Untersuchungen zur Synthese, PEGylierung und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln für medizinische Anwendungen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Florian Schulz

aus Heide (Holstein)

Hamburg, März 2014

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Horst Weller durchgeführt.

- 1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Horst Weller
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Alf Mews

Disputation: 30.04.2014

Inhalt

| InhaltV |
|--|
| AbbildungsverzeichnisIX |
| Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen XII |
| Kapitel 1 Synthese Citratstabilisierter |
| Goldnanopartikel1 |
| 1.1 Einleitung zu Kapitel 1 |
| 1.2 Theoretische Grundlagen und Forschungshintergrund zu Kapitel 1 |
| 1.2.1 Stand der Forschung zur Synthese von Gold Nanopartikeln |
| 1.2.2 Mechanistische Aspekte der Synthese von Gold Nanopartikeln |
| 1.2.3 Seeded Growth Synthese14 |
| 1.2.4 Stabilität und Reinigung von AuNP |
| 1.2.5 Funktionalisierung von AuNP22 |
| 1.2.6 Optische Eigenschaften und Charakterisierung von AuNP |
| 1.3 Experimentalteil Kapitel 1 |
| 1.3.1 Chemikalien |
| 1.3.2 Spektroskopische Methoden |
| 1.3.3 DLS- und ζ-Potential-Messungen |
| 1.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie |
| 1.3.5 Synthesen |
| 1.4 Ergebnisse und Diskussionen Kapitel 143 |

| 1.4.1 Synthese sphärischer, citratstabilisierter Goldnanopartikel | |
|---|-------|
| 1.4.2 Seeded Growth Synthesen | 50 |
| 1.4.3 Herausforderungen bei der Seeded Growth Synthese | 55 |
| 1.4.4 Variationen der Seeded Growth Synthese | 59 |
| 1.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Seeded Growth Synthese | 60 |
| 1.4.6 Fazit zu Kapitel 1 | 64 |
| Kapitel 2 Synthese und Charakterisierung von | |
| PEGylierten Goldnanopartikeln | 65 |
| 2.1 Einleitung zu Kapitel 2 | 67 |
| 2.2 Theoretische Grundlagen und Forschungshintergrund zu Kapitel 2. | 69 |
| 2.2.1 Oberflächenchemie und SAMs auf Au und AuNP | 69 |
| 2.2.2 Funktionalisierungsstrategien | |
| 2.2.3 PEGylierung von AuNP | |
| 2.2.4 Stabilität von AuNP-Konjugaten | 91 |
| 2.2.5 Ligandenstruktur und Stabilität von AuNP-Konjugaten | 95 |
| 2.3 Experimentalteil zu Kapitel 2 | 99 |
| 2.3.1 Materialien | |
| 2.3.2 Charakterisierung | |
| 2.3.3 Goldnanopartikel-Synthesen | 100 |
| 2.3.4 Ligandensynthesen | 100 |
| 2.4 Ergebnisse und Diskussionen zu Kapitel 2 | 111 |
| 2.4.1 Synthese und Charakterisierung von AuNP@PEGx-Konjugaten | 111 |
| 2.4.2 Einfluss der PEG-Länge auf die Stabilität von AuNP@PEG-Konjugater | 1 119 |
| 2.4.3 Einfluss des Spacers auf die Stabilität von AuNP@PEGx-Konjugaten | 128 |

| 2.4.4 Fazit zu Kapitel 2 | |
|---|-------|
| Kapitel 3 Funktionalisierung von Goldnanopartikeln | |
| mit L1-Peptiden | 155 |
| 3.1 Einleitung zu Kapitel 3 | 157 |
| 3.2 Theoretischer Hintergrund und Stand der Forschung zu Kapitel | 3 159 |
| 3.2.1 Drug-Delivery mit AuNP | |
| 3.2.2 AuNP zur Diagnose und Behandlung neurologischer Erkrankungen. | |
| 3.2.3 Das Zelladhäsionsmolekül L1 und L1-Peptide | |
| 3.2.4 Konjugation von Peptiden an AuNP | |
| 3.3 Experimentalteil zu Kapitel 3 | 169 |
| 3.3.1 Materialien | |
| 3.3.2 Peptid-Stammlösungen | |
| 3.3.3 Synthese der AuNP-Konjugate | |
| 3.3.4 Charakterisierung der Konjugate | |
| 3.4 Ergebnisse und Diskussionen zu Kapitel 3 | 173 |
| 3.4.1 Synthese und Charakterisierung von AuNP@L1-Konjugaten | |
| 3.4.2 Biologische Funktionalität der AuNP@L1-Konjugate | |
| 3.4.3 Fazit zu Kapitel 3 | |
| Zusammenfassung | |
| Abstract | |
| Referenzen | 197 |
| Sicherheit | 217 |

| Lebenslauf | |
|------------|--|
| | |
| Danksagung | |

Abbildungsverzeichnis

| Abb. 1.1: Mechanismus der Goldnanopartikel-Synthese nach Turkevich | 7 |
|--|----|
| Abb. 1.2: Seeded Growth mit und ohne Verdünnung. | 16 |
| Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) | 25 |
| Abb. 1.4: Wirkungsquerschnitte σ_{Ext} , σ_{Str} und σ_{Abs} von AuNP mit Durchmessern von 5- | |
| 100 nm | 26 |
| Abb. 1.5: Vergleich von Mie-Theorie und Experiment. | 28 |
| Abb. 1.6: Nahfeld eines sphärischen AuNP mit $d = 40$ nm. | 33 |
| Abb. 1.7: Unterschiedliche Stabilisierung von AuNP | 36 |
| Abb. 1.8: Abhängigkeit der AuNP-Synthese vom pH-Wert | 46 |
| Abb. 1.9: Vergleich von Variationen der Turkevich-Synthese. | 47 |
| Abb. 1.10: Einfluss von EDTA auf die AuNP-Synthese. | 49 |
| Abb. 1.11: Einfluss von EDTA auf die Form der AuNP. | 50 |
| Abb. 1.12: Schema der Seeded Growth Synthese Variante 1. | 51 |
| Abb. 1.13: Schema der Seeded Growth Synthese Variante 2. | 51 |
| Abb. 1.14: TEM-Analyse der Generationen 0-6 einer Seeded Growth Synthese (SG6) | 53 |
| Abb. 1.15: UV/vis-Analytik einer Seeded Growth Synthese (SG6) | 54 |
| Abb. 1.16: Theoretische Zunahme des Durchmessers von AuNP in einer Seeded Growth | |
| Synthese | 55 |
| Abb. 1.17: Vergleich der Seeded Growth Synthesen SG6 und SG9 | 56 |
| Abb. 1.18: TEM-Aufnahmen der Generation 4 (g42) einer Seeded Growth Synthese, die | |
| mit 75 % Citratpuffer durchgeführt wurde | 57 |
| Abb. 2.1: Struktur einer SAM. | 70 |
| Abb. 2.2: Oberflächenstruktur einer SAM. | 71 |
| Abb. 2.3: Durchschnittliche Struktur der Alkylketten in SAMs als Ein-Kettenmodell | 73 |
| Abb. 2.4: Mechanismus der Selbstanordnung von Alkylthiolen auf Gold | 75 |
| Abb. 2.5: Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichte von Thiolen und Disulfiden an | |
| Goldoberflächen. | 76 |
| Abb. 2.6: Anteil der Oberflächenatome in Goldnanopartikeln. | 79 |
| Abb. 2.7: Konzept der Multifunktionalisierung von AuNP. | 83 |
| Abb. 2.8: Strategien zur Funktionalisierung von AuNP. | 85 |
| Abb. 2.9: Schematische Darstellung der mushroom- und der brush-Konformation | 90 |

| Abb. 2.10: Synthese von PEGMUA | 112 |
|--|-----|
| Abb. 2.11: IR-Spektren der Liganden PEGMUA (PEGMUA2k), PEGMUA5k, | |
| PEGMPA, PEGMPAA und PEGLIP. | 113 |
| Abb. 2.12: Konjugation von PEGx-Liganden an citratstabilisierte AuNP und Übersicht | |
| über alle verwendeten PEGx-Liganden | 115 |
| Abb. 2.13: Analytik von AuNP12@PEGx-Konjugaten | 116 |
| Abb. 2.14: NMR-Analytik von AuNP. | 118 |
| Abb. 2.15: Ergebnisse der zeitaufgelösten UV-vis-Spektroskopie zur Verfolgung der | |
| Reaktion der AuNP54@PEGNH2-Konjugate mit Cyanid | 122 |
| Abb. 2.16: DTT-induzierte Aggregation | 123 |
| Abb. 2.17: Stabilität in Abhängigkeit von der (PEG-) Ligandenlänge | 125 |
| Abb. 2.18: DLS-Experimente zum Einfluss der (PEG-) Ligandenlänge | 126 |
| Abb. 2.19: Einfluss der PEG-Länge auf die Ätzreaktion | 127 |
| Abb. 2.20: Schematische Darstellung der veränderten Konjugatgeometrie durch | |
| Verwendung eines Spacers | 128 |
| Abb. 2.21: Analytik von AuNP12B@PEGx-Konjugaten | 129 |
| Abb. 2.22: Stabilität von AuNP-Konjugaten gegen Elektrolyt-induzierte Aggregation | 130 |
| Abb. 2.23: Titration von AuNP-Konjugaten mit KCN-Lösung | 131 |
| Abb. 2.24: In situ-Verfolgung des oxidativen Ätzens von AuNP-Konjugaten | 132 |
| Abb. 2.25: Ätzkinetiken von gealterten AuNP-Konjugaten. | 133 |
| Abb. 2.26: Ätzreaktion von AuNP-Konjugaten mit 25 mM KCN | 134 |
| Abb. 2.27: Ätzreaktion mit 30 nm AuNP-Konjugaten | 134 |
| Abb. 2.28: Struktur der untersuchten Spacer | 136 |
| Abb. 2.29: Untersuchung der Desorption mithilfe der Ätzreaktion | 138 |
| Abb. 2.30: Ätzreaktion von AuNP-Konjugaten mit 10 mM KCN | 139 |
| Abb. 2.31: Untersuchung der Ätzprozesse von AuNP12@PEGMUA | 140 |
| Abb. 2.32: Vereinfachter Ätzmechanismus | 142 |
| Abb. 2.33: Einfluss von freien Liganden auf die Ätzreaktion. | 144 |
| Abb. 2.34: Analyse der DTT-induzierten Aggregationen | 146 |
| Abb. 2.35: Analogie der Kinetiken von Aggregation und Folgereaktion | 147 |
| Abb. 2.36: Stabilisierung von AuNP durch PEGLIP. | 151 |
| Abb. 3.1: Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1. | 165 |
| Abb. 3.2: Synthese der L1-funktionalisierten AuNP. | 174 |
| Abb. 3.3: Illustration der Liganden und AuNP. | 175 |

| Abb. 3.4: Übersicht über die synthetisierten Konjugate und deren Benennung 176 |
|--|
| Abb. 3.5: Analyse der Agglomerationsprozesse mittels UV/vis-Spektroskopie 177 |
| Abb. 3.6: Spektroskopische Verfolgung der Agglomeration von AuNP@L1- |
| Konjugaten |
| Abb. 3.7: Charakterisierung der AuNP@L1-Konjugate mit einem Überschuss von |
| PEGMUA in der Ligandenhülle180 |
| Abb. 3.8: Kolloidale Stabilität der AuNP@L1-Konjugate in PBS |
| Abb. 3.9: Stabilität der AuNP40-Konjugate in relevanten Puffern und Medien |
| Abb. 3.10: Vergleich der Wirkung von freiem L1-Peptid und AuNP@L1-Konjugaten 183 |
| Abb. 3.11: Verstärkung der Neuritogenese und verbessertes Zellüberleben durch |
| AuNP@L1-Konjugate184 |
| Abb. 3.12: Analyse der zellulären Bindung von AuNP@L1-Konjugaten mittels SEM 187 |
| Abb. 3.13: Neuritogenese von murinen zerebellären Neuronen, Motoneuronen und |
| dorsalen Hinterwurzelganglienneuronen in Gegenwart L1-funktionalisierter |
| AuNP |
| Abb. 3.14: Modellierte Strukturen der verschiedenen L1-Peptide |
| Abb. 3.15: Stimulation des Wachstums von Fortsätzen und der Proliferation von |
| Schwann-Zellen |

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| A450 | Absorbanz bei 450 nm |
|-----------------|--|
| ACSF | Artifizielle Cerebrospinale Flüssigkeit |
| AF | Aggregationsfaktor |
| AFM | Rasterkraftmikroskopie |
| ANOVA | Varianzanalyse (in dieser Arbeit: Einfaktorielle) |
| AuNP | Goldnanopartikel |
| AuNR | Goldnanostäbchen bzwNanorods |
| BBB | Blut-Hirn-Schranke |
| BEM | Boundary Element Methode |
| BisNTA-disulfid | 3,3'-Dithiobis[N-(5-N', N'-(dicarboxymethyl)amino-5- |
| | carboxypentyl)propionamide] |
| C | Cystein (Einbuchstabencode) |
| C.A. | Citronensäure |
| СТ | Computertomographie |
| СТАВ | Cetyl-trimethylammoniumbromid |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCS | Differentielle Zentrifugalsedimentation |
| DDA | Discrete Dipole Approximation |
| DLS | Dynamische Lichtstreuung |
| DLVO | Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek |
| DSC | Dynamische Differenzkalorimetrie |
| DTT | DL-Dithiothreitol |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |
| | |

| XIV | Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen |
|---------------------|---|
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EF | Verstärkungsfaktor |
| EG ₄ MUA | (11-Mercaptoundecyl)tetra(ethylenglykol) |
| EG ₄ SH | (Mercapto)tetra(ethylenglykol) |
| EPR | Enhanced Permeability and Retention |
| ES-DMA | Elektrospray-differentielle Mobilitätsanalyse |
| FDTD | Finite Difference in the Time Domain Methode |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| GIXRD | Röntgendiffraktometrie mit streifendem Einfall |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| HAS | Heliumatomstreuung |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HREELS | Hochauflösende Elektronenenergieverlustspektroskopie |
| IR | Infrarot (FTIR: Fourier-Transform-IR-Spektroskopie) |
| K | Lysin (Einbuchstabencode) |
| μCP | Mikrokontaktdruck |
| MPC | Monolayer Protected Cluster |
| MS | Massenspektrometrie |
| MUA | 11-Mercaptoundecansäure |
| MWCO | Molecular Weight Cut-Off |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid bzw. 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidindion |
| NLS | Nukleares Lokalisierungssignal |
| NMR | Kernspinresonanz |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PEG | Polyethylenglykol |

| PEGAmidMUA | α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(11-mercaptoundecansäureamid) |
|-------------|---|
| PEGLIP | $\alpha - Methoxy - polyethylenglykol - \omega - ((R/S) - 5 - (1, 2 - dithiolan - 3 - yl) pentanoat)$ |
| PEGMM | Polyethylenglykol-monomethylether |
| PEGMPA | α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(3-mercaptopropionat) |
| PEGMPAA | α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(4-mercaptophenylethanoat) |
| PEGMUA | α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(11-mercaptoundecanoat) |
| PEGMUA5k | PEGMUA mit Molmasse ~ 5000 g/mol |
| PEG3kNH2 | α -Amino- ω -mercapto-polyethylenglykol-hydrochlorid |
| | 3k: Molmasse ~ 3000 g/mol |
| | 5k: Molmasse ~ 5000 g/mol |
| | 10k: Molmasse ~ 10000 g/mol |
| PEGylierung | Funktionalisierung mit PEG-Liganden |
| PLL | Poly-L-Lysin |
| PLO | Poly-L-Ornithin |
| PPTT | Plasmonische Photothermale Therapie |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RAIRS | Reflektionsabsorptionsinfrarotspektroskopie |
| RedOx | Reduktion-Oxidation |
| RES | Reticuloendotheliales System |
| RME | Rezeptorvermittelte Endozytose |
| SAM | Selbstanordnende Monolage |
| SAXS | Röntgenkleinwinkelstreuung |
| S.C. | Natriumcitrat |
| SEM | Rasterelektronenmikroskopie |
| SERS | Oberflächenverstärkte Raman-Streuung oder -Spektroskopie |
| SPB | Oberflächenplasmonenresonanz-Bande |

| XVI | Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen |
|-----------|---|
| SPM | Rastersondenmikroskopie |
| SPR | Oberflächenplasmonenresonanz |
| STM | Rastertunnelmikroskopie |
| Sulfo-NHS | <i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid bzw. 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidindion-3-sulfonat |
| TAT | Aktivator der Transkription |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TGA | Thermogravimetrische Analyse |
| THF | Tetrahydrofuran |
| UPD | Unterpotential Abscheidung |
| UV/vis | ultraviolettes und sichtbares Licht |
| XANES | Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie |
| XPS | Röntgenphotoelektronenspektroskopie |

Kapitel 1

Synthese Citratstabilisierter Goldnanopartikel

Einige der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse sind veröffentlicht in:

Schulz, F.; Homolka, T.; Bastús, N. G.; Puntes, V.; Weller, H.; Vossmeyer, T. Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2014**, *30*, 10779–10784.

Copyright (2014) American Chemical Society

1.1 Einleitung zu Kapitel 1

Goldnanopartikel gehören zu den meistuntersuchten Nanomaterialien mit einer enormen Anwendungsbreite in unterschiedlichsten Bereichen wie Medizin und Biotechnologie, Materialwissenschaften, Elektronik, Optik und Katalyse. Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Goldnanopartikeln in wässrigen Lösungen, die besonders für medizinische und biotechnologische Anwendungen interessant sind.

Im ersten Kapitel werden Arbeiten zur Synthese citratstabilisierter Goldnanopartikel mit der etablierten Methode von Turkevich und mit der Seeded Growth Synthese vorgestellt. Zunächst wird auf den umfangreichen Forschungshintergrund zu diesen Synthesen eingegangen, um dann im Ergebnisteil zu zeigen, wie darauf aufbauend die Synthesen optimiert und besser verstanden werden konnten. Elementar für dieses Verständnis ist die Beachtung aller involvierten Parameter, deren Rolle ausführlich dargestellt und diskutiert wird.

Als theoretische Grundlagen, die auch in den folgenden Kapiteln von Bedeutung sein werden, werden darüber hinaus die optischen Eigenschaften, Aspekte der Stabilität und die Charakterisierung von Goldnanopartikeln behandelt.

1.2 Theoretische Grundlagen und Forschungshintergrund zu Kapitel 1

1.2.1 Stand der Forschung zur Synthese von Gold Nanopartikeln

Kolloidales Gold war von verschiedenen Kulturen bereits viele Jahrhunderte, insbesondere zum Färben von Glas, aber auch in Alchemie und Medizin, genutzt worden, bevor Michael Faraday Mitte des neunzehnten Jahrhunderts dessen kolloidale Natur erkannte¹ und damit die moderne wissenschaftliche Beschäftigung mit Goldkolloiden einleitete.^{2,3} Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des optischen Verhaltens kolloidaler sphärischer Metallpartikel leistete Gustav Mie 1908 mit der nach ihm benannten Theorie zur Streuung und Absorption sphärischer Objekte.⁴ 1951 beschrieben Turkevich, Stevenson und Hillier die Synthese von kolloidalem Gold in wässriger Lösung mit Citrat als Reduktionsmittel und Stabilisator.⁵ Diese als Turkevich-Synthese bekannte Methode ist heute wohl die meistgenutzte nasschemische Synthesemethode für Goldnanopartikel (AuNP) in wässriger Lösung.^{2,6,7} Gründe dafür dürften die Einfachheit der Synthese und gute Stabilität der erhaltenen AuNP sein, insbesondere aber auch die Möglichkeit, die stabilisierenden Citratmoleküle durch Moleküle mit stärker bindenden funktionellen Gruppen mit geringem synthetischen Aufwand zu ersetzen, was solche citratstabilisierten AuNP als enorm vielseitiges, funktionalisierbares Material qualifiziert. Bis heute werden sowohl Mechanismus der Turkevich-Synthese als auch verschiedene Variationen diskutiert und publiziert. Die ersten Verfeinerungen der Turkevich Synthese lieferte Frens in den frühen siebziger Jahren.⁸ Er konnte zeigen, dass durch Änderung des Verhältnisses von Natriumcitrat zum Goldprecursor Tetrachloridogoldsäure die Partikelgröße über einen weiten Größenbereich, von 12-150 nm im Durchmesser, einstellbar ist. Allerdings nahmen Uniformität und Monodispersität der erhaltenen Partikel mit zunehmender Größe ab. Variationen der Turkevich Synthese und alternative Ansätze zur Synthese von AuNP zielen folglich in der Regel auf eine Verbesserung der Monodispersität und Reproduzierbarkeit der Synthese ab, vor allem bezüglich der AuNP mit hohen Durchmessern.^{9,7} Weitere Optimierungsansätze adressieren die Konzentration der erhaltenen Partikel¹⁰ und deren Uniformität.^{9,11-14} Alternative Ansätze zur Synthese von AuNP in wässriger Lösung umfassen die Synthese mit verschiedensten Reduktionsmitteln wie Borhydrid, Aminoboranen, Hydrazinen, Formaldehyd, Hydroxylaminen, Alkoholen, Oxalsäuren, Polyolen, Zuckern, Wasserstoffperoxid, Sulfiten, Kohlenstoffmonoxid, Wasserstoff, Ethen und bestimmten Metallkomplexen.^{2,7} Als Stabilisatoren spielen neben Natriumcitrat Schwefelliganden, insbesondere Thiole, eine wichtige Rolle, außerdem Phosphor-, Sauerstoffund Stickstoff-basierte Liganden, Dendrimere, Polymere und Tenside.⁷

1.2.2 Mechanistische Aspekte der Synthese von Gold Nanopartikeln

Die Turkevich-Synthese beruht auf der Reduktion von Tetrachloridogoldsäure, dem Precursor, bei erhöhter Temperatur in wässriger Lösung. Als Reduktionsmittel wird tribasisches Natriumcitrat ($Na_3C_6O_5H_7$ ·2 H_2O , im Folgenden mit S.C. abgekürzt) verwendet. Bereits Turkevich *et al.* stellten fest, dass die beobachtete temperaturabhängige Nukleation angesichts der geringen eingesetzten Goldkonzentration nicht zufriedenstellend mit einer Fluktuationstheorie wie dem LaMer Modell¹⁵ erklärt werden kann, dass das Erreichen einer kritischen Nukleationskonzentration fordert. Sie vermuteten daher, dass ein organisierendes Element in der Synthese hohe lokale Goldkonzentrationen bewirken muss, die eine Nukleation begünstigen. Diese Vermutung wurde bestärkt durch die Feststellung, dass sämtliche getesteten Reduktionsmittel, die für die Synthese von Goldkolloiden prinzipiell geeignet waren, polydentate Komplexbildner waren und somit polymere Komplexe mit Goldionen bilden konnten. Eine Ausnahme stellte die von Faraday vorgeschlagene etherische Phosphorlösung als Reduktionsmittel in der Goldkolloidsynthese dar, doch auch hier ist eine organisierende Funktion der in Wasser emulgierten Phosphorlösung denkbar.

Weiterhin erkannten Turkevich *et al.*, dass als primäres Oxidationsprodukt von Citrat die Entstehung von Acetondicarboxylat wahrscheinlich ist. Zusammenfassend lässt sich der Mechanismus der Turkevich-Synthese nach heutigem Erkenntnisstand wie in Abbildung 1.1 gezeigt zusammenfassen: Der erste Schritt ist die Oxidation von Citrat zu Acetondicarboxylat. Diese Oxidation kann sowohl durch Goldionen, bei erhöhten Temperaturen aber auch durch Luftsauerstoff erfolgen.¹² Die Gold(III)ionen werden zu Gold(I)ionen reduziert, die durch Acetondicarboxylat verbrückend komplexiert werden können, wodurch hohe lokale Goldkonzentrationen entstehen, die die anschließende Disproportionierung zu Gold(0) und Gold(III) und Nukleation des Gold(0) begünstigen. Die entstandenen Nuklei wirken als Keime und erreichen durch Aufwachsen weiteren Goldes ihre finale Größe.

Der genaue Mechanismus von Keimbildung und Wachstum ist Gegenstand aktueller Forschung. Grundsätzlich können hier mehrere Prozesse eine Rolle spielen. Entsprechend dem LaMer-Modell würde einer kritischen Übersättigung, die im Falle der Turkevich-Synthese lokal innerhalb der polymeren Precursor-Acetondicarboxylat-Komplexe vorliegt, eine schlagartige Nukleation folgen. Diese simultane schlagartige Nukleation geht mit einer Verringerung der Precursor-Konzentration einher, so dass die kritische Übersättigungskonzentration unterschritten wird und keine weitere Nukleation stattfindet. Eine kurze, und von der anschließenden Wachstumsphase scharf getrennte Nukleationsphase ist vorteilhaft für die Monodispersität der entstehenden Partikel. Eine längere Nukleationsphase hat eine Verbreiterung der Größenverteilung zur Folge, da sich für die einzelnen Nuklei die anschließenden Wachstumsphasen stärker unterscheiden. Früh entstandene Nuklei wachsen lange und damit zu großen Partikeln, spät entstandene Nuklei dagegen wachsen kurz zu vergleichsweise kleinen Partikeln. Im Idealfall fände eine instantane Nukleation statt, die scharf von der folgenden Wachstumsphase getrennt wäre. LaMer prägte hierfür den Ausdruck der "burst nucleation". Obwohl Nukleation und Wachstum in der Turkevich-Synthese nicht zufriedenstellend mit dem LaMer-Modell alleine beschrieben werden können, gilt auch hier der Zusammenhang von schneller Nukleation und hoher Monodispersität.¹⁶ Das nach der Nukleation verbleibende Precursormaterial wächst dann auf die bereits entstandenen Nuklei auf. Abgesehen von Nukleation und Wachstum sind Sinterprozesse zu berücksichtigen. Bei der Koaleszenz verschmelzen zwei Cluster, während bei der Ostwald Reifung ein größerer Cluster auf Kosten eines Kleineren wächst.



Abb. 1.1: Mechanismus der Goldnanopartikel-Synthese nach Turkevich.

Mehrere detaillierte Studien des Nukleations- und Wachstumsmechanismus in der AuNP-Synthese nach Turkevich wurden in den letzten Jahren veröffentlicht, die beachtliche Unterschiede in ihren Schlussfolgerungen aufweisen. Pong *et al.* postulierten intermediäre Nanodrähte, die schließlich in sphärische AuNP fragmentieren.¹⁷ Ähnliche intermediäre Strukturen wurden auch von Ji et al. gefunden.¹⁸ Polte et al. dagegen schlussfolgerten aus in situ Untersuchungen der AuNP-Synthese mittels Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (XANES, engl.: X-ray absorption near-edge structure spectroscopy) und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, engl.: small angle x-ray scattering) einen mehrstufigen Mechanismus, in dem Wachstum durch Aggregation und Koaleszenz eine entscheidende Rolle spielen.¹⁹ Hinweise auf Nanodrähte wurden in diesen Untersuchungen ausdrücklich nicht gefunden. Kimling et al. folgerten aus kinetischen Untersuchungen ebenfalls einen mehrstufigen Prozess, in dem der Nukleation zu Primärpartikeln eine Agglomeration und Koaleszenz dieser Primärpartikel zu größeren Partikeln folgt, begleitet von Wachstum der Partikel durch Precursorverbrauch.²⁰ Der polykristalline Charakter der erhaltenen AuNP, der mittels Pulverdiffraktometrie nachgewiesen werden konnte, ist in Einklang mit diesem Mechanismus. Diese Beispiele mögen verdeutlichen, dass durch fundamentale Untersuchungen und Beobachtungen bereits durch Turkevich eine detaillierte mechanistische Vorstellung vom Nukleations- und Wachstumsmechanismus in der AuNP-Synthese mit Citrat entwickelt werden konnte, die durch zahlreiche Untersuchungen bis heute bereichert wurde und wird. Als ex situ Methode spielt in diesen Untersuchungen insbesondere die Elektronenmikroskopie (Transmissionselektronenmikroskopie, TEM und Rasterelektronenmikroskopie, SEM) eine wichtige Rolle, in situ Untersuchungen stützen sich auf UV/vis-Spektroskopie und Röntgenmethoden wie SAXS. Nichtsdestotrotz sind einige Aspekte der AuNP-Synthese noch nicht abschließend aufgeklärt und vorliegende Studien zeichnen nicht immer ein einheitliches Bild. Die komplexen Vorgänge bei Nukleation und Wachstum der Partikel, insbesondere in der Anfangsphase, sind nach wie vor nicht vollständig verstanden und folglich Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschung. Es existieren zahlreiche Hinweise darauf, und auch die Theorie legt nahe, dass die Nukleations- und Wachstumsvorgänge empfindlich von den Parametern der Reaktionsführung abhängen und diesem Umstand mögen auch manche, auf den ersten Blick, widersprüchliche Beobachtungen und Ergebnisse geschuldet sein. Die Optimierung der Turkevich-Synthese kann folglich nur unter exakter Berücksichtigung aller involvierten Parameter erfolgen. Dazu zählen Temperatur, pH-Wert, Durchmischung, Reaktantenkonzentrationen und während der Reaktion entstehende Spezies. Diese Parameter werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

1.2.2.1 Citrat als pH-Mediator

Die komplexe Rolle des Citrats in der Turkevich-Synthese als Reduktionsmittel, strukturgebendes Element (in der oxidierten Form als Acetondicarboxylat) und Stabilisator beinhaltet als weiteren Aspekt die Regulation des pH-Wertes, da Citrat als schwache Base agiert.¹⁸ Nicht nur die Reaktivität des Acetondicarboxylats wird durch den pH-Wert beeinflusst¹² sondern auch die des Precursorkomplexes. Tetrachloridogoldsäure bildet beim Lösen in Wasser

auch die des Precursorkomplexes. Tetrachloridogoldsäure bildet beim Lösen in Wasser tetrakoordinierte Komplexanionen deren Ligandenzusammensetzung aus Chlorid- und Hydroxidionen (AuCl₄, AuCl₃(OH), AuCl₂(OH), AuCl₂(OH), AuCl₂(OH), oder Au(OH), vom pH-Wert abhängt. Mit zunehmenden pH-Wert werden mehr Hydroxo-Liganden koordiniert, was die Reaktivität der Komplexe herabsetzt.¹⁸ Dies wirkt einer schnellen Nukleation entgegen, die für eine hohe Monodispersität wünschenswert ist. Andererseits nimmt die Reaktivität des Acetondicarboxylats und die elektrostatische Stabilisierung der Partikel durch Citrat mit sinkendem pH Wert ab, so dass nicht bei beliebig niedrigem pH-Wert gearbeitet werden kann. Die schlechtere Stabilisierung bei niedrigeren pH-Werten beeinflusst möglicherweise den Wachstumsmechanismus. So postulieren Ji et al. einen pH von etwa 6.5 als Grenzwert zwischen zwei fundamental unterschiedlichen Wachstumsmechanismen. Unter pH 6.5 folgt einer schnellen Nukleation (aufgrund der höheren Reaktivität der Precursorspezies bei niedrigem pH) die Aggregation zu Nanodrähten, die dann zu sphärischen Partikeln reifen, deren Uniformität und Monodispersität nicht optimal ist. Bei pH-Werten über 6.5 dagegen folgt einer langsameren Nukleation das langsame Wachstum zu Partikeln höherer Qualität. Die Autoren wiesen auf den bemerkenswerten Umstand hin, dass der beobachtete pH-Grenzwert gut mit dem pK_{a3}-Wert der Citronensäure von 6.4 übereinstimmt. Unabhängig davon, ob der vorgeschlagene Mechanismus im Detail bestätigt werden wird und verallgemeinert werden kann, steht außer Frage, dass der pH-Wert einen ganz entscheidenden Parameter in der AuNP-Synthese darstellt.

1.2.2.2 Reaktanten

Neben den absoluten Konzentrationen der Reaktanten beeinflusst das Verhältnis von Citrat zu Gold-Precursor wesentlich die Synthese der AuNP und kann dazu genutzt werden, die Partikelgröße zu kontrollieren. Nach ersten Hinweisen durch Turkevich und Stevenson auf den Einfluss der Citrat-Konzentration lieferte Frens eine umfassende Studie zum Einfluss der relativen Reaktantenkonzentrationen, deren Ergebnisse vielfach bestätigt wurden und daher als reproduzierbar gelten.^{21,8,22,23,5} Im Bereich eines Reaktantenverhältnisses S.C.:HAuCl₄ von 0.43 bis etwa 5 nimmt die finale Partikelgröße ab, während die Monodispersität zunimmt. Bei höheren Citratüberschüssen nimmt die Partikelgröße dann wieder zu, während die Monodispersität abnimmt. Gründe für diese Abhängigkeit sind der Einfluss des pH-Wertes auf Nukleation und Wachstum und die Rolle des Acetondicarboxylats bei der Nukleation. Mit steigender Citratkonzentration steigt der pH-Wert, was sich, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, bis zu einer bestimmten Grenze positiv auf Nukleation und Wachstum auswirken

könnte. Bei hohen Citratüberschüssen dürfte jedoch als weiterer Effekt die abschirmende Wirkung der Natriumionen eine Rolle spielen, deren Konzentration ebenfalls zunimmt. Diese abschirmende Wirkung reduziert die elektrostatische Stabilisierung der AuNP durch gebundenes Citrat wodurch Aggregation und unregelmäßiges Wachstum begünstigt wird.²³ Dies könnte eine Erklärung für die beobachtete Zunahme von Partikelgröße und Polydispersität bei hohen Citratüberschüssen sein. Interessant ist die Beobachtung von Frens, dass selbst bei einem sehr niedrigen Verhältnis S.C.:HAuCl₄ von 0.43 eine vollständige Reduktion des Gold-Precursors stattfindet, was im Widerspruch zum mechanistisch geforderten Verhältnis S.C.:HAuCl₄ von 1.5 steht (vgl. Abb. 1.1: 3 Citratmoleküle reduzieren im beschriebenen Mechanismus 2 Moleküle HAuCl₄). Kumar et al. wiesen auf die Rolle des Acetons in diesem Zusammenhang hin.²³ Aceton entsteht als Zerfallsprodukt von Acetondicarboxylat in der Synthese und ist in der Lage Gold(III) zu reduzieren. Unter Annahme einer entsprechenden Stöchiometrie kann damit die Beobachtung von Frens erklärt werden. In dieser Studie, in der die AuNP-Synthese nach Turkevich modelliert wurde, wird der Einfluss des Zerfalls von Acetondicarboxylat auf die Nukleationsrate unterstrichen. Nur unter Berücksichtigung dieses Zerfalls zu Aceton und Kohlenstoffdioxid konnten die experimentellen Beobachtungen zum Zusammenhang von Reaktantenverhältnis und Partikelgröße mit guter Übereinstimmung modelliert werden. In einer anderen Studie wurde als weiteres Nebenprodukt Acetat identifiziert.²⁴ Der Einfluss der relativen Reaktantenkonzentrationen muss demzufolge auch im Zusammenhang mit dem Einfluss der Temperatur betrachtet werden, denn sowohl die Oxidation des Citrats als auch die Degradation des Acetondicarboxylats sind temperaturabhängig und Acetondicarboxylat und Aceton sind zudem in diesem Temperaturbereich labile bzw. flüchtige Substanzen.

1.2.2.3 Temperatur

Sowohl Nukleation und Wachstum als auch die involvierten chemischen Reaktionen bei der AuNP-Synthese sind temperaturabhängige Prozesse und dementsprechend ist die Kinetik der Gesamtreaktion stark temperaturabhängig. Bei der einfachen Synthese von AuNP wird mit einer kochenden Lösung gearbeitet, also bei ~100 °C, um eine möglichst schnelle Nukleation zu erreichen. Die Nukleation und das Erreichen einer kritischen Größe kann durch den Farbumschlag der Reaktionsmischung über dunkel-bläulich, -grau, -schwarz, oder – violett nach weinrot leicht beobachtet werden. Wird bei niedrigeren Temperaturen gearbeitet, so wird die Nukleationsphase zu Gunsten der Wachstumsphase verzögert. Es entstehen weniger Keime, die zu größeren Partikeln wachsen. Die finale Partikelkonzentration ist folglich geringer. Bei Temperaturen unter etwa 70 °C findet keine Nukleation mehr statt, da

Die Frage, wie lange nach dem Farbumschlag weitergeheizt werden sollte, um weiteres und abschließendes Partikelwachstum zu fördern und die komplette Umsetzung des Gold-Precursors zu erreichen, kann anhand der Literatur nicht einheitlich beantwortet werden und hängt sicherlich von den genauen Bedingungen ab. Angegebene Reaktionszeiten variieren typischerweise zwischen 5-15 Minuten nach Farbumschlag und insofern dürfte auch ein langsames Abkühlen der Reaktionsmischung für eine komplette Umsetzung ausreichend sein. Wird die Reaktionsmischung längere Zeit auf 100 °C erwärmt, so kann dies eine Erhöhung der Polydispersität und letztlich eine komplette Destabilisierung und Aggregation der Partikel zur Folge habe, die in erster Linie auf die Zersetzung von Citrat und Acetondicarboxylat zu flüchtigen Produkten zurückzuführen sein dürfte.

1.2.2.4 Weitere Faktoren

Wie für eine Kolloidsynthese zu erwarten, haben Verunreinigungen und Durchmischung einen starken Einfluss auf das Ergebnis der Turkevich-Synthese. Kleinste Verunreinigungen können zu einer uneinheitlichen Nukleation führen, da sie als Nukleationskeime fungieren können. Kontaminationen mit Metallionen können das Wachstum der Partikel stark beeinflussen, indem die Metallionen bevorzugt an bestimmte Kristallflächen der wachsenden Goldpartikel adsorbieren, die dadurch für weiteres Wachstum blockiert oder gehemmt werden.²⁵ Eine Folge kann eine geringe Uniformität der Partikel sein. Davon abgesehen können die chemischen Vorgänge in der Synthese durch Kontaminationen beeinflusst werden, zum Beispiel durch katalytische oder RedOx-Prozesse. Da in der Turkevich-Synthese mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet wird, können bereits geringe Kontaminationen das Ergebnis beeinflussen. Wie bei vielen Kolloidsynthesen ist der Vielzahl an relevanten Parametern geschuldet. dass eine zuverlässige Reproduzierbarkeit, insbesondere in anderen Arbeitsumgebungen, eine entscheidende Herausforderung darstellt. Ebenso ist eine Hochskalierung, sowohl durch Erhöhung der absoluten Konzentrationen als auch durch Erhöhung des Reaktionsvolumens, nicht ohne Weiteres möglich.⁷ Die folgenden zwei neueren Ansätze zur Optimierung der Turkevich-Synthese mögen die empfindliche Abhängigkeit dieser Synthese von der Reaktionsführung verdeutlichen. 2010 berichteten Xia et al. die Optimierung der Turkevich-Synthese durch Zugabe von Silbernitrat und Änderung der Reaktionsführung.¹³ In der klassischen Vorschrift wird zu einer kochenden Lösung des Precursors Tetrachloridogoldsäure eine Lösung von Natriumcitrat gegeben, in der optimierten Vorschrift wurde nun ein geringes Volumen (2.5 ml) einer Mischung von Tetrachloridogoldsäure,

Natriumcitrat und Silbernitrat zu kochendem Wasser (47.5 ml) gegeben. Es wurden sphärische Partikel mit einer engeren Größenverteilung und einer deutlich verbesserten Uniformität erhalten. Das zugegebene Silber dient zunächst dazu, die Oxidation von Citrat zu Acetondicarboxylat zu katalysieren und damit deutlich zu beschleunigen. Auf diese Weise wird die Nukleation beschleunigt, was zu einer engeren Größenverteilung führt. Durch Beschleunigung der Nukleation wird zudem die Zersetzung von Acetondicarboxylat zu Aceton verringert, seinerseits als Reduktionsmittel auftreten das und unerwünschte Sekundärnukleation bewirken kann. Die verbesserte Uniformität hingegen kann nicht durch die schnellere Nukleation erklärt werden, sondern ist vermutlich in der Abscheidung von Silberionen an den polykristallinen AuNP begründet, die bevorzugt an (100) und (110) Kristallflächen stattfindet.^{26,27,13} Zwar kann abgeschiedenes Silber oxidiert und durch Goldionen verdrängt werden, es dürfte diesen Prozess jedoch hemmen und damit sphärisches Wachstum an (111) Flächen begünstigen. Ein Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit der genauen Abstimmung der Reaktanten, insbesondere der Silbernitratkonzentration, wenn qualitativ hochwertige AuNP erhalten werden sollen.

Ein einfacherer Ansatz wurde in der Gruppe von Puntes gewählt, indem die Reihenfolge der Reagenzienzugabe umgekehrt wurde. Statt eine siedende Lösung von Tetrachloridogoldsäure vorzulegen, zu der dann Citratlösung gegeben wird, wurde eine Citratlösung zum Sieden erhitzt und dann mit einem kleinen Volumen der Precursorlösung versetzt.¹² Durch diese Änderung der Reaktionsführung konnten Reproduzierbarkeit der Partikelgröße und die Monodispersität verbessert werden. Die Autoren untersuchten die Abhängigkeit der Reaktion vom Acetondicarboxylat und konnten zeigen, dass beim Erwärmen der Citratlösung Acetondicarboxylat entsteht. Mittels HPLC-Experimenten wurde abgeschätzt, dass in einer 2.25 mM Citratlösung nach einer Stunde Erhitzen zum Sieden etwa 9 % des Citrats zu Acetondicarboxylat umgesetzt sind, nach 15 Minuten etwa 2 % und nach 30 Minuten etwa 4 %. Diese Konzentrationen sind durchaus hoch angesichts der Tatsache, dass nur etwa 7 % des Citrats in der beschriebenen Synthese als Reduktionsmittel dienen. Durch die höhere Acetondicarboxylatkonzentration, die bei dieser inversen Methode erzeugt wird, wird die Nukleation beschleunigt und so die Partikelqualität wie beschrieben verbessert, insbesondere wenn nach Erreichen des Siedepunktes die Citratlösung noch einige Zeit weiter erhitzt wird, bevor die Precursorzugabe erfolgt. Das Testen von Gemischen aus Natriumcitrat und Acetondicarboxylat in Form von Aceton-1,3-dicarbonsäure ergab eindeutig, dass durch höhere Aceton-1,3-dicarbonsäurekonzentrationen die Nukleation beschleunigt wird, was durch UV/vis-spektroskopische Reaktionsverfolgung gezeigt werden konnte. Eine Verbesserung der Partikelqualität wurde jedoch nur mit einem Aceton-1,3-dicarbonsäureanteil von 10 % erhalten, bei einem Anteil von 50 % wurden dagegen große und sehr polydisperse Partikel erhalten, eventuell aufgrund von unkontrollierter Sekundärnukleation. Interessanterweise wurden mit reiner Aceton-1,3-dicarbonsäure in drei Stunden keine Nuklei oder AuNP gebildet, was im Widerspruch zu Ergebnissen von Turkevich et al. steht. Der Grund ist vermutlich, dass bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet wurde. Wenn mit reiner Aceton-1,3dicarbonsäure gearbeitet wird, sinkt der pH-Wert der Lösung nach Zugabe der Tetrachloridogoldsäure auf etwa 3.5-4. Bei niedrigen pH-Werten liegt Aceton-1,3dicarbonsäure in protonierter Form vor, wodurch die oxidative Decarboxylierung und damit die Reduktion des Goldprecursors gehemmt wird. Weitere Experimente der Autoren legen nahe, dass der Einfluss des Acetondicarboxylats, dessen Reaktivität mit sinkendem pH-Wert abnimmt, wichtiger ist als der Einfluss der Precursorreaktivität, die mit steigendem pH-Wert abnimmt (vgl. die Abhängigkeit der Ligandenzusammensetzung der komplexen Precursoranionen vom pH-Wert). Da in den Experimenten mit hohen Acetondicarboxylatkonzentrationen und bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet wurde ist jedoch fraglich, ob diese Schlussfolgerung auf andere Synthesebedingungen übertragbar ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die AuNP-Synthese nach Turkevich eine zuverlässige und einfache Methode zur Herstellung sphärischer AuNP mit Durchmessern von 10-20 nm ist, deren Polydispersität *P* (*P* ist die relative Standardabweichung vom Mittelwert der Größenverteilung) in der Regel 10-15 % beträgt. Für eine hohe Reproduzierbarkeit und Steuerbarkeit der Partikelgröße und Versuche der systematischen Optimierung sind die genaue Kenntnis und das Verständnis der Reaktions-, Nukleations- und Wachstumsmechanismen, sowie der verschiedenen Einflussgrößen und Parameter und deren Zusammenspiel notwendig. Die chemischen und physikalischen Vorgänge in der Turkevich-Synthese sind im Gegensatz zur einfachen Durchführung so komplex, dass sie nach wie vor Gegenstand reger Forschungsaktivitäten sind.

In diesem Kapitel wurde der Stand der Forschung zur Turkevich-Synthese ausführlich beschrieben, eine erschöpfende und vollständige Darstellung ist angesichts der Vielzahl der Studien jedoch nicht sinnvoll möglich. Es wurde daher versucht, sich auf Studien zu beschränken, in denen sehr nah an den Bedingungen der ursprünglichen Synthese gearbeitet wurde. Eine Vielzahl von Studien mit stärkeren Änderungen der Bedingungen sind veröffentlicht, z.B. die zusätzliche Anwendung von Ultraschall,^{28,29} Bestrahlung³⁰ oder die Verwendung von Deuteriumoxid anstelle von Wasser als Lösungsmittel.³¹ Es ist jedoch der grundlegende Gedanke nicht von der Hand zu weisen, dass die Einfachheit der Synthese und deren Reproduzierbarkeit unmittelbar zusammenhängen und durch Einführung zusätzlicher Größen der ohnehin schon große Parameterraum schlechter kontrollierbar wird. Insofern ist eine Optimierung der Synthese auch immer mit einer Abwägung von Optimierungsnutzen (z.B. in Form einer besseren Größenverteilung) und vermehrtem Syntheseaufwand (z.B. durch zusätzliche Apparaturen, Reagenzien etc.) zu bewerten.

1.2.3 Seeded Growth Synthese

Die Synthese von AuNP mit größeren Durchmessern, etwa ab 30 nm, kann zwar wie bei Frens⁸ beschrieben durch Variation der Reaktantenverhältnisse erreicht werden, es ist jedoch heute etabliert, dass ein sukzessives Wachstum der AuNP in einer mehrstufigen Synthese vorteilhafter ist.^{32–34} Bei diesen sogenannten Seeded Growth Synthesen wird zunächst eine Population kleiner Partikel synthetisiert, auf die dann durch schrittweise, abgestimmte Zugaben von Precursormaterial weitere Schichten aufwachsen. Die Herausforderung ist dabei, Nukleation in den Wachstumsschritten zu vermeiden und ein gleichmäßiges Aufwachsen zu erreichen. Grundsätzlich katalysieren die Seed-Partikel die Reaktion des Precursors an ihrer Oberfläche³⁵ und es kann daher prinzipiell mit milderen Reduktionsmitteln oder bei tieferen Temperaturen gearbeitet werden als bei der eigentlichen Partikelsynthese.

Erste Arbeiten in der Gruppe von Natan bewiesen die grundsätzliche Leistungsfähigkeit der Seeded Growth Synthese.^{32,36} Mit verschiedenen Reduktionsmitteln wurden Partikel bis zu einem Durchmesser von d = 100 nm mit besserer Monodispersität und Uniformität als mit der von Frens beschriebenen Methode erhalten.^{32,36,8} Allerdings wurde die Ausbeute durch die Bildung von Zweitpopulationen verringert. In den Gruppen von Murphy und Liz-Marzán wurde die Seeded Growth Synthese erweitert und verbessert.^{33,34} Mit dem kationischen Tensid Cetyl-trimethylammoniumbromid (CTAB) als Stabilisator und Ascorbinsäure als Reduktionsmittel konnten sphärische AuNP bis zu einem Durchmesser von etwa 180 nm mit guter Formkontrolle und hoher Monodispersität synthetisiert werden. Insbesondere für Anwendungen in Medizin und Biotechnologie ist jedoch ein entscheidender Nachteil dieser Synthesen, dass CTAB wesentlich schwieriger durch andere Liganden zu ersetzen ist als Citrat bzw. Acetondicarboxylat. Zudem ist CTAB zytotoxisch und kann z.B. in Zellstudien zu falschen Ergebnissen führen, wenn es nicht sorgfältig entfernt wurde.³⁷ Ähnlich problematisch in dieser Hinsicht sind Synthesen die mit Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol) als Reduktionsmittel arbeiten, da dieses in der Synthese zu giftigem und umweltgefährlichen 1,4-Benzochinon oxidiert wird.³⁸ Bei der Verwendung von Mercaptobernsteinsäure, bei der Partikel mit Durchmessern von 30-150 nm erhalten wurden,³⁹ ist wiederum die anschließende einfache Wichtige Anforderungen an die Synthese von AuNP größeren Durchmessers sind also die Einfachheit der Durchführung und Reproduzierbarkeit, die Qualität der erzielten AuNP hinsichtlich Stabilität, Kontrollierbarkeit der Größe, Uniformität und Monodispersität, die Mög-Größenvariation über weiten Bereich lichkeit der einen bei vergleichbaren Synthesebedingungen (um vergleichbare Partikel für Studien der Größenabhängigkeit bestimmter Effekte zu erhalten) und schließlich die Verwendung nicht toxischer Reagenzien und eines Stabilisators, der leicht austauschbar ist. Weiterhin wäre eine möglichst hohe Partikelkonzentration für alle einstellbaren Größen wünschenswert. Die Einfachheit einer Synthese ergibt sich z.B. durch geringen apparativen, zeitlichen und materiellen Aufwand aber auch durch eine möglichst quantitative Ausbeute, die eine abschließende Reinigung (z.B. zur Entfernung von Nebenpopulationen) überflüssig macht. Zwei Ansätze, die viele dieser Anforderungen erfüllen, wurden 2011 veröffentlicht. Die Seeded Growth Synthese, die in Eychmüllers Gruppe entwickelt wurde, basiert auf der Reduktion von Tetrachloridogoldsäure durch Ascorbinsäure unter Verwendung von Citrat als Stabilisator bei Raumtemperatur.¹⁴ Als Seeds wurden citratstabilisierte AuNP nach Turkevich verwendet. Ein Schlüsselelement der Synthese ist die langsame und getrennte Zugabe der Reduktionsmischung, bestehend aus Natriumcitrat und Ascorbinsäure, und der Precursorlösung, Tetrachloridogoldsäure in Wasser, zu den Seed-Partikeln bei Raumtemperatur. Die langsame, gleichmäßige Zugabe über einen Zeitraum von 45 Minuten wurde durch den Einsatz einer peristaltischen Pumpe erreicht. Aus der Analyse der Reaktion mittels TEM folgerten die Autoren, dass in dieser ersten Phase der Reaktion kleine Partikel auf den Oberflächen der Seed-Partikel aufwachsen. Durch anschließendes 30-minütiges Erhitzen zum Sieden wurde dann die Reifung dieser Strukturen zu einheitlichen, sphärischen AuNP bewirkt. Diese Schritte können wiederholt werden, um große Partikeldurchmesser zu erreichen. Es konnten AuNP mit Durchmessern von 30 bis 300 nm synthetisiert werden. Die in der Gruppe von Puntes auf Basis der Citrat-Methode entwickelte Seeded Growth Synthese wird ohne zusätzliche Chemikalien und ohne Verwendung von Pumpen durchgeführt, sondern basiert allein auf der sorgfältigen Kontrolle der Reaktionsparameter, insbesondere der Reaktantenkonzentrationen und der Temperatur.⁹ Auf citratstabilisierte AuNP-Seeds wird in dieser Synthese durch sukzessive Zugabe weiterer Tetrachloridogoldsäure weiteres Gold aufgewachsen. Eine Zweitnukleation wird durch Senken der Reaktionstemperatur, im Vergleich zur Turkevich-Synthese, auf 90 °C verhindert. Außerdem wurde durch Zugabe experimentell bestimmter Mengen Citrat der pH Wert bei 7 gehalten, der sonst durch die Zugaben des Tetrachloridogoldsäure-Precursors mit jedem Wachstumsschritt sinken würde. Mit zunehmender Größe der Seeds wird naturgemäß die Durchmesserzunahme pro Precursorzugabe immer geringer, wenn die Partikelkonzentration konstant ist. Ein schnelleres Wachstum der Partikel kann nur durch Verdünnungsschritte, also auf Kosten der Partikelkonzentration, erreicht werden. Abbildung 1.2 verdeutlicht den Zusammenhang von Wachstumstempo und Partikelkonzentration bzw. Verdünnung.



Abb. 1.2: Seeded Growth mit und ohne Verdünnung. Berechnete Partikelradii in Abhängigkeit der Precursor-Zugaben bei einer Seeded Growth Synthese. Für die Berechnung wurden als Seed-Partikel 150 ml AuNP mit d = 12 nm und c = 4 nM angenommen. Jede Precursorzugabe entspricht 1 ml Tetrachloridogoldsäure mit 25 mM (4.92 mg Gold). Die Verdünnungen erfolgen jeweils nach zwei Precursor-Zugaben, beginnend vor der dritten Zugabe. Es wird in jedem Verdünnungsschritt auf 2/3 der vorherigen Konzentration verdünnt. Diese Bedingungen ähneln der von Bastus *et al.* beschriebenen Seeded Growth Synthese.⁹ Annahmen für die Berechnung sind kompletter Precursor-Umsatz in jedem Wachstumsschritt und keine Sekundärnukleation.

Sowohl die Seeded-Growth Synthese nach Ziegler und Eychmüller als auch die von Bastus *et al.* ermöglichen die Synthese von citratstabilisierten AuNP in einem weiten Größenbereich mit Polydispersitäten deutlich unter 10 %. Allerdings erfordern diese Synthesen eine genaue Kontrolle aller involvierten Parameter (vgl. auch Abschnitt 1.2.2) um die Qualität der AuNP zu gewährleisten und insbesondere Sekundärnukleation zu vermeiden. Letzteres ist besonders anspruchsvoll, da die Kontrolle des pH Werts in Abhängigkeit vom verwendeten Wasser Anpassungen der Natriumcitratkonzentration oder Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge erfordern kann. Durch solche Zugaben werden wiederum die Ionenkonzentrationen in der Reaktionsmischung beeinflusst mit möglichen Folgen für den Reaktionsverlauf. Nichtsdestotrotz haben diese Synthesen starke Beachtung gefunden, erkennbar an der recht hohen Zahl an Zitationen der entsprechenden Publikationen innerhalb der vergleichsweise kurzen Zeit von zwei bis drei Jahren seit Veröffentlichung.

Zwischenzeitlich wurden mehrere Ansätze veröffentlicht, die eine Synthese von großen AuNP bei Raumtemperatur in einem oder wenigen Schritten und mit guter Kontrolle der Größe postulieren. Liu *et al.* stellten 2012 eine direkte Synthese von AuNP mit Wasserstoffperoxid vor, das in dieser Synthese als Reduktionsmittel fungiert. Durch Variation der Konzentration der Seed-Partikel konnte die Größe der Partikel in einem Bereich von 30-140 nm eingestellt werden.⁴⁰ Ein Vorteil dieser Synthese ist der geringe Aufwand. Es ist lediglich die Synthese von Seed-Partikeln notwendig, die dann mit den Reagenzien bei Raumtemperatur vermischt werden. Es ist keine weitere Aufarbeitung nötig und die Zersetzung von überschüssigem Wasserstoffperoxid kann durch Lagern abgewartet oder durch Erhitzen zum Sieden beschleunigt werden. Ein Nachteil dieser Synthese sind die geringen AuNP-Konzentrationen, die erhalten werden, und die im Gegensatz dazu sehr hohen Überschüsse an Wasserstoffperoxid, die benötigt werden, um eine zufriedenstellende Partikelqualität zu erhalten. Die Möglichkeit der Hochskalierung wurde in dieser Studie zudem nicht untersucht. Wenn eine Hochskalierung möglich wäre, müssten beispielsweise etwa 750 ml Wasserstoffperoxid in einer Synthese eingesetzt werden, um Partikelkonzentrationen zu erhalten, die mit denen nach Bastus *et al.* erhaltenen vergleichbar sind. Solch große Mengen an Peroxid machen die Synthese vergleichsweise gefährlich, teuer und aufwändig in der Aufarbeitung zur vollständigen Entfernung des Peroxids.

Njoki et al. stellten 2012 eine Seeded Growth Synthese von AuNP basiert auf der Reduktion mit verschiedenen Acrylaten vor.¹¹ Im Bereich von Durchmessern über 30 nm wurden mit etwa 2 % sehr geringe Polydispersitäten postuliert. Kritisch muss zu der entsprechenden Studie jedoch angemerkt werden, dass keine reproduzierbare Synthesevorschrift vorgelegt wurde, sondern eher eine allgemeine Beschreibung des Vorgehens. Ebenso sind die angegebenen Polydispersitäten in den Veröffentlichungen nicht zweifelsfrei belegt und die Uniformität der Partikel ist nicht optimal. Grundsätzlich ist die Reduktion von Tetrachloridogoldsäure durch Acrylate auf Seed-Partikeln jedoch eine durchaus leistungsfähige Methode, große AuNP bei Raumtemperatur zu synthetisieren. Die Reaktionsdauer beträgt einige Tage und die Synthese von AuNP mit Durchmessern von 30-100 nm wurde demonstriert. Bezüglich des Mechanismus konnte ein aggregativer Wachstumsmechanismus, über eine zwischenzeitlich bimodale Verteilung, durch Untersuchungen der Wachstumskinetik und TEM-Analyse überzeugend nahegelegt werden. Problematisch für medizinische Anwendungen und bestimmte Anwendungen der Biotechnologie ist die Toxizität der Acrylate. Obwohl diese prinzipiell unter Laborbedingungen durch Ligandenaustausch und Reinigung quantitativ entfernt können, da sie ähnlich schwach binden wie Citrat, ist eine Anwendung von AuNP-basierten Pharmazeutika, deren Produktionshistorie die Verwendung von giftigen Substanzen beinhaltet, wegen des Kontaminationsrisikos bestenfalls suboptimal und eine Zulassung dementsprechend schwierig zu erlangen.

Ein Ansatz aus der Gruppe von Yin versucht das Problem des Zielkonfliktes von hoher Partikelkonzentration und der Vermeidung von Sekundärnukleation zu adressieren.⁴¹ Um hohe Partikelkonzentrationen unter Vermeidung von Sekundärnukleation zu synthetisieren, wird in diesem Ansatz Iodid als zusätzliches Reagenz sowie Polyvinylpyrrolidon (PVP) als Stabilisator zugegeben. Iodid ist ein stärker bindender Komplexligand für Gold als Chlorid und Hydroxid und dementsprechend wird durch die Zugabe von Iodid die Reaktivität der Precursorkomplexe herabgesetzt. Das PVP unterdrückt unerwünschtes aggregatives Wachstum durch effektive Stabilisierung der AuNP. Auf diese Weise konnten unter Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel AuNP mit Durchmessern von 10 bis 200 nm in einstufigen Synthesen (die Synthese der AuNP-Seeds nicht eingerechnet) bei Raumtemperatur dargestellt werden. Der stöchiometrische Umsatz des Gold-Precursors ermöglicht zudem eine gute Vorhersagbarkeit bzw. Einstellbarkeit der AuNP-Durchmesser. Die Partikel erreichen hinsichtlich Monodispersität und Sphärizität nicht die Qualität der zuvor beschriebenen AuNP nach Bastus und Ziegler und es ist nicht klar ob das Iodid in den AuNP-Lösungen einen Ligandenaustausch erschwert. Es handelt sich dennoch um einen interessanten Ansatz, der dem Repertoire der Seeded-Growth-Synthese ein weiteres strategisches Element hinzufügt, nämlich die direkte Einstellung der Precursor-Reaktivität durch maßgeschneiderte Komplexliganden und nicht nur über Einstellung des pH-Werts.

In diesem Abschnitt wurde der Stand der Forschung zur Seeded-Growth-Synthese umrissen, ohne detailliert auf mechanistische Aspekte einzugehen, und wichtige Studien der vergangenen Jahre dazu vorgestellt. Die Problematik der Reproduzierbarkeit und Kontrollierbarkeit der Partikelgröße ist in den Seeded-Growth-Synthesen noch ausgeprägter als bei der Synthese von AuNP-Seeds und es ist nur eine leistungsfähige Seeded-Growth-Synthese literaturbekannt, die ausgehend von der Turkevich-Synthese ohne zusätzliche Chemikalien auskommt. Mit aktuellen Methoden können durch sorgfältige Kontrolle von Konzentration, Temperatur und pH-Wert AuNP über einen weiten Größenbereich mit hoher Sphärizität und Polydispersitäten unter 10 % synthetisiert werden. Optimierungspotential besteht hinsichtlich des Syntheseaufwands und der Partikelkonzentrationen, abgesehen von den naheliegenden Parametern Reproduzierbarkeit und Größenkontrolle, Monodispersität und Uniformität sowie Skalierbarkeit.

1.2.4 Stabilität und Reinigung von AuNP

1.2.4.1 DLVO-Theorie

Die nach ihren Entwicklern benannte Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek-Theorie bietet eine leistungsfähige und etablierte Grundlage für das Verständnis der Stabilität kolloidaler Systeme.⁴² Die grundlegende Idee der DLVO-Theorie ist, dass die Stabilität von Kolloiden durch die paarweise Betrachtung des Zusammenspiels von attraktiven Van-der-Waals-Kräften, F_{attr} , und repulsiven Coulomb-Kräften, F_{rep} , verstanden und abgeschätzt werden kann.⁴³ Für zwei AuNP kann das totale Interaktionspotential V_{T} als Summe aus elektrostatischer Abstoßung (Repulsion), V_{el} , und Van-der-Waals-Anziehung (Attraktion), V_{vdw} , angegeben werden:

$$V_{\rm T} = V_{\rm el} + V_{\rm vdw} \tag{1.1}$$

 $V_{\rm el}$ hängt vom Partikelradius *R* und der Dicke der elektrischen Doppelschicht ab, die mit der Debey-Länge κ^{-1} ausgedrückt werden kann. Es ist üblich das Produkt κR zur Bezeichnung zweier Grenzfälle zu verwenden, Werte >> 1 ergeben sich für große Partikel mit dünner elektrischer Doppelschicht (also hohem κ), während Werte << 1 für kleine Partikel mit dicker Doppelschicht erhalten werden. Weiterhin fließen in $V_{\rm el}$ das Oberflächenpotential Ψ_0 , das durch ζ -Potential-Messungen abgeschätzt werden kann, und der minimale Abstand der zwei Partikel ein. Die Ionenstärke *I* der Lösung und die elektrische Permittivität des Mediums ε finden in κ ihren Ausdruck:

$$\kappa = \left(\frac{2N_A e^2 I}{\varepsilon \varepsilon_0 kT}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{1.2}$$

mit der Temperatur *T*, der Elementarladung *e*, der Avogadrozahl N_A und der elektrischen Permittivität des Vakuums ε_0 .

Für die Beschreibung der attraktiven Wechselwirkungen zwischen zwei sphärischen Partikeln, die von Van-der-Waals-Wechselwirkungen dominiert werden, spielt neben den Radien R_i und dem Abstand *d* der Partikelzentren die Hamaker-Konstante A_H eine wichtige Rolle, die in diesem Beispiel folgendermaßen ausgedrückt werden kann:

$$A_{121} = \left(\sqrt{A_{11}} + \sqrt{A_{22}}\right)^2 \tag{1.3}$$

Der Index 1 repräsentiert hier Partikel gleichen Materials, die durch ein kontinuierliches Medium, repräsentiert durch den Index 2, getrennt sind. Literaturwerte für die Hamaker-Konstante von AuNP liegen im Bereich von $(1-4) \cdot 10^{-19}$ J.⁴³

Auf Grundlage der DLVO-Theorie kann die Stabilität von AuNP qualitativ verstanden und abgeschätzt werden. Ohne Stabilisierung würden AuNP aggregieren, da $F_{attr} >> F_{rep}$. Die Stabilisierung von AuNP durch Citrat ist elektrostatischer Natur mit $F_{rep} >> F_{attr}$ und entsprechend kann über die DLVO-Theorie ein Zusammenhang von Leitfähigkeit, elektrophoretischer Mobilität und kolloidaler Stabilität hergestellt werden. Ebenso können mechanistische Aspekte der AuNP-Synthese mit der DLVO Theorie erklärt werden, z.B. aggregatives Wachstum und der Zusammenhang von Partikelgröße und Citratkonzentration. Dass die Stabilisierung von AuNP durch Citrat rein elektrostatischer Natur ist, lässt sich besonders einfach durch Zugabe von Salz zeigen. Bei steigender Ionenkonzentration und damit Ionenstärke *I* werden die Ladungen der Citratmoleküle zunehmend abgeschirmt – die Debye-Länge κ^{-1} als Maß für die elektrostatische Abschirmung sinkt (vgl. Gl.(1.2)) – und die AuNP werden destabilisiert und aggregieren schließlich.

Die Stabilisierung von AuNP kann aber auch durch ungeladene Polymerliganden erfolgen, was bei einer Beschreibung im Rahmen der DLVO Theorie einer Modulation von V_{vdw} bzw. F_{attr} gleichkäme. Thermodynamische Aspekte einer solchen Stabilisierung sind neben den sterischen repulsiven Wechselwirkungen entropische Effekte. Bei geringer Distanz zweier polymerstabilisierter AuNP kann die Entfernung von Lösungsmittelmolekülen aus Zwischenräumen der Polymerhüllen einen Entropiegewinn bewirken, während Einbußen an Freiheitsgraden der verschränkten Polymerketten eine Entropieabnahme bewirken. Die Wechselwirkungen der Monomereneinheiten sind in guten Lösungsmitteln stark repulsiv (weil die Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen bevorzugt sind) in schlechten Lösungsmitteln attraktiv. Die Stabilisierung durch die Polymerhülle ist folglich stark abhängig vom Lösungsmittel und hydrophoben/hydrophilen Wechselwirkungen.

Die Stabilität von AuNP ist also definiert durch das Wechselspiel von elektrostatischen und Van-der-Waals-Kräften, sowie durch Wechselwirkungen von Liganden, die auf der Partikeloberfläche gebunden sind. Bei Letzteren können ebenfalls Ladung und Van-der-Waals-Wechselwirkungen eine Rolle spielen, zusätzlich aber auch thermodynamische Effekte und kovalente und nicht-kovalente (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) chemische Wechselwirkungen zwischen den gebundenen Molekülen.
1.2.4.2 Reinigung von AuNP

Die wichtigste Reinigungsmethode für AuNP ist wohl die Zentrifugation, mit der einfach und effizient freier Ligand und Matrixbestandteile von den Partikeln abgetrennt oder Puffer ausgetauscht werden können.²⁴ Um Partikel verschiedener Größen oder Formen voneinander zu trennen oder Aggregate zu entfernen wurden diverse Verfahren der Dichtegradienten- und Viskositätsgradientenzentrifugation vorgeschlagen.^{44–46} Weitere Möglichkeiten der Reinigung von AuNP sind Dialyse, Größenausschlußchromatographie, Ultrafiltration und Gel-Elektrophorese. Welche Art der Reinigung für AuNP sinnvoll und geeignet ist, hängt stark von der Funktionalisierung der Partikel ab. So können Citratstabilisierte AuNP zu einem gewissen Grad durch Zentrifugation gereinigt und aufkonzentriert werden, nicht aber mit vielen Techniken der Gel-Elektrophorese und Größenausschlußchromatographie, da oft Bestandteile der mobilen oder stationären Phase den schwach bindenden Citratliganden kompetitiv verdrängen und damit die Partikel destabilisieren können.

1.2.5 Funktionalisierung von AuNP

Eine Vielzahl von funktionellen Gruppen kann für die Funktionalisierung von AuNP genutzt werden, beispielsweise Amine, Phosphine, Phosphinoxide, Carboxylate, Carbonyle und Isocyanide,² und ebenso binden klassische Komplexliganden wie Iodid. Die bei Weitem wichtigste Gruppe von Liganden für die Funktionalisierung von AuNP sind jedoch solche, die funktionelle Gruppen mit Schwefel enthalten, und unter diesen die Thiole. Die Au-S Bindungsstärke wird im Bereich von $126^{47} - 209^{48}$ kJ/mol angegeben und es ist heute akzeptiert, dass Thiole als Thiolate an die Goldoberfläche der AuNP gebunden werden.⁴⁹ Die Schwefel-Gold Bindung und Oberflächenchemie der gebundenen Moleküle ist nicht nur im Zusammenhang der Funktionalisierung von Nanopartikeln von Interesse, sondern auch im großen Themenbereich der Self-Assembling-Monolayers auf Gold Substraten mit Anwendungen in der Sensorik, Optik, Mikroelektronik und Oberflächenchemie,^{48,50} sowie in der theoretischen Chemie,^{51,52} der Komplexchemie⁵¹ und in der Clusterphysik und –Chemie.^{52,53} Dementsprechend umfassend ist die Datenlage und der Erkenntnisstand, was für die Interpretation und das Verständnis der Oberflächenchemie auf AuNP von großem Vorteil ist, da die Oberfläche von AuNP, insbesondere in Lösung, analytisch nur schwer zugänglich ist. Eine genauere Beleuchtung der Oberflächenchemie von Thiolen und anderen Schwefelliganden auf Gold erfolgt in Kapitel 2, Abschnitt 2.2.1.

1.2.6 Optische Eigenschaften und Charakterisierung von AuNP

Die wohl wichtigsten physikalischen Eigenschaften von AuNP, insbesondere deren optischen Eigenschaften, beruhen auf Plasmonenresonanz. Daher werden einige wichtige physikalischen Grundlagen der Plasmonenresonanz in AuNP im Folgenden dargestellt, die für das Verständnis und die Interpretation der in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Strategien und Daten hilfreich sein werden.

