
**Untersuchungen zur Stabilität von
Halbleiternanopartikeln,
deren Biokonjugationen mittels Staudinger Ligation
und Zellaufnahmestudien solcher Systeme**

DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Manuela Gehring
aus Ludwigslust

Hamburg 2014

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Oktober 2009 bis Juni 2013 am Institut der Physikalischen Chemie der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Weller angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Mews

Disputation: 15. Mai 2014

für

Michel

&

Charlie

&

Maiko

1 EINLEITUNG.....	1
2 THEORETISCHER HINTERGRUND.....	3
2.1 Halbleiternanopartikel.....	3
2.2 Synthese.....	4
2.3 Größenabhängige Eigenschaften.....	5
2.4 Größenquantisierungseffekt	7
2.4.1 Teilchen im Kasten	7
2.4.2 LCAO-Theorie.....	9
2.5 Optische Eigenschaften.....	9
2.6 Oberflächenfehlstellen und Quantenausbeute	11
2.8 Anwendung von Nanopartikeln im <i>Life Science</i> -Bereich.....	12
2.8.1 Biokompatibilität	12
2.8.2 Ligandenaustausch von CdSe/CdS/ZnS-Nanopartikeln mit Diblock-Polymeren.....	13
2.8.3 Stabilität von Nanopartikeln.....	15
2.8.4 Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen	18
2.8.5 Toxizität von Halbleiternanopartikeln	19
2.9 Staudinger Ligation	23
2.9.1 Nicht spurlose Staudinger Ligation	23
2.9.2 Spurlose Staudinger Ligation	25
3 ZIELSETZUNG.....	26
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	27
4.1 Partikelsysteme.....	27
4.2 CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (Partikelsystem a).....	35
4.2.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	35
4.2.2 Temperaturabhängige Langzeitstabilität über 3 Monate	36
4.2.3 Kurzzeitstabilität über 1 Woche	40
4.2.4 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden.....	42
4.2.5 Dynamische Lichtstreuung	43
4.2.6 Lagerung bei -20 °C / 120 °C	50
4.3 CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (Partikelsystem b).....	52
4.3.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	52
4.3.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche	54
4.3.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden.....	56
4.3.4 Dynamische Lichtstreuung	57

4.3.6 Lagerung bei -20 °C / 120 °C	60
4.4 CdSe/ZnCdS/ZnS-PI-<i>b</i>-PEO-OH (Partikelsystem c)	62
4.4.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	62
4.4.2 Dynamische Lichtstreuung	64
4.5 CdSe/CdS/ZnS-PI-<i>b</i>-PEO-OH-Polystyrol (Partikelsystem d)	66
4.5.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	66
4.5.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche	68
4.5.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden.....	69
4.5.4 Dynamische Lichtstreuung	71
4.5.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C	74
4.6 CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH (Partikelsystem e)	76
4.6.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	76
4.6.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche	78
4.6.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden.....	79
4.6.4 Dynamische Lichtstreuung	81
4.6.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C	84
4.7 CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von Ocean Nano Tech (Partikelsystem f).....	86
4.7.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	86
4.7.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche	88
4.7.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden.....	89
4.7.4 Dynamische Lichtstreuung	91
4.7.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C	94
4.8 CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von life technologies™ (Partikelsystem g)	96
4.8.1 Langzeitstabilität über 6 Monate	96
4.8.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche	98
4.8.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden.....	99
4.8.4 Dynamische Lichtstreuung CdSe/ZnS-PEO-NH ₂ (g) life technologies™	101
4.8.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C	104
4.9 DLS der verwendeten Medien.....	105
4.10 Zeta-Potentiale der Partikelsysteme	106
4.11 Toxizitätsmessungen von den Partikelsysteme der Stabilitätsreihe	107
4.12 Zusammenfassung.....	108
4.13 Nicht spurlose Staudinger Ligation.....	113
4.13.1 Darstellung des Staudinger-Reagenzes	113
4.13.2 Kopplungsreaktion des Staudinger-Reagenzes an Methoxypolyethylenglycolamin	114
4.13.3 Staudinger Ligation von mPEG-MDT mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galacto-pyranosylazid	116
4.13.4 Kopplungsreaktionen des Staudinger-Reagenzes an PI- <i>b</i> -PEO	118
4.13.5 Staudinger Ligation von PI- <i>b</i> -PEO-MDT mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylazid	119
4.13.6 Kopplungsreaktion des Staudinger-Reagenzes an QDs und anschließende Staudinger Ligation mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylazid	120

4.14 Spurlose Staudinger Ligation	122
4.14.1 Darstellung des Raines-Reagenzes.....	122
4.14.2 Kopplungsreaktion des DPPM an Methoxypolyethylenglycolen	124
4.14.2.1 Reaktionsmechanismus zur DCC-Kopplung	125
4.14.2.2 Reaktionsmechanismus zur CDI-Kopplung.....	127
4.14.3 Staudinger Ligation diverser mPEGs mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D- galacto-pyranosylazid	128
4.14.4 Kopplungsreaktionen des Raines-Reagenzes an Diblock-Polymeren	129
4.14.5 Staudinger Ligation von Diblock-Polymeren mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galacto-pyranosylazid	130
4.15 Zell-Aufnahmestudien von Nanopartikeln	131
4.15.1 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (NP1).....	134
4.15.1.2 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT konjugiert mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (NP1-Gal)	135
4.15.1.3 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT konjugiert mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (NP1-Glu)	136
4.15.2. Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-OH (NP2)	138
4.15.2.1 Zellaunahmen von CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT konjugiert mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (NP2-Gal)	139
4.15.2.2 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT konjugiert mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (NP2-Glu)	140
4.15.3 Zellaufnahme von CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (NP3)	141
4.15.3.1 Zellaufnahmen von CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT konjugiert mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (NP3-Gal)	142
4.15.3.2 Zellaufnahme von CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT konjugiert mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (NP3-Glu)	143
4.15.4 Vergleichende Aufnahmen von Nanopartikel an Hep-G2-Zellen.....	145
4.15.4.1 NP1 + NP1-Gal + NP1-Glu	145
4.15.4.2 NP2 + NP2-Gal + NP2-Glu	147
4.15.4.3 NP3 + NP3-Gal + NP3-Glu	149
4.15.4.4 Vergleichende Übersicht der Inkubationsdauer von 2 und 20 Stunden	151
4.15.5 Aufnahmestudien von NP1/Gal/Glu, NP2/Gal/Glu und NP3/Gal/Glu an der humanen Lungenkrebszelllinie A549	161
4.16 Toxizitätsuntersuchungen der mit Zucker konjugierten Partikel	172
5 EXPERIMENTALTEIL	173
5.1 Synthese von (SH)₃-PEO-OH (nach Literatur ⁸⁰).....	173
5.2 Ligandenaustausch:	173
CdSe/CdS/ZnS (CAN GmbH; Lot.: SAB-0-110-15) mit (SH)₃-PEO-OH.....	173
5.3 Stabilitätsuntersuchung.....	174
5.3.1 Ansetzen der biologisch relevanten Medien - Langzeitmedien über 6 Monate	174
5.3.2 Ansetzen der biologisch relevanten Medien - Kurzzeitmedien über 1 Woche.....	175
5.3.3 Ansetzen der biologisch relevanten Medien - Kurzzeitmedien über 24 Stunden	175
5.3.4 Herstellung der Farbstofflösung Rhodamin 6G als Referenz für die Quantenausbeutebestimmung	176
5.3.5 Messlösungen der Nanopartikel-Proben	177

5.4 Darstellung von 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalat (MDT) ^[82]	177
5.5 Kopplung von MDT mit Methoxypolyethylenglycolamin (Modellreaktion) ^[82]	178
5.6 Staudinger Ligation: MDT-NH-mPEG mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galacto-pyranosylazid ^[81]	179
5.7 Kopplung von MDT mit PI- <i>b</i> -PEO-NH ₂	179
5.8 Staudinger Ligation: MDT-NH-PI- <i>b</i> -PEO mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galacto-pyranosylazid	180
5.9 Kopplung von MDT an CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH	180
5.9.1 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH-MDT mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galacto-pyranosid	181
5.9.2 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH-MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose ...	181
5.10 Kopplung von MDT an CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-OH	181
5.10.1 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galacto-pyranosid	182
5.10.2 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose	182
5.11 Kopplung von MDT an CdSe/CdS-(Dot/Rods)-PI- <i>b</i> -PEO-OH	182
5.11.1 Staudinger Ligation: CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid	183
5.11.2 Staudinger Ligation: CdSe/CdS-(Dot/Rods)-PI- <i>b</i> -PEO-OH-MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose	183
5.12 Reinigung der Zucker-gekoppelten Partikel über den Sucrosegradienten	184
5.13 Darstellung von S-((diphenylphosphan)methyl)ethanethioat ^[78]	185
5.14 Darstellung von (Diphenylphosphan)methanthiol ^[99]	185
5.15 DCC-Kopplung von Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure mit Diphenylphosphan-methanthiol (Modellreaktion) ^[96]	186
5.16 CDI-Kopplung von Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure mit Diphenylphosphan-methanethiol (Modellreaktion) ^[96]	186
5.17 Reaktion von Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester mit Diphenylphosphanmethanthiol (Modellreaktion)	187
5.18 Reaktion von Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester mit Diphenylphosphanmethanthiol (Modellreaktion)	188
5.19 Staudinger Ligation: Kopplung von DPPM-CO-mPEG (5000) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid	188
5.20 Staudinger Ligation: DPPM-(essigsäure)-mPEG (5000) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid	189

5.21 Staudinger Ligation: Kopplung von DPPM-(essigsäure)-mPEG (5000) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid.....	189
5.22 DCC-Kopplung von PI- <i>b</i> -PEO-COOH mit Diphenylphosphanmethanthiol.....	190
5.23 Staudinger Ligation: DPPM-CO-PI- <i>b</i> -PEO mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid	190
5.24 Toxizitätsmessungen - WST-8 Assay.....	191
5.25 Zell-Aufnahmestudien von Nanopartikeln mit Hep-G2- und A549-Zellen	191
6 METHODEN	193
6.1 Absorptionsspektroskopie	193
6.2 Emissionsspektroskopie	193
6.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	193
6.4 Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM)	195
6.5 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR).....	195
6.6 Cellomics ArrayScan	196
7 ZELLKULTUR.....	197
7.1 Humane Lungenkrebszellen A-549	197
7.2 Hep-G2 Zellen	197
7.3 WST-8 Assay	197
8 ZUSAMMENFASSUNG.....	198
9 SUMMARY.....	200
10 LITERATUR	201
11. ANHANG	206
11.1 Abkürzungen	206
11.2 Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	208
11.3 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge	211
DANKSAGUNG	219

ERKLÄRUNG	220
-----------------	-----

1 Einleitung

Seit den 80er Jahren wird auf dem Gebiet der Nanotechnologie mit großem Interesse geforscht. ^[1,2,3,4] Anfangs waren die Synthesen verschiedenartiger Nanopartikel mit Verwendung unterschiedlichster Materialien sowie die daraus folgenden Eigenschaften von enormer Bedeutung. Die kleinen Partikel im Größenbereich von 1-100 nm wiesen im Vergleich zu Festkörpern aus dem jeweiligen Material andere neuartige optische und elektrische Eigenschaften auf.

Mit fortschreitenden Forschungs- und Entwicklungsergebnissen gewann die Anwendungsvielfalt der Nanopartikel an Interesse.

Heutzutage sind diese Teilchen unter anderem in den Bereichen der Solarindustrie, Kosmetik, Nahrungsmittelindustrie, Automobilindustrie, Pharmaindustrie und der Medizin unverzichtbar. ^[5]

Gerade bei Verwendung von lumineszierenden Halbleiternanopartikeln im biologischen Milieu müssen alle Voraussetzungen für eine nicht-toxische aber doch zielrelevante und effiziente Anwendung gegeben sein. Nach heutigem Forschungs- und Wissensstand bedarf es entsprechend in diesem Bereich noch weiterer Studien. Zum einen müssen milde Reaktions-, Konjugations- und Reinigungsmethoden entwickelt und untersucht werden, die keine zytotoxischen Spuren hinterlassen. ^[6,7,8,9]

Zum anderen müssen bestimmte biologische Stabilitätsmerkmale der Partikel unter diversen chemischen und biologischen Einflüssen, wie Temperaturgradienten, Reagenzien, pH-Werte und Kultivierungsmedien von Zellen hinsichtlich des Einsatzes in humanen Bereichen untersucht und bewertet werden. Gleichzeitig sollen dabei die Nanopartikel keine erheblichen Veränderungen ihrer Eigenschaften erleiden. Dies bedeutet insbesondere keine Änderungen bei Quantenausbeute, Lumineszenzeigenschaften allgemein und Photostabilität der Partikel. Weiterhin wird das schon oben angesprochene Ziel der Nicht-Toxizität dieser Teilchen verfolgt. Ein anderer Aspekt ist die Anwendung von Halbleiternanopartikeln als Biomarker für Markierungsversuche. Es gibt Hinweise, dass Nanopartikel gewisse Barrieren wie die Haut, Schleimhäute, Blut-Plazenta-, Blut-Hirn- oder auch Blut-Prostata-Schranke überwinden können. Dies kann zu gravierenden Folgen für die Gesundheit führen, weswegen weitere Studien hinsichtlich der Wirkung von Nanopartikeln auf humane Zellen erforderlich sind. Gegenwärtig haben es sich zahlreiche Forschungsgruppen zur Aufgabe gemacht, diverse Nanopartikel-Systeme herzustellen und für biologische und medizinische Anwendungen zu modifizieren.

^[10,11,12,13,14] Im Bereich der Bionanotechnologie werden unter anderem fluoreszierende Halbleiternanopartikel so verändert, dass diese für den medizinischen Einsatz, wie zum Beispiel zur Tumorbildgebung verwendet werden können. ^[15,16] Für entsprechende Studien und Untersuchungen bezüglich der Wirkung von Nanopartikeln *in-vivo* werden zunächst spezielle Modifikationen an den Nanopartikeln durchgeführt. So werden ihre Größe, Form und Oberfläche dahingehend verändert, dass sie die Voraussetzungen für den Einsatz in medizinischen oder biologischen Bereichen erfüllen. ^[6]

Mittlerweile gibt es eine Reihe an Anbietern, wie *Ocean Nano Tech*, *life technologiesTM*, *BioScience*, *cytodiagnosics*, die speziell für Kopplungsreaktionen oder Zellexperimenten diverse Nanopartikel zur Verfügung stellen. Neben den optimalen physikalisch-chemisch-biologischen Eigenschaften des Label-Systems spielen die wirtschaftlichen Gesichtspunkte eine herausragende Rolle, insbesondere das Preis-Leistung-Verhältnis.

In dieser Arbeit werden deshalb kommerziell erhältliche Quantum Dots (QDs) von *life technologiesTM* und *Ocean Nano Tech* mit denen von mir modifizierten Nanopartikeln sowie spezielle Teilchensysteme aus dem Arbeitskreis Weller der Universität Hamburg und der CAN GmbH auf ihre Eigenschaften, Stabilität und Zellaufnahme-Verhalten untersucht und verglichen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Halbleiternanopartikel

Als Halbleiternanopartikel werden Teilchen, die aus den Atomen der jeweiligen Gruppen des Periodensystems aufgebaut sind, verstanden. In der Literatur sind mittlerweile zahlreiche Zusammensetzungen bekannt: II-VI (z.B. CdSe, CdS, CdTe, ZnSe, ZnS), III-V (z.B. InP, InAs, GaAs) oder IV-VI (z.B. PbS, PbSe).^[17]

Durch Variation des Herstellungsverfahrens und Wahl geeigneter Materialien können Partikel im Hinblick auf die Absorptions- und Emissionswellenlängen einen großen Bereich abdecken (400 nm bis 1350 nm).

Wahlweise können annähernd kugelförmige *Quantum Dots* (QDs), stäbchenförmige Teilchen (*Quantum Rods*, QRs) oder auch komplexe Formen von Nanopartikeln erhalten werden (siehe Abb. 1). Die Nanopartikel sind auf Grund ihrer größenabhängigen, optischen und photoelektronischen Eigenschaften von besonderem Interesse unter anderem für biologische und medizinische Anwendungen.^[18]

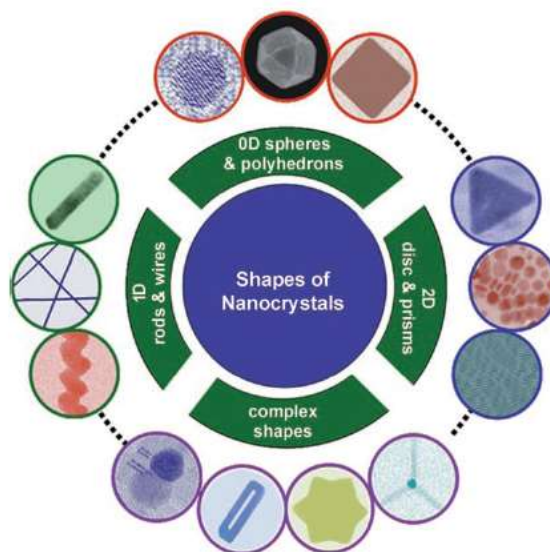


Abbildung 1: Übersicht zu den verschiedenen Partikelformen je nach Wahl der Materialien und Syntheseverfahren^[17]

Das wohl meist untersuchte Halbleiternanopartikel-System besteht aus einem CdSe-Kern und ein bis zwei umschließenden Schalen. Diese verleihen dem System eine deutlich verbesserte Stabilität und bestehen meist aus CdS und ZnS.

Da solche Partikelsysteme ausgezeichnete Photostabilität zeigen und durch verschiedene Kopplungsstrategien zugänglich für eine Vielzahl spezifischer Biokonjugationen sind, stellen sie in Bildgebungsverfahren gute Alternativen zu den bisher verwendeten organischen Farbstoffen dar. Dazu müssen die QDs nach der

Synthese mit entsprechenden biokompatiblen Liganden modifiziert und durch Anwendung spezifischer Konjugationsmethoden auf ein entsprechendes Targeting abgestimmt werden. ^[19,20] Die Löslichkeit der hydrophoben Nanopartikel in wässrigen Medien wird durch Wahl geeigneter Stabilisatoren beeinflusst. Dabei dienen organische Moleküle, die sich an der Oberfläche der Teilchen anlagern und eine Verbindung zwischen fester (QD) und flüssiger (Lösemittel) Phase bilden.

Beispiele für solche Ligandenmoleküle mit Thiol- oder Amin-Funktionalitäten sind Dihydroliponsäure ^[21], Mercaptocarbonsäuren $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}, n=1-15]$ ^[22,23,24,25,26] sowie mehrzählige Liganden. Weiterhin dienen zahlreiche Polymere mit Polyethylenoxid (PEO)-, Polyethylenimin (PEI)-, oder Polyisopren (PI)-Einheiten als Stabilisatormoleküle. ^[11,27,28,29,30] Diese können mit einer Vielzahl an terminalen funktionellen Gruppen (wie -Aldehyd, -Alken, -Alkin, -Amin, -Azid, -Boronsäure-ester, -Carbonsäure, -Epoxid, -Halogen, -Hydroxy, Pentafluorophenylester, -Thiol, etc.) versehen sein.

Durch die Art der verwendeten Liganden zur Oberflächenmodifizierung werden die cadmiumhaltigen Nanopartikel entsprechend abgeschirmt und können eventuelle Zytotoxizität verringern.

In dieser Arbeit sind wahlweise sphärische CdSe/ZnS- und CdSe/CdS/ZnS-Partikel sowie stäbchenförmige CdSe/CdS-Teilchen mit unterschiedlichen Polymer-Liganden modifiziert und unter anderem hinsichtlich ihrer Toxizität untersucht worden (siehe Kapitel 4.11).

2.2 Synthese

Nanopartikel sind prinzipiell durch zwei unterschiedliche Synthesestrategien darstellbar.

Zum einen können sie durch konventionelle Verkleinerungsmethoden, in sogenannten *top-down*-Verfahren, hergestellt werden. Hier werden makroskopische Festkörper mechanisch (z.B. durch Mahlprozesse) oder chemisch (z.B. durch Ätzmethoden) zerkleinert. Dabei werden QDs mit einer breiten Größenverteilung, erheblichen Agglomerationen sowie Verunreinigungen erhalten. Es lassen sich mit dieser Methode kaum Partikel, die kleiner als 50 nm sind, herstellen.

Anders sieht es bei der sogenannten *bottom-up*-Methode aus. Hierbei erfolgt der Aufbau von Nanopartikel aus Salzen und anderen geeigneten Vorstufen. Der Partikel wird Atom für Atom bzw. Ion für Ion aufgebaut. Mit diesem „Vergrößerungsverfahren“ ist es möglich, die Darstellung von sehr kleinen Nanopartikeln, etwa 2 nm bis mehrere 100 nm zu steuern. Neben der Kontrolle der Partikelgröße sind weitere Vorteile, wie eine monodisperse Größenverteilung, die Unterdrückung von Agglomerationsprozessen und die gezielte Kontrolle der Oberflächenfunktionalisierung von großer Bedeutung. ^[5, 19]

Mittels sogenannter Precursor-Lösungen, bestehend aus den gewünschten Ausgangsverbindungen (im Falle von CdSe: Cadmiumacetat oder Cadmiumoxid gelöst in Tri-*n*-octylphosphin (TOP)- und Selen gelöst in TOP), kann die Nukleation bei geeigneten Temperaturen (um die 300 °C) gesteuert werden. Um möglichst einheitliche und kristalline Nanopartikel zu erhalten, wird nach der *hot-injection*-Methode die Temperatur schnellstmöglich verringert.^[31] Durch die Dauer der bei der niedrigeren Temperatur anschließenden Wachstumsphase lässt sich die Größe der Partikel erfolgreich steuern. Eine Absättigung der reaktiven Oberflächen erfolgt während dieser Reaktion mit organischen Stabilisatormolekülen, meist langkettige Alkylverbindungen (hier: Tetradecylphosphonsäure (TDPA), Hexadecylamin (HDA), Tri-*n*-octylphosphinoxid (TOPO)). Durch entsprechende Wahl von geeigneten Stabilisatoren und Temperaturen ist auch eine Formkontrolle der Nanoteilchen möglich.

In dieser Arbeit werden annähernd kugel- und stäbchenförmige Partikel untersucht. Beide Teilchensysteme bestehen aus einem runden CdSe-Kern. Dabei wird die resultierende Form des Partikels bereits durch Wahl der cadmiumhaltigen Precursor-Lösung bestimmt.

Die sphärischen Nanopartikel werden aus Cadmiumacetat und unter Verwendung von HDA-Liganden hergestellt. Anschließend werden sie mit einer CdS- und ZnS-Schale gleichmäßig versehen. Hierbei werden entsprechende Cadmium- und Zinkacetat-TOP-Lösungen mit einer Schwefelkomponente, Schwefelwasserstoff oder Bistrimethylsilylsulfid, verwendet.

Für die stäbchenförmigen Partikel wird zunächst Cadmiumoxid in TOP bei Temperaturen von 300 °C gelöst. Es wird anstelle von HDA die kürzer-kettige Alkylphosphonsäure TDPA verwendet. Die Form der resultierenden CdSe-Kerne ist rund, aber die sich anschließende CdS-Schale, hergestellt aus Cadmiumacetat und einer Schwefel-TOP-Lösung, bildet die gewünschten elongierten Partikel. Solche Teilchensysteme werden Dot/Rod-Partikel bezeichnet.

2.3 Größenabhängige Eigenschaften

Halbleiternanopartikel besitzen größenabhängige, optische und elektronische Eigenschaften, die sich von ihren makroskopischen Festkörpern signifikant unterscheiden.

