5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung verschiedener Konzepte zur Funktionalisierung von Nanopartikeln und ihre Konjugation mit Biomolekülen im Hinblick auf nanotechnologische Anwendungen.

Es wurden Synthesen für Gold-Nanopartikel entwickelt, die es erlauben, die Ligandenhülle bei minimaler Dicke kovalent zu verknüpfen und somit statisch an die Teilchenoberfläche zu binden. Dies wurde über Sol-Gel-Technik in Form einer Silikathülle realisiert. Darüber hinaus wurde die Ligandenhülle mit einer frei wählbaren Anzahl von funktionellen Kopplungsgruppen versehen. Gleichzeitig konnte die Löslichkeit und die Oberflächenladung durch zusätzliche kovalent gebundene Hilfsliganden eingestellt werden. CdTe-Nanokristalle wurden in ähnlicher Weise beschichtet und funktionalisiert. Ihre bis zu Monaten reichende Stabilität und Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Dicke der Silikathülle. Die resultierenden Kolloide waren über Monate stabil. Die biokompatiblen Nanopartikel besitzen fest gebundene Ligandenhüllen und nach außen zeigenden Aminogruppen, welche sich hervorragend für Kopplungsreaktionen mit biologischen Molekülen eignen.

Derartig aminofunktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden über eine Amidverknüpfungsreaktion mit einem *N*-hydroxysuccinimid-aktivierten Biotinderivat modifiziert. Mittels der an die Partikeloberfläche kovalent gebundenen Hilfsliganden können Löslichkeit und Oberflächenladung so eingestellt werden, daß sowohl vor als auch nach der Biotinylierung derart oberflächenmodifizierte Partikel über Monate in Lösung stabil sind. Die Biotinylierungsrate beträgt je nach Präparation zwei bis acht Biotingruppen pro Partikel. Die entsprechenden silikatbeschichten CdTe-Kolloide konnten in gleicher Weise biotinyliert werden. Diese bilden mit Avidin in einer sehr spezifischen Schlüssel-Schloß-Reaktion fluoreszierende Biokonjugate, die, wenn sie mit einem hohen Überschuß an CdTe-Kolloiden präpariert werden, eine komplexartige Struktur besitzen.

Es wurden verschiedene Konzepte zur Konjugation von Nanopartikeln und DNA entwickelt. Voraussetzung für eine dauerhafte Anbindung von DNA ist, daß die Ankergruppen auf der Partikeloberfläche fest gebunden sind, wie es in der quervernetzten Hülle der silikatbeschichteten Gold- und CdTe-Nanopartikel der Fall ist. Kovalente Bindungen zwischen DNA und funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche wurden über verschiedene Bindungsstrategien durchgeführt. Diese waren einerseits die über einen heterobifunktionellen Linker vermittelte Verknüpfung der oberflächengebundenen Aminogruppen mit den Thiolgruppen an entsprechend modifizierten Oligonukleotiden und andererseits die Phosphoramidbindung zwischen den Aminogruppen auf der

Partikeloberfläche und dem 5'-terminierten Phosphatrest der DNA. Die resultierenden Konjugate können über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt werden. Die gereinigten Konjugate wurden über AFM visualisiert.
Die elektrostatische Orientierung von DNA und DNA-Konjugaten in einem externen elektrischen Feld wurde mit Hilfe einer fluoreszenzmikroskopischen Methode beobachtet. Die DNA-Moleküle richten sich durch induzierte Polarisation entlang den Feldlinien aus und konzentrieren sich im inhomogenen Feld in den Bereichen höherer Feldstärken. Als optimale Feldparameter wurden bei einer sinusförmigen Wechselspannung eine Frequenz von 500 kHz und eine Spannung von 30 V (V_{Peak}) bei einem Elektrodenabstand von 20 µm bestimmt. Die Methode der elektrostatischen Manipulation individueller Moleküle im externen elektrischen Feld könnte einen wertvollen Beitrag zur Fabrikationstechnik molekularer Bauteile leisten.