1.2.6.1 Optische Eigenschaften von Metallen

Durch Wechselwirkung mit einem äußeren Wechselfeld können in Metallen Plasmaschwingungen, also Schwingungen der freien Leitungselektronen, angeregt werden. Ein Plasmaschwingungsquant wird als Plasmon bezeichnet. Die Leitungselektronen in einem Metall werden in der klassischen Drude-Theorie als ideales Gas betrachtet.⁵⁴ Dieses Modell wurde durch das Lorentz-Oszillator Modell erweitert, in dem die Ladungsträger als gedämpfte harmonische Oszillatoren beschrieben werden.⁵⁵ Eine Verfeinerung der Drude-Theorie unter Berücksichtigung quantenmechanischer Aspekte erfolgte durch Sommerfeld,⁵⁶ der die Elektronen als Fermi-Gas beschrieb um dem Ausschließungs- bzw. Pauli-Prinzip Rechnung zu tragen. Die Wechselwirkungen der Elektronen mit den Metallatomrümpfen werden durch Einführung einer effektiven Masse, m_{eff} , berücksichtigt, die anstelle der Elektronenmasse bei den Rechnungen verwendet wird. Für die dielektrische Funktion des Metalls in Abhängigkeit von einem elektromagnetischen Wechselfeld $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$ ergibt sich durch Aufstellen und Lösen der Bewegungsgleichung für die Ladungsträger und unter der Annahme, dass sich die Elektronen in Phase bewegen:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\Gamma\omega}$$
(1.4)

mit der Frequenz des anregenden Wechselfeldes ω , der Plasmafrequenz ω_p , und der Dämpfungskonstante Γ . Für die Plasmafrequenz gilt:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m_{eff}}} \tag{1.5}$$

Mit der Ladungsträgerdichte N, der Elementarladung e und der Permittivität des Vakuums ε_0 .

Die Dämpfungskonstante ergibt sich aus der mittleren freien Weglänge der Elektronen, l_e , und der Fermigeschwindigkeit v_F :

$$\Gamma = \frac{\nu_F}{l_e} \tag{1.6}$$

Die Dämpfung der durch das äußere Feld erzwungenen Schwingung wird durch Wechselwirkungen der Elektronen verursacht. Die Plasmafrequenz eines Metalls ist unabhängig von der Frequenz des anregenden Wechselfeldes, sie hängt von der Elektronendichte des Metalls ab. Plasmafrequenzen von Metallen liegen im Bereich von ~ $5 \cdot 10^{-15}$ s⁻¹ entsprechend einer Wellenlänge von etwa 300 nm. Aus der Plasmafrequenz ergibt sich bei Metallen die Plasmaresonanzfrequenz, bei der der Realteil der dielektrischen Funktion eine Nullstelle durchläuft. Die Plasmaresonanzfrequenz wird auch durch Interbandübergänge im Metall beeinflusst, die in der Drude-Theorie nicht berücksichtigt werden. Elektromagnetische Strahlung mit einer höheren Frequenz als die Plasmaresonanzfrequenz breitet sich im Metall aus, der Realteil der dielektrischen Funktion (Gl.(1.4)) ist positiv. Bei niedrigerer Frequenz wird der Realteil negativ und es dominiert die Reflektion der elektromagnetischen Strahlung am Metall. Der Imaginärteil der dielektrischen Funktion beschreibt die Absorption durch das Material und bestimmt somit, wie transparent das Material bei positivem Realteil für elektromagnetische Strahlung einer gegebenen Frequenz ist.⁵⁷

Für den komplexen Brechungsindex $\tilde{n}(\omega)$ nichtmagnetischer Materialien folgt aus der Maxwell-Beziehung:

$$\tilde{n}(\omega) = \sqrt{\varepsilon(\omega)}$$
 (1.7)

und

$$\tilde{n}(\omega) = n(\omega) + i\kappa(\omega)$$
 (1.8)

mit dem Extinktionskoeffizienten $\kappa(\omega)$, der die Abschwächung der elektromagnetischen Strahlung im Medium beschreibt, während der Realteil des Brechungsindex $n(\omega)$ die Polarisation beschreibt. Diese Größen können also für nichtmagnetische Materialien direkt aus der dielektrischen Funktion berechnet werden:

$$n(\omega) = \sqrt{\frac{\varepsilon_{Re}}{2} + \frac{\sqrt{\varepsilon_{Re}(\omega)^2 + \varepsilon_{Im}(\omega)^2}}{2}}$$
(1.9)

$$\kappa(\omega) = \sqrt{-\frac{\varepsilon_{Re}}{2} + \frac{\sqrt{\varepsilon_{Re}(\omega)^2 + \varepsilon_{Im}(\omega)^2}}{2}}$$
(1.10)

Die Indizes Re und Im kennzeichnen Real- und Imaginärteil der dielektrischen Funktion.⁵⁷

1.2.6.2 Optische Eigenschaften metallischer Nanopartikel

Die optischen Eigenschaften von Nanopartikeln unterscheiden sich in der Regel fundamental von den Eigenschaften desselben Materials in makroskopischen Dimensionen. Zum Beispiel weisen Lösungen von AuNP eine tiefrote Färbung auf, im Gegensatz zum charakteristischen gelblichen Glanz des massiven Goldes. Ein wichtiger Grund liegt in dem Umstand, dass ein Nanopartikel aufgrund seiner Dimension einen Resonator gegenüber sichtbarem Licht darstellt. Der Durchmesser des Nanopartikels ist klein im Vergleich zur Wellenlänge sichtbaren Lichts und daher kann die Phase zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb des Partikels als konstant angesehen werden. Da eine Bandstruktur auch in AuNP bereits ab Durchmessern von wenigen Nanometern vorliegt, können die Leitungselektronen durch das elektromagnetische Wechselfeld phasengleich polarisiert werden. Durch rückstellende Coulomb-Kräfte ergibt sich so eine kollektive und kohärente Oszillation der Leitungselektronen bzw. des Plasmas mit einer charakteristischen Eigenfrequenz, die vom Material, der Größe und Form des Partikels sowie seiner dielektrischen Umgebung abhängt.^{43,58-60} Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung dieser sogenannten Oberflächenplasmonenresonanz (engl.: surface plasmon resonance, SPR).



Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR). Diese liegt den charakteristischen optischen Eigenschaften von AuNP zugrunde. Das elektrische Feld E der einfallenden elektromagnetischen Welle (die hier nicht maßstabsgetreu mit deutlich zu niedriger Wellenlänge dargestellt ist) polarisiert die Leitungselektronen des AuNP kollektiv, was zu einer kohärenten und kollektiven Oszillation führt. Die Kopplung ist bei der charakteristischen Resonanzfrequenz am stärksten.

Die Beschleunigung von Ladungsträgern durch die Oszillation geht mit Emission elektromagnetischer Strahlung gleicher Frequenz einher, die anregende Strahlung wird gestreut. Die Streuung kann durch den Streuquerschnitt σ_{Str} quantifiziert werden. Zudem entstehen Dämpfungsverluste durch Absorption, die auf Wechselwirkungen der Elektronen und Bildung von Elektron-Loch-Paaren zurückzuführen ist. Die Wechselwirkungen der Elektronen umfassen Stöße untereinander, Stöße mit Gitterfehlstellen, Phononen und Stöße mit der Partikeloberfläche.^{59,61} Letztere spielen mit abnehmender Partikelgröße eine zunehmende Rolle und wirken sich über ein verringerte freie Weglänge auf die Dämpfungskonstante im Imaginärteil der dielektrischen Funktion (Gl.(1.4)) aus. Die Elektron-Loch-Paarbildung kann innerhalb des Leitungsbandes (bestehend aus 6s¹p-Hybridorbitalen für Gold) oder zwischen Valenz- (bestehend aus den 5d-Orbitalen für Gold) und Leitungsband erfolgen. Sowohl die inelastischen Stöße der Elektronen als auch die Paarbildung bewirken letztlich eine Umwandlung der elektromagnetischen Energie in Wärme. Diese Umwandlung ist bei AuNP sehr effektiv und der Absorptionsquerschnitt σ_{Abs} durchläuft ein Maximum nahe der Eigenfrequenz der Plasmaoszillation.⁶² Die Möglichkeit der lokalen kontrollierten Erwärmung mit AuNP ist eine für viele Anwendungen interessante Eigenschaft, im medizinischen Bereich z.B. im Kontext hyperthermaler Behandlungsmethoden.^{63,6}

1.2.6.3 Lösung der Maxwell-Gleichungen nach Mie

Die erste exakte analytische Lösung der Maxwell-Gleichungen für die Streuung von Licht an einer Kugel wurde 1908 von Gustav Mie vorgestellt.⁴ Die Lichtwelle wurde dazu in die einfallende Welle, die Welle im Streuobjekt und die gestreute Welle aufgeteilt. Die Berechnungen gehen von einem homogenen, isotropen und quellenlosen Medium aus und der Forderung, dass die Tangentialkomponenten der elektrischen und magnetischen Felder an der Partikeloberfläche stetig sind. Die gestreute Welle wird durch verschiedene elektrische und magnetische Multipolschwingungen innerhalb des Partikels verursacht, die durch einen Summationsindex *L* gekennzeichnet werden. L = 1 bezeichnet eine Dipolschwingung und L =2 eine Quadrupolschwingung, Schwingungen höherer Ordnung spielen für die optischen Eigenschaften von AuNP mit Durchmessern < 100 nm keine Rolle. Grundsätzlich gilt, dass sich der Extinktionsquerschnitt aus Absorptions- und Streuquerschnitt zusammensetzt:

$$\sigma_{Ext}(\lambda) = \sigma_{Abs}(\lambda) + \sigma_{Str}(\lambda) \tag{1.11}$$

Abbildung 1.4 zeigt die Wirkungsquerschnitte für AuNP mit Durchmessern von 5-100 nm bei einer Wellenlänge von 520 nm, die mit der Software Mie-Plot (v4.3, Philip Laven) berechnet wurden.



Abb. 1.4: Wirkungsquerschnitte σ_{Ext} , σ_{Str} und σ_{Abs} von AuNP mit Durchmessern von 5-100 nm.

Für kleine Partikel mit einem Radius *R*, der sehr viel kleiner ist als die Wellenlänge λ der einfallenden Lichtwelle, kann die Streuung vernachlässigt und zudem eine quasistatische Näherung verwendet werden. Da die Phase der elektromagnetischen Welle sich zu einem gegebenen Zeitpunkt innerhalb des Partikels nicht ändert, erfolgt nur eine homogene Polarisation der Ladungsträger und entsprechend nur eine Anregung dipolarer Schwingungen (L = 1).^{43,59,64} Für den Extinktionsquerschnitt der dipolaren Absorption ergibt sich nach Mie:

$$\sigma_{ext}^{Dip}(\lambda) = \frac{24\pi^2 R^3}{\lambda} \frac{\varepsilon_m^{\frac{3}{2}} \varepsilon_{Im}(\lambda)}{(\varepsilon_{Re}(\lambda) + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_{Im}(\lambda)^2}$$
(1.12)

 $\varepsilon_{\rm m}$ ist die Permittivität des Mediums, die hier als wellenlängenunabhängig angenommen wird.

Eine größenunabhängige Resonanzbedingung ergibt sich hieraus zu:

$$(\varepsilon_{Re}(\lambda) + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_{Im}(\lambda)^2 = min.$$
(1.13)

oder einfach zu $\varepsilon_{\text{Re}}(\lambda) = -2\varepsilon_{\text{m}}$ wenn der Imaginärteil der dielektrischen Funktion, $\varepsilon_{\text{Im}}(\lambda)$, klein oder nur schwach wellenlängenabhängig ist.

Die Dipolnäherung ist allerdings nur für sehr kleine AuNP gültig (d < 20 nm), mit zunehmender Größe kommt die Abhängigkeit der Lage der Plasmonenresonanz von der Partikelgröße aufgrund von Retardierungseffekten zum Tragen und die Anregung von Schwingungen höherer Ordnung spielt zunehmend eine Rolle, deren Resonanz bei niedrigerer Energie und damit bei höheren Wellenlängen liegt. Diese Größenabhängigkeit der optischen Spektren (von AuNP mit d > 20 nm) wird als extrinsischer Größeneffekt bezeichnet und ist im Einklang mit der Mie-Theorie.^{43,64} Ab Durchmessern von etwa 40 nm ist die Streuung der AuNP nicht mehr zu vernachlässigen (vgl. Abb. 1.4), die auch eine Zunahme der Linienbreite der Plasmonenbande im optischen Spektrum bewirkt. Experimentell wird auch eine Größenabhängigkeit der Resonanzenergien von Partikeln mit kleinen Durchmessern (d < 20 nm) gefunden, deren Ursache in der Größenabhängigkeit der dielektrischen Funktion, einer intrinsischen Eigenschaft des Materials, angenommen wird.^{65,64} Diese Größenabhängigkeit der optischen Eigenschaften von AuNP (d < 20 nm) wird dementsprechend als intrinsischer Größeneffekt bezeichnet. Während eine Linienverbreiterung durch die Zunahme der Streuung von Elektronen an der Partikeloberfläche durch Einführung einer korrigierten Dämpfungskonstante gut beschrieben werden kann - die experimentell gefundene 1/R-Abhängigkeit der Linienbreite wird damit richtig wiedergegeben - ist die Vorhersage und physikalische Interpretation der größenabhängigen Resonanzenergien deutlich schwieriger. Es ist aber naheliegend, dass die Beschreibung der Nanopartikel mit der dielektrischen Funktion des Volumenmaterials in diesem Größenbereich nicht mehr zulässig ist.

Für die Lösung der Maxwell-Gleichungen mit der Methode von Mie oder auf dieser basiert hat sich der Begriff Mie-Theorie etabliert. Mit diesem Ansatz lassen sich prinzipiell die optischen Eigenschaften von Kugeln beliebiger Größe und beliebigen Materials berechnen, solange dessen dielektrische Funktion bekannt ist. Der grundsätzlich beträchtliche Rechenaufwand ist dabei von aktuellen Standard-PCs problemlos zu bewältigen. Abbildung 1.5 zeigt den Vergleich einer Berechnung mit einem experimentellen Spektrum. Angesichts der idealisierten Bedingungen der Berechnung (isolierter, einzelner und damit monodisperser, ideal sphärischer Partikel) ist die Übereinstimmung sehr gut.



Abb. 1.5: Vergleich von Mie-Theorie und Experiment. Vergleich der Berechnung eines AuNP-Spektrums nach der Mie-Theorie mit einem experimentellen Spektrum von AuNP gleichen Durchmessers (d = 14 nm). Die Berechnung erfolgte mit der Software Mieplot und lieferte $\sigma_{Ext}(\lambda)$. Für den Vergleich wurden beide Datensätze mit dem Wert bei 450 nm normiert.

Die Beschränkungen der Mie-Theorie betreffen die Form, es werden ausschließlich Kugeln behandelt, und die Betrachtung eines isolierten Partikels. Wechselwirkungen zwischen Partikeln, die eine wichtige Rolle bei der Untersuchung und in vielen Anwendungen von AuNP spielen, müssen durch erweiterte Theorien behandelt werden.

1.2.6.4 Behandlung nicht isolierter Partikel

Als Maß für die Partikelkonzentration (hier: sphärische Partikel) kann ein Füllfaktor definiert werden:^{43,64}

$$f = NV_0 = \frac{4}{3}\pi R^3 N = \frac{V_{part}}{V_{ges}}$$
(1.14)

mit der Volumendichte N der Partikel im Medium und dem Volumen eines einzelnen Partikels V_0 , sowie dem Gesamtvolumen der Partikel V_{part} und dem Gesamtvolumen der Probe V_{ges} . Prinzipiell ist also der Füllfaktor auf beliebige Partikelgeometrien anwendbar, solange diese zufriedenstellend beschrieben werden können.

Ein wichtiger Ansatz zur Beschreibung realer Proben kolloidaler Lösungen basiert auf einer Theorie des effektiven Mediums. Die Grundannahmen sind die quasistatische Näherung $(\lambda \gg 2R)$, Sphärizität der Partikel (reale Partikel sind quasisphärisch), gegebenenfalls die Möglichkeit der Vereinfachung von Aggregatgeometrien, um diese beschreiben zu können, die Beschränkung auf dielektrische Eigenschaften von Matrix/Medium und Partikeln und damit Vernachlässigung von Grenzflächeneffekten und schließlich die Annahme, dass Tunneleffekte zwischen benachbarten Partikeln ausgeschlossen werden können.⁴³ Im einfachsten Fall von niedrigen Füllfaktoren ($f < 10^{-3}$) können Wechselwirkungen zwischen Partikeln vernachlässigt werden und das optische Verhalten der Probe aus dem Ergebnis der Mie-Theorie erhalten werden. Dazu wird der Extinktionsquerschnitt der dipolaren Absorption (s. Gl.(1.12)) mit der Volumendichte der Partikel multipliziert.

Für höhere Füllfaktoren kann die Maxwell-Garnett Theorie verwendet werden.^{43,64} Es wird hier unterschieden zwischen der direkten Umgebung eines betrachteten Partikels und der entfernteren Umgebung. Letztere kann durch eine Lorentz-Kugel mit einer bestimmten Polarisationsladung dargestellt werden, deren Radius so gewählt wird, dass das Feld außerhalb der Kugel als homogen angesehen werden kann.⁵⁷ Somit kann dieses Feld mit einer effektiven dielektrischen Funktion $\varepsilon_{\text{eff}}(\lambda)$ beschrieben werden. Für das lokale Feld E_{lokal} gilt:

$$E_{lokal} = E_{ex} + E_s + E_{nah} \tag{1.15}$$

mit dem externen Feld E_{ex} , dem durch die Polarisation der imaginären Lorentzkugel verursachten Feld E_s und dem Feld durch Partikel in direkter Umgebung E_{nah} . Unter der Annahme, dass die Kolloide statistisch verteilt sind und die Streufelder der Partikel innerhalb der Lorentzkugel sich durch Interferenz annullieren, $E_{nah} = 0$, setzt sich das lokale Feld folglich aus externem Feld und Polarisationsfeld zusammen. Für das Dipolmoment μ eines Partikels gilt:

$$\mu = \alpha E_{lokal} \tag{1.16}$$

und für die Polarisation P durch Partikel mit der Teilchendichte N:

$$P = \sum_{i} \mu_{i} N_{i} = \sum_{i} \alpha_{i} N_{i} E_{lokal}(i)$$
(1.17)

Die Polarisierbarkeit α sphärischer Teilchen kann über die Clausius-Mossotti-Relation mit der dielektrischen Funktion verknüpft werden und es ergibt sich nach Maxwell-Garnett schließlich folgender Zusammenhang:

$$\frac{\varepsilon_{eff}(\lambda) - \varepsilon(\lambda)_m}{\varepsilon_{eff}(\lambda) + 2\varepsilon(\lambda)_m} = f \frac{\varepsilon(\lambda) - \varepsilon(\lambda)_m}{\varepsilon(\lambda) + 2\varepsilon(\lambda)_m}$$
(1.18)

Eine detaillierte Herleitung findet sich z.B. bei Ghosh und Pal.⁴³ Es wird in diesem Ansatz also die mikroskopische Variable Teilchenpolarisierbarkeit α mit der dielektrischen Funktion als makroskopische Eigenschaft verknüpft. Die Clausius-Mossotti-Relation beschreibt den Zusammenhang für Atome, die Maxwell-Garnett-Relation für Partikel. Die dielektrische Funktion des Mediums ist hier auch komplex und abhängig von der Wellenlänge. Der Faktor 2 im Nenner ergibt sich aus der Sphärizität der Partikel und kann für andere Partikelgeometrien angepasst werden.

Mit der Maxwell-Garnett-Theorie wird also ausschließlich der Einfluss des Fernfeldes beschrieben, indem ein homogenes Medium außerhalb einer Lorentzkugel angenommen wird, das mit einer effektiven dielektrischen Funktion beschrieben werden kann. Auf diese Weise lassen sich Proben mit Füllfaktoren $f > 10^{-3}$ gut beschreiben, inbegriffen unterschiedliche Partikelgeometrien in flüssigen, aber auch festen Medien wie z.B. einer Aluminiummatrix.⁶⁴ Ähnlich wie bei der Mie-Theorie stimmen insbesondere die Positionen der Maxima in berechneten Absorbanzspektren gut mit den Experimenten überein, während die reale Linienbreite abweicht, was angesichts der idealisierten Bedingungen (z.B. Sphärizität, Monodispersität) leicht nachvollziehbar ist. Sobald bei hohen Füllfaktoren Nahfeld-Wechselwirkungen der Partikel nicht mehr vernachlässigt werden können, reicht die Maxwell-Garnett-Theorie nicht mehr für die Beschreibung aus. In der Anwendung wurde die Maxwell-Garnett-Theorie durch numerische Methoden verdrängt. Sie ist jedoch für das Verständnis des Einflusses von Partikel-Partikel-Wechselwirkungen auf die optischen Eigenschaften von Kolloidlösungen nach wie vor wertvoll. Solche Wechselwirkungen haben nicht nur bei sphärischen AuNP den stärksten Einfluss auf die optischen Eigenschaften und sind von entsprechender Bedeutung bei deren Charakterisierung und Anwendungen.

1.2.6.5 Numerische Methoden

Wichtige numerische Methoden zur Beschreibung optischer Eigenschaften, nicht nur von AuNP, sind die Boundary Element Methode (BEM), die Discrete Dipole Approximation (DDA) und die Finite Difference in the Time Domain Methode (FDTD).⁶⁶ Die BEM Methode nutzt die Tatsache, dass das elektromagnetische Feld innerhalb eines Materials durch Ladungsverteilung und –flüsse an dessen Grenzfläche eindeutig festgelegt ist und beruht auf der Lösung entsprechender Oberflächenintegrale durch Diskretisierung mit einer Menge von repräsentativen Punkten auf den Oberflächen.⁶⁶ Die DDA unterteilt das Material in ein Gitter aus einzelnen Dipolen, für die das lokale Feld sich jeweils aus der Wirkung des externen Feldes und des Feldes, das durch alle anderen Dipole erzeugt wird, zusammensetzt. Beide Methoden, BEM und DDA, liefern das resultierende elektromagnetische Feld in der Frequenzdomäne, wobei mit der BEM die Oberfläche, mit der DDA das Volumen parametrisiert werden. Im Unterschied dazu werden mit der FDTD Methode die Maxwell Gleichungen in definierten Zeitabständen in einem räumlichen Gitter gelöst. Die 3. und 4. Maxwell Gleichung beschreiben, dass die zeitliche Änderung des elektrischen Feldes in jedem Punkt von der lokalen Änderung des magnetischen Feldes (dem Wirbelfeld) abhängt, was analog für das magnetische Feld gilt. Durch schrittweises Lösen der Gleichungen in der Zeitdomäne durch einen rigorosen Algorithmus können mit der FDTD Methode so sowohl Nah- und Fernfeld berechnet werden.^{43,64,66} Die Leistungsfähigkeit moderner Rechner ermöglicht die weitreichende Anwendung dieser numerischen Methoden, deren Effizienz und Genauigkeit durch adaptive Gitter, iterative Verfahren, Implementierung von Symmetrien und andere Verfeinerungen noch gesteigert werden kann.⁶⁴

Numerische Methoden werden heute in zahlreichen Bereichen der Photonik, Materialwissenschaft etc. sowohl im industriellen als auch im akademischen Bereich genutzt, weil mit ihnen sehr gut die optischen Eigenschaften definierter Strukturen vorhergesagt und geplant werden können. Nichtsdestotrotz können auch numerische Modelle bei komplexen Wechselwirkungen, z.B. Aggregationsprozessen, in kolloidalen Lösungen an ihre Grenzen stoßen.

1.2.6.6 AuNP mit anderen Formen

Nach aktuellem Stand der Forschung ist eine große Formenvielfalt von AuNP synthetisch zugänglich.^{6,25,67} Da nichtsphärische AuNP in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielen, soll im Folgenden jedoch nur kurz auf einige wichtige Aspekte der Formvariationen eingegangen werden.

Es ist angesichts der beschriebenen optischen Eigenschaften von AuNP intuitiv naheliegend, dass eine Abweichung der Partikelform von der Sphärizität einen massiven Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Partikels hat. Sehr einfach lässt sich das am Beispiel der Goldnanostäbchen (engl.: nanorods, AuNR) verdeutlichen. Diese sind im einfachsten Fall charakterisiert durch eine lange und ein kurze Achse mit den Längen a (Länge) und b(Breite), deren Seitenverhältnis a/b als aspect ratio bezeichnet wird. In optischen Spektren von AuNR findet sich eine Plasmonenresonanzbande im Bereich von 520 nm und eine Bande im Bereich höherer Wellenlängen.^{64,68} Mit zunehmendem aspect ratio, steigt die Energiedifferenz zwischen den Plasmonenresonanzen; die in erster Linie auf eine Rotverschiebung der Bande im höherwelligen Bereich zurückzuführen ist. Diese Beobachtungen sind darauf zurückzuführen, dass Plasmaoszillationen im Stäbchen in Richtung der langen oder kurzen Achse stattfinden. Die Oszillation in Richtung der kurzen Achse wird als transversale Mode bezeichnet und die Energie der transversalen Plasmonenresonanz liegt im gleichen Bereich wie bei sphärischen AuNP. Die Oszillation entlang der langen Achse, die longitudinale Mode, bewirkt eine Absorption bei deutlich niedrigeren Energien. Eine erste Erweiterung der MieTheorie, die für die theoretische Beschreibung der optischen Eigenschaften von AuNR genutzt werden kann, lieferte Gans 1912,⁶⁹ 1915 folgte die Beschreibung von Silberkolloiden.⁷⁰

Die optischen Eigenschaften von AuNP hängen also neben den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Partikeln besonders stark von der Form der Partikel ab. Dies ist für viele Anwendungen von außerordentlicher Relevanz. Zum Beispiel kann durch Optimierung der Partikelform die Absorption im sogenannten biologischen Fenster maximiert werden. Dies ist ein spektraler Bereich im nahen Infrarot (800-1000 nm) in dem Gewebe kaum absorbiert. Derart optimierte Partikel können also im Körper in tieferen Gewebeschichten detektiert, aber auch mit deutlich weniger Schädigung von Umgebungsgewebe durch einen Laser angeregt werden, sei es für hyperthermale Behandlungen oder auch die Verstärkung von Raman- oder Fluoreszenzsignalen von Analyten nahe der Partikeloberfläche.

1.2.6.7 Nahfeld an der Oberfläche von AuNP

Direkt mit den optischen Eigenschaften durch Plasmonenresonanz verknüpft ist eine weitere wichtige physikalische Eigenschaft der AuNP: die Verstärkung des elektrischen Feldes an der Partikeloberfläche. Diese ergibt sich direkt aus der Polarisation des AuNP durch ein externes Feld.^{62,61} Das elektrische Feld, das sich aus dieser Polarisation ergibt ist nicht auf das Partikelvolumen beschränkt, sondern reicht über dessen Oberfläche hinaus in das angrenzende Medium hinein. Abhängig von Betrag und Orientierung des elektrischen Feldes außerhalb des Partikels E ergibt sich eine Verstärkung E/E_0 des externen Feldes E_0 . Abbildung 1.6 zeigt einige Ergebnisse von Berechnungen mittels FDTD zum Nahfeld eines AuNP mit einem Durchmesser von d = 40 nm. Geometriebedingt (der größte Teil der elektrischen Feldlinien verläuft innerhalb des Partikels) ist die elektrische Feldverstärkung bei sphärischen AuNP eher schwach ausgeprägt. Kopplung von Nahfeldern zweier oder mehrerer AuNP durch entsprechende räumliche Nähe, also in Dimeren, Trimeren und größeren Partikelclustern kann die Feldverstärkung jedoch drastisch erhöhen.^{71,43,72} Ebenso kann durch optimierte Formen, z.B., sogenannte Nanosterne,^{73,74} und bei Mikrosphären⁷⁵ und planaren Substraten^{76,77} durch Optimierung der Oberflächenbeschaffenheit die Feldverstärkung maximiert werden.



Abb. 1.6: Nahfeld eines sphärischen AuNP mit d = 40 nm. Anregung mit einer in z-Richtung linear polarisierten elektromagnetischen ebenen Welle (Amplitude = 1), die sich in y-Richtung ausbreitet. Es ist die x-z-Ebene durch y ~ 0 gezeigt. Die Berechnung erfolgte mit der Software FDTD Solutions.

Die Bedeutung der Feldverstärkung ergibt sich aus deren Auswirkungen auf Absorption, Fluoreszenz und Raman-Streuung von entsprechenden Molekülen, die sich in diesem verstärkten Feld befinden.

Die Anregungsrate eines Moleküls bei einer bestimmten Wellenlänge γ_{exc} ist proportional zum Betragsquadrat des Skalarprodukts von Übergangsdipolmoment p und elektrischem Feld E am Ort x des Moleküls:⁶²

$$\gamma_{exc} \propto |\boldsymbol{p} \cdot \boldsymbol{E}(\boldsymbol{x})|^2 \tag{1.19}$$

Dementsprechend bewirkt eine elektrische Feldverstärkung auch eine Anregungsverstärkung für Moleküle, die sich (mit entsprechender Orientierung) im verstärkten Feld befinden.

Für Fluorophore sind neben der Anregungsverstärkung noch die Einflüsse des AuNP auf die strahlende und nichtstrahlende Relaxation des Fluorophors aus dem angeregten Zustand zu betrachten. Die strahlende Relaxation, also die als Fluoreszenz bezeichnete Emission eines Photons, wird durch den Purcell-Effekt beeinflusst. Dieser beschreibt die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für spontane Emission in Gegenwart eines Resonators, den hier der AuNP darstellt.⁶² Die AuNP können aber auch die nichtstrahlende Relaxation sowohl durch den sogenannten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) als auch durch statische und dynamische Fluoreszenzlöschung beeinflussen.^{78,79} Goldoberflächen und AuNP stellen in der Tat sehr gute Fluoreszenzlöscher dar. Insbesondere die Rate des FRET fällt nicht mit der sechsten Potenz des Abstandes von Donor (Fluorophor) und Akzeptor (hier: AuNP) wie es beim FRET zwischen Fluorophoren der Fall ist, und die hohe Absorption der AuNP trägt zu einer

Vergrößerung des Förster Radius (Donor-Akzeptor-Abstand bei 50% FRET-Effizienz) bei.^{80–83} Sowohl Anregungsverstärkung als auch FRET hängen von der relativen Orientierung des Fluorophors zur AuNP-Oberfläche ab, zudem gelten für alle beschriebenen Effekte unterschiedliche Abstandsabhängigkeiten. Dementsprechend können AuNP sowohl Fluoreszenzverstärkung als auch -löschung bewirken. Eine Fluoreszenzlöschung ist experimentell jedoch deutlich einfacher zu realisieren und diese Eigenschaft der AuNP wird in zahlreichen Anwendungen in der Biotechnologie ausgenutzt, vor allem zur Abstandsbestimmung auf molekularer Ebene.^{78,80,82}

Ähnliche Mechanismen wie bei Anregungsverstärkung und Purcell-Effekt spielen bei der elektromagnetischen Verstärkung der Raman-Streuung im Nahfeld von AuNP eine Rolle. Da bei der Raman-Streuung jedoch keine angeregten Zustände involviert sind, findet auch kein Energietransfer und keine Löschung statt und die Ramanverstärkung durch AuNP erreicht sehr viel höhere Werte als die Fluoreszenzverstärkung.⁷² Als zusätzlicher Effekt kann eine sogenannte chemische Ramanverstärkung auftreten, die auf eine Änderung des Wirkungsquerschnitts der Raman-Streuung durch Chemisorption zurückzuführen ist.^{84,85} Es herrscht jedoch Einigkeit, dass der dominante Effekt für sehr hohe Ramanverstärkungen die elektromagnetische Verstärkung ist.⁶² Der Verstärkungsfaktor kann mit der vierten Potenz der Feldverstärkung des elektromagnetischen Feldes im Nahfeld des AuNP abgeschätzt werden, denn die Intensität des anregenden und des emittierten Photons ist jeweils proportional zum Quadrat der elektrischen Feldstärke. In Bereichen sehr hoher Feldverstärkung, sogenannten hot spots, können lokal extreme Ramanverstärkungen mit Faktoren von 10¹⁴-10¹⁵ auftreten.⁷² mittlere Faktoren für reale Proben liegen allerdings deutlich niedriger, da die lokalen Verstärkungsfaktoren eine sehr breite Verteilung aufweisen.⁷¹ Die Ramanverstärkung im Nahfeld von AuNP, bzw. Gold- und Silber-Nanostrukturen im weiteren Sinne, kann die Detektion von einzelnen Molekülen ermöglichen und wird, wie die Fluoreszenzlöschung, in zahlreichen Anwendungen ausgenutzt; z.B. in der Einzelmolekül- bzw. oberflächenverstärkten Spektroskopie, biochemischen Analytik, in vitro Diagnostik und medizinischen Bildgebung.^{6,84}

Dass AuNP als plasmonischer Resonator gegenüber elektromagnetischer Strahlung auftreten ist also für ihre Charakterisierung von herausragender Bedeutung. Ihr Fernfeld stellt die optischen Eigenschaften der Partikel mit all ihren Abhängigkeiten von Geometrie, Ausdehnung, Funktionalisierung und interpartikulären Wechselwirkungen dar und das Nahfeld kann die optischen Eigenschaften von Molekülen nahe der Partikeloberfläche stark beeinflussen. Zudem kann die hocheffiziente Umwandlung von Lichtenergie in Wärme eine lokale Erwärmung in der Umgebung der Partikel bewirken. Die UV/vis Spektroskopie als analytische Methode ist dementsprechend wertvoll für die Charakterisierung von AuNP. Informationen über die Ligandenhülle können zusätzlich aus Fluoreszenz-, IR- und Ramanspektroskopie gewonnen werden. Der Nachweis von AuNP z.B. in Zellen kann mit vielen Methoden der optischen Mikroskopie indirekt über deren Streulicht erfolgen, die zuverlässige Auflösung einzelner Partikel ist ab Partikeldurchmessern von 60 nm möglich, mit optimierten Methoden können aber auch deutlich kleinere Partikel untersucht werden.^{65,86} Insbesondere Dunkelfeldmikroskopie und photothermale Mikroskopie sind für die Detektion von AuNP gut geeignet.

1.2.6.8 Weitere Charakterisierungsmethoden

AuNP als ein Nanomaterial sind auch die Elektronenmikroskopie und Für Rastersondenmikroskopie wichtige analytische Methoden zur Charakterisierung. Welche geeignet ist, bestimmt die Fragestellung. Für die Bestimmung Technik der Größenverteilungen von AuNP-Proben wird üblicherweise die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eingesetzt, aber auch Rasterelektronenmikroskopie (engl.: Scanning Electron Microscopy, SEM). Mittels TEM kann die Größe der Partikel genau bestimmt werden, da die Ligandenhülle typischerweise keinen oder kaum Kontrast verursacht und daher nur der AuNP selbst abgebildet wird. Die Qualität der Auswertung wird beeinträchtigt durch die nicht ideale Sphärizität der AuNP, denn in den TEM-Messungen wird eine zweidimensionale Abbildung erzeugt, aus der durch Messen von Durchmesser oder Fläche auf den Partikeldurchmesser geschlossen werden kann. Dies erfolgt unter Annahme von Sphärizität. Eine detaillierte Diskussion der nicht-idealen Sphärizität im Kontext der Charakterisierung (Konzentration, Oberfläche und Durchmesser) von AuNP findet sich bei Gadogbe et al.⁸⁷ Weiterhin sind statistische Aspekte zu berücksichtigen, denn die TEM-Messungen zeigen jeweils nur einen kleinen Ausschnitt der Probe. Um eine statistische Signifikanz zu erreichen, sollten mindestens hundert Partikel aus verschiedenen Bereichen der Probe (d.h. auf verschiedenen Aufnahmen) vermessen werden. Dafür ist es von Vorteil, wenn die Partikel separiert auf dem Probenträger vorliegen und nicht in Form von Aggregaten oder durch andere Effekte nicht voneinander abgegrenzt. Die Präparation von TEM-Proben beinhaltet das Eintrocknen der kolloidalen Lösung auf dem Probenträger, einem Kupfernetzchen. Wie die AuNP sich beim Eintrocknen verhalten, hängt stark von der Ligandenhülle ab und eine geeignete Polymerhülle kann im Gegensatz zu Citrat eine Separation der AuNP gewährleisten. Abbildung 1.7 zeigt den Vergleich der TEM-Aufnahmen von citratstabilisierten und mit einem Polyethylenglykol-Liganden funktionalisierten AuNP.



Abb. 1.7: Unterschiedliche Stabilisierung von AuNP. TEM-Aufnahmen von AuNP stabilisiert mit A: Citrat oder B: PEGMUA, einem in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenglykol-thiol-Liganden. PEGMUA bewirkt eine Separation der AuNP auch nach dem Eintrocknen auf dem Probenträger.

Neben der Elektronenmikroskopie stellt auch die dynamische Lichtstreuung (DLS) eine wichtige Charakterisierungsmethode für AuNP dar. Hier wird die Fluktuation der Intensität des Streulichts in zwei Dimensionen durch Autokorrelationsfunktionen erfasst, um über die Brownsche Molekularbewegung mittels Stokes-Einstein-Beziehung auf die Durchmesser sphärischer Partikel zu schließen. Da die Streulichtintensität Istreu im betrachteten Größenbereich (d < 60 nm, die Teilchen sind also deutlich kleiner als die Wellenlänge des gestreuten Lichts und es gilt die Rayleigh-Näherung für die Streuung) von der sechsten Potenz des Radius r abhängt, ist die intensitätsgewichtete Größenverteilung, die als primäres Ergebnis einer DLS-Messung erhalten wird, zum einen stark verbreitert und zum anderen zu höheren Durchmessern verschoben (da größere Durchmesser stärker gewichtet werden) als die über Elektronenmikroskopie erhaltenen Größenverteilungen nach Häufigkeit. Die Umrechnung der Intensitätsverteilung in Volumen- und Häufigkeitsverteilung ist prinzipiell möglich, aber nicht trivial und potentiell fehlerbehaftet. DLS-Messungen liefern den hydrodynamischen Radius der Kolloide, der bei AuNP von der Ligandenhülle abhängt. Citrat-Liganden tragen vernachlässigbar (> 1 nm) zum hydrodynamischen Radius bei,⁸⁸ Polymerliganden können diesen jedoch sehr deutlich vergrößern. Zur genauen absoluten Größenbestimmung von AuNP ist DLS nur begrenzt geeignet und beschränkt auf sphärische Partikel. Da AuNP stark streuen, kann deren Durchmesser ab etwa 20 nm jedoch durchaus zuverlässig abgeschätzt werden. Zudem erfasst eine DLS-Messung eine wesentlich höhere Zahl an Partikeln als eine TEM-Analyse und repräsentiert daher statistisch gesehen besser die gesamte Probe. Da Aggregate in einer Probe gemäß $I_{\text{streu}} \propto r^6$ sehr stark zur Streulichtintensität beitragen, können diese bereits in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden bzw. die Messung stören und Ähnliches gilt für Kontaminationen beispielsweise mit Staub. Daher ist die Sauberkeit der Probe

von besonderer Bedeutung für DLS-Messungen. Mit einem ähnlichen Prinzip wie die DLS Messungen lässt sich das ζ -Potential bestimmen. Hierzu werden an speziellen Küvetten oder Messzellen durch Pausen unterbrochene Spannungspulse angelegt. Aus der dadurch induzierten Frequenzverschiebung des Streulichts kann dann die elektrophoretische Mobilität der Partikel und daraus das ζ -Potential berechnet werden. Das ζ -Potential ist das Potential an der Abscherebene der elektrochemischen Doppelschicht eines geladenen Kolloids und damit ein Maß für dessen Oberflächenladung, die analytisch nicht direkt zugänglich ist.⁸⁹ Die Möglichkeit der DLS- und ζ -Potential-Messung sind heute oft in einem Gerät verwirklicht.

Neben UV-vis Spektroskopie, optischer und Elektronenmikroskopie sowie DLS/ζfiir Potential-Messungen können Röntgenmethoden manche Aspekte der Partikelcharakterisierung genutzt werden. Pulverdiffraktometrie gibt Auskunft über die Kristallinität der Partikel. Weicht die über die Scherrer-Gleichung aus der Reflexverbreiterung berechnete Partikelgröße stark von der tatsächlichen Partikelgröße ab, so ist dies ein Indiz für die Polykristallinität der Partikel.²⁰ Mit SAXS können Aussagen über Konzentration, Polydispersität und Durchmesser sphärischer AuNP gewonnen werden. Da AuNP auch Röntgenstrahlung stark streuen, können mittels SAXS auch geringe Konzentrationen und kleine Durchmesser bestimmt werden und Messungen mit hoher Zeitauflösung sind möglich.¹⁹ Vorteil der SAXS von AuNP-Lösungen ist, ähnlich wie bei der DLS, dass die gesamte Probe erfasst wird.

Die beschriebenen analytischen Methoden sind für die Charakterisierung von AuNP, auch in dieser Arbeit, von besonderer Bedeutung. Es handelt sich jedoch ausdrücklich nicht um eine umfassende Auflistung. Ihrem breiten Anwendungsspektrum entsprechend viele weitere Methoden werden für die Charakterisierung von AuNP eingesetzt, insbesondere nach ihrer Funktionalisierung. Als Beispiele seien Methoden der chemischen Analytik wie Kernspinresonanz- (NMR, engl.: nuclear magnetic resonance) und Infrarot- (IR) Spektroskopie, elektrochemische Charakterisierungsmethoden wie Cyclovoltammetrie, biochemische Methoden wie Immunoassays und Gel-Elektrophorese, oder Methoden der makromolekularen Chemie wie Thermogravimetrische Analyse (TGA) und Gelpermeationschromatographie (GPC) genannt.^{63,90–93,53} Ihre physikalischen Eigenschaften: starke Absorption und Streuung im Bereich des sichtbaren Licht, hoher Kontrast bei Röntgenmethoden⁹⁴ und Elektronenmikroskopie aufgrund der hohen Ordnungszahl des Goldes, und Nahfeldverstärkung qualifizieren AuNP als leistungsfähiges Label. Das sogenannte Immunogold Labelling ist seit den 1980er Jahren eine etablierte Standardmethode in den Biowissenschaften.⁹⁵ Die Oberflächenchemie der AuNP selbst bzw. die Charakterisierung ihrer Ligandenhülle stellt jedoch nach wie vor eine analytische Herausforderung dar. Es wird in der Regel mit niedrigen Partikelkonzentrationen im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich gearbeitet, was Ligandenkonzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich entspricht, die Reinigung bzw. Unterscheidung von gebundenem und freiem Ligand ohne Beeinträchtigung der kolloidalen Stabilität ist nicht immer möglich, die Frage der Reproduzierbarkeit und damit der Verallgemeinbarkeit von Beobachtungen ist kritisch zu sehen und es können AuNP-Proben nicht beliebig manipuliert werden ohne eine irreversible Destabilisierung der kolloidalen Lösungen zu riskieren, weshalb Ligandenhüllen von AuNP auch für viele Techniken unzugänglich sind.

1.3 Experimentalteil Kapitel 1

1.3.1 Chemikalien

Laborchemikalien und Lösungsmittel in p.a. Qualität wurden, wenn nicht vorrätig, bei den Herstellern Fluka, Sigma Aldrich oder Merck bestellt oder beim Lager der Universität Hamburg angefordert. Standardmäßig wurde Reinstwasser ($R = 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) aus einer Milli-Q Reference A+ Anlage mit einem Millipak-20 Express (0.22 µm) Membranfilter (Millipore GmbH) verwendet.

1.3.2 Spektroskopische Methoden

UV-Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary 50 Spektralphotometer aufgenommen. Es wurden UV-Küvetten für Mikrovolumina (Plastibrand®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet wenn nicht anders angegeben.

1.3.3 DLS- und ζ-Potential-Messungen

DLS- und ζ -Potential-Messungen wurden mit dem Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments) durchgeführt. Die Laserwellenlänge beträgt 633 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Dispersion Technology Software Version 5.10. Die Anzahl der Wiederholungen pro Messung wurde auf automatische Anpassung durch die Steuerungssoftware eingestellt und betrug mindestens 20 Wiederholungen für ζ -Potential Messungen und 12 Wiederholungen für DLS-Messungen. Die präsentierten Daten stellen jeweils den Mittelwert aus drei Messungen dar, deren Standardabweichung unter 4 % lag, wenn nicht anders angegeben. Für die rechnerische Auswertung der ζ -Potential-Messungen durch die Software wurde die Smoluchowski-Näherung (f(κ a) = 1.5) vorgegeben. Die Messungen erfolgten in klaren Einweg-Kapillarzellen (DTS1060, Malvern Instruments). DLS-Messungen wurden mit UV-Mikroküvetten (Plastibrand®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) durchgeführt, die Probenvolumina betrugen 100-200 µl. Die aus den DLS-Messungen erhaltenen Größenverteilungen, werden als Volumenverteilungen präsentiert, weil diese die beste Übereinstimmung mit den TEM-Analysen zeigten.

1.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Jeol JEM-1011 Mikroskop bei 100 kV aufgenommen. Vor der TEM-Analyse wurden 500 µl der AuNP-Lösungen mit 50 µl einer 1 mM wässrigen Lösung des Liganden α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(11-mercaptoundecanoat) (PEGMUA, vgl. Abschnitt 2.3.4) versetzt und anschließend durch Zentrifugation (20 000 g, 10-20 Minuten) gereinigt. Dazu wurden nach der Zentrifugation je 500 µl Überstand durch 500 µl Wasser ersetzt. Es wurden dann 10 µl der wässrigen Partikellösung auf ein mit amorphem Kohlenstoff beschichtetes Kupfer-Netzchen aufgetragen, das auf einem Deckglas platziert war. Das Netzchen wurde anschließend mindestens 24 h bei Raumtemperatur oder mindestens 45 Minuten bei 65° C getrocknet.

Die quantitative Auswertung der TEM-Aufnahmen erfolgte mit der Software ImageJ. Die Aufnahmen wurden in Schwarz-Weiß-Aufnahmen überführt, skaliert und unter Ausschluss der Bildränder ausgezählt. Sich berührende Partikel, die von der Software nicht richtig erkannt wurden, und andere Fehlerquellen wie der Skalierungsbalken wurden aus dem Bild entfernt. Partikel die stark von der Größenverteilung abwichen, koaleszierte Partikel, ungewöhnliche Geometrien etc. wurden *nicht* gelöscht. Die Flächen der gezählten Partikel wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.

1.3.5 Synthesen

1.3.5.1 AuNP Synthese

Diese Synthese folgt der Vorschrift von Ojea-Jimenez et al.¹²

In einer Standardsynthese wurden 97.1 mg (0.330 mmol) Natriumcitrat Dihydrat (Na₃C₆H₅O₇·2 H₂O; Abk.: S.C., englisch: sodium citrate) in 150 ml Wasser gelöst (c = 2.2 mM) und die Lösung in einem 250 ml-Dreihalskolben mit Rückflusskühler zum Sieden erhitzt. Dann wurde unter starkem Rühren durch schnelle Injektion 1 ml wässrige Tetrachloridogoldsäurelösung (c = 25 mM, hergestellt aus dem Trihydrat: HAuCl₄·3H₂O) zugegeben und der Farbumschlag nach rot abgewartet. Die Wartezeit betrug 30 Sekunden bis etwa 10 Minuten, wenn nicht anders angegeben. Der Heizpilz wurde dann abgeschaltet, aber nicht entfernt und das Abkühlen der Lösung auf etwa 70 °C abgewartet. Die Lösungen wurden dann in Vorratsbehälter überführt.

1.3.5.2 Variationen der AuNP Synthese

Variation der Wartezeit vor Precursorzugabe

Nach Erreichen des Siedepunkts der 2.2 mM S.C.-Lösung wurde diese weitere 5-20 Minuten zum Sieden erhitzt bevor der Precursor zugegeben wurde.

Änderung und Kontrolle des pH-Werts durch Citrat-Puffer

Eine 2.2 mM Natriumcitrat-Lösung, S.C., und eine 2.2 mM Citronensäurelösung (C.A., engl.: citric acid; Monohydrat: $C_6H_8O_7$ ·H₂O) wurden in verschiedenen Verhältnissen S.C./C.A.: 90/10; 75/25; 66/33; 50/50 gemischt. Dann wurde verfahren wie unter 1.3.5.1 beschrieben.

Änderung des pH-Werts durch Salzsäure

Es wurde verfahren wie unter 1.3.5.1 beschrieben. Vor Zugabe des Precursors wurde zur siedenden S.C.-Lösung 100 µl 2 M Salzsäure (HCl) gegeben.

Zugabe von Silbernitrat

Es wurde verfahren wie unter 1.3.5.1 beschrieben. Direkt oder 10 Minuten vor der Precursorzugabe wurden in die siedende S.C.-Lösung 127 μ l 5.9 mM Silbernitratlösung AgNO₃ injiziert. Diese Variation folgt der Vorschrift von Xia *et al.*¹³

Zugabe von EDTA

Es wurde verfahren wie unter 1.3.5.1 beschrieben, unter Verwendung von 2.2 mM Citratpuffer (S.C./C.A.: 75/25) mit 0.1 mM, 0.02 mM oder 0.5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Es wurde das Tetranatrium-Salz, Na₄EDTA, zum Einstellen der Konzentrationen verwendet.

Änderung der Mischungsbedingungen und der Ansatzgröße

Es wurden 800 ml 2.75 mM Citrat-Puffer (S.C./C.A.: 75/25) in einem 2000 ml-Becherglas auf einem Magnetrührer mit Heizplatte unter Rühren zum Sieden erhitzt. In einem 400 ml Becherglas wurden zeitgleich 200 ml 812.5 μ M Tetrachloridogoldsäure in Wasser unter Rühren auf 90-100 °C erhitzt. Die Citrat-Puffer-Lösung wurde 10-15 Minuten zum Sieden erhitzt, dann wurde zügig und unter starkem Rühren die heiße Precursorlösung zugegeben. [*Verbrühungsgefahr! Angemessene Schutzkleidung, insbesondere geeignete Schutzhandschuhe verwenden.*] Die Wärmezufuhr wurde dann unterbrochen und unter Rühren das langsame Abkühlen abgewartet. Nach 15-30 Minuten wurden die erhaltene AuNP-Lösung in Vorratsbehälter überführt. Eine Variation dieser Synthese ist die Durchführung in Gegenwart von 0.01 mM EDTA (bezogen auf das Volumen der Reaktionsmischung = 1000 ml).

1.3.5.3 Seeded Growth Synthese

Die durchgeführten Seeded Growth Synthesen stellen Variationen der von Bastus *et al.* beschriebenen Synthese dar.⁹

Seed Partikel und Generation 0

Als Seed-Partikel wurden Citratstabilisierte AuNP wie unter 1.3.5.1 beschrieben synthetisiert wenn nicht anders angegeben. Die Seeded Growth Reaktion wird unter Rühren durchgeführt. Nach Abkühlen der Seed-Partikellösung auf 80 °C innerhalb von 20-30 Minuten wurde 1 ml Probe entnommen und durch 1 ml S.C.-Lösung ersetzt (Generation 0, Zyklus 0: g00). Die Konzentration dieser 1 ml S.C.-Lösung, c_{g00} (S.C.), variierte in verschiedenen Experimenten von 2.2-75.0 mM. Bei 80 °C wurden dann 1 ml 25 mM Tetrachloridogoldsäure (Precursorlösung) zugegeben. Nach 20 oder 40 Minuten wurde 1 ml Probe (g01) entnommen und durch 1 ml S.C.-Lösung (c_{g01} (S.C.)) ersetzt. Nach weiteren 20 Minuten oder direkt im Anschluss (Wartezeit zwischen den Precursorzugaben $\Delta t = 40$ min) wurden wieder 1 ml Presursorlösung zugegeben. Nach 40 Minuten wurden 55 ml der Reaktionsmischung entnommen (g02) und durch 53 ml Wasser und 2 ml S.C.-Lösung (c_{g02} (S.C.) ersetzt.

Seeded Growth Zyklen, Generationen i

Die verdünnten Partikel AuNPg02 wurden bei 80 °C mit 1 ml Precursorlösung versetzt. Nach 20 oder 40 Minuten wurde 1 ml Probe (gi0) entnommen und durch 1 ml S.C.-Lösung $(c_{gi0}(S.C.))$ ersetzt. Nach weiteren 20 Minuten oder direkt im Anschluss (Wartezeit zwischen den Precursorzugaben $\Delta t = 40$ min) wurde wieder 1 ml Presursorlösung zugegeben. Nach 20 oder 40 Minuten wurde 1 ml Probe (gi1) entnommen und durch S.C.-Lösung ($c_{gi1}(S.C.)$) ersetzt. 40 Minuten nach der vorangehenden Precursorzugabe wurde ein drittes Mal 1 ml Precursorlösung zugegeben. Nach 40 Minuten wurden 55 ml der Reaktionsmischung entnommen (gi2) und durch 53 ml Wasser und 2 ml S.C.-Lösung ($c_{gi2}(S.C.)$) ersetzt. Mit diesen verdünnten Partikeln wurde der nächste Zyklus nach dieser Vorschrift gestartet (gi+1).

1.3.5.4 Variationen der Seeded Growth Synthese

In einer Variation der Seeded Growth Synthese erfolgten pro Generation nur zwei Precursorzugaben. Hier entsprach die die jeweilige Generation g(i+1)0 der verdünnten vorangegangenen Generation gi2 (vgl. Abb. 1.13).

Variationen der beschriebenen Seeded Growth Synthese betreffen die Konzentrationen der zugegebenen S.C.-Lösungen, c_{gij} , die Reaktionstemperatur, die Wartezeiten zwischen den Precursorzugaben und die Zeitpunkte der Probennahme und S.C.-Zugaben. Die Variationen dieser Parameter werden im Ergebnisteil (Abschnitt 1.4.4) spezifiziert und diskutiert.

1.4 Ergebnisse und Diskussionen Kapitel 1

1.4.1 Synthese sphärischer, citratstabilisierter Goldnanopartikel

Die Synthese sphärischer, Citratstabilisierter Goldnanopartikel (AuNP) nach der von Ojea-Jimenéz et al.12 beschriebenen inversen Methode liefert zuverlässig AuNP von 8-15 nm mit Polydispersitäten von 10-15 %. Bei den durchgeführten Synthesen wurden die Parameter Temperatur und S.C.-Konzentration nicht variiert. Für eine schnelle Nukleation wurde eine maximale Temperatur als optimal angenommen und zum Einfluss der S.C. Konzentration liegen viele umfassende Studien vor (vgl. Abschnitt 1.2.2) anhand derer die eingesetzte Konzentration als Wert im optimalen Bereich angenommen werden kann. Die Reproduzierbarkeit sowohl der Partikelgröße als auch der Polydispersität ist jedoch innerhalb der genannten Bereiche verbesserungswürdig und es wurden in dieser Arbeit verschiedene Parameter untersucht, die in vorliegenden Studien experimentell nicht hinreichend berücksichtigt wurden. Als entscheidende Parameter wurden in dieser Arbeit der pH-Wert und die Durchmischung herausgearbeitet. Der Einfluss dieser Parameter ist grundsätzlich literaturbekannt, nichtsdestotrotz konnten durch Anpassung der Synthesen sowohl Reproduzierbarkeit als auch Polydispersität der AuNP im Vergleich zu publizierten Methoden deutlich verbessert werden. Ein weiterer Parameter ist der Zeitpunkt der Precursorzugabe bei der verwendeten inversen Methode nach Ojea-Jimenéz et al.,¹² die nahezu allen durchgeführten AuNP Synthesen zugrundeliegt. Es wurde weiterhin die Strategie von Xia et al.¹³ getestet, die Uniformität und Polydispersität der AuNP durch Zugabe von Silbernitrat zu verbessern. In den folgenden Abschnitten werden einige Parameter diskutiert und Resultate von ergänzenden Experimenten vorgestellt. Abschließend wird die Leistungsfähigkeit der in dieser Arbeit entwickelten optimierten Synthesen bewertet.

1.4.1.1 Zeitpunkt der Precursorzugabe

Ein wichtiger Parameter der inversen Synthese ist die Wartezeit bis zur Precursorzugabe, nachdem die vorgelegte 2.2 mM Citratlösung (S.C.) den Siedepunkt erreicht hat. Diese Wartezeit beeinflusst, wie in Abschnitt 1.2.2.4 erläutert, den Gehalt an Acetondicarboxylat in der Reaktionsmischung und damit die Nukleationsgeschwindigkeit. Grundsätzlich ist wünschenswert, die Nukleation scharf von der Wachstumsphase zu trennen, wichtig ist aber auch die Frage, wie viel Precursormaterial durch die Nukleation umgesetzt wird und wie viel in der anschließenden Wachstumsphase. Bedingungen, die eine schnelle Nukleation begünstigen, insbesondere hohe Temperatur, ein niedriger pH-Wert (bei dem reaktivere Precursor-Spezies vorliegen) und hohe Reduktionskraft der Lösung, sind für ein kontrolliertes Wachstum ungünstig und erhöhen zudem die Wahrscheinlichkeit einer Sekundärnukleation. Folglich ist eine möglichst vollständige Umsetzung des Precursormaterials durch die initiale Nukleation wünschenswert. Die Nukleation kann in der Synthese deutlich am Farbumschlag der zunächst farblosen Lösung über dunkle, bläuliche oder violette Töne hin zum charakteristischen tiefen Weinrot erkannt werden. In einem Kontrollexperiment wurde die Reaktion direkt nach der Nukleation gestoppt bzw. stark verlangsamt, indem eine Probe mit einem Polymerliganden versetzt und abgekühlt wurde. Die Polydispersität P dieser Partikel war deutlich geringer (< 10 %) als die von Partikeln nach beendeter Reaktion (> 15 %).

Die Wartezeit vor der Precursorzugabe wurde in verschiedenen Synthesen von ~0-20 Minuten variiert. Im direkten Vergleich dreier Synthesen mit Wartezeiten von 10, 15 und 20 Minuten vor der Precursorzugabe, wurde eine abnehmende Polydispersität (P = 17.6, 14.9 und 13.1 %) mit zunehmender Wartezeit beobachtet. Die Wartezeit scheint jedoch ein untergeordneter Parameter zu sein. Wenn der pH-Wert der Lösung nicht optimal eingestellt ist, kann die Anpassung der Wartezeit die Partikelqualität verbessern, allerdings nur von einer geringen (P > 15 %) zu einer durchschnittlichen Qualität ($P \sim 12-15$ %). Ist der pH-Wert dagegen im optimalen Bereich, so werden unabhängig von der Wartezeit AuNP hoher Qualität erhalten (P < 12 %). Dies weist darauf hin, dass die pH-abhängige Reaktivität der Precursor-Spezies¹⁸ den Effekt der Acetondicarboxylat-Konzentration, die durch längere Wartezeit erhöht wird,¹² deutlich überwiegt.

1.4.1.2 Einfluss des pH-Wertes

Der komplexe Einfluss des pH-Wertes auf die AuNP-Synthese wurde in Abschnitt 1.2.2.1 erläutert. Während der Einfluss des pH-Wertes unumstritten ist, hat sich noch nicht etabliert welcher pH-Wert für die Synthese optimal ist. Ein ganz entscheidender Aspekt für die Reproduzierbarkeit ist davon unabhängig jedoch, wie der pH-Wert grundsätzlich kontrolliert werden kann. Schwankungen des pH-Wertes in der Reaktionsmischung können viele Ursachen haben, insbesondere darf der Einfluss des eingesetzten Wassers nicht unterschätzt werden. Natriumcitrat kann in hoher Reinheit zuverlässig und reproduzierbar eingewogen werden, allerdings hängt das Gleichgewicht der Oxidationsreaktion zum Acetondicarboxylat in Wasser, abgesehen vom pH-Wert und Sauerstoffgehalt des Wassers, von Parametern wie Heizraten und Temperaturprofilen ab, die in verschiedenen Apparaturen und Laboren nicht perfekt konstant gehalten werden können. Der Precursor Tetrachloridogoldsäure ist stark hygroskopisch und in wässrigen Lösungen entstehen daraus Mischungen komplexer Au(III)-Anionen mit den Liganden Cl⁻ und OH⁻ in unterschiedlichen Zusammensetzungen (s. Ab-

schnitt 1.2.2.1), deren Verteilung sowohl den pH-Wert beeinflusst, als auch durch diesen beeinflusst wird. Typischerweise ergibt sich aus der Mischung der S.C.-Lösung und der Precursorlösung ein pH-Wert zwischen 5.5 und 7, ein Bereich in dem der pH-Wert empfindlich von den Ionenkonzentrationen in der Mischung abhängt. Selbst bei exakt gleichen Reaktionsbedingungen ist die Reproduzierbarkeit der Synthese bei dieser Versuchsführung also nur gegeben, wenn der pH-Wert des verwendeten Wassers konstant ist.

Eine Möglichkeit, den pH-Wert zu kontrollieren, ist dessen Anpassung durch Säurezugabe. Durch Zugabe von Salzsäure konnte die Polydispersität der AuNP deutlich verbessert werden, sinkt jedoch der pH-Wert der Mischung unter etwa 4.6, tritt eine Destabilisierung und Aggregation der AuNP ein. Zwar dürfte die zugegebene Salzsäure den pH-Wert dominieren, der im niedrigeren Bereich zudem unempfindlicher gegenüber den Einflüssen anderer Ionen ist, die Verwendung von Citronensäure erscheint jedoch aus zweierlei Gründen sinnvoller: Zum einen liegt bei Verwendung von Citronensäure ein echtes Puffersystem, der klassische Citrat-Puffer, vor, zum anderen wird keine neue Spezies in die Reaktionsmischung gebracht. Der Chlorid-Ionengehalt wird nicht erhöht und der Natriumionengehalt verringert, da weniger Trinatriumcitrat verwendet wird. Chlorid-Ionen können als Ligand an die Goldoberfläche binden und dementsprechend den Syntheseverlauf beeinflussen.⁹⁶ In Vorversuchen wurde getestet, wie der pH-Wert vom Verhältnis S.C./C.A. abhängt. Dazu wurden der Synthesevorschrift entsprechend 150 ml Citratpuffer mit 1 ml Precursorlösung versetzt, jedoch bei Raumtemperatur, und die pH-Werte vor und nach der Zugabe verglichen. Es zeigte sich, dass eine Mischung von 70/30 (S.C./C.A.) eine gute Pufferwirkung bei pH 4.7 zeigte. Erst nach Zugabe von 3 ml Precursorlösung sank der pH-Wert unter 4.7. Abbildung 1.8 (A) zeigt die Ergebnisse. Es wurden AuNP-Synthesen mit verschiedenen Pufferzusammensetzungen durchgeführt (Abb. 1.8 B-E). Die geringsten Polydispersitäten und besten Uniformitäten wurden mit der Zusammensetzung 75/25 erhalten, bei einer Zusammensetzung von 50/50 wurden sehr polydisperse Partikel erhalten. Bei dieser Zusammensetzung lag der pH-Wert in den Vorversuchen vor der Precursorzugabe bei 4.4 und nach der Zugabe bei 4.3. Es kann in Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten, in denen mit Salzsäure angesäuert wurde, geschlussfolgert werden, dass bei pH-Werten unter 4.5 die Stabilisierung der AuNP rapide abnimmt. Dadurch wird aggregatives Wachstum zu ungleichmäßiger geformten Partikeln höherer Polydispersität begünstigt. Ein pH Wert von 4.7, recht nahe dieser Grenze, scheint dagegen optimal für die AuNP-Synthese. Die genaue Kontrolle des pH-Werts bei diesem Wert ist mit einer Pufferlösung am besten möglich und durch Verwendung eines Citratpuffers wird die Einführung zusätzlicher Spezies in die Reaktionsmischung vermieden.

Unter Verwendung dieses Puffers konnten geringe Polydispersitäten < 11% bei vergleichsweise hohen Partikeldurchmessern von 14-15 nm reproduziert werden. Bemerkenswert ist die Übereinstimmung des pH-Optimums mit der zweiten Säurekonstante der Citronensäure $pK_{S2} = 4.76$.



Abb. 1.8: Abhängigkeit der AuNP-Synthese vom pH-Wert. A: pH-Wert von 150 ml 2.2 mM Citratpuffer in den angegebenen Zusammensetzungen S.C.:C.A. bei Raumtemperatur vor und nach der Zugabe von 1 ml Precursorlösung (25 mM HAuCl₄). B: Mittlere Durchmesser und Standardabweichungen von AuNP, die in 2.2 mM Citratpuffern verschiedener Zusammensetzung synthetisiert wurden. C, D und E zeigen die entsprechenden TEM-Analysen und eine Beispielaufnahme. Die Auswertung erfolgte unter Annahme der Sphärizität, die für in 50:50 Citratpuffer synthetisierte AuNP (E) bei vielen Partikeln nicht gegeben ist. Für diese Probe dient die Auswertung nur Vergleichszwecken. Die geringste Polydispersität wurde mit 75 % S.C.-Anteil erhalten (D), diese Mischung puffert bei pH 4.7.

1.4.1.3 Einfluss der Durchmischung

Sowohl die klassische Turkevich-Synthese als auch die inverse Methode basieren auf der Zugabe eines kleinen Volumens (5 ml⁵ oder 1 ml¹²) zu einem großen Volumen (95-100 ml oder 149 ml). Für eine gute Durchmischung scheint indes die Strategie von Polte *et al.*^{19,35} vorteilhaft zu sein, bei der gleiche Volumina (je 35 ml) bei der Reaktionstemperatur miteinander vermischt werden. Bei diesem Vorgehen erfolgt bereits durch die Zugabe der einen Lösung zur anderen eine starke Durchmischung. Um den Einfluss der Durchmischung zu testen, aber auch die Möglichkeit, größere Volumina zu synthetisieren, wurden AuNP-Synthesen mit einem finalen Volumen von 1000 ml in Citratpuffer (75% S.C.) durchgeführt. Hierzu wurden 200 ml Precursorlösung und 800 ml Citratpuffer parallel zum Sieden erhitzt und dann unter starkem Rühren zügig vereint. Die Konzentrationen der Reaktanten in dieser Reaktionsmischung entsprachen denen der inversen Methode: 2.2 mM Citratpuffer und 0.163 mM Tetrachloridogoldsäure (0.167 mM bei der inversen Methode). Mit diesem Vorgehen wurden sowohl deutlich geringere Polydispersitäten (~8 %) erhalten als auch die Reproduzierbarkeit der Partikelgröße signifikant verbessert. Abbildung 1.9 zeigt einen Vergleich der verschiedenen Synthesemethoden.



Abb. 1.9: Vergleich von Variationen der Turkevich-Synthese. Durchmesser und Standardabweichung verschiedener Partikelchargen, die mit der inversen Methode ohne und mit pH-Anpassung, sowie der Methode für eine bessere Durchmischung synthetisiert wurden.

Der mittlere Durchmesser aus vier Synthesen betrug $\bar{d} = 11.75 \pm 0.17$ nm, die Schwankungen des Durchmessers lagen also unter 1.5 %, während bei der inversen Methode die Durchmesser verschiedener AuNP-Chargen um 20 % schwankten und bei den pH-optimierten Synthesen um 6 %. Dies zeigt, dass die Kontrolle des pH-Werts und der Durchmischung eine ganz entscheidende Rolle bei der Synthese sphärischer AuNP spielen.

1.4.1.4 Einfluss von EDTA

In verschiedenen Synthesen wurde der Einfluss von EDTA auf die Qualität der AuNP untersucht. EDTA kann die Synthese von AuNP grundsätzlich auf zwei Arten beeinflussen: es kann den Restgehalt bestimmter Metallionen in der Reaktionsmischung komplexieren, aber auch als Reduktionsmittel und stabilisierender Ligand auftreten.⁹⁷ Ein wichtiger struktureller Unterschied zur Citronensäure ist die deutlich höhere Acidität des EDTA durch den negativen induktiven (-I) Effekt der tertiären Amine, die ihrerseits basisch reagieren. Die pKs-Werte der Säuregruppen betragen $pKs_1 = 0.26$, $pK_{S2} = 0.86$, $pK_{S3} = 2.0$, $pK_{S4} = 2.7$ und die pK_S -Werte der Amine $pK_{S5} = 6.2$ und $pK_{S6} = 10.3$. Die Carboxylgruppen des EDTA liegen also im Gegensatz zur Citronensäure (pKs₁ = 3.13, pKs₂ = 4.76, pKs₃ = 6.4) beim pH-Wert 4.7 der optimierten AuNP-Synthese weitestgehend deprotoniert vor, während die tertiären Aminogruppen bei diesem pH-Wert mehrheitlich protoniert vorliegen. Abbildung 1.10 zeigt die Struktur des EDTA beim pH-Wert der Synthesen und TEM-Aufnahmen von AuNP, die durch Synthesen in Gegenwart unterschiedlicher EDTA-Konzentrationen erhalten wurden. Die Synthesebedingungen entsprachen, abgesehen von der EDTA-Konzentration, denen der in Abbildung 1.8 D gezeigten Synthese (inverse Methode in Citratpuffer mit 75% S.C.). Die TEM-Analysen legen nahe, dass die Entstehung dreieckiger, prismatischer AuNP durch die Zugabe von EDTA verringert werden kann. Bei hohen EDTA-Konzentrationen (0.5 mM) werden keine monodispersen AuNP mehr erhalten. Diese Beobachtung spricht dafür, dass beim pH Wert der Synthesen von 4.7 EDTA nicht geeignet ist, die AuNP zu stabilisieren, die deshalb durch aggregatives Wachstum und Koaleszenz unkontrolliert zu sehr polydispersen Verteilungen wachsen. Dozol et al. beobachteten in AuNP-Synthesen mit EDTA, dass bei niedrigen pH-Werten (4.5-6.3) aggregatives Wachstum zu sehr großen Partikeln dominierte, während bei höheren pH-Werten deutlich kleinere und weniger polydisperse Partikel erhalten wurden und führten dies auch auf die schlechtere Stabilisierung der AuNP durch EDTA bei niedrigeren pH-Werten zurück.⁹⁷ Der Grund für die schlechter Stabilisierung dürfte die schwächere Bindung des EDTA zum Gold aufgrund der Protonierung der Aminogruppen sein, wobei ungeklärt ist, wie EDTA die Stabilisierung durch Citrat stört. Es scheint vor diesem Hintergrund in jedem Fall nicht schlüssig, inwiefern EDTA in seiner Rolle als Ligand das anisotrope Wachstum zu dreieckigen Prismen unterdrücken sollte. Ähnliches gilt für die reduzierende Eigenschaft des EDTA, die eine beschleunigte Nukleation bewirken könnte.

Eine schnellere Nukleation kann aggregatives Wachstum z.B. über die Größe der Primärpartikel beeinflussen und das Wachstum im Allgemeinen durch einen veränderten initialen Precursorverbrauch. Typischerweise führt eine schnellere Nukleation zu weniger polydispersen Partikeln, die Polydispersität änderte sich in den untersuchten Proben jedoch nicht signifikant bei EDTA Konzentrationen von 0.02 mM und 0.1 mM im Vergleich zur Synthese ohne EDTA (Abb. 1.8 D) und es ist kein Mechanismus bekannt, nach dem eine schnelle Nukleation anisotropes Wachstum zu dreieckigen Prismen unterbindet.