Allgemein bestehen Nanopartikel aus Atomen mit diskreten Energieniveaus. Wenn zwei energetisch gleiche Atomorbitale (AO) miteinander wechselwirken, kommt es nach der Linearkombination von Atomen (LCAO, *Linear Combination of Atomic Orbitals*) zur Aufspaltung in zwei energetisch unterschiedliche Molekülorbitale (MO).

Bei Betrachtung makroskopischer Festkörper werden aus N AO entsprechend N MO aufgespalten. Da die resultierenden Energieniveaus der entstandenen Orbitale sehr

eng beieinander liegen, werden sie als Bänder bezeichnet. Dabei besteht das untere Valenzband aus bindenden Molekülorbitalen, während das energetisch höher liegende Leitungsband antibindenden Charakter aufweist. Im Fall von leitenden Materialien sind Valenz- und Leitungsband überlappt und so die Ladungsträger frei beweglich. Anders sieht es bei Isolatoren und Halbleitern aus. Hier kommt es zur Trennung der Bänder durch eine verbotene Zone, die sogenannte Bandlücke E_g , die keine Energieniveaus aufweist. In makroskopischen Halbleiter-Materialien ist diese Bandlücke eine Materialkonstante und nimmt Werte von 0 eV bis 4 eV an, bei Isolatoren über 4 eV. Speziell bei CdSe-Festkörpern beträgt diese Konstante 1.74 eV. [32]

Die Energiebänder in Molekülen spalten sich in die höchsten besetzten MO (*highest occupied molecular orbitals* – HOMO, was der oberen Grenze des Valenzbandes entspricht) und in die niedrigsten unbesetzten MO (*lowest unoccupied molecular orbitals* – LUMO, vergleichbar mit der energetischen Untergrenze des Leitungsbandes) auf.

Nanopartikel bestehen aus etwa 10 bis 1000 Atomen und befinden sich so im Übergangsbereich der diskreten Energieniveaus und den quasikontinuierlichen Bändern. Aus dieser Betrachtungsweise lassen sich die Nanoteilchen keinem der beiden Grenzfälle eindeutig zuordnen.

In Abb. 2 ist ein Energiediagramm mit dem Übergang vom makroskopischen Festkörper über die Nanopartikel zum Molekül desselben Materials dargestellt.

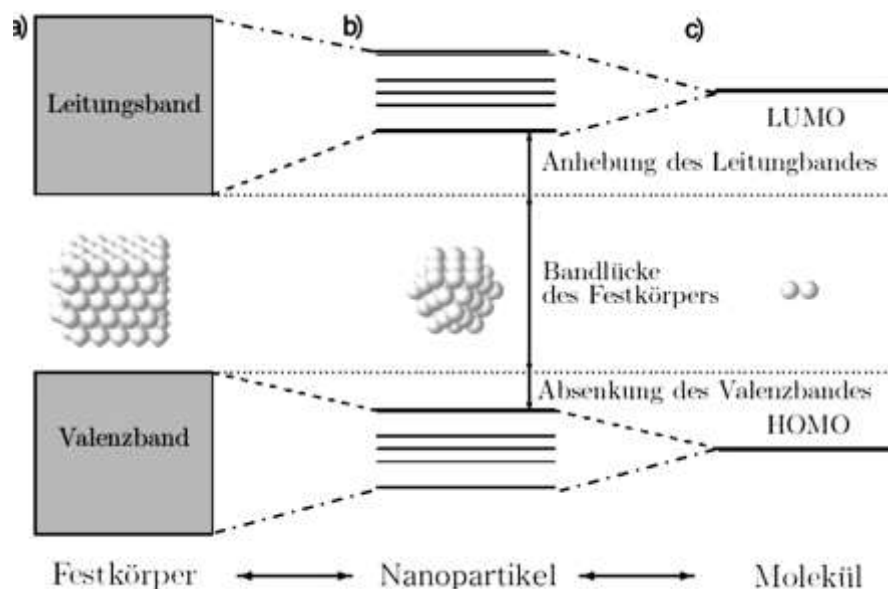


Abbildung 2: Energieschemata von a) Festkörper, b) Nanopartikel und c) Molekülen [33]

2.4 Größenquantisierungseffekt

Die Bandlücke E_g bei den Halbleiter-QDs ist abhängig von dem Durchmesser des Teilchens. Durch die Partikelgröße variieren somit die entsprechenden Absorptions- und Emissionsmaxima. Folglich können Partikel gleicher Zusammensetzung in unterschiedlichen Farben fluoreszieren (Abb. 3). Dieses Phänomen ist die Folge des Größenquantisierungseffekts.

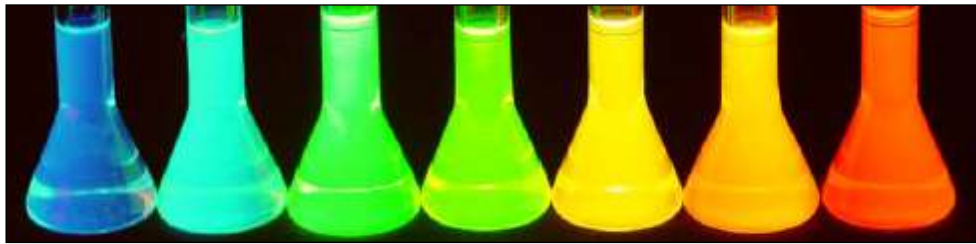


Abbildung 3: Halbleiternanopartikel im Größenbereich von ca. 1,7 nm (blau) bis ca. 5 nm (rot) unter UV-Bestrahlung ^[34]

Die Erklärung des Größenquantisierungseffekts kann mit Hilfe zweier Theorien erläutert werden: „Teilchen im Kasten“ und LCAO-Theorie.

2.4.1 Teilchen im Kasten

Kommt es zur Anregung eines Elektrons e^- aus dem Valenz- in das Leitungsband, bleibt an dessen Stelle ein Loch h^+ zurück. Im Nanoteilchen können sich Elektron und Loch auf Grund ihrer gegenseitigen Ladungen und der begrenzten Ausdehnung des Kristalls nicht frei bewegen. Es kommt durch Coulomb-Wechselwirkungen zur Ausbildung eines gebundenen Zustandes, dem sogenannten Wannier-Exziton (Abb. 4).

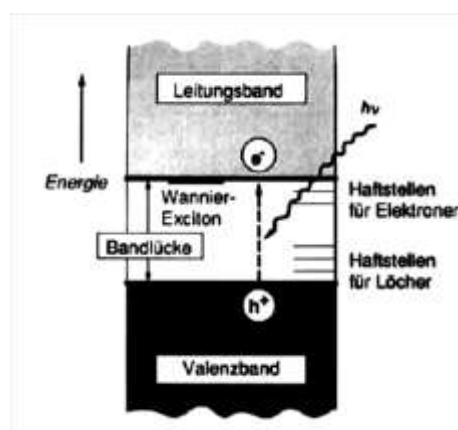


Abbildung 4: Energieniveauschema eines Loch-Elektron-Paares ^[35]

Das Exziton kann analog zu einem Wasserstoff-Atom beschrieben werden, da sich auch hier eine negative Ladung um eine positive Ladung bewegt. Durch Anwendung der „Effektiven-Massen-Näherung“ können die Ruhemassen durch die effektiven Massen von Elektron und Loch angegeben werden. Diese stellen vereinfacht ein Maß für die Beweglichkeit der Ladungsträger im Kristallgitter dar.

Die Ladungsträger besitzen dabei einen mittleren Abstand, den sogenannten Exziton-Bohr-Radius. Bei Halbleitern nimmt dieser Bohr-Radius Werte zwischen 1 nm und 50 nm an, speziell für CdSe-Makrokristalle beträgt er 4.9 nm.

Bei den betrachteten QDs ist die Ausdehnung des Partikels kleiner als dieser Exziton-Bohr-Radius. Die Ladungsträger erfahren die räumlichen Grenzen des Teilchens als Potentialwände. Nach dem Modell des *Teilchens im Kasten* können sich die Ladungsträger innerhalb dieser Potentialwände frei bewegen, während das Potential außerhalb unendlich wird.

Resultierend daraus kann die Energie des Exzitons in Abhängigkeit der Teilchendimensionen nur diskrete Werte annehmen. Nimmt der Durchmesser des Teilchens ab, sinkt entsprechend der Abstand der Potentialwände, folglich verschieben sich die Energiezustände zu höheren Werten.

Mit abnehmender Partikelgröße vergrößert sich somit die entsprechende Bandlücke und ist damit keine Materialkonstante mehr. Die verschieden großen QDs fluoreszieren im Ergebnis bei unterschiedlichen Wellenlängen.

Eine quantitative Berechnung zur Veränderung der Bandlücke E_g in Abhängigkeit der Kristallitgröße erfolgt durch Anwendung der Brus-Formel (Gleichung 1).

$$\Delta E = \frac{h^2}{8 \cdot R^2} \cdot \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.8 \cdot e^2}{4 \cdot \pi \cdot \varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot R} \quad \text{Gl. 1}$$

mit ΔE Änderung der Bandlücke in Bezug zur makrokristallinen Bandlücke
 h Plancksche Konstante
 m_e^*/m_h^* effektive Massen vom Elektron und Loch
 R Radius vom Nanopartikel
 $\varepsilon/\varepsilon_0$ Dielektrizitätskonstanten vom Halbleiter und im Vakuum

Der positive Beitrag wird durch den 1. Term beschrieben mit der Abhängigkeit von $1/R^2$. Durch die räumliche Einschränkung wird hierbei die Vergrößerung der Bandlücke zwischen den Energieniveaus von Elektron und Loch beschrieben.

Der 2. Term beschreibt den Beitrag der Coulomb-Wechselwirkung der Ladungsträger. Dieser stellt die Bindungsenergie des Exzitons dar und verändert sich mit $1/R$. Für kleine Werte von R hat der 1. Term einen größeren Einfluss, entsprechend wird die Bandlücke größer.

2.4.2 LCAO-Theorie

Die zweite Erklärung des Größenquantisierungseffekts ist an die LCAO-Theorie angelehnt. Die Nanopartikel werden als große Moleküle betrachtet, die mittels jeweils N AO gleicher Symmetrie und gleicher Energie beschrieben werden können. Durch Bildung von Linearkombinationen entstehen aus den N AO wiederum N Molekülorbitale (MO). Mit zunehmender Anzahl der AO nimmt somit auch die Zahl der MO zu. Mit steigender Atomanzahl wird der Abstand zwischen HOMO und LUMO kleiner. Im makrokristallinen Halbleiter gehen die MO schließlich in Valenz- und Leitungsband über. Die entstehenden Energiebänder sind durch die sogenannte Bandlücke voneinander getrennt.

Nanopartikel bestehen aus zahlreichen Atomen und befinden sich dabei zwischen Molekül und Makrokristall. Die Größe ihrer Bandlücke ist umgekehrt proportional zur Anzahl der Atome aus denen sie bestehen. Durch gezielte Wachstumskontrolle von Halbleiternanopartikel, bestehend aus CdSe, CdS und ZnS, können Werte für die Bandlücke zwischen 1.7 eV und 4 eV erhalten werden. ^[36,37] Dieser Bereich entspricht einer Wellenlänge von 400 nm bis 700 nm, also etwa dem Spektralbereich des sichtbaren Lichts.

2.5 Optische Eigenschaften

Wie bereits erwähnt wird durch die Größe der Nanopartikel die Lage der Bänder und die Abstände der Energiezustände innerhalb dieser Bänder verändert. Dies spiegelt sich in den erhaltenen Absorptions- und Emissionsspektren wider.

Beim Absorptionsspektrum kommt es zur Überlagerung der einzelnen Übergänge, hervorgerufen durch unterschiedliche energetische Zustände des Exzitons. Im Bereich der Bandkanten sind diese Überlagerungen deutlich voneinander getrennt, dass einzelne Übergänge erkennbar werden.

Werden Halbleiternanopartikel mit monochromatischem Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, so wird dieses absorbiert wenn die Photonenenergie größer bzw. gleich der Bandlücke ist. Bei verschiedenen großen Nanopartikeln verschiebt sich entsprechend ihrer Größe ihr erstes Absorptionsmaximum. Mit abnehmender Partikelgröße verschiebt sich der erste elektronische Übergang zu höherer Energie bzw. kleinerer Wellenlänge, folglich vergrößert sich die Bandlücke.

Die Absorption (oder auch Extinktion bzw. optische Dichte genannt) einer Probe entspricht dem Verhältnis I/I_0 , die sogenannte Transmission.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 2) stellt die Abhängigkeit der Intensität von der Probenkonzentration und der zurückgelegten Wegstrecke dar:

$$E_{\lambda} = -\lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 2}$$

mit	E_{λ}	Extinktion der Probe für Licht mit der Wellenlänge λ
	I	Intensität des transmittierten Lichts
	I_0	Intensität des eingestrahnten Lichts
	ε_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient (auch Absorptionskoeffizient) der absorbierenden Substanz
	c	Konzentration der absorbierenden Probe
	d	Weglänge bzw. Schichtdicke des Probengefäßes

Nach erfolgter Anregung eines Elektrons entsteht ein Elektron-Loch-Paar, wobei das Elektron in einen höheren Energiezustand übergeht. Es relaxiert dann zunächst bis zur Leitungsbandkante und fällt anschließend wieder in einen Zustand tiefer liegender Energie zurück. Geschieht diese Rekombination von Loch und Elektron strahlend, wird ein Photon mit der entsprechenden Energiedifferenz der beiden Bandkanten abgegeben und kann vom Spektrometer detektiert werden.

Die resultierenden Emissionsmaxima sind im Vergleich zu den entsprechenden Absorptionsbanden zu höheren Wellenlängen verschoben.

Dieser sogenannte *Stokes Shift* kann mit Hilfe des Franck-Condon-Prinzip erklärt werden (Abb. 5): Es erfolgt ein elektronischer Übergang aus dem Grundzustand in den darüber liegenden Schwingungszustand des angeregten elektronischen Zustands. Auf Grund der geringeren Masse der Elektronen erfolgt dieser Übergang so schnell, dass die schweren Kerne nicht darauf reagieren können und in ihrer ursprünglichen Lage verharren. Folglich sind nur vertikale Übergänge möglich. Nach strahlungsloser Desaktivierung im angeregten elektronischen Zustand kommt es zur Rekombination der Ladungsträger und schließlich zur spontanen Emission durch ein freiwerdendes Photon. Das erhaltene Emissionsspektrum ist zu höheren Wellenlängen und somit geringerer Energie verschoben.

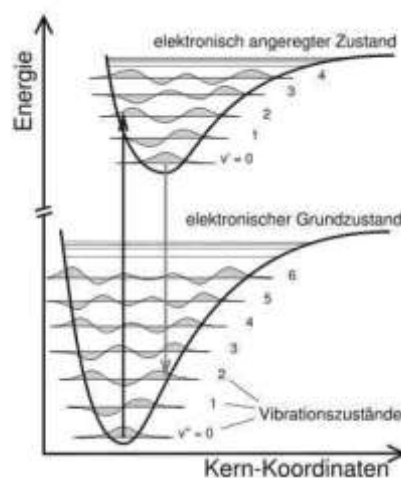


Abbildung 5: Franck-Condon-Prinzip ^[38]

2.6 Oberflächenfehlstellen und Quantenausbeute

Durch geeignete Synthesebedingungen lassen sich die Form und Größe der Partikel steuern (siehe Kapitel 2.2).

Ähnlich einfache Maßnahmen sind zur Kontrolle der Fluoreszenzeigenschaften nicht gegeben. Grund hierfür sind die großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisse der QDs. Diese bedeutende Eigenschaft bei Nanopartikeln hat zur Folge, dass an deren Oberfläche ausgebildete Fehlstellen im Kristallgitter überproportional stark die Eigenschaften der Partikel beeinflussen. Das können sowohl Energieniveaus für Elektronen (unter der Leitungsbandkante) als auch für Löcher (oberhalb der Valenzbandkante) sein, die als Fallenzustände (sogenannte „traps“) für die freien Ladungsträger fungieren können. Dies kann zur Folge haben, dass die durch Photonenabsorption erzeugten Ladungsträger nicht mehr frei beweglich, sondern an der Partikeloberfläche lokalisiert sind. Es kann keine Rekombination des Ladungsträgerpaares stattfinden. Um diesen Effekt entgegen zu wirken, müssen die Oberflächen der QDs bei der Synthese durch Stabilisatormoleküle (wie Liganden) oder über ein Schalenwachstum mit einem anderen Halbleitermaterial abgesättigt werden.

Das Vorhandensein dieser Fallenzustände beeinflusst das Fluoreszenzverhalten der Nanopartikel erheblich. Zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute wird das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen berechnet. Allerdings hat nicht jedes absorbierte Photon ein durch Fluoreszenz emittiertes Photon zur Folge. Ein Teil der gebildeten Exzitonen rekombiniert strahlungslos (siehe oben) und steht der messbaren Quantenausbeute nicht mehr zur Verfügung.

Zur relativen Bestimmung der Quantenausbeute von den in dieser Arbeit verwendeten II-VI-Halbleiternanopartikeln wird der Referenzfarbstoff Rhodamin 6G mit einer Quantenausbeute von 95% in Ethanol verwendet. ^[39]

Die Berechnung erfolgt unter Berücksichtigung der Brechungsindizes der entsprechenden Lösemittel mit der Steigungsmethode mit folgender Gleichung:

$$\phi(x) = \phi(\text{ref}) \cdot \frac{a(x)}{a(\text{ref})} \cdot \frac{n^2(x)}{n^2(\text{ref})} \quad \text{Gl. 3}$$

mit $\phi(x \text{ oder ref})$ Quantenausbeuten der Messprobe (x) und der Referenzprobe (ref, hier Rhodamin 6G mit 95% in Ethanol)

$a(x \text{ oder ref})$ lineare Steigungen aus den Auftragungen der erhaltenen Emissionsintegralen gegen die berechneten Absorptionsintensitäten der Messprobe (x) sowie der Referenzprobe (ref)

$n^2(x \text{ oder ref})$ Brechungsindizes der Messprobe (x) und der Referenzprobe (ref)

2.8 Anwendung von Nanopartikeln im *Life Science*-Bereich

2.8.1 Biokompatibilität

Für eine biologisch-orientierte Anwendung von Halbleiter-QDs müssen entsprechende Modifizierungen an der Teilchenoberfläche mit wasserlöslichen Liganden vorgenommen werden. [40,41,42,43]

Diese sollten zum einen den Verlust der Lumineszenzeigenschaften gering halten bzw. gar nicht beeinflussen, keine Beeinträchtigung in der Stabilität der Nanopartikel hervorrufen, sowie gute Zugangsmöglichkeiten für Kopplungsreaktionen von Biomolekülen gewähren.

Zur Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln können zwei allgemeine Mechanismen herangezogen werden (Abb. 7).

Die organischen Liganden auf den Nanopartikeln, wie z.B. TOPO oder HDA, werden beispielsweise in einem Zweiphasensystem aus Wasser und dem organischen Solvens gegen hydrophile Thiolatliganden ausgetauscht (A in Abb. 7). Dabei werden kovalente Disulfid-Bindungen zwischen der Sulfid-Oberfläche der Teilchen (durch die vorhandene CdS- oder ZnS-Schicht) und den verwendeten Thiolliganden ausgebildet. [8]

In dieser Arbeit wurde diese Reaktion am Beispiel des mehrzähligen Thiol-PEO-OH-Liganden mit CdSe/CdS/ZnS-Partikeln durchgeführt (siehe Kapitel 5.2). [44]

Ein zweites Herstellungsverfahren wasserlöslicher Partikel ist die Einkapselung der QDs durch langkettige amphiphile Polymere (hier z.B. PI-*b*-PEO-OH/-Polystyrol, B in Abb. 6). Dabei interagiert ein hydrophober Ligandenteil mit den organischen Oberflächenliganden der Nanopartikel während der hydrophile Teil des Polymers die Wasserlöslichkeit ermöglicht.

Im Arbeitskreis Weller wurde dazu ein spezielles Verfahren mit dem Diblock-Copolymer PI-*b*-PEO entwickelt, welches mizellare Strukturen hervorbringt. Diese Methode der Oberflächenmodifizierung soll weitaus stabilere Partikel in Wasser bilden, als die herkömmlichen Ligandenaustauschreaktionen. [29,45,46]

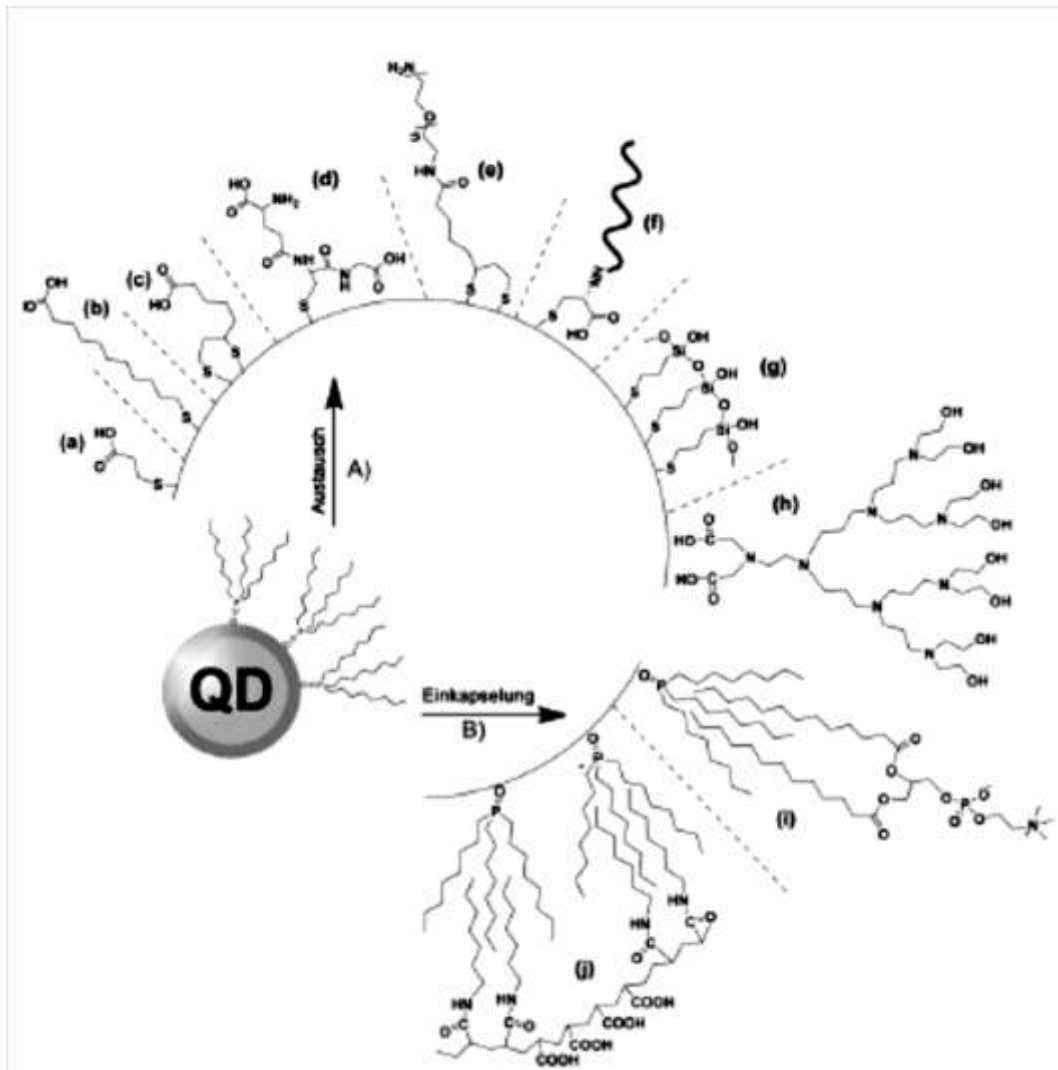


Abbildung 6: Austausch- und Einkapselungsmethoden zur Modifizierung von Nanopartikel-Oberflächen ^[47]

2.8.2 Ligandenaustausch von CdSe/CdS/ZnS-Nanopartikeln mit Diblock-Polymeren

Zum Transfer von organisch-löslichen Kern/Schale/Schale – CdSe/CdS/ZnS – QDs ins wässrige Medium hat sich die Verkapselung mit dem Diblock-Copolymer-Liganden PI-*b*-PEO als standardmäßiges Verfahren etabliert. Die entstehende mizellare Struktur der so verkapselten Nanopartikel zeigt hervorragende Löslichkeit in wässrigen Medien und gute Stabilitäten unter verschiedenen äußeren Einflüssen (pH-Wert, Temperatur, Proteinzusatz). Auf die einzelnen Stabilitätsuntersuchungen dieses Polymersystems wird in den Kapiteln 4.2-4.5 eingegangen.