S-Schichten wurden als Templat für die regelmäßige Anordnung von Nanopartikeln verwendet. Erstmalig konnte eine derartige Anordnung von Halbleiter-Nanopartikeln gezeigt werden. Wasserlösliche, positiv geladene CdSe-Nanopartikel binden auf der S-Schicht aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen in einem rechtwinkligen Gitter, das exakt der Periodizität der S-Schicht entspricht. Die selbstorganisierte Anordnung von Partikeln mit Halbleitereigenschaften besitzt ein einmaliges Potential im Hinblick auf die Fabrikation von integrierten elektronischen Bauteilen im Nanometermaßstab.
Die asymmetrische Funktionalisierung von Nanokristallen stellt eine große Herausforderungen an das Oberflächendesign von Partikeln dar. Erkenntnisse aus der Halbleiter-Kolloidsynthese, Photokatalyse, Sol-Gel-Chemie und Oberflächenstabilisierung bzw. –funktionalisierung vereinigen sich hier in einem komplexen Syntheseweg. Die asymmetrische Funktionalisierung eines Teilchens erfordert ein 'Werkzeug', das die Oberfläche eines Teilchens organisiert. Dieses wurde in Form eines heterophasigen Systems von platinisierten nanokristallinen Zinkoxidschichten und –pulvern realisiert. Die einseitig von Zinkoxid geschützten Platinpartikel wurden in mehreren Schritten asymmetrisch funktionalisiert. Die Bifunktionalisierung der Platinpartikel wurde über TEM- und IR-Charakterisierung nachgewiesen.
Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Synthesen und Selbstorganisationsverfahren nanoskaliger Materialien stellen einen vielfältigen Methodensatz zum Aufbau komplexer Hybridstrukturen dar.

6. Summary

The present work deals with the development of various conceptions for the functionalisation of nanoparticles and their conjugation with biomolecules in terms of nanotechnological applications.

Syntheses of gold nanoparticles were developed that allow to link the ligand-shell covalently at a minimum thickness, thus binding it statically to the particle surface. This was realised by means of sol-gel-technique in terms of a silica-shell. Furthermore, the ligand-shell was provided with an adjustable number of functional coupling groups. At the same time the solubility and the surface charge can be adjusted by additional covalently bound auxiliary ligands. CdTe nanocrystals were coated and functionalised in an analogous proceeding. Their up to months reaching stability and fluorescence intensity depend on the thickness of the silica-shell. The resulting colloids remained stable for months. The biocompatible nanoparticles possess a tightly bonded ligand-shell with outward pointing amine groups and an outstanding suitability for coupling reactions with biomolecules.

Such amino-functionalised gold nanoparticles were modified by amide linkage with a *N*-hydroxysuccinimide activated biotin derivative. By means of surface bound auxiliary ligands solubility and surface charge can be adjusted in such a way that before and after biotinylation the surface-modified particles remained stable in solution for months. The rate of biotinylation amounts according to the preparation two to eight biotin groups per particle. The corresponding silica-coated CdTe colloids could be biotinylated in the same manner. In a very specific key-lock reaction they form fluorescent bio-conjugates with avidin that have a complex-like structure, if they are prepared with a high excess of CdTe colloids.

Diverse conceptions for the conjugation of nanoparticles and DNA have been developed. The precondition for a permanent linkage of DNA is the tight bonding of the anchor-groups to the particle surface, as in the cross-linked shell of the silica-coated gold and CdTe nanoparticles. Covalent bonds between DNA and the functional groups on the particle surface were carried out via different coupling strategies. These were first the heterobifunctional linker mediated linkage of the surface amine groups and the thiol groups of appropriately modified oligonucleotides and second the phosphoramidate bond between the amine groups on the particle surface and the 5'-phosphate of the DNA. The resulting conjugates can be purified by agarose gel electrophoresis. The purified conjugates were visualised by AFM.

The electrostatic orientation of DNA and DNA-conjugates in an external electric field was observed employing a fluorescence microscopic method. The DNA molecules align themselves along the electric field lines by means of induced polarisation. In the

inhomogeneous field they concentrate in the areas of increased electric field strength. The optimal field parameters at an electrode distance of 20 µm were a sinusoidal voltage with a frequency of 500 kHz and a peak voltage of 30 V. The method of the electrostatic manipulation of individual molecules in an external electric field could accomplish a valuable contribution to the fabrication technique of molecular devices.

S-layers were used as a template for the regular assembly of nanoparticles. For the first time such formations of semiconductor nanoparticles could be shown. Due to electrostatic interactions water soluble, positively charged CdSe nanoparticles bind on the s-layer in a rectangular array that conforms exactly to the periodicity of the s-layer. The self-assembled array of particles with semiconductor properties possesses a unique potential with respect to the fabrication of integrated electronic devices in the nanometer scale.

The asymmetrically functionalisation of nanocrystals repesents one of the major challenges to the surface design of nanoparticles. Here the knowledge of the synthesis of semiconductor colloids, photocatalysis, sol-gel-chemistry and surface-stabilisation respectively -functionalisation combine to a complex synthesis. The asymmetrically functionalisation requires a 'tool', that organises the surface of a particle. That was realised in terms of a heterophasic system of platinised nanocrystalline zincoxide films and powders. Successively, the platinum particles, one-side protected by zincoxide, were asymmetrically functionalised. The bifunctionalisation of the platinum particles was verified by TEM and IR characterisation.

The within the scope of this work developed syntheses and self-assembly-methods of nanoscaled materials represent a set of techniques for the formation of complex hybrid structures.