Abb. 1.10: Einfluss von EDTA auf die AuNP-Synthese. Struktur des EDTA bei pH 4.7 mit protonierten Aminogruppen und deprotonierten Carboxylgruppen und TEM-Aufnahmen von AuNP die mit der inversen Methode in Citratpuffer (S.C. 75%) in Gegenwart von 0.02 mM (A), 0.1 mM (B) und 0.5 mM (C) EDTA synthetisiert wurden.

Wenn EDTA weder in seiner Eigenschaft als Ligand noch als Reduktionsmittel das anisotrope Wachstum unterdrückt, bleibt die Möglichkeit der Komplexierung störender Metallionen. Für viele Synthesen anisotroper AuNP wie Nanorods und auch trigonaler Prismen wird Silbernitrat verwendet und als Beitrag zum anisotropen Wachstum wird die Rolle der Unterpotential-Abscheidung (UPD, engl.: underpotential deposition) diskutiert.^{25,67} UPD bezeichnet die Abscheidung einer oder weniger Monolagen eines Metalls bei Potentialen, die deutlich positiver als dessen Nernst-Potential sind. Eine solche Abscheidung kann eine Passivierung bestimmter Kristallflächen und damit anisotropes Wachstum bewirken. Zwar wurde in allen Synthesen mit Reinstwasser gearbeitet, allerdings können Spurenmetalle über die Reagenzien eingebracht werden, und bereits sehr geringe Konzentrationen (< μ M) könnten prinzipiell eine Population von Prismen im niedrigen Prozentbereich verursachen, da die AuNP-Konzentrationen in den Synthesen sehr niedrig sind (typischerweise 1-7 nM). Für ein besseres Verständnis der Wirkung des EDTA sind weitere Experimente nötig, z.B. Synthesen in Gegenwart definierter Konzentrationen bestimmter Metallionen und EDTA. Die Beobachtung, dass in der Gegenwart von EDTA weniger trigonale Prismen erhalten werden, bestätigte sich auch bei Synthesen mit optimierter Durchmischung (Abb. 1.11).



Abb. 1.11: Einfluss von EDTA auf die Form der AuNP. TEM-Aufnahmen von AuNP die mit der inversen Methode in Citratpuffer (S.C. 75%) und optimierter Durchmischung ohne EDTA (A, C) und in der Gegenwart von 0.01 mM EDTA (B, D) synthetisiert wurden.

1.4.2 Seeded Growth Synthesen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Seeded Growth Synthesen basieren auf der Vorschrift von Bastus *et al.*⁹ Es wurden zwei Varianten dieser Synthese durchgeführt (vgl. Experimentalteil Abschnitt 1.3.5.3 ff.), Variante 1 entspricht in der Abfolge der Precursorzugaben und Verdünnungsschritte der Vorschrift nach Bastus und ist in Abbildung 1.12 schematisch dargestellt. In Variante 2 erfolgen nur zwei anstelle von drei Precursorzugaben pro Generation, eine Generation gi2 entspricht nach dem jeweiligen Verdünnungsschritt den Seed-Partikeln g(i+1)0 der darauffolgenden Generation (Abbildung 1.13).



Abb. 1.12: Schema der Seeded Growth Synthese Variante 1. Diese Variante folgt der Vorschrift von Bastus *et al.*⁹



Abb. 1.13: Schema der Seeded Growth Synthese Variante 2.

Abgesehen von diesen grundsätzlichen Variationen in Variante 1 und 2 der Seeded Growth Synthese wurden die Temperatur, die Citratkonzentration und die Reaktionszeiten variiert. Die Citratkonzentration kann in den Verdünnungsschritten durch Verdünnung mit entsprechend konzentrierter Citratlösung angepasst werden, oder durch Ersetzen von Probenvolumina, die während der Synthese entnommen werden, durch Citratlösung. Typischerweise wurden in den Seeded Growth Synthesen in jedem Zyklus eine Probe von 1 ml entnommen und durch Citratlösung ersetzt.

Abbildung 1.14 zeigt die TEM-Analyse einer Seeded Growth Synthese nach Variante 1 mit gewünschtem Verlauf, d.h. ohne Sekundärnukleation und mit gleichmäßigem Wachstum der Partikel. Abbildung 1.14 B zeigt das Wachstum der Partikel von Generation 0 bis Generation 6 im Vergleich zum theoretischen Wachstum, das auf Basis des Precursorumsatzes und der Verdünnungsschritte berechnet wurde. Der Berechnung wurde der Durchmesser und die Konzentration der Generation 0 (g02) zugrundegelegt. Der Durchmesser wird aus der TEM-Analyse erhalten und die Konzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie nach der Methode von Haiss et al., in der die Absorbanz bei 450 nm und ein größenabhängiger Extinktionskoeffizient genutzt wird.⁸⁸ Die Berechnung des theoretischen Wachstums erfolgt dann unter Annahme idealer Sphärizität der Partikel und von 100 % Precursorumsatz in jedem Zyklus. Als Dichte wird die Dichte von makroskopischem Gold, $\rho_{Au} = 19.32$ g/cm³, verwendet. Durch Gleichsetzen des Volumens von N_{AuNP} Kugelschalen der Dicke d_{i+1} - d_i mit dem zugegebenen Goldvolumen m_{Au}/ρ_{Au} ergibt sich:

$$d_{i+1}^3 = \frac{6m_{Au}}{\pi \rho_{Au} N_{AuNP}} + d_i^3 \tag{1.20}$$

Hier ist d_i der Durchmesser nach der *i*-ten, und d_{i+1} der Durchmesser nach der darauffolgenden Precursorzugabe. m_{Au} ist die Masse an Gold pro Precursorzugabe, bei Zugabe von 1 ml 25 mM Tetrachloridogoldsäure gilt $m_{Au} = 4.92$ mg, und N_{AuNP} ist die Zahl der Partikel vor der *i*+1-ten Precursorzugabe (vgl. auch Bastus *et al.*⁹).



Abb. 1.14: TEM-Analyse der Generationen 0-6 einer Seeded Growth Synthese (SG6). Gezeigt sind die Generationen der Synthese nach abgeschlossenem Zyklus 2, d.h. Generation 0 (g0) entspricht g02, g1 = g12, g2 = g22 usw. Gezeigt sind je eine repräsentative TEM-Aufnahme und die Häufigkeitsverteilung aus der Auswertung mehrerer TEM-Aufnahmen dieser Generation mit Anpassung durch eine Gauß-Verteilungsfunktion (Gauß-Fit) (A). Der Vergleich des gefundenen Partikelwachstums (exp, blaue Quadrate, Standardabweichung vom mittleren Durchmesser als Fehlerbalken, N > 150) als Zunahme des Durchmessers *d* in Abhängigkeit von der Generation mit dem theoretischen Wachstum (theor) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung für diese Synthese (B). Zwecks klarer Darstellung sind die berechneten Durchmesser (theor) nicht als Punkte, sondern als gestrichelte Linie durch diese Punkte dargestellt.

Ebenso wie das Wachstum entspricht auch die Konzentrationsabnahme der AuNP durch die Verdünnungsschritte den theoretischen Erwartungen. Dies weist darauf hin, dass wenig oder keine Partikel durch Sekundärnukleation entstanden sind. Die Konzentrationen können aus den Absorbanzspektren berechnet werden. Abbildung 1.15 zeigt die Absorbanzspektren der Generationen 0-6 dieser Seeded Growth Synthese, die normierten Spektren und den Vergleich von erwarteter und gefundener Konzentrationsabnahme.



Abb. 1.15: UV/vis-Analytik einer Seeded Growth Synthese (SG6). Absorbanzspektren $A(\lambda)$ und normierte Absorbanzspektren (normiert mit der Absorbanz bei 450 nm: $A/A450(\lambda)$) der Generationen g02-g06 der Seeded Growth Synthese SG6 (A). Die Proben waren 1:10 verdünnt, um im Arbeitsbereich des Detektors zu bleiben. Die Verschiebung des Absorbanzmaximums mit steigender Partikelgröße ist deutlich zu erkennen. Die aus den Absorbanzspektren berechneten Konzentrationen (c exp., rote Kreuze) stimmen gut mit den theoretischen Werten (c theor., graue gestrichelte Linie) überein (B). Der stufenförmige Verlauf von c theor. spiegelt die Verdünnungsschritte nach jeder Generation wider, als Ausgangspunkt für die Modellierung wurde die experimentell bestimmte Konzentration der Generation g02 gewählt. Man beachte, dass die Absorbanz in A trotz abnehmender Konzentrationen mit dem Durchmesser bzw. der Generation steigt, was die starke Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten der AuNP vom Durchmesser verdeutlicht.

Die Absorbanzspektren entsprechen den Erwartungen auf Grundlage der Mie-Theorie und weisen eine Zunahme des Extinktionskoeffizienten und eine Rotverschiebung des Absorbanzmaximums mit zunehmendem Durchmesser auf. Weiterhin steigen zwar die absoluten Standardabweichungen mit zunehmendem Durchmesser, die Polydispersitäten P als relative Standardabweichungen sinken jedoch. Niedrige Polydispersitäten, P < 10 %, werden bei Durchmessern über ~30 nm regelmäßig erhalten. Bei günstigem Verlauf werden auch Werte von 5-6% erreicht. Als ergänzende Analytik kann DLS genutzt werden, die besten Übereinstimmungen mit den TEM-Analysen zeigen typischerweise der Z-Average und der Mittelwert der volumengewichteten Größenverteilung. Die entsprechenden Durchmesser weichen bei Durchmessern über 20 nm i.d.R. weniger als 10 % von den TEM-Ergebnissen ab. Allerdings reagieren die DLS-Messungen sehr empfindlich auf Kontaminationen wie einzelne Aggregate oder große Partikel, die überproportional zur Streulichtintensität beitragen (wegen $I \propto d^{6}$) und vermutlich können auch polymere Precursorkomplexe, die in Lösung als wolkige, ausgedehnte Gebilde vorliegen,¹³ Licht streuen und dadurch ein störendes Signal verursachen, wenn der Precursor nicht quantitativ reagiert hat. Bei Vorliegen solcher störenden Signale ist die DLS-Messung zur Größenbestimmung nur noch sehr eingeschränkt geeignet, sie stellt dann jedoch ein Indiz dafür dar, dass Kontaminationen in der Probe vorliegen. TEM- und UV/vis-Analysen können dann weitere Hinweise auf Art und Ausmaß der Kontaminationen liefern.

1.4.3 Herausforderungen bei der Seeded Growth Synthese

Die in dieser Arbeit verwendete Methode für die Seeded Growth Synthese liefert mit guter Zuverlässigkeit sphärische AuNP in einem weiten Größenbereich. Verbesserungswürdig sind die möglichst genaue Reproduzierbarkeit eines gewünschten Partikeldurchmessers, die zuverlässige Stabilität der erhaltenen AuNP und die zuverlässige Vermeidung von Kontaminationen. Diese Aspekte sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

1.4.3.1 Reproduzierbarkeit der Partikelgröße

Die Durchmesser von AuNP derselben Generation, die in verschiedenen Seeded Growth Synthesen erhalten wurden, können deutlich voneinander abweichen. Unvollständiger Precursorumsatz und aggregatives Wachstum können AuNP-Konzentration und -Durchmesser beeinflussen, als wichtigste Ursache für stark unterschiedliche Größen kann jedoch der Einfluss der Seed-Partikel angenommen werden, was sich anhand eines Gedankenexperiments leicht zeigen lässt. Werden Seed-Partikel nach der klassischen oder inversen Turkevich-Methode synthetisiert, so variieren deren Durchmesser in einem Bereich von etwa 8-16 nm (extreme Abweichungen nicht eingeschlossen) und damit auch die Konzentrationen in einem Bereich von 1-11 nM. Je größer die AuNP, desto geringer deren Konzentration, wenn die gleiche Precursormenge eingesetzt wird. Abbildung 1.16 zeigt die Modellierung des Partikelwachstums für verschiedene Seed-Partikel unter sonst gleichen Bedingungen einer typischen Seeded Growth Synthese.



Abb. 1.16: Theoretische Zunahme des Durchmessers von AuNP in einer Seeded Growth Synthese. Modelliert für verschiedene Durchmesser und Konzentrationen der Seed-Partikel, wie sie in einer Standardsynthese erhalten werden können (A), für verschiedene Konzentrationen der Seed-Partikel bei gleichem Durchmesser (B) und für verschiedene Durchmesser der Seed-Partikel bei gleicher Konzentration (C).

Die Modellierung verdeutlicht, dass die Partikelgröße in Abhängigkeit von den Seed-Partikeln stark variieren kann, in diesem Beispiel von d = 36 nm bis d = 72 nm in der abgeschlossenen Generation 6 (g62). Die entscheidende Größe ist dabei die Konzentration der Seed-Partikel, während deren Durchmesser im betrachteten Bereich nahezu irrelevant ist. Dieser Umstand ist anhand von Gleichung 1.20 leicht einzusehen, denn während bei gleicher Anfangskonzentration und gleicher Precursorzugabe kleinere Partikel bzw. Kugeln schneller wachsen als größere und sich daher bereits nach wenigen Precursorzugaben demselben Durchmesser annähern (Abb. 1.16 C), fließt die Partikelkonzentration bzw. -anzahl als Faktor bei jedem Wachstumsschritt ein. Abbildung 1.17 zeigt den Vergleich des Wachstums in zwei Seeded Growth Synthesen mit stark unterschiedlichen Seed-Partikeln, der die Modellierung bestätigt.



Abb. 1.17: Vergleich der Seeded Growth Synthesen SG6 und SG9. Diese wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt (vgl. Tab. 1.1), jedoch unterschieden sich Durchmesser und Konzentration der Seed-Partikel stark (A). Die farbigen Beschriftungen verdeutlichen dies anhand der Generation g02. Das theoretische Wachstum ist anhand der Konzentrationen und Durchmesser der Seed-Partikel modelliert und für die Proben als gestrichelte graue Linie dargestellt (SG9: Punkte; SG6: Punkt-Strich). Für die Synthese SG9 ist zusätzlich die berechnete Partikelkonzentration c mit den experimentell bestimmten Werten (rote Pluszeichen) gezeigt (B). Die Abweichungen mancher experimentellen Werte vom theoretischen stufenförmigen Verlauf (Verdünnungsschritt vor jeder Generation) sind vermutlich auf Konzentrationsabnahmen durch aggregatives Wachstum zurückzuführen.

Für eine gute Reproduzierbarkeit der Partikelgröße ist es somit entscheidend, die Konzentration der Seed-Partikel zu bestimmen. Es kann dann ggf. deren Konzentration oder die Anzahl der Precursorzugaben angepasst werden, um gezielt AuNP mit einem gewünschten Durchmesser zu synthetisieren. Problematisch für die genaue Reproduzierbarkeit sind dann nur noch der Einfluss von aggregativem Wachstum und nicht umgesetztem Precursor auf die Partikelkonzentration.

1.4.3.2 Einfluss von Kontaminationen

Eine besondere Herausforderung bei der Seeded Growth Synthese ist die richtige Einstellung des Citratgehalts. Die komplexe Rolle des Citrats, die im Zusammenhang mit der AuNP-Synthese diskutiert wurde, erfordert in der Seeded Growth Synthese sorgfältige Berücksichtigung. Eine hohe Citratkonzentration bewirkt eine höhere Konzentration an
Wahrscheinlichkeit Acetondicarboxylat und damit die erhöhte unerwünschter Sekundärnukleation, andererseits aber auch eine bessere Stabilisierung der Partikel durch die Funktion als Ligand und pH-Mediator. Im Laufe einer Seeded Growth Synthese wird die Reaktionsmischung viele Stunden erhitzt und es erfolgen zahlreiche Precursorzugaben. Es ist daher kaum möglich, den Citratgehalt der Lösung vorherzusagen, das in mehreren Prozessen verbraucht wird, die nicht exakt quantifizierbar oder vorhersagbar sind: die Oxidation zu Acetondicarboxylat und anderen flüchtigen Folgeprodukten, die Reaktion mit Gold-Precursor und die Bindung an AuNP als Ligand. Eine Strategie der pH-Kontrolle mit einem Citrat-Puffer, wie sie für die einstufige Synthese sphärischer AuNP entwickelt wurde, ist für die Seeded Growth Synthese ungeeignet, da der niedrige pH-Wert auch bei niedrigeren Temperaturen eine zu hohe Reaktivität der Precursorkomplexe und damit unkontrolliertes Wachstum und Sekundärnukleation zur Folge hat. Abbildung 1.18 zeigt AuNP, die in einer Seeded Growth Synthese erhalten wurden, bei der in allen Schritten 75% Citratpuffer anstelle von Citratlösung verwendet wurde. Die Probe ist sehr polydispers, nicht uniform und scheint stark mit Precursorkomplexen und möglicherweise kleinen Goldclustern kontaminiert zu sein.



Abb. 1.18: TEM-Aufnahmen der Generation 4 (g42) einer Seeded Growth Synthese, die mit 75 % Citratpuffer durchgeführt wurde.

Insofern ist für die richtige Einstellung des Citratgehalts eine allgemeine Vorgabe schwierig, allerdings kann die Synthese spektroskopisch und mit DLS verfolgt werden, um auf ungünstige Entwicklungen wie die Entstehung von Sekundärpopulationen oder Akkumulation von Precursormaterial reagieren zu können. Wenn in einer Generation Precursormaterial oder eine Sekundärpopulation kleiner Partikel vorliegt, kann versucht werden, diese durch Reinigung zu entfernen, oder durch fortgesetztes Erhitzen deren Verbrauch durch Aufwachsen auf die Primärpartikel zu erwirken. Dies scheint insbesondere durch eine Behandlung im Mikrowellenofen gut möglich zu sein. Hinweise, dass ein solches Aufwachsen stattfindet, können sowohl bei TEM- als auch bei DLS-Messungen erhalten werden. Es wurde auch beobachtet, dass Sekundärpopulationen während einer Seeded Growth Synthese auftreten, die in folgenden Generationen wieder verschwinden, was stark dafür spricht, dass kleine Au-Cluster oder AuNP aggregativ auf die Hauptpopulation aufwachsen können. Vergleichbare Mechanismen wurden bereits in verschiedenen Studien beobachtet und beschrieben.^{9,18,19,35,14} Denkbar ist auch eine Ostwald-Reifung, also ein Wachstum größerer Partikel auf Kosten kleinerer durch diffusiven Stofftransport, was letztlich zur Auflösung der kleineren Partikel führen kann.⁹ Neben kleinen AuNP und -Clustern und Precursormaterial können sehr große AuNP, deren Form ein Entstehen durch Koaleszenz bzw. aggregatives Wachstum kleinerer Partikel nahelegt, und Aggregate als Kontamination auftreten. Es ist nicht immer klar zu differenzieren, ob koaleszierte AuNP durch die TEM-Präparation oder -Analyse entstanden sind, also während des Eintrocknens oder durch die Energie des Elektronenstrahls, oder ob sie auch in der Probe vorliegen. In extremen Fällen kann das Vorhandensein von Aggregaten oder großen Partikeln spektroskopisch nachgewiesen werden, da diese im längerwelligen Bereich absorbieren. In typischen Synthesen ist die Anzahl der Aggregate jedoch zu gering um das Spektrum messbar zu beeinflussen. Einen Hinweis auf vorhandene Aggregate können dann noch DLS-Messungen liefern, die allerdings wenig Aussagekraft bezüglich Anzahl und Art der Aggregate haben, da die Technik für polydisperse Proben kaum geeignet ist. Ist eine störende Anzahl von Aggregaten vorhanden, so kann versucht werden, diese über sorgfältig eingestellte Zentrifugationen oder durch Filtration zu entfernen.

1.4.3.3 Stabilität der AuNP

Der schlecht kontrollierbare Citratgehalt beeinflusst neben der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Kontaminationen auch die Stabilität der erhaltenen Partikel, zum einen über den pH-Wert, zum anderen über die Funktion des Citrats als stabilisierender Ligand. Es wurde immer wieder beobachtet, dass Proben von AuNP aus Seeded Growth Synthesen ohne erkennbaren äußeren Einfluss spontan aggregierten und sedimentierten, auch nach längerer Lagerung. Um solchen spontanen Destabilisierungen vorzubeugen, empfiehlt sich eine gründliche Sterilisation und kühle Lagerung der Proben, da manche Mikroorganismen Citrat abbauen können. Zudem kann für eine zusätzliche Stabilisierung der Citratgehalt nach der Synthese in den abgekühlten Proben erhöht werden, wenn ein störender Einfluss durch Zugabe während der Synthese befürchtet wird. Während der Synthese, z.B. bei der Probennahme, ist eine Kontamination mit Metallen strikt zu vermeiden. So kann das Eintauchen einer Stahlkanüle in die heiße Reaktionsmischung bereits eine Destabilisierung der Partikel bewirken.

1.4.4 Variationen der Seeded Growth Synthese

Variationen der Seeded Growth Synthese nach Bastus⁹ betreffen die Die Synthesetemperatur, die Citratzugaben und die Reaktionszeiten. Um Sekundärnukleation vorzubeugen wurde in den meisten Synthesen bei T = 80 °C gearbeitet; die Vorschrift nach Bastus sieht eine Reaktionstemperatur von 90 °C vor. Bei dieser niedrigeren Temperatur kann die Citratkonzentration während der Synthese deutlich höher gehalten werden, ohne dass eine Sekundärnukleation stattfindet. Die höhere Citratkonzentration bewirkte eine zuverlässigere Stabilität der Partikel, spontane Destabilisierungen während der Synthese konnten dadurch durchgehend vermieden werden. Allerdings wurden in manchen Synthesen Hinweise auf unvollständigen Precursorumsatz gefunden. Um dieses Problem zu adressieren, kann die Reaktionszeit verlängert, oder die Temperatur zwischenzeitlich erhöht werden. Die Temperaturerhöhungen wurden ggf. mindestens 20 Minuten nach der entsprechenden Precursorzugabe vorgenommen. Nach dieser Zeit hat der größte Teil des Precursors bereits mit den Seed-Partikeln reagiert und die Gefahr von Sekundärnukleation ist entsprechend geringer. Bastus et al. weisen in ihrer Studie darauf hin, dass die Precursorkonzentration nicht nur die Nukleationswahrscheinlichkeit beeinflusst, sondern auch die Kinetik des Wachstums und schlussfolgern, dass für ein möglichst gleichmäßiges Wachstum ein geringes Precursor/Seed-Partikel-Verhältnis vorteilhaft ist.⁹ Dieses Verhältnis wird im Laufe einer Seeded Growth Synthese durch die Verdünnungsschritte zu einem höheren Precursoranteil hin verschoben, und in Abschnitt 1.2.3 wurde gezeigt, dass diese Verschiebung notwendig ist, um mit angemessenem Aufwand AuNP mit Durchmesser > 40 nm zu synthetisieren (Abb. 1.2). Durch den relativ erhöhten Precursoranteil ist die Gefahr der Sekundärnukleation erhöht und durch die niedrigere Partikelkonzentration ist die Wachstumsreaktion verlangsamt. Es kann daher sinnvoll sein, bei der Synthese sehr großer AuNP die Reaktionszeiten entsprechend anzupassen. Für Durchmesser bis 100 nm erschien eine Reaktionszeit von 40 Minuten nach jeder Precursorzugabe als ausreichend. Precursormaterial, das in dieser Zeit nicht reagiert hatte, konnte auch durch längeres Erwärmen ohne Temperaturerhöhung nicht zur Reaktion gebracht werden. Dies weist darauf hin, dass Precursorkomplexe geringer Reaktivität vorliegen, möglicherweise die von Ji et al. beschriebenen Komplexe¹⁸ oder unbekannte komplexe Anionen. Wenn sich solche wenig reaktiven Precursorkomplexe über mehrere Zyklen hin in der Reaktionsmischung anreichern, kann allerdings die kritische Konzentration für eine Sekundärnukleation überschritten werden. Daher ist es wichtig eine solche Akkumulation während der Synthese zu vermeiden, indem z.B. die erwähnte Erhöhung der Temperatur vorgenommen wird. Es bleibt indes festzuhalten, dass das Auftreten von

Precursormaterial nicht gut reproduzierbar war, was darauf hindeutet, dass neben den kontrollierbaren Syntheseparametern weitere Einflussgrößen bestehen, wie sie im Zusammenhang der einstufigen Synthese von AuNP diskutiert wurden, also z.B. Konzentrationen an Spurenmetallen durch eingesetzte Reagenzien und Schwankungen des pH-Werts und Restionengehalts des eingesetzten Wassers.

1.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Seeded Growth Synthese

In Tabelle 1.1 sind die Bedingungen und Bemerkungen zu verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Seeded Growth Synthesen zusammengefasst. Obwohl einige Erkenntnisse zu dieser Synthese gewonnen werden konnten, ist die Datenlage nicht ausreichend, um eine Empfehlung für eine allgemeine Arbeitsvorschrift abzugeben. Dies ist der höheren Komplexizität der Synthese im Vergleich zur einstufigen AuNP-Synthese geschuldet, die sich aus der höheren Zahl kontrollierbarer und unkontrollierbarer Parameter ergibt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass für die Synthese größerer AuNP durch Seeded Growth eine hohe Konzentration der Seed-Partikel vorteilhaft ist, durch die ein gleichmäßigeres Wachstum auf Kosten der Wachstumsgeschwindigkeit bewirkt wurde. Der pH-Wert sollte durch entsprechende Zugaben von Citrat > 5 gehalten werden, um Stabilität und gleichmäßiges Wachstum der Partikel zu gewährleisten, eine Pufferstrategie wie bei der einstufigen Synthese konnte nicht erfolgreich übertragen werden. Es ist aber möglich, in Citratpuffer synthetisierte AuNP als Seeds einzusetzen, wenn danach Zugaben reiner Citratlösung erfolgen, die eine Erhöhung des pH-Wertes bewirken. Als Wachstumstemperatur scheint 80° C geeignet zu sein, um Sekundärnukleation zu vermeiden. Bei dieser Reaktionstemperatur können jedoch Strategien notwendig werden, die einen vollständigen Precursorumsatz gewährleisten, wie die zwischenzeitliche Erhöhung der Temperatur. Signifikante Populationen großer Aggregate und AuNP können durch Reinigungsschritte entfernt werden. Längere Pausen unter Abkühlung der Reaktionsmischung hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die Synthesen und es ist möglich auch lange gelagerte AuNP durch zusätzliche Seeded Growth Zyklen gezielt zu vergrößern. Die Synthese ist insofern durchaus flexibel und zuverlässig, bei fast allen Variationen wurden, ggf. nach Reinigungsschritten, geringe Polydispersitäten P < P10 % im Bereich höherer Durchmesser, d > 30 nm, erhalten. In zukünftigen Arbeiten könnten weitere Strategien getestet werden, die sowohl Sekundärnukleation als auch unvollständigen Precursorumsatz effektiv und reproduzierbar vermeiden. Zudem könnte untersucht werden, ob durch eine abgestimmte Zugabe von EDTA die Uniformität der AuNP verbessert werden kann.

| Benennung | Bedingungen | Beobachtungen |
|-----------|---|--|
| SG1 | Variante 2. $T(Zyklen) = 90$ °C. Reak- tionszeit pro Zyklus, $t_Z = 20-25$ Minu- ten. Ersetzen der Probenvolumina durch Wasser ($c_{gi0}(S.C.) = c_{gi1}(S.C.) = 0$ mM), Verdünnungsschritte durch Ersetzen von 55 ml Lösung mit 53 ml Wasser und 2 ml 61 mM S.C. ($c_{gi2}(S.C.) = 61$ mM). | 10 Generationen synthetisiert. Sekundärnukleation ab g7. Geringe Stabilität aller Generationen. $P < 8 \%$ von g3-g6. $d(g62)$ $= 64 \pm 3$ nm. |
| SG2 | Variante 2. $T(Zyklen) = 80 \text{ °C. } t_Z = 40$ Minuten. $c_{gi0}(S.C.) = c_{gi1}(S.C.) = 2.2$ mM, $c_{gi2}(S.C.) = 75$ mM. | 6 Generationen synthetisiert. Keine Sekundärnukleation. Hohe Stabilität aller Generationen. $P < 11$ % für alle Generationen, $P < 8$ % für g4 und g5. $d(g52) = 41 \pm 3$ nm. |
| SG3 | wie S2 | 4 Generationen synthetisiert. Keine Sekundärnukleation. Hohe Stabilität aller Generationen. $d(g32) = 31 \pm 3$ nm. |
| SG4 | wie S2 | 2 Generationen synthetisiert. Keine Sekundärnukleation. Hohe Stabilität aller Generationen. $d(g12) = 19 \pm 2$ nm. |
| SG5 | Variante 1. $T(Zyklen) = 80$ °C. $t_Z = 40$ Minuten. Ersetzen des ersten Proben- volumens pro Generation durch 60 mM S.C.: $c_{g00}(S.C.) = 60$ mM, $c_{gi0}(S.C.) = c_{gi1}(S.C.) = 2.2$ mM, $c_{gi2}(S.C.) = 75$ mM. | 8 Generationen synthetisiert. Geringe Stabilität einiger Generationen. Vereinzelt Hinweise auf Sekundärnukleation und unvollständigen Precursorumsatz. Vereinzelt große Partikel. $d(g82) = 82 \pm 5 \text{ nm}$ |
| SG6 | Variante 1. $T(Zyklen) = 80 \text{ °C. } t_Z = 40$ Minuten. $c_{g00}(S.C.) = c_{gi0}(S.C.) = c_{gi1}(S.C.) = 75 \text{ mM}, c_{gi2}(S.C.) = 75 \text{ mM}.$ | 6 Generationen synthetisiert. pH-Wert kon- stant 5.0-5.5. Hohe Stabilität aller Generatio- nen. Niedrige Polydispersitäten < 10 % aller Generationen. Keine Sekundärnukleation. Vereinzelt große Partikel. $d(g62) = 41 \pm 2$ nm. Auswertung in Abb. 1.14 |
| SG7 | wie SG6 | 6 Generationen synthetisiert. Hohe Stabilität aller Generationen. Niedrige Polydispersitäten < 10 % aller Generationen. Keine Sekundär- nukleation. In g1 und g2 Hinweise auf unvoll- ständigen Precursorumsatz. Vereinzelt große Partikel. $d(g62) = 50 \pm 3$ nm. |
| SG8 | wie SG6 | 6 Generationen synthetisiert. Hohe Stabilität aller Generationen. Niedrige Polydispersitäten < 10 % aller Generationen. Keine Sekundär- nukleation. In g0 Hinweise auf unvollständi- gen Precursorumsatz. Selten große Partikel. $d(g62) = 48 \pm 4$ nm. |

Tabelle 1.1: Übersicht über durchgeführte Seeded Growth Synthesen.

| SG9 | wie SG6 | 4 Generationen synthetisiert. Hohe Stabilität aller Generationen. Große Seed-Partikel mit sehr hoher Polydispersität ~ 20 %; verbesserte sich deutlich im Laufe der Synthese bis < 10 % in g4. In allen Generationen außer g32 Hin- weise auf unvollständigen Precursorumsatz und Sekundärnukleation kleiner Cluster, aber keine mitwachsende Sekundärpopulation. Selten große Partikel. Sehr große Partikel und starkes Wachstum. $d(g42) = 65 \pm 4$ nm. |
|------|--|---|
| SG10 | wie SG6 | 4 Generationen synthetisiert. Hohe Stabilität aller Generationen. Hohe Polydispersität der Seed-Partikel ~ 15 %, verbesserte sich deutlich im Laufe der Synthese bis < 10 % in g4. Sekundärnukleation in g2. In g1 bis g4 Hin- weise auf unvollständigen Precursorumsatz. Geringeres Ausmaß in g4. Selten große Parti- kel. $d(g42) = 40 \pm 3$ nm. |
| SG11 | Variante 1. g1-g3: $T(Zyklen) = 80$ °C. g4 und g5: Precursorzugabe bei 80 °C, nach 20 min <i>T</i> erhöht auf 100 °C. 20 min Reaktion bei 100 °C. $t_Z = 40$ Minuten. $c_{g00}(S.C.) = 2.2$ mM, $c_{gi0}(S.C.) = c_{gi1}(S.C.) = 37.5$ mM, $c_{gi2}(S.C.) = 75$ mM. Zeitlich versetzte Zugabe der Citratlösung nach Probennahme: jeweils 10 min. nach der folgenden Precursorzugabe. | 5 Generationen synthetisiert. Hohe Stabilität aller Generationen. Recht hohe Polydispersitäten 9-11 % aller Generationen. In g02, g21 und g22 starke Hinweise auf unvollständigen Precursorumsatz und Sekundärnukleation kleiner Cluster, aber keine mitwachsende Sekundärpopulation. In g22 und g32 nach zusätzlichem Erhitzen auf 100 °C für 20-40 Minuten deutlich weniger oder keine Hinweise auf unvollständigen Precursorumsatz. In allen Generationen einige große, koaleszierte Partikel. $d(g52) = 48 \pm 4$ nm. |
| SG12 | Variante 1. T (Zyklen) = 80-100 °C. Precursorzugabe bei 80 °C, nach 20 min T erhöht auf 100 °C. 20 min Reaktion bei 100 °C. t_Z = 40 Minuten. c_{g00} (S.C.) = 2.2 mM, c_{gi0} (S.C.) = c_{gi1} (S.C.) = 37.5 mM, c_{gi2} (S.C.) = 75 mM. Zeitlich versetzte Zugabe der Citratlösung nach Probennahme: jeweils 10 min. nach der folgenden Precursorzugabe. | 4 Generationen synthetisiert. Hohe Polydispersität der Seed-Partikel ~ 15 %, verbesserte sich deutlich im Laufe der Syn- these bis < 9 % in g2-g4. Hohe Stabilität aller Generationen. In g3 und g4 wenige Hinweise auf unvollständigen Precursorumsatz. Keine Sekundärnukleation. Einige große Partikel in g0 und g1, wenige in g2- g4. $d(g42) = 41 \pm 4$ nm. |
| SG13 | Wie SG12, jedoch Verwendung von 75 % Citratpuffer anstelle von S.C. in allen Zugabeschritten. | 4 Generationen synthetisiert. Starke Anzeichen auf sehr unvollständigen Precursorumsatz in allen Generationen. Sekundärnukleation spätestens ab g3. Starke Zunahme der Polydispersität und von Verformungen im Laufe der Synthese. Unkontrolliertes Wachstum. AuNP nicht verwertbar. |

| SG14 | Variante 1. $T(Zyklen) = 80-90$ °C. Precursorzugabe bei 80 °C, nach 20 min T erhöht auf 90 °C. 20 min Reaktion bei 90 °C. $t_Z = 40$ Minuten. $c_{g00}(S.C.) = 2.2$ mM, $c_{gi0}(S.C.) = c_{gi1}(S.C.) = 37.5$ mM, $c_{gi2}(S.C.) = 75$ mM. Seed-Partikel (g00), in 75% Citratpuffer synthetisiert. Zeitlich versetzte Zugabe der Citratlösung nach Probennahme: jeweils 10 min. nach der folgenden Precursorzugabe. | 3 Generationen synthetisiert. <i>P</i> aller Genera- tionen 7-9 %. Keine Sekundärnukleation. Sehr selten Hinweise auf unvollständigen Precursorumsatz. $d(g32) = 38 \pm 3$ nm. |
|------|--|---|
|------|--|---|

1.4.6 Fazit zu Kapitel 1

In diesem Kapitel wurde dargestellt, wie sphärische, citratstabilisierte Goldnanopartikel, AuNP, zuverlässig synthetisiert werden können. AuNP mit einem Durchmesser von ~12 nm konnten durch Optimierung der etablierten Turkevich-Synthese mit einer engeren Größenverteilung, deutlich verbesserten Reproduzierbarkeit der Partikelgröße und in größeren Ansätzen synthetisiert werden. Experimente zum Einfluss von EDTA auf die AuNP-Synthese deuten darauf hin, dass Kontaminationen der Reaktionsmischung mit Metallionen die Form der AuNP beeinflussen können und dass dieser Einfluss durch Zugabe abgestimmter Mengen EDTA unterdrückt werden kann. Diese ersten Ergebnisse könnten in zukünftigen Arbeiten abgesichert und weiter verfolgt werden.

AuNP mit größeren Durchmessern d > 15 nm wurden über die Seeded Growth Synthese synthetisiert. Diese Synthese ist deutlich komplexer und es kann zu diesem Zeitpunkt keine allgemeingültige Arbeitsvorschrift empfohlen werden. Es wurden 14 Seeded Growth Synthesen durchgeführt und mittels UV/vis-Spektroskopie, DLS und TEM analysiert. Aus den Ergebnissen dieser Analysen konnten Erkenntnisse zu den Einflüssen von Parametern wie pH-Wert, Temperatur, Citratkonzentration und Reaktionszeit gewonnen werden. In Kombination mit theoretischen Überlegungen und experimentell bestätigten einfachen Modellierungen konnten daraus Empfehlungen entwickelt werden, wie zuverlässig reproduzierbar sphärische AuNP mit genau einstellbaren Durchmessern von 12-80 nm, enger Größenverteilung und hoher Stabilität synthetisiert werden können. Für die genaue Einstellbarkeit der Partikelgröße ist die Konzentration der Seed-Partikel die entscheidende Größe und eine höhere Konzentration der Seed-Partikel scheint zudem eine engere Größenverteilung zu begünstigen. Unerwünschte Sekundärnukleation kann durch sorgfältige Einstellung und Kontrolle der Reaktionstemperatur und -zeit sowie der Citratkonzentration vermieden werden. Für eine hohe Stabilität der Partikel sind vor allem der pH-Wert und die Citratkonzentration entscheidend. Durch die Untersuchungen zur Seeded Growth Synthese konnten das Verständnis und die Kontrolle dieser Reaktion im Vergleich zu bisher veröffentlichten Studien vertieft und verbessert werden. Die Untersuchungen sowohl zur AuNP- als auch zur Seeded Growth Synthese waren fokussiert auf die praktische Durchführung der Synthesen. Die verschiedenen literaturbekannten Vorschläge zu den Mechanismen der AuNP-Synthesen wurden in der Planung und Analyse der Experimente, in den Modellierungen und bei der Diskussion berücksichtigt.

Kapitel 2

Synthese und Charakterisierung von PEGylierten Goldnanopartikeln

Teile dieses Kapitels sind in übersetzter Form übernommen aus:

Schulz, F.; Vossmeyer, T.; Bastús, N. G.; Weller, H. Effect of the Spacer Structure on the Stability of Gold Nanoparticles Functionalized with Monodentate Thiolated Poly(ethylene Glycol) Ligands. *Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908.

Copyright (2013) American Chemical Society

2.1 Einleitung zu Kapitel 2

Polymerliganden, die auf Polyethylenglykol (PEG) basieren, sind sehr gut geeignet für die Stabilisierung von Nanomaterialien für Anwendungen in der Medizin und Biotechnologie. In diesem Kapitel werden einige Grundlagen zur Oberflächen- und Ligandenchemie von AuNP erläutert. Die wohl wichtigste funktionelle Gruppe, die für die Bindung von Liganden an AuNP genutzt wird, ist die Thiol-Gruppe und dementsprechend liegt der Schwerpunkt der Ausführungen auf der Thiol-Gold Chemie. Die Strukturen von selbstanordnenden Monolagen (SAM) von Thiolen auf Goldoberflächen wurden in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv studiert. Das resultierende Verständnis stellt eine breite und fundierte Basis dar für das Studium der Struktur von Thiol-Monolagen auf AuNP, die analytisch deutlich schwieriger zugänglich sind. Wichtige Aspekte und der Stand der Forschung zu SAMs auf Gold und AuNP sollen zu Beginn des Kapitels umrissen werden. Es folgt die Vorstellung wichtiger Funktionalisierungsstrategien, die die Frage adressieren, wie Biomoleküle, Label, Wirkstoffe und andere Moleküle, die Partikel mit zusätzlichen Funktionen ausstatten, an Partikel gebunden und in die Struktur der Ligandenhülle integriert werden können. Anschließend wird der Einfluss von PEG auf die physikalischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Nanomaterialien erläutert, gefolgt von einigen grundlegenden Betrachtungen zur Stabilität von AuNP-Konjugaten und zum Zusammenhang von Ligandenstruktur und Stabilität.

Im Ergebnisteil wird dann gezeigt, wie mit verschiedenen Stabilitätstests die Struktur von Ligandenhüllen auf AuNP untersucht werden kann, und welche Erkenntnisse zum Zusammenhang von Ligandenstruktur und Stabilität aus diesen Untersuchungen gewonnen wurden. Eine besonders wichtige Methode war in diesen Untersuchungen das analytische Ätzen von AuNP mit Cyanid, das sowohl als Methode studiert wurde, als auch seinerseits zum Studium der Ligandenstruktur genutzt wurde. Die durchgeführten Arbeiten umfassen die Synthesen verschiedener PEG-Liganden mit einer besonders einfachen und flexiblen Methode, die Synthese der AuNP@PEG-Konjugate, also von AuNP, die mit PEG-Thiolat-Liganden funktionalisiert sind, die umfassende Charakterisierung dieser Konjugate und das Studium der Ligandenhüllen.

2.2 Theoretische Grundlagen und Forschungshintergrund zu Kapitel 2

2.2.1 Oberflächenchemie und SAMs auf Au und AuNP

2.2.1.1 Selbstanordnende Monolagen (SAMs)

Oberflächen von Metallen und Metalloxiden adsorbieren unter Umgebungsbedingungen organische Moleküle aus der Umgebung, weil dadurch die freie Energie an der Grenzfläche Metall/Metalloxid-Umgebung vermindert wird.48 Diese Adsorption findet undefiniert und unkontrolliert statt und resultiert dementsprechend in unstrukturierten Schichten von adsorbiertem Material. Geordnete und definierte Schichten von organischen Molekülen auf Metallund Metalloxidoberflächen werden als selbstanordnende Monolagen (engl.: Self-Assembled Monolayers, SAMs) bezeichnet. SAMs können dazu genutzt werden, verschiedenste physikalische Eigenschaften der Grenzfläche Metall/Metalloxid-Umgebung zu beeinflussen und einzustellen, z.B. die Leitfähigkeit, den hydrophilen/hydrophoben Charakter oder die Korrosionsbeständigkeit bzw. Reaktivität im Allgemeinen. Daraus folgt das enorme Potential und die Bedeutung von SAMs für alle Bereiche und Anwendungen in denen diese Grenzfläche eine Rolle spielt, sei es in der Speicherelektronik, der Sensorik, den Materialwissenschaften oder der Medizin, sei es die Beständigkeit eines Schiffsrumpfs oder die Verträglichkeit eines künstlichen Gelenks. SAMs können unabhängig davon, ob sie sich auf Nanomaterialien oder makroskopischen Metallsubstraten befinden, als eine Form der Nanotechnologie angesehen werden, denn zum einen ist eine der wichtigsten Eigenschaften von Nanomaterialien ihr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis und das Studium der SAMs ist eine Oberflächenwissenschaft, und zum anderen beträgt die Dicke der interessierenden Grenzschicht typischerweise wenige Nanometer. Durch lithographische Techniken und Mikrokontaktdruck (engl.: microcontact printing, µCP) können SAMs auf planaren Substraten auch in der Ebene der Metall-/Metalloxidoberfläche mit Auflösungen von 10-100 nm² strukturiert werden.⁴⁸ Einen hervorragenden Überblick über die Forschung an SAMs von 1999-2004 bietet der Übersichtsartikel aus dem Jahre 2005 aus der Gruppe von Whitesides, die einen gewaltigen Beitrag zum Verständnis von SAMs geleistet hat. In diesem Artikel wird die angesprochene Bedeutung von SAMs als Form der Nanotechnologie herausgearbeitet. Die frühere Forschung an SAMs, die mit der 1983 von Nuzzo und Allara vorgelegten Studie eingeläutet wurde,⁹⁸ ist in Übersichtsartikeln von Whitesides und Laibinis 1990,99 Dubois und Nuzzo 1992¹⁰⁰ sowie Ulman 1996¹⁰¹ zusammengefasst worden.

2.2.1.2 Struktur von SAMs auf Au(111)-Substraten

Grundsätzlich besteht eine SAM aus dem Metall- oder Metalloxidsubstrat und den adsorbierten organischen Molekülen, den Liganden, die Struktur ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt.



Abb. 2.1: Struktur einer SAM. Dargestellt als Skizze (A) und am Beispiel von 11-Mercaptoundecansäureliganden (MUA), die als Thiolat an ein Metallsubstrat gebunden sind (B). In der schematischen Darstellung sind die Säuregruppen deprotoniert.

Ein typischer Ligand enthält eine funktionelle Gruppe, die sogenannte Kopfgruppe, die an das Substrat bindet, eine organische, z.B. aliphatische oder aromatische, Zwischensequenz, die auch als Spacer bezeichnet wird, und schließlich eine terminale Gruppe, bei der es sich um eine funktionelle Gruppe aber auch eine Methylgruppe handeln kann. Die Spacer definieren die Grenzschicht zwischen Medium und Substratoberfläche und beeinflussen so z.B. optische und elektrische Eigenschaften des Substrats. Diese organische Grenzschicht mit definierter Dicke stellt zudem eine physikalische Barriere dar.⁴⁸ Terminale funktionelle Gruppen können dazu genutzt werden, durch chemische Kopplungsreaktionen zusätzlich Moleküle an die SAM zu binden. Sie bestimmen aber auch Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität und Ladung. SAMs auf planaren Substraten sind hinsichtlich ihrer einfachen Herstellung, guten analytischen Zugänglichkeit und kontrollierbaren Struktur besonders vorteilhaft, sie können sich jedoch genauso auf Substraten mit gekrümmten Oberflächen ausbilden, Oberflächen von Nanopartikeln verschiedenster Form eingeschlossen.

Gold ist aus verschiedenen Gründen das meiststudierte Substrat für SAMs:⁴⁸ Gold ist in verschiedensten Formen erhältlich, ob kolloidal, als dünner Film, als Einkristall oder in definierten Strukturen auf Trägern, die durch lithographische und Ätztechniken produziert werden können. Gold ist inert, es oxidiert nicht unter Standardbedingungen und reagiert nur mit wenigen Chemikalien. Gold hat eine hohe Affinität zu Thiolen, die dementsprechend auch adsorbierte Verunreinigungen verdrängen. Dünne Goldfilme oder –chips sind ein gebräuchliches Trägermaterial für wichtige analytische und spektroskopische Techniken wie

Oberflächenplasmonenresonanz- (SPR-) Spektroskopie, Schwingquarz-Mikrogravimetrie, Reflektionsabsorptionsinfrarotspektroskopie (RAIRS) und Ellipsometrie. Und schließlich ist Gold nicht giftig für Zellen und daher gut geeignet für Zellstudien.⁴⁸ Die wichtigste Kristallfläche des Goldes ist die (111)-Fläche, die beim kubisch-flächenzentrierten Kristall-gitter des Goldes einer hexagonalen Packung der Oberflächenatome entspricht.

Die wohl wichtigsten, und für die vorliegende Arbeit relevanten, Liganden für die Synthese von SAMs sind Thiole und davon abgeleitete Strukturen. Thiole binden gut an Edelmetalle und deren Legierungen. Die Angaben für die Bindungsenergie der Au-S Bindung bewegen sich im Bereich von 126-215 kJ/mol.^{47,48} Bei maximaler Bedeckung bilden Thiole ebenso wie elementarer Schwefel auf Au(111) eine kommensurate (d.h. das Verhältnis der Periodizitäten von Überstruktur und Kristallfläche ist eine rationale Zahl) ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$)R30° Überstruktur, in der die Schwefelatome die dreifach koordinierten Muldenplätze besetzen. Die Struktur ist in Abbildung 2.2 gezeigt.



Abb. 2.2: Oberflächenstruktur einer SAM. Maßstabsgetreue Darstellung einer Überstruktur von Schwefelatomen auf einer Au(111) Fläche mit $a = l_{Au} = 288$ pm. Die Elementarzelle der Au(111)-Fläche ist in grünen gestrichelten Linien, die der $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ Überstruktur in blau angedeutet. Den Goldatomen (rote Kugeln) ist der Radius $l_{Au}/2 = 144$ pm, den Schwefelatomen (gelbe Kugeln) der kovalente Radius des Schwefels von 102 pm zugrundegelegt.

R bezeichnet eine Rotation der Elementarzelle, in diesem Fall um 30°. Der Gitterparameter a_{Au} von Gold im kubisch-flächenzentrierten Gitter beträgt 407.8 pm, die Bindungslänge l_{Au} beträgt 288.4 pm. Zudem bilden bei SAMs von *n*-Alkanthiolen die Alkylketten eine sekundäre $c(4 \times 2)$ Überstruktur.^{48,50,102} Es werden zahlreiche Abweichungen von dieser idealisierten Struktur diskutiert, die z.B. durch die Ligandenmolekülstruktur verursacht sein können.¹⁰³ In der $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ Überstruktur beträgt der footprint eines Schwefelatoms bzw. *n*-Alkanthiolats 0.22 nm². Dieser Wert gibt einen Hinweis auf die maximal mögliche Bedeckungsdichte von Thiolen auf Au(111)-Oberflächen von rechnerisch 4.63 Liganden pro nm². Mit der Oberflächendichte der Goldatome von 13.9 nm⁻² ergibt sich eine Koordinationszahl von 3 für die Schwefelatome.

Die detaillierte Kenntnis der Struktur der Ligandenhülle ist durch die Vielzahl von Techniken möglich, die für die Charakterisierung von Oberflächen anwendbar sind. Dies sind insbesondere RAIRS, Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl.: X-ray photoelectron spectroscopy, XPS), hochauflösende Elektronenenergieverlustspektroskopie (engl.: highresolution electron energy loss spectroscopy, HREELS), XANES, Röntgendiffraktometrie mit streifendem Einfall (engl.: grazing incidence X-ray diffraction, GIXRD), Heliumatomstreuung (HAS), und Rastersondenmikroskopie (engl.: scanning probe microscopy, SPM) wie Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy, AFM) und Rastertunnelmikroskopie (engl.: scanning tunneling microscopy, STM).^{104,48,102,105} Diese Techniken sind nicht oder nur eingeschränkt für AuNP anwendbar und es ist nicht gesichert, inwieweit die Kenntnisse der Strukturen von SAMs auf planaren Substraten auf die SAMs auf AuNP übertragen werden können.

Für die Beschreibung der Ordnung der unverzweigten aromatischen oder aliphatischen Spacer ist ein einfaches Ein-Kettenmodell geeignet.^{106,48,50,102,105} Der Winkel α beschreibt dann die Verkippung der Spacerachse gegen den Normalenvektor der Oberfläche, der Winkel β die Rotation der Spacerachse, also die Verdrehung der CCC-Bindungsebene gegen die Ebene durch verkippte Spacerachse und Normalenvektor (Abb. 2.3). Zudem kann die Richtung der Verkippung durch einen weiteren (Azimut-) Winkel γ beschrieben werden.



Abb. 2.3: Durchschnittliche Struktur der Alkylketten in SAMs als Ein-Kettenmodell. Beschreibung der Orientierung und Verkippung von Alkylketten in SAMs durch die Winkel α , β und γ . Die z-Achse entspricht dem Normalenvektor der Substratoberfläche. Je nachdem, ob eine gerade oder ungerade Zahl von Methylengruppen vorliegt, ergibt sich bei verkippten Alkylketten (hier $\alpha = 30^{\circ}$) eine unterschiedliche Orientierung der terminalen Methylgruppe relativ zum Normalenvektor ("Odd-Even"-Effekt).

 α und β hängen stark von der Spacerstruktur ab und stellen einen Mittelwert aller Liganden in der SAM dar. In SAMs von *n*-Alkanthiolen auf Au(111) liegt α bei etwa 30° und β bei etwa 50°. Der Grund für die quasikristalline Ordnung der Alkylketten und anderer Spacer in SAMs sind die Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die durch diese sekundären Ordnungen maximiert werden, was eine Stabilisierung der SAM bewirkt. Die geometrische Begrenzung besteht dabei durch die "Verankerung" der Moleküle über die bindenden Kopfgruppen. Aus der Verkippung von Alkylthiolen in SAMs ergibt sich eine interessante strukturelle Besonderheit, dass nämlich Ketten mit einer ungeraden (engl.: odd) Anzahl von Methylengruppen sich geometrisch von solchen mit einer geraden (engl.: even) Anzahl von Methylengruppen unterscheiden. Dieser sogenannte "Odd-Even"-Effekt bewirkt z.B. ein unterschiedliches Benetzungsverhalten der entsprechenden SAMs.⁴⁸

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Struktur von SAMs einer Vielzahl von Thiolen, insbesondere von *n*-Alkylthiolen, in den letzten dreißig Jahren intensiv erforscht wurde und die Struktur solcher SAMs sehr detailliert beschrieben und verstanden wurde. Basis dafür sind und waren die Arbeiten an SAMs auf planaren Substraten, die mit einer Vielzahl leistungsfähiger analytischer und spektroskopischer Techniken untersucht werden können. Die strukturellen Modelle beschreiben indes idealisierte Strukturen ohne Defekte und es ist nicht klar, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse auf Nanomaterialien übertragen werden können. Diese weisen zum einen in der Regel eine deutlich unregelmäßigere und gekrümmte Oberfläche mit entsprechend mehr Defekten auf und sind zudem analytisch deutlich weniger Techniken und oft nur mit Einschränkungen zugänglich. Nichtsdestotrotz stellen die Erkenntnisse aus den umfassenden Arbeiten zu SAMs auf planaren Substraten eine ungemein wertvolle Basis für das Studium von Thiol-Ligandenhüllen auf AuNP dar.

2.2.1.3 Kinetische und thermodynamische Aspekte der Selbstanordnung von Thiolen auf Au

Die Selbstanordnung von Thiolen auf Gold ist kinetisch und thermodynamisch ein komplexer Prozess. Einige grundlegende Faktoren in diesem Prozess sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Das Wechselspiel von kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen ist bei der Selbstanordnung von besonderer Bedeutung. Die durch die Au-S-Bindungen vorgegebene Struktur kann die Packungsdichte der Spacer, und damit den Energiegewinn durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen beschränken, andererseits kann aber auch der sterische Anspruch der Spacer der begrenzende Faktor für die Packungsdichte der Liganden auf dem Substrat sein. Vor diesem Hintergrund sind auch Hinweise auf eine Mobilität der bereits gebundenen Liganden^{48,107,50,102,103} und die möglichen variierenden Motive der Schwefel-Gold-Bindung^{51,52} von Bedeutung. Es kann daraus gefolgert werden, dass prinzipiell in Abhängigkeit von Substrat und Liganden eine Vielzahl von primären und sekundären Überstrukturen von SAMs möglich ist.

Es ist etabliert, dass für *n*-Alkanthiole und verwandte Strukturen (z.B. aliphatische α - ω -Mercaptocarboxylsäuren) jede Methylengruppe durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen 4.0-7.9 kJ/mol zur Stabilisierung der SAM beiträgt.^{47,48} Lavrich et al. geben an, dass sich die Desorptionsenthalpie von *n*-Alkylthiolaten in SAMs auf Au(111) für n > 9 aus einem Beitrag der Chemisorption von 126 ± 2 kJ/mol und einem Beitrag der Physisorption von > 97 kJ/mol zusammensetzt (Die Thiolgruppe trägt laut Lavrich et al. 33 kJ/mol, eine Methylengruppe etwa 6.1 kJ/mol und die terminale Methylgruppe 16 kJ/mol zur Enthalpie der Physisorption bei).⁴⁷ Die Wechselwirkungen der Alkylketten leisten also einen bedeutenden Beitrag zur Stabilisierung der SAM. Auch der Mechanismus der Selbstanordnung hängt von der Kettenlänge ab. Dieser Mechanismus konnte insbesondere mithilfe der immer leistungsfähigeren Rastertunnelmikroskopie detailliert aufgeklärt werden.^{48,107,50,102,108,103} Studien zur Adsorption von n-Alkylthiolen an Au aus der Gasphase belegen übereinstimmend einen Prozess, der eine Übergangsphase niedriger Bedeckung beinhaltet. Diese Phase wird als striped-phase oder lying-down-phase bezeichnet, die Alkylthiole sind in dieser Phase physisorbiert und "liegen" auf der Substratoberfläche auf (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: Mechanismus der Selbstanordnung von Alkylthiolen auf Gold. Der initialen Adsorption (A) folgt die Anordnung der Moleküle zur sogenannten striped-phase (B). Adsorption weiterer Moleküle führt zur Nukleation von Bereichen höherer Dichte, in denen die Moleküle aufgerichtet sind (standing-up-phase, C). Diese Bereiche wachsen auf Kosten der striped-phase und aus diesem Phasenübergang resultiert schließlich die geordnete SAM (D).

Die Adsorptionsenthalpie korreliert dabei naturgemäß mit der Kettenlänge. Der schnellen initialen Physisorption folgt ein langsamerer Prozess, in dem die mobilen, physisorbierten n-Alkanthiole zu Domänen von aufrecht stehenden chemisorbierten Thiolaten mit hoher Bedeckungsdichte nukleieren, die schließlich zur vollständigen SAM wachsen. Diese Phase wird auch als standing-up-phase bezeichnet und entsteht also durch die Nukleation und Ausrichtung der Alkylketten, was auch als Kristallisations- oder Reorganisationsprozess aufgefasst werden kann.¹⁰⁹ Gleichzeitig erfolgt aber auch die chemische Umwandlung des adsorbierten Thiols in ein Thiolat unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms.^{110,48} Diese Umwandlung kann als dissoziative Adsorption aufgefasst werden, nach der ein gebundenes Thiolat Au-SR und ein gebundenes Wasserstoffatom Au-H vorliegt. Letzteres kann in der Gasphase durch reduktive Eliminierung zu molekularem Wasserstoff desorbieren, in Lösung und in Gegenwart von Sauerstoff ist auch eine Desorption durch Reaktion zu Wasser denkbar.⁴⁸ Die Desorption von Thiolaten als Disulfid findet hingegen bei Raumtemperatur nicht statt, wurde bei höheren Temperaturen aber beobachtet. Die höhere Adsorptionsenthalpie von längerkettigen Alkanthiolen und sterische Wechselwirkungen hemmen die Adsorption zusätzlicher langkettiger Moleküle, die für den Übergang von der lying-down-phase zur standing-up-phase (zur Erreichung der höheren Bedeckungsdichte) nötig sind.⁴⁸ Für die standing-up-phase, also die Ausbildung der vollständigen SAM, werden übereinstimmend mit diesem Mechanismus

Dauern von bis zu mehreren Tagen angegeben.¹⁰⁹ Ebenso folgt aus den sterischen Unterschieden, dass der Bedeckungsgrad, der in der ersten Phase schneller Adsorption erreicht wird, sich für langkettige und kurzkettige Moleküle unterscheidet.⁴⁹ Andererseits die höhere Adsorptionsenthalpie längerkettiger könnte durch Alkanthiole die Aktivierungsenergie (der Übergang vom physisorbierten zum chemisorbierten Zustand ist ein aktivierter Prozess) für die Dissoziationsreaktion der adsorbierten Thiole gesenkt werden,⁴⁸ während für kleine Thiole wie Methanthiol die Physisorption sehr schwach ausgeprägt und der Haftkoeffizient $s(\Theta)$ als Maß für die Adsorptionswahrscheinlichkeit entsprechend so gering sein kann, dass die Dissoziationsreaktion kinetisch unterdrückt ist.^{106,48} Alkyldisulfide, auch kurzkettige wie Dimethyldisulfid, weisen dagegen grundsätzlich sehr hohe Haftkoeffizienten, nahe 1, auf.48,111

Der Übergang vom physisorbierten Zustand (lying-down-phase) in den chemisorbierten Zustand (standing-up-phase) findet in der Gasphase erst ab Temperaturen über 200 K statt,¹⁰² was belegt, dass es sich um einen aktivierten Prozess handelt. Xu *et al.* konnten in einer AFM-basierten Studie zeigen, dass in einer begrenzten Mikroumgebung die direkte Adsorption von Thiolen in eine aufgerichtete Konfiguration, also eine standing-up-phase, energetisch begünstigt sein kann.¹¹² Die Kinetik der Selbstanordnung wird dadurch stark beschleunigt: die Bildung der SAM ist um einen Faktor von mindestens 10 schneller. Die begrenzte Mikroumgebung wurde mittels einer AFM-Spitze in einer bereits gebildeten SAM und die AFM-Spitze dar.

Die Kinetik der Selbstanordnung und die thermodynamische Stabilität der SAMs hängen also deutlich von der Ligandenstruktur und der Mikroumgebung ab. Eine weitere wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die chemischen Gleichgewichte, die mit der Adsorption und Desorption der Thiol-Liganden an die Goldoberfläche verbunden sind. In Abbildung 2.5 sind die entsprechenden Reaktionen für die Adsorption/Desorption von Thiolen und Disulfiden gezeigt.

$$2 \text{ R} - \text{SH} + 2 \text{ Au(s)} \xrightarrow{\text{"on"}} 2 \text{ RS} - \text{Au(s)} + \text{H}_2$$

$$RS - \text{SR} + 2 \text{ Au(s)} \xrightarrow{\text{"on"}} 2 \text{ RS} - \text{Au(s)}$$

Abb. 2.5: Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichte von Thiolen und Disulfiden an Goldoberflächen. Diese können auch als on/off Gleichgewichte aufgefasst werden.

Aus der Biochemie kann das Konzept des on/off-Gleichgewichts übernommen werden, wenn die Reversibilität der Prozesse berücksichtigt werden soll. Die Desorptionsraten von Thiolaten an Gold in wässriger Lösung sind allerdings sehr gering.

In einer aktuelleren Studie konnte in der Gruppe von Schlenoff gezeigt werden, dass die Adsorptionskinetiken von kurzkettigen Thiolen und Disulfiden an Gold gleich sind.⁴⁹ Die Adsorptionskinetiken von Thiolen an Gold können mit erweiterten Langmuir-Kinetiken beschrieben werden;48,49,109 einer nahezu linearen Phase schneller Adsorption folgt eine kontinuierliche Abnahme der Adsorptionsrate im Bereich hoher Bedeckungen. Diese Abnahme ist vermutlich auf die mit zunehmender Bedeckung schlechtere Zugänglichkeit der Adsorptionsplätze zurückzuführen bzw. der entsprechenden Abnahme der Haftkoeffizienten. Die Desorptionsraten von Thiolaten auf Gold sind in wässriger Lösung sehr niedrig,¹⁰⁹ so dass SAMs mit nahezu vollständiger Bedeckung auch in Abwesenheit ungebundener Liganden eine hohe Stabilität aufweisen können. Diese Stabilität ist jedoch kinetischer Natur, denn eine thermodynamische und damit unbegrenzte Stabilität der SAM würde eine Desorptionsrate von null verlangen.⁴⁸ Sowohl Adsorptions- als auch Desorptionsrate hängen naturgemäß von der Konzentration, aber auch von der Struktur der Liganden ab. Längerkettige Thiole bzw. Thiolate bewirken eine frühere Verlangsamung der Adsorptionsrate, vermutlich wegen der größeren sterischen Hinderung und der vielfältigen physikalischen Prozesse im Zuge der Reorganisation zur finalen SAM.⁴⁹ Sie bewirken aber auch eine niedrigere Desorptionsrate aufgrund der zusätzlichen Stabilisierung durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die die Desorptionsenthalpie erhöhen.

2.2.1.4 Defekte in SAMs

Die hochgeordneten Strukturen, durch die SAMs beschrieben werden, stellen immer eine Idealisierung der tatsächlichen Verhältnisse dar. Defekte in der SAM können sowohl durch das Substrat, als auch die SAM selbst verursacht sein. Jedes metallische Substrat enthält Verunreinigungen, strukturelle Unregelmäßigkeiten wie Kanten und Stufen, Gitterfehler, Bereiche mit abweichender Kristallstruktur und, im Falle polykristalliner Substrate, Korngrenzen.⁴⁸ Ebenso kann die SAM Verunreinigungen, Fehlstellen, Gitterfehler und ungeordnete Bereiche enthalten. Eine besondere Art der Unregelmäßigkeit ergibt sich aus der Oberflächenrekonstruktion des Goldes (bei Au(111) z.B. die sogenannte Fischgräten-Rekonstruktion), die durch Adsorption von Thiolen und Ausbildung der SAM so verändert wird, dass Ad-Atome und atomare Lücken entstehen, was durch STM-Studien nachgewiesen werden konnte.¹⁰³ Sowohl die Ad-Atome als auch die Lücken sind mobil und nukleieren und koaleszieren durch Anlagerung an Stufen im Falle der Ad-Atome oder durch Bildung größerer Lücken, die als vacancy islands oder etch pits bezeichnet werden. In Hinblick auf die Funktionalisierung von AuNP mit Thiolen können die Erkenntnisse zu den Defekten auf Au(111)-Substraten direkt übertragen werden, und es ist realistisch anzunehmen, dass aus Gründen der Geometrie und der Polykristallinität von AuNP, die nach der Turkevich-Methode synthetisiert wurden, diese einen höheren Anteil an Defekten der Oberfläche aufweisen, als ein sauberes und poliertes planares Substrat.

2.2.1.5 SAMs auf AuNP

Thiolat-funktionalisierte AuNP können durch direkte Synthese nach der Methode von Brust *et al.*¹¹³ synthetisiert oder durch Ligandenaustausch erhalten werden.^{2,114} Grundsätzlich ist zwischen AuNP mit Durchmessern < 5 nm, die als Monolayer Protected Cluster (MPC) bezeichnet werden, und größeren AuNP zu unterscheiden, die zum Beispiel nach der Turkevich-Methode erhalten werden. Nur bei MPC, die für diese Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen, sind Oberflächenkrümmung, das Vorliegen verschiedener Kristallflächen und der Anteil von Goldatomen, die auf Ecken, Spitzen und Kanten liegen von herausragender Bedeutung.^{48,53} Bereits ab Durchmessern von 4.4 nm dominieren Au(111)-Flächen die Oberfläche des Partikels und es kann mit zunehmender Größe Quasisphärizität angenommen werden.^{115,116} Auch der prozentuale Anteil von Oberflächenatomen nimmt schnell mit steigendem Durchmesser, bzw. Radius ab, was in Abbildung 2.6 verdeutlicht ist.



Abb. 2.6: Anteil der Oberflächenatome in Goldnanopartikeln. Anzahl der Goldatome im gesamten Volumen eines sphärischen AuNP (Agglomerationszahl (rote Linie, Annahme: $\rho = 19.32 \text{ g/cm}^3$) und Anzahl der Oberflächenatome unter Annahme einer reinen Au(111)-Oberfläche (grüne Linie) oder einer reinen Au(100)-Oberfläche (blaue Linie). Das Inset zeigt Letztere als prozentualen Anteil in Abhängigkeit vom Partikelradius. Die Abbildung wurde aus der Diplomarbeit des Verfassers übernommen.

Im Zusammenhang von MPC sind vor allem die Arbeiten in der Gruppe von Murray von Bedeutung, die neben einem elektrochemischen Schwerpunkt die Strukturen und Reaktivitäten von Ligandenhüllen der MPC adressiert haben.^{114,117,115,118,53} Aus diesen Arbeiten und Beiträgen weiterer Gruppen⁴⁸ kann geschlossen werden, dass die Ligandenhüllen von MPC grundsätzlich vergleichbar sind mit SAMs auf planaren Substraten. Dies gilt dann umso mehr für AuNP mit höheren Durchmessern. Auf den Au(111)-Flächen von Partikeln mit Durchmessern > 4.4 nm bilden sich SAMs von Alkanthiolaten aus, die in ihren spektroskopischen und physikalischen Eigenschaften denen auf planaren Substraten zunehmend ähneln, was mit FTIR, Dynamischer Differenzkalorimetrie (engl.: differential scanning calorimetry, DSC), Kontaktwinkelmessungen und thermischer Desorptionsspektroskopie nachgewiesen wurde.¹¹⁵ Die Areale von geordneten SAMs sind durch ungeordnete Strukturen an Kanten und Ecken unterbrochen und sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Selbstanordnung von MPC und AuNP.^{119,120} Der Partikelabstand in solchen Anordnungen kann über die Länge der Alkanthiolat-Liganden gesteuert werden.¹²⁰ Die Untersuchungen von SAMs auf MPC kann als Verbindung zweier Forschungsgebiete angesehen werden: der Kolloidchemie und der Forschung an SAM. Diese Verbindung hat sich als äußerst fruchtbar für beide Bereiche

und darüber hinaus, z.B. bei der Entwicklung von Nanoelektroden, Substraten für SERS-(Oberflächenverstärkte Ramanstreuung, engl. surface enhanced Raman scattering oder Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie) und der Einzelmolekül und -clustermikroskopie mit STM, erwiesen.¹¹⁷ Für die Charakterisierung von MPC sind viele Methoden der Oberflächenchemie und -physik (vgl. Abschnitt 2.2.1.2) nicht anwendbar und die Strukturen ihrer Ligandenhüllen sind weniger detailliert verstanden bzw. die Modelle nicht in vergleichbarem Maße experimentell untermauert wie für SAMs auf planaren Substraten.^{48,53} Sie können aber wie stabile chemische Substanzen gehandhabt werden und sind in ausreichenden Mengen synthetisch zugänglich^{113,53} und das eröffnet analytische Möglichkeiten, die ihrerseits für klassische SAMs nicht gegeben sind. Insbesondere sind dies NMR-Spektroskopie, Transmissions-IR-Spektroskopie und DSC, mit denen Phasenübergänge identifiziert und strukturelle Informationen wie der Anteil der gauche-Defekte in den Alkylketten erhalten werden können.^{121,117} Wie die SAMs sind MPC nicht auf Alkanthiolate als Liganden beschränkt, sondern können in Gegenwart verschiedenster Thiole synthetisiert werden. Ebenfalls in der Gruppe von Murray wurden die ersten Protokolle für den Ligandenaustausch entwickelt, die die Flexibilität und Variabilität der MPC zusätzlich erhöhen.114

Neben den spektroskopischen und physikalischen Charakterisierungsmethoden bietet auch die chemische Reaktivität der MPC die Möglichkeit, deren Ligandenhüllen zu studieren.^{118,122} Hierbei kann zwischen der Stabilität gegen oxidatives Ätzen mit Cyanid^{123–125,118,122} und der gegen kompetitiven Ligandenaustausch, z.B. durch Dithiothreitol,^{123,124} unterschieden werden. Auf diese analytischen Stabilitätstests wird im Abschnitt 2.2.4 ausführlich eingegangen.