Die Biofunktionalisierung der CdSe/CdS/ZnS-QDs erfolgt allgemein in zwei Stufen (Abb. 7):

1. Die organischen Kern/Schale/Schale-Partikel (CdSe/CdS/ZnS) werden in den hochsiedenden Lösungsmitteln TOP/TOPO/HDA hergestellt. Diese fungieren als Liganden auf der Oberfläche der QDs. Im ersten Schritt des Ligandenaustausches wird 2,2'-Diaminodiethylamin-block-polyisopren (PI-N3) als Passivator für die sogenannten *Traps-States* der QDs in Chloroform eingesetzt. Dies hat durch die zusätzliche stabilisierende Wirkung einen positiven Effekt auf die Quantenausbeute. Zum Anderen dient das PI-N3 als eine Art „Keimbildung“ für die sich anschließende Mizellenbildung (siehe Schritt 2). Nach Beendigung dieses Ligandenaustauschschritts wird das Lösungsmittel entfernt und die nun PI-N3-stabilisierten Nanopartikel können in Tetrahydrofuran (THF) überführt werden.

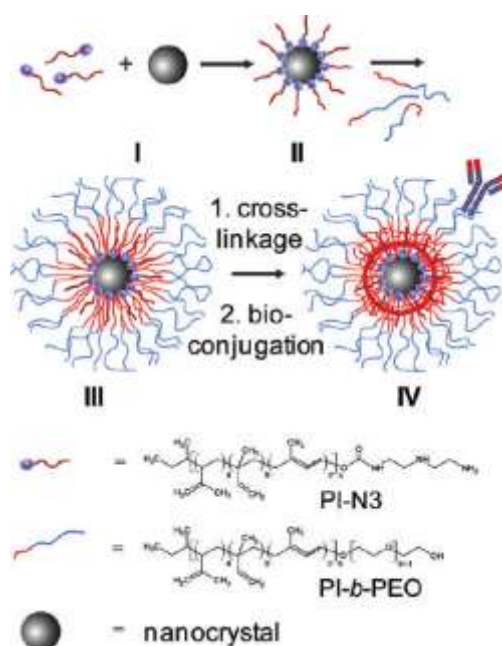


Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Verkapselung von Nanopartikeln mit dem amphiphilen PI-*b*-PEO-Diblock-Copolymer ^[48]

2. In dem sich anschließenden zweiten Schritt wird nun das amphiphile Polymer (PI-*b*-PEO) sowie der Radikal-Initiator Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) hinzugefügt. Diese QD-Polymer-Lösung in THF wird mittels einer Spritzenpumpe mit Wasser vermischt und es erfolgt eine spontane Selbstassemblierung (*self-assembly*) vom PI-*b*-PEO um die hydrophoben PI-N3 umhüllten QDs unter Ausbildung von Mizellen.

Schließlich werden die terminalen –C=C-Doppelbindungen des Poly(isopren)-Blocks durch thermische radikalische Polymerisation vernetzt.

Da bei diesem Ligandenaustausch neben den mit QDs gefüllten Mizellen auch leere Mizellen entstehen, müssen diese mittels eines Sucrosegradienten wieder entfernt werden. Diese Reinigungsmethode liefert schließlich biologisch verwertbare wasserlösliche Nanoteilchen.

2.8.3 Stabilität von Nanopartikeln

Die kolloidale Stabilität von Nanopartikeln ist zum einen von deren Materialbeschaffenheit und Aufbau (Kern-Schale-Schale-System) bestimmt. Zum anderen ist die Oberflächenmodifizierung von größter Bedeutung. Hier sollte sicher gestellt sein, dass eine optimale Abschirmung besteht, so dass die Nanoteilchen weder aggregieren noch ihre Fluoreszenzeigenschaften leiden. Durch Verwendung verschiedener Ligandensysteme und –Austauschverfahren (siehe Kapitel 2.8.1 und 2.8.2), können somit unterschiedliche Stabilitäten in biologischen Medien erhalten werden.

Dabei sind z.B. mehrzählige Thiolliganden sehr stabil, welche über Disulfid-Brücken an die Nanopartikeloberfläche gebunden sind. Da aber in Lösung ein Gleichgewicht zwischen an der Nanopartikeloberfläche gebundenen und in der Lösung vorliegenden Liganden besteht, gibt es hier eine erhöhte Angriffsmöglichkeit von Salzen (z.B.: Borat-Salzlösung, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS),...) oder komplexierenden Substanzen (wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA)). Diese führen zu destabilisierenden Effekten für das gesamte Nanopartikel-Liganden-System, indem sie die Bindungseigenschaften der Oberflächenliganden negativ beeinflussen. Abb. 8 zeigt verschiedene Bindungsmöglichkeiten von Liganden auf der Nanopartikeloberfläche. Diese können koordinativ oder über van-der-Waals-Kräfte gebunden sein.

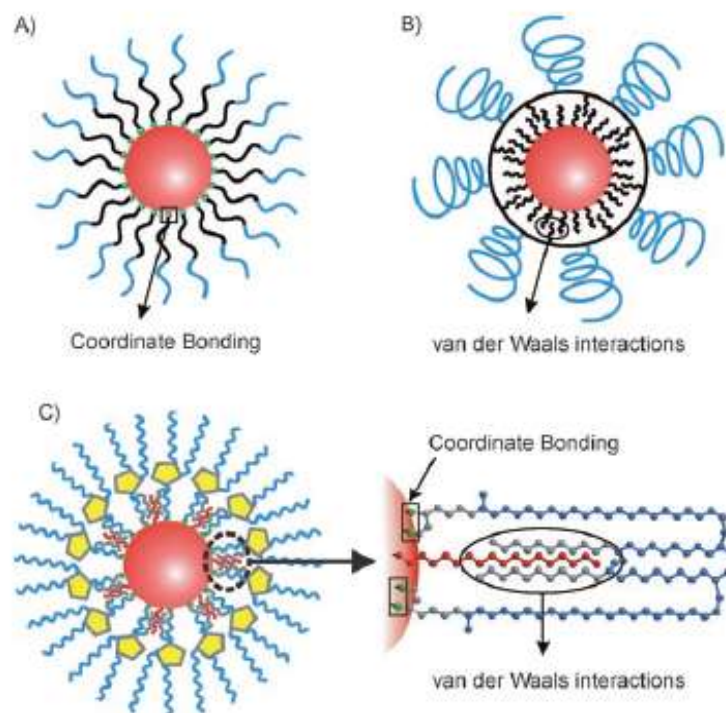


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bindungseigenschaften von Liganden auf der Nanopartikel-Oberfläche ^[49]

Gerade in stark verdünnten Lösungen tritt Aggregation der Nanoteilchen auf. Das Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Liganden ist dabei stark zu den sich in Lösung befindenden Liganden. Hier hilft ein mehrzähniger Ligand, da die Wahrscheinlichkeit dass beide Bindungsgruppen gleichzeitig abgehen gegenüber den Liganden mit nur einer Bindungseinheit verringert ist.

Ein weiterer großer Vorteil der Teilchen mit mehrzähnigen Thiolliganden ist die kleine Partikelgröße, gemessen am hydrodynamischen Durchmesser. Meist beträgt er bei kurzkettigen Polymeren ($M \sim 1000$ g/mol) um die 10 nm bis 20 nm.

Die Verwendung von Diblock-Polymeren oder Dendrimeren ergeben stabile Mizellen, welche allerdings einen wesentlich größeren hydrodynamischen Durchmesser von 35 bis 60 nm aufweisen. Auch hier sind destabilisierende Effekte durch Salze und Komplexe zu verzeichnen. Die dadurch bedingten Einflüsse auf die Ligandenhülle verändern die optischen Eigenschaften sowie die Quantenausbeute der Nanopartikel. Die Absorptionsspektren zeigen so zum Beispiel mehr oder weniger stark ausgeprägte Streuung, während Emissionsspektren einen Intensitätsverlust aufweisen.

Die sich ergebenden hydrodynamischen Durchmesser lassen auf eine Aggregation der Partikel schließen.

Unabhängig davon, welches Ligandensystem für die Oberflächenmodifizierung der Partikel verwendet wird, können kleinste Ionen die Oberfläche der Partikel erreichen und sie destabilisieren. So haben speziell Interaktionen mit Protonen aus sauren Lösungen und Sauerstoffradikale oxidierender Substanzen Veränderungen der optischen Eigenschaften zur Folge und verursachen hohe Quantenausbeuteverluste.

[50,51,52,53]

Die Stabilität der QDs gegenüber diversen pH-Einflüssen stellt hinsichtlich biologischer Anwendungen einen wichtigen Aspekt dar. Der menschliche Organismus ist sehr komplex und deckt einen Großteil der pH-Wert-Skala ab. Während es im Blut neutrale pH-Werte bei 7.0 bis 7.4 existieren, variieren diese im Magen bei sauren Werten um 1.0 bis 3.5 sowie im Pankreas mit 8.0 bis 8.3 (siehe Abb. 9). ^[103] Der Einfluss der biologischen Stabilität bei verschiedenen pH-Werten auf die Nanopartikel wird in dieser Arbeit hinreichend untersucht.

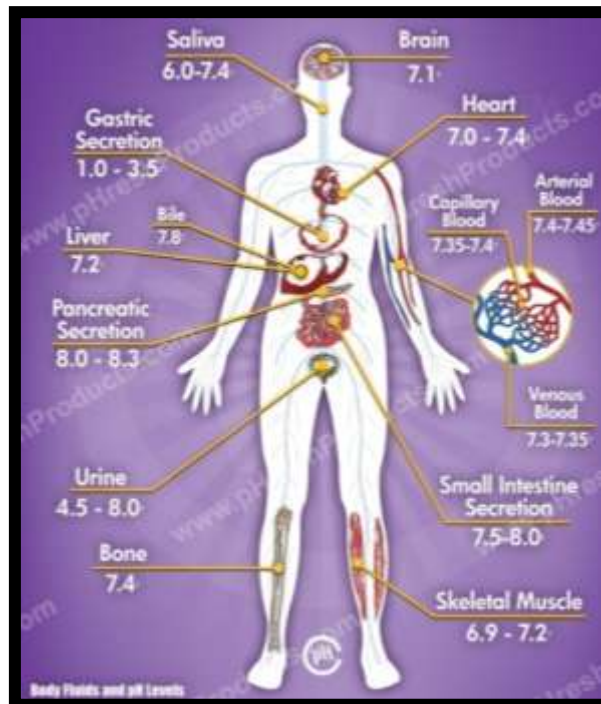


Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen pH-Wert-Bereiche im menschlichen Organismus. [103]

In den Abb. 10 und 11 sind Messküvetten von Dot/Rods in diversen Lösungsmitteln nach unterschiedlicher Lagerungsdauer (unter Bestrahlung mit UV-Licht) dargestellt. Hier werden die erwähnten Einflüsse von Salzen, Protonen und Sauerstoffradikalen auf das Nanopartikel-Liganden-System deutlich, in Form von Aggregation der Teilchen (PBS pH 11 sowie Na-Azid-PBS) und Abnahme der Fluoreszenz und somit der Quantenausbeute.

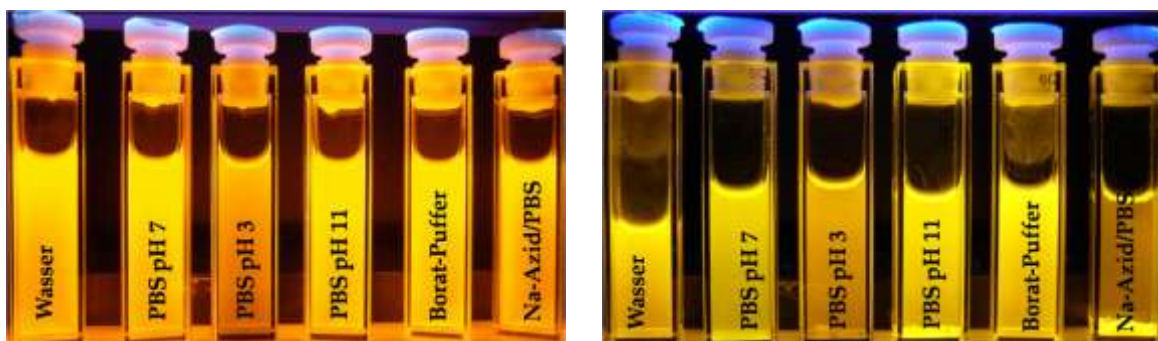


Abbildung 10: Agglomerationseffekte durch Einflüsse von Protonen und Salzen der Pufferlösungen bei CdSe/CdS-PI-b-PEO-OH (Dot/Rods) in PBS pH 11 und Na-Azid-Puffer nach 6 Monaten Lagerung (*rechtes Bild*) im Vergleich zu Beginn der Stabilitätsstudie in den untersuchten Medien (*linkes Bild*)

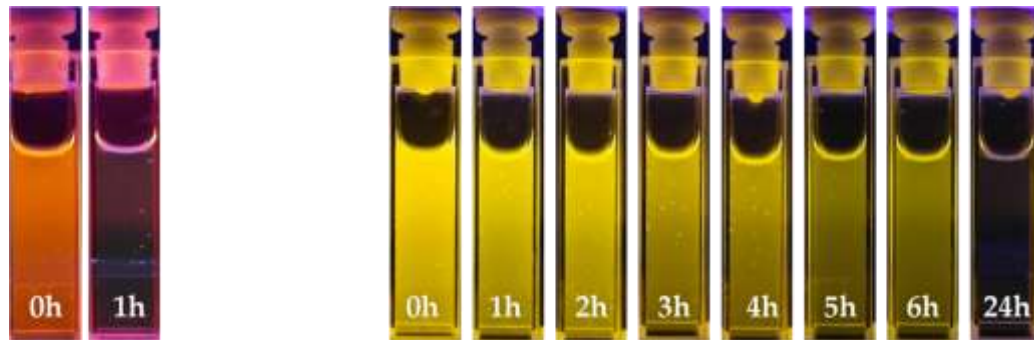


Abbildung 11: *links:* Aufnahme von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-QDs mit dem mehrzähligen Thiol-Liganden in 1%iger H₂O₂-Lösung unter UV-Bestrahlung. Nach bereits einer Stunde sind die Nanopartikel in 1%iger H₂O₂-Lösung vollständig aufgelöst. Es ist keine Fluoreszenz mehr messbar. *rechts:* Aufnahme auf CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH (Dot/Rods) in 1%iger H₂O₂-Lösung unter UV-Bestrahlung. Hier ist eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenz und somit auch der Quantenausbeute zu sehen. Nach 24 Stunden ist auch dieses Partikelsystem vollständig zerstört.

2.8.4 Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen

Transportprinzip

Die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen, z.B. für Markierungsstudien, kann durch Rezeptor-vermittelnde Endozytose erfolgen. Auf der Zellmembran befinden sich verschiedenste Arten von Rezeptoren, die außerzelluläre Bindungsreaktionen mit Liganden eingehen. Das heißt, die Nanopartikel müssen mit entsprechenden funktionalisierten Oberflächenliganden modifiziert sein, um von den Rezeptoren erkannt und schließlich spezifisch gebunden zu werden. ^[54]

In Abb. 12 wird die Aufnahme von Nanopartikeln durch einen oder mehrere endozytotische Wege verdeutlicht.

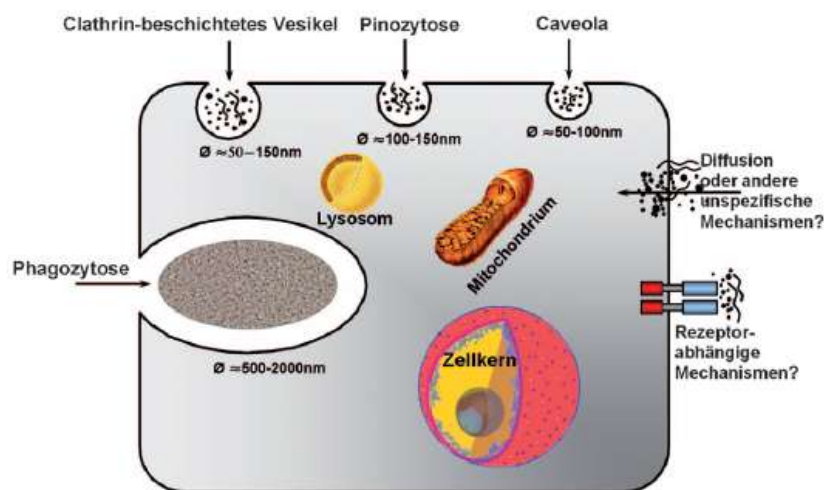


Abbildung 12: Aufnahme- und Transportmechanismen von Nanopartikeln in Zellen. ^[55]

Sie durchqueren in Vesikeln das endolysomale Netzwerk mit Hilfe von Proteinen und Zellorganellen. Durch die Vesikel gelangen die Nanoteilchen in die Endosomen oder sie werden durch die Plasmamembran zurück an die Zelloberfläche transportiert. Aus den Endosomen können sich enzymatisch Lysosomen bilden. Damit die Partikel ins Zytoplasma oder in den Zellkern gelangen, müssen sie das endolysomale Netzwerk verlassen und das Zytoplasma durchqueren. ^[56]

Eine weitere Möglichkeit ist die „Diffusion“ durch die Plasmamembran, die sogenannte adhäsive Interaktion. ^[56]

Oberflächenprinzip

Beim Vergleich große mit kleinen Partikeln unterscheiden die sich nicht nur in ihrem Durchmesser, sondern sehr stark in dem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis. Kleinere Partikel verursachen schnellere Reaktionen in den Zellen, auf Grund ihrer höheren Anzahl an reaktiven Atomen auf ihrer Oberfläche. Dies verstärkt sowohl positive (z.B. Transport von Therapeutika) als auch negative Wirkungen (z.B. Protein-Bindung). ^[56]

Fluoreszierende Halbleiter-QDs sind besonders interessant für biologische Markierungen von Zellen oder Tumorgewebe. Typischerweise sind sie je nach Oberflächenstrukturierung bzw. Ligandenfunktionalität bis zu 100 nm groß. Bei den CdSe-haltigen-Partikeln bestehen die Kerne aus dem toxisch wirkenden Cadmium. Ein bedeutender Faktor der Nanotoxizität besteht in der Stabilität der Partikel. Um die Toxizität zu reduzieren, müssen die Teilchen entsprechend stabilisiert werden. Dies wird durch das Aufwachsen von Hüllen (hier z.B. CdS und ZnS) sowie durch entsprechende Oberflächenmodifizierungen durch biokompatible Liganden erreicht.

2.8.5 Toxizität von Halbleiternanopartikeln

Mittlerweile gibt es einen weiten Anwendungsbereich für Nanopartikel. Somit ist auch für jeden Menschen, für Tiere und Umwelt ein gewisser Expositionsgrad gegeben. Da diese Kleinstteilchen nicht unmittelbar augenscheinlich auffallen, muss aus gegebenem Interesse für eine nicht-gesundheitsschädliche Aufnahme gesorgt werden. ^[57,58,59,60]

Es sind diverse Aufnahmewege in den menschlichen Organismus von Nanopartikeln möglich (Abb. 13). ^[61,62] Die QDs können je nach Anwendung oder Handhabung über die Lunge, die Haut, die Schleimhäute der Atemwege bis ins Blut gelangen oder intravenös die Blut-Hirnschranke und Plazenta passieren.

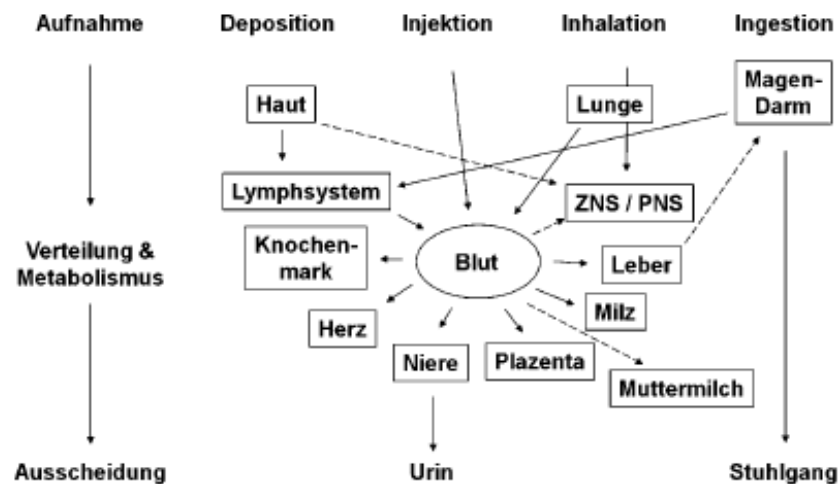


Abbildung 13: Schematische Darstellung über nachgewiesene (durchgezogene Pfeile) und mögliche (gestrichelte Pfeile) Transportwege von Nanoteilchen in den menschlichen Organismus ^[63]

Es können verschiedene Lungen-, Herz-Kreislauf- und Nervensystemerkrankungen ausgelöst werden. Demnach ist es von größter Bedeutung die biologische Wirkung synthetischer Nanopartikel zu untersuchen.

Ein genauer Wirkmechanismus von der Vielzahl an Nanomaterialien ist allerdings noch nicht verstanden.

Bei den Halbleiternanopartikeln wird die Zelltoxizität durch zwei Mechanismen hervorgerufen.

Ein Hauptaspekt ist die Bildung freier Sauerstoffradikale (*ROS - reactive oxygen species*; Superoxidanionradikal und Hydroxylradikal). Diese Radikale können in großen Mengen unkontrolliert mit Zellkomponenten, wie z.B. Lipiden, Proteinen oder der DNA interagieren. Folglich kommt es zur Schädigung oder sogar zum Tod der Zelle. Folgende Ursachen zur Bildung von ROS sind bekannt: Zum einen entstehen die Radikale direkt an der Nanopartikeloberfläche unter Bestrahlung der Teilchen mit UV-Licht. Auch die katalytische Wirkung von Übergangsmetallen hat die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen zur Folge (Abb. 14). Schließlich können nanogeschädigte Mitochondrien das Gleichgewicht der Atmungskette stören und selbst die Zellen produzieren durch aktivierte Makrophagen oder Neutrophilen ROS oder RNS (Stickstoffradikale). Die Radikale verursachen Entzündungsreaktionen, die im schlimmsten Fall eine Reaktion der Radikale mit Makromolekülen der Zelle mit sich führt. Folglich versagt das Abwehrsystem von Zelle und Gewebe.

Zum anderen kann Zelltoxizität durch die Freisetzung freier Cadmiumionen in Lösung ausgelöst werden. Cadmium wirkt sich kanzerogen auf Lunge, Haut und zum Beispiel Knochen aus und gilt als fruchtschädigend. ^[64]

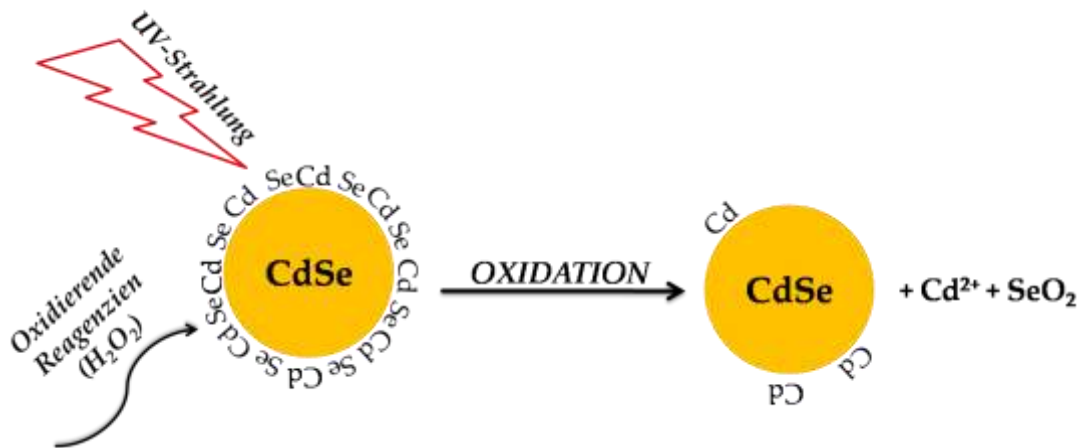


Abbildung 14: Freisetzungsmöglichkeiten von Cadmiumionen durch oxidierende Reagenzien und UV-Einwirkung ^[64]

Durch den Einfluss von toxischen Reagenzien verändert sich unter anderem optisch die Morphologie der Zellen.

Dies ist am Beispiel der humanen Lungenkrebszelllinie A549 dargestellt (Abb. 15). Während im linken Bild intakte Zellen dargestellt sind, zeigt die rechte Aufnahme kugelförmige abgestorbene Zellen durch die toxische Wirkung von CdCl₂.

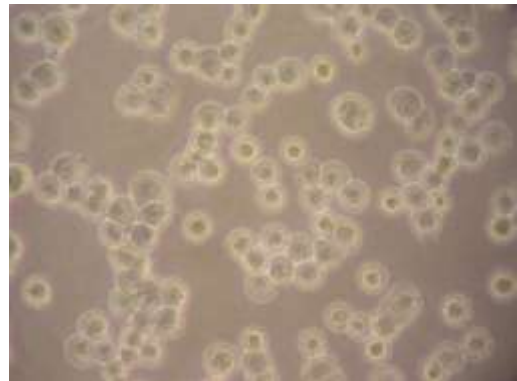
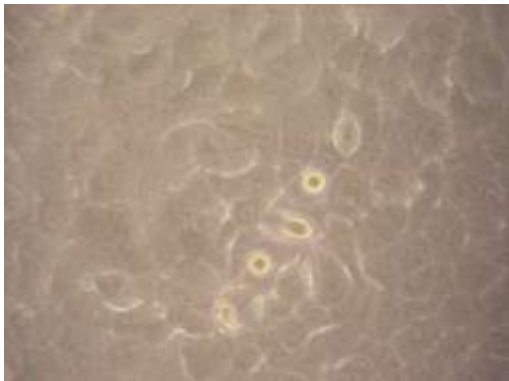


Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen von intakten A549-Zellen (linkes Foto) und von geschädigten Zellen (rechtes Foto), hervorgerufen hier durch 250 µM CdCl₂

2.8.5.1 WST-8 Assay

Es sind mittlerweile verschiedene Assays zur Toxizitätsuntersuchung etabliert worden.^[65,66,67,68,69,70]

Die Beurteilung lebender Zellen wird mittels des Tetrazoliums Salzes WST-8 (*water soluble tetrazolium*) in Verbindung mit einem Elektronenvermittler, 1-Methoxy-PMS durchgeführt (Abb. 16).^[71]

Für die Studien in dieser Arbeit wurde dieses Assay auf die humane Lungenkrebszelllinie A549 angewendet. Das 1-Methoxy-PMS befindet sich auf der Zellmembran und reagiert direkt mit dem NADH (*nicotineamido adenine dinucleotide* reduzierte Form) oder NADPH (*nicotineamido adenine dinucleotide phosphate* reduzierte Form). Diese beiden Formen entstehen durch Dehydrogenasereaktionen von Enzymen aus NAD⁺ und NADP⁺. Das wasserlösliche farblose Tetrazoliumsalz wird schließlich durch Dehydrogenase zum gelb-orangefarbenen Formazan mit einem bei 460 nm detektierbaren Absorptionsmaximum reduziert. Hieraus lässt sich die Konzentration des Farbstoffes ermitteln. Die gemessene Intensität ist hierbei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.^[72]

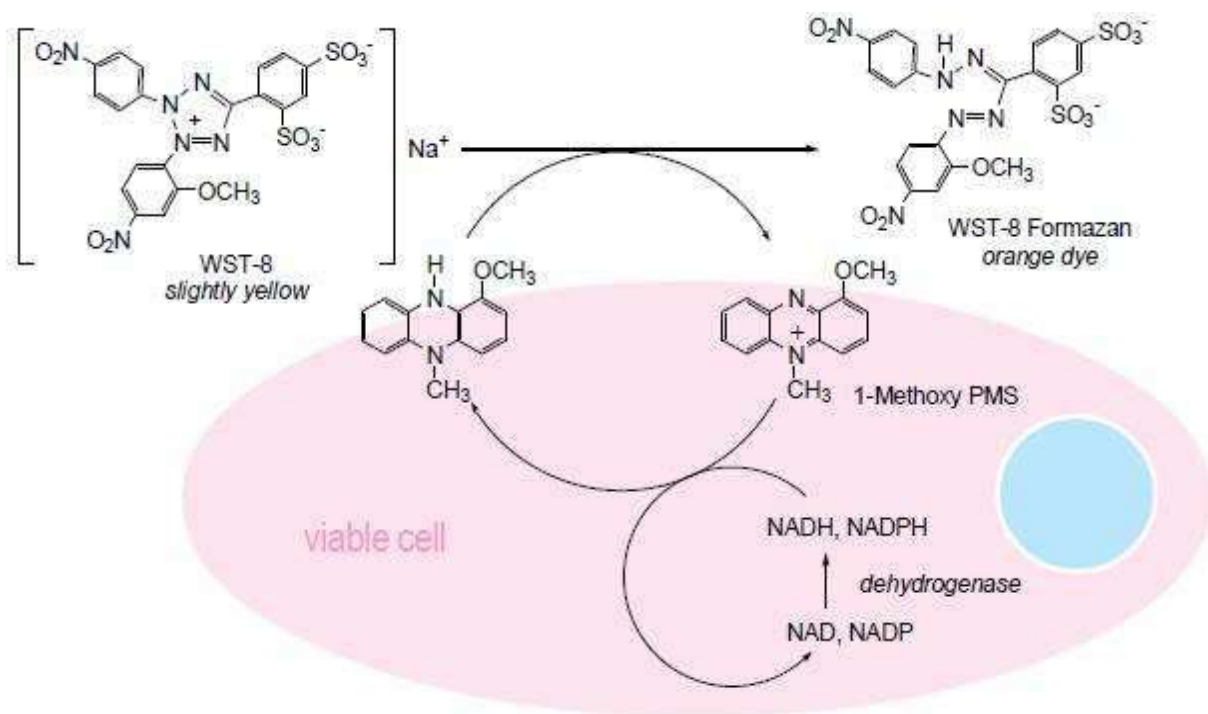


Abbildung 16: Mechanismus zur Darstellung vom WST-8 Formazan aus WST-8 einer intakten Zelle^[73]

2.9 Staudinger Ligation

Biokonjugationsmethoden zur Knüpfung kovalenter Bindungen von Markierungsmolekülen an diversen Biomolekülen werden immer bedeutsamer und entsprechend erforscht. *In vitro* können unter physiologischen Bedingungen mit unterschiedlichen Kopplungsstrategien z.B. Proteine, Glycane oder DNA so modifiziert werden, dass diese zur Markierung von Zelloberflächen und Immobilisierung von Proteinen dienen.

Zur Synthese solcher Biokonjugate werden beispielsweise die Thiol-Maleimid- oder die Amin-aktivierte Esterkopplung angewandt. Diese Konjugationsarten können allerdings nicht *in vivo* durchgeführt werden, auf Grund konkurrierender Nukleophile und Elektrophile, die an den Biomolekülen vorhanden sind. Um trotzdem *in vivo*-Markierungen durchzuführen, wurden ortsspezifische Konjugationsmethoden in einer natürlichen Umgebung entwickelt. Für diese sogenannten bioorthogonalen Konjugationen werden spezifisch reagierende funktionelle Gruppen, die nicht in biologischen Systemen vorkommen verwendet.^[74] Eine der am häufigsten genutzten Funktionalitäten für derartige Konjugationreaktionen ist die Azidgruppe, weil sie unter Abspaltung von Stickstoff gezielt aktivierbar ist. Für erfolgreiche Konjugationen macht sich neben der „Sharpless-Huisgen-Click-Chemie“ die hier sogenannte Staudinger Ligation diese Azid-Funktionalität zu nutze. Bei dieser Reaktionsmethode reagiert ein Azid mit einem Phosphanreagenz zu einer stabilen Amidbindung.

Bertozzi et al. fanden erstmals heraus, dass die Staudinger-Reaktion als chemoselektive, bioorthogonale Reaktion in der Glycobiologie angewandt werden kann.^[75] Es konnten erfolgreich Markierungsexperimente von azidmodifiziertem Glycan mit einem fluorogenen Phosphanreagenz in Zelloberflächen durchgeführt werden.^[74]

Die Ligation kann je nach Wahl des Phosphanreagenzes und Reaktionsbedingung *nicht spurlos* (nach *Bertozzi et al.*) oder *spurlos* (nach *Raines et al.* und *Bertozzi et al.*) ablaufen.^[74,76,77,78,79] Im Folgenden sind beide Mechanismen kurz erläutert.

2.9.1 Nicht spurlose Staudinger Ligation

Bei der hier sogenannten *nicht spurlosen* Staudinger Ligation reagieren ein Phosphan und ein Azid in Wasser unter milden Bedingungen quantitativ schrittweise zum stabilen Amid. Damit das dabei entstehende Aza-Ylid nicht zu einem primären Amin und dem zugehörigen Phosphanoxid hydrolysiert, ist das Phosphanreagenz mit einer intramolekularen elektrophilen Gruppe versehen. Durch intramolekulare Cyclisierung wird das nukleophile Aza-Ylid-Intermediat abgefangen. Am Schlüsselschritt der Staudinger Ligation ist vermutlich das in Abb. 17 gezeigte

Intermediat **c** beteiligt. Bei dem entstehenden Phosphanoxid **e** stammt das Sauerstoffatom von einem Wassermolekül. ^[75]

Bei dieser Staudinger Ligation reagiert die nukleophile Polymer-Phosphan-Einheit **a** mit dem elektrophilen Stickstoff des Zuckerazids **b** unter Abspaltung von Stickstoff (**1**). Dabei kommt es zur intramolekularen Cyclisierung (**2**). Unter Einwirkung von Wasser wird Methanol frei und es entsteht das gekoppelte Zucker-Polymer-Molekül mit der Phosphanoxid-Einheit **e** (**3**), welche als „Spur“ der Reaktion im Konjugat verbleibt.

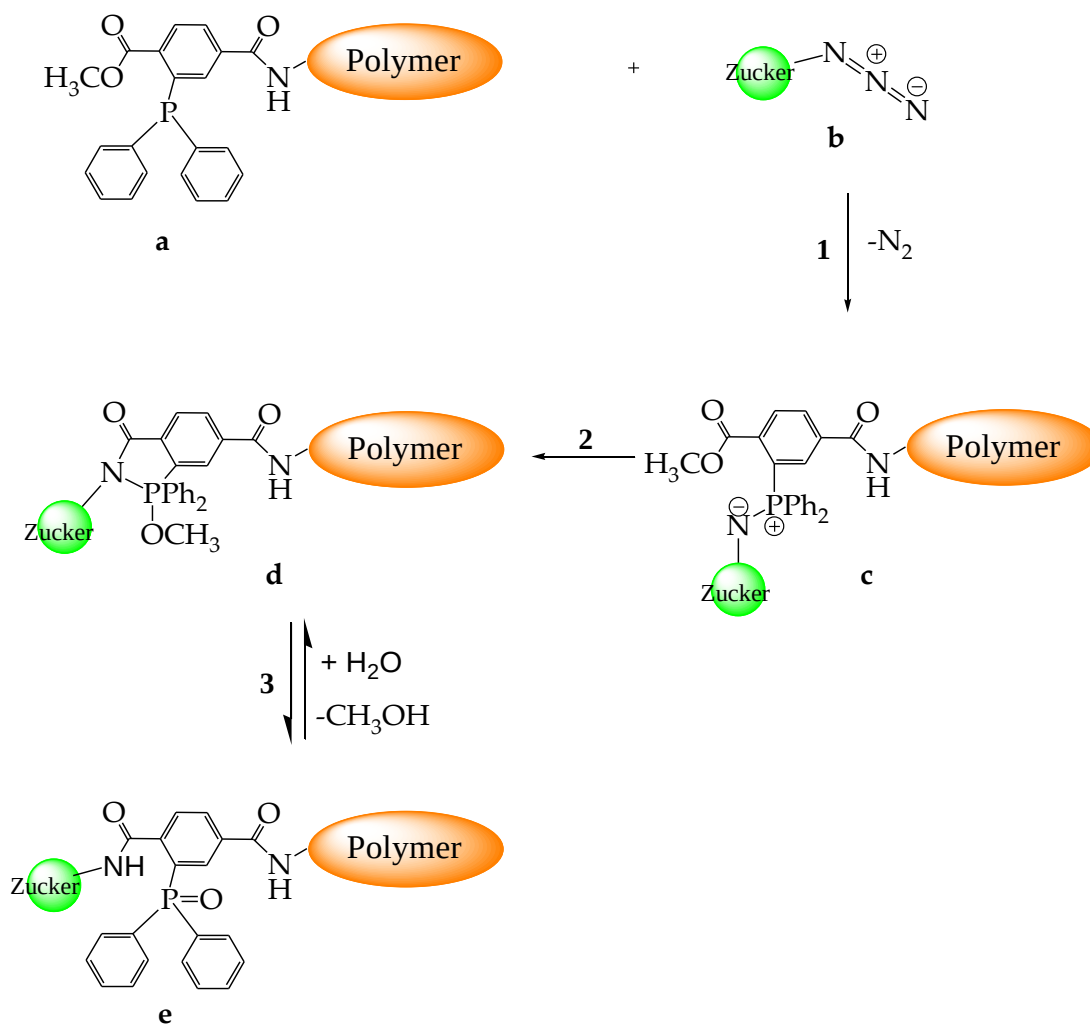


Abbildung 17: Schematische Darstellung zum Mechanismus der *nicht spurlosen* Staudinger Ligation anhand eines gekoppelten aminfunktionalisierten Polymers mit einem Azido-Zucker.

2.9.2 Spurlose Staudinger Ligation

Die *spurlose* Staudinger Ligation wurde zur Bildung nativer Amid-Bindungen entwickelt, ohne dass eine „Spur“ des Phosphan-Kopplungsreagenzes im Konjugat zurückbleibt. Diese Reaktion eignet sich daher unter anderem zur (racemisierungsfreien) Knüpfung von Peptidfragmenten zu Proteinen. [74]

Sie verläuft allgemein in drei Schritten. Der Azido-Zucker **b** koordiniert zunächst über ein Stickstoffatom an die Phosphoreinheit des Polymers **a** unter Ausbildung eines Iminophosphorans **c** (Abb. 18) (1). Durch die aktivierte Thioesterfunktion kommt es durch das nukleophile Stickstoffatom des Azido-Zuckers zur intramolekularen Umlagerung zum Amidophosphonium-Salz **d** (2). Im letzten Schritt wird durch Hydrolyse das entstehende Phosphanoxid **f** eliminiert und es entsteht über Ausbildung einer stabilen Amidbindung das gewünschte Produkt **e** (3).

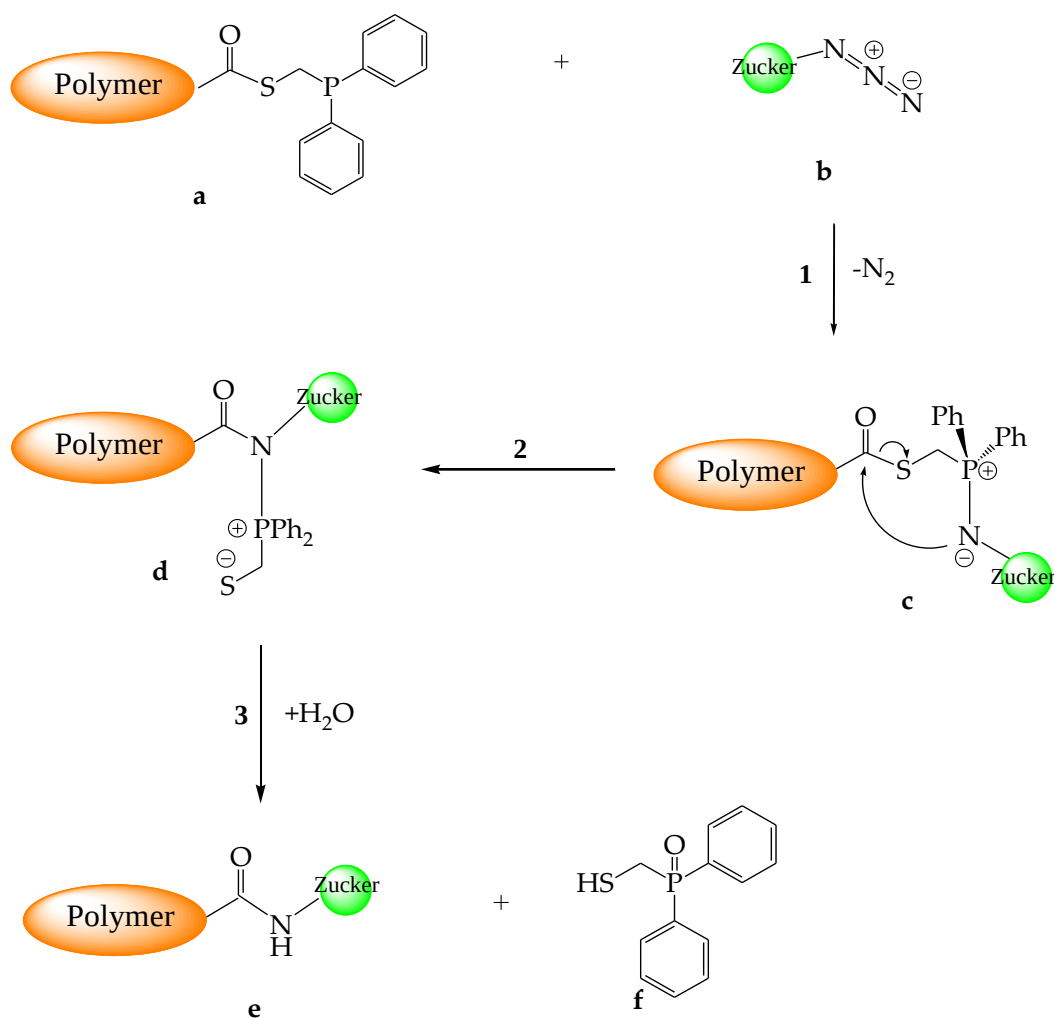


Abbildung 18: Schematische Darstellung der *spurlosen* Staudinger Ligation nach Raines

1: Kopplung des aktivierten Thioesters (a) mit einem Azidozucker (b) unter Bildung eines Iminophosphorans (c); 2: Intramolekulare Umlagerung des Iminophosphorans (c) zum Amidophosphonium-Salz (d); 3: Hydrolyse von (d); Eliminierung des Phosphanoxids (f) vom Endprodukt (e) [52]

3 Zielsetzung

Der erste Teil dieser Studienarbeit befasst sich mit der Untersuchung diverser Nanopartikelsysteme hinsichtlich ihrer Stabilitäten und toxischen Eigenschaften in Abhängigkeit ihrer Teilchen- und Ligandenbeschaffenheit.

Bei allen verwendeten Partikelsystemen handelt es sich um fluoreszierende II-VI-CdSe-Halbleiter. Sie unterscheiden sich durch den am Kern anschließenden Schalensystem (CdS, CdS/ZnS, ZnCdS/ZnS oder ZnS) in der Form (sphärisch oder elongiert) oder Größe sowie in der Ligandenbeschaffenheit zum Wassertransfer.

Es werden sphärische Kern/Schale- (CdSe/ZnS von der Firma *Ocean Nano Tech*) und Kern/Schale/Schale-Partikel (CdSe/CdS/ZnS von der *CAN GmbH* und aus dem *Arbeitskreis Weller* der Universität Hamburg), elongierte Kern/Schale-Teilchen (CdSe/CdS-Dot/Rods von der *CAN GmbH*) sowie gemischte Partikelsysteme (sphärische und elongierte CdSe/ZnS-QDs der Firma *life technologiesTM*) sowie Kern/Alloy-Nanoteilchen hergestellt im kontinuierlichen Fluss (CdSe/ZnCdS/ZnS von der *CAN GmbH*) auf Stabilität und Toxizität untersucht und verglichen.

Der zweite Part in dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Biokonjugation von Biomolekülen (hier speziell 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid, 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid sowie 6-Azido-6-deoxy-D-glucose) an ausgewählten QDs der Stabilitätsreihe. Dazu wurden Studien zur *nicht spurlosen* sowie zur *spurlosen* Staudinger Ligation durchgeführt. Zunächst wurden Modellreaktionen an günstigeren und kürzeren Polymeren bewertend untersucht. Im Anschluss wurden die Reaktionsbedingungen auf die im *Arbeitskreis Weller* synthetisierten Diblock-Copolymere übertragen. Schließlich konnte an ausgewählten Nanopartikel-Systemen Konjugationsreaktionen mit den oben genannten Azido-Zuckern durchgeführt werden.

Abschließende Untersuchungen wurden zu den Zellaufnahme-Studien der modifizierten Nanopartikel gemacht. Hierzu sollten die spezifischen Affinitäten der mit Galactose konjugierten Teilchen an die Leberzelllinie Hep-G2 über den ASGP-Rezeptor aufgezeigt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Teil I

4.1 Partikelsysteme

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden sieben Nanopartikelsysteme ausgewählt. Um einen Überblick zur Partikelform und Einheitlichkeit zu bekommen, wurden Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen und in Abb. 19 dargestellt.