MPC sind für die Grundlagenforschung an Clustern und als supramolekulares Material bis heute von großem Interesse und haben auch die theoretische Chemie in diesem Bereich befruchtet.^{51,126,52,53} Daraus resultiert ein zunehmendes Verständnis der Vielfalt der Bindungsmotive von Thiolaten auf MPC,^{51,52} der Energien, Geometrien und Kristallstrukturen der Cluster und des Einflusses der Ligandenhülle auf diese Parameter.^{127,53} Im Bereich der Anwendungen liegt das Potential der MPC insbesondere in der Elektrochemie, z.B. bei der Entwicklung von Nanoelektroden, aber auch in der Katalyse, Optoelektronik und Nanomedizin.^{2,52,53}

Der Übergang von Au-Clustern, bzw. MPC, zu AuNP ab einem Durchmesser von etwa 5 nm hat eine physikalische Basis, sollte aber nicht als scharfe Abgrenzung aufgefasst werden. So ziehen aktuelle Studien die Grenze zwischen Au-Cluster und AuNP bei ~2 nm, weil sich ab Durchmessern von 2 nm die typischen optischen Eigenschaften von AuNP herauszubilden beginnen, die mit der Mie-Theorie beschrieben werden können.^{128,129} Diese Grenze kann also als eine zwischen Au-Supramolekül oder Quantenobjekt und metallischem Au verstanden werden, während die Grenze bei ~ 5 nm sich auf die Oberflächeneigenschaften bezieht. Die Geometrie geht in diesem Bereich ($d \sim 2.5$ nm) von einem platonischen Körper in einen quasisphärischen Kristall über, die Struktur der Ligandenhülle entspricht zunehmend den SAMs auf planaren Substraten und es liegt eine kontinuierliche Bandstruktur vor, was spektroskopisch über die zunehmende Ausprägung der Plasmonenresonanz verfolgt werden kann.^{43,117,48,52,53} Synthetisch sind die größeren AuNP über die Turkevich-Synthese, aber auch Seeded-Growth-Verfahren zugänglich, die von Clustern als Seeds ausgehen.^{33,34} AuNP nach Turkevich unterscheiden sich von MPC darin, dass sie ausschließlich in wässriger Lösung synthetisiert werden, was für medizinische und biotechnologische Anwendungen ein wichtiger Vorteil ist, in denen diese AuNP etabliert sind.^{2,6,130,131} Die Konzentrationen der AuNP liegen deutlich unter denen der MPC und die zunehmende Partikelgröße bewirkt eine stärkere Signalverbreiterung in NMR-Spektren, daher sind einige Methoden zur Charakterisierung von MPC, wie NMR- und FTIR-Spektroskopie aber auch Massenspektrometrie, für AuNP nicht oder weniger geeignet. Es sind dies klassische Methoden der chemischen Analytik im Einklang mit der Analogie der MPC zu typischen chemischen Substanzen, während zur Charakterisierung von AuNP Methoden der Kolloidchemie wie DLS besser geeignet sind. Ein sehr wichtiger Vorteil der AuNP sind ihre ausgeprägteren plasmonischen Eigenschaften, die vielfältig genutzt werden können und dass sie mit zunehmender Größe weiteren Techniken der Mikroskopie, z.B. den für viele medizinische und biotechnologische Anwendungen fundamentalen lichtmikroskopischen Methoden, zugänglich werden. Als entscheidende analytische Methode zur Charakterisierung von AuNP kommt folglich die UV/vis-Spektroskopie hinzu, mit der die plasmonischen Eigenschaften der AuNP ausgenutzt werden können. Manche Techniken sind aber auch für die Charakterisierung von MPC und AuNP gleichermaßen

geeignet und von Bedeutung, insbesondere sind dies die Elektronenmikroskopie aber auch TGA und DSC. Auch die Methoden der chemischen Reaktivität sind für AuNP gleichermaßen geeignet wie für MPC.

Es lässt sich festhalten, dass das detaillierte Verständnis von SAMs auf planaren Substraten und die Forschung auf diesem Gebiet eine ungemein wertvolle Basis für das Studium von Ligandenhüllen auf AuNP darstellt. Die Analogie von SAMs auf planaren Substraten und Ligandenhüllen kolloidaler Goldpartikel und das Potential dieser Analogie wurden Mitte der 1990er Jahre im Rahmen der Forschungen zu MPC bald erkannt, nachdem die Synthese der MPC 1994 von Brust *et al.* vorgestellt wurde. Die Forschung an und mit AuNP hat oft einen anderen Schwerpunkt als das Verständnis der Struktur der Ligandenhülle, nämlich den der gezielten Funktionalisierung für biotechnologische und medizinische Anwendungen, sie profitiert aber nichtsdestotrotz vom Verständnis der Oberflächenchemie und den Zusammenhängen von Struktur der SAM und ihren physikalischen Eigenschaften. Die Reduktion der unspezifischen Adsorption von Proteinen durch PEGylierung wurde beispielsweise bereits an SAMs intensiv studiert und die Erkenntnisse ließen sich gewinnbringend auf Ligandenhüllen von AuNP übertragen, um deren pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern.¹³²⁻¹³⁶ An der Schnittstelle von Medizin und Nanotechnologie gibt es jedoch noch viel Potential, Erkenntnisse der Forschungen zu SAMs und MPC zu berücksichtigen, um die physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von AuNP weiter zu verbessern. Es ist festzustellen, dass viele Studien in diesem Bereich wenig Gewicht auf die Struktur-Eigenschafts-Beziehungen der Ligandenhüllen von AuNP legen, was in Teilen der Interdisziplinarität der Forschung und in Teilen der Fokussierung auf Funktionalisierung der AuNP bzw. ihrer Ligandenhülle und Anwendung der funktionalisierten AuNP geschuldet sein mag. Insofern ist es weiterhin wichtig, grundlegende Aspekte der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen von Ligandenhüllen zu studieren und experimentell zu untermauern, um die daraus resultierenden Erkenntnisse und darauf basierte Protokolle zu etablieren.

2.2.2 Funktionalisierungsstrategien

2.2.2.1 Funktionalisierung von AuNP als Konzept in der Nanomedizin und Biotechnologie

Die Möglichkeit der einfachen Funktionalisierung ist ein entscheidender Vorteil von AuNP, die funktionalisierten Partikel werden als Konjugate bezeichnet. AuNP dienen in vielen Anwendungen als Plattform, auf der unterschiedliche Moleküle und damit unterschiedliche Funktionen kombiniert werden können.^{137,2,6,138,93} Funktionen können das gezielte Ansteuern bestimmter Zellen oder Gewebearten sein (engl.: targeting), das Markieren des Partikels, um dessen Detektion zu erleichtern (engl.: labeling), eine therapeutische Wirkung, die Erkennung bestimmter Substanzen (engl.: sensing), die Stabilisierung des Konjugats und der Schutz koadsorbierter Moleküle sowie die Verbesserung oder Einstellung der pharmakokinetischen und physikalischen Eigenschaften. Wenn mehrere dieser Funktionen kombiniert werden, spricht man auch von Multifunktionalisierung. Abb. 2.7 zeigt eine schematische Darstellung des Konzepts.



Abb. 2.7: Konzept der Multifunktionalisierung von AuNP. Verschiedene Ligandentypen, die verschiedene, auch mehrere, Funktionen erfüllen, können auf dem AuNP als Plattform kombiniert werden, um komplexere Anwendungen zu ermöglichen. Auch die physikalischen Eigenschaften des AuNP selbst können dabei genutzt werden.

Typische Beispiele für Multifunktionalisierung sind die gezielte Beförderung von Wirkstoffen an Zellen, z.B. Krebszellen, oder Gewebe, also die Kombination von Targeting und therapeutischer Wirkung, die als Drug-Delivery bezeichnet wird,¹³⁹⁻¹⁴² und die Kombination aus Markierung bzw. Labeling und Targeting um z.B. Tumoren in einem sehr frühen Stadium zu diagnostizieren.^{143,63,78,90,130,144} Zusätzlich zu den Funktionen der Moleküle auf der Oberfläche können auch die physikalischen Eigenschaften des AuNP selbst für verschiedene Zwecke genutzt werden. Die hohe Atommasse von Au prädestiniert AuNP z.B. als Label für den Nachweis mit Röntgenmethoden, auch in vivo, z.B. durch Computertomographie (CT),⁹⁴ die plasmonischen Eigenschaften können wirkungsvoll für hyperthermale Behandlungsstrategien genutzt werden.^{63,6} Die Eigenschaft von AuNP, die Raman-Streuung adsorbierter Moleküle zu verstärken und die Fluoreszenz zu löschen, ermöglicht auch komplexe Labelingstrategien. Zum Beispiel konnte die Gruppe von El-Sayed vor Kurzem demonstrieren, wie intrazelluläres Drug-Delivery durch Ausnutzung dieser Eigenschaften in Echtzeit und an einzelnen Zellen verfolgt werden kann.¹⁴⁵ Die Vielseitigkeit von AuNP-Konjugaten weckte in den letzten ~15 Jahren ein enormes Forschungsinteresse an diesen Systemen. Die Zahl der Publikationen zum Thema Gold Nanomedizin steigt seit 2000 exponentiell an und lag 2010 bereits bei etwa 900 Publikationen pro Jahr,⁶ die Gesamtzahl der Publikation zum Thema Gold Nanopartikel und deren Anwendung in Medizin und Biologie wird in einem Übersichtsartikel von Alkilany, Lohse und Murphy auf etwa 15.000 geschätzt.³⁷ Dementsprechend wertvoll sind die Übersichtsartikel zu diesem Gebiet, z.B. von Astruc und Mitarbeitern,⁶³ Dykman und Khlebtsov,^{90,146} und aus den Gruppen von Rotello,^{147–149,140,150,151} El-Sayed,^{6,152} Murphy,^{37,153} Parak¹³¹, Mirkin¹⁵⁴ und Weiteren.^{143,155,156,141,157–159} Nicht alle Studien zum Thema AuNP in medizinischen Anwendungen basieren auf multifunktionalisierten AuNP, denn zum Beispiel ist auch eine passive Aufnahme, d.h. ohne Targeting, von AuNP in Tumorgewebe durch den sogenannten EPR-Effekt (engl.: enhanced permeability and retention) möglich.⁶ Dieser beschreibt die erhöhte Durchlässigkeit der vaskulären Struktur von Tumorgewebe, die eine Anreicherung von Nanopartikeln im Tumorgewebe bewirken kann. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass immer zumindest eine einfache Funktionalisierung der AuNP für medizinische Anwendungen nötig ist, um sie zu stabilisieren, ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern, oder ihre Toxizität zu verringern, denn die meisten AuNP sind unmittelbar nicht für die Anwendungen in physiologischer Umgebung oder an lebenden Zellen geeignet. Citratstabilisierte sphärische AuNP sind beispielsweise nicht stabil in biologischen Medien, stäbchenförmige AuNP, die sogenannten Au-Nanorods (AuNR), haben typischerweise eine Ligandenhülle aus Cetyl-trimethylammoniumbromid (CTAB), das für Zellen giftig ist. Eine entscheidende und grundlegende Funktion der Ligandenhülle ist also die Stabilisierung der Konjugate, darauf aufbauend können weitere Funktionen eingeführt werden. Eine wichtige Bedingung ist dabei, dass die Konjugate keine unspezifische Toxizität aufweisen dürfen.

2.2.2.2 Strategien zur Funktionalisierung von AuNP

Die Ligandenhülle von AuNP beinhaltet grundsätzlich Moleküle, die über eine oder mehrere funktionelle Gruppen, die Ankergruppen, mehr oder weniger stark an die Oberfläche gebunden sind.² Neben den ein- und mehrzähnigen Thiolaten können das z.B. Amine, Dithiocarbamate, Carboxylate, Phosphine, Selenide und Isothiocyanate sein.^{2,6} Für die weitere Modifizierung oder Funktionalisierung der AuNP-Oberfläche sind eine Vielzahl von Strategien möglich, von denen einige in Abbildung 2.8 dargestellt sind. Möglich sind ein teilweiser oder vollständiger kompetitiver Austausch von Liganden, oder die zusätzliche Anbindung von Molekülen durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen, durch kovalente Bindungen mittels Methoden der Kopplungschemie, durch dative Bindungen, durch Hybridisierung von Oligonukleotiden oder durch Anbindung über photo- oder pH-labile Linker, die einen Spezialfall der kovalenten Bindung darstellt.^{6,93}



Abb. 2.8: Strategien zur Funktionalisierung von AuNP. Moleküle können z.B. über kompetitiven Austausch (A), kovalente oder dative Bindungen an vorhandene Liganden (B), hydrophobe (C) oder elektrostatische Wechselwirkungen (D) an den AuNP gebunden werden.

Die wichtigste und meiststudierte Ankergruppe ist die Thiolatgruppe,^{2,93} mit der Moleküle einfach und in vielen Lösungsmitteln an AuNP gebunden werden können. Insbesondere ist dies auch in wässrigen Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen, also in biologischen Medien, möglich,93 und teilweise auch vorteilhaft, wie z.B. in der Gruppe von Mirkin mit Oligonukleotid-funktionalisierten AuNP demonstriert wurde.¹⁵⁴ Es kann also jedes (Bio-) Molekül, das mit einer Thiolgruppe versehen werden kann, oder eine solche aufweist, mit sehr geringem Aufwand an AuNP gebunden werden. In vielen Studien wird eine zusätzliche Sequenz zwischen die Ankergruppe und das (Bio-) Molekül eingebaut, der sogenannte Spacer. Spacer können verschiedene Funktionen erfüllen: Erhöhung der Wasserlöslichkeit und/oder der Stabilität, Einstellung des distalen Abstandes zur Partikeloberfläche, des lateralen Abstandes der Liganden und Beeinflussung der Präsentation des gebundenen Moleküls, was vor allem bei der Funktionalisierung mit Proteinen eine Rolle spielt.⁹³ Wichtige Spacerstrukturen sind Poly- und Oligoethylenglykole und Alkylketten, es können aber auch Aminosäure- oder Nukleotidsequenzen in Peptiden bzw. Oligonukleotiden als Spacer genutzt werden. Die gewünschten Moleküle können vor der Bindung an AuNP mit Spacern versehen werden, eine wichtige Strategie ist aber auch die Funktionalisierung der AuNP mit bifunktionellen Molekülen, die neben der Ankergruppe eine terminale funktionelle Gruppe

enthalten. An diese Ligandenhüllen können dann mit Methoden der Kopplungschemie die Zielmoleküle gebunden werden, und die Strategie kann insofern als Funktionalisierung der AuNP mit dem Spacer und darauffolgender Anbindung des Zielmoleküls aufgefasst werden. Auch bei dieser Strategie werden überwiegend Poly- und Oligoethylenglykole und Alkylketten als Spacer genutzt, typische terminale Funktionen sind Amine und Carboxylgruppen oder aktivierte Carboxylgruppen wie NHS- und Sulfo-NHS-Ester (NHS: N-Hydroxysuccinimid bzw. 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidindion; Sulfo-NHS: N-Hydroxysulfosuccinimid bzw. 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidindion-3-sulfonat), die für Standardkopplungschemie wie die EDC-Kupplung (EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) genutzt werden können.160,93 Von Bedeutung sind aber auch die Cu(I)-vermittelte [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Huisgencycloaddition) als Verfahren der Click-Chemie, mit der Alkine und Azide verknüpft werden können,^{93,161} und als nicht-kovalentes Verfahren die Funktionalisierung der AuNP mit terminalen Nitrilotriessigsäure-Einheiten (z.B. durch Reaktion mit BisNTA-disulfid: 3,3'-Dithiobis[N-(5-N', N'-(dicarboxymethyl)amino-5-carboxypentyl)propionamide]), die über Chelatisierung von Nickel(II)-Ionen dann Proteine mit Histidin-Tags (eine terminale Sequenz von meist sechs Histidinen) koordinativ bzw. dativ binden können.^{162,163} In einigen Studien wurden auch terminale Maleimidgruppen verwendet, an die Thiole gebunden werden können.¹⁶⁴ Vorteile dieser Strategie gegenüber einer direkten Anbindung der Thiole an die AuNP können die höhere Stabilität und bessere Kontrolle der Anzahl und Präsentation gebundener Liganden sein. Aus demselben Grund werden in sehr vielen Studien gemischte Ligandenhüllen verwendet, die neben funktionalisierbaren Liganden nicht reaktive Liganden bzw. Spacer enthalten, die ausschließlich oben genannte Funktionen wie die Stabilisierung der Konjugate erfüllen.^{160,6,92,93} Ebenso können gemischte Ligandenhüllen aber auch ein oder mehrere direkt gebundene Biomoleküle, Wirkstoffe oder Label und zusätzlich unreaktive Liganden enthalten, die ausschließlich der Stabilisierung oder Absättigung der Oberfläche dienen.^{165–167} Auch in diesem Zusammenhang können Oligo- und Polyethylenglykol-basierte Liganden als die wohl wichtigste Gruppe solcher Liganden angesehen werden.^{160,133,150,168,93} Eine wichtige Voraussetzung für die Synthese komplexer gemischter Ligandenhüllen ist die Kontrolle ihrer Zusammensetzungen, und diese Kontrolle wird durch die zuverlässige und unkomplizierte Gold-Thiolat-Chemie ermöglicht. Die ausgewählten Beispiele mögen verdeutlichen, wie wenig Grenzen der Kreativität bei der Gestaltung von AuNP-Konjugaten gesetzt sind und diese Variabilität ist ein wichtiger Grund für das hohe Potential von AuNP in einer Vielzahl von Anwendungen nicht nur im medizinischen Bereich. Strategische Aspekte beim Design von AuNP-Konjugaten sind die Stabilität des Konjugats, dessen pharmakokinetischen Eigenschaften, und die Präsentation des funktionstragenden Moleküls. Ob Label, Wirkstoff oder Erkennungsmoleküle (z.B. Antikörper), es hängt von der spezifischen Anwendung ab, ob z.B. eine hohe Bedeckungsdichte oder eine niedrige, eine Präsentation außerhalb der Ligandenhülle oder darin eingebettet, eine stabile oder eine labile Anbindung für die gewünschte Anwendung zielführend und erfolgsversprechend ist. So kann eine Präsentation eines Antikörpers außerhalb der Ligandenhülle in Zelltests vorteilhaft sein, während *in vivo* die pharmakokinetischen Eigenschaften verschlechtert werden, weil das Konjugat schneller der Immunantwort, unspezifischer Bindung oder enzymatischer Zersetzung unterliegt. Die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften ist ein wichtiger, wenn auch nicht der einzige, Grund für die Bedeutung von PEG-basierten Molekülen als Spacer und stabilisierendes Koadsorbat bei der Konstruktion von AuNP-Konjugaten und von Nanomaterialien im Allgemeinen.^{169,133,170} Diese Bedeutung wird im folgenden Abschnitt erläutert.

2.2.3 PEGylierung von AuNP

2.2.3.1 PEG als Ligand für Nanomaterialien

PEG bietet eine Reihe günstiger Eigenschaften für die Verwendung als Ligand an NP-Konjugaten für medizinische und biologische Anwendungen. Es ist nicht giftig, inert, in sehr vielen Variationen, sowohl die Polymerlänge als auch die terminale Funktionalisierung betreffend, verfügbar, und es ist im Kontext medizinischer und biologischer Forschung (einschließlich verwandter Bereiche wie der Biochemie, Biotechnologie etc.) sehr gut untersucht, weil es z.B. auch für die Verbesserung der Wasserlöslichkeit von Proteinen und Peptiden etabliert ist.^{171–173} Die sogenannte PEGylierung ist also kein neues Konzept, das für inorganische Nanomaterialien entwickelt wurde, sondern wurde erfolgreich aus der biomedizinischen Forschung übernommen. Auch im Zusammenhang mit SAMs auf planaren Substraten spielt PEGylierung eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der Biorepulsivität und damit der sogenannten Antifouling-Eigenschaften von Oberflächen oder auch der Spezifizität von Biosensoren in Techniken wie SPR-Spektroskopie, die mit Goldsubstraten arbeiten.^{48,174,136} Viele Studien haben gezeigt, dass die PEGylierung von Nanopartikeln die Aufnahme durch das reticuloendotheliale System (RES) verringert und die Zirkulationszeiten (im Blutkreislauf) deutlich erhöht.^{175,6,169,133,176–178} Dafür gibt es mehrere Gründe; zum einen erhöht die Hydrophilie der Ethylenglykoleinheiten die Wasserlöslichkeit der Konjugate und verringert dadurch deren Tendenz zur Aggregation und verbessert ihre Mobilität im Blut, ebenfalls wird durch die Polymere eine sterische Stabilisierung der AuNP bewirkt, die dadurch in Lösungen mit hohem Salzgehalt (die osmotische Konzentration des Blutes beträgt 308 mM) besser oder überhaupt erst stabilisiert werden (Auf die Stabilität von AuNP-Konjugaten wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen). Zusätzlich wird durch die PEG-Hülle die unspezifische Adsorption von Gewebe- und Serumproteinen und -peptiden stark verringert und folglich wird auch die Opsonierung, die als Markierung von Fremdkörpern durch spezielle Proteine, die Opsonine, im Rahmen der Immunantwort aufgefasst werden kann, unterdrückt.^{169,133} Aus diesem Grund werden PEG-Hüllen oft als "Tarnkappen" (engl.: stealth) beschrieben, die den Partikel vor der Immunantwort "verstecken", wodurch dessen Zirkulationszeit erhöht wird. Der molekulare Mechanismus, der dieser Biorepulsivität von PEG zugrundeliegt, ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Ein mechanisches Modell geht davon aus, dass durch das Auftreffen des Proteins auf die PEG-Hülle diese komprimiert wird (Proteine haben die Dimension von Nanomaterialien und einen entsprechenden Impuls beim Auftreffen) woraufhin das Protein ein rückstellende Kraft erfährt und vom Konjugat abgestoßen wird.¹³³ Diesem Mechanismus liegt also die elastische Eigenschaft der PEG-Hülle zugrunde, es spielt weiterhin jedoch sicherlich auch eine Rolle, dass die hydratisierte PEG-Hülle wenig Angriffspunkte für hydrophobe und andere nichtkovalente Wechselwirkungen bietet, die für die unspezifische Adsorption von Proteinen nötig sind, und dass sie für diese nicht penetrierbar ist.

Aufgrund der strukturellen Variabilität der PEG-Liganden können eine Vielzahl von Parametern beim Design von PEGylierten AuNP (AuNP@PEG) variiert werden und es liegen eine Vielzahl von Studien zu solchen Konjugaten vor. Wichtige Parameter sind die Funktionalisierung,^{137,92,179} die Kettenlänge,^{176,165,180,181,178} und die Bedeckungsdichte auf der AuNP-Oberfläche.^{182,180,174} Bei der Funktionalisierung kann zwischen der Ankergruppe, fast immer handelt es sich um ein- oder mehrzähnige Thiole,⁹³ und der terminalen Gruppe unterschieden werden. Letztere dient der Funktionalisierung und entsprechend häufig werden Amine, Carbonsäuren und aktivierte Carbonsäuren, Azide und Alkine verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.2.2), unreaktive PEG-Liganden sind meist durch eine Methoxygruppe terminiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt der terminalen Funktion ist ihr Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Grenzfläche Konjugat/Medium, z.B. kann durch diese Gruppen die Oberflächenladung gesteuert werden, die sich im ζ -Potential widerspiegelt.^{183,184} Die Oberflächenladung und die terminalen funktionellen Gruppen oder Moleküle beeinflussen maßgeblich die unspezifische Adsorption, nicht nur von Proteinen und Peptiden im Serum oder biologischen Medien, sondern auch die der Konjugate selber an Gefäßwände, und das Aggregationsverhalten der Konjugate.¹⁸⁵ Bei der Aggregation oder Agglomeration, die durch funktionelle Gruppen vermittelt wird, können auch verbrückende Moleküle in der Lösung eine Rolle als nicht-kovalenter "Kreuzvernetzer" (engl.: crosslinker) spielen, z.B. konnte in der Gruppe von Puntes die Rolle des Citrats in diesem Zusammenhang gezeigt werden.¹⁸⁶

Bei den Studien zu AuNP@PEG-Konjugaten kann grob unterschieden werden zwischen solchen, die das Verhalten der Konjugate *in vitro* und *in vivo* untersuchen und denen, die sich mit der physikalisch-chemischen Charakterisierung und Stabilität der Konjugate beschäftigen. Ein weiteres Feld ist die Entwicklung neuartiger PEG-Liganden, die oft für die Stabilisierung verschiedener Nanomaterialien geeignet sind.^{187–190} In der aktuelleren Forschung werden z.B. zunehmend multidentate Polymerliganden für die Stabilisierung von Nanomaterialien vorgeschlagen, die aus einem sogenannten "Rückgrat" (engl.: "backbone") bestehen, das Ankereinheiten und terminale Polymereinheiten, oft PEG, und funktionalisierbare Einheiten trägt.^{191,192}

2.2.3.2 Struktur von PEG auf AuNP

Für PEG stellt Wasser ein sehr gutes Lösungsmittel dar und das Polymer liegt in wässriger Lösung stark hydratisiert als zufälliges Knäuel (engl.: random coil) vor, dessen Durchmesser deutlich größer ist als der von Proteinen gleicher Molmasse.¹⁶¹ In der PEG-Hülle von AuNP kann es physikalisch als terminal gebundenes (engl.: grafted) Polymer beschrieben werden.¹⁹³ Die entscheidende physikalische Größe ist dann die Bedeckungsdichte (engl.: grafting density), von der die Konformation der gebundenen Polymere abhängt. Im Falle geringer Bedeckungsdichten liegen die Polymere als gebundene statistische Knäuel vor, die nicht überlappen und nicht oder kaum interagieren. Diese entropisch günstige Konformation wird als mushroom-Konformation bezeichnet. Bei hohen Bedeckungsdichten überlappen die Ketten der gebundenen Polymere und da sich die Monomere in einem guten Lösungsmittel abstoßen, nehmen die Polymere eine gestreckte Konformation an, um die Wechselwirkungen der Monomere zu minimieren. Diese Konformation wird als brush-Konformation bezeichnet.¹⁹³ Die Konformationen sind in Abbildung 2.9 gezeigt. Die Dicke der Polymerhülle ist folglich in der brush-Konformation deutlich höher als in der mushroom-Konformation, sie kann mit Methoden der Polymerphysik abgeschätzt werden.^{194,193} Dazu wird das Polymer in einem Random Walk- bzw. Random Coil, Freely-Jointed-Chain oder Freely-Rotating-Chain Modell in statistische Segmente mit der sogenannten Kuhn-Länge l_K ($l_K = 0,71$ nm für PEG) zerlegt, aus der sich eine statistische Monomerenzahl N_{Mono} ergibt. Diese Größen entsprechen nicht den tatsächlichen Werten für die Monomere, sondern berücksichtigen deren Wechselwirkungen untereinander auf Grundlage der Flory-Theorie.¹⁹³ Nach Hill¹⁹⁴ beträgt die Dicke L einer PEG-Hülle in der mushroom-Konformation etwa $L \sim N_{Mono}^{a} \cdot l_{K}$, a ist hier der FloryExponent (0.6 für gute Lösungsmittel). In der brush-Konformation beträgt die Dicke $L \sim 0.42 \cdot N_{Mono} \cdot l_{K}$.



Abb. 2.9: Schematische Darstellung der mushroom- und der brush-Konformation. Die Änderung des hydrodynamischen Durchmessers Δd durch Adsorption von PEG kann zur Beschreibung der Dicke *L* der PEG-Hülle genutzt werden: $L \sim 0.5\Delta d$. Diese Dicke ist in der mushroom-Konformation niedriger als der Random Walk-Radius $\langle x^2 \rangle^{0.5}$ des Polymers: $0.5\Delta d < \langle x^2 \rangle^{0.5}$, weil der hydrodynamische Durchmesser die mittlere Zunahme, der Random Walk-Radius hingegen die maximale Zunahme des Durchmessers widerspiegelt. In der brush-Konformation gilt dagegen $0.5\Delta d > \langle x^2 \rangle^{0.5}$, weil die Polymere gestreckter vorliegen und nicht mehr als statistisches Knäuel bzw. mit einem Random Walk beschrieben werden können (Bearbeitet nach Ref.[196]).

In einigen Studien von Tsai *et al.* wurde versucht auf Grundlage von DLS-Messungen und Elektrospray-differentieller Mobilitätsanalyse (engl.: electrospray differential mobility analysis, ES-DMA), die Dicke von PEG-Hüllen zu bestimmen, um mit den Methoden der Polymerphysik auf die Konformation der PEG-Liganden und deren Bedeckungsdichte zurückschließen zu können.^{195,196} Die Methodik ist allerdings durch die Genauigkeit der DLS-und ES-DMA-Messungen beschränkt. Interessant könnte für diese Fragestellung daher die vor Kurzem von Krpetic *et al.* veröffentlichte Methodik auf Basis der differentiellen Zentrifugalsedimentation (engl.: differential centrifugal sedimentation, DCS) sein.¹⁹⁷ Die Autoren konnten mit dieser Methode Unterschiede in der Dicke der OEG-Hülle von 0.1 nm nachweisen. In der Studie wurden allerdings Liganden mit maximal sechs Ethylenglykol-Einheiten verwendet und es ist unklar, ob die Methodik auf PEG-Polymere übertragen werden kann.

PEGylierung spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Funktionalisierung von Nanomaterialien für medizinische und biologische Anwendungen, aber auch in anderen Forschungsgebieten und aus diesem Grund ist PEG eines der am meiststudierten Polymere in einer Vielzahl von Fachgebieten, beginnend bei der theoretischen Chemie und Polymerphysik bis hin zur medizinischen Forschung. Ähnlich wie bei der Synergie der Forschung an SAMs und Kolloiden stellen die Erkenntnisse aus diesen verschiedenen Forschungsrichtungen eine wertvolle Grundlage für das Studium von PEG-Hüllen auf Nanomaterialien dar, um die offenen Fragen zu klären und Parameter zu studieren, die mit der Charakterisierung und Anwendung von PEGylierten AuNP bzw. NP verbunden sind. Zu diesen Fragen gehören die Wechselwirkungen von PEG mit anderen Liganden, das Verhalten von PEGylierten AuNP *in vivo*, z.B. die aktuelle Diskussion um die Immunogenizität von PEG,¹⁹⁸ die Frage der geeigneten Konformation (mushroom- oder brush-) für eine hohe Repulsivität gegenüber Proteinen *in vivo*, nach wie vor aber auch die Stabilität der PEGylierten Partikel. Im folgenden Abschnitt wird die Stabilität von AuNP-Konjugaten behandelt, insbesondere um den Begriff der Stabilität zu differenzieren.

2.2.4 Stabilität von AuNP-Konjugaten

In Abschnitt 1.2.4.1 wurde erläutert, wie die physikalisch-chemische Stabilität von AuNP im Rahmen der DLVO Theorie durch das Wechselspiel von attraktiven und repulsiven Kräften verstanden werden kann. Im Zusammenhang der Stabilisierung von AuNP durch Ligandenhüllen ist darauf aufbauend wichtig, die Mechanismen zu betrachten, durch die eine Destabilisierung der Konjugate bewirkt werden kann. Außerdem muss der Begriff Destabilisierung für den konkreten Fall definiert werden.

2.2.4.1 Aggregation, Agglomeration und Sedimentation

Unter Destabilisierung von AuNP kann deren reversible oder irreversible Aggregation aufgefasst werden oder deren teilweise oder vollständige Auflösung. Aggregation kann bei AuNP zu Koaleszenz bzw. Sintern führen, was ebenfalls eine Beeinträchtigung der Probenqualität darstellt. Die thermodynamische Triebkraft für Aggregation und Koaleszenz ist die Verringerung der Oberfläche und die entstehenden chemischen Bindungen. Um irreversible und reversible Aggregation zu unterscheiden, wird in dieser Arbeit, den IUPAC-Empfehlungen folgend, reversible Aggregation als Agglomeration und irreversible Aggregation als Aggregation bezeichnet. Aggregation und Agglomeration sind fast immer mit Sedimentation verbunden. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Sedimentation von AuNP gut modellieren und daher zur Größenbestimmung größerer AuNP nutzen lässt.¹⁹⁹ Auch analytische Ultrazentrifugation²⁰⁰ und DCS¹⁹⁷ basieren auf Sedimentation. Sphärische, citratstabilisierte AuNP sedimentieren ohne Zentrifugation ab Durchmessern von etwa 50 nm, die Sedimentationsdauern liegen im Bereich von Tagen. Es kann somit abgeschätzt werden, dass bereits vergleichsweise kleine Aggregate von AuNP mit Durchmessern von 5-50 nm sedimentieren. Sedimentation kann daher ebenso wie Zentrifugation mit niedrigen Drehzahlen für eine zumindest teilweise Reinigung von AuNP-Proben genutzt werden, indem große koaleszierte Partikel oder Aggregate als Sedimente vorsichtig abgetrennt werden.

Aufgrund der plasmonischen Eigenschaften von AuNP können alle Formen ihrer Destabilisierung einfach und hochempfindlich spektroskopisch verfolgt werden und im Bereich des Biosensing mit AuNP stellen kolorimetrische Assays neben Fluoreszenz-, SPR- und RIbasierten Assays einen enorm bedeutenden Teilbereich dar.²⁰¹ Diese Assays nutzen die Aggregation von AuNP, und die empfindliche Detektion von Krebszellen,²⁰² Enzymaktivität,²⁰³ DNA-Sequenzen²⁰⁴ kleinen organischen Molekülen²⁰⁵ und Schwermetallionen²⁰⁶ sind nur einige Beispiele für die vielfältigen Anwendungen solcher Aggregations-basierten Assays. Auch Schwangerschaftstest, als Beispiel für sogenannte Lateral Flow Immunoassays, und andere Schnelltests, z.B. auf bestimmte Bakterien, sind mit AuNP realisierbar und auf dem Markt.²⁰⁷

2.2.4.2 Ursachen für Agglomeration und Aggregation

Da AuNP, wie alle NP, aus thermodynamischen Gründen eine Tendenz haben zu aggregieren und koaleszieren, müssen sie durch Liganden stabilisiert werden, die diese Aggregation verhindern. Diese Stabilisierung kann elektrostatisch sein, wie bei Citratliganden, oder auf sterischer Hinderung beruhen, wie bei Polymerliganden. Es sind daher mehrere Ursachen für eine Agglomeration oder Aggregation von AuNP denkbar.

Eine Ursache ist die Entfernung gebundener Liganden, z.B. thermisch, durch Änderung des Lösungsmittels, durch Verdünnung oder pH-Wert-Änderung und damit verbundener Verschiebung des on/off Gleichgewichts (vgl. Abb. 2.5) oder durch kompetitiven Austausch mit Spezies, die die AuNP nicht stabilisieren. Eine weitere Ursache ist die Beeinflussung des Stabilisierungsmechanismus, z.B. kann elektrostatische Stabilisierung durch Salzzugabe unwirksam werden, weil Ladungen mit steigender Ionenstärke zunehmend abgeschirmt werden.⁴³ Sterische Stabilisierung kann durch Austausch des Lösungsmittels unwirksam werden, weil in einem schlechten Lösungsmittel (für den Liganden) die Ligand-Ligand Wechselwirkungen auch interpartikulär attraktiv werden verbunden mit dem Kollabieren der Ligandenhülle aus demselben Grund (Minimierung der Ligand-Solvens-Wechselwirkungen).^{43,193} Schließlich können eine Ursache für Agglomeration und Aggregation auch Wechselwirkungen der Liganden bzw. Ligandenhüllen sein, teilweise vermittelt durch verbrückende Moleküle. Diese Wechselwirkungen alle möglichen können physikalischen und chemischen Wechselwirkungen von Molekülen umfassen: Dispersionswechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen und alle Formen von kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen. Solche
Wechselwirkungen sind die Grundlage für die meisten kolorimetrischen Assays, aber z.B. auch für das bedeutende Forschungsgebiet der kontrollierten Anordnung von NP.^{208–211}

Für AuNP-Konjugate in biologischen und medizinischen Anwendungen sind insbesondere die Stabilität in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und die gegen kompetitiven Ligandenaustausch von Bedeutung, denn biologische Puffer und Blut weisen hohe Konzentrationen von Salzen auf und Blut enthält eine Vielzahl von Molekülen mit funktionellen Gruppen die an AuNP binden können, einschließlich Thiol-Gruppen wie z.B. in Cystein und Glutathion.

Die Stabilität in Lösungen mit hoher Ionenstärke kann einfach und direkt durch Salzzugabe getestet werden, die Stabilität gegen kompetitiven Ligandenaustausch kann mit kleinen Thiolen getestet werden. Zu letzterem Zweck eignet sich besonders DL-Dithiothreitol (DTT), weil es als kleines Molekül die Ligandenhülle gut durchdringen kann und als Dithiol stark an die AuNP-Oberfläche bindet. DTT stabilisiert AuNP nicht, daher aggregieren diese, nachdem ein kritischer Teil der Ligandenhülle durch DTT ersetzt wurde. Die Verfolgung DTT induzierter Aggregation von AuNP mittels zeitaufgelöster UV/vis-Spektroskopie wurde bereits in mehreren Studien genutzt, um Ligandenhüllen zu charakterisieren, und z.B. die bessere Stabilisierung gegen Ligandenaustausch durch Verwendung zwei- oder mehrzähniger Thiol-Liganden zu demonstrieren,^{212–214,124,179,215,188} oder den Einfluss verzweigter Liganden¹²³ oder von Koadsorption²¹⁶ auf die Stabilität gegen Ligandenaustausch zu studieren. Die Kinetik der Destabilisierung durch DTT ist abgesehen von DTT- und AuNP-Konzentration und -Durchmesser durch zwei Aspekte beeinflusst: die Durchdringung der Ligandenhülle und die kompetitive Verdrängungsreaktion an der Partikeloberfläche. Es ist daher naheliegend, dass mehrzähnige Thiole in dieser Hinsicht besser stabilisieren als einzähnige, weil sie durch den Chelat-Effekt stärker an die AuNP-Oberfläche gebunden sind. Die genannten Studien und auch Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass diese chemische Stabilität für die Austauschkinetik wichtiger ist als die Durchdringung der Ligandenhülle, denn obwohl einzähnige Thiolliganden wegen ihres geringeren Platzanspruchs dichter gepackte Ligandenhüllen bilden dürften als zweizähnige, werden sie schneller durch DTT ausgetauscht.²¹⁷

2.2.4.3 Oxidatives Ätzen von AuNP

Die Reaktion von Cyaniden (hier Kaliumcyanid) mit Gold:

$$4 \text{Au} + 8 \text{KCN} + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2] + 4 \text{KOH}$$

ist aus dem industriellen Bergbau bekannt, wo sie für die sogenannte Cyanidlaugerei genutzt wird, sie kann aber auch für die "weiche" Lithographie mit μ CP verwendet werden, um Mikro- und Nanostrukturen von Gold zu erzeugen.²¹⁸ Die Reaktion von Cyanid mit AuNP kann für den hochsensitiven und selektiven Nachweis von Cyanid genutzt werden, z.B. indem die Verstärkung des Raman-Signals durch AuNP ausgenutzt wird.²¹⁹ Das oxidative Ätzen von AuNP bewirkt eine teilweise oder vollständige Auflösung der Partikel und die Kinetik der Ätzreaktion hängt stark von der Ligandenhülle ab. Daher kann das oxidative Ätzen von AuNP analytisch genutzt werden, um die Ligandenhülle zu studieren. So wurde der Einfluss von dendritischen Strukturen,^{220,221} Lipid-Doppelschichten,²²² Kreuzvernetzung,^{223,224} sterischem Anspruch und Länge von Alkanthiolaten,^{123,118} und der Kettenlänge von ω -Mercaptocarbonsäuren¹²² auf die Stabilität von AuNP gegen Ätzen studiert. Zudem wird die Ätzreaktion in manchen Studien genutzt, um eine gute Stabilisierung durch neue Ligandentypen oder von Konjugaten zu demonstrieren.^{225,191}

Wie die Aggregation kann auch das Ätzen von AuNP hervorragend mittels zeitaufgelöster UV/vis-Spektroskopie verfolgt werden, da die Extinktion der AuNP entsprechend dem Lambert Beerschem Gesetz von deren Konzentration abhängt und diese Abhängigkeit wegen der extrem hohen Extinktionskoeffizienten von AuNP stark ausgeprägt ist. Die Extinktionskoeffizienten sind ihrerseits vom Durchmesser der AuNP abhängig.⁸⁸ Zusätzlich kann in manchen Experimenten die Abhängigkeit der Lage der SPR-Bande vom Partikeldurchmesser zur Interpretation genutzt werden.

Im Gegensatz zur DTT-induzierten Aggregation hängt die Kinetik der Ätzreaktion nicht von der Stärke der chemischen Bindungen der Liganden an die AuNP-Oberfläche ab, sondern nur von der Durchdringbarkeit der Ligandenhülle für die Cyanidionen. Insofern weist das oxidative Ätzen gute Voraussetzungen für ein Studium der Ligandenhüllen von AuNP-Konjugaten auf. Die Zahl der Studien, die diese Methode verwenden ist allerdings gering. Die Ätzreaktion von Cyanid mit AuNP-Konjugaten und die dafür relevanten Parameter sind kaum untersucht, was ihren analytischen Wert und die studienübergreifende Vergleichbarkeit der Ergebnisse begrenzt. Studien, in denen die Ätzreaktion präparativ genutzt wird, beschränken sich vor allem auf Synthesen, bei denen Gold als Templat dient, z.B. solchen von hohlen Polymer- oder Silicakapseln.^{226–231}

Die Stabilität von AuNP-Konjugaten muss also differenziert betrachtet werden. Zum einen muss die Art der Destabilisierung unterschieden werden, Agglomeration, Aggregation oder Auflösung, zum anderen die Ursache der Destabilisierung. Da die Stabilität von AuNP-Konjugaten maßgeblich von der Ligandenhülle abhängt, können Stabilitätstests genutzt werden, um die Ligandenhüllen von AuNP-Konjugaten zu studieren. Methodisch sind dafür die Elektrolyt-induzierte Aggregation, die DTT-induzierte Aggregation und das oxidative Ätzen mit Cyanid geeignet. Im folgenden Abschnitt sollen abschließend einige Überlegungen zum Zusammenhang von Struktur der Ligandenhülle und Stabilität der AuNP-Konjugate dem Ergebnisteil vorangestellt werden.

2.2.5 Ligandenstruktur und Stabilität von AuNP-Konjugaten

Bei der Betrachtung der Ligandenhüllen von AuNP lohnt es, sich die Analogie zu SAMs zu vergegenwärtigen, um wichtige strukturelle Parameter herauszuarbeiten (vgl. Abb. 2.1). Die Grenzfläche Ligandenhülle-Medium wird durch die terminalen Gruppen der Liganden definiert und für die Stabilität der Konjugate sind vor allem die durch sie bestimmte Oberflächenladung und deren Funktionalität bzw. Reaktivität im weiteren Sinne von Bedeutung. Der Bereich der Ligandenhülle stellt die physikalische Barriere zwischen Partikeloberfläche und Medium dar und ist durch Eigenschaften wie Packungsdichte, hydrophile und hydrophobe Bereiche, Kristallinität, Vernetzung, Konformation und seine Dimension (Dicke) charakterisiert. Die Grenzfläche Ligandenhülle-Partikeloberfläche ist bestimmt durch die chemischen Bindungen der Ankergruppen und deren Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften der Oberfläche, wie deren Kristallinität bzw. Oberflächenrekonstruktion.

Die Bedeckungsdichte der Liganden ist eine grundsätzlich bedeutende Größe. Die Stabilität von Konjugaten hängt immer davon ab, wie vollständig die Bedeckung mit Liganden ist und wie dicht die Liganden bei vollständiger Bedeckung gepackt sind. Die Bedeckungsdichte hängt, ebenso wie die zuvor erläuterten Eigenschaften der Ligandenhülle, naturgemäß von der Struktur der Liganden ab. Wichtige Parameter der Ligandenstruktur sind die Dimension der Liganden und deren Ankergruppen und terminale Gruppen.

2.2.5.1 Dimension der Liganden

Aus Untersuchungen an SAMs und MPC ist bekannt und auch intuitiv einleuchtend, dass die Stabilisierung durch *n*-Alkanthiolate und verwandte Strukturen mit steigender Kettenlänge zunimmt. Diese Korrelation ist jedoch nur bis zu einer Kettenlänge im Bereich von etwa 10 Methylengruppen gegeben. Sowohl bei SAMs von Alkanthiolaten auf MPC¹¹⁸ als auch bei solchen von ω -Mercaptocarbonsäuren auf AuNP mit $d = 40 \text{ nm}^{122}$ wurde beispielsweise ab einer Kettenlänge von 10 keine zusätzliche Stabilisierung gegen oxidatives Ätzen beobachtet, während die Korrelation bei kleineren Kettenlängen sehr stark ausgeprägt war. Bei MPC ist ein Grund dafür in der Oberflächenkrümmung zu sehen,¹¹⁸ denn durch sie nimmt die Packungsdichte der Ketten mit dem distalen Abstand von der Clusteroberfläche ab. Bei den

w-Mercaptocarbonsäuren könnte eine Zunahme von Defekten und ungeordneten Bereichen bei längeren Ketten eine Rolle spielen. Diese werden durch starke Wasserstoffbrückenbindungen der Carboxylgruppen und deren (Rück-) Bindung an die Goldoberfläche im Zusammenspiel mit der zunehmenden Flexibilität der Ketten befördert.¹⁰⁴ Zu einem ähnlichen Ergebnis führen Überlegungen zur Korrelation von Stabilität und Ligandenlänge bei Polymerliganden. Zwar nimmt die Dicke der Ligandenhülle mit der Polymerkettenlänge zu, andererseits haben größere Polymere auch einen höheren Platzbedarf, da deren bevorzugte Konformation typischerweise durch das statistische Knäuel beschrieben werden kann, dessen Durchmesser mit der Kettenlänge zunimmt. Dementsprechend kann die abnehmende Bedeckungsdichte den Vorteil der zunehmenden Dicke ab einer bestimmten Länge relativieren. Studien zur Abhängigkeit von PEG-Länge und Bedeckungsdichte bestätigen den beschriebenen Zusammenhang,^{232,180} der resultierende Einfluss auf die Stabilität und Biorepulsivität der PEG-Konjugate bzw. -SAMs ist aber nicht eindeutig.^{134,165,174,181,178} Systematische Untersuchungen zum Einfluss der PEG-Länge auf die Stabilität gegen oxidatives Ätzen und DTT-induzierte Aggregation sind dem Verfasser zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

Die laterale Dimension bzw. die Verzweigung der Liganden kann die Stabilität der Konjugate gegen oxidatives Ätzen erhöhen aber auch verringern.¹²³ Wenn aus dem zusätzlichen sterischen Anspruch durch die Verzweigung eine geringere Bedeckungsdichte resultiert, ist die Stabilisierung verringert. Befindet sich die Verzweigung dagegen in ausreichendem Abstand von der bindenden Thiolatgruppe, so dass die Bedeckungsdichte nicht beeinflusst wird, so können die zusätzlichen Van-der-Waals-Wechselwirkungen und die schlechtere Durchdringbarkeit der Ligandenhülle stabilisierend wirken. Ebenso wirken starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Liganden stabilisierend¹²⁵ und –als kovalentes Analogon- die Kreuzvernetzung von Teilen der Ligandenhüllen, wie sie z.B. in den micellaren Strategien der Gruppe von Weller angewendet wird.^{233,234,184}

2.2.5.2 Ladung

Die Oberflächenladung der Konjugate wird durch die terminalen Gruppen und deren Wechselwirkung mit dem Medium bestimmt. Über den Anteil von Carboxylgruppen und Aminogruppen in der Ligandenhülle lässt sich das ζ -Potential in einem weiten Bereich einstellen.^{183,184} Gemäß der DLVO-Theorie wirkt eine hohe Oberflächenladung stabilisierend, allerdings ist die DLVO-Theorie für die Beschreibung von vielen AuNP-Konjugaten nicht direkt geeignet, weil sie nicht die Wechselwirkungen der Ligandenhüllen und des Mediums berücksichtigt. Insbesondere in biologischen Anwendungen kann eine geladene Oberfläche

nachteilig sein, weil sie unspezifische Adsorption verstärken kann.¹⁸⁵ Unspezifische Adsorption kann aber auch in nicht-biologischen Medien, die also keine Zellen, Proteine, Peptide etc. enthalten, stattfinden und problematisch sein, z.B. die unspezifische Adsorption an Gefäßwände. Geladene Gruppen an der Oberfläche können auch zu Agglomeration führen, entweder mit anderen, gegensätzlich geladenen Partikeln, oder durch verbrückende Moleküle oder Ionen vermittelt. Dies können für positiv geladenen Aminotermini z.B. freie Citratmoleküle sein,¹⁸⁶ negativ geladene Gruppen wie Carboxylate agglomerieren besonders in Gegenwart von Calciumionen.¹⁸⁵ Die Ladung der Liganden kann die Packungsdichte beeinflussen, z.B. können deutlich höhere Bedeckungsdichten von Oligomeren auf AuNP erreicht werden, wenn die Adsorption in Lösungen mit höherer Salzkonzentration erfolgt.¹⁵⁴ Die elektrostatische Repulsion zwischen den negativ geladenen Oligomeren wird durch die bessere Abschirmung bei hohen Ionenstärken verringert. In Polymeren mit nur einer terminalen geladenen Gruppe ist hingegen keine Beeinflussung der Packungsdichte zu erwarten. Zur Frage wie die Oberflächenladung von AuNP-Konjugaten deren Stabilität gegen oxidatives Ätzen oder DTT-induzierte Aggregation beeinflusst, liegen keine systematischen Studien vor. Es lässt sich spekulieren, ob negativ geladene Gruppen aufgrund elektrostatischer Repulsion, oder positiv geladene Gruppen durch elektrostatische Attraktion, das Eindringen von Cyanidionen in die Ligandenhülle hemmen können, allerdings werden solche Überlegungen der Komplexität der Reaktion wohl nicht gerecht. Citratstabilisierte AuNP werden beispielsweise sehr schnell und bereits von geringen Cyanidkonzentrationen destabilisiert und aufgelöst und angesichts dieser Beobachtung scheint der Beitrag der Oberflächenladung zur Stabilisierung gering zu sein.

2.2.5.3 Zähnigkeit

Mehrzähnige Liganden sind aufgrund des Chelat-Effektes stärker an Substrat- und Partikeloberflächen gebunden und es wurden daher viele mehrzähnige Ligandentypen entwickelt.²³⁵ Wichtige Beispiele sind die in der Gruppe von Mattoussi entwickelten zweizähnigen PEG-Thiolat-Liganden, die auf Liponsäure basieren,¹⁹⁰ aber auch dreizähnige,^{236,189} mehrzähnige¹⁸⁸ und vielzähnige bzw. multi- oder polydentate^{191,192} PEG-Thiolat-Liganden wurden bereits vorgestellt. Mehrzähnige Thiolatliganden sind auch für die Stabilisierung anderer Nanomaterialien als AuNP geeignet, besonders für die von Quantenpunkten. Weil die Affinität von Thiolen zu deren Oberfläche geringer ist, kommt der Vorteil des Chelat-Effektes hier stärker zum Tragen. Das on/off Gleichgewicht kann dann im Vergleich zu Quantenpunkten mit einzähnigen Thiolatliganden sehr stark verschoben, die Konzentration an freiem Liganden also sehr verringert, bzw. die funktionalisierten Quantenpunkte stark verdünnt werden, ohne dass deren Stabilität beeinträchtigt wird.¹⁸⁹ Bei Gold ist das aufgrund der stabilen Schwefel-Gold-Bindung auch mit einzähnigen Thiolatliganden möglich. Nachteile mehrzähniger Liganden sind ihre häufig höhere chemische Labilität und ihr höherer footprint im Vergleich zu Monothiolen. Mit mehrzähnigen Thiolen lassen sich in der Regel wohl nicht die Bedeckungsdichten von Monothiolen erreichen, sie adsorbieren aber stärker an die AuNP-Oberfläche und sind von dieser auch schwieriger zu entfernen. Im Einklang mit dieser Vorstellung sind die experimentellen Ergebnisse, die eine höhere Stabilisierung von AuNP gegen oxidatives Ätzen durch Monothiole, aber eine höhere Stabilisierung gegen kompetitiven Ligandenaustausch durch mehrzähnige Liganden zeigen.¹²⁴

Die Struktur der Ligandenhülle lässt sich also über die Struktur der Liganden hinsichtlich verschiedener Parameter steuern. Dabei ist es wichtig, die einzelnen Parameter differenziert zu betrachten. Zum Beispiel führen höhere Polymerkettenlängen oder Mehrzähnigkeit der Liganden nicht immer zu einer höheren Stabilität der Konjugate. Zusätzlich muss auch die Stabilität selbst differenziert betrachtet werden. Durch Kombination verschiedener Stabilitätstest lassen sich dann Eigenschaften der Ligandenhüllen studieren, die mit üblichen Charakterisierungsmethoden (z.B. TEM, DLS, UV/vis, IR, NMR) nicht ohne Weiteres zugänglich sind. Elektrolyt-induzierte Aggregation weist schnell und einfach elektrostatische Stabilisierung in Abgrenzung zu sterischer nach, DTT-induzierte Aggregation hängt von der chemischen Stabilität der AuNP-Ligandenbindungen ab, aber auch von der Durchdringbarkeit der Ligandenhülle. Oxidatives Ätzen hängt schließlich primär von der Durchdringbarkeit der Ligandenhülle ab.

In dieser Arbeit wurden diese Techniken genutzt, um verschiedene Parameter zu studieren, die die Stabilität von PEGylierten AuNP beeinflussen könnten. Neben Polymerlänge, Partikelgröße, Zähnigkeit und Matrix lag ein besonderer Schwerpunkt auf der Struktur der PEG-Thiolat-Liganden nahe der Ankergruppe. Dazu wurden sowohl AuNP als auch verschiedene PEG-Liganden synthetisiert, umfassend charakterisiert und systematischen Stabilitätstests unterzogen.

2.3 Experimentalteil zu Kapitel 2

2.3.1 Materialien

α-Amino-ω-mercapto-polyethylenglykol-hydrochloride mit den mittleren Molmassen M_w ~ 3000 g/mol (Herstellerangabe: 3163 Da, PEG3kNH2), M_w ~ 5000 g/mol (Herstellerangabe: 4847 Da, PEG5kNH2) und M_w ~ 10,000 g/mol (Herstellerangabe: 9669 Da, PEG10kNH2) waren von Iris Biotech (Iris Biotech GmbH, Marktredwitz). α-Methoxy-polyethylenglykol-ω-(11-mercaptoundecansäureamid) (PEGAmidMUA, M = 716 g/mol, 10 Ethylenglykoleinheiten) war von Polypure (Polypure AS, Oslo).

Alle sonstigen Laborchemikalien, Lösungsmittel und deuterierten Lösungsmittel in p.a. Qualität wurden, wenn nicht vorrätig, bei den Herstellern Fluka, Sigma Aldrich oder Merck bestellt oder beim Lager der Universität Hamburg angefordert. In allen Prozeduren wurde grundsätzlich ultrareines Wasser verwendet (18.2 M Ω , Anlage: Milli-Q Reference A+ (Millipore GmbH) unter Verwendung eines 0.22 µm Membranfilters (Millipak-20 Express). Lösungen sind, wenn nicht anders angegeben, wässrige Lösungen.

2.3.2 Charakterisierung

2.3.2.1 Spektroskopische Methoden

¹H-NMR-Spektren wurden vom NMR-Service des Instituts für organische Chemie der Universität Hamburg mit einem Bruker AV2-400 NMR Spektrometer bei 400.13 MHz oder einem Bruker DRX 500 bei 500.13 MHz und 298 K aufgenommen.

Einzelne UV-Vis-Spektren wurden auf einem Varian Cary 50 Spektralphotometer aufgenommen, wie in Kapitel 1, Abschnitt 1.3.2 beschrieben.

Für die Analyse mittels Fouriertransformierter Infrarot-Spektroskopie (FTIR) wurden Spektren mit einem Bruker FT-IR-Spektrometer, Modell Equinox 55, oder einem Varian 660 FT-IR-Spektrometer jeweils unter Verwendung des Aufbaus für Messungen nach dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflektion (ATR, engl.: attenuated total reflection) aufgenommen. Es wurden feste, trockene, Proben vermessen wenn nicht anders angegeben.

2.3.2.2 DLS- und ζ-Potential-Messungen

DLS- und ζ -Potential-Messungen wurden wie in Kapitel 1, Abschnitt 1.3.3, beschrieben durchgeführt.

2.3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM-Analytik wurde wie in Kapitel 1, Abschnitt 1.3.4 beschrieben durchgeführt.

2.3.2.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen (MS-) Experimente wurden vom MS-Service der Universität Hamburg mit einem Agilent 6224 LC-TOF-System im hochauflösenden Modus durchgeführt. Es wurden Lösungen der Analyten (~1 mg/ml) in Tetrahydrofuran (THF) mit Wasser, Acetonitril (1:1) und Ameisensäure (0.1%) verdünnt und 8 µl der verdünnten Lösung über einen Schleifeninjektor eingespeist. Es wurde im m/z-Bereich 110-3200 gemessen, die Peaks der internen Referenzen lagen bei 121.051 und 922.010.

2.3.2.5 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die analytischen Gelpermeationschromatographien wurden an einem HLC-8320 EcoSec GPC System (Tosoh Bioscience LLC) der CAN GmbH (Hamburg) durchgeführt.

2.3.3 Goldnanopartikel-Synthesen

Die AuNP Synthesen wurden wie in Kapitel 1, Abschnitt 1.3.5 beschrieben nach der inversen Methode, der Seeded Growth Methode oder der verbesserten inversen Methode durchgeführt.

2.3.4 Ligandensynthesen

Folgende Liganden wurden nach der gleichen Arbeitsvorschrift mit geringfügigen Variationen synthetisiert.

Ausgehend von Polyethylenglykol-monomethylether (PEGMM) mit einer mittleren Molmasse von $M_w \sim 2000$ g/mol (PEGMM2k):

 α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(11-mercaptoundecanoat) (PEGMUA)



 α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(3-mercaptopropionat) (PEGMPA)

 α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(4-mercaptophenylethanoat) (PEGMPAA)

 α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -((R/S)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoat) (PEGLIP)

In vergleichenden Studien wurden ausschließlich Liganden verwendet, die mit PEGMM2k der gleichen Charge synthetisiert wurden.

Ausgehend von Polyethylenglykol-monomethylether (PEGMM) mit einer mittleren Molmasse von $M_w \sim 5000$ g/mol (PEGMM5k):

 α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -(11-mercaptoundecanoat) (PEGMUA5k)

2.3.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von PEG-Thiolaten mittels Veresterung

Es wurden 4.0 g (~ 2 mmol) PEGMM2k und 1.28 g (6.00 mmol) 11-Mercaptoundecansäure für PEGMUA, 1.00 g (5.9 mmol) 4-Mercaptophenylessigsäure für PEGMPAA, 523 μ l (0.637 g, 6.0 mmol) 3-Mercaptopropionsäure für PEGMPA, oder 1.65 g (8.0 mmol) (*R/S*)- α -Liponsäure für PEGLIP, in einem 50 ml Dreihalskolben mit aufgesetztem Tropftrichter unter schwachem Stickstoffstrom 36-72 Stunden bei 160 °C gerührt. Es wurde dann das Abkühlen der Reaktionsmischung auf 60 °C abgewartet, 3.5 ml Chloroform zugegeben, und die Lösung in 250 ml kalten Diethylether gegeben. Der weiße Niederschlag wurde zügig filtriert und mehrmals mit kaltem Diethylether gewaschen. Dann wurde der Niederschlag durch Lösen in Chloroform in einen Einhalskolben überführt und anschließend das Chloroform unter vermindertem Druck (~350 mbar) bei etwa 40 °C am Rotationsverdampfer abgetrennt. Der Feststoff wurde dann in Wasser aufgenommen, eingefroren und innerhalb von 36 Stunden im Ölpumpenvakuum einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Die Synthese von PEGMUA5k erfolgte analog, mit 5.0 g (~ 1 mmol) PEGMM5k und 0.64 g (3.00 mmol) 11-Mercaptoundecansäure.

2.3.4.3 Reinigung und Charakterisierung der Liganden

Die Reaktionen können gut über Dünnschichtchromatographie verfolgt werden und ebenso kann die Abtrennung der Mercaptocarbonsäuren vom Produkt damit kontrolliert werden. Als Laufmittel wurde in der Regel ein Chloroform/Ethanol 2:1 Gemisch verwendet, das Anfärben erfolgte in einer Iod-Kammer. Die Polymere zeigen verschmierte Banden und müssen daher dünn getüpfelt werden, die Mercaptocarbonsäuren weisen in diesem Laufmittel höhere R_f-Werte auf.

Die Reinigungswirkung durch die Fällung in Ether unterscheidet sich bei den unterschiedlichen Mercaptocarbonsäure-Edukten. Während bei PEGLIP, PEGMPA und PEGMPAA die Mercaptocarbonsäure-Edukte durch Fällen und gründliches Waschen mit kaltem Diethylether sehr gut abgetrennt werden, kann diese Behandlung bei PEGMUA nicht ausreichend sein. Als zusätzliche Reinigung können erneute Fällungen erfolgen, Dialysen oder Säulenchromatographie mit Chloroform:Ethanol 9:1 durchgeführt werden. Letztere eignet sich jedoch nur für sehr geringe Mengen (~20-80 mg), da das Polymer auf einer Kieselgelsäule stark verschmiert. Auch eine Gelpermeationschromatographie mit Sephadex G25 Superfine (GE Healthcare, Großbritannien) und Wasser als Laufmittel wurde erfolgreich durchgeführt. Die Dialysen wurden typischerweise mit Membranen aus regenerierter Cellulose (ZelluTrans/Roth V-Serie, Carl Roth GmbH) und einem Molecular Weight Cutoff (MWCO) von 1000 Da durchgeführt. Es wurde gegen ~2000 ml Wasser dialysiert. Die Dialysedauer betrug mindestens 16 h und des Wasser wurde innerhalb dieser Zeit mindestens viermal ausgetauscht.

Eventuell noch vorhandenes Eduktpolymer (PEGMM) konnte nicht abgetrennt werden. Der Umsatz kann über die NMR-Auswertung abgeschätzt werden. Dazu werden die Signale der terminalen Methoxygruppe (3H, Singulett mit δ im Bereich 3.3-3.4 in CDCl₃ für alle Liganden) als Referenz verwendet und für deren Integral der Wert 3 vorgegeben. Das Signal der Methylengruppe in α -Position zum Ester-Sauerstoff (2H, Triplett mit δ im Bereich 4.2-4.3 in CDCl₃ für alle Liganden) hat bei quantitativer Umsetzung ein Integral von 2. Bei nicht quantitativer Umsetzung kann diese bestimmt werden, indem das Integral dieses Signals durch 2 geteilt wird. Für PEGLIP und PEGMUA wurden im Rahmen der Genauigkeit der quantitativen NMR-Analyse von \pm 5 %²³⁷ quantitative Umsätze erreicht (> 95 %), für PEGMPA und PEGMPAA lagen die Umsätze bei ~80%. Für alle vergleichenden Studien wurden daher die Reinheiten von PEGMUA und PEGLIP durch Zugabe von PEGMM2k ebenfalls auf einen Wert von 80 % eingestellt. Eine Beeinflussung der Bindung an AuNP durch PEGMM2k ist nicht zu erwarten, da dieses Polymer keine funktionellen Gruppen aufweist, die stark an Au binden, und Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Konjugationsreaktionen wurden nicht beobachtet.

Weiterhin kann über die NMR-Analyse der Oxidationszustand der Liganden quantifiziert werden. Dies ist für die einzelnen Liganden bei ihrer NMR-Charakterisierung erläutert.

Die Quantifizierung des Umsatzes über die NMR-Analyse war bei PEGMUA5k nicht möglich, da das Signal der Ethylenglykoleinheiten hier deutlich breiter ist und das Signal der terminalen Methoxygruppe teilweise überdeckt. Insofern kann für diesen Liganden der Umsatz mit dieser Methode nur abgeschätzt werden. Es wurde für diesen Liganden eine zusätzliche Reinigungsstrategie angewendet, um das Eduktpolymer abzutrennen. Dazu wurde das Rohprodukt durch Zugabe einiger Körnchen Iod zum Disulfid oxidiert. Das Disulfid, dessen Molmasse etwa 10,000 g/mol entsprach, wurde dann in Membranen mit einem MWCO von 8000 dialysiert, um sowohl das Polymeredukt ($M_w \sim 5000$ g/mol), als auch Iodid und evtl. noch vorhandene Mercaptocarbonsäureedukte abzutrennen.

PEGMUA:

¹H-NMR, δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.22 (m, 2H, -CH₂-O-CO-), 3.90-3.45 (m, 183 H, - (C₂H₄O)_n-), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 2.68 (t, ${}^{3}J$ = 7.3 Hz, 2H, -S-S-CH₂-), 2.53 (m, 2H, -CH₂SH), 2.32 (t, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz, 2H, -CH₂CO-O-), 1.71-1.55 (m, 4H, -CH₂-CH₂-SH, -CH₂CH₂-CO-O-), 1.43-1.24 (m, 13H, CH₂ intern und -SH).

Das Signal bei 2.68 (t, ${}^{3}J = 7.3$ Hz, 2H, -S-S-CH₂-) ist durch die oxidierte Spezies, das Disulfid, verursacht. Da das Proton der Thiolgruppe im Disulfid fehlt und daher nicht mehr zur Signalaufspaltung beiträgt, wird ein Triplett anstelle eines scheinbaren Quartetts beobachtet. Dieses scheinbare Quartett ist tatsächlich ein Dublett eines Tripletts, dessen Kopplungskonstanten fast gleich (${}^{3}J = 7.2-7.4$ Hz) sind. Dieses Signal kann integriert werden, um den Anteil der oxidierten Spezies zu quantifizieren. Die Interpretation der Signale wurde durch 2D-Experimente untermauert.

IR (ATR), v/cm⁻¹: 2882, 1735, 1466, 1359, 1341, 1279, 1240, 1146, 1098, 1060, 961, 841, 669, 530.

MS (ESI, *m*/*z*): 590-900, Signalabstand 14.6 – 14.7 [M³⁺].

(Die Signale der Molekülionen von PEG-Polymeren haben einen Abstand von 44/z, die Ladung *z* der Ionen beträgt hier 3.²³⁸ Die Molekülmassen waren dementsprechend verteilt von ~1770-2700 u)

GPC (UV and RI-Detektor, Laufmittel THF):

Peak 1: $M_w = 2156$ g/mol, Polydispersitätsindex PI = 1.036.

Peak 2: $M_w = 5092$ g/mol, Polydispersitätsindex PI = 1.043 (Disulfid).

PEGMPAA:

¹H-NMR, δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.48-7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.24-7.18 (m, 2H, Ar-H), 4.24 (m, 2H, -CH₂-O-CO-), 3.90-3.45 (m, 185 H, -(C₂H₄O)_n-), 3.38 (s, 3H, -OCH₃).

Das Signal des Thiol-Protons wurde bei dieser Verbindung nicht beobachtet. Möglicherweise liegt es im Bereich der Ethylenglykoleinheiten von 3.90-3.45 ppm, da es sich um ein aromatisches Thiol handelt, oder dessen höhere Acidität bewirkt eine Signalverbreiterung. Die mögliche Erklärung, dass die Verbindung komplett oxidiert sein könnte stand im Widerspruch zu den GPC Ergebnissen. Das Signal der Methylenprotonen in α -Position zum aromatischen Ring liegt ebenfalls im Bereich der Ethylenglykoleinheiten.

IR (ATR), v/cm⁻¹: 2883, 1734, 1649, 1466, 1359, 1341, 1279, 1240, 1146, 1102, 1060, 958, 842, 669, 530.

MS (ESI, *m*/*z*): 590-900, Signalabstand 14.6 – 14.7 [M³⁺].

GPC (UV and RI-Detektor, Laufmittel THF):

Peak 1: $M_w = 2034$ g/mol Polydispersitätsindex PI = 1.032.

Peak 2: M_w = 4591 g/mol Polydispersitätsindex PI = 1.043. (Disulfid)

PEGMPA:

¹H-NMR, δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.26 (m, 2H, -CH₂-O-CO-), 3.90-3.45 (m, 183 H, - (C₂H₄O)_n-), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 2.87-2.74 (m, 2H, -CH₂CO-O-), 2.72-2.58 (m, 2H, - CH₂SH), 1.68 (t, ${}^{3}J$ = 8.2 Hz, 1H, -SH).

Bei dieser Verbindung können die Methylenprotonen in α -Position zur Thiol- bzw. Disulfidgruppe nicht differenziert werden, da sie im selben Bereich liegen (Multiplett von 2.72-2.58 ppm). Das Signal des Thiol-Protons bei 1.68 ppm kann stattdessen für die Quantifizierung des Oxidationszustandes genutzt werden.

IR (ATR), v/cm⁻¹: 2883, 1734, 1466, 1359, 1340, 1279, 1240, 1146, 1102, 1060, 957, 842, 669, 529.

MS (ESI, *m*/*z*): 590-900, Signalabstand 14.6 – 14.7 [M³⁺].

GPC (UV and RI-Detektor, Laufmittel THF):

Peak 1: $M_w = 2034$ g/mol Polydispersitätsindex PI = 1.030.

Peak 2: $M_w = 4391$ g/mol Polydispersitätsindex PI = 1.031. (Disulfid)

PEGLIP:

¹H-NMR, δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.23 (m, 2H, -CH₂-O-CO-), 3.90-3.43 (m, 183 H, - (C₂H₄O)_n-), 3.38 (s, 3H, -OCH₃), 3.25-3.05 (m, 2H, -CH₂S-), 2.52-2.41 (m, 1H, -C**H**₂CH₂S-), 2.35 (t, ${}^{3}J$ = 7.4 Hz, 2H, -CH₂CO-O-), 1.96-1.84 (m, 1H, -C**H**₂CH₂S-), 1.75-1.55 (m, 4H, - C**H**₂-(CH₂)₃-CO-O-, -C**H**₂CH₂-CO-O-), 1.39 (m, 2H, -C**H**₂-(CH₂)₂-CO-O-).

Das Signal des Protons am Chiralitätszentrum liegt im Multiplett von 3.90-3.43 ppm. Das Produkt wurde als vollständig oxidiert angenommen, erkennbar an den Signalen bei 3.25-3.05 ppm und 2.52-2.41 ppm. Die Signale dieser Protonen des Dithiolan-Rings liegen in der reduzierten Form bei etwa 2.8 und 2.6 ppm und die Thiolprotonen bei etwa 1.30 (t) und 1.25 (d).¹⁹⁰ Keines dieser Signale wurde im Spektrum beobachtet.

IR (ATR), v/cm⁻¹: 2882, 1732, 1466, 1359, 1340, 1279, 1240, 1146, 1102, 1060, 959, 842, 528.

MS (ESI, m/z): 550-900, Signalabstand 14.6 – 14.8 [M³⁺]. GPC (UV and RI-Detektor, Laufmittel THF): Peak 1: M_w = 1998 g/mol Polydispersitätsindex PI = 1.032.