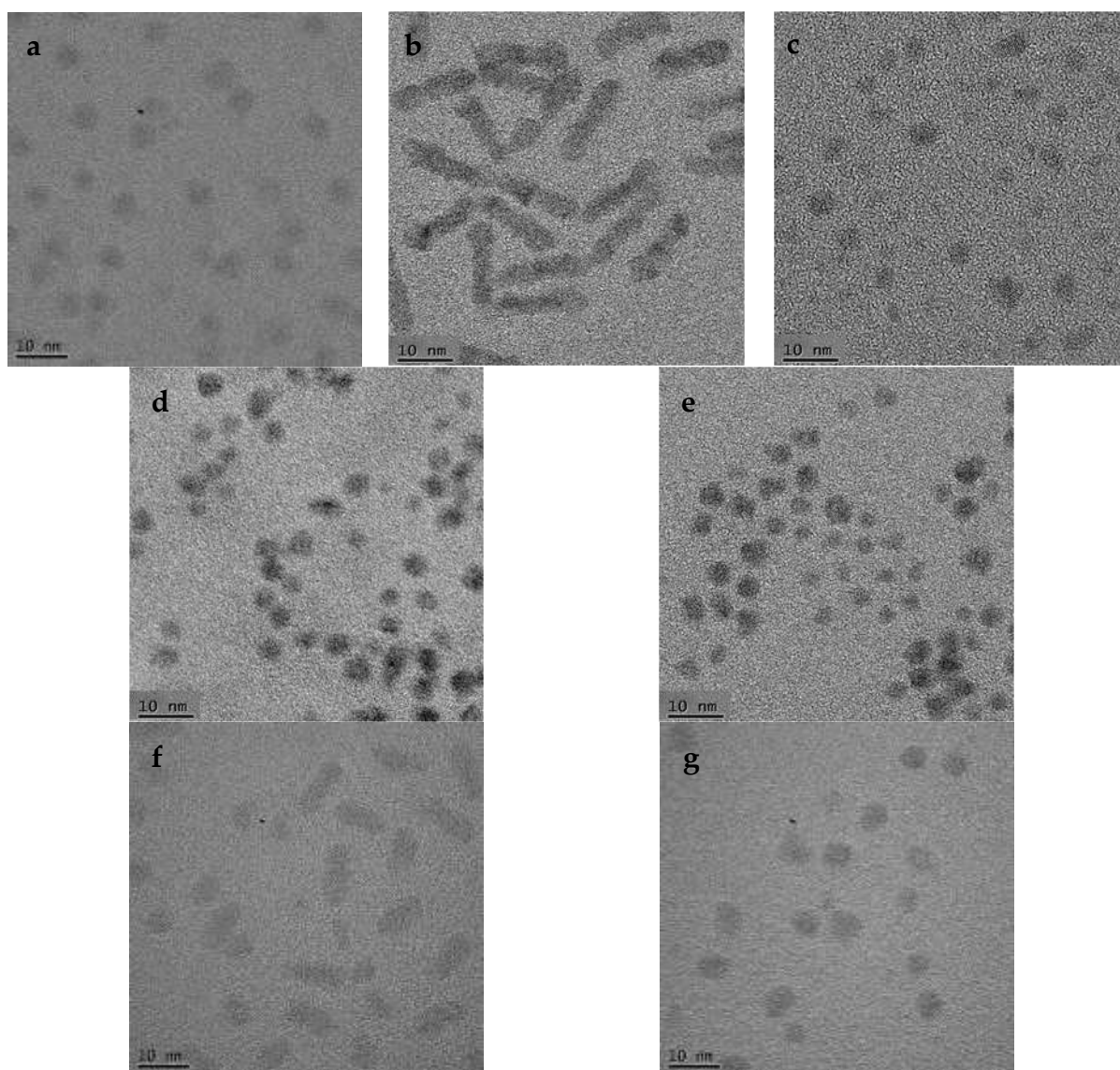


Abbildung 19: TEM-Aufnahmen der in Wasser gelösten Nanopartikel, die im Hinblick auf ihrer Stabilität in verschiedenen biologischen Medien untersucht und verglichen wurden. (a) CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH, (b) CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH, (c) CdSe/ZnCdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH, (d) CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol, (e) CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH, (f) CdSe/ZnS mit Amino (PEG) von *life technologies*TM, (g) CdSe/ZnS/ODA/APM/PEG-NH₂ von *Ocean Nano Tech*.

Alle hier untersuchten Nanopartikel wiesen eine gute Kristallinität auf.

Die dargestellten Partikel **a**, **b** und **c** in der Abb. 19 wurden von der *CAN GmbH* zur Verfügung gestellt.

Die sphärischen CdSe/CdS/ZnS-QDs **a** und elongierten CdSe/CdS-QDRs **b** wurden im Kolben hergestellt, während das Partikelsystem CdSe/ZnCdS/ZnS **c** (nachfolgend als Reaktorpartikel bezeichnet) im kontinuierlichen Fluss synthetisiert wurde. Alle drei hydrophoben Partikelsysteme wurden mit derselben Ligandenhülle, dem Diblock-Copolymer PI-*b*-PEO-OH, versehen und bildeten auf Grund der Polymerverkapselung hydrophile, mizellare Strukturen aus (Abb. 20 und 21).

Die sphärischen QDs **a** und **c** wiesen unterschiedlich ausgeprägte Größenverteilungen aus. Die Reaktorpartikel waren hinsichtlich ihrer Größe nicht einheitlich. Durch gezielte grössenselektive Fällungsmethoden kann eine Abtrennung kleiner Partikel von den großen erfolgen. Zukünftig sollte dieser Schritt schon bei der Reinigung der organischen Kerne durchgeführt werden. Folglich könnte dann ein gleichmäßiges Schalenwachstum gewährleistet werden.

Die Abbildung **b** zeigt nahezu gleichmäßig große Nanostäbchen mit einer Länge von etwa 19 nm und einem *aspect ratio* von 3.5 bis 4.

Die beiden Teilchensysteme **d** und **e** sind in der Universität Hamburg im *Arbeitskreis von Prof. Horst Weller* entwickelt worden. Bei beiden handelt es sich um dieselben hydrophoben sphärischen Ausgangspartikel, die bereits zur Darstellung der QDs-PI-*b*-PEO-OH **a** verwendet wurden. Während die Partikel **d** um die bestehende PI-*b*-PEO-OH-Ligandenhülle eine zusätzlich stabilisierende Polystyrol-Schicht enthielt, wurden die QDs **e** durch Ligandenaustausch mit dem mehrzahnigen Thiolliganden (SH)₃-PEO-OH ins Wasser überführt (Abb. 20). Diese Ligandenaustausch-Reaktion erfolgte in dieser Arbeit in abgewandelter Form nach der entwickelten Arbeitsvorschrift von Dr. Marc Thiry (siehe Kapitel 5.2).^[80] Auch diese beiden Partikelsysteme zeigten Uneinheitlichkeiten hinsichtlich ihrer Teilchengröße, die in zukünftige Arbeiten durch grössenselektive Reinigung beseitigt werden können.

Die letzten beiden zu untersuchenden Partikelsysteme wurden von *life technologies™* **f** (Qdot® 605 ITK™ Amino (PEG) Quantum Dots) und *Ocean Nano Tech* **g** (QSA-600-10) kommerziell erworben. Laut Datenblätter handelte es sich um CdSe/ZnS-Quantum Dots, die ein aminfunktionalisiertes Polyethylenglycol (PEG) als hydrophiles Ligandensystem enthielten (Abb. 20 und 21). Die TEM-Aufnahmen zeigten bei den *life technologies™*-Teilchen eine Mischung aus unterschiedlich großen Dots und Rods **f**. Die Partikel von *Ocean Nano Tech* waren recht gleichmäßig und ausschließlich sphärisch.

Alle Partikelsysteme besitzen eine funktionelle Gruppe (Hydroxy oder Amin) mit der anschließend Kopplungsreaktionen durchgeführt werden können. Auf Grund biologischer Anwendungsmöglichkeiten, werden diese Teilchen speziell in solchen Medien auf Stabilität untersucht. Da diese Nanopartikel untereinander vergleichbar sein sollten, sind ähnliche Emissionswellenlängen und optische Dichten im entsprechenden Absorptionswellenlängenbereich Voraussetzung. Alle

Partikelsysteme wurden unter gleichen Bedingungen in biologisch relevanten Medien spektroskopisch vermessen und im Hinblick auf Langzeit- und Kurzzeitstudien miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 24 Stunden (in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100) von einer Woche (in Zellmedien) und von einem halben Jahr (in pH- und salzabhängigen Lösungen). Für die Untersuchung der Langzeitstabilitäten wurden die Nanopartikel in Reinstwasser, in PBS mit unterschiedlichen pH-Werten (3, 7 und 11), in Borat-Puffer- sowie in Natriumazid-PBS-Lösung gelagert.

Für Kurzzeitstabilitäten wurden zum einen Nährmedien mit entsprechenden Protein-Zusätzen für Zellen verwendet:

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10% 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES),
- DMEM mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS),
- PBS mit 10% FCS und
- PBS mit 1% Bovines Serumalbumin (BSA).

Zum anderen wurden diverse Einflüsse auf Nanopartikel durch Salze oder Oxidationsmittel, die in Kopplungsreaktionen oder Zelluntersuchungen stattfinden können untersucht:

- 10 mM EDTA (für biologische und chemische Anwendungen als Bestandteil von TAE- und TBE-Puffer für Gel-Elektrophoresen, z.B. zur Trennung von DNA-Fragmenten),
- 5% Glutaral (zur Fixierung von Gewebe für Licht- und Elektronenmikroskopie),
- 1% H₂O₂ (zur Herbeiführung von programmierten Zelltod, sowie Interesse der oxidierenden Wirkung auf Nanopartikel),
- 5% Triton X-100 (Anwendung in der Biochemie zum Herauslösen von Membranproteinen aus Membranen)

Dazu wurde zunächst die OD aller Nanopartikel-Lösungen in ihrem jeweiligen Absorptionsmaximum auf einen Wert von 0.05 eingestellt. Ein wichtiges Maß für die Stabilität von Nanopartikeln ist die deutlich messbare Veränderung/Verminderung der Quantenausbeute. Diese wurde gegen den Referenzfarbstoff Rhodamin 6G mit Hilfe der Steigungsmethoden-Berechnung ermittelt. Die Absorptionsmaxima der Nanopartikelsysteme **a**, **d**, **e**, und **f** liegen in wässriger Lösung bei 585 nm (Abb. 20). Daraus lässt sich auf ein ähnliches Syntheseverfahren der Partikel schließen. Die Teilchensysteme **a**, **d** und **e** entstammen denselben hydrophoben Partikeln, die mittels der *hot-injection*-Methode hergestellt wurden. Die kommerziellen Nanoteilchen von *Ocean Nano Tech f* sind offenbar auf gleicher Weise synthetisiert worden. Aus den vorliegenden Datenblättern konnten keine Rückschlüsse auf das Syntheseverfahren gemacht werden. Die Oberflächenhülle besteht aus einer

Monolage eines amphiphilen Polymers und einer Monolage Polyethylenglycol.¹ Diese Angaben wurden jedoch nicht weiter spezifiziert. Die Emissionsmaxima dieser Partikelsysteme befanden sich bei 600 nm +/- 3 nm. Die resultierenden *Stokes Shifts* lagen folglich bei 17 nm bzw. 13 nm für die *Ocean Nano Tech*-Partikel.

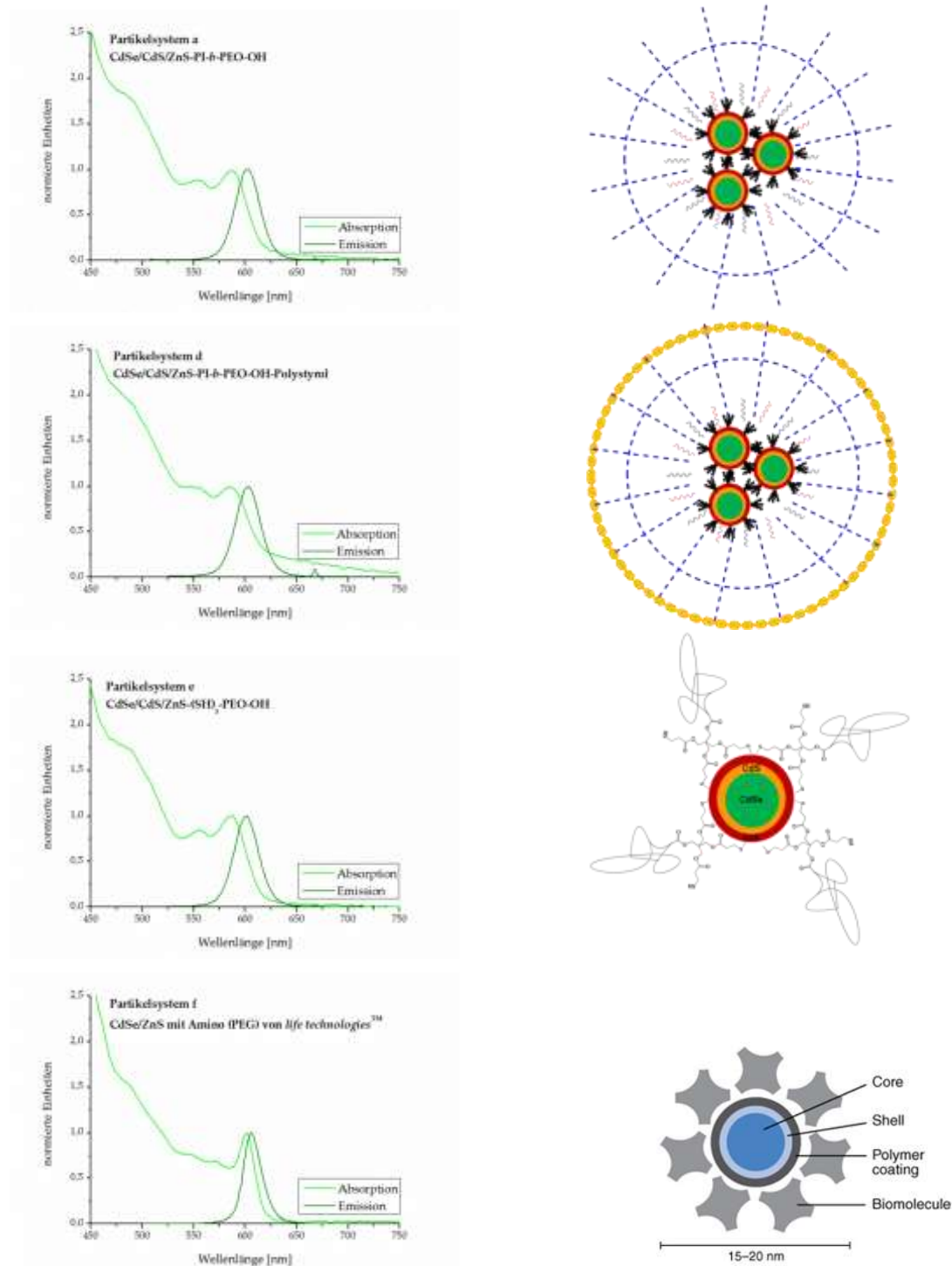


Abbildung 20: Absorptions- und Emissionsspektren der Partikelsysteme a, d, e und f in Wasser sowie die schematische Darstellung der Partikel-Ligandensysteme.

¹ www.oceannanotech.com

² www.lifetechnologies.com

Die Partikelsysteme **b**, **c** und **g** wurden durch andere Synthesemethoden dargestellt. Die Teilchen **c** wurden in einer kontinuierlichen Flusssynthese im Reaktor produziert und absorbieren bei 546 nm (Abb. 21). Die Dot-Rods **b** sowie die kommerziellen Partikel von *life technologies*TM **g** (gemischt aus Dots und Rods) wiesen ihre Absorptionsmaxima bei 576 nm und 601 nm auf. Durch Wahl des Schalenmaterials und geeigneter Reaktionsbedingungen konnten stäbchenförmige Partikel erhalten werden (Teilchensystem **b**). Das Datenblatt des Partikelsystems von *life technologies*TM zeigte keine Hinweise auf das Syntheseverfahren und den verwendeten hydrophilen Liganden auf (Abb. 20).

Die Reaktorpartikel **c** emittieren bei 561 nm und waren somit die kleinsten Teilchen in dieser Vergleichsreihe, die unter UV-Bestrahlung grün lumineszierten. Die Dot-Rods **b** emittieren bei 586 nm und die hierzu vergleichbaren Partikel von *life technologies*TM **g** besaßen ihr Emissionsmaximum bei 606 nm. Auffällig waren bei diesen beiden Systemen die deutlich geringeren Stokes-Verschiebungen mit 10 nm und 5 nm im Vergleich zu den sphärischen Partikeln.

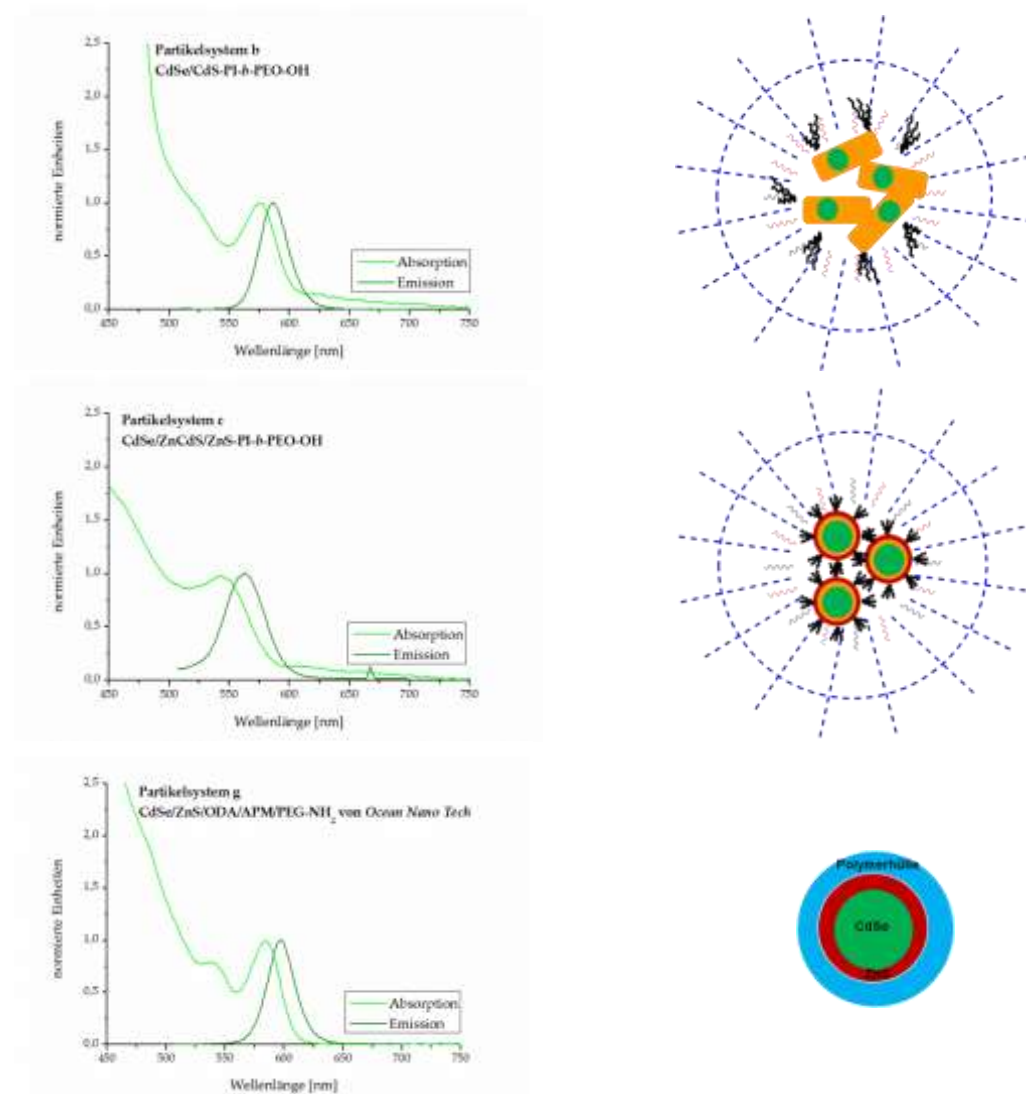


Abbildung 21: Absorptions- und Emissionsspektren der Partikelsysteme **b**, **c** und **g** in Wasser, sowie die schematische Darstellung der Partikel-Ligandensysteme

Auch bei den Halbwertsbreiten (HWB) (*half width at half maximum* HWHM und *full width at half maximum* FWHM) gab es ähnliche Abweichungen in den gemessenen Werten. Diese wurden durch das verwendete Material und die Dicke der auf den CdSe-Kernen wachsenden anorganischen Hülle bestimmt. Bei allen Partikeln wurden Cadmium, Schwefel und Zink zum Schalen Aufbau verwendet. Durch Art der Zusammensetzung und Menge der verwendeten Hüllmaterialien entstanden die charakteristischen Verläufe und das Aussehen der aufgenommenen Absorptions- und Emissionsspektren. Während die Nanopartikel von *life technologies*TM **g** schmale HWB in ihrer jeweiligen Absorption und Emission aufwiesen, zeigten die übrigen Partikelsysteme vergleichend breite Spektren. Besonders abweichend war die spektroskopische Darstellung der Reaktorpartikel. Hier wurde auf das Kernmaterial eine Alloy-Schale aus ZnCdS/ZnS aufgewachsen, während bei den übrigen Partikeln CdS/ZnS-Schalen sowie bei den kommerziellen Teilchen von *Ocean Nano Tech*- und *life technologies*TM eine ZnS-Hülle synthetisiert wurde.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal bezüglich der Nanopartikelgröße ist die Angabe der Ergebnisse aus den Messungen der Dynamischen Lichtstreuung (DLS). Hier wurde der hydrodynamische Durchmesser auf Grundlage der bei der Messung gezählten Partikel angegeben. Bei den mizellaren Partikelsystemen (**a** bis **d**) betrug die durchschnittliche Größe in Wasser 30-70 nm. Die Nanoteilchen mit dem Diblock-Copolymer PI-*b*-PEO-OH sind dabei mit 25 nm bis 43 nm deutlich kleiner, als die Mizellen, die mit einer zusätzlichen Polystyrolschicht versehen wurden. Hier wurden Durchmesser bis zu 70 nm detektiert.

Zuletzt wurde eine Aussage über die Quantenausbeute der verschiedenen Partikel gegeben. Hier wurde ein größerer Einfluss durch die verwendeten Partikelarten als durch die diversen Ligandensysteme deutlich. Während die stäbchenförmigen Nanoteilchen **b** und **g** die höchsten Quantenausbeuten mit 54% und 49% besaßen, hatten die Partikel **d**, die durch eine zusätzliche Polymerhülle stabilisiert waren, mit 16% die geringsten Lumineszenzeigenschaften. Die übrigen Nanopartikel besaßen Quantenausbeuten von 24% bis 29%.

Bei den nachfolgenden Stabilitätsuntersuchungen wurden speziell die Veränderungen der Quantenausbeuten, der hydrodynamischen Durchmesser und auffälliger Verschiebungen in den Absorptions- und Emissionsspektren begutachtet und bewertet. Dabei wurden die sieben Partikelsysteme hinsichtlich dieser Eigenschaften miteinander verglichen und prägnante Auffälligkeiten veranschaulicht und beurteilt.

Zusammenfassend ist in Tabelle 1 eine vergleichende Übersicht der bedeutendsten Qualitätsmerkmale der untersuchten Partikelsysteme dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Nanopartikel im Vergleich ihrer Stabilitätseigenschaften zu Beginn der Studie

	a CAN GmbH	b CAN GmbH	c CAN GmbH	d Universität Hamburg	e Universität Hamburg	f Ocean Nano Tech	g life technologies™
	QD-PI- <i>b</i> -PEO-OH	QD/DR-PI- <i>b</i> -PEO-OH	QD-PI- <i>b</i> -PEO-OH	QD-PI- <i>b</i> -PEO-OH-PS	QD-(SH) ₃ -PEO-OH	QD-PEG-NH ₂	QD-PEG-NH ₂
Partikel	CdSe/CdS/ZnS	CdSe/CdS	CdSe/ZnCdS/ZnS	CdSe/CdS/ZnS	CdSe/CdS/ZnS	CdSe/ZnS	CdSe/ZnS
	dots	dot/rods	dots (Reaktor)	dots	dots	dots	dots+rods
Polymer/Ligand	PI- <i>b</i> -PEO-OH	PI- <i>b</i> -PEO-OH	PI- <i>b</i> -PEO-OH	PI- <i>b</i> -PEO-OH-Polystyrol	(SH) ₃ -PEO-OH	PEG-NH ₂	PEG-NH ₂
Ab _S Max [nm]	586	576	546	586	585	584	601
Em _{Max} [nm]	603	586	561	603	602	597	606
Stokes Shift [nm]	17	10	15	17	17	13	5
HWHM [nm]	19	15	24	22	18	15	10
FWHM [nm]	28	29	38	29	28	28	21
DLS _{number} [nm]	32-43	33-38	25-34	61-70	10-14	14-16	11-12
Quantenausbeute	24%	54%	26%	16%	27%	29%	49%

Nachfolgend wird jedes Partikelsystem zunächst für sich dargestellt und hinsichtlich der Stabilitätsänderungen bewertet.

Es wird auf die Langzeitstabilität über sechs Monate in Wasser, in DPBS (pH 7), in PBS (pH 3 und 11), im Borat-Puffer und in 0.025%iger Natriumazid-PBS-Lösung eingegangen.

Weiterhin werden die Ergebnisse der Kurzzeitstabilitäten in zell- und kopplungsrelevanten Medien (HEPES/DMEM, FCS/DMEM, FCS/DPBS, BSA, EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100) schematisch gezeigt und diverse Änderungen diskutiert. Dazu werden die Quantenausbeuten über die Zeit bestimmt.

Die Messungen und Lagerung der Partikellösungen finden in Quarzglasküvetten bei Raumtemperatur (um 20 °C) unter Lichtausschluss statt.

Für eine temperaturabhängige Studie wird ein Partikelsystem (QD-PI-*b*-PEO-OH, **a**) über einen Zeitraum von drei Monaten in den Langzeitmedien zum einen im Kühlschrank bei 4 °C und zum anderen im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Zusätzlich werden Temperatureinflüsse von -20 °C im Gefrierschrank und 120 °C im Autoklaven bei den wässrigen Partikelproben untersucht.

Von allen Proben wurden über die Zeit die hydrodynamischen Durchmesser sowie die Zeta-Potentiale in Wasser gemessen.

Abschließend werden die wässrigen Nanopartikel-Lösungen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung untersucht.

4.2 CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (Partikelsystem a)

4.2.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Das Kern/Schale/Schale-Partikelsystem aus CdSe/CdS/ZnS mit dem Diblock-Copolymer-Liganden PI-*b*-PEO-OH hatte in wässriger Umgebung sowie in den übrigen neutralen und alkalischen Medien eine Anfangsquantenausbeute von 23%. Zu Beginn gab es nur im sauren Milieu eine Abweichung von 5%. Hier fiel bereits zum Anfang der Stabilitätsmessung die Quantenausbeute auf 18% und reduzierte sich schließlich nach sechs Monaten auf 10%.

Während im Wasser und neutralen DPBS keine Änderung der Lumineszenzeigenschaften zu verzeichnen waren, zeigten die alkalischen Medien, PBS (pH 11) und der Borat-Puffer (pH 8), eine scheinbar stabilisierende Wirkung auf das Partikel-Ligandensystem. Hier kam es zu einer geringen Zunahme der Quantenausbeute um 4% bis 9%.

In Abb. 22 ist der schematische Verlauf der Quantenausbeute über eine Zeit von sechs Monaten dargestellt.

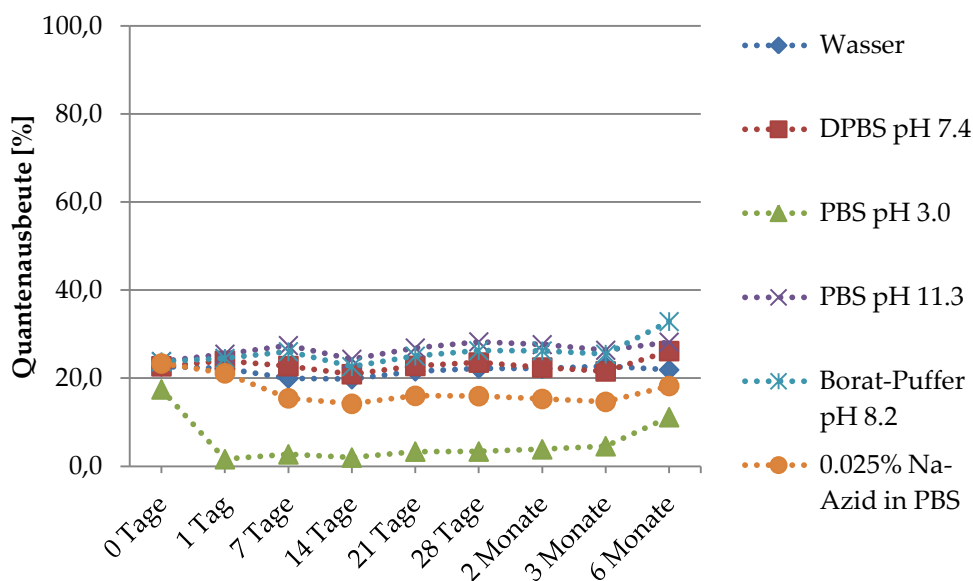


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

4.2.2 Temperaturabhängige Langzeitstabilität über 3 Monate

Für einen Einblick über eine temperaturabhängige Stabilität wurde das Partikelsystem **a** in den Medien für die Langzeitstabilitätsuntersuchung zusätzlich bei 37 °C im Inkubator und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und über drei Monate vermessen.

Bei einem pH-Wert von 3 verhielten sich die Partikel bei 4 °C und 37 °C entsprechend wie bei Raumtemperatur (Abb. 25). Es wurde von Anfang an eine Instabilität der Nanoteilchen deutlich. Nach drei Monaten war eine Quantenausbeute von nur noch 5% messbar.

Im Wasser gab es einen deutlichen Unterschied bei der Lagerung der Partikel. Während die Quantenausbeute bei 20 °C und bei 4 °C nahezu konstant blieb, kam es bei 37 °C nach drei Monaten zu einer Verringerung auf 11% (Abb. 23). Die Lumineszenz hat sich hier über die Zeit halbiert.

Bei DPBS (pH 7) (Abb. 24) und dem Natriumazid-Puffer (Abb. 28) waren nur leichte Schwankungen um 2% im Vergleich der Temperatureinflüsse zu verzeichnen.

Im Alkalischen zeigte sich ein scheinbar stabilisierender Einfluss auf die Lumineszenz der Nanopartikel.

Abb. 23-28 stellen den vergleichenden Verlauf der Quantenausbeute bei verschiedenen Lagerungstemperaturen dar.

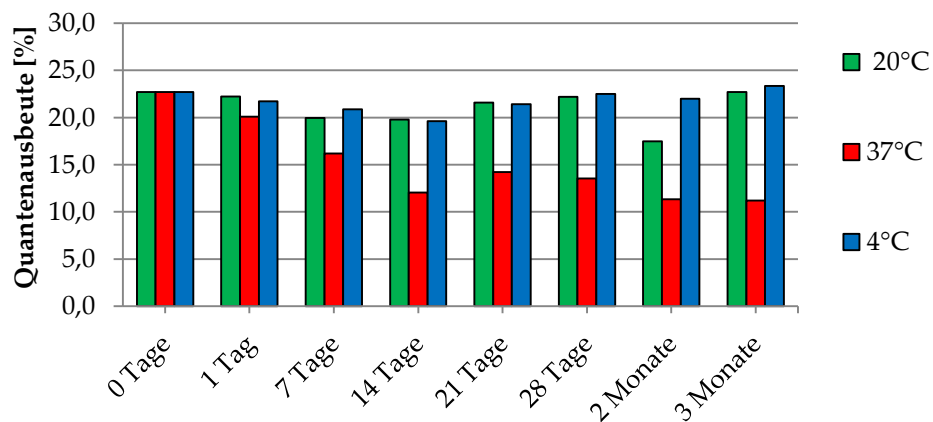


Abbildung 23: Temperaturabhängige Darstellung der Quantenausbeuteänderung von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (**a**) in Wasser über drei Monate

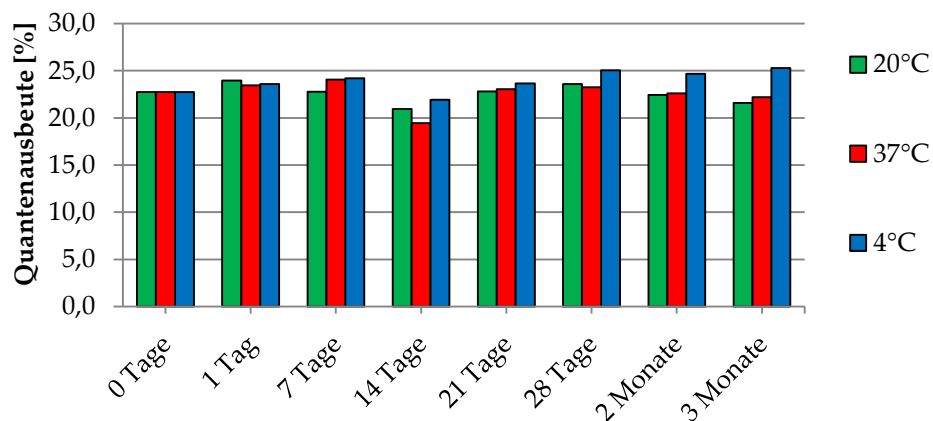


Abbildung 24: Temperaturabhängige Darstellung der Quantenausbeuteänderung von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) in DPBS pH 7.4 über drei Monate

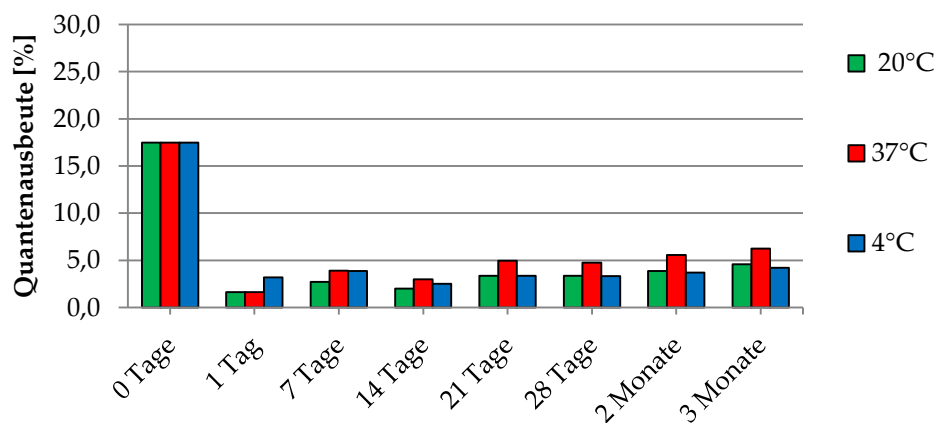


Abbildung 25: Temperaturabhängige Darstellung der Quantenausbeuteänderung von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) in PBS pH 3 über drei Monate

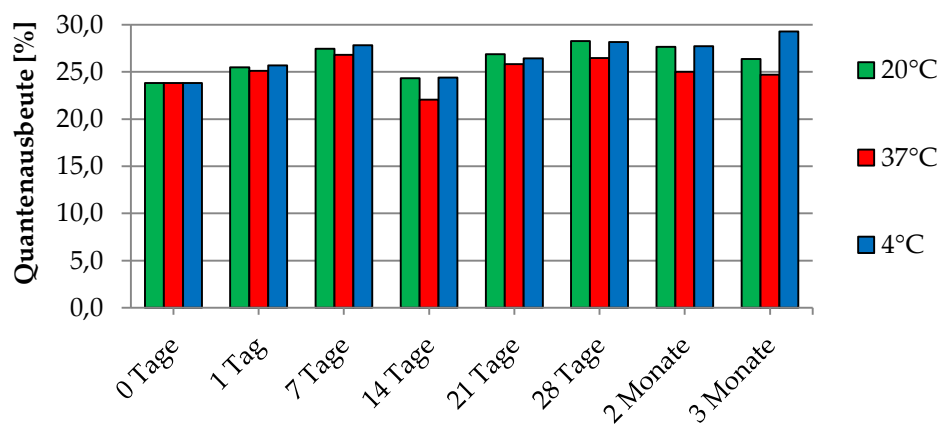


Abbildung 26: Temperaturabhängige Darstellung der Quantenausbeuteänderung von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) in PBS pH 11 über drei Monate

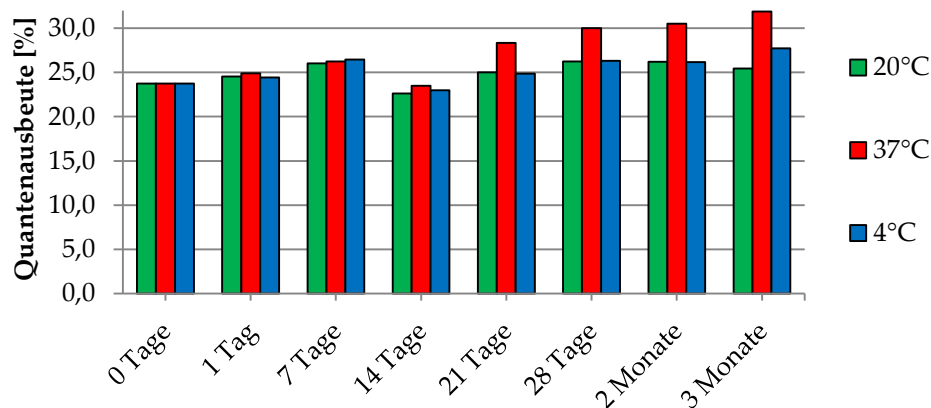


Abbildung 27: Temperaturabhängige Darstellung der Quantenausbeuteänderung von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) in Borat-Puffer pH 8 über drei Monate

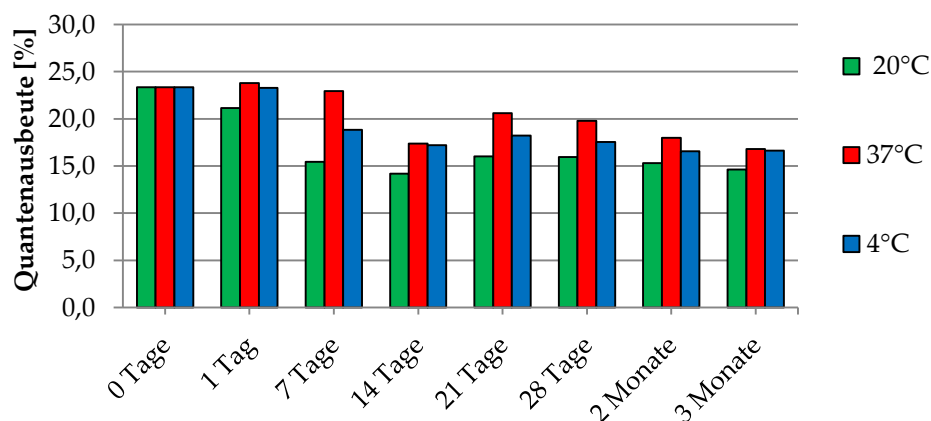


Abbildung 28: Temperaturabhängige Darstellung der Quantenausbeuteänderung von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) in 0.025% Na-Azid in PBS über drei Monate

In Abb. 29 sind die Absorptionsspektren der QD-Diblock-OH (a) über ein halbes Jahr dargestellt.

Unter sauren Bedingungen in PBS war eine kontinuierliche Abnahme der optischen Dichte zu erkennen. Dies spiegelte die zuvor erwähnte abnehmende Quantenausbeute um etwa 50% wider. Hier hatten scheinbar die Protonen die Stabilität der Mizellen derart beeinflusst, dass die Partikel teilweise ihre Lumineszenzeigenschaften verloren.

Im Wasser und in der Natriumazid-PBS-Lösung waren nur geringe Schwankungen in den Absorptionsverläufen sichtbar. Diese hatten jedoch keinen bedeutenden Einfluss auf die Stabilität der Partikel, was auch bereits in der Quantenausbeuteänderung über die Zeit sichtbar wurde.

Die übrigen Spektren zeigten keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich Aggregatbildungen oder Streueffekten und somit auch keine Stabilitätsverluste hinsichtlich der Quantenausbeuten.

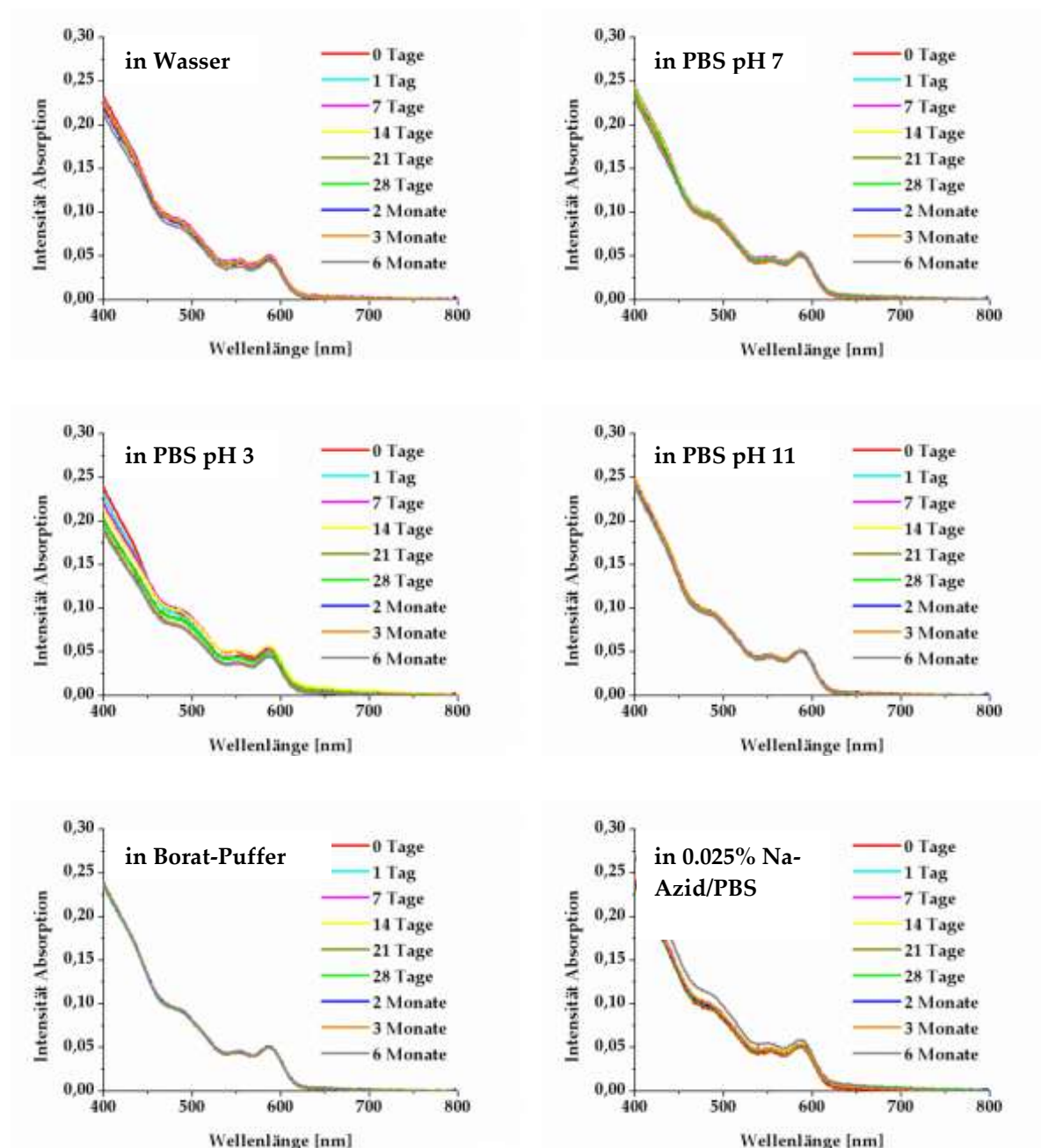


Abbildung 29: Absorptionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

4.2.3 Kurzzeitstabilität über 1 Woche

Bei der Untersuchung der Stabilität in zellrelevanten Lösungen war bei dem Partikelsystem **a** nur bei dem Nährmedium DMEM mit Zusatz von 10% FCS eine Veränderung der Quantenausbeute von 22% auf 14% zu verzeichnen.

Bei den anderen Zellmedien wurden nur Schwankungen bis zu 3% sichtbar (Abb. 30). Es gab offenbar einen geringen Einfluss des DMEM-Mediums auf das Partikel-Ligandensystem hinsichtlich der Lumineszenzeigenschaften. Dabei spielte der Zusatz von FCS oder HEPES keine bedeutsame Rolle. Das FCS verursachte lediglich einen enormen Streueffekt, welcher in den aufgenommenen Absorptionsspektren nach einer Woche deutlich wurde (Abb. 31). Es könnten Komplexierungsreaktionen, verursacht durch die im FCS enthaltenen Proteine, an der Ligandenoberfläche des Partikelsystems statt gefunden haben. Diese führten scheinbar zu destabilisierenden Effekten. Folgedessen wurden erhöhte Streuuntergründe in den Absorptionsspektren mit FCS aufgenommen, die auf das Vorhandensein größerer Aggregate hinwiesen.

Ansonsten zeigten die übrigen Medien keine Änderungen in den Absorptionen und Emissionen. Hier gab es keine Stabilitätsverluste der Lumineszenzeigenschaften sowie Änderungen der Beschaffenheit der QD-Mizellen.

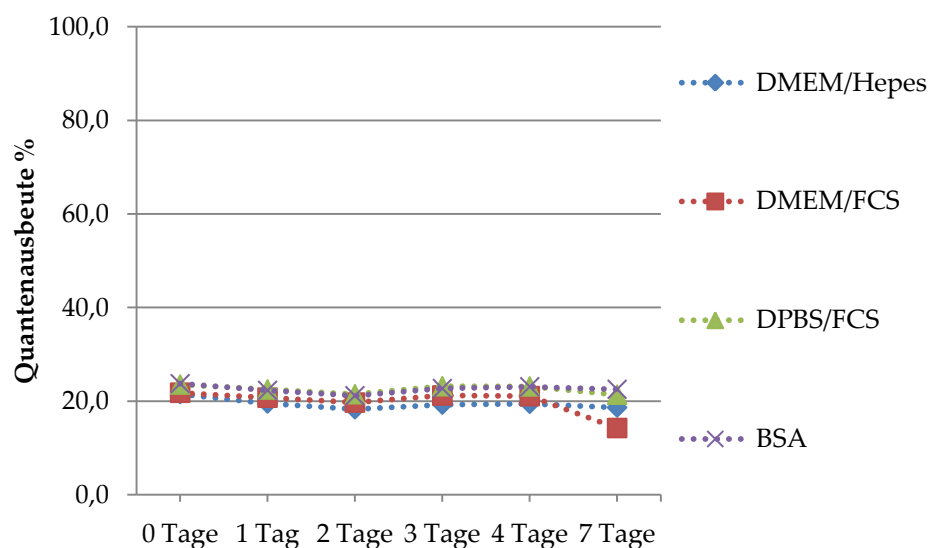


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH in DMEM + 10% HEPES, DMEM + 10% FCS, DPBS + 10%FCS und 1% BSA über einen Zeitraum von einer Woche

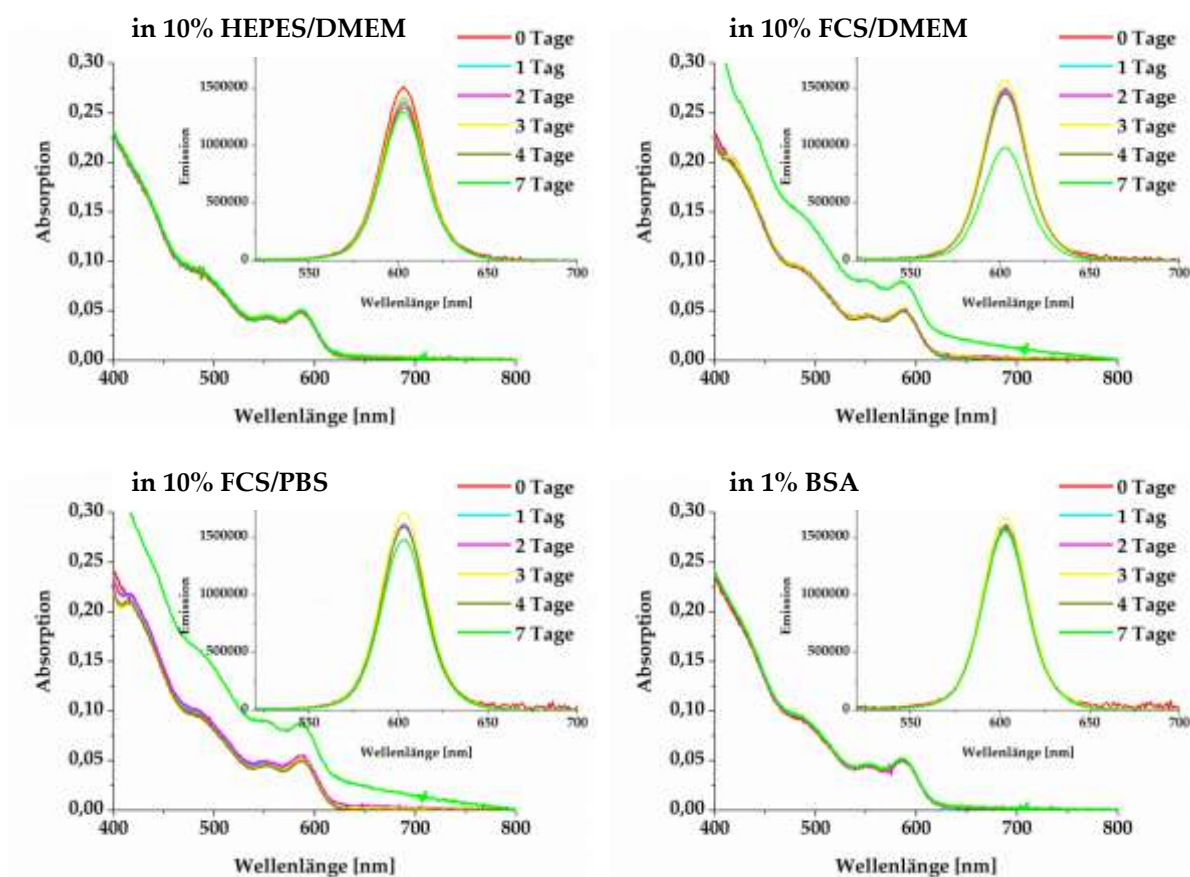


Abbildung 31: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

4.2.4 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden

Bei der 24-Stunden-Stabilitätsuntersuchung von kopplungs- und zellrelevanten Medien wurde eine Abnahme der Quantenausbeute in Glutaral um 35% gemessen und in Wasserstoffperoxid eine vollständige Löschung der Partikel erhalten (Abb. 32). Die oxidierende Wirkung hatte hierbei einen enormen Einfluss auf die Stabilität der Nanopartikel.