GPC des Polymeredukts PEGMM2k:

Peak 1: $M_w = 2002$ g/mol, Polydispersitätsindex PI = 1.031.

Die GPC Ergebnisse spiegeln nicht exakt die Änderungen der Molmassen wieder, da die Änderungen der chemischen Struktur auch das Laufverhalten der Liganden beeinflussen können.

PEGMUA5k:

¹H-NMR, δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 4.08 (m, 2H, -CH₂-O-CO-), 3.80-3.10 (m, 452 H, - (C₂H₄O)_n-), 3.24 (s, 3H, -OCH₃), 2.54 (t, ${}^{3}J$ = 7.3 Hz, 2H, -S-S-CH₂-), 2.38 (dt, 2H, -CH₂SH), 2.18 (t, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz, 2H, -CH₂CO-O-), 1.55-1.40 (m, 4H, -CH₂-CH₂-SH, -CH₂CH₂-CO-O-), 1.30-1.10 (m, 13H, CH₂ intern und -SH).

Der Umsatz konnte nur grob auf 65 % abgeschätzt werden, da das Signal der Methoxyprotonen (s, 3.24 ppm) vom Signal der Ethylenglykoleinheiten (m, 3.80-3.10 ppm) überlagert ist. IR (ATR), v/cm⁻¹: 2882, 1734, 1467, 1359, 1342, 1279, 1240, 1146, 1098, 1060, 961, 842, 527.

MS (ESI, m/z): 750-1200, Signalabstand 8.8 [M⁵⁺]. GPC (UV and RI-Detektor, Laufmittel THF): Peak 1: $M_w = 5234$ g/mol Polydispersitätsindex PI = 1.040.

2.3.4.4 Synthese der AuNP-Konjugate

Alle verwendeten Partikel stammten aus Seeded Growth Synthesen, die in Kapitel 1, Abschnitt 1.4.5 beschrieben sind, außer AuNP12C, die mit der verbesserten inversen Methode (Details in Kapitel 1, Abschnitt 1.3.5.2) synthetisiert wurden.

Die Synthese der AuNP-Konjugate AuNP@PEGx (x = MUA, MUA5k, AmidMUA, MPA, MPAA, LIP, 3kNH2, 5kNH2, 10kNH2) erfolgte durch einfaches Vermischen der Ligandenlösungen mit AuNP bei Raumtemperatur, die Reaktionszeit vor der Reinigung betrug mindestens 30 Minuten. Die Ligandenlösungen wurden jeweils vorgelegt, um bereits durch die Zugabe der größeren Volumina AuNP eine starke Durchmischung zu erreichen. Es wurden wässrige oder ethanolische Lösungen der Liganden verwendet, die Konzentrationen betrugen standardmäßig 1 mM. Tabelle 2.1 fasst die Bedingungen für die verschiedenen Konjugate zusammen. Die theoretischen Überschüsse wurden bezogen auf eine maximale Bedeckung mit einer idealen SAM, unter Annahme sphärischer Partikel mit Au(111)-Flächen und einem footprint der Thiole von 0.214, entsprechend dem footprint von langkettigen Alkanthiolaten auf Au(111)-Substraten.¹³² Ein zweifacher Überschuss würde z.B. für zwei idealisierte Monolagen auf den jeweiligen AuNP ausreichen. Der tatsächliche Überschuss kann also höher liegen, da nicht alle Liganden solch hohe Bedeckungsdichten erreichen können.

Tabelle 2.1: Bedingungen für die Konjugation. Mit Durchmesser *d* und Konzentration *c* der AuNP vor der Konjugation und Reinigung, Zugabevolumina *V* von 1 mM Ligandenlösung pro ml AuNP-Lösung und daraus berechneter Ligandenüberschuss bezogen auf eine maximale Bedeckung aller AuNP mit einer idealen SAM. Zudem ist die Reinigungsmethode (Zentr. = Zentrifugation) für die Konjugate angegeben.

| Charge | d(AuNP) [nm] | c(AuNP) [nM] | <i>V</i> (Lig.)/ml [µl] | Überschuss | Reinigung |
|---------|--------------|--------------|-------------------------|------------|-----------|
| AuNP12 | 11.7±1.2 | 10.5 | 80 | 4-fach | Zentr. |
| AuNP12B | 12.0±1.3 | 44.6 | 800 | 10-fach | Zentr. |
| AuNP12C | 11.7±0.9 | 3.1 | 80 | 13-fach | Zentr. |
| AuNP30 | 30.5±2.6 | 0.5 | 80 | 11-fach | Zentr. |
| AuNP41 | 41.4±2.4 | 0.3 | 35 | 8-fach | Dialyse |
| AuNP53 | 53.0±3.1 | 0.2 | 35 | 5-fach | Dialyse |
| AuNP54 | 54.1±5.9 | 0.2 | 35 | 5-fach | Dialyse |

Die Reinigung durch Zentrifugation erfolgte durch viermaliges Zentrifugieren (20-30 min bei 20,000g für AuNP12-, AuNP12B- und AuNP12C-Konjugate, 10-15 min bei 12,000g für AuNP30-Konjugate) und Ersetzen des Überstandes durch Wasser.

Die Reinigung durch Dialyse erfolgte in Schlauchmembranen mit 25,000 MWCO (regenerierte Cellulose, ZelluTrans/Roth V-Serie, Carl Roth GmbH) gegen etwa 2000 ml Wasser für mindestens 24 h. Das Wasser wurde mindestens viermal ausgetauscht.

2.3.4.5 Stabilitätstest

Stabilität gegen oxidatives Ätzen mit Cyanid

Für ein Standard-Ätzexperiment wurden 900 µl AuNP-Lösung in einer verschließbaren UV-Mikroküvette (Plastibrand, Carl Roth GmbH) mit 100 µl Kaliumcyanidlösung (KCN) versetzt. [Achtung! KCN ist sehr giftig und muss mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden. Alle Lösungen müssen in eindeutig gekennzeichneten und verschlossenen Behältern gelagert werden. Abfälle sollten separat in einem eindeutig beschrifteten Behälter gesammelt und mit angemessenen Methoden entsorgt werden. KCN-Lösungen dürfen niemals angesäuert werden!] KCN-Stammlösungen können bei -18°C gelagert werden und halten sich dann mindestens mehrere Monate, wenn sie nur für kurze Zeiträume (30-60 Minuten) aufgetaut werden. Die Zersetzung der Lösung lässt sich an einer Gelbfärbung durch Oxidationsprodukte erkennen, im Zweifel sollte für das analytische Ätzen eine frische Lösung hergestellt werden. Typische Cyanidkonzentrationen in der Küvette betrugen 100, 25 oder 10 mM und AuNP-Konzentrationen lagen im Bereich von 0.1-10 nM. Daraus ergeben sich bezogen auf die Stoffmenge an Gold, *n*(Au), die unter der Annahme der Sphärizität der Partikel und der

Dichte von Gold $\rho = 19.32 \text{ g/cm}^3$ berechnet werden kann, ~20-400-fache Überschüsse von Cyanidionen. Die Küvetten wurden für die Experimente verschlossen und während der zeitaufgelösten Messungen nicht geschüttelt oder gerührt. Die Experimente wurden mit Perkin-Elmer Lambda 1050, Perkin-Elmer Lambda 25 oder Varian Cary 50 UV/vis-Spektrometern durchgeführt, die dafür im Cycle-Mode betrieben wurden und in festgelegten Intervallen, typischerweise 2, 5 oder 10 Minuten, Absorbanzspektren aufnahmen. Die Zahl der aufgenommenen Spektren bewegte sich von 30-288 pro Experiment. Die Zugabe der Cyanidlösung erfolgte nach Aufnahme eines ersten Spektrums, mit dem Konzentration und Stabilität der Probe kontrolliert werden konnten.

Titrationen von AuNP mit Cyanidlösung

Die Titrationen von AuNP-Proben mit Cyanid-Lösung wurden in Quarz-Küvetten (Hellma GmbH) durchgeführt. 2500 μ l einer AuNP-Probe mit 1-2 nM wurden schrittweise mit 1 M wässriger Kaliumcyanidlösung (KCN) versetzt. Es wurden 10 μ l KCN-Lösung pro Minute (± 5 Sekunden) zugegeben und nach jeder Zugabe die Küvette fest verschlossen und geschüttelt. Es wurden 500 μ l bis zu einem finalen Volumen von 3000 μ l zugegeben. Wenn die Probe dann noch nicht vollständig aufgelöst war, wurden die Zugabevolumina auf 50 μ l/min erhöht. Für die Probe AuNP12@PEGMUA wurde das Experiment nach einer Gesamtzugabe von 1000 μ l gestoppt und 12 Minuten nach der letzten Zugabe wurde ein weiteres Absorbanzspektrum aufgenommen.

Analyse geätzter Proben mit TEM und UV/vis-Spektroskopie

Konjugate von AuNP mit PEGMUA (AuNP12@PEGMUA) wurden mit 10 und 25 mM KCN geätzt. Die Reaktion wurde nach 48 Stunden gestoppt indem jeweils 500 µl der Proben mit 1 ml Wasser verdünnt und dann zentrifugiert (20,000g, 20 min) wurden. Je 1490 µl des Überstands wurden mit Wasser ersetzt. Die Proben für die TEM-Analyse wurden durch Auftropfen von je 8-15 µl auf Kupfernetzchen, die mit amorphem Kohlenstoff beschichtet waren, und Eintrocknen über Nacht präpariert. Die statistische Auswertung erfolgte wie beschrieben mit jeweiliger Auszählung von mindestens 650 AuNP auf verschiedenen TEM-Aufnahmen. Die Konzentrationsbestimmung über die Absorbanzspektren erfolgte nach der Methode von Haiss⁸⁸ unter Berücksichtigung der durch das Ätzen veränderten Durchmesser, die aus der TEM-Auswertung erhalten wurden.

Stabilität gegen Elektrolyt-induzierte Aggregation

Je 600 µl AuNP-Konjugat-Probe (AuNP12B@PEGx oder AuNP12B@Citrat) wurden mit 400 µl Natriumchloridlösung (NaCl, 1 M) versetzt. Nach gründlichem Durchmischen durch starkes Schütteln wurden die Probe nicht weiter agitiert und nach verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Die Kontrolle wurde mit Wasser anstelle von NaCl-Lösung versetzt. Die finale AuNP Konzentration aller Proben betrug 3.2 nM.

Stabilität gegen DTT-induzierte Aggregation

Die Stabilität gegen DTT-induzierte Aggregation wurde ähnlich wie von Mei *et al.* beschrieben¹²⁴ getestet. Das Vorgehen entsprach prinzipiell den Ätzexperimenten und dieselben Spektrometer wurden verwendet. Es wurden typischerweise 240 Spektren in 2-Minuten-Abständen aufgenommen. Die sehr hohe DTT-Konzentration von 1 M in der Küvette lässt sich nicht durch Verdünnung einstellen, daher wurden direkt vor der Messung 154.3 mg DTT (1 mmol) und 23.4 mg NaCl (400 μ mol, Zielkonzentration 400 mM) in die Küvette gegeben und in 1 ml AuNP-Konjugat-Probe gelöst. Abweichende Konzentrationen wurden analog eingestellt.

2.4 Ergebnisse und Diskussionen zu Kapitel 2

2.4.1 Synthese und Charakterisierung von AuNP@PEGx-Konjugaten

2.4.1.1 Synthese verschiedener PEG-Thiolat-Liganden

Die Synthese der PEG-Liganden erfolgte durch eine Veresterung von Polyethylenglykolmonomethylether (PEGMM) mit verschiedenen Mercaptocarbonsäuren. In früheren Arbeiten im Arbeitskreis Weller wurde diese Reaktion erfolgreich eingesetzt, um α-Methoxy-polyethylenglykol-ω-(3-mercaptopropionat) (PEGMPA) zu synthetisieren.²³⁹ Im Rahmen der Diplomarbeit des Verfassers wurde diese Strategie dann für die Synthese von α-Methoxy-polyethylenglykol- ω -(11-mercaptoundecanoat) (PEGMUA) genutzt¹⁸⁹ und im Rahmen der vorliegenden Arbeit dann auf die Synthesen von α-Methoxy-polyethylenglykol-ω-(4mercaptophenylethanoat) (PEGMPAA) und α -Methoxy-polyethylenglykol- ω -((R/S)-5-(1,2dithiolan-3-yl)pentanoat) (PEGLIP) übertragen. Zudem wurde PEGMUA mit unterschiedlichen Molmassen synthetisiert und auch PEGMPA wurde in dieser Arbeit synthetisiert. Der Vorteil der Synthesen ist, dass für alle Polymere mit Molmassen von ~2000 g/mol hohe Umsätze über 80 % erzielt wurden. Andere Strategien, die mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-aktivierten Carbonsäuren und 4-(Dimethylamino)-Pyridin arbeiten liefern bei diesen Polymergrößen deutlich schlechtere Ausbeuten bei einem höheren Reinigungsaufwand,¹⁹⁰ oder sind mehrstufige Synthesen mit erheblich höherem Arbeitsaufwand bei geringerer Ausbeute.²⁴⁰ Der Umsatz und die Oxidation zum Disulfid lassen sich gut über die NMR-Analyse quantifizieren (Details dazu finden sich im Experimentalteil Abschnitt 2.3.4.3). Im ¹H-NMR liegt das Signal der Ester-Protonen, ein Triplett, typischerweise bei 4.22 ppm. In Abbildung 2.10 sind beispielhaft die Veresterungsreaktion und die NMR-Analytik für PEGMUA gezeigt.



Abb. 2.10: Synthese von PEGMUA. Reaktionsschema der Veresterungsreaktion zu PEGMUA (**A**), sowie NMR-Spektrum und -Auswertung von PEGMUA (**B**, 10 mg PEGMUA in CDCl₃, 400 MHz).

Die IR-Spektren sind von den Signalen der PEG-Ketten dominiert, die Schwingung der Ester-Carbonylgruppe bei 1732-1735 cm⁻¹ bestätigt zusätzlich zur NMR-Analytik die erfolgreiche Veresterung. Ein sehr schwaches Signal bei 1649 cm⁻¹ im IR-Spektrum des PEGMPAA deutet auf eine Schwingung des aromatischen Rings hin. Abbildung 2.11 zeigt die IR-Spektren von PEGMUA, PEGMUA5k, PEGMPAA, PEGMPAA und PEGLIP.



Abb. 2.11: IR-Spektren der Liganden PEGMUA (PEGMUA2k), PEGMUA5k, PEGMPA, PEGMPAA und PEGLIP. Die Spektren sind von den Ethylenglykoleinheiten dominiert und unterscheiden sich kaum. Die Bande bei 1735 cm⁻¹ in allen Spektren weist auf die C=O-Schwingung der Estergruppe hin. Die Banden bei 1640 cm⁻¹ im IR-Spektrum von PEGMPAA könnten auf Ringschwingungen des aromatischen Systems zurückzuführen sein, sind allerdings sehr schwach ausgeprägt. Die Banden bei 2340 cm⁻¹ und 2360 cm⁻¹ sind Kohlenstoffdioxid zuzuordnen.

Für PEGMPA, PEGMPAA und PEGLIP war Fällen des Rohprodukts in kaltem Ether und Waschen mit kaltem Ether ausreichend, um überschüssige Mercaptocarbonsäure vollständig abzutrennen. Bei PEGMUA musste dafür mehrmals gefällt und gewaschen werden, oder es wurden andere Reinigungsmethoden angewendet. Kleine Mengen lassen sich mit Säulenchromatographie reinigen, auch mit Sephadex als stationärer Phase, also als GPC bei Atmosphärendruck. Außerdem ist eine Dialyse möglich, die aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von 11-Mercaptoundecansäure (MUA) jedoch nicht sehr effizient ist. Die Effizienz kann gesteigert werden, indem statt gegen Wasser, gegen ein Wasser/Ethanol-Gemisch dialysiert wird. Der begrenzende Faktor für das Mischungsverhältnis ist die chemische Stabilität der Dialysemembran.

Das Eduktpolymer PEGMM konnte nicht abgetrennt werden, da es den Produkten in seinen physikalischen Eigenschaften zu sehr ähnelt. Allerdings stört es auch nicht die Konjugationsreaktionen und wird dann bei der Reinigung der AuNP-Konjugate abgetrennt. Eine Ausnahme stellt PEGMUA5k dar. Dieses Rohprodukt wurde gezielt zum Disulfid oxidiert, dass dann eine verdoppelte Molmasse aufwies und mittels Dialyse mit 8000 MWCO gereinigt werden konnte. Bei dieser Dialyse wird auch das Eduktpolymer (M_w ~ 5000 g/mol) entfernt. In wässriger Lösung oxidieren auch die anderen Liganden zum Disulfid und dementsprechend

lagen nach längerer Dialyse große Teile der Liganden als Disulfid vor. Neben der NMR-Analytik kann auch die analytische GPC genutzt werden, um die Disulfide über deren verdoppelte Masse nachzuweisen und ihren Anteil im Produkt abzuschätzen. Disulfide binden ebenso wie Thiole an AuNP, (Vgl. Abschnitt 2.2.1.3) oder sogar besser, weil bei der Chemisorption kein Wasserstoff eliminiert werden muss.¹⁰⁹ Die Oxidation zum Disulfid ist also unproblematisch und es wurden in der Tat keine Beeinträchtigungen der Konjugationsreaktionen bei Verwendung von Liganden mit hohem Disulfidanteil oder Disulfiden festgestellt. Die Stabilität von PEGMUA in wässriger Lösung wurde mittels NMR-Analytik untersucht. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben einer wässrigen PEGMUA-Lösung, die bei Raumtemperatur gelagert wurde, entnommen, lyophilisiert und mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Nach 4 Tagen in wässriger Lösung wurden erste Anzeichen einer Hydrolyse von etwa 2-4 % Prozent der Probe beobachtet, nach 7 Tagen waren etwa 25 % und nach 10 Tagen etwa 50 % hydrolysiert. Die Quantifizierung erfolgte analog zur Bestimmung des Umsatzes über das Verhältnis der Esterprotonen bei 4.2 ppm und denen der Methoxygruppe bei 3.4 ppm (gemessen in CDCl₃, 400 MHz), das im reinen Produkt 2:3 beträgt. Auch die Oxidation zum Disulfid konnte über das Verhältnis der entsprechenden Signale verfolgt werden. Der Disulfidanteil lag zu Beginn des Experiments bei 28 %, nach einem Tag bei 45 % und danach im Bereich von 35-40 %. Die trockenen Liganden PEGMUA, PEGMPA und PEGMPAA wurden bei -18 °C gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens 12 Monate stabil. Manche Proben des Liganden PEGLIP zeigten unter diesen Bedingungen nach längeren Zeiträumen > 6 Monaten Lagerung Anzeichen für eine Destabilisierung in Form einer Verbreiterung der Signale und fehlender Feinstruktur im NMR-Spektrum. Eine mögliche Ursache ist die irreversible Aggregation oder Polymerisation der Liponsäure-Spacer, die für Liponsäure mit den gleichen Auswirkungen auf die NMR-Spektren literaturbekannt ist.²⁴¹

Weiterhin wurden einige kommerziell erworbene Liganden verwendet. Abbildung 2.12 gibt einen Überblick über alle verwendeten PEG-Liganden.

2.4.1.2 Verwendete Goldnanopartikel

Es wurden verschiedene Chargen von citratstabilisierten AuNP verwendet, deren Synthese in Kapitel 1 ausführlich diskutiert wurde. Die Benennung der Chargen erfolgt durch Anhängen des gerundeten Partikeldurchmessers, und ggf. durch alphabetische Nummerierung, wenn mehrere Chargen AuNP gleichen Durchmessers verwendet wurden. So sind z.B. AuNP12 und AuNP12B Partikel mit einem Durchmesser von etwa 12 nm aus verschiedenen Synthesen.

2.4.1.3 Synthese und Charakterisierung von AuNP@PEGx-Konjugaten

Die Synthese der Konjugate AuNP@PEGx erfolgt durch einfaches Vermischen von Ligandenlösungen (c = 1 mM) mit den AuNP bei Raumtemperatur. Sie ist in Abbildung 2.12 schematisch dargestellt.





Abb. 2.12: Konjugation von PEGx-Liganden an citratstabilisierte AuNP und Übersicht über alle verwendeten PEGx-Liganden. Zusätzlich ist die Struktur von DTT gezeigt, das für Experimente zum kompetitiven Ligandenaustausch verwendet wurde.

Die Adsorption von Liganden bewirkt durch die Änderung der dielektrischen Umgebung der Partikel eine Rotverschiebung der SPR-Bande (SPB, vgl. Kapitel 1, Abschnitt 1.2.6) um wenige Nanometer.^{88,60} Diese Verschiebung ist beispielhaft anhand der Absorbanzspektren einiger AuNP12@PEGx-Konjugate in Abbildung 2.13 gezeigt, ebenso wie DLS-Messungen der gleichen Konjugate, die die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers durch die PEG-Ligandenhülle zeigen.



Abb. 2.13: Analytik von AuNP12@PEGx-Konjugaten. Absorbanzspektren (links) und DLS-Messungen (rechts) von AuNP12@PEGx Konjugaten. Die gestrichelten Linien sind die Daten der Ausgangspartikel AuNP12@Citrat. Es sind die Daten von AuNP12@PEGMUA (rote Linien), AuNP12@PEGMPA (blaue Linien) und AuNP12@PEGMPAA (grüne Linien) gezeigt. Die niedrigere Absorbanz der Konjugate ist auf Konzentrationsverluste durch die Reinigung zurückzuführen. Die Rotverschiebung der SPB um 2-5 nm ist im Inset mit einem Ausschnitt der normierten Spektren verdeutlicht. Die DLS-Messungen verdeutlichen die Zunahmen der hydrodynamischen Durchmesser durch die Konjugationen. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die Verschiebung der SPB kann innerhalb von Sekunden nach Vermischen der Reagenzien beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die initiale Adsorption sehr schnell erfolgt. Dieser schnellen initialen Adsorption folgt in Abhängigkeit von der Struktur der Liganden möglicherweise ein langsamerer Ordnungs- und Kristallisationsprozess, wie er für SAMs bekannt ist und in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben wurde. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers liegt für alle Konjugate mit PEG der Molmasse ~2000 g/mol im Bereich von 8-16 nm. Anhand von NMR-Analytik, GPC und Massenspektrometrie wurde für diese PEG-Liganden eine mittlere Zahl von Ethylenglykoleinheiten (Monomeren) von 45 angenommen. Mit der Kuhn-Länge 0.71 nm, einer Zahl von 28 statistischen Monomeren und einem Flory-Exponent von a = 0.6 (Wasser ist ein sehr gutes Lösungsmittel für PEG) ergibt sich nach Hill¹⁹⁴ für die Dicke der PEG-Hülle in einer mushroom-Konformation 5.2 nm und in einer brush-Konformation 8.3 nm. Dies entspräche Zunahmen des hydrodynamischen Durchmessers von ~10.4-16.6 nm. Die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser stimmen gut mit dieser Abschätzung überein, lassen aber keine Aussage über die Konformation der PEG-Liganden zu. Zum einen liegen die meisten Werte zwischen den theoretischen Abschätzungen für die verschiedenen Konformationen, zum anderen tragen die Spacer der untersuchten Liganden zur Dicke der Ligandenhülle bei.

2.4.1.4 Eignung von NMR- und IR-Spektroskopie für die Charakterisierung von AuNP-Konjugaten

Die Konjugate können prinzipiell auch mittels NMR- und IR-Spektroskopie untersucht werden, allerdings sind diese Techniken für eine Standardcharakterisierung nicht optimal. Es werden große Mengen (im Milligrammbereich) trockener Probe benötigt, was mit einem entsprechend hohen Präparationsaufwand einhergeht und gemessen daran ist der Informationsgewinn gering.

Die IR-Spektren der unterschiedlichen Liganden unterscheiden sich kaum, wie in Abbildung 2.11 gezeigt wurde. Die Liganden sind daher in den Konjugaten mittels IR-Spektroskopie nicht zuverlässig zu unterscheiden. Ähnliches gilt für die NMR-Spektroskopie. In Abbildung 2.14 ist dies beispielhaft für AuNP mit $d = 7.7 \pm 1.0$ nm gezeigt, die mit PEGMPAA funktionalisiert und anschließend durch Säulenchromatographie mit Sephadex gereinigt wurden. Es wurden Proben der Partikel vor und nach der Reinigung lyophilisiert und dann je 1 mg der trockenen Proben in Deuteriumoxid aufgenommen und der NMR-Analytik unterzogen. In der gereinigten Probe konnte der Ligand PEGMPAA kaum nachgewiesen werden, da das entsprechende Signal sehr schwach war. Eine Unterscheidung verschiedener PEG-Liganden wäre bei solch geringen Signalintensitäten nicht möglich, ganz zu schweigen vom Informationsgewinn aus der Feinstruktur des Spektrums. Es wurden davon abgesehen, im Gegensatz zur ungereinigten Probe, keine Citratsignale gefunden. Das Signal des PEGMPAA-Liganden war im Vergleich deutlich schwächer, obwohl die gleiche Probenmenge verwendet wurde, was auf eine erfolgreiche Abtrennung der freien Liganden hinweist.



Abb. 2.14: NMR-Analytik von AuNP. NMR-Spektren von AuNP ($d = 7.7 \pm 1.0$ nm), die mit PEGMPAA funktionalisiert und durch Säulenchromatographie mit Sephadex gereinigt wurden. In den gereinigten Konjugaten (1 mg in D₂O, A) ist nur noch ein sehr schwaches Signal der Ethylenglykoleinheiten des PEGMPAA zu beobachten, unterschiedliche PEG-Liganden wären so nicht zu unterscheiden. Die ungereinigten Konjugate (1 mg in D₂O, B) weisen stärkere Signale des Liganden PEGMPAA auf. Es konnten die Signale der aromatischen Gruppe, der Esterprotonen, der terminalen Methoxygruppe und der Ethylenglykoleinheiten identifiziert werden. Weiterhin wurde ein starkes Signal der Citratmoleküle gefunden. Dies weist darauf hin, dass durch die Reinigung nicht nur Citrat entfernt wurde, sondern auch überschüssiges PEGMPAA. Das Signal bei 2.2 ppm in beiden Proben ist vermutlich auf eine Kontamination mit Aceton zurückzuführen.

Sowohl IR- als auch NMR-Spektroskopie eignen sich dafür, die Anwesenheit von Citratmolekülen nachzuweisen und können daher prinzipiell die Effektivität einer Reinigungsmethode belegen, wenn kein Citrat detektiert wird. Wird Citrat detektiert, ist allerdings mit diesen Methoden nicht zu bestimmen, ob es an die AuNP gebunden oder in der Matrix vorlag, bevor die Probe eingetrocknet wurde.

2.4.1.5 Stabilität der Konjugate

Die Konjugate von AuNP und Methoxy-terminierten PEG-Liganden mit Molmassen von 2000 g/mol oder höher waren sehr stabil. Auch bei Konjugaten, die 2-3 Jahre nach ihrer Synthese (Lagerung bei ~7 °C) untersucht wurden, wurden keine Anzeichen einer signifikanten Destabilisierung, z.B. im Absorbanzspektrum, beobachtet. Konjugate von AuNP und PEG-

Liganden mit Amino-Termini oder Molmassen unter 1000 g/mol zeigten dagegen Anzeichen von sehr langsamer irreversibler unspezifischer Adsorption und Aggregation. Im Folgenden werden zunächst die Stabilitätstest und zusätzliche Charakterisierung der Konjugate AuNP@3kPEGNH2, AuNP@5kPEGNH2 und AuNP@10kPEGNH2 dargestellt, gefolgt von den Konjugaten mit Methoxy-terminierten PEG-Liganden, bei denen insbesondere der Einfluss des Spacers untersucht wurde.

2.4.2 Einfluss der PEG-Länge auf die Stabilität von AuNP@PEG-Konjugaten

2.4.2.1 Stabilität von AuNP@PEGNH2-Konjugaten

Konjugate mit terminalen Aminogruppen sind für biologische und medizinische Anwendungen interessant, weil an diese mit etablierten Protokollen wie der EDC-Kupplung weitere Moleküle gebunden werden können. Aktivierte NHS- und Sulfo-NHS-Ester vieler Moleküle, insbesondere von Fluoreszenzfarbstoffen, sind kommerziell erhältlich. Obwohl für die kontrollierte Präsentation von Biomolekülen und Stabilität der Konjugate die Verwendung gemischter Ligandenhüllen vorteilhaft ist,^{242,92} wurden in dieser Arbeit reine Amino-PEG-Konjugate studiert, da das Interesse hier nur den Eigenschaften der PEG-Hülle und nicht der Anwendung der Konjugate galt (Eine Anwendung von AuNP-Konjugaten in der medizinischen Forschung wird in Kapitel 3 dieser Arbeit beschrieben).

Ein entscheidender Unterschied, abgesehen von den terminalen Aminogruppen, der Amino-PEG-Liganden ist der fehlende Spacer. Im Gegensatz zu den anderen studierten Liganden ist die PEG-Kette direkt durch eine Thiol-Gruppe terminiert und das kann das Packungsverhalten und die maximale Bedeckungsdichte beeinflussen. Auch bei diesen Konjugaten lagen die Zunahmen der hydrodynamischen Durchmesser zwischen den theoretischen Werten für eine mushroom- bzw. eine brush-Konformation. Der hydrodynamische Radius nahm allerdings nicht proportional zur PEG-Länge zu und näherte sich mit zunehmender PEG-Länge dem theoretischen Wert für eine mushroom-Konformation. Dies deutet auf einen zunehmenden footprint, bzw. niedrigere Bedeckungsdichten mit steigender Kettenlänge hin, in Übereinstimmung mit aktuellen Studien.^{180,243}

Die terminalen Aminogruppen der gebundenen PEG-Liganden bewirken eine positive Oberflächenladung der Konjugate, die sich mittels ζ -Potential Messungen nachweisen lässt. Das ζ -Potential der citratstabilisierten Partikel, AuNP@Citrat, lag bei -55 mV, nach Synthese und Reinigung der Konjugate lag es bei +20 mV. Da die Konjugate eine Tendenz zu Aggregation und Anhaftung an Gefäßwände zeigten, wurde die pH-Abhängigkeit dieses Verhaltens getestet. Von Proben des ungereinigten Konjugats AuNP41@PEG3kNH2 mit pH 2, pH 7 und pH 12 wurden dazu jeweils 90 Absorbanzspektren in Intervallen von 5 Minuten aufgenommen. Bei pH 7 wurde anhand der abnehmenden Absorbanz ein leichter Konzentrationsabfall auf ca. 80 % der Ausgangskonzentration festgestellt, während die Proben bei pH 2 und 12 keine Änderung des Absorbanzspektrums innerhalb dieses Zeitraums aufwiesen. Diese Beobachtungen unterstreichen die Rolle der geladenen Aminogruppen bei der Destabilisierung, sie legen aber auch eine verbrückende Funktion der Citratmoleküle nahe, die z.B. für Peptid-Konjugate bereits beschrieben wurde.¹⁸⁶ Bei pH 12 sind die Aminogruppen deprotoniert und bei pH 2 sind die Citratmoleküle vollständig protoniert. In beiden Fällen ist die elektrostatisch induzierte Agglomeration nicht möglich.

2.4.2.2 Stabilität von AuNP@PEGNH2-Konjugaten gegen oxidatives Ätzen

Um die Stabilisierung durch die Amino-PEG-Liganden gegen oxidatives Ätzen zu untersuchen, wurden Konjugate mit der Partikelcharge AuNP54 unter gleichen Bedingungen synthetisiert und durch Dialysieren gereinigt. Anschließend wurden Teile dieser Proben auf die gleiche Partikelkonzentration von 0.04 nM eingestellt und das oxidative Ätzen in Gegenwart von 10 mM KCN spektroskopisch verfolgt (Intervall: 5 Minuten; Gesamtdauer: 18 Stunden). Das Experiment wurde nach einem Monat unter gleichen Bedingungen wiederholt, um den Einfluss der langfristigen Destabilisierung durch Desorption von Liganden zu untersuchen. Da in den gereinigten Konjugaten kein freier Ligand mehr vorliegen sollte, ist die Desorption aus der Ligandenhülle thermodynamisch begünstigt und kann nur durch kinetische Hemmung verzögert werden. Die Desorption von Thiolen ist in wässrigen Lösungen am schwächsten ausgeprägt¹⁰⁹ und kann vernachlässigbar gering sein,⁴⁹ jedoch dürfte die Kinetik des oxidativen Ätzens bereits durch geringe Zunahmen an Defektstellen in den Ligandenhüllen beeinflusst werden. Die Ergebnisse der Ätzexperimente sind in Abbildung 2.15 gezeigt. Abbildung 2.15 A zeigt beispielhaft die aufgenommenen Spektren für AuNP54@PEG3kNH2. Es ist eine sehr regelmäßige Abnahme der Absorbanz mit der Zeit zu erkennen ohne Anzeichen für eine signifikante Aggregation der Probe. Diese würde eine Zunahme der Absorbanz im Bereich von etwa 600-800 nm bewirken. Dies weist darauf hin, dass die Partikelgröße sich während des Ätzens nicht stark ändert und dass durch Ätzen destabilisierte Partikel schnell vollständig aufgelöst werden. Wenn eine Aggregation stattgefunden hätte, hätte die Sedimentationsgeschwindigkeit dieser Aggregate sehr hoch sein müssen, um zu keinem Zeitpunkt Aggregate zu detektieren. Es wurden allerdings keine Anzeichen von Sedimenten nach den Experimenten gefunden, so dass bedeutende Aggregationsprozesse in

diesen Experimenten ausgeschlossen werden können. Eine genaue Untersuchung und Diskussion des Ätzmechanismus wird in Abschnitt 2.4.3.3 dieses Kapitels vorgestellt.

Durch Auftragen der maximalen Absorbanz der SPB oder der Absorbanz bei 450 nm gegen die Zeit lassen sich die Kinetiken der Ätzprozesse direkt darstellen und vergleichen (Abbildung 2.15 B). Der Vergleich der Ätzkinetiken zeigt sowohl für die frischen als auch die gealterten Proben, dass die Stabilisierung mit zunehmender PEG-Kettenlänge leicht abnimmt. Außerdem sind die gealterten Proben etwas instabiler gegenüber dem oxidativen Ätzen als die frischen. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass PEG-Liganden mit höheren Molmassen schlechter stabilisieren als solche mit niedrigeren Molmassen, wenn der stabilisierende Effekt einer dickeren Ligandenhülle durch den destabilisierenden Effekt einer niedrigeren Bedeckungsdichte relativiert wird. Zudem deutet die geringere Stabilität nach einem längeren Zeitraum auf die Desorption von Liganden hin, die jedoch nicht stark ausgeprägt zu sein scheint. Auch die Destabilisierung durch Alterung ist bei den Konjugaten mit längeren PEG-Liganden etwas stärker ausgeprägt.



Abb. 2.15: Ergebnisse der zeitaufgelösten UV-vis-Spektroskopie zur Verfolgung der Reaktion der AuNP54@PEGNH2-Konjugate mit Cyanid. Eine repräsentative Auswahl an Absorbanzspektren der Probe AuNP54@PEG3kNH2 in Gegenwart von 10 mM Kaliumcyanid verdeutlicht die sukzessive Abnahme der Absorbanz, die hier auf die Abnahme der AuNP-Konzentration zurückzuführen ist (A). Die Spektren wurden in 5 Minuten-Intervallen aufgenommen, aus Gründen der Übersichtlichkeit ist jedoch nur jedes 4. Spektrum gezeigt ($\Delta t = 20$ min). In den Spektren finden sich keine Anzeichen für Aggregation oder signifikante Änderungen des mittleren Durchmessers der Probe. Durch Auftragung der normierten Absorbanzmaxima der SPB gegen die Zeit können die Kinetiken der Ätzreaktionen dargestellt und verglichen werden (B). Gereinigte Proben, die also keine freie Liganden enthielten, wiesen nach 27 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur in verschlossenen Gefäßen eine etwas geringere Stabilität gegen oxidatives Ätzen mit Kaliumcyanid auf. Außerdem nahm mit zunehmender Molmasse der Liganden die Stabilisierung gegen oxidatives Ätzen ab.

2.4.2.3 Stabilität von AuNP@PEGNH2-Konjugaten gegen DTT-induzierte Aggregation

Die Stabilität von AuNP54@PEG3kNH2, AuNP54@PEG5kNH2 und AuNP54@PEG10kNH2 gegen DTT-induzierte Aggregation wurde mit einer DTT-Konzentration von 330 mM und 133 mM NaCl getestet. Die Kinetiken sind in Abbildung 2.16 gezeigt.



Abb. 2.16: DTT-induzierte Aggregation. Aggregation der AuNP54@PEGNH2-Konjugate in Gegenwart von 330 mM DTT und 133 mM NaCl, dargestellt über die mit der Zeit abnehmende Absorbanz der SPB (SPB-Absorbanz).

Diese Experimente sind schwieriger zu interpretieren, weil die Verläufe der Absorbanz mit der Zeit unregelmäßiger sind. Dies ist in der Komplexität der Aggregations- und damit verbundenen Sedimentationsprozesse begründet, die zu ungewöhnlichen Konzentrationsprofilen innerhalb der Küvette führen können. Die Kinetik scheint bei AuNP54@PEG5kNH2 und AuNP54@PEG10kNH2 verzögert zu sein, und diese anfängliche Verzögerung scheint bei der Probe AuNP54@PEG10kNH2 stärker ausgeprägt zu sein. Dies könnte vorsichtig als eine etwas bessere Stabilisierung mit zunehmender Kettenlänge interpretiert werden. Eine höhere Bedeckungsdichte dürfte auch hinsichtlich der DTT-induzierten Aggregation stabilisierend wirken, auch weil mehr Thiolat-Bindungen ausgetauscht werden müssen. Da das DTT-Molekül deutlich größer ist als Cyanid-Ionen könnte aber der Effekt der sterischen Hinderung durch eine dickere Ligandenhülle in diesen Experimenten überwiegen. Mit zunehmender PEG-Kettenlänge sind zudem weniger Moleküle pro AuNP nötig, um diese sterisch gegen Aggregation zu stabilisieren.

2.4.2.4 Fazit zum Einfluss der Kettenlänge Teil I

Sowohl die Stabilität gegen oxidatives Ätzen als auch die Stabilität gegen DTT-induzierte Aggregation wurde durch PEG-Liganden höherer Molmasse nicht signifikant verbessert. Die

getesteten PEG-Liganden waren heterobifunktionelle Liganden, bei denen die PEG-Kette direkt durch eine Amino- bzw. eine Thiolfunktion in α - und ω -Position terminiert ist, in denen also kein Spacer zwischen Thiol und PEG-Kette vorlag. Die Stabilität gegen oxidatives Ätzen nahm mit zunehmender Kettenlänge leicht ab, die DTT-induzierte Aggregation war mit zunehmender Kettenlänge schwach verzögert. Als wichtiger Grund für diese Beobachtungen werden Unterschiede in der Bedeckungsdichte angenommen.

2.4.2.5 Einfluss der Kettenlänge bei PEGMUA

Der Einfluss der Kettenlänge auf die Stabilität der Konjugate wurde auch mit den Liganden PEGMUA, PEGMUA5k und PEGAmidMUA untersucht. PEGAmidMUA unterscheidet sich von den anderen beiden Liganden dadurch, dass der Spacer - basiert auf 11-Mercaptoundecansäure - hier über eine Amidbindung mit der PEG-Kette verknüpft ist und dass es sich um ein reines Oligomer mit zehn Ethylenglykoleinheiten handelt, dessen Molmasse nicht verteilt ist (Abb. 2.12).

Es wurden AuNP12C mit den Liganden funktionalisiert. Diese Partikel waren mit der optimierten inversen Methode synthetisiert und wiesen eine enge Größenverteilung auf bei einem Durchmesser von 11.7 ± 0.9 nm. Die Konjugate AuNP12C@PEGAmidMUA waren nicht stabil und es wurden Konzentrationsverluste nach der Reinigung durch Zentrifugation festgestellt. Auch die DLS-Messungen und Absorbanzspektren wiesen auf eine teilweise Aggregation hin (Abbildungen 2.17 und 2.18). Auch Konjugate von AuNP mit 11-Mercaptoundecansäure (MUA), AuNP12C@MUA, wurden durch Zentrifugationen destabilisiert (Abbildungen 2.17 und 2.18) und diese Beobachtungen zeigen, dass die PEG-Kette eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der Konjugate spielt und ausreichend lang sein muss, um eine hohe Stabilität in wässriger Lösung zu gewährleisten.



Abb. 2.17: Stabilität in Abhängigkeit von der (PEG-) Ligandenlänge UV/vis Analytik der Konjugate AuNP12C@Citrat, @MUA, @PEGAmidMUA, @PEGMUA2k und @PEGMUA5k direkt nach der Konjugationsreaktion ("roh"), nach Filtration mittels Spritzenfilter (0.22 µm PVDF, "filtriert") und nach Reinigung und Aufkonzentrieren durch mehrfache Zentrifugation ("purif."). Die detaillierten Durchführungen von Konjugation und Reinigung sind im Experimentalteil beschrieben. Die Absorbanzspektren zeigen, dass die Konjugate AuNP12C@MUA und @PEGAmidMUA bereits nach der Filtration niedriger konzentriert sind (rote Spektren, A), was auf eine teilweise Aggregation hinweist. Die Konjugate AuNP12C@MUA zeigten hohe Konzentrationsverluste durch Reinigung und Aufkonzentrieren, wurden also durch die Zentrifugationsschritte stark destabilisiert (blaue Spektren, A). AuNP12C@PEGAmidMUA zeigten ebenfalls Konzentrationsverluste durch Reinigung und Aufkonzentrieren, während die Konjugate AuNP12C@PEGMUA2k und @PEGMUA5k keine Konzentrationsverluste, weder durch Filtration, noch durch Reinigung und Aufkonzentrieren, aufwiesen. In den normierten Absorbanzspektren (B, normiert mit der Absorbanz bei 450 nm), weist nur für die Konjugate AuNP12C@MUA die stärkere Absorbanz im Bereich von ~600-800 nm auf eine signifikante Population von Aggregaten hin, sowohl vor als auch nach der Reinigung. Alle anderen Absorbanzspektren zeigen nur die charakteristische Verschiebung der SPR-Bande nach Konjugation eines PEG-Liganden.



Abb. 2.18: DLS-Experimente zum Einfluss der (PEG-) Ligandenlänge. Der über DLS-Messungen bestimmte hydrodynamische Durchmesser der Konjugate AuNP12C@PEGMUA2k und @PEGMUA5k (filtrierte und gereinigte Proben) nimmt mit steigender PEG-Länge zu (A). Die DLS-Messungen der Konjugate AuNP12C@MUA (nur filtrierte Probe wegen zu starker Destabilisierung durch Reinigung) und @PEGAmidMUA (filtrierte und gereinigte Probe) weisen auf eine teilweise Aggregation der Proben hin (B).

Die Konjugate AuNP12C@PEGAmidMUA wurden trotz ihrer geringeren Stabilität den in Abbildung 2.19 gezeigten Ätzexperimenten unterzogen. Allerdings ist wegen der Konzentrationsverluste durch Aggregation die Anfangskonzentrationen der Probe nicht mit denen der stabileren Konjugate AuNP12C@PEGMUA und AuNP12C@PEGMUA5k vergleichbar. Eine Probe AuNP12C@PEGMUA wurde für solch einen Vergleich verdünnt und einem Ätzexperiment unter gleichen Bedingungen unterzogen. Die Ätzexperimente sind nicht mit denen der AuNP54@PEGNH2-Konjugate zu vergleichen, da eine andere Partikelkonzentration und -größe verwendet wurde. Es ist jedoch bemerkenswert, dass mit deutlich höheren Cyanidionenkonzentrationen von 85 mM, im Vergleich zu 10 mM, gearbeitet wurde, was auf die höhere Stabilität der AuNP12C@PEGMUA-Konjugate hinweist. Denn trotz dieser höheren Cyanidionenkonzentration wurden die Proben AuNP12C@PEGMUA und AuNP12C@PEGMUA5k während der Dauer des Experiments nicht vollständig aufgelöst. Die Rolle des (MUA-) Spacers für die Stabilisierung von AuNP-Konjugaten wird im folgenden Abschnitt ausführlich untersucht und diskutiert. Die Stabilität der AuNP@-PEGMUA-Konjugate gegen oxidatives Ätzen war im Gegensatz zu den AuNP54@PEGNH2-Konjugaten stark abhängig von der PEG-Kettenlänge und nahm mit zunehmender Kettenlänge zu.



Abb. 2.19: Einfluss der PEG-Länge auf die Ätzreaktion. Abnahme der Absorbanz bei 450 nm (A450) im Verlauf der Reaktion der Konjugate AuNP12C@PEGMUA5k (blaue Kreise), AuNP12C@PEGMUA2k (rote Dreiecke) und AuNP12C@PEGAmidMUA (grüne Vierecke) mit je 85 mM Kaliumcyanid. Für den Vergleich mit den instabileren Koniugaten AuNP12C@PEGAmidMUA wurde zusätzlich die Reaktion einer verdünnten Probe der Konjugate AuNP12C@PEGMUA2k unter gleichen Bedingungen spektroskopisch verfolgt (AuNP12C@-PEGMUA2k (2), graue Dreiecke). Die Experimente belegen übereinstimmend eine deutliche Korrelation von PEG-Länge und Stabilität gegen oxidatives Ätzen mit Cyanid.

Diese wichtige Beobachtung ist ein starker Hinweis darauf, dass der MUA-Spacer eine höhere Bedeckungsdichte insbesondere der größeren Polymere ermöglicht. Dies kann zum einen bewirken, dass die PEG-Ketten stärker in eine brush-Konformation gezwungen werden, wodurch die Dicke der Ligandenhülle zunimmt. Der wichtigere Punkt ist aber, dass der stabilisierende Effekt einer dickeren Ligandenhülle in diesen Konjugaten nicht oder weniger durch eine geringere Bedeckungsdichte relativiert wird. Dass durch den MUA-Spacer eine höhere Bedeckungsdichte erzielt wird, kann geometrische und thermodynamische Gründe haben. Das geometrische Argument berücksichtigt den geringeren Platzanspruch der Alkylketten im Zusammenhang mit der Krümmung der AuNP-Oberfläche. Durch den Abstand von etwa 0.5-1 nm, den die Alkylketten zwischen PEG-Ketten und AuNP-Oberfläche erzeugen, und durch die Aufspreizung der Liganden aufgrund der Oberflächenkrümmung, ergibt sich mehr Raum für die PEG-Ketten, von denen folglich mehr an den AuNP gebunden werden können, selbst wenn sie in der gleichen Konformation vorliegen (Abb. 2.20). Die innere hydrophobe Schicht, die durch die Alkylketten gebildet wird, stellt eine zusätzliche physikalische Barriere dar. Dies erklärt, zusammen mit der höheren Bedeckungsdichte, dass bei gleicher Polymerlänge durch Verwendung eines Spacers die Stabilität der Konjugate erhöht wird.



Abb. 2.20: Schematische Darstellung der veränderten Konjugatgeometrie durch Verwendung eines Spacers. Da der Spacer, z.B. MUA, als innere Schicht oder Hülle zum Durchmesser des AuNP beiträgt, können aus geometrischen Gründen mehr PEG-Liganden in der gleichen Konformation an den Partikel gebunden werden. Die innere Schicht stellt eine zusätzliche physikalische Barriere dar.

Allerdings würde bei unveränderter Konformation der PEG-Reste auch bei Verwendung eines Spacers mit steigender Polymerlänge die Bedeckungsdichte abnehmen. Dass die Stabilität der AuNP@PEGMUA-Konjugate mit der PEG-Länge korreliert, lässt sich also nur damit erklären, dass die PEG-Reste durch Verwendung eines Spacers in eine Konformation gezwungen werden, die eine höhere Bedeckungsdichte ermöglicht. Dies kann thermodynamisch durch Bilanzierung der attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen in der Ligandenhülle begründet werden. Während bei PEG-Liganden ohne Spacer die Bedeckungsdichte allein durch die repulsiven Wechselwirkungen der PEG-Monomere beeinflusst wird (die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel Wasser sind bevorzugt),¹⁹³ liefern bei den PEGMUA-Konjugaten die attraktiven Van-der Waals-Wechselwirkungen der Alkylketten einen energetischen Beitrag,⁴⁷ der eine höhere Bedeckungsdichte und eine brush-Konformation der PEG-Ketten begünstigt, unabhängig davon, ob es sich um ein gekrümmtes oder ein planares Substrat handelt.

2.4.3 Einfluss des Spacers auf die Stabilität von AuNP@PEGx-Konjugaten

Die Liganden PEGMUA, PEGMPA, PEGMPAA und PEGLIP wurden mit PEGMM der gleichen Charge synthetisiert und wiesen daher die gleiche Molmassenverteilung der Methoxy-terminierten PEG-Ketten auf. PEGMUA, PEGMPA und PEGMPAA unterschieden sich ausschließlich durch den Spacer, der die terminale Thiolgruppe über eine Esterbindung mit der PEG-Kette verband. Mit diesen Liganden konnte der Einfluss des Spacers auf die Stabilität der Konjugate systematisch getestet werden. Die getesteten Spacer sind eine lange (C₁₀, PEGMUA) oder kurze (C₂, PEGMPA) Alkylkette und eine Phenylengruppe (PEGMPAA). PEGLIP ist im Gegensatz zu den monodentaten Thiolen ein zweizähniger Ligand basiert auf
Liponsäure. Das Konzept der Verknüpfung von Liponsäure mit PEG wurde von Mattoussis Gruppe vorgestellt und entwickelt.¹⁸⁸ Alle diese Liganden können für die Synthesen von AuNP-Konjugaten mit hoher kolloidaler Stabilität in wässriger Lösung verwendet werden. Die DLS-Profile und Absorbanzspektren der Konjugate sind ähnlich oder gleich, so dass diese nicht anhand der Standardanalytik unterschieden werden können (Abb. 2.13 und 2.21).



Abb. 2.21: Analytik von AuNP12B@PEGx-Konjugaten. Absorbanzspektren (links) und DLS-Messungen (rechts) der AuNP12B@PEGx-Konjugate. Die Daten für AuNP12B@Citrat sind für den Vergleich gezeigt (schwarze gestrichelte Linien). Die Konzentrationen von AuNP12B@PEGMUA (rote Linien), AuNP12B@PEGMPA (blaue Linien), AuNP12B@PEGMPAA (grüne Linien) und AuNP12B@PEGLIP (braune Linien) waren auf 5.4 nM eingestellt. Die normierten Absorbanzspektren im Inset verdeutlichen die Verschiebung der SPR-Bande um wenige Nanometer nach Konjugation der PEG-Liganden. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach Konjugation liegt für alle gezeigten Liganden im gleichen Bereich (8-16 nm), da sie sich nur in der Spacersequenz unterscheiden. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus SI zu Schulz *et al. Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die Konjugate werden auch durch vielfaches Zentrifugieren nicht destabilisiert und können dementsprechend einfach gereinigt werden. In Gegenwart von Salz werden die Konjugate nicht destabilisiert wie AuNP@Citrat und diese Beobachtung weist auf die sterische Stabilisierung der AuNP@PEGx-Konjgate im Gegensatz zur elektrostatischen Stabilisierung der AuNP@Citrat hin (Abbildung 2.22).



Abb. 2.22: Stabilität von AuNP-Konjugaten gegen Elektrolyt-induzierte Aggregation. Fotografien der AuNP12B-Konjugate (c = 3.2 nM) vor ("no addition") und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einstellen einer NaCl-Konzentration von 400 mM: AuNP12B@Citrat (A), AuNP12B-@PEGMUA blind (ohne NaCl, B), AuNP12B@PEGMUA (C), AuNP12B@PEGMPA (D), AuNP12B@PEGMPAA (E), und AuNP12B@PEGLIP (F). Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* 2013, 29, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

2.4.3.1 Stabilität der AuNP@PEGx-Konjugate gegen oxidatives Ätzen mit Cyanid

Titrationen der Konjugate mit KCN-Lösungen

Die Konjugate AuNP12@PEGx (x = MUA, MPA oder MPAA, c = 1.2-1.3 nM), sowie die Ausgangspartikel AuNP12@Citrat (c = 2.0 nM), wurden in Vorversuchen mit KCN-Lösung (c = 1 M) titriert. Mit solchen Titrationen lässt sich ein vergleichsweise schneller Überblick über die Stabilitäten der Konjugate verschaffen und sie können helfen, geeignete Cyanidkonzentrationen für Monitoring-Experimente abzuschätzen. In den Titrationen wurden in festen Zeitabständen ($\Delta t = 60 \pm 5$ s) definierte Volumina Cyanidlösung zu den Proben gegeben und Absorbanzspektren aufgenommen. Die Proben wurden direkt nach jeder Zugabe durch kräftiges Schütteln durchmischt. Die Stabilität der Proben kann dann über die Absorbanz der SPB verfolgt und als Funktion der Zeit, oder als Funktion der Cyanidionenkonzentration dargestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.23 gezeigt.

Die citratstabilisierten Partikel AuNP12@Citrat zeigten die geringste Stabilität gegen das oxidative Ätzen. Dies zeigt, dass die mögliche elektrostatische Stabilisierung durch die gleichen Ladungen von Citrathülle und Cyanidionen keine wichtige Rolle spielt. Die Stabilität der AuNP12@PEGx-Konjugate nahm in der Reihe AuNP12@PEGMPA < AuNP12@-

PEGMPAA << AuNP12@PEGMUA zu. AuNP12@PEGMUA konnten unter den experimentellen Bedingungen nicht vollständig aufgelöst werden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die außerordentlich gute Stabilisierung von Konjugaten durch den Liganden PEGMUA. Zudem zeigen die Experimente, dass durch diese Stabilitätstests Konjugate von PEG-Liganden mit geringem Aufwand unterschieden werden können, bei denen dies mit gängigen Charakterisierungsmethoden wie DLS, TEM oder UV/vis-Spektroskopie nicht möglich ist. Eine Analyse der Ätzkinetiken, auf die die Titrationsexperimente erste Hinweise lieferten, erfolgte auf Basis von *in situ*-Verfolgungen der Ätzreaktionen.



Abb. 2.23: Titration von AuNP-Konjugaten mit KCN-Lösung. Titrationen mit 1 M KCN-Lösung Quadrate), (magentafarbene AuNP12@PEGMPA von AuNP12@Citrat (blaue Kreise), AuNP12@PEGMPAA (grüne Dreiecke) und AuNP12@PEGMUA (braune Rauten). Die grauen Kreise repräsentieren die theoretische Abnahme der Absorbanz durch Verdünnungseffekte für die Probe AuNP12@PEGMUA. Die Absorbanzmaxima der SPR-Banden (SPB Max) sind als Funktion der Zeit (A) und der KCN-Konzentration, c(KCN), (B) aufgetragen. Das Zugabevolumen wurde von 10 µl/min auf 50 µl/min erhöht nachdem 200 µl zugegeben waren, also bei t = 20 min und bei c(KCN)= 74.1 mM. Die Abnahme der Absorbanz der Probe AuNP12@PEGMUA bei c(KCN) = 285.7 mM(die letzten zwei gezeigten Datenpunkte) ist auf eine zehnminütige Wartezeit nach der letzten Messung zurückzuführen, nach der die Probe erneut vermessen wurde. Eine vollständige Auflösung der Probe wurde in dieser Zeit nicht erreicht. Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus SI zu Schulz et al. Langmuir 2013, 29, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

In situ-Verfolgung des oxidativen Ätzens von AuNP-Konjugaten

Aufgrund ihrer optischen Eigenschaften lässt sich das oxidative Ätzen von AuNP hervorragend spektroskopisch verfolgen, was beispielsweise für die AuNP54@PEGNH2 Konjugate in Abbildung 2.15 gezeigt wurde. Um aussagekräftige Informationen aus den Ätzexperimenten zu gewinnen, ist es notwendig, die Vielzahl der Parameter zu berücksichtigen, die die Kinetik der Ätzreaktion beeinflussen können. Insbesondere sind dies die Partikelkonzentration, -größe und -form, die Cyanidkonzentration und Quelle der Cyanidionen, Bestandteile der Matrix wie Salze und freie Liganden, der Sauerstoffgehalt der Reaktionsmischung, und physikalische Parameter wie Temperatur und Durchmischung. Um die Bedingungen möglichst ähnlich zu halten, wurden in vergleichenden Experimenten die Konzentrationen der gereinigten Konjugate auf denselben Wert eingestellt. Die Kontrolle erfolgte mittels UV/vis-Spektroskopie anhand der Absorbanz bei 450 nm.⁸⁸ Der Sauerstoffgehalt wurde nicht explizit bestimmt, da aber die Proben mit Wasser aus einer Charge synthetisiert und gereinigt und unter gleichen Bedingungen gelagert wurden, sind starke Abweichungen sehr unwahrscheinlich. Die Experimente wurden grundsätzlich wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu testen. Diese war in allen Experimenten gegeben. Das oxidative Ätzen der AuNP12@PEGx Konjugate wurde in Gegenwart von 10 mM, 25 mM und 100 mM Cyanid spektroskopisch verfolgt. Der pH-Wert der Lösungen kann durch die Cyanidzugabe bis zu einem Wert von ~10 steigen. Eine Destabilisierung der AuNP12@PEGx-Konjugate bei pH 10 (eingestellt durch NaOH-Zugabe) im Zeitraum der Ätzexperimente wurde in Kontrollexperimenten nicht beobachtet. Ein Grund für eine solche Destabilisierung könnte die Hydrolyse der Esterbindungen sein, über die PEG-Reste und Spacer verknüpft sind.

Abbildung 2.23 zeigt Absorbanzspektren, die von AuNP12@PEGMUA, AuNP12@-PEGMPAA und AuNP12@PEGMPA während des oxidativen Ätzens mit 100 mM Cyanid aufgenommen wurden und die Auswertung der Experimente durch Auftragen der SPB-Absorbanz gegen die Zeit.



Abb. 2.24: In situ-Verfolgung des oxidativen Ätzens von AuNP-Konjugaten (Links) Schematische Darstellungen und Absorbanzspektren von AuNP12@PEGMUA (oben) in 5 Minuten-Intervallen aufgenommen ($\Delta t = 5 \text{ min}$), von AuNP12@PEGMPAA (Mitte, $\Delta t = 2 \text{ min}$) und von AuNP12@-PEGMPA (unten, $\Delta t = 2 \text{ min}$) nach Einstellen einer KCN-Konzentration von 100 mM. Die ersten Spektren (schwarze Linien) wurden vor der KCN-Zugabe aufgenommen, um die Partikelkonzentration zu überprüfen. (Rechts) Absorbanzmaxima der SPR-Bande (SPB absorbance, für diese Proben bei 524 nm) aufgetragen gegen die Reaktionszeit der Ätzreaktion. AuNP12@PEGMPA (blaue Dreiecke und Linien) und AuNP12@PEGMPAA (grüne Kreise und Linien) waren innerhalb von 4 Minuten komplett aufgelöst, während AuNP12@PEGMUA (rote Quadrate und Linien) selbst nach 20 Stunden noch nicht vollständig aufgelöst waren. Im Inset sind dieselben Daten auf einer logarithmischen Skala gezeigt. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* 2013, 29, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Wie die Titrationen mit Cyanidlösung zeigen diese Experimente die außerordentlich hohe Stabilität der Konjugate AuNP12@PEGMUA. Während AuNP12@PEGMPAA und AuNP12@PEGMPA bereits nach 4 Minuten vollständig aufgelöst waren, war dies bei AuNP12@PEGMUA erst nach etwa 23 Stunden der Fall. Proben, die in Gegenwart von freiem Ligand sechs Monate gelagert wurden, bevor sie unter gleichen Bedingungen gereinigt und geätzt wurden, waren stabiler, zeigten aber denselben Stabilitätstrend und denselben drastischen Unterschied der Stabilität von AuNP12@PEGMUA (Abb. 2.25).



Abb. 2.25: Ätzkinetiken von gealterten AuNP-Konjugaten. Absorbanz bei 450 nm als Funktion der Reaktionszeit der Ätzreaktion (100 mM KCN) der gealterten Proben AuNP12@PEGMPA (blaue Dreiecke und Linie), AuNP12@PEGMPAA (grüne Kreise und Linie) und AuNP12@PEGMUA (rote Quadrate und Linie) auf einer logarithmischen Skala. Die Proben waren 6 Monate in Gegenwart von freiem Liganden gealtert, bevor sie gereinigt und anschließend den Ätzexperimenten unterzogen wurden. Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus SI zu Schulz *et al. Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die höhere Stabilität könnte auf die längere Reaktionszeit zurückzuführen sein, in der sich eine geordnetere Ligandenhülle, in Analogie zu SAMs, ausbilden kann. Bei diesen Proben zeigte sich auch ein stärkerer Unterschied der Stabilität von AuNP12@PEGMPA und AuNP12@PEGMPAA.

Der Stabilitätsunterschied dieser Konjugate war in Experimenten mit frischen Proben und niedrigeren Cyanidkonzentrationen, z.B. 25 mM, ebenfalls deutlicher (Abb. 2.26). Bei dieser Konzentration wurde die Probe AuNP12@PEGMUA innerhalb der Dauer des Experiments nicht vollständig aufgelöst. In Übereinstimmung mit den Titrationsexperimenten war in allen Experimenten die Stabilität von AuNP12@PEGMPAA höher als die von AuNP12@PEGMPA.



Abb. 2.26: Ätzreaktion von AuNP-Konjugaten mit 25 mM KCN. SPB-Absorbanz als Funktion der Reaktionszeit der Ätzreaktion mit 25 mM KCN der Proben AuNP12@PEGMPA (blaue Dreiecke), AuNP12@PEGMPAA (grüne Kreise) und AuNP12@PEGMUA (rote Quadrate). AuNP12@PEGMUA wurden nicht vollständig aufgelöst (verfolgt bis 1430 min). Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* 2013, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Einfluss der Partikelgröße

Der Stabilitätstrend AuNP12@PEGMUA >> AuNP12@PEGMPAA > AuNP12@-PEGMPA wurde auch mit größeren AuNP gefunden. Abbildung 2.27 zeigt die Ergebnisse von Ätzexperimenten mit AuNP30@PEGx-Konjugaten.



Abb. 2.27: Ätzreaktion mit 30 nm AuNP-Konjugaten. SPB-Absorbanz als Funktion der Reaktionszeit der Ätzreaktion (100 mM KCN) der Proben AuNP30@PEGMPA (blaue Dreiecke und Linie), AuNP30@PEGMPAA (grüne Kreise und Linie) und AuNP30@PEGMUA (rote Quadrate und Linie). Das Inset zeigt einen Ausschnitt derselben Daten. Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus SI zu Schulz *et al. Langmuir* 2013, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die Kinetiken dieser Ätzprozesse sind nicht vergleichbar mit denen der kleineren Konjugate, weil die Partikelkonzentrationen sich unterschieden. Generell ist der semiquantitative Vergleich von Ätzexperimenten mit Partikeln unterschiedlicher Größe schwierig, da nicht klar ist, welcher Parameter die Kinetik dominiert: die Konzentration der Partikel, deren Oberfläche, oder deren Volumen. Die durchgeführten Ätzexperimente zeigen, dass die Durchdringung der Ligandenhülle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Ätzprozesses ist, denn citratstabilisierte AuNP werden durch Cyanid innerhalb kurzer Zeit (1-2 Minuten) vollständig aufgelöst, auch bei vergleichsweise niedrigen Cyanidionenkonzentrationen (5 mM) und unabhängig von der Partikelgröße oder -konzentration, solange ein Cyanidionenüberschuss verwendet wird. Vor diesem Hintergrund erscheint der Vergleich von Proben mit derselben Gesamtoberfläche am sinnvollsten, da diese am besten die zu durchdringende Ligandenhülle quantifiziert. In entsprechenden Experimenten müsste dann über eine geringere Konzentration größerer Partikel die Oberfläche konstant gehalten werden. Ein solcher Ansatz vernachlässigt allerdings den Einfluss der niedrigeren Konzentration der größeren Partikel und ihrer langsameren Diffusion auf die Kinetik. Andererseits haben größere Partikel eine höhere Querschnittsfläche, was wiederum die Stoßwahrscheinlichkeit erhöhen und den Ätzprozess beschleunigen könnte. Die Komplexität des Ätzprozesses macht also die Interpretation von Experimenten mit AuNP unterschiedlicher Größe schwierig und dementsprechend vorsichtig sind die Daten zu interpretieren. In Vorversuchen konnte im Größenbereich 10-40 nm kein eindeutiger Trend für den Zusammenhang von Partikelgröße und Stabilität gefunden werden.

Interpretation der Stabilitätsunterschiede in Abhängigkeit vom Spacer

In Abschnitt 2.4.2.5 wurde bereits angesprochen, dass PEGMUA aus geometrischen Gründen eine höhere Bedeckungsdichte als bei direkt gebundenem PEG erlaubt. In einem einfachen Modell kann der MUA-Spacer als zusätzliche "Schale" auf dem Partikel aufgefasst werden, wodurch dessen Oberfläche vergrößert wird und entsprechend mehr PEG-Ketten untergebracht werden können. Diesem Modell folgend ist es einleuchtend, dass die Stabilität der Konjugate von der Dicke dieser Schale, bzw. der Länge des Spacers, abhängt und dieser Zusammenhang wurde auch gefunden. Abbildung 2.28 zeigt schematisch die Oberflächenstrukturen von PEGMPA, PEGMPAA und PEGMUA auf Goldoberflächen mit Abschätzungen der Spacerlänge.



Abb. 2.28: Struktur der untersuchten Spacer. Ausschnitte der Ligandenstrukturen von PEGMUA, PEGMPA und PEGMPAA als Kugel-Stab-Modelle an einer Goldoberfläche mit Abschätzungen der Spacerlänge. Auch wenn die tatsächliche Struktur und Dicke der Spacerschicht von dieser Darstellung abweichen kann, wird deutlich, dass PEGMUA die dicksten Spacerschichten ausbilden kann. Die Stabilität gegen oxidatives Ätzen mit Cyanid korrelierte in allen Experimenten mit der Länge der Spacer.

Die Länge des Spacers nimmt in der Reihe PEGMPA < PEGMPAA < PEGMUA zu, ebenso wie die Stabilität der entsprechenden Konjugate: AuNP12@PEGMPA < AuNP12@-PEGMPAA << AuNP12@PEGMUA. Abgesehen davon, dass sie aus geometrischen Gründen eine höhere Bedeckungsdichte ermöglicht, stellt die hydrophobe Spacerschicht eine physikalische Barriere für die Cyanidionen dar. Ebenfalls erwähnt wurde die thermodynamische Stabilisierung durch Spacer-Wechselwirkungen; während die Monomer-Wechselwirkungen der hydrophilen PEG-Ketten in Wasser repulsiv sind, sind die Van-der-Waals-Wechselwirkungen der hydrophoben Spacer in Wasser attraktiv. Dies begünstigt energetisch eine höhere Bedeckungsdichte und die, auch entropisch ungünstigere, brush-Konformation der PEG-Ketten. Wenn von einer Analogie zu SAMs auf planaren Substraten ausgegangen werden kann, was einige Studien nahelegen,^{121,117,244} dann dürfte auch der Ordnungsgrad der Spacer MPA, MPAA und MUA sich unterscheiden, denn während Aromaten und langkettige *n*-Alkanthiolate hochgeordnete SAMs auf Gold bilden können, ist dies bei kurzkettigen Alkanthiolaten nicht der Fall. Die Ordnung der Alkylketten bzw. Aromaten bewirkt zunächst eine zusätzliche thermodynamische Stabilisierung,^{245,47} da die Vander-Waals-Kontakte bzw. π - π -Wechselwirkungen zwischen den Spacern optimiert sind, sie geht außerdem mit einer geringeren Zahl von Defektstellen in der Ligandenhülle einher.⁴⁸

Ligandenhüllen mit längeren Spacern sind also thermodynamisch stabiler, sie erlauben eine höhere Bedeckungsdichte, haben vermutlich weniger Defekte und bilden eine dickere hydrophobe innere Schicht in den Konjugaten aus. Der MUA-Spacer ist länger als der MPAA-Spacer und sterisch weniger anspruchsvoll und kann daher prinzipiell dichtere Ligandenhüllen ausbilden und eine dickere hydrophobe Schicht. Die höhere Stabilität von AuNP12@PEGMUA gegenüber AuNP12@PEGMPAA ist daher zu erwarten, der Effekt ist jedoch bemerkenswert stark.

2.4.3.2 Desorption von Liganden

Da die Konjugate vor den Ätzexperimenten mehrfach zentrifugiert wurden, um alle ungebundenen Liganden zu entfernen, ist auch der Einfluss der Desorption auf die Stabilität der Konjugate zu erwägen. Desorption von Liganden führt zu einer niedrigeren Bedeckungsdichte und mehr Defekten in den Ligandenhüllen und es kann angenommen werden, dass die Desorptionsrate von der Struktur der Liganden abhängt, analog zur Desorption von Alkanthiolaten auf planaren Substraten.⁴⁷ Daher wurde der Einfluss der Desorption mit AuNP12B@PEGx-Konjugaten getestet. Dazu wurden die Konjugate AuNP12B@PEGMPAA (einzähniger Ligand) und AuNP12B@PEGLIP (zweizähniger Ligand) 16-mal zentrifugiert wie im Experimentalteil beschrieben. Nach acht Zentrifugationen wurden die Proben 24 h ruhen gelassen, bevor weitere acht Zentrifugationen durchgeführt wurden. Dann wurde die Stabilität der Proben nach vier Zentrifugationen und nach 16 Zentrifugationen in Gegenwart von 25 mM Cyanid spektroskopisch verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.29 dargestellt.



Abb. 2.29: Untersuchung der Desorption mithilfe der Ätzreaktion. Einfluss von Zentrifugationen auf die Stabilität der Konjugate AuNP12B@PEGLIP (A) und @PEGMPAA (B). Die Reaktion der Konjugate mit 25 mM Kaliumcyanid wurde spektroskopisch verfolgt und ist hier anhand der Abnahme der SPB-Absorbanz dargestellt. Die Konjugate AuNP12B@PEGLIP (A) nach 4 Zentrifugationen (4 Z, orangene Quadrate) und nach 16 Zentrifugationen (16 Z, braune Kreise), wiesen keinen Unterschied in der Stabilität gegen oxidatives Ätzen mit Kaliumcyanid auf. Für die Konjugate AuNP12B@PEGMPAA (B) wurde eine geringfügig schnellere Abnahme der Absorbanz für die 16 mal zentrifugierten Konjugate (dunkelgrüne Dreiecke) im Vergleich zu den viermalig zentrifugierten Konjugate (hellgrüne Kreise) festgestellt, aber ebenfalls keine signifikante Änderung der Stabilität gegen oxidatives Ätzen.