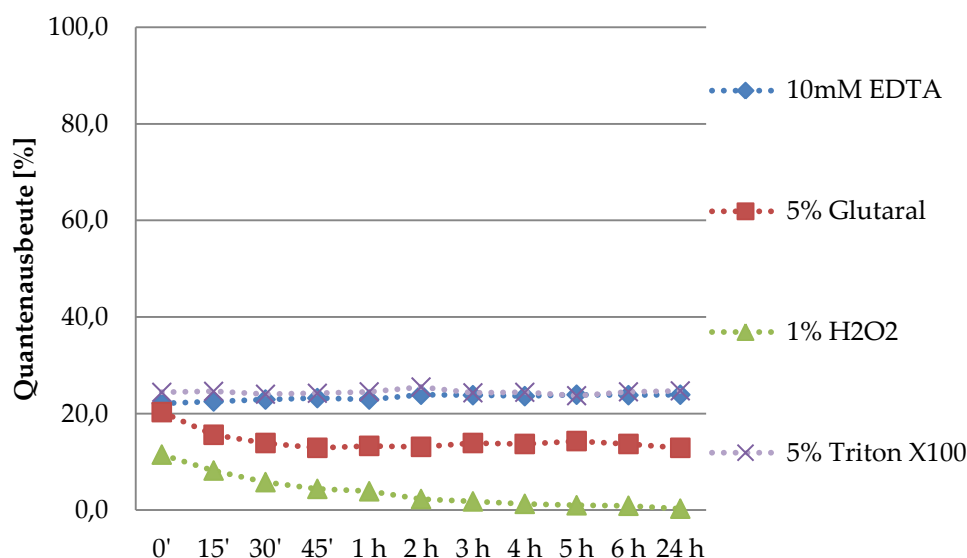


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100 über einen Zeitraum von 24 Stunden

Die Absorptions- und Emissionsspektren zeigten die Wirkungsweise von Wasserstoffperoxid auf das Partikel-Ligandensystem. Es wurde eine stete Abnahme der Intensitäten sowie die Veränderung der optischen Dichte und Verschiebung des Absorptionsmaximums deutlich (Abb. 33). Nach 24 Stunden war durch Auflösung der Teilchen weder Absorption noch Emission messbar.

In Glutaral zeigten die Partikel ebenso instabiles Verhalten hinsichtlich der Lumineszenzeigenschaften. Es kam zu einer Verringerung der Quantenausbeute von 20% auf 13%. Allerdings zeichneten sich hier keine Änderungen in den Absorptionsspektren ab. Die mizellare Struktur der Teilchen blieb unter gegebenem Einfluss weiterhin stabil.

In EDTA und Triton X-100 waren die QDs über den Zeitraum stabil und unterlagen weder einen Verlust an Quantenausbeute noch einer Änderung im Streuverhalten.

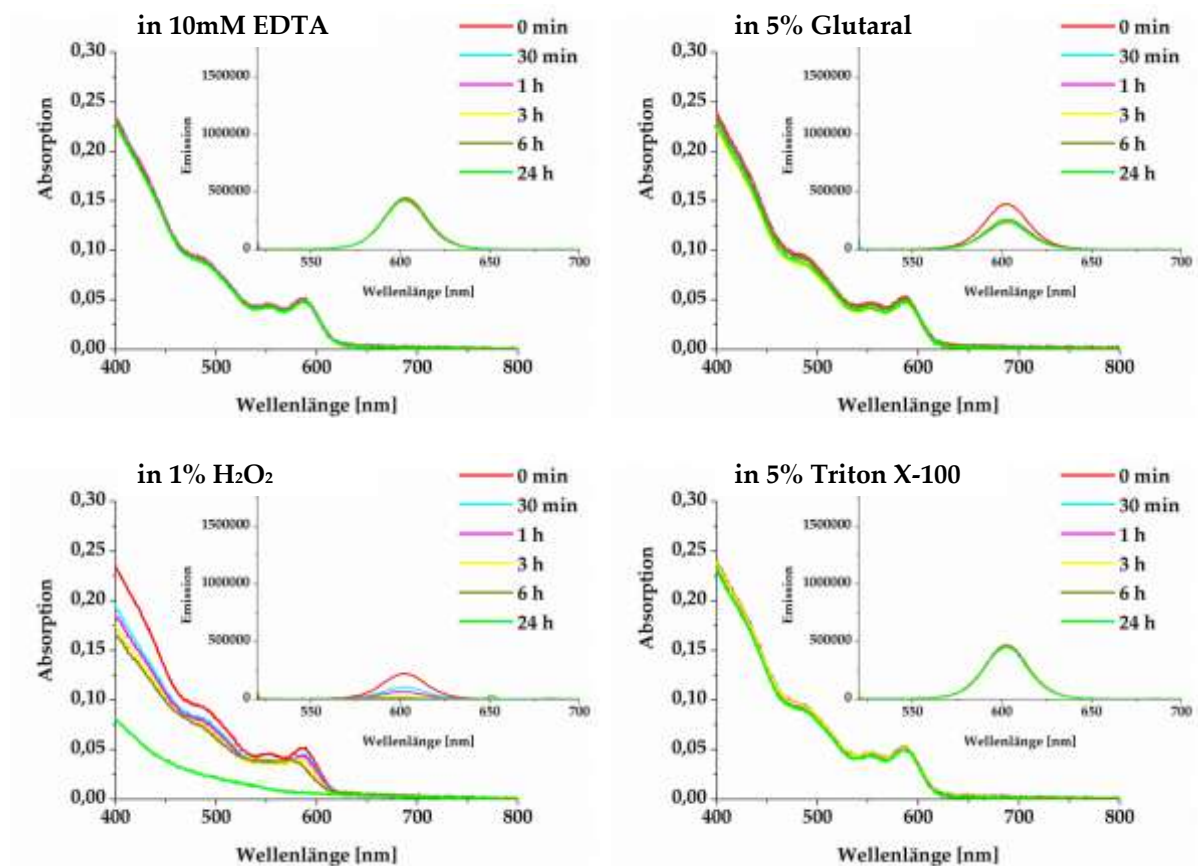


Abbildung 33: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

4.2.5 Dynamische Lichtstreuung

Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel **a** lag zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung im Bereich von 30 nm in fast allen Langzeit-Medien außer im alkalischen PBS. Hier waren über den Zeitraum von sechs Monaten die meisten Schwankungen zu erkennen. Während es zunächst ausgehend von 24 nm zu einer Zunahme der Mizellengröße kam, waren die Teilchen nach einem halben Jahr etwa 21 nm groß.

Im neutralen und sauren PBS kam es zur Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers von 28 nm auf 38 nm.

Im Borat-Puffer blieben die Partikel über drei Monate hinsichtlich ihrer hydrodynamischen Größe unverändert, nach einem halben Jahr verringerte sich ihr Radius um 9 nm.

Der Natriumazid-Puffer zeigte einen zunehmend destabilisierenden Einfluss auf die Nanopartikel. Mit der Zeit nahm der hydrodynamische Durchmesser der Teilchen stetig von 28 nm auf 59 nm zu. Weiterhin wurde im DLS-Spektrum eine

zunehmende Halbwertsbreite (HBW) von 17 nm (Beginn der Messung) zu 35 nm (nach sechs Monaten) deutlich (Abb. 34).

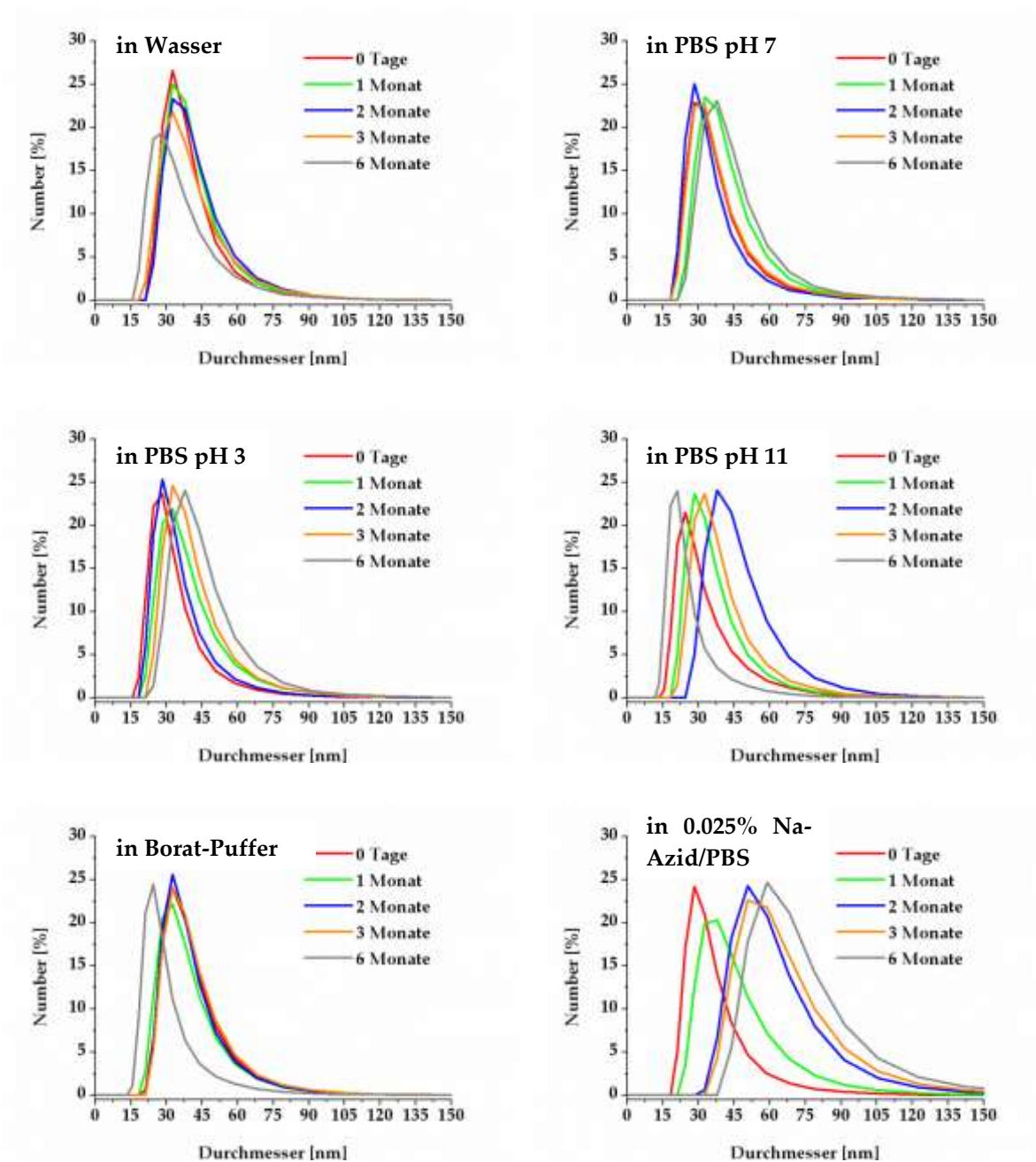


Abbildung 34: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über 6 Monate

In den Zellmedien zeigten ebenfalls nur leichte Schwankungen des gemessenen hydrodynamischen Durchmessers über einen Zeitraum von einer Woche.

Während es in DMEM + 10% HEPES zu einer Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers von 33 nm auf 21 nm kam, zeigten die Partikel in DMEM + 10% FCS kaum Änderungen.

In PBS + 10% FCS blieb zwar die hydrodynamische Größe der Mizellen gleich, allerdings wurden zeitweise nur Signale hervorgerufen vom FCS bei etwa 5 nm gemessen.

Bei den DLS-Messungen in BSA-PBS-Lösung konnten keine partikeltypischen Größen in Bezug auf den hydrodynamischen Durchmesser ermittelt werden. Hier waren ebenfalls nur die Proteinsignale der Lösung bei 6 nm sichtbar (Abb. 35).

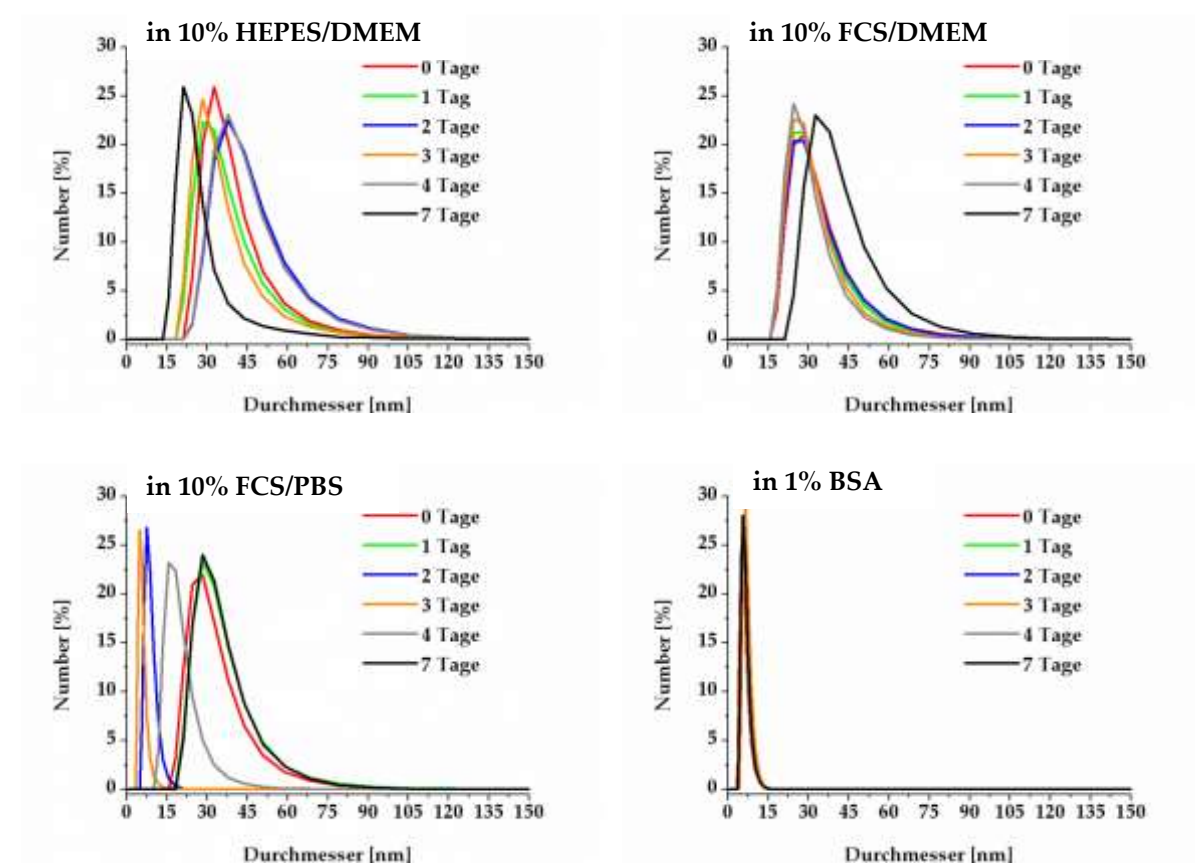


Abbildung 35: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

Nachfolgend sind die hydrodynamischen Durchmesser der Mizellen in EDTA, Glutaral, Wasserstoffperoxid und Triton X-100 über 24 Stunden aufgetragen (Abb. 36).

Die durchschnittliche hydrodynamische Größe der Partikel betrug hier bei EDTA anfangs 33 nm und nach einem Tag 24 nm.

In Triton X-100 hingegen wurde hauptsächlich das Signal vom Salz bei 6 nm aufgezeichnet. Nach einer Stunde konnten einmalig die Partikel mit einer Größe von 28 nm detektiert werden.

Während die Teilchen in Glutaral nach 24 Stunden eine Größenverschiebung von 28 nm auf 38 nm mit einer gleichzeitigen Zunahme der HBW von 17 nm auf 25 nm erfuhren, wurden die Mizellen in Wasserstoffperoxid durchschnittlich von 24 nm auf 33 nm größer. Durch den Einfluss der Peroxid-Lösung fluoreszierten die Partikel nicht mehr. Somit waren scheinbar noch vorhandene leere Mizellen detektierbar. Diese waren etwas größer und zeigten eine breitere Verteilung auf im Vergleich zu den intakten Teilchen.

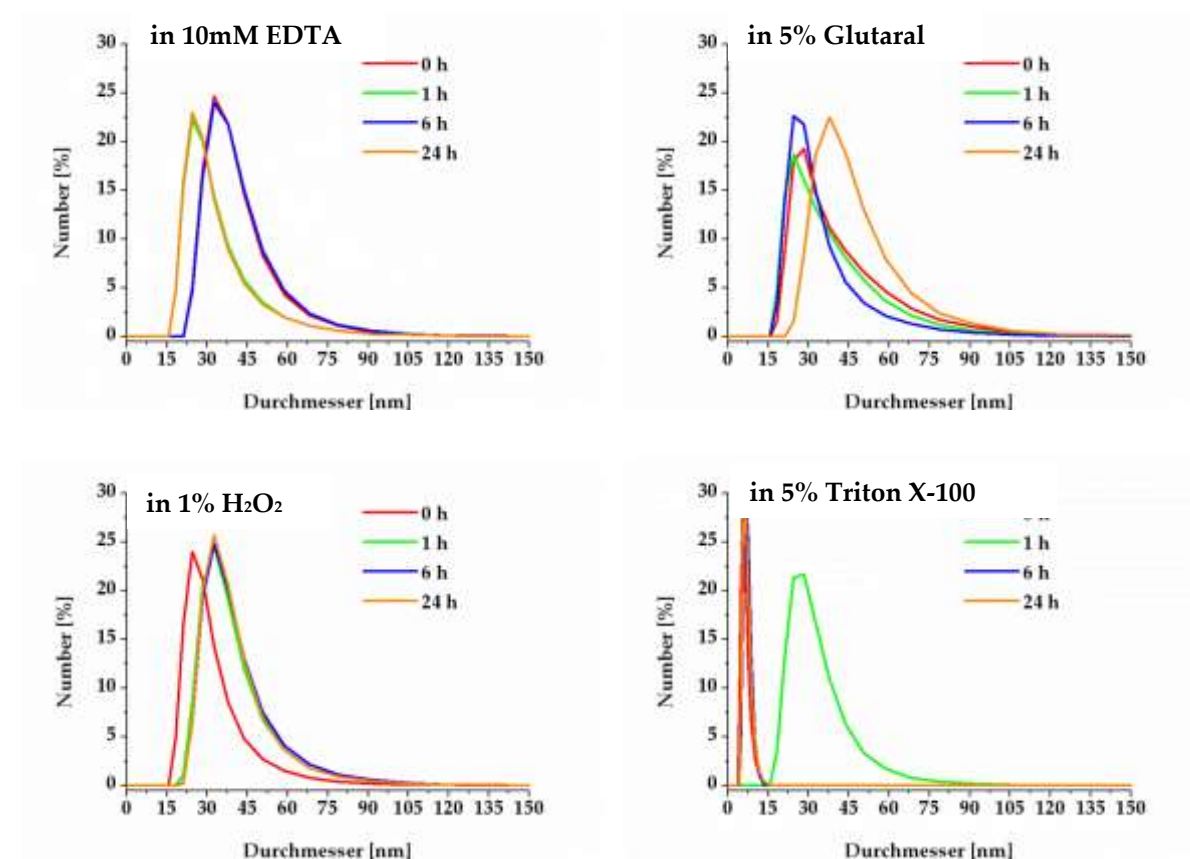


Abbildung 36: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

Die Lagerung bei niedrigen und hohen Temperaturen (4 °C und 37 °C) zeigten hauptsächlich im alkalischen PBS und in der Natriumazid-PBS-Lösung einen Effekt hinsichtlich des hydrodynamischen Durchmessers der Nanopartikel (Abb. 37 und 38). Bei 37 °C kam es in PBS pH 11 zu keiner Größenveränderung, während sich die Partikel bei Lagerungstemperaturen um die 4 °C nach drei Monaten um 9 nm auf 33 nm vergrößerten. Bei 20 °C und 37 °C zeigten sich keine Unterschiede der Teilchen.

Eine enorme Änderung war allerdings im Natriumazid-Puffer zu erkennen. Bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C wurden nach einem viertel Jahr Mizellen mit Größen von 55 nm detektiert, die anfangs nur 28 nm groß waren. Während bei 37 °C eine Zunahme des Durchmessers um 16 nm erfolgte, hatte die Lagerung bei 4 °C einen geringeren Einfluss auf die Teilchengröße. Nach drei Monaten waren diese nur um 10 nm größer als zu Beginn der Messung.

Während die Partikel bei Lagerungstemperaturen um 4 °C in Wasser, neutralen PBS und im Borat-Puffer über drei Monate konstante HWB von 19 nm aufzeigten, waren in den übrigen Medien Abweichungen der HBW bis auf 24 nm sichtbar.

Bei 37 °C zeigte der Natriumazid-Puffer den stärksten Einfluss auf die Partikel-Größe. Hier veränderte sich die HWB von anfänglich 17 nm auf 29 nm.