Die Stabilität der Konjugate AuNP12B@PEGLIP gegenüber oxidativem Ätzen wurde durch die Waschschritte nicht beeinflusst. Die zusätzlichen Konjugate AuNP12B@PEGMPAA zeigten nach 16 Zentrifugationen eine leichte Abweichung in der Ätzkinetik, die auf eine geringfügige Destabilisierung hindeuten könnte. Diese Abweichung war zwar reproduzierbar, aber so schwach ausgeprägt, dass sie vorsichtig interpretiert werden muss. Es würde aber intuitiv einleuchten, dass die Desorption eines einzähnigen Liganden und die daraus resultierende Destabilisierung etwas stärker ausgeprägt ist, als die eines zweizähnigen Liganden. Eine signifikante Änderung der Stabilität wurde nicht gefunden, die Zeit bis zur vollständigen Auflösung blieb auch für die Konjugate AuNP12B@PEGMPAA nahezu unverändert. Diese Beobachtung und auch die hohe Langzeitstabilität der gereinigten Konjugate weisen darauf hin, dass die Desorption von Liganden in diesen Konjugaten sehr schwach ausgeprägt ist und wenig Einfluss auf deren Stabilität gegenüber oxidativem Ätzen hat. Diese Interpretation deckt sich mit Studien zur Desorption von Alkanthiolaten aus SAMs auf planaren Substraten.^{49,109} Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass durch die ersten vier Waschschritte durch Zentrifugation einige Liganden aus der Ligandenhülle entfernt werden, die schwach gebunden waren, z.B. wegen einer ungünstigen Struktur der Goldoberfläche an der Bindungsstelle.

2.4.3.3 Untersuchung des Ätzmechanismus mit den AuNP@PEGMUA-Konjugaten

Beim oxidativen Ätzen von AuNP12@PEGMUA mit 25 und 10 mM KCN und AuNP12@PEGMPAA mit 10 mM wurden die Proben innerhalb der Dauer der Experimente (18-24 h) nicht vollständig aufgelöst. Das oxidative Ätzen von AuNP12@PEGMUA und AuNP12@PEGMPAA mit 10 mM wurde über einen längeren Zeitraum spektroskopisch verfolgt, um festzustellen, ob der Ätzprozess langsam voranschreitet, die Ergebnisse sind in Abbildung 2.30 mit den Ergebnissen für AuNP12@PEGMPA bei dieser Cyanidionenkonzentration gezeigt.



Abb. 2.30: Ätzreaktion von AuNP-Konjugaten mit 10 mM KCN. SPB-Absorbanz als Funktion der Reaktionszeit der Ätzreaktion (10 mM KCN) der Proben AuNP12@PEGMPA (blaue Dreiecke), AuNP12@PEGMPAA (grüne Kreise) und AuNP12@PEGMUA (rote Quadrate).

Die Konjugate AuNP12@PEGMPAA waren nach 2150 Minuten (~ 36 h) praktisch vollständig aufgelöst, die Ätzreaktion schritt also langsam weiter voran. Bei den Konjugaten AuNP12@PEGMUA war dies nicht der Fall und die Absorbanz blieb zwischen 2000 (~33 h) und 2870 Minuten (~48 h) näherungsweise konstant. Diese Beobachtung zeigt, dass das exponentielle Abklingen der Ätzreaktion nicht allein auf die sinkende Partikelkonzentration zurückzuführen sein kann (analog einer Reaktion erster, oder pseudo-erster Ordnung), denn die Cyanidkonzentration ist ausreichend, um die vorhandene Partikelkonzentration aufzulösen, wie die Experimente mit schlechter stabilisierten Konjugaten (z.B. AuNP12@-PEGMPA und AuNP@Citrat) zeigen. Es müssen daher zusätzliche kinetische Hemmungen mit zunehmender Reaktionszeit auftreten.

Um das Verständnis des Ätzprozesses zu vertiefen, wurden zusätzliche Experimente mit den Konjugaten AuNP12- und AuNP12B@PEGMUA durchgeführt. AuNP12@PEGMUA wurden mit 10 mM und 25 mM Cyanid versetzt und der Ätzprozess nach 48 h gestoppt indem die Proben stark verdünnt und gereinigt wurden. Die Proben wurden dann mittels TEM und UV/vis-Spektroskopie untersucht (das genaue Vorgehen ist im Experimentalteil beschrieben).



Abbildung 2.31 zeigt die Resultate dieser Experimente und die Ätzkinetiken der AuNP12@PEGMUA-Konjugate bei verschiedenen Cyanidionenkonzentrationen.

Abb. 2.31: Untersuchung der Ätzprozesse von AuNP12@PEGMUA. Reaktion von AuNP12@-PEGMUA (c = 6.4 nM) mit unterschiedlichen Cyanidkonzentrationen. A: SPB-Absorbanz (bei diesen Proben bei 524 nm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von 10 (gestrichelte Linie), 25 (gepunktete Linie) und 100 mM (Punkt-Strich-Linie) Cyanid (KCN). H: Absorbanzspektren dieser Proben und einer Kontrolle (0 mM KCN, durchgezogene Linie) nach 48 h Reaktion mit Cyanid. Die TEM-Analyse der Kontrolle (0 mM KCN, **B**, **C** und **D**), und der Proben, die 48 h mit 10 mM (**E**, **F**, **G**) und 25 mM (**I**, **J**, **K**) KCN reagiert hatten, weist auf eine leichte Abnahme des Durchmessers der AuNP-Hauptpopulation hin. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* **2013**, 29, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die TEM-Aufnahmen können nicht quantitativ interpretiert werden, jedoch sind deutliche Unterschiede in der Beschaffenheit der Proben mit zunehmender Cyanidionenkonzentration erkennbar. Insbesondere war deutlich mehr amorphes Material in den geätzten Proben, bei dem es sich um Au-Cyanid-Komplexe, freigesetzte Liganden und weitere Reaktionsprodukte handeln dürfte. Die statistische Auswertung der TEM-Aufnahmen belegt eine leichte Abnahme des mittleren Durchmessers der Hauptpopulation um etwa einen Nanometer, außerdem wurde eine Nebenpopulation kleinerer Partikel in den geätzten Proben gefunden. Die Partikelkonzentrationen konnten anhand der UV/vis-Spektren bestimmt werden, die nach 48 h Reaktion aufgenommen wurden (**H** in Abb. 2.31). Bei der Berechnung der Konzentrationen nach der Methode von Haiss *et al.*⁸⁸ wurden die veränderten Durchmesser, die aus der TEM-Auswertung erhalten wurden, berücksichtigt. Je nachdem, ob die mittleren Durchmesser oder die Erwartungswerte der Gauß-Verteilungen geben besser die mittleren Durchmesser der Hauptpopulation wieder und wurden daher verwendet. Die resul-

tierenden Konzentrationen betrugen 4.5 nM (nach 48 h Reaktion mit 10 mM KCN) und 3.1 nM (nach 48 h Reaktion mit 25 mM KCN).

Das oxidative Ätzen der AuNP-Konjugate kann also auf zwei Arten erfolgen: durch sukzessives Auflösen von ganzen Partikeln, das mit einer Abnahme der Konzentration einhergeht oder durch simultanes Auflösen aller Partikel, das eine Abnahme des durchschnittlichen Durchmessers zur Folge hat. Offenbar spielen beide Mechanismen in den gezeigten Experimenten eine Rolle. Der Konzentrationsverlust entspricht vollständig aufgelösten Partikeln und aus der Abnahme des Durchmessers der verbleibenden Hauptpopulation kann abgeschätzt werden, wie viel Gold von den Oberflächen der Partikel durch simultanes Auflösen entfernt wurde. Unter Annahmen der Sphärizität und mit der Dichte von Gold ($\rho = 19.32 \text{ g/cm}^3$) ergibt sich, dass bei der Reaktion mit 10 mM Cyanid ~66 % des Goldes durch Auflösen vollständiger Partikel und ~33 % durch simultanes Auflösen aller Partikel komplexiert wurde. Unter der Annahme, dass nur Dicyanoaurat entsteht, geschah dies unter Verbrauch von ~2.8 % der vorhandenen Cyanidionen. Bei der Reaktion mit 25 mM Cyanid wurde ~80 % des Goldes durch Auflösen vollständiger Partikel und ~20 % durch simultanes Auflösen aller Partikel unter Verbrauch von 1.6 % der vorhandenen Cyanidionen komplexiert. Der Mechanismus des Auflösens vollständiger Partikel scheint also mit zunehmender Cyanidkonzentration bedeutender zu werden.

Ein vereinfachendes Modell, um diese Beobachtungen zu erklären, ist die Konkurrenz der Reaktionen von Liganden und von Cyanidionen an der Oberfläche der AuNP (Abbildung 2.32).

Die anfängliche Ätzrate (Geschwindigkeit der Ätzreaktion) hängt von der Beschaffenheit der Ligandenhülle, z.B. der Zahl der Defekte darin, und ihrer Struktur ab. Unter der Annahme, dass die Reaktion ausschließlich Dicyanoaurat, früher oder später freie Liganden (und nicht etwa gemischte oder reine Au-Thiolat-Komplexe) und eine Defektstelle in der Ligandenhülle produziert, kann die Reaktion der freien Liganden an dieser Defektstelle (**B** in Abbildung 2.32) als "Reparatur" der Ligandenhülle aufgefasst werden, die diese restabilisiert. Die Reaktivität an den Defektstellen ist erhöht und daher ist auch die Ätzrate an diesen Stellen höher, wenn keine solche "Reparatur" stattfindet.



n [Au(CN)₂]⁻

Abb. 2.32: Vereinfachter Ätzmechanismus. Vereinfachendes Modell zur Illustration der konkurrierenden Prozesse während des oxidativen Ätzens von AuNP@PEGx-Konjugaten: Reaktion mit Liganden und Reaktion mit Cyanid. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der Struktur der Ligandenhülle ab, wie im Text diskutiert. Die Reaktion mit Cyanidionen (A) führt zu Defektstellen in der Ligandenhülle und setzt gebundene Liganden frei. An der Defektstelle ist das Konjugat besser zugänglich für weitere Reaktionen. Die Reaktion mit freien Liganden (B) restabilisiert die Ligandenhülle und verringert die Reaktivität des Konjugats. Die Reaktion mit weiteren Cyanidionen dagegen führt zu weiterer Destabilisierung und Erhöhung der Reaktivität des Konjugats, das somit mit zunehmender Reaktionsgeschwindigkeit aufgelöst wird. Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* 2013, 29, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Es sind nun zwei Extremfälle vorstellbar. Wenn nach jeder Ätzreaktion eine "Reparatur" stattfände, wäre die Ätzrate für alle Partikel ähnlich und folglich würden alle Partikel simultan aufgelöst und ausschließlich eine Abnahme des durchschnittlichen Durchmessers beobachtet werden (nur **B** in Abbildung 2.32). Wenn dagegen nie "Reparaturen" stattfänden, würden Partikel sehr schnell aufgelöst werden, sobald Defektstellen - also Schwachstellen - in ihrer Ligandenhülle durch Ätzreaktionen produziert wurden, denn die Ätzrate würde für diese Partikel immer weiter zunehmen. In der Summe wäre die Ätzrate für einige Partikel stark erhöht, die dann schnell aufgelöst würden, und es würde eine Abnahme der Konzentration ohne signi-

fikante Änderung des Durchmessers beobachtet werden (nur C in Abbildung 2.32). Die durchgeführten Experimente legen nahe, dass tatsächlich beide Prozesse stattfinden. Die Konzentration von freien Liganden nimmt im Laufe der Ätzreaktion zu, während die Cyanidkonzentration leicht abnimmt und daher wird die Ligandenreaktion bzw. "Reparatur" dominanter und kann schließlich die Ätzreaktionen kinetisch komplett hemmen. In solch einem Fall würden die AuNP-Konjugate nicht vollständig aufgelöst werden, oder die Ätzrate würde auf einen sehr geringen Wert abfallen, obwohl die Cyanidkonzentration ausreichend wäre, um alle Partikel aufzulösen. Der Mechanismus ist auch in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Auflösung vollständiger Partikel mit zunehmender Cyanidionen-konzentration dominanter zu werden scheint.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass auch in den geätzten Proben fast alle AuNP sphärisch waren und kaum deformierte oder ausgehöhlte Partikel gefunden wurden. Der Grund dafür könnte die höhere Reaktivität von Goldatomen an Ecken und Spitzen und an Defektstellen sein, sowie die erhöhte Mobilität von Au-Adatomen in Cyano- und Thiolatokomplexen,^{246,108} die Oberflächenrekonstruktionen erlaubt und damit die Beibehaltung der energetisch günstigeren sphärischen Geometrie.

Das beschriebene Modell der Konkurrenz von Ligandenreaktion und Reaktion von Cyanidionen mit der Goldoberfläche wurde durch weitere Experimente überprüft. Insbesondere wurde bereits in Vorversuchen festgestellt, dass das Ätzverhalten von gereinigten und nicht gereinigten Konjugaten sich stark unterscheiden kann. In Abbildung 2.33 A sind die Ergebnisse eines Langzeitexperiments mit AuNP12B@PEGMUA (c = 5.5 nM) gezeigt. Es wurden die Reaktionen einer gereinigten und einer nicht gereinigten Probe, die also freie Liganden und Citrat enthielt, in Gegenwart von 25 mM KCN verglichen. Die Reaktionen wurden insgesamt ~67 h bzw. ~90 h spektroskopisch verfolgt und eine deutlich höhere Stabilität der nicht gereinigten Probe festgestellt. Dass Citratmoleküle die Ätzreaktion nicht signifikant hemmen ist aus den Vorversuchen bekannt, so dass die bessere Stabilisierung auf die Anwesenheit von freiem Liganden PEGMUA zurückgeführt werden kann.



Abb. 2.33: Einfluss von freien Liganden auf die Ätzreaktion. Oxidatives Ätzen mit 25 mM KCN von gereinigten (rote Quadrate, $\Delta t = 10$ min) und ungereinigten (cyanfarbene für $\Delta t = 10$ min bis t = 1240 min und dunkel cyanfarbene Dreiecke für $\Delta t = 60$ min für t = 1300-5440 min) Konjugaten AuNP12B@PEGMUA, also in Abwesenheit oder Gegenwart von freiem Liganden PEGMUA (A). Eine Probe der gereinigten Konjugate AuNP12B@PEGMUA wurde nach 67 Stunden Ätzreaktion (c(KCN) = 25 mM) erneut gereinigt, um Cyanid und Reaktionsprodukte inklusive freigesetztem Liganden PEGMUA zu entfernen. Dann wurde die Probe erneut mit Cyanid versetzt (c(KCN) = 25 mM) und die Ätzreaktion spektroskopisch verfolgt (B). Die Reinigung verursachte einen Konzentrationsverlust, daher ist die SPB-Absorbanz am Startpunkt geringer als zu erwarten. Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* 2013, 29, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die gereinigte Probe wurde nach 67 h Reaktion erneut durch mehrfache Zentrifugation gereinigt, um freigesetzte Liganden, Cyanid und weitere Reaktionsprodukte zu entfernen. Durch die Zentrifugationen wurde Konzentration eingebüßt, möglicherweise weil im ersten Zentrifugationsschritt in Gegenwart von Cyanid die Ätzreaktion beschleunigt wurde. Das normierte Absorbanzspektrum war indes unverändert. Diese gereinigten AuNP12B@-PEGMUA wurden erneut mit 25 mM KCN versetzt und die Reaktion spektroskopisch verfolgt. Die Reaktion mit Cyanid war nun wieder deutlich schneller und schritt voran, bis die AuNP vollständig aufgelöst waren (Abb. 2.33 B). Dieses Experiment zeigt, dass in der Tat während der Ätzreaktion freigesetzte Liganden eine Stabilisierung durch kinetische Hemmung der Ätzreaktion bewirken und widerlegt die Vorstellung, dass innerhalb einer AuNP-Probe stark unterschiedlich stabilisierte Populationen vorliegen könnten, von denen nur manche mit Cyanid reagieren.

Zusammenfassend lassen sich aus den Experimenten zum oxidativen Ätzen von AuNP@PEGx-Konjugaten mit Cyanid folgende Schlüsse ziehen: Die Kinetik der Ätzreaktion hängt sehr stark von der Struktur der Ligandenhülle ab, insbesondere nahe der AuNP-Oberfläche, wo diese durch die Spacer, bzw. die Struktur nahe der bindenden Thiolgruppe, definiert wird. Die Geschwindigkeit der Ätzreaktion hängt zudem nicht nur von der Cyanidionenkonzentration ab, sondern auch von der Konzentration freier Liganden. Wenn die Geschwindigkeit der Ätzreaktion niedrig ist, weil eine gut stabilisierende Ligandenhülle der Konjugate vorliegt, kann sie kinetisch so stark gehemmt werden, dass keine vollständige Auflösung stattfindet. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die Konkurrenz von Ätzreaktion und Reaktion freier Liganden mit der Goldoberfläche. Der überwiegende Teil der AuNP@PEGx-Konjugate scheint während der Ätzreaktion sphärisch zu bleiben und bei unvollständig geätzten Proben scheint die Polydispersität der Hauptpopulation abzunehmen.

2.4.3.4 Stabilität der AuNP@PEGx-Konjugate gegen DTT-induzierte Aggregation

Auswertung der Aggregationsexperimente

Die Änderungen der optischen Eigenschaften von AuNP durch Aggregation sind meist komplexer, als die beim Auflösen der AuNP durch oxidatives Ätzen. Das Auflösen bewirkt bei den hier studierten Konjugaten lediglich eine Abnahme der Absorbanz durch den Konzentrationsverlust und teilweise eine Verschiebung der SPB um wenige Nanometer. Die Kinetik der Auflöseprozesse kann daher gut durch Auftragen der SPB-Absorbanz oder der Absorbanz bei 450 nm gegen die Zeit dargestellt werden. Im Gegensatz dazu bewirken die Dipol-Wechselwirkungen in AuNP-Aggregaten eine starke Verschiebung des Absorbanzmaximums zu höheren Wellenlängen, typischerweise in den Bereich von 600-800 nm.⁴³ Außerdem nimmt bei den meisten Aggregationsprozessen die Polydispersität der Probe stark zu, was eine Verbreiterung der SPB bewirkt. Wenn sowohl eine Population von Aggregaten, als auch eine nicht-aggregierter Partikel in einer Probe vorliegt, kann das Absorbanzspektrum diese Mischung widerspiegeln und zwei Peaks aufweisen. Schließlich ist auch die Aggregation mit einer Konzentrationsabnahme verbunden, durch die Aggregate sinkt deren Konzentration. Beide Prozesse resultieren in einer Abnahme der Absorbanz.

Um die Kinetiken von Aggregationsprozessen auszuwerten, wurden verschiedene Ansätze vorgeschlagen, z.B. die Verwendung der von 600-800 nm integrierten Absorbanzen,⁹¹ oder die des Quotienten aus Absorbanz bei 615 nm und der Absorbanz bei der SPB-Wellenlänge der nicht aggregierten Probe, die meist bei 524-527 nm liegt.¹²⁴ Die Verwendung der Integrale berücksichtigt allerdings nicht die Sedimentation, d.h. der darüber definierte Aggregationsparameter sinkt, sobald Konzentrationsverlust durch Sedimentation die Entwicklung des Absorbanzverhaltens dominiert. Der Quotient der Absorbanz bei 615 nm und ~524 nm wird von den Autoren als Aggregationsfaktor (AF) bezeichnet. Wie gut der AF die Aggregation beschreibt, hängt davon ab, wie nahe das Absorbanzmaximum der Aggregate an 615 nm liegt. Ist es deutlich zu höheren Wellenlängen verschoben, so kann der AF ebenfalls sinken,

nachdem er ein Maximum durchlaufen hat. Als zusätzliche Möglichkeit der Auswertung von Aggregationsprozessen wurde in dieser Studie die Lage bzw. Wellenlänge des Absorbanzmaximums (SPB peak position) gegen die Zeit aufgetragen (SPB(t)).

Abbildung 2.34 zeigt eine repräsentative Auswahl aus den 240 Absorbanzspektren, die in zweiminütigen Abständen von den jeweiligen Proben aufgenommen wurden. Gezeigt sind die Aggregationen von AuNP12@PEGMUA, AuNP12@PEGMPA und AuNP12@PEGMPAA in Gegenwart von 1 M DTT und 400 mM NaCl. Die Auswertungen durch Auftragung des AF gegen die Zeit AF(t) und der Verschiebung der SPB gegen die Zeit, SPB(t), sind ebenfalls in Abbildung 2.34 gezeigt. Obwohl diese Ansätze zur Auswertung grundsätzlich verschieden sind, zeigen die Verläufe eine gute Übereinstimmung.



Abb. 2.34: Analyse der DTT-induzierten Aggregationen. (Links) Absorbanzspektren der Konjugate AuNP12@PEGMUA (A), AuNP12@PEGMPA (B) und AuNP12@PEGMPAA (C) in Gegenwart von 1 M DTT und 400 mM NaCl. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine Auswahl der jeweils 240 Spektren ($\Delta t = 2$ min) gezeigt. (Rechts) Auswertung dieser Experimente durch Auftragung der Position des Absorbanzmaximums (SPB peak position, oben) oder des Aggregationsfaktors (AF, unten) gegen die Zeit. AuNP12@PEGMUA (rote Quadrate und Linien), AuNP12@PEGMPA (blaue Dreiecke und Linien) und AuNP12@PEGMPAA (grüne Kreise und Linien). Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* 2013, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Die Auftragungen der SPB(t) haben gegenüber den AF(t) den Vorteil, dass auch die maximale Verschiebung der SPB sich für die Proben unterscheidet und nicht nur die Geschwindigkeit der Verschiebung. Je schneller die Verschiebung stattfindet, desto höher ist auch die maximale Verschiebung. Dieses Verhalten weist auf die Details des Aggregationsprozesses hin, dessen Kinetik durch die Geschwindigkeit der Aggregatbildung und die Sedimentationsrate bestimmt wird. Durch Entstehung neuer und Wachstum ggf. vorhandener Aggregate wird die Konzentration einzelner AuNP verringert, so dass deren SPB schwächer wird, während die SPB der Aggregate das optische Verhalten der Probe zunehmend dominiert, begleitet von einer Verbreiterung des Spektrums durch die zunehmende Polydispersität. Die Sedimentationsrate nimmt mit der Masse der Aggregate zu und mit höherer Sedimentationsrate sinkt die Zahl detektierbarer Aggregate schneller. Wenn die Aggregationsgeschwindigkeit hoch ist im Vergleich zur Sedimentationsrate, bildet sich eine höhere Konzentration von Aggregaten, als im umgekehrten Fall, und die Aggregate werden im Durchschnitt größer, bevor sie sedimentieren. Dies resultiert in einer Rotverschiebung zu höheren Wellenlängen innerhalb kürzerer Zeit. Insofern ähnelt die Aggregationskinetik der Kinetik einer Folgereaktion, mit der "Reaktion" zu Aggregaten mit der Geschwindigkeitskonstanten k(Agg) und dem "Verbrauch" der Aggregate durch die Sedimentation mit der Geschwindigkeitskonstanten *k*(Sed). In Abbildung 2.35 sind verschiedene Fälle modelliert.



Abb. 2.35: Analogie der Kinetiken von Aggregation und Folgereaktion Modellierte Aggregationskinetiken für die Fälle k(Agg) = 10 k(Sed) (rote Linie), $k(Agg) \sim k(Sed)$ (violette Linie) und k(Agg) = 1/10 k(Sed) (blaue Linie). Genaugenommen wird die Aggregation zu Aggregaten einer Größe modelliert, da k(Sed) von der Größe der Aggregate abhängt. Der realistische Aggregationsprozess würde dann durch eine Menge von Einzelprozessen mit $k(Agg)_i$ und $k(Sed)_i$ beschrieben, die sich qualitativ jedoch nicht unterscheiden. Da k(Sed) mit der Größe der Aggregate zunimmt, folgt, dass bei höheren Aggregationsraten auch höhere Konzentrationen größerer Aggregate erhalten werden, und damit die maximale Größe der Aggregate in Lösung zunimmt.

Da alle getesteten Konjugate mit denselben Partikeln, AuNP12, synthetisiert wurden, ist die Sedimentationsrate, bzw. die jeweiligen $k(Sed)_i$ für Aggregate gleicher Größe, für alle

Proben gleich. Die Verschiebung der SPB in Abhängigkeit von der Zeit bietet so ein vergleichbares Maß für die Aggregationsrate dieser Proben. Mit dem AF wird über die jeweiligen SPB-Absorbanzen die Konzentration der Aggregate in Relation zur Konzentration einzelner AuNP gesetzt. Eine echte quantitative Analyse der Aggregationsprozesse ist allerdings weder mit der SPB(t) noch mit dem AF(t) möglich, weil die genaue Größe, Morphologie, Zahl und insbesondere die optischen Eigenschaften der Aggregate nicht verfolgt oder modelliert werden können. Nichtsdestotrotz stimmen SPB(t) und AF(t) gut überein und ermöglichen die semiquantitative Darstellung der Aggregationskinetiken und Unterscheidung der verschiedenen AuNP12@PEGx-Konjugate.

Die Wendepunkte der erhaltenen Kurven SPB(t) und AF(t) reduzieren die Daten auf einen einzelnen Punkt und ermöglichen den schnellen Vergleich der verschiedenen Proben (Tabelle 2.2).

| Ligand | Wendepunkt SPB(t) (t [min]) | Wendepunkt AF(t) (t [min]) |
|---------|--------------------------------|-------------------------------|
| PEGMPAA | 14 | 8 |
| PEGMPA | 48 | 14 |
| PEGMUA | 214 | 184 |

Tabelle 2.2: Wendepunkte der Auftragungen SPB(t) und AF(t)

Stabilitätstrend der AuNP12@PEGx-Konjugate

Die SPB(t)-Kurven haben einen sigmoidalen Verlauf, der bei den AF(t)-Kurven schwächer ausgeprägt ist. Die Wendepunkte der AF(t)-Kurven liegen bei niedrigeren Werten, zeigen aber denselben Trend. Die AuNP12@PEGMUA-Konjugate waren am stabilsten gegen gefolgt AuNP12@PEGMPA DTT-induzierte Aggregation, von und schließlich AuNP12@PEGMPAA. Die deutlich höhere Stabilität der Probe AuNP12@PEGMUA ist im Einklang mit den Ergebnissen der Experimente zum oxidativen Ätzen mit Cyanid. Die Stabilität der AuNP12@PEGMPA gegen DTT-induzierte Aggregation ist dagegen höher als die von AuNP12@PEGMPAA, im Gegensatz zu den Ätzexperimenten. Die Stabilität gegen die verwendete Salzkonzentration von 400 mM im Zeitraum der durchgeführten Experimente ist für alle untersuchten Konjugate gegeben, wie in Abbildung 2.22 gezeigt wurde. Die Aggregation kann daher eindeutig auf die kompetitive Adsorption von DTT zurückgeführt werden. Die geringere Stabilität von AuNP12@PEGMPAA weist daher darauf hin, dass die aromatische Au-S-Bindung schwächer ist. Ein weiterer Grund könnten die strukturellen Unterschiede der Ligandenhüllen sein. Während SAMs aliphatischer Thiolate durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen bestimmt werden, dominieren in SAMs von aromatischen Thiolen deren elliptischer Querschnitt und π - π -Wechselwirkungen die Struktur und führen zu einer Fischgräten-Struktur (engl.: herringbone), in der die aromatischen Ringe in T-Form zueinander versetzt sind.^{245,48} Während beim oxidativen Ätzen mit Cyanidionen die Dicke der inneren hydrophoben Schicht als ausschlaggebend für die Stabilisierung angenommen wird, könnte für die größeren und ungeladenen DTT-Moleküle die sterische Hinderung wichtiger sein. Chen *et al.* wiesen zudem auf den Einfluss von Ladung und Polarität der Ligandenhülle auf die Stabilisierung von AuNP-Konjugaten gegen kompetitiven Austausch hin.²⁴⁷

Die Experimente zur DTT-induzierten Aggregation unterstreichen den wichtigen Punkt, dass die Stabilität von AuNP-Konjugaten sich in Abhängigkeit vom Destabilisierungsmechanismus und der destabilisierenden Spezies (hier: Cyanid oder DTT) unterscheiden kann. Daraus resultiert eine zusätzliche Möglichkeit, Ligandenhüllen zu differenzieren und zu charakterisieren. Außerdem kann die Methodik in zukünftigen Studien auch zum Studium komplexerer Ligandenhüllen genutzt werden, um diese besser zu verstehen.

Besonders wichtig und auffällig ist, dass die AuNP12@PEGMUA auch gegenüber der DTT-induzierten Aggregation eine besonders hohe Stabilität zeigten. Die Gründe dafür wurden im Zusammenhang mit den Ergebnissen zum oxidativen Ätzen diskutiert: eine thermodynamisch und geometrisch begünstigte höhere Bedeckungsdichte, die dickere innere hydrophobe Schicht und möglicherweise die hohe Ordnung bzw. Pseudokristallinität der Alkylketten. Einige Studien lieferten Hinweise auf die gute Stabilisierung durch MUA- oder vergleichbare Spacer. So ist aus Studien zu SAMs auf planaren Substraten,^{48,240} und auf MPCs^{118,122} bekannt, dass MUA und verwandte Liganden, z.B. Oligoethylenglykole niedriger Molmasse mit MUA als Spacer,²⁴⁸ eine hohe Stabilisierung bewirken können und ebenso ist die Struktur von MUA auf solchen Substraten durch diese und weitere Studien sehr gut verstanden. Diese Erkenntnisse wurden in der Vergangenheit allerdings wenig auf größere PEGylierte AuNP übertragen. Gründe dafür mögen abweichende Schwerpunkte und Zielsetzungen der Studien sein, aber auch, dass Liganden wie MUA oder (11-Mercaptoundecyl)tetra(etyhlenglykol) (EG₄MUA) kommerziell erhältlich sind. Dies gilt auch für viele PEG-Thiol-Liganden, allerdings ist die Auswahl deutlich eingeschränkter, und die hier studierten Liganden sind, soweit bekannt, nicht kommerziell erhältlich, außer möglicherweise als Auftragssynthese, und bisherige literaturbekannte Synthesen, wenn vorhanden, waren vergleichsweise aufwändig²⁴⁰ (Die hier beschriebene Synthese von PEGMUA wurde erstmalig 2011 in einer Studie publiziert, in der es zur Stabilisierung von Quantenpunkten

genutzt wurde¹⁸⁹). Einige aktuelle Studien unterstreichen die Wichtigkeit der Spacerstruktur. Z.B. konnten Maus *et al.*²⁴² zeigen, dass die Kontrolle bei der Konjugation von Peptiden durch Verwendung eines C₁₁-Alkylspacers verbessert werden kann und Simpson *et al.*²⁴⁹ stellten Unterschiede in der Immunantwort auf MPCs fest, die mit (Mercapto)tetra(etyhlenglykol) (EG₄SH) oder EG₄MUA funktionalisiert waren. Larson *et al.* konnten zeigen, wie durch Verwendung eines MUA-Spacers Proteinadsorption und Phagozytose stark reduziert wird,²⁵⁰ was die Bedeutung des Spacers für biologische Anwendungen bestätigt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie²¹⁷ ist die Erste, die systematisch den Einfluss des Spacers auf die physikochemische Stabilität PEGylierter AuNP untersucht hat. Die Ergebnisse belegen, dass der Einfluss des Spacers wichtiger ist als z.B. der der Polymerlänge (solange eine Mindestlänge gegeben ist, s. Abschnitt 2.4.2.5 und wie der Spacer die Stabilisierung durch längere PEG-Ketten unterstützen kann. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass nur MUA als Ligand keine vergleichbare Stabilisierung der AuNP in wässriger Lösung bewirkt, dass also eine ausreichend lange PEG-Einheit für eine effektive Stabilisierung benötigt wird.

In ergänzenden Experimenten wurde die Stabilisierung durch den zweizähnigen Liganden PEGLIP mit der durch PEGMUA verglichen. Diese werden im Folgenden beschrieben.

2.4.3.5 Vergleich von PEGMUA mit dem zweizähnigen Liganden PEGLIP

In ergänzenden Experimenten sollte die Stabilisierung von AuNP gegen oxidatives Ätzen und DTT-induzierte Aggregation durch PEGLIP getestet werden, um sie mit der Stabilisierung durch PEGMUA zu vergleichen. PEGLIP konnte ebenso wie PEGMUA durch direkte Veresterung erhalten werden und für die Experimente wurde PEGLIP mit PEGMM derselben Charge ($M_w \sim 2000$ g/mol) synthetisiert. Abbildung 2.36 zeigt die Ergebnisse der Stabilitätsexperimente. AuNP12B@PEGLIP zeigten eine deutlich höhere Stabilität gegen DTTinduzierte Aggregation (Wendepunkt des AF(t) bei 508 min), wurden in Gegenwart von 25 mM Cyanid aber innerhalb von ~300 Minuten vollständig aufgelöst und waren damit deutlich schlechter gegen oxidatives Ätzen stabilisiert als AuNP12@PEGMUA und AuNP12B@PEGMUA.



Abb. 2.36: Stabilisierung von AuNP durch PEGLIP. Die Konjugate AuNP12B@PEGLIP wurden in Gegenwart von 25 mM KCN innerhalb von etwa 300 Minuten vollständig aufgelöst (braune Quadrate). Der AF(*t*) dieser Konjugate (orangene Kreise) in Gegenwart von 1 M DTT und 330 mM NaCl zeigt deren deutlich höhere Stabilität gegen kompetitiven Austausch im Vergleich zu Konjugaten mit einzähnigen PEG-Liganden. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908; Copyright (2013) American Chemical Society.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Mei *et al.*¹²⁴ überein, die ähnliche Experimente mit Liganden durchgeführt haben, die strukturell (Amid- statt Ester-Verknüpfung, C₅- statt C₁₀-Spacer im einzähnigen Thiolat) und hinsichtlich der PEG-Kettenlänge ($M_w \sim 750$ g/mol anstelle von 2000 g/mol) nur leichte Unterschiede zu den hier verwendeten aufwiesen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellungen von der molekularen Struktur der Ligandenhülle: PEGMUA kann einfacher Ligandenhüllen höherer Dichte ausbilden, als das sterisch anspruchsvollere PEGLIP und die innere hydrophobe Schicht kann in der PEGMUA-Ligandenhülle als dicker angenommen werden. Dementsprechend ist die Reaktion von Cyanidionen mit den AuNP@PEGMUA-Konjugaten langsamer, weil sie nur davon abhängt, wie gut die Goldoberfläche erreichbar ist. Andererseits hängt der kompetitive Austausch durch DTT von der Bindungsstärke der Ankergruppen ab und diese ist aufgrund des Chelat-Effektes für zweizähnige Ankergruppen höher. Dementsprechend sind die AuNP@PEGLIP-Konjugate stabiler gegenüber DTT-induzierter Aggregation als die AuNP@PEGMUA-Konjugate.

2.4.4 Fazit zu Kapitel 2

Die durchgeführten systematischen Experimente zum Zusammenhang von Struktur der PEG-Liganden und ihrer stabilisierenden Wirkung zeigen die große Bedeutung der Struktur nahe der bindenden Ankergruppe, des Spacers, und sollen das Design und die Synthese von PEG-Liganden unterstützen, die AuNP-Konjugate optimal stabilisieren. Darauf aufbauend können Konjugate mit verbesserten Eigenschaften für medizinische und biologische Anwendungen entwickelt werden. Im letzten Kapitel dieser Arbeit wird z.B. eine Studie vorgestellt, in der PEGMUA erfolgreich als stabilisierender Ligand in gemischten Ligandenhüllen eingesetzt wurde.

Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse scheint die Kombination vieler Ankergruppen mit langen Spacerketten in einem Liganden für eine hohe Stabilität optimal, denn dadurch würde eine hohe chemische Stabilität gegen Ligandenaustausch mit einer dichten Packung, hoher Ordnung und erhöhten Dicke einer inneren hydrophoben Schicht vereint werden. Idealerweise sollte die Ligandensynthese zudem einfach, zuverlässig und kostengünstig sein und der Ligand sollte nicht toxisch und stabil unter biologisch relevanten Bedingungen sein. Ansätze für vielzähnige Liganden werden auch durch die Forschung an SAMs auf planaren Substraten stimuliert²³⁵ und in den letzten Jahren wurden bereits einige vielzähnige Liganden für die Stabilisierung von Nanomaterialien vorgeschlagen.^{191,187,192}

Auch die im Arbeitskreis Weller entwickelte Micellenstrategie auf Basis von Poly(isopren)-*block*-poly(ethylenoxid)^{233,234,184} folgt im Prinzip einer solchen Strategie, denn durch Quervernetzung der inneren, hydrophoben, Poly(isopren)-einheiten, wird hier eine bessere Stabilisierung, in Analogie zur Vielzähnigkeit, erreicht.

Die Eignung eines Liganden hängt immer von der gewünschten Anwendung der Konjugate und der Kopplungsstrategie ab; für die Entwicklung maßgeschneiderter Biokonjugate jedoch sind auch Studien wichtig und nützlich, die auf Grundlage solider experimenteller Daten zum verbesserten Verständnis der Zusammenhänge von Ligandenstruktur und Stabilisierung beitragen.

Die Experimente zum oxidativen Ätzen von AuNP betreffend, weisen die Ergebnisse stark darauf hin, dass konkurrierende Ligandenreaktionen den Ätzprozess beeinflussen. Auf Basis von TEM- und UV/vis-Analysen wurde ein vereinfachtes Modell für das oxidative Ätzen von AuNP entwickelt. Ein besseres Verständnis dieses Prozesses kann helfen, das Ätzen zu einer leistungsfähigen Methode für das Studium von Ligandenhüllen zu entwickeln. Das Potential dieser Methode wurde durch diese und andere Studien bereits demonstriert. Z.B. könnten über Ätzexperimente einfach Ligandenhüllen mit unterschiedlichen Spacern unterschieden werden, die anhand gängiger Charakterisierungstechniken (DLS, UV/vis, TEM, IR, NMR) kaum zu unterscheiden sind. Denkbar sind aber auch der einfache Nachweis eines vollständigen Ligandenaustausches eines schwach stabilisierenden Liganden gegen einen stark stabilisierenden, oder die Untersuchung gemischter Ligandenhüllen. Möglicherweise kann ein kontrollierter Ätzprozess auch für die Synthese neuartiger komplexer Nanomaterialien oder deren Optimierung genutzt werden.

Kapitel 3

Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit L1-Peptiden

Teile dieses Kapitels sind in übersetzter Form übernommen aus:

Schulz, F.; Lutz, D.; Rusche, N.; Bastus, N. G.; Stieben, M.; Holtig, M.; Gruner, F.; Weller, H.; Schachner, M.; Vossmeyer, T.; Loers, G. Gold Nanoparticles Functionalized with a Fragment of the Neural Cell Adhesion Molecule L1 Stimulate L1-mediated Functions. *Nanoscale* **2013**, *5*, 10605–10617.

mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry, Copyright (2013).

3.1 Einleitung zu Kapitel 3

In diesem Kapitel wird eine medizinische Anwendung von AuNP vorgestellt, die in Kooperation mit der Gruppe von Prof. M. Schachner (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) entwickelt wurde. In dieser Gruppe wurde ein minimales funktionales Fragment des Zelladhäsionsmoleküls L1 identifiziert und untersucht. L1 ist ein Transmembranprotein, das in neurologischen Prozessen eine Rolle spielt, und bei den daraus abgeleiteten Fragmenten handelt es sich um Peptide von 2-3 kDa, die L1-vermittelte Funktionen stimulieren können. In dieser Studie wurden die physikochemischen Eigenschaften der L1-Peptide dadurch verbessert, dass sie in einer gemischten Ligandenhülle auf AuNP mit dem PEG-Liganden PEGMUA kombiniert wurden. Nach Charakterisierung und Optimierung der Konjugate wurden diese in der Gruppe von Melitta Schachner umfangreichen Tests mit primären Neuronen unterzogen, um die biologische Aktivität der Konjugate zu belegen.

In dieser Studie konnten Erkenntnisse zum Einfluss des Mischungsverhältnisses der Ligandenhülle, der AuNP-Größe und der Präsentation der L1-Peptide auf die biologische Aktivität gewonnen werden. Zudem wurde demonstriert, dass AuNP@L1-Konjugate verschiedene L1-vermittelte Funktionen effektiver stimulieren als L1-Peptide alleine. Die entwickelten Konjugate sind interessant für die Behandlung von Wirbelsäulenverletzungen und perspektivisch für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

3.2 Theoretischer Hintergrund und Stand der Forschung zu Kapitel 3

3.2.1 Drug-Delivery mit AuNP

3.2.1.1 Aktiver und passiver Transport

Das Konzept der Multifunktionalisierung von AuNP wurde in Kapitel 2, Abschnitt 2.2.2.1 vorgestellt. Eine bedeutende Anwendung funktionalisierter AuNP ist der Wirkstofftransport, das sogenannte "drug delivery".^{63,251,6} Es kann grundsätzlich unterschieden werden zwischen aktivem und passivem Transport. Der aktive Transport, oder "targeted drug delivery", erfordert die Anbindung eines Erkennungsmoleküls wie zum Beispiel eines Antikörpers oder des epidermalen Wachstumsfaktors (engl.: epidermal growth factor), ein Polypeptid, oder anderer Signalmoleküle, bei denen es sich um Proteine, Peptide, aber auch kleine organische Moleküle handeln kann (z.B. manche Hormone und Neurotransmitter).^{63,6,148,140} Der passive Transport kann zum Beispiel unter Ausnutzung des EPR-Effekts (vgl. Abschnitt 2.2.2.1) in einer Anreicherung der Partikel im Tumorgewebe resultieren. Die meisten Studien zum Wirkstofftransport zielen auf die Behandlung von verschiedenen Krebsformen ab,¹⁵² wichtige Wirkstoffe sind z.B. Doxorubicin,¹⁴² Paclitaxel,²⁵² Tamoxifen²⁵³ und *cis*-Platin bzw. Oxaliplatin.^{139,254} Eine weitere wichtige Anwendung ist die Transfektion mit Hilfe von AuNP,^{148,154,155,255} also die "Lieferung" von Oligonukleotiden (DNA- oder RNA-Fragmenten) in den Zellkern. Auf diesem Gebiet hat insbesondere die Gruppe von Mirkin viele bedeutende Beiträge geleistet.¹⁵⁴ Neben Erkennungsmolekülen, die durch spezifische Wechselwirkungen eine selektive Lieferung der Konjugate bewirken, können zusätzlich Stoffe genutzt werden, die z.B. die Aufnahme in die Zelle oder den Transport in den Zellkern (Nukleus) verbessern sollen. Wichtige Beispiele sind RME- (Rezeptorvermittelte Endozytose, engl.: receptor mediated endocytosis) und NLS- (Nukleares Lokalisierungssignal, engl.: nuclear localization signal) Peptide,^{165,256} und TAT-Peptide (abgeleitet vom HIV-TAT-Protein, Aktivator der Transkription, engl.: trans-activator of transcription),^{257,258} oder Transferrin.²⁵⁹ Tkachenko et al. konnten zeigen, dass eine Kombination verschiedener Peptide, z.B. adenovirales NLS und RME, auf AuNP besonders wirkungsvoll für nukleares Targeting, also den gezielten Transport in den Zellkern, sein kann.^{256,260}

3.2.1.2 Drug release oder multivalente Wirkung

Ein Typ von Wirkstofftransportern ist so gestaltet, dass nach Erreichen des Zielortes der Wirkstoff freigesetzt werden soll. Dies kann durch verschiedene Stimuli erreicht werden, z.B. durch pH-Änderungen bei Aufnahme in bestimmte Zellkompartimente,¹⁴² durch bestimmte chemische Reaktionen inklusive enzymatischer und Austauschreaktionen,^{148,149} durch nicht-kovalente Beladung des Konjugats mit dem Wirkstoff,²⁶¹ oder durch externe Stimuli wie Licht oder Laserpulse, die entweder über die Erwärmung der AuNP eine Abspaltung der Wirkstoffe bewirken,²⁶² oder durch Spaltung photolabiler Linker.^{6,148}

Ein weiterer wichtiger Typ von Wirkstofftransportern beruht im Gegensatz dazu auf der Aktivität des gesamten Konjugats und es werden keine einzelnen Wirkstoffmoleküle freigesetzt.^{6,141} Insofern könnte dieser Typ auch als eigenständiger Wirkstoff bezeichnet werden. Neben dem Vorteil, dass die Wirkstoffe durch Koadsorption weiterer Moleküle stabilisiert und mit zusätzlichen Funktionen kombiniert werden können, werden durch die Bindung vieler Wirkstoffmoleküle auf einen Nanopartikel hohe lokale Konzentrationen des Wirkstoffs erreicht. Durch multivalente Bindungen können so höhere Affinitäten zu Zielstrukturen (z.B. Rezeptoren) bewirkt und die Effizienz der Behandlung gesteigert werden.^{6,152} Dies wird durch den sogenannten Verstärkungsfaktor (engl.: enhancement factor, EF) ausgedrückt, der angibt, um welchen Faktor niedriger die Konzentration eines an Nanopartikel konjugierten Wirkstoffes ist, die den gleichen Effekt erzielt wie die Referenzkonzentration eines nicht gebundenen Wirkstoffs. Niedrige Wirkstoffkonzentrationen sind immer vorteilhaft, insbesondere aber wenn der Wirkstoff eine systemische Toxizität aufweist, wie z.B. viele Wirkstoffe zur Chemotherapie von Krebs.¹⁵² Paciotti et al. konnten z.B. in einem Mausmodell durch Konjugation von Tumornekrosefaktor (TNF, ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) mit Antitumoraktivität) an AuNP in Kombination mit PEG-Thiolen eine gleiche Reduktion des Tumorvolumens bei halbierter effektiver TNF-Dosis im Vergleich zu freiem TNF erzielen und dadurch zusätzlich die Mortalitätsrate von 33 % auf 0 % reduzieren.¹⁴¹ Die Mortalität bei Verwendung der gleichen effektiven Dosis von freiem TNF lag bei 15 %, es konnte durch Konjugation an AuNP also gleichzeitig die Effektivität des Wirkstoffs gesteigert und dessen Toxizität verringert werden. Inzwischen ist das auf AuNP@TNF-Konjugaten basierte Medikament AurImmuneTM in der dritten Phase der klinischen Studien.⁹⁰

3.2.1.3 Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften

Für einen effizienten Wirkstofftransport ist es wichtig, die pharmakokinetischen Eigenschaften der Träger-Konjugate so gut wie möglich zu kontrollieren und hierbei spielt die Stabilisierung durch PEG-Liganden, die im vorangehenden Kapitel behandelt wurde, eine entscheidende Rolle. Gründe für eine Destabilisierung oder Deaktivierung der Konjugate *in vivo* können kompetitive Austauschreaktionen durch Serumproteine und -moleküle wie Cystein und Glutathion sein, Prozesse im Rahmen der Immunantwort und ungewünschte unspezifische Bindung an Zellen oder Gewebe, die nicht Ziel der Therapie sind.^{157,263} Wichtig für das Verhalten von Nanomaterialien im Blutkreislauf ist auch die sogenannte Proteinkorona, die sich auch auf passivierten Materialien durch nicht-kovalente, unspezifische Adsorption bilden kann.^{264,265} Auch hier, ebenso wie bei der Opsonierung, ist PEGylierung der Nanomaterialien eine gängige Strategie, um die unspezifische Bindung zu minimieren.¹⁶⁹

3.2.2 AuNP zur Diagnose und Behandlung neurologischer Erkrankungen

3.2.2.1 Medizinische Anwendungsgebiete von AuNP

Goldverbindungen sind seit den 1920er Jahren bekannt und zugelassen (z.B. Auranofin) für die Behandlung rheumatoider Arthritis.^{63,6} Bei diesen Verbindungen handelt es sich nicht um Nanomaterialien. Die Ausnutzung der besonderen Eigenschaften von Gold in der Form von Nanopartikeln, wie deren plasmonische Eigenschaften und Funktionalisierbarkeit, wurde bisher am intensivsten im Kontext von Krebserkrankungen studiert. Dementsprechend fortgeschritten ist in diesem Bereich die Entwicklung von AuNP-basierten Systemen für die Diagnose, den Wirkstofftransport, das Imaging und das gezielte Abtöten von Krebszellen durch plasmonische photothermale Therapie (PPTT).^{63,152,90} Während einige AuNP-basierte Therapien zur Behandlung verschiedenster Krebsarten bereits in klinischen Studien getestet werden,^{251,90} stellen Upscaling, also die zuverlässige Produktion großer Mengen der AuNP-Konjugate, die Frage der kontrollierten Abbaubarkeit der Partikel bzw. ihrer Entfernung oder Ausscheidung aus dem Organismus und die weitere Verbesserung ihrer Eigenschaften *in vivo* große Herausforderungen dar. Ebenfalls von großer Bedeutung ist die fortgesetzte Forschung zu Toxizität und potentiellen ökologischen Auswirkungen der Nanomaterialien.^{266,267,146,268,269}

AuNP werden inzwischen auch in Hinblick auf viele andere medizinische Fragestellungen erforscht, z.B. bei der Bekämpfung multiresistenter Keime,^{270–272} der Diagnose von Entzündungsprozessen²⁷³ und genetischen Defekten,^{143,274,158} und bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

3.2.2.2 AuNP in der Neurologie

Die Forschung zur Anwendung von AuNP in der Neurologie steht im Gegensatz zur Forschung im Kontext von Krebs am Anfang ihrer Entwicklung. Die weitaus geringere Zahl von Veröffentlichungen stammt überwiegend aus den vergangenen zwei bis drei Jahren. Auch hier zeichnet sich indes bereits jetzt eine interessante Anwendungsbreite der AuNP ab. Die Schnittstelle zur Krebsforschung stellt zunächst die Diagnose und Behandlung von Hirntumoren dar. AuNP können gezielt an Tumoren gebunden werden,^{275,276} um dort z.B. in Verbindung mit Kontrastmitteln und SERS-Labeln deren operative Entfernung zu unterstützen.^{277,278} AuNP können auf verschiedene Arten für die Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen genutzt werden,²⁷⁹ und ermöglichen als Biosensoren die hochempfindliche Detektion von Neurotransmittern,²⁸⁰ der Aktivität von Hirnzellen²⁸¹ und die quantitative Verfolgung chemischer Prozesse des Gehirns in vivo.²⁸² In einer vergleichsweise frühen Studie konnten Kogan et al. zeigen, dass die Aggregation von β-Amyloiden, neurobiologisch relevante Peptide mit 40 oder 42 Aminosäuren, durch hyperthermische Behandlung mit AuNP rückgängig gemacht werden kann.²⁸³ Die Aggregation dieser β-Amyloide im Interstitium (Extrazellulärraum) des Gehirns kann zu Ablagerungen, den sogenannten senilen Plaques, führen, die mit der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht werden. Spätere Studien anderer Gruppen beschäftigten sich mit der effizienten Detektion,^{284,285} und der Manipulation dieser β -Amyloid-Aggregate²⁸⁶ mit Hilfe von AuNP. Aktuell wurden in ersten Studien die Wechselwirkungen von AuNP und α-Synuclein untersucht, einem kleine Protein, das bei der Parkinson-Krankheit eine Rolle spielt.^{287,288} Eine Herausforderung bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (engl.: blood brain barrier, BBB). Prades et al. funktionalisierten AuNP mit einer Peptidsequenz, die mit den Transferrin-Rezeptoren der BBB wechselwirkt, und konnten damit einen erhöhten Transport dieser AuNP durch die BBB in einem in vitro BBB-Modell und in vivo zeigen.259

3.2.2.3 Wechselwirkungen von Neuronen mit AuNP

Neuronen können mit AuNP auf verschiedene Arten wechselwirken. Gilles *et al.* konnten über Einstellung der Oberflächeneigenschaften von AuNP und deren Anordnung in bestimmten Mustern auf Substraten das axonale Wachstum von Neuronen steuern.²⁸⁹ AuNP auf Substraten können auch als Mediator für die elektrische Stimulation von Neuritenwachstum dienen²⁹⁰ und solche Substrate haben Potential für die Herstellung von Elektroden zur Kontaktierung von Nervengewebe, die zum Beispiel in Hörgeräten oder für die Tiefe Hirnstimulation eingesetzt werden.²⁹¹ Solche Elektroden müssen sehr klein sein, um die Immunantwort zu minimieren, und im Gegensatz zu vielen anderen Materialien haben Filme von AuNP in diesen Dimensionen hervorragende elektrische Eigenschaften, die eine effiziente Kontaktierung mit Neuronen ermöglichen. Einen interessanten Effekt beobachteten

Paviolo *et al.*,²⁹² nämlich eine Verstärkung von Neuritenwachstum in Gegenwart von AuNR nach Laserbestrahlung. Es scheinen also die Nanopartikel über ihre plasmonischen Eigenschaften Neuritenwachstum stimulieren zu können, der genaue Mechanismus ist allerdings ungeklärt.

3.2.2.4 Therapie neurodegenerativer Erkrankungen mit AuNP

Die Zahl der Studien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen mit AuNP ist sehr gering. Die Auswirkungen eines ischämischen Schlaganfalls konnten bei Ratten durch Gaben von AuNP gemildert werden.²⁹³ Die Autoren fanden, dass AuNP mit d = 20 nm entzündungshemmend und anti-apoptotisch wirkten (Apoptose: programmierter Zelltod, der z.B. durch Immunzellen ausgelöst werden kann), wodurch das Infarktvolumen verringert und neurologische Schäden gelindert wurden. Bemerkenswerterweise handelte es sich um citratstabilisierte AuNP ohne weitere Funktionalisierung. Wang et al. stellten 2011 eine Behandlung von Wirbelsäulenverletzungen basiert auf einer Impfstrategie mit AuNP-Konjugaten vor.²⁹⁴ Die nicht stattfindende neuronale Regeneration nach Wirbelsäulenverletzungen kann teilweise auf die Präsenz inhibitorischer Moleküle zurückgeführt werden und Impfstrategien nutzen das Konzept der schützenden Autoimmunität, um deren Wirkung zu unterdrücken. Die Verabreichung des von den Autoren entwickelten Fusionsproteins als AuNP-Konjugat war der Verabreichung mit Freund-Adjuvans, einem umstrittenen Hilfsstoff zur Verstärkung von Immunreaktionen, in mehreren Punkten überlegen: die Impfung war effizienter und mit keiner nachweisbaren Toxizität verbunden. Die Antiseren (Antiserum: Serum, das die gebildeten Antikörper enthält) der immunisierten Ratten förderten axonales Wachstum in Gegenwart inhibitorischer Moleküle und immunisierte Ratten zeigten eine verbesserte funktionale Erholung nach Wirbelsäulenverletzungen.

AuNP sind also auf verschiedenen Ebenen äußerst vielversprechend für die Anwendung in der Therapie neurologischer Erkrankungen, seien es neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit, Verletzungen der Wirbelsäule oder Infarkte wie der ischämische Schlaganfall. Zusätzlich könnten AuNP zukünftig eine Rolle bei der Entwicklung von Neuroprothesen, z.B. Hörgeräten, spielen. Wie bei den therapeutischen und diagnostischen Anwendungen im Kontext von Krebserkrankungen, sind ihre einfache Funktionalisierbarkeit und plasmonischen Eigenschaften wichtige Gründe für ihr besonderes Potential; in der Neurologie ergeben sich zusätzlich sehr interessante Perspektiven aus ihren elektrischen Eigenschaften. Auch die Herausforderungen sind ähnlich wie bei der Diagnose und Therapie verschiedener Krebsformen und ergeben sich aus der Komplexität der Erkrankungen selber und der Komplexität der Wechselwirkungen von Nanopartikeln im Körper.¹⁸⁵ Die Überwindung der BBB ist eine zusätzliche spezielle Herausforderung der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Während bei der nanomedizinischen Behandlung von Krebs die Zielsetzung eine möglichst selektive, vollständige und minimalinvasive Abtötung von Krebszellen ist, zielt die Behandlung vieler neurologischer Erkrankungen darauf ab, die Regeneration von Nervengewebe zu fördern und Nervenzellen vor dem Absterben zu schützen. Da die Regeneration von verletztem Nervengewebe durch die Präsenz inhibitorischer Moleküle unterdrückt wird, während ein Mangel an stimulierenden Molekülen vorliegt,^{295,296} ergeben sich zwei grundsätzliche Behandlungsstrategien. Zum einen kann versucht werden, wie bei der erläuterten Impfstrategie, die Wirkung inhibitorischer Moleküle zu minimieren, oder aber Moleküle zum verletzten Gewebe zu transportieren, die dessen Regeneration stimulieren. Für eine solche Stimulation ist das Zelladhäsionsmolekül L1 ein interessanter Kandidat.
3.2.3 Das Zelladhäsionsmolekül L1 und L1-Peptide

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein Transmembranprotein der Immunoglobulin-Superfamilie, das von Neuronen und Schwann-Zellen exprimiert wird. Die Struktur ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.



Abb. 3.1: Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1. (A) Struktur des neuralen Zelladhäsionsmoleküls L1 mit sechs Immunoglobulindomänen, fünf Fibronektin Typ III Domänen und einer zytoplasmatischen Domäne. Das Sternchen zeigt die Position der L1-Peptidsequenz an. (B) Sequenz innerhalb der dritten Fibronektin Typ III Domäne des murinen L1, die die Sequenz des funktionalen L1-Peptids (rote Buchstaben) enthält. Die unterstrichene Sequenz wird vom L1 Antikörper AB557 erkannt. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

L1 spielt bei der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle und fördert in einer generell inhibitorischen Umgebung dessen Regeneration bei akuten und chronischen Erkrankungen.^{297–299} Durch homophile Wechselwirkungen von L1-Proteinen werden Neuritenwachstum, neuronale Migration und neuronales Überleben in vitro gefördert, 300-304 und L1 fördert die Myelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem.^{305–307} In *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass das L1-Protein in verschiedenen Formen, z.B. auf Stamm-^{308,297,309} oder Schwann-Zellen,³⁰⁶ über Adeno-assoziierte Viren,³¹⁰ oder als Fusionsprotein^{298,299} Symptome neuronaler Schädigungen verbessert und die Regeneration fördert. Allerdings haben die Anwendungen des L1-Proteins in diesen Formen schwerwiegende Nachteile für die Therapie. Es ist schwierig, das L1-Protein in ausreichenden

Mengen zu produzieren, es hat eine geringe Lebensdauer, und L1-überexprimierende Zellen dringen nicht tief ins Zielgewebe ein. Aus diesem Grund wurde in der Gruppe von Melitta Schachner durch systematische Fragmentierung des L1-Proteins die minimale Peptidsequenz bestimmt, die in der Lage ist, L1-vermittelte Funktionen auszuüben.³⁰⁰ Die Sequenz des identifizierten 22-meren Peptids ist in Abbildung 3.1 B gezeigt. Das L1-Peptid stimuliert L1-vermittelte Funktionen und wird durch den monoklonalen L1-Antikörper 557 erkannt. Ein solches Peptid ist einfacher und günstiger zu produzieren und deutlich stabiler als das ganze Protein und dementsprechend vorteilhaft für die therapeutische Anwendung. Allerdings ist das L1-Peptid stark hydrophob und aggregiert stark in wässrigen Medien. Die in diesem Kapitel beschriebene Studie zeigt, wie die Konjugation von L1-Peptiden an AuNP genutzt werden kann, um deren Löslichkeit und Stabilität gegen Aggregation zu verbessern, ohne die biologische Wirksamkeit zu beeinträchtigen.

3.2.4 Konjugation von Peptiden an AuNP

Da kleine Peptide mit nahezu beliebigen Sequenzen synthetisch und kommerziell - über Auftragssynthesen - zugänglich sind, bieten sie eine praktikable Möglichkeit, die Oberflächeneigenschaften von AuNP systematisch einzustellen. Über eine terminale Cysteineinheit kann einfach eine Gold-bindende Ankergruppe in das Peptid integriert werden, da die Aminosäure Cystein eine Thiolgruppe enthält. Im bei Weitem größten Teil der bisherigen Studien zu medizinischen Anwendungen von AuNP@Peptid-Konjugaten wurden Peptide für das Targeting in Multikonjugaten integriert, das in Abschnitt 3.2.1.1 angesprochen wurde. Deutlich geringer ist die Zahl der Studien mit therapeutisch wirksamen Peptiden.³¹¹ Andere Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss der Peptidstruktur auf die Eigenschaften der Konjugate,^{91,312} und mit der Peptidstruktur auf AuNP, sowohl experimentell³¹³ als auch theoretisch.^{314,315} Neben den physikochemischen Eigenschaften wie der kolloidalen Stabilität wurden in verschiedenen Studien auch grundlegende biologische Eigenschaften von AuNP@Peptid-Konjugaten wie Immunantwort³¹⁶ und Verteilung im Organismus³¹⁷ untersucht. Aus den ersten wegweisenden Studien zu Struktur-Eigenschafts-Beziehungen entwickelte sich das Konzept der "künstlichen Proteine" mit der Idee, biologische Eigenschaften von AuNP@Peptid-Konjugaten durch gemischte Ligandenhüllen aus Peptiden und stabilisierenden Molekülen wie PEG präzise einzustellen.³¹⁸ Solche gemischten Konjugate können z.B. Enzyme simulieren,¹⁶⁷ aber auch als künstliches Substrat genutzt werden, um Enzymaktivitäten zu studieren.^{319,320} Weiterhin wurde in verschiedenen Studien die Verwendung bestimmter Peptide als Ligand für AuNP und MPC für biologische Anwendungen vorgeschlagen.^{321–324} Peptide bieten in diesem Kontext den Vorteil der Biokompatibilität und Kontrolle der physikochemischen Eigenschaften über die Aminosäuresequenz, einschließlich der Präsentation gewünschter terminaler Gruppen für die weitere Funktionalisierung (typischerweise Amino- oder Carboxylgruppen). Es ist auch möglich, dass Peptide in der AuNP-Synthese als Reduktionsmittel und als Ligand fungieren, analog zum Citrat in der Turkevich-Synthese. Dies wurde z.B. mit Poly-L-Lysin gezeigt.²⁵⁵ Die Anwendung von AuNP@Peptid-Konjugaten ist nicht auf den biologischen Bereich beschränkt, sie werden z.B. auch in der Sensorik,³²⁵ Katalyse,³²⁶ und für den Aufbau plasmonischer Strukturen bzw. komplexerer Nanomaterialien genutzt.^{327,328}

Peptide können problemlos in gemischte Hüllen mit PEG-Thiolen integriert werden, wie z.B. vergleichsweise frühe Arbeiten in der Gruppe von Feldheim zeigten,¹⁶⁵ und diese Strategie wurde, auch in noch komplexeren Ligandenhüllen, in zahlreichen Studien angewandt, z.B. in den Gruppen von Fiammengo,²⁴² Fernig³²¹ und Mirkin.¹⁶⁶ Über die optimale Präsentation eines Peptids in einer PEG-Hülle herrscht keine Einigkeit. Ob z.B. das Peptid über einen langen Spacer gebunden werden sollte, wodurch es aus der Ligandenhülle herausragen könnte, oder eine geschütztere Einbettung innerhalb der Ligandenhülle günstiger ist, ob die PEG-Liganden länger oder kürzer sein sollten als das Peptid, in welchem Mischungsverhältnis die Liganden vorliegen sollten; solche und ähnliche Fragen sind bisher nicht generell geklärt und es ist anzunehmen, dass dies auch nicht möglich ist, sondern die optimalen Eigenschaften für die jeweilige Anwendung bestimmt werden müssen. Aus der zunehmenden Zahl an Studien und Forschungsbemühungen könnten aber methodische Ansätze für die effektive Untersuchung und Leitlinien für das Design von Multikonjugaten hervorgehen, die allgemeingültiger und zumindest teilweise auf neue Anwendungen übertragbar sind.

3.3 Experimentalteil zu Kapitel 3

3.3.1 Materialien

Die verwendeten Peptide wurden bei Schafer-N (Dänemark) bestellt und hatten folgende Sequenzen:

mL1-N-Lys: H-CKKKKKPELEDITIFNSSTVLVRWRPVD-OH

mL1-C-Lys: H-PELEDITIFNSSTVLVRWRPVDKKKKKC-OH

Beide Peptide leiten sich von murinem L1 ab und enthalten einen Spacer aus fünf Lysin (K)-Einheiten der ein terminales Cystein (C) mit der funktionalen Sequenz verknüpft. Die Cystein-Einheit befindet sich bei mL1-*N*-Lys am *N*-Terminus und bei mL1-*C*-Lys am *C*-Terminus. Die Synthese und Charakterisierung des verwendeten PEGMUA ($M_w \sim 2000$ g/mol) wurde in Kapitel 2 beschrieben.

3.3.2 Peptid-Stammlösungen

1-3 mg des Peptids wurden in 1 ml Wasser gelöst. Nach starkem Schütteln wurde die Lösung zentrifugiert (10 min, 14,000 g), der Überstand entnommen und mit einem Spritzenfilter (0.45 μ m Porengröße, Carl Roth GmbH) filtriert um aggregierte Peptide abzutrennen. Die Konzentrationen der gereinigten Lösungen wurden über deren Absorbanz bei 350, 320 und 280 nm mit der Methode von Mach *et al.*³²⁹ bestimmt. Die Konzentrationen wurden nach Lagerung und Konjugationen überprüft, um sicherzustellen, dass sie sich nicht verändert hatten.

3.3.3 Synthese der AuNP-Konjugate

Die verwendeten Partikel stammten aus Seeded Growth Synthesen, die in Kapitel 1, Abschnitt 1.3.5.3 beschrieben sind. Lyophilisiertes PEGMUA und Peptide sowie deren wässrige Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Die Synthese der AuNP-Konjugate mit gemischten Ligandenhüllen erfolgte analog zur Synthese der AuNP@PEGx-Konjugate (Abschnitt 2.3.4.4) durch einfaches Vermischen der Ligandenlösungen mit AuNP bei Raumtemperatur. Die Reaktionszeit unter Rühren vor der Reinigung betrug mindestens zwölf Stunden. Es wurden reine Konjugate, nur mit L1-Peptid oder PEGMUA, synthetisiert, und gemischte Konjugate mit den Mischungsverhältnissen L1-Peptid:PEGMUA von 1:3, 1:1 und 3:1. Die Mischungsverhältnisse beziehen sich auf die vorgelegten Ligandenlösungen, z.B. wurden für eine 1:3 Mischung auf AuNP14 1 625 Äquiva-

lente L1-Peptid und 4 875 Äquivalente PEGMUA pro AuNP vorgelegt, insgesamt also 6 500 Liganden pro Partikel mit 14 nm Durchmesser. Der Überschuss für AuNP mit 40 nm Durchmesser betrug 50 000 Liganden pro Partikel.

Die Ligandenlösungen wurden jeweils im gewünschten Verhältnis L1-Peptid:PEGMUA vorgelegt, um bereits durch die Zugabe der größeren Volumina AuNP-Lösung eine starke Durchmischung zu erreichen. Tabelle 3.1 fasst die Bedingungen für die verschiedenen Konjugate zusammen.

Tabelle 3.1: Bedingungen für die Konjugationen von L1-Peptiden und PEGMUA. Mit Durchmessern *d* und Konzentrationen *c* der AuNP vor der Konjugation und Reinigung und Ligandenüberschuss pro AuNP.

| Charge | d(AuNP) [nm] | c(AuNP) [nM] | Überschuss |
|---------|--------------|--------------|------------|
| AuNP14 | 13.9±1.5 | 6.1 | 6 500 |
| AuNP14B | 13.9±1.3 | 44.6 | 6 500 |
| AuNP40 | 40.4±3.4 | 0.5 | 50 000 |
| AuNP40B | 40.0±2.3 | 0.3 | 50 000 |
| AuNP40C | 39.6±2.7 | 0.2 | 50 000 |
| AuNP40D | 39.6±3.8 | 0.2 | 50 000 |

Die Reinigung durch Zentrifugation erfolgte durch viermaliges Zentrifugieren (15-20 min bei 20 000g für AuNP14-Konjugate, 15-20 min bei 2 000-4 000g für AuNP40-Konjugate) und Ersetzen des Überstandes durch Wasser. Für Lagerung und biologische Test wurden die gereinigten Konjugate in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) umgepuffert, ebenfalls durch Zentrifugation und Ersetzen des Überstands. Die Konjugate wurden in Glasgefäßen gelagert um Anhaftungen an Gefäßwände zu minimieren. Konjugate, die nach Lagerung agglomeriert waren, konnten durch kräftiges Schütteln oder Ultraschallbehandlung resuspendiert werden.

3.3.4 Charakterisierung der Konjugate

TEM-, DLS und UV-vis Messungen erfolgten wie in Kapitel 1 und 2 beschrieben und an denselben Geräten.

3.3.4.1 Aufnahme der Aggregationskinetiken mittels UV/vis-Spektroskopie

Die Aggregationsexperimente erfolgten mit den ungereinigten Reaktionsmischungen in Citratpuffer bei pH 5.5-6.0 (in diesem Puffer liegen die AuNP vor). Für die Experimente wurden die Konjugate wie beschrieben in einer UV-Mikroküvette synthetisiert, allerdings ohne Zugabe eines magnetischen Rührstäbchens. Die Küvetten wurden dicht verschlossen, kräftig geschüttelt und dann in einem UV/vis-Spektrometer platziert. Das Spektrometer wurde im Cycle-Mode betrieben, in dem alle 5 oder alle 10 Minuten ein Absorbanzspektrum im Bereich von 300-800 nm aufgenommen wurde. Die Zahl der Spektren (50-144) und die Intervalle wurden für die verschiedenen Experimente angepasst. Während der Experimente wurden die Proben nicht gerührt oder geschüttelt.

Für die Konjugate von AuNP40 mit mL1-*C*-Lys und PEGMUA wurde das Experiment wiederholt. Nachdem der erste Satz von Spektren aufgenommen war, wurden die Proben durch kräftiges Schütteln resuspendiert und erneut im Spektrometer platziert. Es wurde dann ein weiterer Satz von Absorbanzspektren aufgenommen wie beschrieben.

3.3.4.2 Stabilität der AuNP40-Konjugate in PBS

Die entsprechenden AuNP40-Konjugate in PBS wurden durch Verdünnung mit PBS auf dieselbe Konzentration (0.14 nM) eingestellt. Je 600 µl der Proben wurden dann zentrifugiert (5 000g, 10 min) und 550 µl des Überstands durch ACSF (engl.: artificial cerebrospinal fluid, ein glucosehaltiger Puffer für *in vitro* Assays mit Neuronen) ersetzt. Absorbanzspektren dieser Proben wurden nach 4 Wochen in PBS, sowie nach 1 Minute und 24 Stunden in ACSF aufgenommen.

3.3.4.3 Biologische Experimente und Zellkulturen

Die biologischen Experimente wurden von David Lutz und Dr. Gabriele Loers in der Gruppe von Melitta Schachner am Zentrum für molekulare Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt. Die experimentellen Details sind bei Schulz *et al.*³³⁰ beschrieben.

3.3.4.4 Mikroskopie von Neuronen mit AuNP

Die SEM-Mikroskopie von Neuronen mit AuNP wurde von Martin Stieben (Institut für Experimentalphysik, Universität Hamburg, Center for Free-Electron Laser Science (CFEL)) und Michael Höltig (AK Mews, Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg) durchgeführt. Die Proben wurden von David Lutz präpariert.

Es wurden zerebelläre Neuronen von Wildtyp-Mäusen auf mit Poly-L-Lysin (PLL) bedeckte, runde Deckgläschen (Durchmesser = 12 mm) ausgesät $(2.5 \cdot 10^5$ Zellen pro Gläschen). Die Zellen wurden 24 h mit AuNP40-Konjugaten inkubiert (*c* äquivalent zu ~200 nM L1-Peptiden). Die Zellen wurden dann mit 4% Para-Formaldehyd in PBS fixiert und 30 Minuten an der Luft getrocknet. Die fixierten Neuronen wurden in einem 682 Precision Etching & Coating System (Gatan, Inc.) mit amorphem Kohlenstoff gesputtert (Dicke: 4-6 nm). Die SEM-Aufnahmen erfolgten bei 5 kV mit einem LEO 1550-GEMINI (LEO Electron Microscopy Group).

3.3.4.5 Statistische Analyse

Alle numerischen Daten der *in vitro* Experimente sind Mittelwerte der Gruppen mit den Standardabweichungen vom Mittelwert. Parametrische und nicht-parametrische Tests wurden verwendet wie in den Abbildungsbeschriftungen angegeben.

3.4 Ergebnisse und Diskussionen zu Kapitel 3

3.4.1 Synthese und Charakterisierung von AuNP@L1-Konjugaten

3.4.1.1 Zusammenfassung der Vorarbeiten

In der Gruppe von Melitta Schachner wurde ein minimales funktionales Fragment des L1-Moleküls identifiziert, um dessen günstige Wirkung im Zusammenhang mit der Heilung von Verletzungen des Nervensystems besser für therapeutische Zwecke nutzen zu können. Dieses Fragment ist ein Peptid aus 22 Aminosäuren, das L1-vermittelte Funktionen wie die Stimulation von Neuritenwachstum und den Schutz von Nervenzellen (Neuroprotektion) z.B. vor oxidativem Stress ausüben kann.³⁰⁰ In früheren Arbeiten im Rahmen der Diplomarbeit des Verfassers konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, die Wasserlöslichkeit verschiedener humaner und muriner L1-Peptide deutlich zu verbessern, indem diese in Kombination mit PEG-Liganden an AuNP konjugiert wurden. Es wurde zudem die pH-Abhängigkeit des Agglomerationsverhaltens untersucht und die Abhängigkeit der Stabilität der Konjugate von der Zusammensetzung ihrer Ligandenhülle. Es wurde in dieser Arbeit auch herausgestellt, warum die beweiskräftige Analytik von gemischten Ligandenhüllen schwierig ist, insbesondere wenn die Liganden ähnlich groß sind. In diesem Fall lassen sich Konjugate mit verschiedenen Abmischungen der Ligandenhüllen nämlich oft nicht über einfache UV/vis-Spektroskopie, DLS-Messungen, ζ-Potential-Messungen, geschweige denn TEM-Analytik, eindeutig unterscheiden. Es wurden in den Vorarbeiten erste Hinweise darauf gefunden, dass die Stabilität der Konjugate für ihre Differenzierung genutzt werden könnte. Außerdem wurde die Stabilität von Konjugaten mit hohem PEGMUA-Anteil in der Ligandenhülle (L1-Peptid:PEGMUA = 1:3) in PBS nachgewiesen. Des Weiteren wurden Versuche unternommen, die Bedeckungsdichte verschiedener Peptide auf AuNP über einen Fluoreszenz-Assay zu bestimmen. Die Bestimmung war aufgrund der starken Aggregationsneigung der Peptide in den meisten Fällen jedoch nicht erfolgreich. Nur ein humanes L1-Peptid mit einem Glycin-Spacer, das besonders gut wasserlöslich war, konnte erfolgreich quantifiziert werden, der footprint betrug 0.71 nm². Vorarbeiten in der Gruppe von Schachner zeigten allerdings, dass die biologische Aktivität dieses Peptids vergleichsweise gering war. Dies erscheint vor dem Hintergrund plausibel, dass die biologische Wirkung des L1-Moleküls auf homophiler Bindung beruht. Im Falle der L1-Peptide ist anzunehmen, dass das Ausmaß dieser homophilen Bindung mit der Aggregationsneigung der Peptide korreliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene AuNP@L1-Konjugate in größeren Mengen für umfassende biologische Tests synthetisiert und charakterisiert. Dabei wurde die Präsentation der Peptide, über die *N*- oder *C*-terminale Ankergruppe, variiert und es wurden verschiedene Partikelgrößen (*d* = 14 oder 40 nm) getestet. Abgesehen von der Standardcharakterisierung der Konjugate wurde zudem die Frage der Analytik von gemischten Ligandenhüllen weiter verfolgt. Dazu wurde das Konzept der Stabilität als Möglichkeit der Differenzierung ausgebaut und über die Agglomerationskinetiken der Konjugate konnte schließlich eine Differenzierungsmöglichkeit mit hoher Beweiskraft entwickelt werden. Es zeigte sich, wie bei den AuNP@PEG-Konjugaten, also auch in diesem Kontext, dass zeitaufgelöste UV/vis-Spektroskopie von AuNP-Konjugaten eine hervorragende Methode für deren ergänzende Charakterisierung darstellt. Insbesondere sind darüber Fragestellungen adressierbar, die mit Standardanalytik nicht zufriedenstellend bearbeitet werden können.

3.4.1.2 Synthese und Charakterisierung der Konjugate

Die Synthese der Konjugate erfolgte durch einfaches Mischen der Liganden und AuNP@Citrat bei Raumtemperatur, gefolgt von Rühren über Nacht. Abbildung 3.2 zeigt ein Schema der Synthese und die Strukturen der verschiedenen Liganden mL1-*N*-Lys, mL1-*C*-Lys und PEGMUA.



Abb. 3.2: Synthese der L1-funktionalisierten AuNP. (A) AuNP@Citrat (d = 14 oder 40 nm) wurden mit L1-Peptiden (mL1-C-Lys, mL1-N-Lys) und PEGMUA funktionalisiert, indem die Liganden im gewünschten Stoffmengenverhältnis vorgelegt, durchmischt und anschließend mit den AuNP@Citrat versetzt wurden. (B) Einbuchstabencode der verwendeten Peptide und Struktur von PEGMUA ($n \sim 45$, $M_w \sim 2000$ g/mol). Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605-10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Die *N*- oder *C*-terminale Cystein-Einheit ermöglicht die Bindung der Peptide an die Goldoberfläche, der Spacer aus fünf Lysin-Einheiten sollte die Bindung elektrostatisch begünstigen. Lysin ist im pH-Bereich von 5-6, in dem gearbeitet wurde, zu großen Teilen protoniert und daher positiv geladen, während die citratstabilisierten AuNP negativ geladen sind. Zudem dienen die Lysin-Spacer als distaler und lateraler Abstandshalter. Die Struktur der Liganden auf den verwendeten AuNP (d = 14 oder 40 nm) ist in Abbildung 3.3 maßstabsgetreu dargestellt um die Dimensionen zu verdeutlichen. Die genaue Konformation der gebundenen Liganden ist allerdings nicht bekannt. Die Koadsorption von PEGMUA diente der Stabilisierung und Verbesserung der Wasserlöslichkeit der Konjugate. Die hohe Stabilisierung von AuNP durch PEGMUA wurde in Kapitel 2 demonstriert und diskutiert.



Abb. 3.3: Illustration der Liganden und AuNP. Dimension der Liganden mL1-*N*-Lys und PEGMUA relativ zu AuNP mit 14 nm und 40 nm Durchmesser. Für die Darstellung sind die Liganden nicht in einer realistischen Konformation gezeigt, sondern mit allen $\phi = -120^{\circ}$ und allen $\psi = 120^{\circ}$ (ϕ ist der Torsionswinkel der N-C α -Bindungen und ψ der Torsionswinkel der C α -C(O)-Bindungen im Peptidrückgrat) für das Peptid mL1-*N*-Lys. PEGMUA ist in einer gestreckt-helikalen Konformation dargestellt. Die tatsächlichen Konformationen der Liganden in den Ligandenhüllen sind nicht bekannt. Abbildung mit Änderungen übernommen aus den SI zu Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Die Zusammensetzungen der Ligandenhüllen in den gemischten Konjugaten betrugen L1-Peptid:PEGMUA = 1:3; 1:1 und 3:1, zusätzlich wurden AuNP nur mit PEGMUA, AuNP@-PEGMUA, und nur mit L1-Peptid ohne PEGMUA, AuNP@mL1, synthetisiert. Abbildung 3.4 zeigt die Struktur der verschiedenen Konjugate und ihre Benennung.



Abb. 3.4: Übersicht über die synthetisierten Konjugate und deren Benennung.

Die eingesetzte Zahl der Liganden pro Partikel wäre ausreichend für etwa zwei Monolagen von Alkanthiolaten mit geringem Molekulargewicht auf Gold, wenn man für diese eine Bedeckungsdichte von 4.76/nm² annimmt.^{132,48,101} Da zumindest die Peptide aus sterischen Gründen einen deutlich höheren Platzanspruch auf der Partikeloberfläche haben, ist der tatsächliche Ligandenüberschuss vermutlich ausreichend für mehr als nur zwei vollständige Monolagen.

3.4.1.3 Agglomerationskinetiken

Die verschiedenen ungereinigten Konjugate neigten zur Agglomeration und Ausmaß und Geschwindigkeit dieser Agglomeration korrelierte mit der Zusammensetzung der Ligandenhülle. Der Begriff Agglomeration wird hier verwendet, weil die Assoziation der AuNP-Konjugate reversibel war. Die Agglomeration wurde mittels UV/vis-Spektroskopie verfolgt und Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Ergebnis für die Konjugate AuNP40@mL1-*C*-Lys/PEGMUA(3:1).



Abb. 3.5: Analyse der Agglomerationsprozesse mittels UV/vis-Spektroskopie (Links) Absorbanzspektren der Konjugate AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(3:1) die direkt nach Beginn der Konjugationsreaktion in 10 Minuten-Intervallen aufgenommen wurden. Die Konjugate lagen dementsprechend in Citratpuffer (pH 5.5-6.0) vor. (Rechts) Auftragung der Absorbanz bei 450 nm gegen die Zeit zur Auswertung der Agglomerationskinetik. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus den SI zu Schulz *et al. Nanoscale* **2013**, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

In Abschnitt 2.4.3.4 wurden ausführlich die Einflüsse von Agglomeration, Aggregation und Sedimentation auf die optischen Eigenschaften von AuNP diskutiert und die Bedeutung der Sedimentations- und Aggregations- bzw. Agglomerationsrate herausgearbeitet. In den aufgenommenen Absorbanzspektren, die in Abbildung 3.5 gezeigt sind, ist keine signifikante Zunahme der Absorbanz im Bereich von 600-800 nm festzustellen. Der Grund dafür ist, dass die Agglomeration der Konjugate sehr langsam stattfindet, während die Sedimentationsgeschwindigkeit, insbesondere bei den größeren AuNP (d = 40 nm), hoch ist. Die Agglomerate sedimentieren daher schneller als sie gebildet werden und es baut sich keine messbare Population von Agglomeraten in der Probe auf. Zudem kann diese Beobachtung als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Agglomeration durch Wechselwirkungen der Ligandenhüllen verursacht wird und nicht durch Destabilisierung der AuNP. Der Unterschied zwischen diesen Mechanismen ist der Partikelabstand. Während, z.B. durch DTT, destabilisierte AuNP sich in den Aggregaten sehr nahekommen und auch berühren können, ist bei Agglomeration durch Wechselwirkungen der Ligandenhüllen ein Mindestabstand der AuNP gegeben. Bei den verwendeten Liganden mit $M_w \sim 2000-3000$ g/mol kann dieser Mindestabstand mit mindestens einigen Nanometern abgeschätzt werden, wenn man die experimentell bestimmten und theoretisch abgeschätzten hydrodynamischen Dicken der PEG-Hüllen aus Kapitel 2, Abschnitt 2.4.1.3 zugrundelegt. Da die elektromagnetische Kopplung der AuNP, durch die die Rotverschiebung der SPB bewirkt wird, stark abstandsabhängig ist,⁴³ ist die Rotverschiebung bei Agglomeraten mit höherem Abstand der assoziierten Partikel schwächer ausgeprägt.

Zur Auswertung dieser Agglomerationskinetiken ist es daher sinnvoller, wie in Abbildung 3.5 gezeigt, die Absorbanz bei 450 nm, A450, gegen die Zeit aufzutragen, als den Aggregationsparameter,⁹¹ Aggregationsfaktor AF,¹²⁴ oder die Position der SPB.²¹⁷ Abbildung 3.6 zeigt die Auswertung der Agglomerationskinetiken der AuNP40@mL1-*C*-Lys/PEGMUA-Konjugate einschließlich der Konjugate ohne Peptid (AuNP40@PEGMUA) und ohne PEGMUA (AuNP40@mL1-*C*-Lys). Die Agglomeration ist offensichtlich auf die Gegenwart der Peptide mL1-*C*-Lys zurückzuführen, und korreliert mit dem Anteil des Peptids in der Reaktionsmischung. Die Konjugate AuNP@PEGMUA agglomerierten nicht, eine Sedimentation nicht agglomerierter AuNP kann also ausgeschlossen werden. Dasselbe Verhalten wurde für alle Konjugate beobachtet. Eine Ausnahme stellte die Probe AuNP40@L1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) dar, die aus unbekannten Gründen nicht dem Trend folgte. Diese Ergebnisse legen in Übereinstimmung mit verschiedenen Studien nahe, dass die Zusammensetzung der Ligandenhülle einfach über die initiale Ligandenzugabe bei der Konjugationsreaktion gesteuert werden kann.^{165,166,249}

Die spektroskopische Verfolgung der Agglomerationen erfolgte direkt nach Beginn der Konjugationsreaktionen, die Proben lagen also im Citratpuffer des Ausgangsmaterials AuNP40@Citrat, vor. Insofern könnte über eine verbrückende Rolle der Citratmoleküle bei der Agglomeration spekuliert werden. Eine Agglomeration wurde aber auch bei gereinigten Konjugaten in PBS-Puffer beobachtet, wenn auch schwächer ausgeprägt. Dies lässt wiederum nicht den eindeutigen Schluss auf eine verbrückende Rolle der Citrationen zu, da auch Salzkonzentrationen und pH-Wert die Agglomeration beeinflussen. Zum jetzigen Stand der Untersuchungen ist daher nur gesichert, dass die Agglomerationen nicht ausschließlich auf die Anwesenheit von Citrat zurückzuführen sind. Ein Einfluss der Citrationen ist jedoch nicht auszuschließen. Dieser könnte in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.



Abb. 3.6: Spektroskopische Verfolgung der Agglomeration von AuNP@L1-Konjugaten. Die Absorbanz bei 450 nm (A450) von AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA-Konjugaten in Citratpuffer (pH 5.5-6.0) nimmt durch Agglomeration und Sedimentation mit der Zeit ab. Das Ausmaß der Agglomeration korreliert mit der Zusammensetzung der Ligandenhülle, mL1-C-Lys:PEGMUA = 3:1 (2), 1:1 (3), 1:3 (4). AuNP40@PEGMUA (graue Quadrate) agglomerierten nicht, während Konjugate mit reiner Peptidhülle: AuNP40@mL1-C-Lys (1) am stärksten agglomerierten. Durch kräftiges Schütteln konnten die Proben nahezu vollständig resuspendiert werden (Fotografien rechts). Die Agglomeration dieser resuspendierten Proben wurde erneut spektroskopisch verfolgt (Kurven mit hohlen Symbolen im Diagramm links). Die Zahl der Datenpunkte wurde für eine bessere Übersichtlichkeit reduziert. Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Abbildung 3.6 zeigt auch einen weiteren bemerkenswerten Effekt bei der Agglomeration der AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA-Konjugate. Nachdem diese agglomeriert und maximal sedimentiert waren, erkennbar am konstanten Wert der Absorbanz (A450), wurden sie durch kräftiges Schütteln resuspendiert und ihre Agglomeration erneut spektroskopisch verfolgt. Die Agglomeration der resuspendierten Proben erfolgte mit einer ähnlichen Kinetik und es wurde sehr genau der gleiche finale Wert der Absorbanz (A450) erreicht. Die nahezu vollständig reversible Agglomeration deutet auf eine schwache Wechselwirkung der Peptide in den Ligandenhüllen als Ursache der Agglomeration hin und ein noch stärkeres Indiz dafür ist der ähnliche Verlauf und das gleiche Ausmaß der Agglomeration resuspendierter Proben. Ein solches Verhalten wäre für unkontrollierte Aggregation nicht zu erwarten. Eine anfängliche Verzögerung der Agglomeration ist bei den Proben mit höherem PEGMUA-Anteil zu erkennen (mL1-*C*-Lys:PEGMUA = 1:1 und 1:3, **3** und **4** in Abbildung 3.6). Diese Verzögerung ist bei der Agglomeration der resuspendierten Proben nicht zu beobachten, der Grund dafür ist unklar. Möglicherweise hängt sie mit der initialen Bildung der Ligandenhülle zusammen.

Da die Konjugate mit einem PEGMUA-Überschuss am stabilsten waren, wurden diese in den meisten biologischen Experimente verwendet. Zuvor wurde ihre Stabilität in biologischen Medien getestet.

3.4.1.4 Charakterisierung und Stabilität der AuNP@L1-Konjugate

Abbildung 3.7 zeigt die Charakterisierung der gereinigten Konjugate mit PEGMUA-Überschuss in PBS am Beispiel der AuNP40-Konjugate. Die Charakterisierung erfolgte mittels TEM, DLS und UV/vis-Spektroskopie und im Vergleich zu den Ergebnissen für AuNP40@PEGMUA, die dort ebenfalls gezeigt sind, deuten alle Ergebnisse auf eine leichte Agglomeration der Peptid-Konjugate hin. Im Falle der TEM-Aufnahmen könnten allerdings auch Eintrocknungseffekte eine Rolle spielen, daher sind diese für die Beurteilung der Agglomeration wenig aussagekräftig. Alle Proben waren kolloidal stabil in PBS und daher geeignet für *in vitro* Tests.



Abb. 3.7: Charakterisierung der AuNP@L1-Konjugate mit einem Überschuss von PEGMUA in der Ligandenhülle. TEM-Aufnahmen (oben), volumengewichtete Größenverteilungen aus DLS-Messungen (unten links) und normierte Absorbanzpektren (normiert mit der Absorbanz bei 450 nm: A/A450, unten rechts) der gereinigten Proben AuNP40@PEGMUA (blaue Linien), AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) (grüne Linien) und AuNP40@mL1-*C*-Lys/PEGMUA(1:3) (rote Linien) in PBS. Die DLS-Ergebnisse für AuNP40@Citrat sind zum Vergleich gezeigt (schwarze, gestrichelte Linie). Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Die Probe AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) zeigte die deutlichsten Anzeichen für Aggregation in den DLS Messungen (Abbildung 3.7), doch auch diese Konjugate konnten spätestens durch Ultraschallbehandlung vollständig resuspendiert werden. Abbildung 3.8

zeigt DLS-Messungen von AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) und AuNP14@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) in PBS nach dem Umpuffern und sechs Tage später. Vor den DLS-Messungen wurden die gealterten Proben bei Bedarf wenige Minuten mit Ultraschall behandelt, wodurch vollständig suspendierte Proben erhalten wurden.

Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach Konjugation der Liganden lag für die gemischten Konjugate im selben Bereich wie für reine PEGMUA-Konjugate bei 13-20 nm im Vergleich zu citratstabilisierten AuNP. Dieses Ergebnis ist angesichts der ähnlichen Größen der Liganden zu erwarten.



Abb. 3.8: Kolloidale Stabilität der AuNP@L1-Konjugate in PBS. Volumengewichtete Größenverteilungen aus DLS-Messungen der gereinigten Proben AuNP@PEGMUA (blaue Linien) und AuNP@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) (grüne Linien) nach Umpuffern in PBS (gepunktete farbige Linien) und nach 6 Tagen in PBS (durchgezogene Linien). Die DLS-Ergebnisse für AuNP@Citrat sind zum Vergleich gezeigt (schwarze Strich-Punkt-Linien). Sowohl AuNP mit 14 nm Durchmesser (AuNP14, links), als auch AuNP mit 40 nm Durchmesser (AuNP40, rechts) blieben kolloidal stabil. Die Probe AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) nach 6 Tagen in PBS wurde vor den DLS-Messungen wenige Minuten mit Ultraschall behandelt.

Die Stabilität der AuNP40-Konjugate in relevanten Puffern wurde zusätzlich mittels UV/vis-Spektroskopie überprüft. Dazu wurden die Konjugate in PBS oder artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (engl. artificial cerebrospinal fluid, ACSF) überführt und Absorbanzspektren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Umpufferung aufgenommen (Abbildung 3.9).



Abb. 3.9: Stabilität der AuNP40-Konjugate in relevanten Puffern und Medien. Absorbanzspektren, normiert mit der Absorbanz bei 450 nm (A/A450), von AuNP40@PEGMUA (links), AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3) (Mitte) und AuNP40@mL1-N-Lys/PEGMUA(1:3) (rechts) in verschiedenen Medien: nach 4 Wochen in PBS (blaue Linien), 1 Minute in ACSF (rote Linien) und 24 Stunden in ACSF (orangene Linien). Zum Vergleich sind Absorbanzspektren von AuNP40@Citrate (in ~ 2.2 mM S.C., citratstabilisierte AuNP sind in PBS und ACSF nicht stabil) gezeigt (schwarze, gestrichelte Linien). Abbildung mit Änderungen übernommen aus den SI zu Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Die Konjugate waren stabil in PBS und ACSF in den relevanten Zeiträumen und wurden daher für die *in vitro* Tests verwendet. Die *in vitro* Tests wurden von den Kooperationspartnern am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

3.4.2 Biologische Funktionalität der AuNP@L1-Konjugate

3.4.2.1 Vergleich der Wirkung von L1-Peptid und AuNP@L1- Konjugaten

Die biologische Aktivität der beschriebenen AuNP@L1-Konjugate wurde mit verschiedenen primären murinen Neuronen, sowie murinen Schwann-Zellen getestet. Abbildung 3.10 zeigt den Vergleich der Wirksamkeit eines L1-Peptids ohne Spacer und Cystein-Einheit mit der von AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3). Da der footprint von mL1-C-Lys und dessen genauer Anteil in der gemischten Ligandenhülle nicht bekannt ist, kann die Äquivalenzkonzentration nur grob abgeschätzt werden. Unter der Annahme, dass durchschnittlich 1400 Peptidmoleküle pro AuNP gebunden sind, ergibt sich bei einer AuNP-Konzentration von 0.14 nM eine Äquivalenzkonzentration des Peptids von 200 nM.



Abb. 3.10: Vergleich der Wirkung von freiem L1-Peptid und AuNP@L1-Konjugaten. Neuritenwachstum zerebellärer Neuronen auf einem neutralen PLL-Substrat in Gegenwart von AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3) oder 4200 nM L1-Peptid. Die Konzentration von konjugiertem mL1-C-Lys wurde mit ~200 nM grob abgeschätzt. Das Neuritenwachstum in Kulturmedium ohne Peptide (PLL) diente als Referenz (100 %). Das Neuritenwachstum wurde nach 24 h in Kultur bestimmt. Es wurden mindestens 100 Zellen pro Experiment vermessen und die Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten für jede Behandlung. *** p < 0.0005 Student-t-Test. Abbildung mit Änderungen übernommen aus den SI zu Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Der Vergleich deutet darauf hin, dass deutlich weniger Peptidkonzentration nötig ist, um eine biologische Wirkung zu erzielen, wenn das Peptid an AuNP gebunden ist. Die Berechnung eines Verstärkungsfaktor ist allerdings erst sinnvoll, wenn die Anzahl der konjugierten Peptide zuverlässiger bestimmt werden kann.

Versuche mit Neuronen von L1-defizienten Mäusen zeigten zudem, dass die Wirkung des L1-Peptids und der Konjugate auf Wechselwirkungen mit zellulärem L1 beruhen, denn auf Zellen ohne L1 wurde keine Wirkung beobachtet. Die spezifische Interaktion der L1-Peptide mit L1-Proteinen wurde zusätzlich auch in sogenannten bead aggregation assays nachgewiesen. Details zu diesen Assays finden sich in Ref.[330].

3.4.2.2 Vorversuche zur biologischen Wirkung von AuNP@L1-Konjugaten auf Neuronen

Über das L1-Zelladhäsionsmolekül können Neuritenwachstum bzw. Neuritogenese stimuliert werden und schützende Funktionen aktiviert werden (Neuroprotektion). Ob diese Funktionen auch durch AuNP@L1-Peptid-Konjugate stimuliert werden, wurde in Vorversuchen an murinen zerebellären Granular- bzw. Körnerzellen (engl.: cerebellar granule neurons, kurz: zerebelläre Neuronen) getestet. Die Neuritogenese und das Zellüberleben solcher zerebellären Neuronen wurde in der Gegenwart von AuNP14@PEGMUA und AuNP14@mL1-N-Lys/PEGMUA in allen synthetisierten Zusammensetzungen der Ligandenhülle (3:1, 1:1 und 1:3) untersucht, als Kontrolle und Referenz dienten zerebelläre Neuronen auf dem neutralem Substrat PLL. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 gezeigt. Bemerkenswerterweise wurde das Neuritenwachstum deutlich stärker von den Konjugaten stimuliert, die mit einem Überschuss PEGMUA synthetisiert wurden, und die Effektivität der Stimulation korrelierte mit dem Anteil von PEGMUA in der Ligandenhülle. Während AuNP14@mL1-N-Lys/PEGMUA(1:3) das Neuritenwachstum am stärksten stimulierten, war das Neuritenwachstum in Gegenwart von AuNP14@mL1-N-Lys/PEGMUA(3:1) nur wenig stärker als bei der Kontrolle und nicht signifikant stärker als in Gegenwart reiner AuNP14@PEGMUA-Konjugate.



Abb. 3.11: Verstärkung der Neuritogenese und verbessertes Zellüberleben durch AuNP@L1-Konjugate. (A) Zerebelläre Neuronen wurden mit L1-funktionalisierten AuNP (AuNP14@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(3:1), -(1:1) oder -(1:3)) und AuNP ohne L1-Peptid (AuNP14@PEGMUA) oder nur mit Puffer (PLL) versetzt und die Neuritogenese bestimmt. Für jede Behandlung wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet und die Ergebnisse wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten erhalten. (B) Zur Bestimmung der Neuroprotektion wurden zerebelläre Neuronen mit denselben Konjugaten wie in A oder mit Puffer (PLL) und anschließend mit 10 µM Wasserstoffperoxid behandelt, um den Zelltod zu induzieren. Nach 24 Stunden wurde das Zellüberleben bestimmt. Für jede Behandlung wurden mindestens 500 Zellen gezählt und die Ergebnisse wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten erhalten (***p < 0.0001; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukeys Post-Hoc Test). Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Dass die AuNP@PEGMUA-Konjugate ebenfalls das Neuritenwachstum leicht stimulierten, ist eine weitere interessante Beobachtung. In der Tat wurde in mehreren Studien, vor allem aus der Gruppe von Borgens, gezeigt, dass PEG Neuritenwachstum stimulieren und sogar die Genesung von Hunden und anderen Säugetieren mit Wirbelsäulenverletzungen deutlich verbessern kann.^{331–335} Insofern käme den koadsorbierten PEG-Molekülen eine weitere Funktion - neben Stabilisierung, Verbesserung der Mobilität und Wasserlöslichkeit und Verringerung der Immunogenität - zu, die nicht notwendig für die Aktivität der Konjugate ist, aber bei gezielter Optimierung deren Effektivität noch verbessern könnte. Z.B. ist es denkbar, dass längere PEG-Moleküle einen noch stärkeren Effekt auf das Neuritenwachstum haben.

Der gleiche Trend wie bei der Stimulation des Neuritenwachstums wurde auch bei der neuroprotektiven Wirkung beobachtet: je größer der Anteil von PEGMUA in der Ligandenhülle, desto höher die Zahl der Neuronen, die oxidativen Stress durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid überlebten. Während weniger als 40 % der Kontrollzellen die Behandlung mit Wasserstoffperoxid überlebten, wurden in Gegenwart von AuNP14@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) etwa 90% der Zellen vor dem Zelltod geschützt. Ein schützender Effekt der AuNP@PEGMUA-Konjugate wurde dagegen nicht beobachtet. Auf Zellen von L1defizienten Mäusen wurden Neuritogenese und Zellüberleben nicht signifikant durch die AuNP@L1-Peptid-Konjugate beeinflusst, was zeigt, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf eine Interaktion der konjugierten L1-Peptide mit zellulärem L1 zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Funktionalität des L1-Peptids erhalten bleibt, wenn es an AuNP konjugiert wird und dessen Effektivität durch Koadsorption von PEGMUA deutlich verbessert wird. Dafür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen wird durch PEG die Löslichkeit der Konjugate verbessert und unspezifische Interaktionen von Partikeln und Zellen^{165,242} und Partikeln und Proteinen¹³³ werden verringert. Zum anderen verringert PEGMUA, wie auch in den Agglomerationsexperimenten gezeigt, die homophile Bindung der konjugierten Peptide, die zu Agglomeration der Konjugate und vermutlich einer Verringerung ihrer Aktivität führt. Ebenso wird durch einen hohen Anteil von PEGMUA die Wahrscheinlichkeit verringert, dass L1-Peptide auf demselben Partikel miteinander wechselwirken und dadurch deaktiviert werden. Insofern ist die Koadsorption von PEGMUA auch eine Frage der richtigen Balance, denn die Wechselwirkungen konjugierter L1-Peptide untereinander sollen dadurch unterdrückt werden, deren Wechselwirkungen mit zellulärem L1 jedoch nicht.

3.4.2.3 Analyse der zellulären Bindung von AuNP@L1-Konjugaten mittels SEM

Um die Verteilung der AuNP@L1-Peptid-Konjugate auf der neuronalen Oberfläche zu untersuchen, wurden zerebelläre Neuronen mit AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) oder mit AuNP40@PEGMUA inkubiert und anschließend mittels SEM analysiert (Abb. 3.12). Die

Konjugate mit Peptid, AuNP40@mL1-N-Lys/PEGMUA(1:3), wurden vorwiegend in größeren Clustern auf den Zellkörpern und den Neuriten detektiert (Abb. 3.12 A-C), wo sie vermutlich an zelluläres L1 binden. Der Anteil solcher Cluster war auf Zellen, die mit AuNP40@PEGMUA behandelt worden waren, deutlich geringer (Abb. 3.12 D), es wurde aber auch ein kleiner Teil, vermutlich durch unspezifische Bindung oder Eintrocknungseffekte, adsorbierter AuNP detektiert. Die SEM-Ergebnisse sind alleine nicht beweiskräftig, im Kontext der Zellexperimente unterstützen sie jedoch die Hypothese, dass nur AuNP@L1-Peptid-Konjugate spezifisch an Neuronen binden. Eine vergleichbare Bindung der AuNP@L1-Peptid-Konjugate an Neuronen von L1-defizienten Mäusen wurde nicht beobachtet.



Abb. 3.12: Analyse der zellulären Bindung von AuNP@L1-Konjugaten mittels SEM. SEM-Aufnahmen von zerebellären Granularzellen nach Behandlung mit AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) (A-C) oder mit AuNP40@PEGMUA (D). Im Überblick über mehrere Zellen wurden die Konjugate AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) vor allem als Cluster auf den Zellkörpern und entlang der Neuriten nachgewiesen, während in den zellfreien Räumen kaum Partikel detektiert wurden (A). B und C zeigen jeweils die Vergrößerung des markierten Areals in A bzw. B. Auf den mit AuNP40@PEGMUA behandelten Zellen wurden nur sehr wenige Cluster detektiert (D). Abbildung mit Genehmigung übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* 2013, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

3.4.2.4 Systematische Tests mit verschiedenen AuNP@L1-Konjugaten und an verschiedenen Typen von Neuronen

Nachdem experimentell bestätigt war, dass ein Überschuss an PEGMUA in der Ligandenhülle die biologische Aktivität der AuNP@L1-Peptid-Konjugate steigert, wurden weitere Parameter der Konjugate variiert, um ihren Einfluss auf deren Aktivität zu untersuchen. Verschiedene Partikelgrößen, d = 14 und 40 nm, wurden getestet, und die Präsentation der L1-Peptide in den Konjugaten wurde variiert, indem diese über den *N*-Terminus (mL1-*N*-Lys), oder über den *C*-Terminus (mL1-*C*-Lys) an die AuNP gebunden wurden. Die Wirkung der Konjugate wurde an murinen zerebellären Neuronen (Körnerzellen), Motoneuronen und dorsalen Hinterwurzelganglienneuronen untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 zusammengefasst.



Abb. 3.13: Neuritogenese von murinen zerebellären Neuronen, Motoneuronen und dorsalen Hinterwurzelganglienneuronen in Gegenwart L1-funktionalisierter AuNP. Zerebelläre Neuronen (A), Motoneuronen (B) und dorsale Hinterwurzelganglienneuronen (C) wurden mit AuNP14-Konjugaten (AuNP14@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP14@mL1-*C*-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP14@-PEGMUA), mit AuNP40-Konjugaten (AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP40@mL1-*C*-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP40@PEGMUA) oder nur mit Kulturmedium (PLL oder Poly-L-Ornithin, PLO) versetzt. Nach 24 Stunden in Kultur wurden die Zellen fixiert, angefärbt und die Neuritogenese wurde bestimmt. Für jede Behandlung wurden mindestens 100 Zellen gezählt und die Ergebnisse wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten erhalten (***p < 0.0001; Einfaktorielle ANOVA mit Tukeys Post-Hoc Test). Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus Schulz *et al. Nanoscale* **2013**, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

Die AuNP@PEGMUA Konjugate stimulierten das Neuritenwachstum aller Neuronen nur schwach oder gar nicht, während die gemischten Konjugate das Neuritenwachstum aller Neuronen deutlich stärker stimulierten. Interessanterweise wurden weder bezüglich der Partikelgröße noch der *N*- oder *C*-terminalen Peptidpräsentation klare Trends oder Abhängigkeiten der stimulatorischen Aktivität festgestellt. Vielmehr war die Stimulation in fast allen Experimenten sehr ähnlich, mit Ausnahme der Neuritogenese von Motoneuronen, die deutlich stärker durch AuNP40@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) stimuliert wurde und der Neuritogenese

von dorsalen Hinterwurzelganglienneuronen, die deutlich schwächer durch AuNP14@mL1-*N*-Lys/PEGMUA(1:3) stimuliert wurde. Dass die Aktivität der Konjugate im untersuchten Größenbereich nicht von der Partikelgröße abhängt ist ein wichtiger Vorteil für *in vivo* Experimente und therapeutische und diagnostische Anwendungen, denn die Biodistribution hängt in der Regel von der Partikelgröße ab.^{146,178} Insbesondere wenn Barrieren wie die BBB überwunden werden müssen, dürften kleinere Partikel überlegen sein.³³⁶ Für verschiedene Imaging-Methoden können dagegen größere Partikel vorteilhaft sein.^{156,337} Warum die Stimulation nicht von der Präsentation der Peptide abhängt, ist nicht geklärt. Einen Hinweis könnte eine einfache Modellierung der Peptidstrukturen auf der AuNP-Oberfläche liefern, die ergab, dass beide Peptide sich derart falten, dass ähnliche Bereiche der Sequenz exponiert sind (Abb. 3.14).^{338,339} Unabhängig davon, wie realistisch diese Modellierung eingeschätzt wird, führt dies zu der Vermutung, dass die für die Bindung an zelluläres L1 relevanten Bereiche der Peptidsequenzen bei *N*- und *C*-terminaler Anbindung vergleichbar gut präsentiert werden.



Abb. 3.14: Modellierte Strukturen der verschiedenen L1-Peptide. Die Strukturen des L1-Peptids mit *N*-terminalem Cystein und Lysin-Linker (mL1-*N*-Lys, **a** und **c**) und mit *C*-terminalem Cystein und Lysin-Linker (mL1-*C*-Lys, **b** und **d**) wurden mit dem PEP-FOLD peptide structure prediction server modelliert.^{338,339} Die wahrscheinlichsten Strukturen der Peptide (**a**, **b**) und mögliche Orientierungen der an AuNP gebundenen Peptide (**c**, **d**) sind gezeigt. Durch die Faltung in eine Schlaufenstruktur werden möglicherweise unabhängig von der *N*- oder *C*-terminalen Anbindung an die AuNP die Bereiche exponiert, die für die biologische Aktivität besonders wichtig sind. Abbildung mit Änderungen übernommen aus den SI zu Schulz *et al. Nanoscale* **2013**, *5*, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

3.4.2.5 Wirkung von AuNP@L1-Konjugaten auf Schwann-Zellen

Schwann-Zellen sind Gliazellen, die die Axone des peripheren Nervensystems umhüllen und durch eine Myelinscheide elektrisch isolieren können.³⁴⁰ Die Myelinisierung erfolgt durch Herumwachsen der Schwann-Zelle um das Axon, so dass dieses schließlich vielfach von der Schwann-Zelle umwickelt ist. Schwann-Zellen, die das Axon nur einfach umhüllen, werden als nicht-myelinisierende Schwann-Zellen bezeichnet, sie spielen eine wichtige Rolle für das neuronale Überleben und die Reparatur von Axonen. Das L1-Protein befindet sich neben Neuronen auch auf nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen. Es kann die Proliferation von Schwann-Zellen verstärken und beeinflusst Myelinisierung und Ausbreitung von Fortsätzen (engl.: processes) der Schwann-Zellen über die axonale Oberfläche.^{341–343,307}

Der Einfluss der AuNP@L1-Peptid-Konjugate auf die Länge der Fortsätze von Schwann-Zellen und deren Proliferation wurde getestet, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 gezeigt. Während die PEGMUA-Konjugate AuNP14@PEGMUA und AuNP40@PEGMUA das Wachstum der Fortsätze nur schwach stimulierten, wurden in Gegenwart der Peptidkonjugate deutlich längere Fortsätze erhalten. Im Gegensatz zur größenunabhängigen Stimulation der Neuronen, schienen die größeren AuNP40-Konjugate auf Schwann-Zellen eine bessere Wirkung zu zeigen. Die Wirkung auf die Proliferation von Schwann-Zellen wurde mit AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3) getestet. Die Proliferation wurde bereits durch AuNP40@PEGMUA schwach stimuliert, die Stimulation durch AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3) war jedoch signifikant stärker.

Es konnte in dieser Studie somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die gleichen funktionalisierten Nanopartikel sowohl auf Neuronen, als auch auf Schwann-Zellen wirken können und das Wachstum und Überleben beider Zelltypen stimulieren. Die Stimulation dieser beiden Zelltypen ist von großer Bedeutung für die Regeneration geschädigten Nervengewebes. Die Anwendung von AuNP-Konjugaten könnte bei der Behandlung, z.B. von Wirbelsäulenverletzungen, den Vorteil haben, dass die vergleichsweise kleinen Konjugate tiefer in das Gewebe eindringen können als z.B. L1-exprimierende Stammzellen und dass sie stabiler sind als Fusionsproteine, die durch schnelle Proteolyse abgebaut werden können.



Abb. 3.15: Stimulation des Wachstums von Fortsätzen und der Proliferation von Schwann-Zellen. Das Wachstum (A) und die Proliferation (B) von Schwann-Zellen wurde nach der Behandlung mit Kulturmedium (PLL) allein oder Medium mit AuNP-Konjugaten (A: AuNP14@mL1-N-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP14@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP14@PEGMUA und AuNP40@mL1-N-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3), AuNP40@PEGMUA; **B**: AuNP40@mL1-C-Lys/PEGMUA(1:3) und AuNP40@PEGMUA) untersucht. Das Wachstum der Fortsätze wurde nach 24 Stunden bestimmt. Um die Proliferation der Schwann-Zellen zu bestimmen, wurden diese zusätzlich mit 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) behandelt (magentafarben: proliferierende Zelle, blau: nicht-proliferierende Zelle) und nach 48 Stunden die Proliferation analysiert. Für jede Behandlung wurden mindestens 100 Zellen gezählt und die Ergebnisse wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten erhalten (***p < 0.0001; Einfaktorielle ANOVA mit Tukeys Post-Hoc Test). Abbildung mit Genehmigung bearbeitet und übernommen aus Schulz et al. Nanoscale 2013, 5, 10605–10617; Copyright (2013) Royal Society of Chemistry.

3.4.3 Fazit zu Kapitel 3

In dieser Studie konnte gezeigt werden, wie durch Reaktion einer optimierten Mischung von PEGMUA und spezieller L1-Peptide mit AuNP stabile Konjugate erhalten werden. Die Zusammensetzung der Ligandenhülle konnte dabei über die initiale Ligandenzugabe kontrolliert werden, was mittels zeitaufgelöster UV/vis-Spektroskopie über die Agglomerationskinetiken der Konjugate nachgewiesen werden konnte.

Die stabilen Konjugate stimulierten L1-vermittelte Funktionen, so dass Neuronen in Zellkultur höheres Zellüberleben und stärkeres Neuritenwachstum im Vergleich zu Kontrollen zeigten. Das Wachstum der Fortsätze von Schwann-Zellen und deren Proliferation wurde ebenfalls stimuliert. Der Vergleich mit Zellen von L1-defizienten Mäusen zeigte, dass diese Funktionen auf Wechselwirkungen mit zellulärem L1 zurückzuführen sind. Die Wirkung der Konjugate war weitestgehend unabhängig davon, ob AuNP mit 14 oder 40 nm Durchmesser verwendet wurden. Auch die *N*- oder *C*-terminale Anbindung der Peptide beeinflusste die Aktivität in den meisten Experimenten nicht. Die Ergebnisse zeigen, dass in Form der L1-Peptide das L1-Zelladhäsionsmolekül auf einige seiner essentiellen Funktionen reduziert und auf einer stabilen Nanopartikel-Plattform präsentiert werden kann, die wichtige Vorteile für die therapeutische Nutzung dieser Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem mit sich bringt.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Synthese und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln, AuNP, in wässrigen Lösungen untersucht. Diese Partikel zeichnen sich durch ihre besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften aus und haben ein enorm breites Anwendungspotential z.B. in der Katalyse, Elektronik, Sensorik, Biotechnologie und Medizin.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Studien zur Synthese von citratstabilisierten AuNP nach der von Turkevich *et al.* etablierten Methode und mit der Seeded Growth Methode vorgestellt. In einer Variation der Turkevich-Synthese wurde durch Verwendung eines Citratpuffers anstelle einer Citratlösung der pH-Wert als entscheidender Parameter der Reaktion kontrolliert und durch einfache Änderungen der Reaktionsführung eine schnellere Durchmischung der Reagenzien erreicht. Mit der optimierten Synthese wurden citratstabilisierte AuNP mit engerer Größenverteilung, und besserer Reproduzierbarkeit der Größe bei gleichzeitig größeren Ansätzen erhalten. Die Variation der Partikeldurchmesser in mehreren Synthesen lag mit der optimierten Methode unter 1.5 % im Vergleich zu etwa 20 % mit der herkömmlichen Methode, die Polydispersitäten lagen bei 8 % im Vergleich zu 10-15 % und die Ansatzgröße betrug 1000 ml im Vergleich zu 150 ml.

Durch die Untersuchungen zur Seeded Growth Synthese konnten Empfehlungen entwickelt werden, mit denen AuNP mit Durchmessern von 12-80 nm besser reproduzierbar und mit besser einstellbarer Größe, sowie mit höherer Stabilität synthetisiert werden können als in publizierten Protokollen und wie unerwünschte Sekundärnukleation und unvollständiger Precursorumsatz vermieden werden können.

Im zweiten Kapitel wurde die Funktionalisierung von AuNP mit Polyethylenglykol-(PEG-) Liganden untersucht, die von herausragender Bedeutung in der Nanomedizin und Biotechnologie sind. Es wurden AuNP, verschiedene PEG-Liganden und die Konjugate synthetisiert und charakterisiert. Es wurde die Stabilisierung der AuNP gegen oxidatives Ätzen mit Cyanid untersucht, aber auch die gegen Elektrolyt-induzierte Aggregation und kompetitiven Austausch mit Dithiothreitol. Durch diese **Stabilitätstest** konnten Zusammenhänge von Ligandenstruktur und Stabilisierung herausgearbeitet werden. Es wurde der Einfluss von Ligandenlänge und -Zähnigkeit untersucht, ein besonderer Schwerpunkt lag aber auf der verbindenden Struktur zwischen Kopfgruppe und PEG-Rest, dem Spacer. Es konnte der enorme Einfluss des Spacers auf die Stabilität der AuNP-Konjugate gezeigt werden, der deutlich wichtiger scheint als der von PEG-Länge und Zähnigkeit der Kopfgruppe. Als entscheidendes strukturelles Merkmal wurde die Länge des Spacers gefunden. Ein monodentater PEG-Ligand mit einem C_{10} -Alkylspacer, PEGMUA, stabilisierte AuNP über 20 h gegen oxidatives Ätzen mit 100 mM Cyanid, während PEG-Liganden mit kürzeren Spacern unter gleichen Bedingungen nur wenige Minuten stabilisierten.

Weiterhin wurde in diesem Kapitel der Mechanismus der Ätzreaktion von AuNP@PEGMUA-Konjugaten untersucht und der Einfluss von ungebundenen Liganden nachgewiesen. Auf dieser Basis wurde ein vereinfachendes Modell der Ätzreaktion entwickelt, dass die Konkurrenz von Liganden- und Ätzreaktion berücksichtigt. Mit diesem Modell können verschiedene experimentelle Beobachtungen erklärt werden. Ein besseres Verständnis der Ätzreaktion kann helfen, ihren analytischen Wert zu steigern, aber auch, sie für synthetische Anwendungen weiterzuentwickeln.

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, dass neurologisch wirksame L1-Peptide in Kombination mit PEGMUA an AuNP gebunden werden können, um ihre Wasserlöslichkeit zu verbessern und Homoaggregation zu unterdrücken. Mittels zeitaufgelöster UV/vis-Spektroskopie wurden die Agglomerationskinetiken der AuNP@L1-Konjugate untersucht. Über das Agglomerationsverhalten konnte die erfolgreiche Bindung von L1-Peptiden, Kontrolle ihres Anteils (L1-Peptid:PEGMUA) in der gemischten Ligandenhülle und die Stabilisierung durch Koadsorption von PEGMUA belegt werden. Die Stabilität der Konjugate mit ausreichendem PEGMUA-Überschuss in relevanten biologischen Puffern wurde über DLS-Messungen und UV/vis-Spektroskopie nachgewiesen. Es wurden Konjugate mit verschiedenen AuNP-Größen, Zusammensetzungen der Ligandenhüllen und Orientierungen der gebundenen L1-Peptide synthetisiert, die dann von Kooperationspartnern am Zentrum für Molekulare Neurobiologie an verschiedenen primären murinen Neuronen und Schwann-Zellen hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit getestet wurden. Alle AuNP@L1-Konjugate zeigten auf allen Zelltypen eine signifikant höhere biologische Aktivität als Kontrollen und reine AuNP@-PEGMUA-Konjugate ohne L1-Peptid. In dieser Studie wurde zum ersten Mal demonstriert, dass funktionalisierte AuNP sowohl auf Neuronen als auch auf Schwann-Zellen wirken und Wachstum und Überleben beider Zelltypen stimulieren können. Die AuNP@L1-Konjugate sind vielversprechende Kandidaten für die Therapie von Wirbelsäulenverletzungen und in laufenden und zukünftigen Studien soll deren Aktivität in vivo untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

Abstract

The focus of this work was the synthesis and functionalization of gold nanoparticles, AuNP, in aqueous media. These particles feature unique physical and chemical properties and have high potential in a broad range of applications, e.g. in catalysis, electronics, sensing, biotechnology and medicine.

In the first chapter of the thesis, investigations of the well-established Turkevich-synthesis of citrate-stabilized AuNP and of the seeded growth method were presented. The Turkevich-synthesis was improved by using a citrate-buffer instead of a citrate-solution, to control the pH of the solution as a key parameter and by straightforward adjustments of the original protocol to improve the mixing of the reagents. The optimized synthesis yielded larger volumes of citrate-stabilized AuNP with improved monodispersity and better reproducibility of the AuNP-diameter. The variation of the AuNP-diameter was below 1.5 % with the optimized protocol, compared to about 20 % with the original one, the polydispersities were around 8 %, compared to 10-15 % and 1000 ml of AuNP were obtained, compared to 150 ml.

By studying the seeded growth method, strategies were developed, which allow to synthesize AuNP with diameters from 12-80 nm with improved reproducibility and better control of particle size as well as higher stability compared to published protocols. These strategies also help to avoid secondary nucleation and incomplete reaction of precursor.

In the second chapter the functionalization of AuNP with poly(ethylene glycol)- (PEG-) based ligands was investigated. AuNP, PEG-ligands und AuNP-conjugates were synthesized and characterized. Mainly, the stabilization of AuNP against oxidative etching with cyanide was tested, but also that against electrolyte-induced aggregation and competitive displacement with dithiothreitol. With such stability tests, relationships of ligand structure and stabilization could be deduced. The influence of ligand-length and -denticity was also tested, but the main focus was on the structure connecting the headgroup with the PEG-moiety, the spacer. The enormous impact of the spacer on AuNP-conjugate stability was shown, which seems to be much more important than that of PEG-length and headgroup denticity. As a key structural feature, the length of the spacer was identified. A monodentate PEG-ligand with a C_{10} -alkyl spacer, PEGMUA, stabilized AuNP for 20 h against oxidative etching with 100 mM cyanide,

while PEG-ligands with shorter spacers stabilized just a few minutes under the same conditions.

Additionally, the mechanism of AuNP-conjugate etching was investigated in this chapter and the influence of unbound ligands was shown. Based on these experiments a simplifying model of the etching reaction was developed, that takes into account the competition of ligand and etching reaction. With this model several experimental findings can be explained. A better understanding of the etching reaction can help to improve its value as an analytical tool and also to further develop it for synthetic applications.

In the third chapter it was shown that neurologically active L1-peptides can be bound to AuNP in combination with PEGMUA to improve their solubility in water and suppress homoaggregation. The kinetics of AuNP@L1-conjugate agglomeration were analyzed by time-resolved UV/vis spectroscopy. By analyzing the agglomeration processes, the binding of L1-peptides, control of their ratio (L1-peptide:PEGMUA) in the mixed ligand layers and the stabilization by coadsorption of PEGMUA was proved. The stability of conjugates with sufficient excess of PEGMUA in the ligand layer in relevant biological buffers was confirmed by DLS- and UV/vis-analyses. Conjugates with different AuNP-diameters, compositions of the ligand layers and orientations of the L1-peptides were synthesized and then tested with different types of primary neurons and Schwann-cells for biological activity by project partners at the Center for Molecular Neurobiology, Hamburg. All AuNP@L1-conjugates showed significantly higher activity on all types of cells than controls and AuNP@PEGMUA-conjugates with no L1-peptides. This study demonstrated for the first time that functionalized AuNP can act on both neurons and Schwann-cells and stimulate growth and survival of these cell types. These AuN@L1-conjugates are promising candidates for the therapy of spinal cord injuries and ongoing and future studies will test and, if necessary, optimize their in vivo activity.

Referenzen

- 1. Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, *147*, 145–181.
- 2. 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*, 293–346.
- 3. Reddy, V. R. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Synlett* **2006**, 2006, 1791–1792.
- 4. Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* **1908**, *330*, 377–445.
- 5. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- 6. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779.
- 7. Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 638–665.
- 8. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20–22.
- 9. Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing Versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.
- 10. Li, C.; Li, D.; Wan, G.; Xu, J.; Hou, W. Facile Synthesis of Concentrated Gold Nanoparticles with Low Size-distribution in Water: Temperature and pH Controls. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 440.
- 11. Njoki, P. N.; Luo, J.; Kamundi, M. M.; Lim, S.; Zhong, C.-J. Aggregative Growth in the Size-Controlled Growth of Monodispersed Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26*, 13622–13629.
- 12. Ojea-Jiménez, I.; Bastús, N. G.; Puntes, V. Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. J. Phys. Chem. C 2011, 115, 15752–15757.
- 13. Xia, H.; Bai, S.; Hartmann, J.; Wang, D. Synthesis of Monodisperse Quasi-Spherical Gold Nanoparticles in Water via Silver(I)-Assisted Citrate Reduction. *Langmuir* **2010**, *26*, 3585–3589.
- 14. Ziegler, C.; Eychmüller, A. Seeded Growth Synthesis of Uniform Gold Nanoparticles with Diameters of 15-300 Nm. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 4502–4506.
- 15. LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 4847–4854.
- Privman, V.; Goia, D. V.; Park, J.; Matijević, E. Mechanism of Formation of Monodispersed Colloids by Aggregation of Nanosize Precursors. J. Colloid Interface Sci. 1999, 213, 36–45.
- 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, 6281–6287.
- 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. 2007, 129, 13939– 13948.

- 19. Polte, J.; Ahner, T. T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thuenemann, A. F.; Kraehnert, R. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1296–1301.
- 20. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- 21. Chow, M. K.; Zukoski, C. F. Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *165*, 97–109.
- 22. Freund, P. L.; Spiro, M. Colloidal Catalysis: The Effect of Sol Size and Concentration. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1074–7.
- 23. Kumar, S.; Gandhi, K. S.; Kumar, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 3128–3136.
- 24. Balasubramanian, S. K.; Yang, L.; Yung, L.-Y. L.; Ong, C.-N.; Ong, W.-Y.; Yu, L. E. Characterization, Purification, and Stability of Gold Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9023–9030.
- 25. Grzelczak, M.; Pérez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. M. Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1783–1791.
- 26. Rojas, M. I.; Sanchez, C. G.; Pópolo, M. G. D.; Leiva, E. P. M. Erratum to: "An Embedded Atom Approach to Underpotential Deposition Phenomena": [Surf. Sci. 421 (1999) 59]. Surf. Sci. 2000, 453, 225–228.
- 27. Sánchez, C. G.; Pópolo, M. G. D.; Leiva, E. P. M. An Embedded Atom Approach to Underpotential Deposition Phenomena. *Surf. Sci.* **1999**, *421*, 59–72.
- Cubillana-Aguilera, L. M.; Franco-Romano, M.; Gil, M. L. A.; Naranjo-Rodríguez, I.; Cisneros, J. L. H.-H. de; Palacios-Santander, J. M. New, Fast and Green Procedure for the Synthesis of Gold Nanoparticles Based on Sonocatalysis. *Ultrason. Sonochem.* 2011, 18, 789–794.
- 29. Su, C.-H.; Wu, P.-L.; Yeh, C.-S. Sonochemical Synthesis of Well-Dispersed Gold Nanoparticles at the Ice Temperature. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14240–14243.
- 30. Kim, J.-H.; Lavin, B. W.; Burnett, R. D.; Boote, B. W. Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles by Fluorescent Light Irradiation. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 285602.
- 31. Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puntes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. J. Phys. Chem. C 2010, 114, 1800–1804.
- 32. Brown, K. R.; Natan, M. J. Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces. *Langmuir* **1998**, *14*, 726–728.
- 33. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seeding Growth for Size Control of 5-40 Nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2001**, *17*, 6782–6786.
- 34. Rodriguez-Fernandez, J.; Perez-Juste, J.; Garcia, F. J. de Abajo; Liz-Marzan, L. M. Seeded Growth of Submicron Au Colloids with Quadrupole Plasmon Resonance Modes. *Langmuir* **2006**, *22*, 7007–7010.
- 35. Polte, J.; Herder, M.; Erler, R.; Rolf, S.; Fischer, A.; Wurth, C.; Thunemann, A. F.; Kraehnert, R.; Emmerling, F. Mechanistic Insights into Seeded Growth Processes of Gold Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, *2*, 2463–2469.
- 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, 306–313.
- 37. Alkilany, A. M.; Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The Gold Standard: Gold Nanoparticle Libraries To Understand the Nano-Bio Interface. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 650–661.

- 38. Perrault, S. D.; Chan, W. C. W. Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200 Nm. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 17042–17043.
- Niu, J.; Zhu, T.; Liu, Z. One-step Seed-mediated Growth of 30-150 nm Quasispherical Gold Nanoparticles with 2-mercaptosuccinic Acid as a New Reducing Agent. *Nanotechnology* 2007, 18, 325607.
- 40. Liu, X.; Xu, H.; Xia, H.; Wang, D. Rapid Seeded Growth of Monodisperse, Quasi-Spherical, Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles via H2O2 Reduction. *Langmuir* **2012**, 28, 13720–13726.
- 41. Gao, C.; Vuong, J.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Yin, Y. One-step Seeded Growth of Au Nanoparticles with Widely Tunable Sizes. *Nanoscale* **2012**, *4*, 2875–2878.
- 42. Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G.; Nes, K. van *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Dover, Mineola (N.Y.), 1999.
- 43. Ghosh, S. K.; Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4797–4862.
- 44. Akbulut, O.; Mace, C. R.; Martinez, R. V.; Kumar, A. A.; Nie, Z.; Patton, M. R.; Whitesides, G. M. Separation of Nanoparticles in Aqueous Multiphase Systems Through Centrifugation. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 4060–4064.
- 45. Qiu, P.; Mao, C. Viscosity Gradient as a Novel Mechanism for the Centrifugation-Based Separation of Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4880–4885.
- 46. Steinigeweg, D.; Schütz, M.; Salehi, M.; Schlücker, S. Fast and Cost-Effective Purification of Gold Nanoparticles in the 20-250 Nm Size Range by Continuous Density Gradient Centrifugation. *Small* **2011**, *7*, 2443–2448.
- 47. Lavrich, D. J.; Wetterer, S. M.; Bernasek, S. L.; Scoles, G. Physisorption and Chemisorption of Alkanethiols and Alkyl Sulfides on Au(111). *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3456–3465.
- 48. 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*, 1103–1170.
- 49. Rouhana, L. L.; Moussallem, M. D.; Schlenoff, J. B. Adsorption of Short-Chain Thiols and Disulfides onto Gold Under Defined Mass Transport Conditions: Coverage, Kinetics, and Mechanism. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 16080–16091.
- 50. Schreiber, F. Self-assembled Monolayers: From 'simple' Model Systems to Biofunctionalized Interfaces. J. Phys.: Condens. Matter 2004, 16, R881.
- 51. Häkkinen, H. The Gold-sulfur Interface at the Nanoscale. *Nat. Chem.* 2012, *4*, 443–455.
- 52. Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir* **2009**, *25*, 13840–13851.
- 53. Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W. Monolayer-Protected Cluster Molecules. *Acc. Chem. Res.* 2000, *33*, 27–36.
- 54. Drude, P. Zur Elektronentheorie Der Metalle. Ann. Phys. 1900, 306, 566–613.
- 55. Lorentz, H. A. The Theory of Electrons and Its Applications to the Phenomena of Light and Radiant Heat.; 2nd ed.; Teubner, Leipzig, 1916.
- 56. Bethe, H. A.; Sommerfeld, A. *Elektronentheorie Der Metalle*; Heidelberger Taschenbücher, 19; Springer, Berlin, New York, 1967; pp. 1–36.
- 57. Greiner, W. Theoretische Physik: Klassische Elektrodynamik; 7th ed.; Deutsch, Frankfurt, M., 2008.
- 58. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668–677.

- 59. Kreibig, U.; Vollmer, M. *Optical Properties of Metal Clusters*; Springer series in materials science, v. 25.; Springer, Berlin, New York, 1995.
- 60. Mulvaney, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* **1996**, *12*, 788–800.
- 61. Sönnichsen, C. Plasmons in Metal Nanostructures, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001.
- 62. Ringler, M. Plasmonische Nahfeldresonatoren Aus Zwei Biokonjugierten Goldnanopartikeln, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2008.
- 63. Boisselier, E.; Astruc, D. Gold Nanoparticles in Nanomedicine: Preparations, Imaging, Diagnostics, Therapies and Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759–1782.
- 64. 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*, 409–453.
- 65. Berciaud, S.; Cognet, L.; Tamarat, P.; Lounis, B. Observation of Intrinsic Size Effects in the Optical Response of Individual Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 515–518.
- 66. Myroshnychenko, V.; Rodriguez-Fernandez, J.; Pastoriza-Santos, I.; Funston, A. M.; Novo, C.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M.; Abajo, F. J. Garcia de Modelling the Optical Response of Gold Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1792–1805.
- 67. Millstone, J. E.; Hurst, S. J.; Métraux, G. S.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms. *Small* **2009**, *5*, 646–664.
- 68. Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. J. Phys. Chem. B 1999, 103, 8410–8426.
- 69. Gans, R. Über Die Form Ultramikroskopischer Goldteilchen. Ann. Phys. 1912, 342, 881–900.
- 70. Gans, R. Über Die Form Ultramikroskopischer Silberteilchen. Ann. Phys. 1915, 352, 270–284.
- 71. Fang, Y.; Seong, N.-H.; Dlott, D. D. Measurement of the Distribution of Site Enhancements in Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **2008**, *321*, 388–392.
- 72. Nie, S.; Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- 73. Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T. Gold Nanostars For Surface-Enhanced Raman Scattering: Synthesis, Characterization and Optimization. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18849–18859.
- Kumar, P. S.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Abajo, F. J. G. de; Liz-Marzán, L. M. High-yield Synthesis and Optical Response of Gold Nanostars. *Nanotechnology* 2008, 19, 015606.
- Lin, H.-X.; Li, J.-M.; Liu, B.-J.; Liu, D.-Y.; Liu, J.; Terfort, A.; Xie, Z.-X.; Tian, Z.-Q.; Ren, B. Uniform Gold Spherical Particles for Single-particle Surface-enhanced Raman Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4130–4135.
- 76. Kucheyev, S. O.; Hayes, J. R.; Biener, J.; Huser, T.; Talley, C. E.; Hamza, A. V. Surface-enhanced Raman Scattering on Nanoporous Au. *Applied Physics Letters* **2006**, 89, 53102–1.
- 77. Lin, X.-M.; Cui, Y.; Xu, Y.-H.; Ren, B.; Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman Spectroscopy: Substrate-related Issues. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1729–1745.
- 78. Bunz, U. H. F.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticle-Fluorophore Complexes: Sensitive and Discerning "Noses" for Biosystems Sensing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3268–3279.
- 79. Rossetti, R.; Brus, L. E. Time Resolved Energy Transfer from Electronically Excited B3u Pyrazine Molecules to Planar Ag and Au Surfaces. J. Chem. Phys. **1982**, *76*, 1146–1149.
- 80. Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. Single-mismatch Detection Using Goldquenched Fluorescent Oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365–370.
- Pons, T.; Medintz, I. L.; Sapsford, K. E.; Higashiya, S.; Grimes, A. F.; English, D. S.; Mattoussi, H. On the Quenching of Semiconductor Quantum Dot Photoluminescence by Proximal Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* 2007, 7, 3157–3164.
- Yun, C. S.; Javier, A.; Jennings, T.; Fisher, M.; Hira, S.; Peterson, S.; Hopkins, B.; Reich, N. O.; Strouse, G. F. Nanometal Surface Energy Transfer in Optical Rulers, Breaking the FRET Barrier. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 3115–3119.
- Zhang, X.; Marocico, C. A.; Lunz, M.; Gerard, V. A.; Gun'ko, Y. K.; Lesnyak, V.; Gaponik, N.; Susha, A. S.; Rogach, A. L.; Bradley, A. L. Wavelength, Concentration, and Distance Dependence of Nonradiative Energy Transfer to a Plane of Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 2012, *6*, 9283–9290.
- 84. Guerrini, L.; Graham, D. Molecularly-mediated Assemblies of Plasmonic Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7085–7107.
- 85. Ru, E. Le; Etchegoin, P. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects; Elsevier, Amsterdam, 2009.
- 86. Dijk, M. A. van; Lippitz, M.; Orrit, M. Far-Field Optical Microscopy of Single Metal Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 594–601.
- Gadogbe, M.; Ansar, S. M.; He, G.; Collier, W. E.; Rodriguez, J.; Liu, D.; Chu, I.-W.; Zhang, D. Determination of Colloidal Gold Nanoparticle Surface Areas, Concentrations, and Sizes Through Quantitative Ligand Adsorption. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 413–422.
- 88. 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*, 4215–4221.
- 89. Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77*, 1753–1805.
- 90. Dykman, L.; Khlebtsov, N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256–2282.
- 91. Lévy, 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*, 10076–10084.
- 92. 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*, 7910–7917.
- Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* 2013, *113*, 1904–2074.
- 94. Lee, N.; Choi, S. H.; Hyeon, T. Nano-Sized CT Contrast Agents. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 2641–2660.
- 95. *Colloidal Gold : Principles, Methods, and Applications*; Hayat, M. A., Ed.; Academic Press, San Diego, 1989.
- 96. Zopes, D.; Stein, B.; Mathur, S.; Graf, C. Improved Stability of "Naked" Gold Nanoparticles Enabled by in Situ Coating with Mono and Multivalent Thiol PEG Ligands. *Langmuir* **2013**, *29*, 11217–11226.
- 97. Dozol, H.; Mériguet, G.; Ancian, B.; Cabuil, V.; Xu, H.; Wang, D.; Abou-Hassan, A. On the Synthesis of Au Nanoparticles Using EDTA as a Reducing Agent. J. Phys. Chem. C 2013, 117, 20958–20966.

- 98. Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. J. Am. Chem. Soc. 1983, 105, 4481–4483.
- 99. Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E. Wet Chemical Approaches to the Characterization of Organic Surfaces: Self-assembled Monolayers, Wetting, and the Physical-organic Chemistry of the Solid-liquid Interface. *Langmuir* **1990**, *6*, 87–96.
- 100. Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. Annu. Rev. Phys. Chem. 1992, 43, 437–463.
- 101. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533–1554.
- 102. Schreiber, F. Structure and Growth of Self-assembling Monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **2000**, *65*, 151–257.
- 103. Yang, G.; Liu, G. New Insights for Self-Assembled Monolayers of Organothiols on Au(111) Revealed by Scanning Tunneling Microscopy. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 8746–8759.
- 104. Kind, M.; Wöll, C. Organic Surfaces Exposed by Self-assembled Organothiol Monolayers: Preparation, Characterization, and Application. *Prog. Surf. Sci.* 2009, 84, 230–278.
- 105. Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G. A.; Gago, J. A. M.; Torrelles, X.; Salvarezza, R. C. Surface Characterization of Sulfur and Alkanethiol Self-assembled Monolayers on Au(111). J. Phys.: Condens. Matter 2006, 18, R867.
- 106. Dubois, L. H.; Zegarski, B. R.; Nuzzo, R. G. Molecular Ordering of Organosulfur Compounds on Au(111) and Au(100): Adsorption from Solution and in Ultrahigh Vacuum. J. Chem. Phys. 1993, 98, 678–688.
- 107. Poirier, G. E.; Pylant, E. D. The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111). *Science* **1996**, 272, 1145–1148.
- 108. Wu, H.; Sotthewes, K.; Kumar, A.; Vancso, G. J.; Schön, P. M.; Zandvliet, H. J. W. Dynamics of Decanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) Studied by Time-Resolved Scanning Tunneling Microscopy. *Langmuir* 2013, 29, 2250–2257.
- Schlenoff, J. B.; Li, M.; Ly, H. Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 12528–12536.
- 110. Ansar, S. M.; Perera, G. S.; Jiang, D.; Holler, R. A.; Zhang, D. Organothiols Self-Assembled onto Gold: Evidence for Deprotonation of the Sulfur-Bound Hydrogen and Charge Transfer from Thiolate. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 8793–8798.
- 111. Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; Dubois, L. H. Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on Gold(111). Implications for Molecular Self-assembly on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 733–740.
- 112. Xu, S.; Laibinis, P. E.; Liu, G. Y. Accelerating the Kinetics of Thiol Self-assembly on Gold A Spatial Confinement Effect. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9356–9361.
- 113. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of Thiolderivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994, 801–802.
- 114. Hostetler, M. J.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Murray, R. W. Monolayers in Three Dimensions: Synthesis and Electrochemistry of ω-Functionalized Alkanethiolate-Stabilized Gold Cluster Compounds. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 4212–4213.
- 115. 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. *et al.* 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, 17–30.
- 116. Janz, A.; Köckritz, A.; Yao, L.; Martin, A. Fundamental Calculations on the Surface Area Determination of Supported Gold Nanoparticles by Alkanethiol Adsorption. *Langmuir* **2010**, *26*, 6783–6789.

- 117. Hostetler, M. J.; Murray, R. W. Colloids and Self-assembled Monolayers. *Curr. Opin. Colloid In.* **1997**, *2*, 42–50.
- 118. 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, 1906–1911.
- Lin, X. M.; Jaeger, H. M.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J. Formation of Long-Range-Ordered Nanocrystal Superlattices on Silicon Nitride Substrates. J. Phys. Chem. B 2001, 105, 3353–3357.
- 120. Martin, J. E.; Wilcoxon, J. P.; Odinek, J.; Provencio, P. Control of the Interparticle Spacing in Gold Nanoparticle Superlattices. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9475–9486.
- 121. Badia, A.; Singh, S.; Demers, L.; Cuccia, L.; Brown, G. R.; Lennox, R. B. Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. *Chem.–Eur. J.* **1996**, *2*, 359–363.
- 122. Weisbecker, C. S.; Merritt, M. V.; Whitesides, G. M. Molecular Self-Assembly of Aliphatic Thiols on Gold Colloids. *Langmuir* **1996**, *12*, 3763–3772.
- 123. 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, 70–73.
- 124. Mei, B. C.; Oh, E.; Susumu, K.; Farrell, D.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Effects of Ligand Coordination Number and Surface Curvature on the Stability of Gold Nanoparticles in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2009**, *25*, 10604–10611.
- 125. Paulini, R.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M. Effects of Branched Ligands on the Structure and Stability of Monolayers on Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18*, 2368–2373.
- 126. Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D. Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1 Å Resolution. *Science* **2007**, *318*, 430–433.
- 127. Barnard, A. S. Modeling the Impact of Alkanethiol SAMs on the Morphology of Gold Nanocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 5433–5441.
- 128. Malola, S.; Lehtovaara, L.; Enkovaara, J.; Häkkinen, H. Birth of the Localized Surface Plasmon Resonance in Monolayer-Protected Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10263–10270.
- 129. Yau, S. H.; Varnavski, O.; Goodson, T. An Ultrafast Look at Au Nanoclusters. Acc. Chem. Res. 2013, 46, 1506–1516.
- 130. Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779.
- 131. 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.
- 132. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E. Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. J. Phys. Chem. B 1998, 102, 426–436.
- 133. Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S. PEGylated Inorganic Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1980–1994.
- 134. Kingshott, P.; Thissen, H.; Griesser, H. J. Effects of Cloud-point Grafting, Chain Length, and Density of PEG Layers on Competitive Adsorption of Ocular Proteins. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2043–2056.
- 135. Silin, V.; Weetall, H.; Vanderah, D. J. SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-assembled Monolayers (SAMs). *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185*, 94–103.
- 136. Uchida, K.; Hoshino, Y.; Tamura, A.; Yoshimoto, K.; Kojima, S.; Yamashita, K.; Yamanaka, I.; Otsuka, H.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y. Creation of a Mixed Poly(ethylene

Glycol) Tethered-chain Surface for Preventing the Nonspecific Adsorption of Proteins and Peptides. *Biointerphases* **2007**, *2*, 126–130.

- 137. Bergen, J. M.; Recum, H. A. von; Goodman, T. T.; Massey, A. P.; Pun, S. H. Gold Nanoparticles as a Versatile Platform for Optimizing Physicochemical Parameters for Targeted Drug Delivery. *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 506–516.
- 138. Duncan, B.; Kim, C.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticle Platforms as Drug and Biomacromolecule Delivery Systems. *J. Controlled Release* **2010**, *148*, 122–127.
- 139. Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J.-A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4678–4684.
- 140. Kim, C.; Ghosh, P.; Rotello, V. M. Multimodal Drug Delivery Using Gold Nanoparticles. *Nanoscale* **2009**, *1*, 61–67.
- 141. Paciotti, G. F.; Kingston, D. G. I.; Tamarkin, L. Colloidal Gold Nanoparticles: a Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-targeted Drug Delivery Vectors. *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 47–54.
- 142. Wang, F.; Wang, Y.-C.; Dou, S.; Xiong, M.-H.; Sun, T.-M.; Wang, J. Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3679–3692.
- 143. 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*, 943–950.
- 144. Yeh, Y.-C.; Creran, B.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale* **2012**, *4*, 1871–1880.
- 145. Kang, B.; Afifi, M. M.; Austin, L. A.; El-Sayed, M. A. Exploiting the Nanoparticle Plasmon Effect: Observing Drug Delivery Dynamics in Single Cells via Raman/Fluorescence Imaging Spectroscopy. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7420–7427.
- 146. Khlebtsov, N.; Dykman, L. Biodistribution and Toxicity of Engineered Gold Nanoparticles: a Review of in Vitro and in Vivo Studies. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1647–1671.
- 147. De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. Adv. Mater. 2008, 20, 4225–4241.
- 148. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1307–1315.
- 149. Kim, C. S.; Tonga, G. Y.; Solfiell, D.; Rotello, V. M. Inorganic Nanosystems for Therapeutic Delivery: Status and Prospects. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 93–99.
- 150. Mout, R.; Moyano, D. F.; Rana, S.; Rotello, V. M. Surface Functionalization of Nanoparticles for Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2539–2544.
- 151. Rana, S.; Bajaj, A.; Mout, R.; Rotello, V. M. Monolayer Coated Gold Nanoparticles for Delivery Applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 200–216.
- 152. Dreaden, E. C.; Mackey, M. A.; Huang, X.; Kang, B.; El-Sayed, M. A. Beating Cancer in Multiple Ways Using Nanogold. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3391–3404.
- 153. 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, 1721–1730.
- 154. Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280–3294.
- 155. Mieszawska, A. J.; Mulder, W. J. M.; Fayad, Z. A.; Cormode, D. P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Mol. Pharm.* 2013, 10, 831– 847.

- 156. Ng, V. W. K.; Berti, R.; Lesage, F.; Kakkar, A. Gold: a Versatile Tool for in Vivo Imaging. J. Mater. Chem. B 2013, 1, 9–25.
- 157. Papasani, M. R.; Wang, G.; Hill, R. A. Gold Nanoparticles: The Importance of Physiological Principles to Devise Strategies for Targeted Drug Delivery. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 804–814.
- 158. Radwan, S. H.; Azzazy, H. M. Gold Nanoparticles for Molecular Diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009, 9, 511–524.
- 159. Rippel, R. A.; Seifalian, A. M. Gold Revolution-Gold Nanoparticles for Modern Medicine and Surgery. J. Nanosci. Nanotechnol. 2011, 11, 3740–3748.
- 160. Algar, W. R.; Prasuhn, D. E.; Stewart, M. H.; Jennings, T. L.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjugate Chem.* 2011, 22, 825–858.
- 161. Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A* **2010**, *368*, 1333–1383.
- 162. Abad, J. M.; Mertens, S. F. L.; Pita, M.; Fernández, V. M.; Schiffrin, D. J. Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 5689–5694.
- 163. Kitai, T.; Watanabe, Y.; Toyoshima, Y. Y.; Kobayashi, T.; Murayama, T.; Sakaue, H.; Suzuki, H.; Takahagi, T. Simple Method of Synthesizing Nickel-Nitrilotriacetic Acid Gold Nanoparticles with a Narrow Size Distribution for Protein Labeling. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2011, 50, 095002.
- 164. Oh, E.; Susumu, K.; Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Preparation of Stable Maleimide-Functionalized Au Nanoparticles and Their Use in Counting Surface Ligands. *Small* **2010**, *6*, 1273–1278.
- 165. 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, 2221–2229.
- 166. Patel, P. C.; Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Mirkin, C. A. Peptide Antisense Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, *105*, 17222–17226.
- 167. 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, 400–404.
- 168. Moyano, D. F.; Rotello, V. M. Nano Meets Biology: Structure and Function at the Nanoparticle Interface. *Langmuir* **2011**, *27*, 10376–10385.
- 169. Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for Imaging and Therapy. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 715–728.
- 170. Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated Nanoparticles for Biological and Pharmaceutical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 403–419.
- 171. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 459–476.
- 172. Veronese, F. M. Peptide and Protein PEGylation. A Review of Problems and Solutions. *Biomaterials* **2001**, *22*, 405–417.
- 173. Veronese, F. M.; Pasut, G. PEGylation, Successful Approach to Drug Delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451–1458.
- 174. Taylor, W.; Jones, R. A. L. Protein Adsorption on Well-Characterized Polyethylene Oxide Brushes on Gold: Dependence on Molecular Weight and Grafting Density. *Langmuir* 2013, 29, 6116–6122.
- 175. Brandenberger, C.; Mühlfeld, C.; Ali, Z.; Lenz, A.-G.; Schmid, O.; Parak, W. J.; Gehr, P.; Rothen-Rutishauser, B. Quantitative Evaluation of Cellular Uptake and Trafficking

of Plain and Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles. *Small* **2010**, *6*, 1669–1678.

- 176. Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Sperling, R. A.; Wenk, A.; Takenaka, S.; Schleh, C.; Kissel, T.; Parak, W. J.; Kreyling, W. G. Biodistribution of PEG-modified Gold Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Intravenous Injection. *Biomaterials* 2010, *31*, 6574–6581.
- 177. Shah, N. B.; Vercellotti, G. M.; White, J. G.; Fegan, A.; Wagner, C. R.; Bischof, J. C. Blood-Nanoparticle Interactions and in Vivo Biodistribution: Impact of Surface PEG and Ligand Properties. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2146–2155.
- 178. Zhang, G.; Yang, Z.; Lu, W.; Zhang, R.; Huang, Q.; Tian, M.; Li, L.; Liang, D.; Li, C. Influence of Anchoring Ligands and Particle Size on the Colloidal Stability and in Vivo Biodistribution of Polyethylene Glycol-coated Gold Nanoparticles in Tumorxenografted Mice. *Biomaterials* 2009, *30*, 1928–1936.
- 179. Oh, E.; Susumu, K.; Goswami, R.; Mattoussi, H. One-Phase Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles with Control over Size and Surface Functionalities. *Langmuir* 2010, 26, 7604–7613.
- 180. Rahme, K.; Chen, L.; Hobbs, R. G.; Morris, M. A.; O'Driscoll, C.; Holmes, J. D. PEGylated Gold Nanoparticles: Polymer Quantification as a Function of PEG Lengths and Nanoparticle Dimensions. *R. Soc. Chem. Adv.* **2013**, *3*, 6085–6094.
- 181. Wang, W.; Wei, Q.-Q.; Wang, J.; Wang, B.-C.; Zhang, S.; Yuan, Z. Role of Thiolcontaining Polyethylene Glycol (thiol-PEG) in the Modification Process of Gold Nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or Coagulant? J. Colloid Interface Sci. 2013, 404, 223–229.
- 182. Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B.; Dixon, D. Polyethylene Glycol Functionalized Gold Nanoparticles: The Influence of Capping Density on Stability in Various Media. *Gold Bull.* 2011, 44, 99–105.
- 183. Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E. A.; Schulz, F.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G. *et al.* In Situ Functionalization and PEO Coating of Iron Oxide Nanocrystals Using Seeded Emulsion Polymerization. *Langmuir* 2013, 29, 4915–4921.
- 184. Schmidtke, C.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Pietsch, A.; Kloust, H.; Tran, H.; Schotten, T.; Bastus, N. G.; Eggers, R.; Weller, H. Amphiphilic, Cross-linkable Diblock Copolymers for Multifunctionalized Nanoparticles as Biological Probes. *Nanoscale* 2013, *5*, 7433– 7444.
- 185. Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- 186. Ojea-Jiménez, I.; Puntes, V. Instability of Cationic Gold Nanoparticle Bioconjugates: The Role of Citrate Ions. J. Am. Chem. Soc. **2009**, 131, 13320–13327.
- 187. Na, H. B.; Palui, G.; Rosenberg, J. T.; Ji, X.; Grant, S. C.; Mattoussi, H. Multidentate Catechol-Based Polyethylene Glycol Oligomers Provide Enhanced Stability and Biocompatibility to Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 389–399.
- 188. Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Multidentate Poly(ethylene Glycol) Ligands Provide Colloidal Stability to Semiconductor and Metallic Nanocrystals in Extreme Conditions. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 9804–9813.
- 189. Thiry, M.; Boldt, K.; Nikolic, M. S.; Schulz, F.; Ijeh, M.; Panicker, A.; Vossmeyer, T.; Weller, H. Fluorescence Properties of Hydrophilic Semiconductor Nanoparticles with Tridentate Polyethylene Oxide Ligands. ACS Nano 2011, 5, 4965–4973.

- 190. Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. Synthesis of Compact Multidentate Ligands to Prepare Stable Hydrophilic Quantum Dot Fluorophores. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 3870–3878.
- 191. Kang, J. S.; Taton, T. A. Oligothiol Graft-Copolymer Coatings Stabilize Gold Nanoparticles Against Harsh Experimental Conditions. *Langmuir* **2012**, *28*, 16751–16760.
- 192. Palui, G.; Na, H. B.; Mattoussi, H. Poly(ethylene glycol)-Based Multidentate Oligomers for Biocompatible Semiconductor and Gold Nanocrystals. *Langmuir* **2012**, *28*, 2761–2772.
- 193. Netz, R. R.; Andelman, D. Neutral and Charged Polymers at Interfaces. *Phys. Rep.* 2003, 380, 1–95.
- 194. Hill, R. J. Hydrodynamics and Electrokinetics of Spherical Liposomes with Coatings of Terminally Anchored Poly(ethylene Glycol): Numerically Exact Electrokinetics with Self-consistent Mean-field Polymer. *Phys. Rev. E* 2004, *70*, 051406.
- 195. Tsai, D.-H.; Davila-Morris, M.; DelRio, F. W.; Guha, S.; Zachariah, M. R.; Hackley, V. A. Quantitative Determination of Competitive Molecular Adsorption on Gold Nanoparticles Using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Langmuir* 2011, 27, 9302–9313.
- 196. Tsai, D.-H.; DelRio, F. W.; MacCuspie, R. I.; Cho, T. J.; Zachariah, M. R.; Hackley, V. A. Competitive Adsorption of Thiolated Polyethylene Glycol and Mercaptopropionic Acid on Gold Nanoparticles Measured by Physical Characterization Methods. *Langmuir* 2010, *26*, 10325–10333.
- 197. Krpetić, Ž.; Davidson, A. M.; Volk, M.; Lévy, R.; Brust, M.; Cooper, D. L. High-Resolution Sizing of Monolayer-Protected Gold Clusters by Differential Centrifugal Sedimentation. *ACS Nano* **2013**, *7*, 8881–8890.
- 198. Schellekens, H.; Hennink, W.; Brinks, V. The Immunogenicity of Polyethylene Glycol: Facts and Fiction. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1729–1734.
- 199. Alexander, C. M.; Dabrowiak, J. C.; Goodisman, J. Gravitational Sedimentation of Gold Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *396*, 53–62.
- 200. Calabretta, M.; Jamison, J. A.; Falkner, J. C.; Liu, Y.; Yuhas, B. D.; Matthews, K. S.; Colvin, V. L. Analytical Ultracentrifugation for Characterizing Nanocrystals and Their Bioconjugates. *Nano Lett.* 2005, *5*, 963–967.
- 201. Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2363–2371.
- 202. Medley, C. D.; Smith, J. E.; Tang, Z.; Wu, Y.; Bamrungsap, S.; Tan, W. Gold Nanoparticle-based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1067–1072.
- 203. Xu, X.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. A Gold-nanoparticle-based Real-time Colorimetric Screening Method for Endonuclease Activity and Inhibition. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3468–3470.
- 204. Li, H. X.; Rothberg, L. Colorimetric Detection of DNA Sequences Based on Electrostatic Interactions with Unmodified Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14036–14039.
- 205. Jiang, Y.; Zhao, H.; Zhu, N.; Lin, Y.; Yu, P.; Mao, L. A Simple Assay for Direct Colorimetric Visualization of Trinitrotoluene at Picomolar Levels Using Gold Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8601–8604.
- 206. Huang, C.-C.; Chang, H.-T. Parameters for Selective Colorimetric Sensing of mercury(II) in Aqueous Solutions Using Mercaptopropionic Acid-modified Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2007**, 1215–1217.
- 207. Tang, D.; Cui, Y.; Chen, G. Nanoparticle-based Immunoassays in the Biomedical Field. *Analyst* **2013**, *138*, 981–990.

- 208. Grzelczak, M.; Vermant, J.; Furst, E. M.; Liz-Marzán, L. M. Directed Self-Assembly of Nanoparticles. *ACS Nano* 2010, *4*, 3591–3605.
- 209. Huang, Y.; Kim, D.-H. Synthesis and Self-Assembly of Highly Monodispersed Quasispherical Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27*, 13861–13867.
- 210. Krpetić, Ž.; Singh, I.; Su, W.; Guerrini, L.; Faulds, K.; Burley, G. A.; Graham, D. Directed Assembly of DNA-Functionalized Gold Nanoparticles Using Pyrrole-Imidazole Polyamides. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8356–8359.
- 211. Liz-Marzán, L. M. Tailoring Surface Plasmons Through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* **2006**, *22*, 32–41.
- Biradar, S. C.; Shinde, D. B.; Pillai, V. K.; Kulkarni, M. G. Polydentate Disulfides for Enhanced Stability of AuNPs and Facile Nanocavity Formation. J. Mater. Chem. 2012, 22, 10000–10008.
- 213. Dougan, J. A.; Karlsson, C.; Smith, W. E.; Graham, D. Enhanced Oligonucleotidenanoparticle Conjugate Stability Using Thioctic Acid Modified Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2007, *35*, 3668–3675.
- 214. Liu, X.; Huang, N.; Wang, H.; Li, H.; Jin, Q.; Ji, J. The Effect of Ligand Composition on the in Vivo Fate of Multidentate Poly(ethylene Glycol) Modified Gold Nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8370–8381.
- 215. Oh, E.; Susumu, K.; Mäkinen, A. J.; Deschamps, J. R.; Huston, A. L.; Medintz, I. L. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Coated with Multithiol-Poly(ethylene Glycol) Ligands: Importance of Structural Constraints of the Sulfur Anchoring Groups. J. Phys. Chem. C 2013, 117, 18947–18956.
- 216. Qiao, F.-Y.; Liu, J.; Li, F.-R.; Kong, X.-L.; Zhang, H.-L.; Zhou, H.-X. Antibody and DNA Dual-labeled Gold Nanoparticles: Stability and Reactivity. *Appl. Surf. Sci.* 2008, 254, 2941–2946.
- 217. Schulz, F.; Vossmeyer, T.; Bastús, N. G.; Weller, H. Effect of the Spacer Structure on the Stability of Gold Nanoparticles Functionalized with Monodentate Thiolated Poly(ethylene Glycol) Ligands. *Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908.
- 218. Kumar, A.; Whitesides, G. M. Features of Gold Having Micrometer To Centimeter Dimensions Can Be Formed Through A Combination of Stamping With An Elastomeric Stamp and An Alkanethiol Ink Followed By Chemical Etching. *Appl. Phys. Lett.* 1993, 63, 2002–2004.
- 219. Senapati, D.; Dasary, S. S. R.; Singh, A. K.; Senapati, T.; Yu, H.; Ray, P. C. A Label-Free Gold-Nanoparticle-Based SERS Assay for Direct Cyanide Detection at the Partsper-Trillion Level. *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 8445–8451.
- 220. Cho, T. J.; Zangmeister, R. A.; MacCuspie, R. I.; Patri, A. K.; Hackley, V. A. Newkome-Type Dendron-Stabilized Gold Nanoparticles: Synthesis, Reactivity, and Stability. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 2665–2676.
- 221. Love, C. S.; Ashworth, I.; Brennan, C.; Chechik, V.; Smith, D. K. Dendron-protected Au nanoparticles–Effect of Dendritic Structure on Chemical Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *302*, 178–186.
- 222. Sitaula, S.; Mackiewicz, M. R.; Reed, S. M. Gold Nanoparticles Become Stable to Cyanide Etch When Coated with Hybrid Lipid Bilayers. *Chem. Commun.* 2008, 26, 3013–3015.
- 223. Chen, Y.; Cho, J.; Young, A.; Taton, T. A. Enhanced Stability and Bioconjugation of Photo-Cross-Linked Polystyrene-Shell, Au-Core Nanoparticles. *Langmuir* **2007**, *23*, 7491–7497.
- 224. Liu, X.; Basu, A. Cross-Linked Polynorbornene-Coated Gold Nanoparticles: Dependence of Particle Stability on Cross-Linking Position and Cross-Linker Structure. *Langmuir* **2008**, *24*, 11169–11174.

- 225. Ghann, W. E.; Aras, O.; Fleiter, T.; Daniel, M.-C. Syntheses and Characterization of Lisinopril-Coated Gold Nanoparticles as Highly Stable Targeted CT Contrast Agents in Cardiovascular Diseases. *Langmuir* **2012**, *28*, 10398–10408.
- 226. Caruso, F. Nanoengineering of Particle Surfaces. Adv. Mater. 2001, 13, 11-22.
- 227. Fan, J. D.; Bozzola, J. J.; Gao, Y. Encapsulation of Uranyl Acetate Molecules Using Hollow Polymer Templates. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *254*, 108–112.
- 228. Liu, Y.; Miyoshi, H. Preparation and Characterization of Novel Drug Delivery System of Light-sensitive Silica Nanocapsules with Thin Shells. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 25–32.
- 229. Mulvaney, P.; Giersig, M.; Ung, T.; Liz-Marzán, L. M. Direct Observation of Chemical Reactions in Silica-coated Gold and Silver Nanoparticles. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 570–575.
- 230. Poovarodom, S.; Bass, J. D.; Hwang, S. J.; Katz, A. Investigation of the Core-shell Interface in Gold@silica Nanoparticles: A Silica Imprinting Approach. *Langmuir* **2005**, *21*, 12348–12356.
- 231. Xing, S.; Tan, L. H.; Yang, M.; Pan, M.; Lv, Y.; Tang, Q.; Yang, Y.; Chen, H. Highly Controlled Core/shell Structures: Tunable Conductive Polymer Shells on Gold Nanoparticles and Nanochains. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3286–3291.
- Benoit, D. N.; Zhu, H.; Lilierose, M. H.; Verm, R. A.; Ali, N.; Morrison, A. N.; Fortner, J. D.; Avendano, C.; Colvin, V. L. Measuring the Grafting Density of Nanoparticles in Solution by Analytical Ultracentrifugation and Total Organic Carbon Analysis. *Anal. Chem.* 2012, 84, 9238–9245.
- 233. Pöselt, E.; Schmidtke, C.; Fischer, S.; Peldschus, K.; Salamon, J.; Kloust, H.; Tran, H.; Pietsch, A.; Heine, M.; Adam, G. *et al.* Tailor-Made Quantum Dot and Iron Oxide Based Contrast Agents for in Vitro and in Vivo Tumor Imaging. *ACS Nano* 2012, 6, 3346–3355.
- 234. Schmidtke, C.; Kreuziger, A.-M.; Alpers, D.; Jacobsen, A.; Leshch, Y.; Eggers, R.; Kloust, H.; Tran, H.; Ostermann, J.; Schotten, T. *et al.* Glycoconjugated Amphiphilic Polymers via Click-Chemistry for the Encapsulation of Quantum Dots. *Langmuir* 2013, 29, 12593–12600.
- 235. Chinwangso, P.; Jamison, A. C.; Lee, T. R. Multidentate Adsorbates for Self-Assembled Monolayer Films. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 511–519.
- 236. Perumal, S.; Hofmann, A.; Scholz, N.; Rühl, E.; Graf, C. Kinetics Study of the Binding of Multivalent Ligands on Size-Selected Gold Nanoparticles. *Langmuir* 2011, 27, 4456– 4464.
- 237. Maniara, G.; Rajamoorthi, K.; Rajan, S.; Stockton, G. W. Method Performance and Validation for Quantitative Analysis by 1H and 31P NMR Spectroscopy. Applications to Analytical Standards and Agricultural Chemicals. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4921–4928.
- 238. Nativel, F.; Enjalbal, C.; Lamaty, F.; Lazaro, R.; Martinez, J.; Aubagnac, J.-L. Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Liquid-phase Organic Synthesis. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, *4*, 233–237.
- 239. Nikolic, M. S. Encapsulation of Nanoparticles Within Poly(ethylene Oxide) Shell, University of Hamburg, 2007.
- 240. Tokumitsu, S.; Liebich, A.; Herrwerth, S.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Grunze, M. Grafting of Alkanethiol-Terminated Poly(ethylene Glycol) on Gold. *Langmuir* **2002**, *18*, 8862–8870.
- 241. Kisanuki, A.; Kimpara, Y.; Oikado, Y.; Kado, N.; Matsumoto, M.; Endo, K. Ringopening Polymerization of Lipoic Acid and Characterization of the Polymer. J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 2010, 48, 5247–5253.

- 242. Maus, L.; Dick, O.; Bading, H.; Spatz, J. P.; Fiammengo, R. Conjugation of Peptides to the Passivation Shell of Gold Nanoparticles for Targeting of Cell-Surface Receptors. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6617–6628.
- 243. Xia, X.; Yang, M.; Wang, Y.; Zheng, Y.; Li, Q.; Chen, J.; Xia, Y. Quantifying the Coverage Density of Poly(ethylene Glycol) Chains on the Surface of Gold Nanostructures. *ACS Nano* **2012**, *6*, 512–522.
- 244. Wang, Y.; Zeiri, O.; Neyman, A.; Stellacci, F.; Weinstock, I. A. Nucleation and Island Growth of Alkanethiolate Ligand Domains on Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 629–640.
- 245. Fuxen, C.; Azzam, W.; Arnold, R.; Witte, G.; Terfort, A.; Wöll, C. Structural Characterization of Organothiolate Adlayers on Gold: The Case of Rigid, Aromatic Backbones. *Langmuir* **2001**, *17*, 3689–3695.
- 246. McCarley, R. L.; Bard, A. J. Surface Reactions of Gold(111) with Aqueous Cyanide Studied by Scanning Tunneling Microscopy. J. Phys. Chem. **1992**, 96, 7410–7416.
- 247. Chen, X.; Qoutah, W. W.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G.; Paramelle, D. Features of Thiolated Ligands Promoting Resistance to Ligand Exchange in Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. *Aust. J. Chem.* **2012**, *65*, 266–274.
- 248. 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**, 2294–2295.
- 249. Simpson, C. A.; Agrawal, A. C.; Balinski, A.; Harkness, K. M.; Cliffel, D. E. Short-Chain PEG Mixed Monolayer Protected Gold Clusters Increase Clearance and Red Blood Cell Counts. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3577–3584.
- 250. Larson, T. A.; Joshi, P. P.; Sokolov, K. Preventing Protein Adsorption and Macrophage Uptake of Gold Nanoparticles via a Hydrophobic Shield. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9182–9190.
- 251. Devadasu, V. R.; Bhardwaj, V.; Kumar, M. N. V. R. Can Controversial Nanotechnology Promise Drug Delivery? *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1686–1735.
- 252. Heo, D. N.; Yang, D. H.; Moon, H.-J.; Lee, J. B.; Bae, M. S.; Lee, S. C.; Lee, W. J.; Sun, I.-C.; Kwon, I. K. Gold Nanoparticles Surface-functionalized with Paclitaxel Drug and Biotin Receptor as Theranostic Agents for Cancer Therapy. *Biomaterials* **2012**, *33*, 856–866.
- 253. Dreaden, E. C.; Mwakwari, S. C.; Sodji, Q. H.; Oyelere, A. K.; El-Sayed, M. A. Tamoxifen-Poly(ethylene glycol)-Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment. *Bioconjugate Chem* **2009**, 20, 2247–2253.
- 254. Craig, G. E.; Brown, S. D.; Lamprou, D. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Cisplatin-Tethered Gold Nanoparticles That Exhibit Enhanced Reproducibility, Drug Loading, and Stability: a Step Closer to Pharmaceutical Approval? *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3490– 3497.
- 255. Yan, X.; Blacklock, J.; Li, J.; Möhwald, H. One-Pot Synthesis of Polypeptide-Gold Nanoconjugates for in Vitro Gene Transfection. *ACS Nano* **2012**, *6*, 111–117.
- 256. 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, 4700–4701.
- 257. Fuente, J. M. de la; Berry, C. C. Tat Peptide as an Efficient Molecule To Translocate Gold Nanoparticles into the Cell Nucleus. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1176–1180.
- 258. Sanz, V.; Conde, J.; Hernández, Y.; Baptista, P.; Ibarra, M.; Fuente, J. de la Effect of PEG Biofunctional Spacers and TAT Peptide on dsRNA Loading on Gold Nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 1–9.

- 259. Prades, R.; Guerrero, S.; Araya, E.; Molina, C.; Salas, E.; Zurita, E.; Selva, J.; Egea, G.; López-Iglesias, C.; Teixidó, M. *et al.* Delivery of Gold Nanoparticles to the Brain by Conjugation with a Peptide That Recognizes the Transferrin Receptor. *Biomaterials* 2012, 33, 7194–7205.
- 260. 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. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 482–490.
- 261. Kim, C. K.; Ghosh, P.; Pagliuca, C.; Zhu, Z.-J.; Menichetti, S.; Rotello, V. M. Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 1360–1361.
- 262. Huschka, R.; Zuloaga, J.; Knight, M. W.; Brown, L. V.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Light-Induced Release of DNA from Gold Nanoparticles: Nanoshells and Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12247–12255.
- 263. Wang, G.; Papasani, M. R.; Cheguru, P.; Hrdlicka, P. J.; Hill, R. A. Gold-peptide Nanoconjugate Cellular Uptake Is Modulated by Serum Proteins. *Nanomedicine* **2012**, 8, 822–832.
- Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M. R.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Laurent, S. Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chem. Rev.* 2011, 111, 5610–5637.
- 265. Natte, K.; Friedrich, J. F.; Wohlrab, S.; Lutzki, J.; Klitzing, R. von; Österle, W.; Orts-Gil, G. Impact of Polymer Shell on the Formation and Time Evolution of Nanoparticleprotein Corona. *Colloids Surf.*, *B* **2013**, *104*, 213–220.
- 266. Albanese, A.; Chan, W. C. W. Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5478–5489.
- 267. Gwinn, M. R.; Vallyathan, V. Nanoparticles: Health Effects-pros and Cons. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 1818–1825.
- 268. Kunzmann, A.; Andersson, B.; Thurnherr, T.; Krug, H.; Scheynius, A.; Fadeel, B. Toxicology of Engineered Nanomaterials: Focus on Biocompatibility, Biodistribution and Biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 361–373.
- 269. Sperling, R. A.; Casals, E.; Comenge, J.; Bastús, N. G.; Puntes, V. F. Inorganic Engineered Nanoparticles and Their Impact on the Immune Response. *Curr. Drug Metab.* **2009**, *10*, 895–904.
- 270. Zhao, Y.; Chen, Z.; Chen, Y.; Xu, J.; Li, J.; Jiang, X. Synergy of Non-antibiotic Drugs and Pyrimidinethiol on Gold Nanoparticles Against Superbugs. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12940–12943.
- 271. Zhao, Y.; Jiang, X. Multiple Strategies to Activate Gold Nanoparticles as Antibiotics. *Nanoscale* **2013**, *5*, 8340–8350.
- 272. Zhao, Y.; Tian, Y.; Cui, Y.; Liu, W.; Ma, W.; Jiang, X. Small Molecule-capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-negative Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12349–12356.
- 273. Webb, J. A.; Bardhan, R. Emerging Advances in Nanomedicine with Engineered Gold Nanostructures. *Nanoscale* **2014**.
- 274. Baptista, P. V.; Doria, G.; Quaresma, P.; Cavadas, M.; Neves, C. S.; Gomes, I.; Eaton, P.; Pereira, E.; Franco, R. Chapter 11 Nanoparticles in Molecular Diagnostics. In *Nanoparticles in Translational Science and Medicine*; Villaverde, A., Ed.; Progress in Molecular Biology and Translational Science; Academic Press, 2011; Vol. 104, pp. 427–488.
- 275. Cheng, Y.; Meyers, J. D.; Agnes, R. S.; Doane, T. L.; Kenney, M. E.; Broome, A.-M.; Burda, C.; Basilion, J. P. Addressing Brain Tumors with Targeted Gold Nanoparticles: A New Gold Standard for Hydrophobic Drug Delivery? *Small* 2011, 7, 2301–2306.

- 276. Choi, C. H. J.; Alabi, C. A.; Websterb, P.; Davis, M. E. Mechanism of Active Targeting in Solid Tumors with Transferrin-containing Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1235–1240.
- 277. Collins, K. L.; Orringer, D. A.; Patil, P. G. Nanotechnology in Neurosurgery. J. Nanotechnol. Eng. Med. 2010, 1, 034001–034001–15.
- 278. Kircher, M. F.; de, A. la Zerda; Jokerst, J. V.; Zavaleta, C. L.; Kempen, P. J.; Mittra, E.; Pitter, K.; Huang, R.; Campos, C.; Habte, F. *et al.* A Brain Tumor Molecular Imaging Strategy Using a New Triple-modality MRI-photoacoustic-Raman Nanoparticle. *Nat. Med.* 2012, *18*, 829–834.
- 279. Kurek, N. S.; Chandra, S. B. Nanotechnology Based Diagnostics for Neurological Disorders. Ann. Rev. Biomed. Sci. 2012, 14, 1–15.
- 280. Baron, R.; Zayats, M.; Willner, I. Dopamine-, 1-DOPA-, Adrenaline-, and Noradrenaline-Induced Growth of Au Nanoparticles: Assays for the Detection of Neurotransmitters and of Tyrosinase Activity. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1566–1571.
- 281. Zhang, J.; Atay, T.; Nurmikko, A. V. Optical Detection of Brain Cell Activity Using Plasmonic Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 519–524.
- 282. Zhang, M.; Yu, P.; Mao, L. Rational Design of Surface/Interface Chemistry for Quantitative in Vivo Monitoring of Brain Chemistry. Acc. Chem. Res. 2012, 45, 533– 543.
- 283. Kogan, M. J.; Bastus, N. G.; Amigo, R.; Grillo-Bosch, D.; Araya, E.; Turiel, A.; Labarta, A.; Giralt, E.; Puntes, V. F. Nanoparticle-Mediated Local and Remote Manipulation of Protein Aggregation. *Nano Lett.* 2006, 6, 110–115.
- 284. Choi, I.; Lee, L. P. Rapid Detection of Aβ Aggregation and Inhibition by Dual Functions of Gold Nanoplasmic Particles: Catalytic Activator and Optical Reporter. *ACS Nano* **2013**, *7*, 6268–6277.
- 285. Han, S.-H.; Chang, Y. J.; Jung, E. S.; Kim, J.-W.; Na, D. L.; Mook-Jung, I. Effective Screen for Amyloid β Aggregation Inhibitor Using Amyloid B-conjugated Gold Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 1–12.
- 286. Liao, Y.-H.; Chang, Y.-J.; Yoshiike, Y.; Chang, Y.-C.; Chen, Y.-R. Negatively Charged Gold Nanoparticles Inhibit Alzheimer's Amyloid-β Fibrillization, Induce Fibril Dissociation, and Mitigate Neurotoxicity. *Small* **2012**, *8*, 3631–3639.
- 287. Yang, J. A.; Johnson, B. J.; Wu, S.; Woods, W. S.; George, J. M.; Murphy, C. J. Study of Wild-Type α-Synuclein Binding and Orientation on Gold Nanoparticles. *Langmuir* 2013, 29, 4603–4615.
- 288. Álvarez, Y. D.; Fauerbach, J. A.; Pellegrotti, J. V.; Jovin, T. M.; Jares-Erijman, E. A.; Stefani, F. D. Influence of Gold Nanoparticles on the Kinetics of α-Synuclein Aggregation. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 6156–6163.
- 289. Gilles, S.; Winter, S.; Michael, K. E.; Meffert, S. H.; Li, P.; Greben, K.; Simon, U.; Offenhäusser, A.; Mayer, D. Control of Cell Adhesion and Neurite Outgrowth by Patterned Gold Nanoparticles with Tunable Attractive or Repulsive Surface Properties. *Small* **2012**, *8*, 3357–3367.
- 290. Park, J. S.; Park, K.; Moon, H. T.; Woo, D. G.; Yang, H. N.; Park, K.-H. Electrical Pulsed Stimulation of Surfaces Homogeneously Coated with Gold Nanoparticles to Induce Neurite Outgrowth of PC12 Cells. *Langmuir* **2009**, *25*, 451–457.
- 291. Zhang, H.; Shih, J.; Zhu, J.; Kotov, N. A. Layered Nanocomposites from Gold Nanoparticles for Neural Prosthetic Devices. *Nano Letters* **2012**, *12*, 3391–3398.
- 292. Paviolo, C.; Haycock, J. W.; Yong, J.; Yu, A.; Stoddart, P. R.; McArthur, S. L. Laser Exposure of Gold Nanorods Can Increase Neuronal Cell Outgrowth. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 2277–2291.

- 293. Liu, Z.; Shen, Y.; Wu, Y.; Yang, Y.; Wu, J.; Zhou, P.; Lu, X.; Guo, Z. An Intrinsic Therapy of Gold Nanoparticles in Focal Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, *9*, 1017–1028.
- 294. Wang, Y.-T.; Lu, X.-M.; Zhu, F.; Huang, P.; Yu, Y.; Zeng, L.; Long, Z.-Y.; Wu, Y.-M. The Use of a Gold Nanoparticle-based Adjuvant to Improve the Therapeutic Efficacy of hNgR-Fc Protein Immunization in Spinal Cord-injured Rats. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7988–7998.
- 295. Loers, G.; Schachner, M. Recognition Molecules and Neural Repair. J. Neurochem. 2007, 101, 865–882.
- 296. Prinjha, R.; Moore, S. E.; Vinson, M.; Blake, S.; Morrow, R.; Christie, G.; Michalovich, D.; Simmons, D. L.; Walsh, F. S. Neurobiology: Inhibitor of Neurite Outgrowth in Humans. *Nature* 2000, 403, 383–384.
- 297. Chen, J.; Bernreuther, C.; Dihné, M.; Schachner, M. Cell Adhesion Molecule L1-Transfected Embryonic Stem Cells with Enhanced Survival Support Regrowth of Corticospinal Tract Axons in Mice After Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **2005**, *22*, 896–906.
- 298. Roonprapunt, C.; Huang, W.; Grill, R.; Friedlander, D.; Grumet, M.; Chen, S.; Schachner, M.; Young, W. Soluble Cell Adhesion Molecule L1-Fc Promotes Locomotor Recovery in Rats After Spinal Cord Injury. J. Neurotrauma 2003, 20, 871– 882.
- 299. Xu, G.; Nie, D.; Wang, W.; Zhang, P.; Shen, J.; Ang, B.; Liu, G.; Luo, X.; Chen, N.; Xiao, Z. Optic Nerve Regeneration in Polyglycolic Acid-chitosan Conduits Coated with Recombinant L1-Fc. *NeuroReport* **2004**, *15*, 2167–2172.
- 300. Appel, F.; Holm, J.; Conscience, J.-F.; Bohlen, F. von; Halbach; Faissner, A.; James, P.; Schachner, M. Identification of the Border Between Fibronectin Type III Homologous Repeats 2 and 3 of the Neural Cell Adhesion Molecule L1 as a Neurite Outgrowth Promoting and Signal Transducing Domain. J. Neurobiol. 1995, 28, 297–312.
- 301. Chen, S.; Mantei, N.; Dong, L.; Schachner, M. Prevention of Neuronal Cell Death by Neural Adhesion Molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* **1999**, *38*, 428–439.
- 302. Kamiguchi, H.; Yoshihara, F. The Role of Endocytic L1 Trafficking in Polarized Adhesion and Migration of Nerve Growth Cones. J. Neurosci. 2001, 21, 9194–9203.
- 303. Loers, G.; Chen, S.; Grumet, M.; Schachner, M. Signal Transduction Pathways Implicated in Neural Recognition Molecule L1 Triggered Neuroprotection and Neuritogenesis. J. Neurochem. 2005, 92, 1463–1476.
- 304. Makhina, T.; Loers, G.; Schulze, C.; Ueberle, B.; Schachner, M.; Kleene, R. Extracellular GAPDH Binds to L1 and Enhances Neurite Outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* **2009**, *41*, 206–218.
- 305. Barbin, G.; Aigrot, M. S.; Charles, P.; Foucher, A.; Grumet, M.; Schachner M, M.; Zalc, B.; Lubetzki, C. Axonal Cell-adhesion Molecule L1 in CNS Myelination. *Neuron Glia Biol.* 2004, *1*, 65–72.
- 306. Haney, C. A.; Sahenk, Z.; Li, C.; Lemmon, V. P.; Roder, J.; Trapp, B. D. Heterophilic Binding of L1 on Unmyelinated Sensory Axons Mediates Schwann Cell Adhesion and Is Required for Axonal Survival. J. Cell Biol. 1999, 146, 1173–1184.
- 307. Wood, P.; Moya, F.; Eldridge, C.; Owens, G.; Ranscht, B.; Schachner, M.; Bunge, M.; Bunge, R. Studies of the Initiation of Myelination by Schwann Cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990, 605, 1–14.
- 308. Bernreuther, C.; Dihné, M.; Johann, V.; Schiefer, J.; Cui, Y.; Hargus, G.; Schmid, J. S.; Xu, J.; Kosinski, C. M.; Schachner, M. Neural Cell Adhesion Molecule L1-Transfected Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Excitotoxic Lesion of the Mouse Striatum. J. Neurosci. 2006, 26, 11532–11539.

- 309. Cui, Y.; Hargus, G.; Xu, J.; Schmid, J.; Shen, Y.; Glatzel, M.; Schachner, M.; Bernreuther, C. Embryonic Stem Cell-derived L1 Overexpressing Neural Aggregates Enhance Recovery in Parkinsonian Mice. *Brain* **2010**, *133*, 189–204.
- 310. Chen, J.; Wu, J.; Apostolova, I.; Skup, M.; Irintchev, A.; Kügler, S.; Schachner, M. Adeno-associated Virus-mediated L1 Expression Promotes Functional Recovery After Spinal Cord Injury. *Brain* 2007, 130, 954–969.
- 311. Kumar, A.; Ma, H.; Zhang, X.; Huang, K.; Jin, S.; Liu, J.; Wei, T.; Cao, W.; Zou, G.; Liang, X.-J. Gold Nanoparticles Functionalized with Therapeutic and Targeted Peptides for Cancer Treatment. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1180–1189.
- 312. Olmedo, I.; Araya, E.; Sanz, F.; Medina, E.; Arbiol, J.; Toledo, P.; Álvarez-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 β-Amyloid Fibrils. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1154–1163.
- 313. Shaw, C. P.; Middleton, D. A.; Volk, M.; Lévy, R. Amyloid-Derived Peptide Forms Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticle with a Curvature-Dependent β-Sheet Structure. ACS Nano 2012, 6, 1416–1426.
- 314. Feng, J.; Slocik, J. M.; Sarikaya, M.; Naik, R. R.; Farmer, B. L.; Heinz, H. Influence of the Shape of Nanostructured Metal Surfaces on Adsorption of Single Peptide Molecules in Aqueous Solution. *Small* **2012**, *8*, 1049–1059.
- 315. Yu, J.; Becker, M. L.; Carri, G. A. The Influence of Amino Acid Sequence and Functionality on the Binding Process of Peptides onto Gold Surfaces. *Langmuir* 2012, 28, 1408–1417.
- 316. Bastús, N. G.; Sánchez-Tilló, E.; Pujals, S.; Farrera, C.; López, C.; Giralt, E.; Celada, A.; Lloberas, J.; Puntes, V. Homogeneous Conjugation of Peptides onto Gold Nanoparticles Enhances Macrophage Response. ACS Nano 2009, 3, 1335–1344.
- 317. Guerrero, S.; Herance, J. R.; Rojas, S.; Mena, J. F.; Gispert, J. D.; Acosta, G. A.; Albericio, F.; Kogan, M. J. Synthesis and In Vivo Evaluation of the Biodistribution of a 18F-Labeled Conjugate Gold-Nanoparticle-Peptide with Potential Biomedical Application. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 399–408.
- 318. Lévy, R. Peptide-Capped Gold Nanoparticles: Towards Artificial Proteins. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1141–1145.
- 319. Free, P.; Shaw, C. P.; Lévy, R. PEGylation Modulates the Interfacial Kinetics of Proteases on Peptide-capped Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2009**, 5009–5011.
- 320. Wang, Z.; Lévy, 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, 2214–2215.
- 321. Duchesne, L.; Gentili, D.; Comes-Franchini, M.; Fernig, D. G. Robust Ligand Shells for Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24*, 13572–13580.
- 322. Krpetić, Ž.; Nativo, P.; Porta, F.; Brust, M. A Multidentate Peptide for Stabilization and Facile Bioconjugation of Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 619–624.
- 323. Porta, F.; Speranza, G.; Krpetić, Ž.; Santo, V. D.; Francescato, P.; Scarì, G. Gold Nanoparticles Capped by Peptides. *Mat. Sci. Eng. B* **2007**, *140*, 187–194.
- 324. Voliani, V.; Luin, S.; Ricci, F.; Beltram, F. Single-step Bifunctional Coating for Selectively Conjugable Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, *2*, 2783–2789.
- 325. Zhang, M.; Liu, Y.-Q.; Ye, B.-C. Colorimetric Assay for Parallel Detection of Cd2+, Ni2+ and Co2+ Using Peptide-modified Gold Nanoparticles. *Analyst* **2012**, *137*, 601–607.
- 326. Zaramella, D.; Scrimin, P.; Prins, L. J. Self-Assembly of a Catalytic Multivalent Peptide-Nanoparticle Complex. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8396–8399.

- 327. Briggs, B. D.; Knecht, M. R. Nanotechnology Meets Biology: Peptide-based Methods for the Fabrication of Functional Materials. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 405–418.
- 328. Chen, C.-L.; Rosi, N. L. Peptide-Based Methods for the Preparation of Nanostructured Inorganic Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1924–1942.
- 329. Mach, H.; Middaugh, C. R.; Lewis, R. V. Statistical Determination of the Average Values of the Extinction Coefficients of Tryptophan and Tyrosine in Native Proteins. *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 74–80.
- 330. Schulz, F.; Lutz, D.; Rusche, N.; Bastus, N. G.; Stieben, M.; Holtig, M.; Gruner, F.; Weller, H.; Schachner, M.; Vossmeyer, T. *et al.* Gold Nanoparticles Functionalized with a Fragment of the Neural Cell Adhesion Molecule L1 Stimulate L1-mediated Functions. *Nanoscale* 2013, 5, 10605–10617.
- Borgens, R. B.; Bohnert, D. Rapid Recovery from Spinal Cord Injury After Subcutaneously Administered Polyethylene Glycol. J. Neurosci. Res. 2001, 66, 1179– 1186.
- 332. Borgens, R. B.; Shi, R. Immediate Recovery from Spinal Cord Injury Through Molecular Repair of Nerve Membranes with Polyethylene Glycol. *FASEB J.* **2000**, *14*, 27–35.
- 333. Laverty, P. H.; Leskovar, A.; Breur, G. J.; Coates, J. R.; Bergman, R. L.; Widmer, W. R.; Toombs, J. P.; Shapiro, S.; Borgens, R. B. A Preliminary Study of Intravenous Surfactants in Paraplegic Dogs: Polymer Therapy in Canine Clinical SCI. J. Neurotrauma 2004, 21, 1767–1777.
- 334. Luo, J.; Borgens, R.; Shi, R. Polyethylene Glycol Immediately Repairs Neuronal Membranes and Inhibits Free Radical Production After Acute Spinal Cord Injury. J. Neurochem. 2002, 83, 471–480.
- 335. Shi, R.; Borgens, R. B. Acute Repair of Crushed Guinea Pig Spinal Cord by Polyethylene Glycol. J. Neurophysiol. **1999**, 81, 2406–2414.
- 336. Krol, S.; Macrez, R.; Docagne, F.; Defer, G.; Laurent, S.; Rahman, M.; Hajipour, M. J.; Kehoe, P. G.; Mahmoudi, M. Therapeutic Benefits from Nanoparticles: The Potential Significance of Nanoscience in Diseases with Compromise to the Blood Brain Barrier. *Chem. Rev.* 2013, 113, 1877–1903.
- 337. Zhang, Q.; Iwakuma, N.; Sharma, P.; Moudgil, B. M.; Wu, C.; McNeill, J.; Jiang, H.; Grobmyer, S. R. Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for In vivo Tumor Imaging with Photoacoustic Tomography. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 395102.
- 338. Maupetit, J.; Derreumaux, P.; Tuffery, P. PEP-FOLD: An Online Resource for De Novo Peptide Structure Prediction. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W498–W503.
- 339. Maupetit, J.; Derreumaux, P.; Tufféry, P. A Fast Method for Large-scale De Novo Peptide and Miniprotein Structure Prediction. J. Comput. Chem. 2010, 31, 726–738.
- 340. Kirschbaum, C. *Biopsychologie Von A Bis Z*; Kirschbaum, C., Ed.; Springer-Lehrbuch; Springer, Heidelberg, 2008; p. 254.
- 341. Coman, I.; Barbin, G.; Charles, P.; Zalc, B.; Lubetzki, C. Axonal Signals in Central Nervous System Myelination, Demyelination and Remyelination. *J. Neurol. Sci.* 2005, 233, 67–71.
- 342. Guseva, D.; Zerwas, M.; Xiao, M.-F.; Jakovcevski, I.; Irintchev, A.; Schachner, M. Adhesion Molecule L1 Overexpressed Under the Control of the Neuronal Thy-1 Promoter Improves Myelination After Peripheral Nerve Injury in Adult Mice. *Exp. Neurol.* 2011, 229, 339–352.
- 343. Stevens, B.; Tanner, S.; Fields, R. D. Control of Myelination by Specific Patterns of Neural Impulses. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 9303–9311.

Sicherheit

Verwendete Chemikalien

<u>Chloroform:</u> GHS07 und GHS08 H-Sätze: H302+H332-H315-H319-H336-H351-H361d-H373 P-Sätze: 261-281-305+351+338

<u>Chloroform-d:</u> GHS07 und GHS08 H-Sätze: 302-315-351-373 P-Sätze: 281

<u>Citronensäure Monohydrat:</u> **GHS05** H-Sätze: 318 P-Sätze: 305+351+338-311

Diethylether:

GHS02 und **GHS07** H-Sätze: 224-302-336 EUH: 019-066 P-Sätze: 210-240-403+235

DL-Dithiothreitol: GHS07 H-Sätze: 302-315-319-335 P-Sätze: 261-305+351+338

Ethylendiamintetraessigsäure: GHS07 H-Sätze: 319 P-Sätze: 305+351+338-

Ethanol:

GHS02 H-Sätze: 225 P-Sätze: 210-

<u>Iod:</u>

GHS07 und **GHS09** H-Sätze: 332-312-400 P-Sätze: 273-302+352 <u>Kaliumcyanid:</u> GHS06 und GHS09 H-Sätze: 300+310+330-410 EUH: 032 P-Sätze: 273-280-302+352-304+340-309+310

(*RS*)-Liponsäure: GHS07 H-Sätze: 302 P-Sätze: -

4-Mercaptophenylessigsäure:

GHS05 und **GHS07** H-Sätze: 315-318-335 P-Sätze: 261-280-305+351+338

<u>3-Mercaptopropionsäure:</u> GHS05 und GHS06 H-Sätze: 301-314 P-Sätze: 280-301+310-305+351+338-310

<u>11-Mercaptoundecansäure:</u> GHS07 H-Sätze: 315-319-335 P-Sätze: 261-305+351+338

Polyethylenglykol-monomethylether: H-Sätze: -P-Sätze:

Salzsäure:

GHS05 und GHS07 H-Sätze: 290-314-335 P-Sätze: 234-260-304+340-303+361+353-305+351+338-309+311-501

<u>Silbernitrat:</u> GHS03, GHS05 und GHS09 H-Sätze: 272-314-410 P-Sätze: 273-280-301+330+331-305+351+338-309+310 Tetrachloridogold(III)-säure Trihydrat: GHS05 und GHS07 H-Sätze: 302-314-317 P-Sätze: 280-305+351+338-310

<u>Tetrahydrofuran:</u> GHS02, GHS07 und GHS08 H-Sätze: 225-319-335-351 EUH: 019 P-Sätze: 210-233-243-305+351+338

<u>Tri-Natriumcitrat Dihydrat:</u> H-Sätze: -P-Sätze: -

GHS-Sätze

| Gefahrenpiktogramme | Kodierung | Gefahrenklasse |
|---------------------|-----------|--|
| | GHS01 | Instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide |
| | GHS02 | Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide |
| | GHS03 | Entzündend (oxidierend) wirkend |
| \diamond | GHS04 | Gase unter Druck, verdichtete, verflüs- sigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase |
| | GHS05 | Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung |
| | GHS06 | Akute Toxizität |
| | GHS07 | div. Gesundheitsgefahren |
| | GHS08 | - |
| ¥2 | GHS09 | Gewässergefährdend |

Gefahrenhinweise (H-Sätze)

H200-Reihe: Physikalische Gefahren

| H200 | Instabil, explosiv |
|------|--|
| H201 | Explosiv, Gefahr der Massenexplosion. |
| H202 | Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke. |
| H203 | Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurf- |
| | stücke. |
| H204 | Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke. |
| H205 | Gefahr der Massenexplosion bei Feuer. |
| H220 | Extrem entzündbares Gas. |
| H221 | Entzündbares Gas. |
| H222 | Extrem entzündbares Aerosol. |
| H223 | Entzündbares Aerosol. |
| H224 | Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar. |
| H225 | Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. |
| H226 | Flüssigkeit und Dampf entzündbar. |
| H228 | Entzündbarer Feststoff. |
| H240 | Erwärmung kann Explosion verursachen. |
| H241 | Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen. |
| H242 | Erwärmung kann Brand verursachen. |
| H250 | Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst. |
| H251 | Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten. |
| H252 | In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten. |
| H260 | In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan |
| | entzünden können. |
| H261 | In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase. |
| H270 | Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel. |
| H271 | Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel. |
| H272 | Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel. |
| H280 | Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren. |
| H281 | Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -Verletzungen verursachen. |
| H290 | Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. |
| | |

H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.

| H319 | Verursacht schwere Augenreizung. |
|---------------------|--|
| H330 | Lebensgefahr bei Einatmen. |
| H331 | Giftig bei Einatmen. |
| H332 | Gesundheitsschädlich bei Einatmen |
| H332 H334 | Kann bei Einstman Allergie asthmaartige Symptome oder Atembe |
| 11554 | schwerden verursachen. |
| H335 | Kann die Atemwege reizen. |
| H336 | Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. |
| H340 | Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H341 | Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg ange- ben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Ex- positionsweg besteht). |
| H350 | Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht) |
| H350 i | Kann hei Finatmen Krehs erzeugen |
| H351 | Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H360 | Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schä- digen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg an- geben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Ex- positionswag besteht) |
| | positionsweg destent). |
| H300 F | Kann die Fruchloarkeit beeintrachtigen. |
| H360 D | Kann das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H360 FD | Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H360 Fd | Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H360 Df | Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbar- keit beeinträchtigen |
| H361 | Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expo- sitionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei kei- nem anderen Expositionsweg besteht) |
| H361 f | Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen |
| H361 d | Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schödigen |
| 11301 u 11261 fd | Kann vermutlich die Erschtherkeit heeinträchtigen. Vonn vermutlich des |
| H301 Iû | Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeintrachtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H362 | Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen. |
| H370 | Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr hei keinem anderen Expositionsweg besteht) |
| H371 | Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese |
| | Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H372 | Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht). |
| H373 | Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern |

bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H400-Reihe: Umweltgefahren

| H400 | Sehr giftig für Wasserorganismen. |
|------|--|
| H410 | Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. |
| H411 | Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. |
| H412 | Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. |
| H413 | Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung. |
| | |

Ergänzende Gefahrenmerkmale und Kennzeichnungselemente (EUH-Sätze)

| EUH 001 | In trockenem Zustand explosiv. |
|---------|---|
| EUH 006 | Mit und ohne Luft explosionsfähig. |
| EUH 014 | Reagiert heftig mit Wasser. |
| EUH 018 | Kann bei Verwendung explosionsfähige/ entzündbare Dampf/ Luft- |
| | Gemische bilden. |
| EUH 019 | Kann explosionsfähige Peroxide bilden. |
| EUH 044 | Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss. |
| EUH 029 | Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase. |
| EUH 031 | Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase. |
| EUH 032 | Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. |
| EUH 066 | Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen. |
| EUH 070 | Giftig bei Berührung mit den Augen. |
| EUH 071 | Wirkt ätzend auf die Atemwege. |
| EUH 059 | Die Ozonschicht schädigend. |
| EUH 201 | Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die |
| | von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten. |
| 201 A | Achtung! Enthält Blei. |
| EUH 202 | Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider |
| | zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. |
| EUH 203 | Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. |
| EUH 204 | Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen. |
| EUH 205 | Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervor- |
| | rufen. |
| EUH 206 | Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefähr- |
| | liche Gase (Chlor) freigesetzt werden können. |
| EUH 207 | Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche |
| | Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen ein- |
| | halten. |
| EUH 208 | Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reak- |
| | tionen hervorrufen. |
| EUH 209 | Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden. |
| 209 A | Kann bei Verwendung entzündbar werden. |
| EUH 210 | Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. |
| EUH 401 | Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchs- |

anleitung einhalten.

Sicherheitshinweise (P-Sätze)

P 100-Reihe: Allgemeines

| P101 | Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett |
|------|--|
| | bereithalten. |
| P102 | Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. |
| D102 | |

P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

P 200-Reihe: Prävention

| P201 | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. |
|------|--|
| P202 | Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. |
| P210 | Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten nicht rauchen. |
| P211 | Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen. |
| P220 | Von Kleidung // brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbe- wahren. |
| P221 | Mischen mit brennbaren Stoffen / unbedingt verhindern. |
| P222 | Kontakt mit Luft nicht zulassen. |
| P223 | Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflam- men unbedingt verhindern. |
| P230 | Feucht halten mit |
| P231 | Unter inertem Gas handhaben. |
| P232 | Vor Feuchtigkeit schützen. |
| P233 | Behälter dicht verschlossen halten. |
| P234 | Nur im Originalbehälter aufbewahren. |
| P235 | Kühl halten. |
| P240 | Behälter und zu befüllende Anlage erden. |
| P241 | Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung / verwenden. |
| P242 | Nur funkenfreies Werkzeug verwenden. |
| P243 | Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen. |
| P244 | Druckminderer frei von Fett und Öl halten. |
| P250 | Nicht schleifen / stoßen // reiben. |
| P251 | Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung |
| P260 | Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen. |
| P261 | Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. |
| P262 | Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen. |
| P263 | Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden. |

P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.

| P270 | | Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen. |
|------|---|--|
| P271 | | Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. |
| P272 | | Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. |
| P273 | | Freisetzung in die Umwelt vermeiden. |
| P280 | | Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tra- |
| | | gen. |
| P281 | | Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. |
| P282 | | Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tra- |
| | | gen. |
| P283 | | Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen. |
| P284 | | Atemschutz tragen. |
| P285 | | Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen. |
| P231 | + | Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen. |
| P232 | | |
| P235 | + | Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen. |
| P410 | | |
| | | |

P 300-Reihe: Reaktion

| P301 | BEI VERSCHLUCKEN: |
|------|---|
| P302 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: |
| P303 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): |
| P304 | BEI EINATMEN: |
| P305 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: |
| P306 | BEI KONTAMINIERTER KLEIDUNG: |
| P307 | BEI EXPOSITION: |
| P308 | BEI EXPOSITION ODER FALLS BETROFFEN: |
| P309 | BEI EXPOSITION ODER UNWOHLSEIN: |
| P310 | Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P311 | GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P312 | Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P313 | Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P314 | Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P315 | Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P320 | Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe auf diesem Kenn- |
| | zeichnungsetikett). |
| P321 | Besondere Behandlung (siehe auf diesem Kennzeichnungsetikett). |
| P322 | Gezielte Maßnahmen (siehe auf diesem Kennzeichnungsetikett). |
| P330 | Mund ausspülen. |
| P331 | KEIN Erbrechen herbeiführen. |
| P332 | Bei Hautreizung: |
| P333 | Bei Hautreizung oder -ausschlag: |
| P334 | In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen. |
| P335 | Lose Partikel von der Haut abbürsten. |
| P336 | Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich |
| | nicht reiben. |
| P337 | Bei anhaltender Augenreizung: |
| P338 | Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen weiter ausspülen. |
| 5010 | |

P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position

| | | ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. |
|---------------|----------|--|
| P341 | | Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position |
| - | | ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. |
| P342 | | Bei Symptomen der Atemwege: |
| P350 | | Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen |
| P351 | | Finige Minuten lang behutsam mit Wasser aussnülen |
| P352 | | Mit viel Wasser und Seife waschen |
| D252 | | Haut mit Wasser abwaschen / duschen |
| D260 | | Kontaministra Klaidung und Haut sofort mit viel Wasser abwasschen und |
| 1 300 | | denach Vlaidung auszichen |
| D261 | | Alla kontaministan Klaidungastijaka sofatt susziahan |
| P301 | | Alle kontammerten Kleidungsstucke solort auszlenen. |
| P302 | | Kontammerte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. |
| P363 | | Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen. |
| P3/0 | | Bei Brand: |
| P3/1 | | Bei Großbrand und großen Mengen: |
| P372 | | Explosionsgefahr bei Brand. |
| P373 | | KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht. |
| P374 | | Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener |
| 1071 | | Entferning |
| P375 | | Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen |
| P376 | | Undichtigkeit beseitigen wenn gefahrlos möglich |
| P377 | | Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen bis Undichtigkeit gefahr- |
| 13// | | los basaitiat worden kann |
| D278 | | Tum Löschen verwenden |
| D280 | | Lingebung röumen |
| F 300 | | Alle Zündevellen entformen, wenn gefehrles möglich |
| P200 | | Ane Zundquenen entremen, wenn gerännos mögnen. |
| P390 | | Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschaden zu vermeiden. |
| P391 | | Verschuttete Mengen aufnehmen. |
| P301 | + | BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFOMATIONSZENTRUM oder |
| P310 | | Arzt anruten. |
| P301 | + | BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONS- |
| P312 | | ZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| P301 | + | BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen. |
| P330 | + | |
| P331 | | |
| P302 | + | BEI KONTAKT MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen / nassen |
| P334 | | Verband anlegen. |
| P302 | + | BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife |
| P350 | | waschen. |
| P302 | + | BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. |
| P352 | | |
| P303 | + | BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten. |
| P361 | + | getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen Haut mit Wasser abwa- |
| P353 | ŗ | schen/duschen |
| P304 | _ | BELEINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position rubig- |
| P3/0 | I | stellen die das Atmen erleichtert |
| D204 | | BEI FINATMEN. Bai Atambaschwardan an dia frische Luft bringen und |
| 1 JU4 D2/1 | т | in ginger Desition rubigstallon, die des Atmon erleichtert |
| r 341 D205 | | III CHICI FOSHIOII TUIIIgSICHEII, UIC UAS AUHEII ETIEICHIETI. |
| r 303 | + | DEI KONTAKT WITT DEN AUGEN: Einige Minuten lang benutsam mit |
| P331 | + | wasser spulen. vornandene Kontaktiinsen nach Moglichkeit entfernen. |

| | Weiter spülen. |
|---|--|
| + | BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG: Kontaminierte Kleidung und |
| | Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen. |
| + | BEI EXPOSITION: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt an- |
| | rufen. |
| + | BEI EXPOSITION ODER FALLS BETROFFEN: Ärztlichen Rat einho- |
| | len / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| + | BEI EXPOSITION ODER UNWOHLSEIN: GIFTINFORMATIONS- |
| | ZENTRUM oder Arzt anrufen. |
| + | Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| | - |
| + | Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe |
| | hinzuziehen. |
| + | Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen / nassen |
| | Verband anlegen. |
| + | Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe |
| | hinzuziehen. |
| + | Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder |
| | Arzt anrufen. |
| + | Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich. |
| | |
| + | Bei Brand: zum Löschen verwenden. |
| | |
| + | Bei Brand: Umgebung räumen. |
| | |
| + | Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der |
| + | Entfernung bekämpfen. |
| | |
| + | Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosi- |
| + | onsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen. |
| | |
| | $\begin{array}{c} + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + $ |

P 400-Reihe: Aufbewahrung

| P401 | aufbewahren. |
|------|--|
| P402 | An einem trockenen Ort aufbewahren. |
| P403 | An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. |
| P404 | In einem geschlossenen Behälter aufbewahren. |
| P405 | Unter Verschluss aufbewahren. |
| P406 | In korrosionsbeständigem / Behälter mit korrosionsbeständiger Aus- |
| | kleidung aufbewahren. |
| P407 | Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen. |
| P410 | Vor Sonnenbestrahlung schützen. |
| P411 | Bei Temperaturen von nicht mehr als °C / aufbewahren. |
| P412 | Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen. |
| P413 | Schüttgut in Mengen von mehr als kg bei Temperaturen von nicht |
| | mehr als °C aufbewahren |
| P420 | Von anderen Materialien entfernt aufbewahren. |
| P422 | Inhalt in / unter aufbewahren |
| | |

P402 + In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.

| P404 | | |
|------|---|---|
| P403 | + | Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. |
| P233 | | |
| P403 | + | Kühl an einem gut belüfteten Ort aufgewahren. |
| P235 | | |
| P410 | + | Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewah- |
| P403 | | ren. |
| P410 | + | Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 |
| P412 | | °C aussetzen. |
| P411 | + | Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als °C aufbewahren |
| P235 | | |
| | | |

P 500-Reihe: Entsorgung

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Florian Schulz Diplom-Chemiker 13.02.1980 in Heide (Kreis Dithmarschen) geboren, verheiratet, 1 Kind Student im Studiengang Chemie (Promotion)

Berufliche Tätigkeiten und Zivildienst

10/2010-04/2014

Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg 10/2007-09/2010 Freiberufliche Tätigkeit als Lehrkraft in Kooperation mit dem Institut Die Überflieger, Hamburg 02/2006 – 07/2007 Werkstudent bei der Kelkoo Deutschland GmbH, Hamburg 10/2003 – 06/2005 Tätigkeit als Pflegehelfer beim Pflegedienst AKTIV & MOBIL, Hamburg 07/2002 – 01/2003 Tätigkeit als studentische Hilfskraft bei der Reederei CMA-CGM (Deutschland) GmbH, Hamburg 08/2000 – 03/2001 Tätigkeit als Pflegehelfer beim Pflegedienst Club 68, Helfer e.V., Hamburg 09/1999 – 08/2000

Zivildienst an der Astrid-Lindgren-Schule für Geistigbehinderte, Meldorf

Ausbildungsweg und Schule

seit 10/2010

Promotionsstudium im Arbeitskreis von Prof. Dr. Horst Weller am Institut für

Physikalische Chemie der Universität Hamburg

04-09/2010

Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Horst Weller am Institut für Physikalische

Chemie der Universität Hamburg mit dem Titel:

"Konjugation von L1-Peptiden an Gold-Nanopartikel und Charakterisierung der Addukte"

03/2010

Diplomhauptprüfung

07/2004

Abschluss der Diplomvorprüfung für Studierende der Chemie

10/2001

Immatrikuliert an der Universität Hamburg, Studienfach Chemie (Diplom)

08/1993 - 07/1999

Besuch der Meldorfer Gelehrtenschule, Abschluss Abitur

08/1990 - 07/1993

Besuch der Bismarckschule, Elmshorn

08/1986 - 07/1990

Besuch der Grundschule Kaltenweide, Elmshorn

Auslandsaufenthalt

05 - 08/2007

Forschungspraktikum an der Mississippi State University, Starkville, USA, im Rahmen eines IREU-Programms des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes (DAAD) und der National Science Foundation (NSF)

Publikationen

Publikationen zum Themenfeld dieser Dissertation

Schulz, F.; Vossmeyer, T.; Bastús, N. G.; Weller, H. Effect of the Spacer Structure on the Stability of Gold Nanoparticles Functionalized with Monodentate Thiolated Poly(ethylene Glycol) Ligands. *Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908.

Schulz, F.; Lutz, D.; Rusche, N.; Bastus, N. G.; Stieben, M.; Holtig, M.; Gruner, F.; Weller, H.; Schachner, M.; Vossmeyer, T.; Loers, G. Gold Nanoparticles Functionalized with a Fragment of the Neural Cell Adhesion Molecule L1 Stimulate L1-mediated Functions. *Nanoscale* **2013**, *5*, 10605–10617.

Weitere Publikationen

Kloust, H.; Schmidtke, C.; Feld, A.; Schotten, T.; Eggers, R.; Fittschen, U. E. A.; Schulz, F.; Pöselt, E.; Ostermann, J.; Bastús, N. G.; Weller, H. *In situ* Functionalization and PEO Coating of Iron Oxide Nanocrystals Using Seeded Emulsion Polymerization. *Langmuir* **2013**, *29*, 4915–4921.

Thiry, M.; Boldt, K.; Nikolic, M. S.; Schulz, F.; Ijeh, M.; Panicker, A.; Vossmeyer, T.; Weller, H. Fluorescence Properties of Hydrophilic Semiconductor Nanoparticles with Tridentate Polyethylene Oxide Ligands. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4965–4973.

Konferenzbeiträge

06/2011 Bunsentagung 2011, Berlin, Deutschland

Poster mit dem Titel: Conjugation of L1-peptides to Gold nanoparticles and characterization of the conjugates

Autoren: <u>Florian Schulz</u>, Neus Gómez Bastús, Tobias Vossmeyer, Gabriele Loers, Norman Rusche, David Lutz, Melitta Schachner, Horst Weller

05/2013 Bunsentagung 2013, Karlsruhe, Deutschland

Poster mit dem Titel: The influence of PEG structure on the stability of PEGylated gold nanoparticles

Autoren: Florian Schulz, Tobias Vossmeyer, Neus Gómez Bastús, Horst Weller

05/2013 E-MRS Spring Meeting 2013, Strasbourg, France.

Vortrag mit dem Titel: Stable gold nanoparticle-L1-peptide conjugates for the treatment of nervous system injury

Autoren: <u>Florian Schulz</u>, David Lutz, Norman Rusche, Neus Bastús-Gomez, Horst Weller, Melitta Schachner, Tobias Vossmeyer, Gabriele Loers

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Horst Weller für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, hervorragende Forschungsbedingungen, seinen stets guten Rat nicht nur in wissenschaftlichen Fragen und die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. Alf Mews danke ich für die freundliche Übernahme der Aufgabe des Zweitgutachters.

Ich danke Herrn Dr. Tobias Vossmeyer für seine hervorragende Betreuung, insbesondere für zahlreiche spannende und fruchtbare Diskussionen und Anregungen und die enorm wertvolle Unterstützung bei der Erstellung und Veröffentlichung der Publikationen. Ich habe sehr viel von ihm gelernt.

Ich danke Frau Dr. Neus G. Bastús für ihre wertvolle Unterstützung, spannende Diskussionen und Anregungen. Sie übernahm lange vor Beginn meiner Promotion meine "Grundausbildung" im Bereich der Goldnanopartikelsynthese und -funktionalisierung und steckte mich mit ihrer Begeisterung für das Thema an.

Ich danke Frau Dr. Gabriele Loers und Herrn Dr. David Lutz für die fruchtbare und spannende interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Teile der Forschung wurden finanziell durch die Landesexzellenzinitiative Hamburg: Nanotechnology in Medicine (NAME) unterstützt, vielen Dank dafür.

Weiterhin danke ich folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Allen Projekt- und Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit.

Julia Ziegler, Kristina Rossow, Sarah Wölper, Irina Fink, Nguyen Phung, Eugen Formenko und Agnes Weimer für ihre wertvolle Mitarbeit im Rahmen verschiedener Forschungspraktika. Niklas Lucht für die Bereicherung der Forschung mit seiner Bachelorarbeit

Frau Dr. Maria Trusch und der MS-Abteilung des Instituts für organische Chemie für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn Dr. Thomas Hackl und der NMR-Abteilung des Instituts für organische Chemie für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Johannes Ostermann für die GPC-Messungen.

Meinen alten und neuen Bürokollegen danke ich für eine tolle Zeit.

Ich danke zudem allen Mitgliedern des AK Weller ganz herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft, viele spannende Diskussionen und gemeinsame Projekte.

Ganz besonders möchte ich meiner geliebten Frau, Jennifer Jasberg, danken für ihre großartige Unterstützung!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Florian Schulz, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche gekennzeichnet habe. Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 09.02.2014

Florian Schulz