Die aufgenommenen DLS-Spektren zeigten teilweise kleine Verschiebungen bei gleichbleibender HBW hinsichtlich der Partikelgröße. Die Nanopartikel wiesen keine Aggregationen auf und konnten somit als stabil betrachtet werden.

Anders sieht es bei eventuellen aggregierten Nanopartikeln in Lösung aus. Die HWB nimmt zu und es kommt entsprechend zu Veränderungen der Teilchengröße. Die resultierenden Abweichungen im DLS-Spektrum könnten z.B. durch Temperaturveränderung, anhaftende Probenbestandteile an der Messküvetteninnenwand oder durch Änderung der Medienlösung hervorgerufen werden. Deshalb sollten die Ergebnisse aus den erhaltenen DLS-Daten stets mit kritischen Augen betrachtet werden. Geringe Schwankungen in den gemessenen Zeiträumen sind im Toleranzbereich und weisen noch keine Instabilität der Partikel auf. Die DLS-Daten dienen hier lediglich der Darstellung der relativen konstanten Teilchengrößen. Kommt es zu Aggregationen durch destabilisierende Einflüsse in den untersuchten Medien, sind entsprechende Veränderungen der hydrodynamischen Durchmesser sichtbar. Dies muss auch bei den nachfolgenden Untersuchungsreihen der übrigen Partikelsysteme beachtet werden.

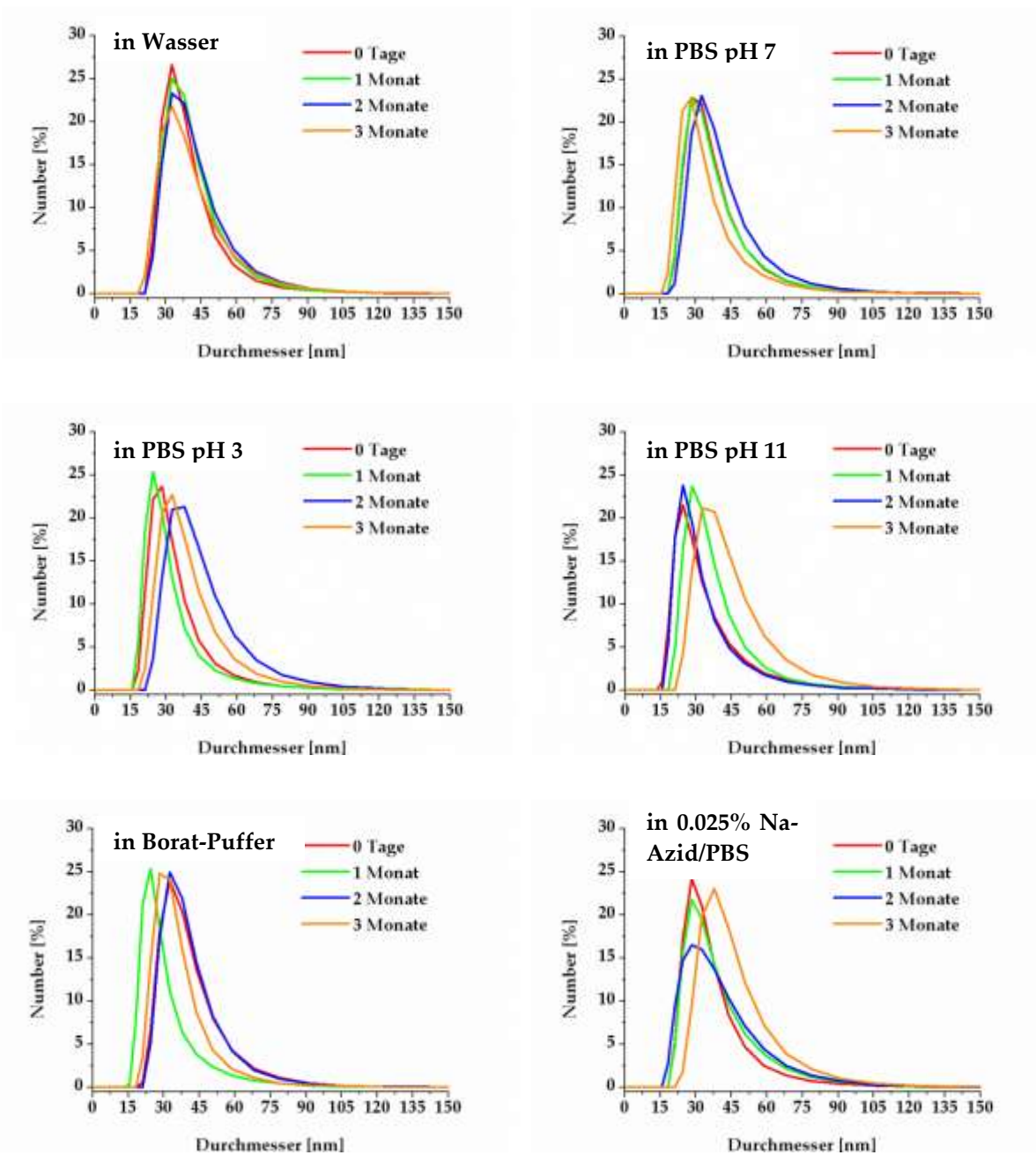


Abbildung 37: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) bei 4 °C in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über drei Monate

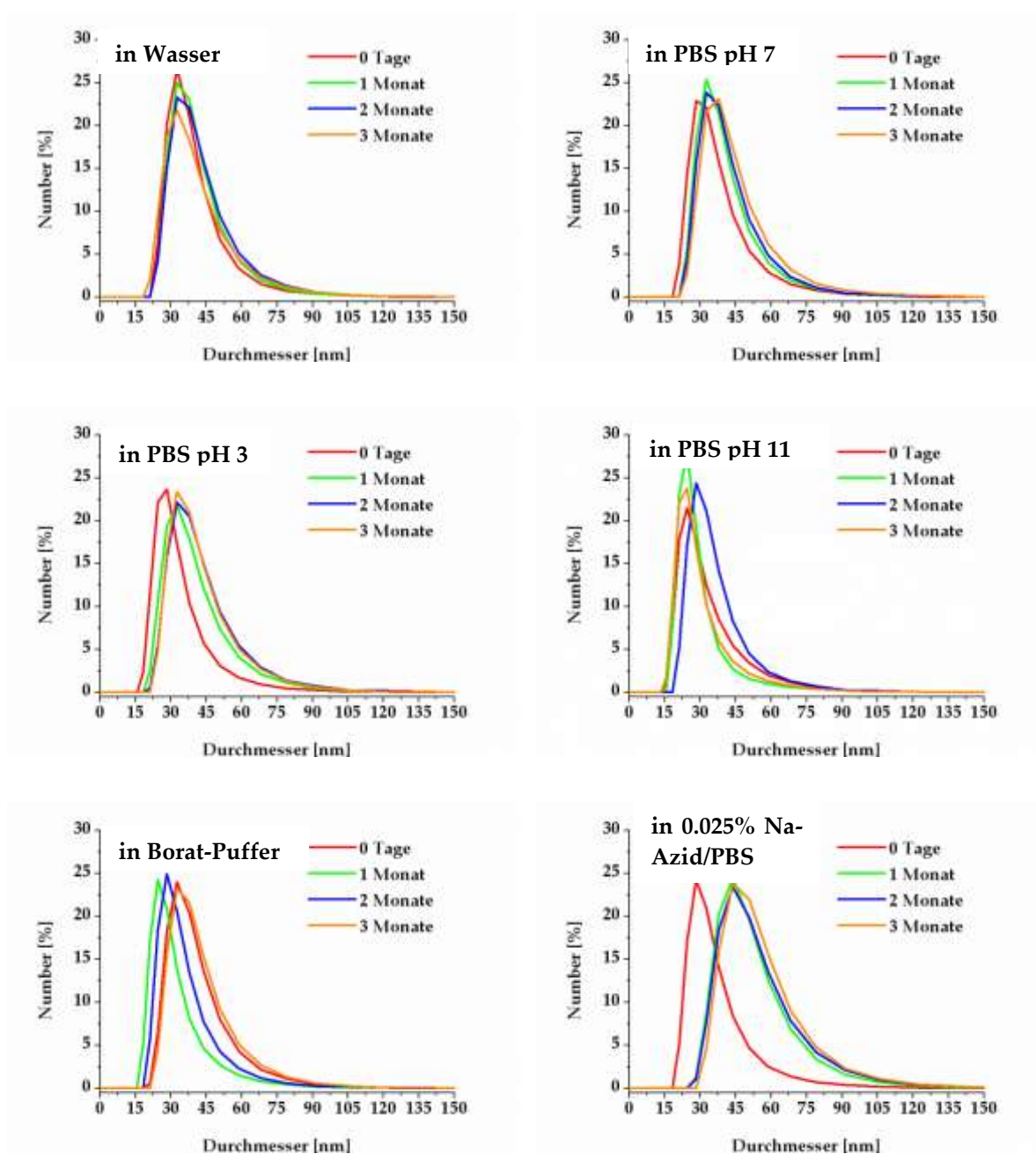


Abbildung 38: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (a) bei 37 °C in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über drei Monate

4.2.6 Lagerung bei -20 °C / 120 °C

Beim Autoklavieren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Teilchen in Wasser zeigte die Absorption eine leichte Veränderung. Diese spiegelte die Beobachtungen in den gemessenen Größenverteilungen vor und nach dem Autoklavieren wider. Während die Partikel anfangs einen hydrodynamischen Durchmesser von 33 nm besaßen, konnten nach der Lagerung bei 120 °C vergrößerte Mizellen bei durchschnittlich 59 nm detektiert werden. Die HWB verdoppelte sich nahezu von 18 nm auf 35 nm. Ebenso war eine Veränderung der Größe nach dem Einfrieren bei -20 °C erkennbar. Hier wurden im Schnitt Partikel mit einer Größe von 59 nm und HWB bis zu 45 nm gemessen. Die sehr niedrigen Temperaturen hatten einen enormen Einfluss auf die Stabilität der Partikel. Sie waren aggregiert und zum Teil ausgefallen, was in der Darstellung des Absorptionsspektrums mit einem hohen Streuuntergrund verdeutlicht wurde (Abb. 39). Trotz dieser Stabilitätsverluste hinsichtlich der mizellaren Beschaffenheit der QDs veränderten sich die Emissionsspektren nach dem Autoklavieren nur wenig und nach dem Einfrieren gar nicht. Die Fluoreszenz der Teilchen wurde somit unter diesen extremen Bedingungen nicht beeinträchtigt.

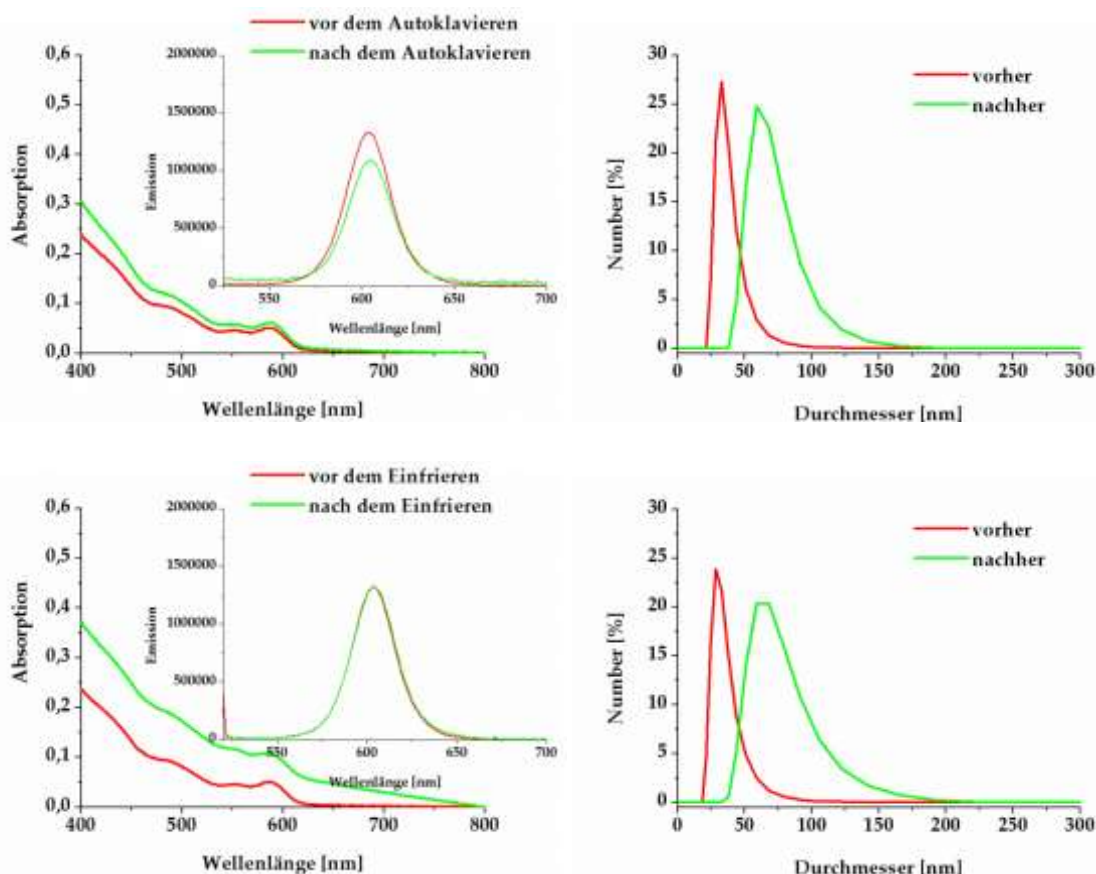


Abbildung 39: Graphische Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren (links) sowie die hydrodynamischen Durchmesser (rechts) der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (a) nach dem Autoklavieren (oben) und nach Einlagerung bei -20 °C (unten) in Wasser

Fazit:

Das Partikelsystem CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH wies gute Stabilitäten in den untersuchten Medien auf.

Unter sauren Bedingungen sowie in Wasserstoffperoxid erfuhren die Teilchen starke Veränderungen in ihren Lumineszenzeigenschaften. Während unter Wirkung der Protonen die mizellare Struktur der Partikel noch intakt war, wurden die Teilchen in der Peroxidlösung vollständig aufgelöst. Hier war keine Quantenausbeute mehr bestimmbar.

Der Einfluss von hohen (37 °C) und niedrigen (4 °C) Lagerungstemperaturen über drei Monate zeigte nur in der wässrigen Lösung eine Abnahme der Quantenausbeute um 50% bei 37 °C.

Die DLS-Daten zeigten in den meisten Lösungen Verschiebungen mit der Zeit. Dies wurde eventuell durch Veränderungen der mizellaren Struktur hervorgerufen.

Die Lagerung bei -20 °C und 120 °C führte zu Aggregationen der Partikel. Die Quantenausbeute verringerte sich allerdings nur bei den autoklavierten Partikeln.

Für zukünftige Arbeiten sollten die Quantenausbeuten weiter optimiert werden. Dazu könnten beispielsweise einzelne Schritte bei der Nanopartikelsynthese sowie beim Ligandenaustauschverfahren untersucht und eventuell verbessert werden.

4.3 CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH (Partikelsystem b)

4.3.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Das Dot-Rod-Nanopartikelsystem, bestehend aus einem runden CdSe-Kern und einer stäbchenförmigen CdS-Hülle, mit dem Diblock-Copolymer-Liganden CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH (**b**) zeigte in den Langzeitstabilitätsstudien unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Einflüsse der Medien (Abb. 40).

Im Wasser und im Borat-Puffer blieben die Partikel über den Zeitraum von sechs Monaten nahezu stabil. Die Quantenausbeuten verringerten sich nur um 2% auf 47% in Wasser und von 51% auf 42% im Borat-Puffer.

Im alkalischen PBS blieben die Mizellen nur über drei Monate stabil, nach einem halben Jahr waren diese aggregiert und zum Teil ausgefallen. Hier kam es schließlich zu Lumineszenzverluste von 50% hinsichtlich der Anfangsmessung.

Bei einem pH-Wert von 3 sank die Quantenausbeute bereits zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung auf 22%. Nach sechs Monaten konnten nur noch 13% ermittelt werden. Dies war eines von drei Medien, das den stärksten Einfluss auf die Mizellen der Dot-Rods hinsichtlich ihrer Instabilität hatte.

Im neutralen DPBS sowie im Natriumazid-Puffer kam es bereits nach einer Woche zu Aggregationen und hohen Quantenausbeute-Verlusten. Ein Teil der Nanopartikel waren durch den Einfluss der im PBS enthaltenen Salze zu schwereren Agglomeraten geworden und zu Boden gesunken. Die übrigen gelösten Teilchen wiesen am Ende Quantenausbeuten von noch 9% auf.

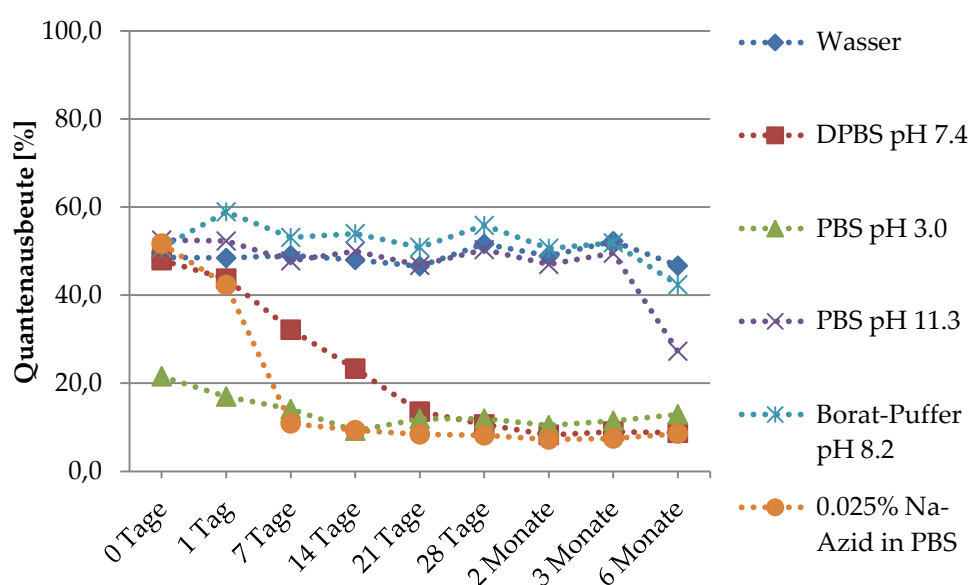


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

Die Instabilitäten im neutralen und sauren PBS sowie im Natriumazid-PBS-Medium zeigten sich auch im zeitlichen Verlauf der aufgenommenen Absorptionsspektren (Abb. 41). Hier verringerte sich die gemessene OD bis schließlich kaum noch Absorption der Teilchen detektierbar war.

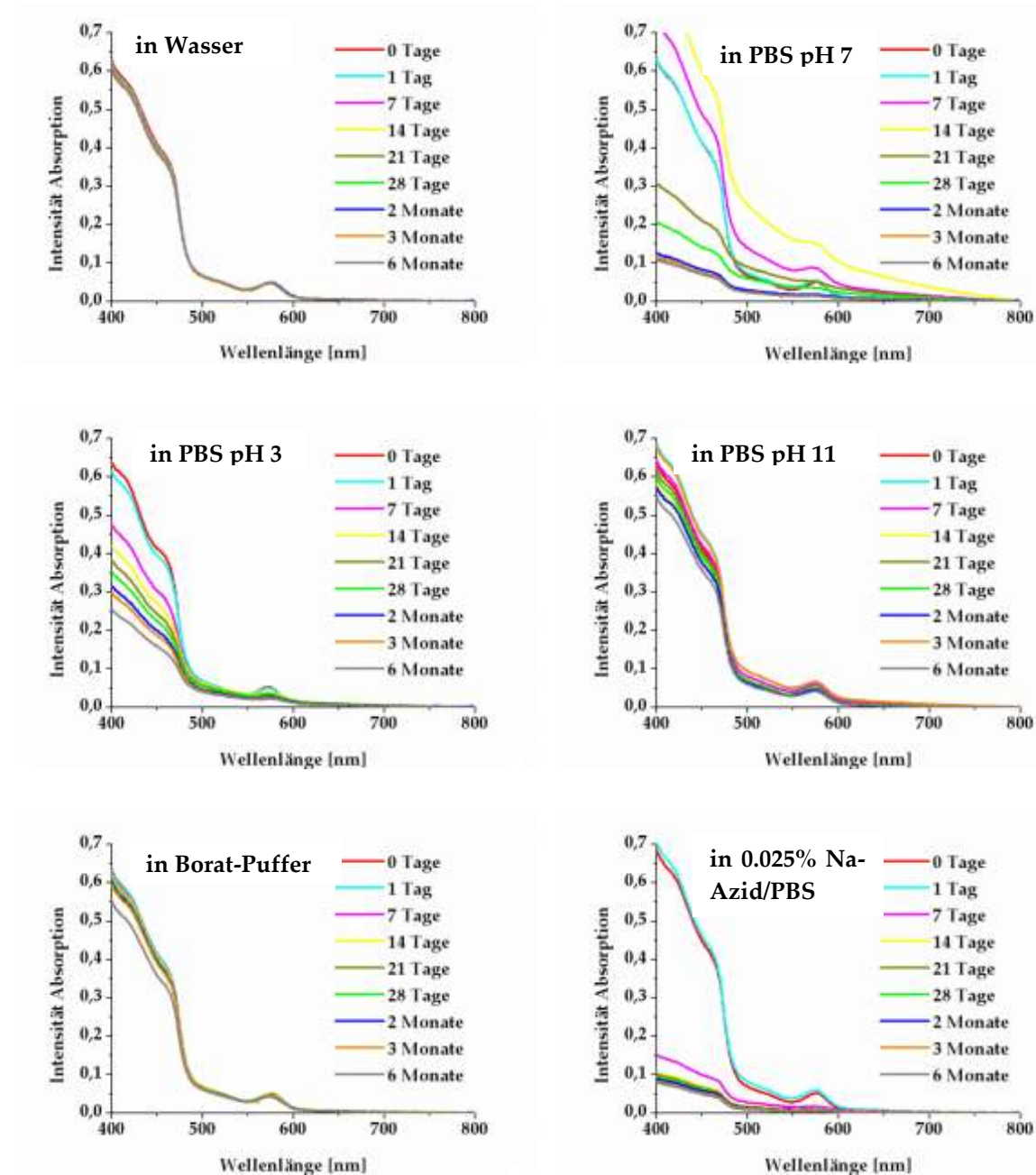


Abbildung 41: Absorptionsspektren der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

Die alkalische PBS-Lösung wies nur leichte Schwankungen auf im Vergleich zu den weniger stabilen QD-PBS-Lösungen unter neutralen und sauren Bedingungen. Hier könnten die vorhandenen Hydroxid-Ionen die Oberfläche der Nanopartikel

stabilisieren. Die Fluoreszenzeigenschaften blieben unter diesen Bedingungen über einen längeren Zeitraum (3 Monate) stabil.

Im Wasser und im Borat-Puffer blieben die Verläufe der Absorptionsspektren über den gesamten Zeitraum stabil und unverändert, was auch die nahezu gleichbleibende Quantenausbeute unterstützte.

4.3.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche

Bei den Messungen in den zellrelevanten Nährmedien blieben die Partikel nur in BSA mit einer Quantenausbeute um die 52% konstant und stabil (Abb. 42).

Während sie in beiden FCS-haltigen Lösungen innerhalb einer Woche stetig an Lumineszenz verloren, (in DMEM um 30% und in DPBS um 50%), hatte der HEPES-Zusatz in DMEM den größten destabilisierenden Einfluss auf die Nanoteilchen. Hier war bereits zu Beginn der Messung 20% weniger Quantenausbeute im Vergleich zu den in BSA befindlichen Teilchen messbar. Nach einer Woche waren schließlich nur noch 9% der Lumineszenzquantenausbeute übrig.

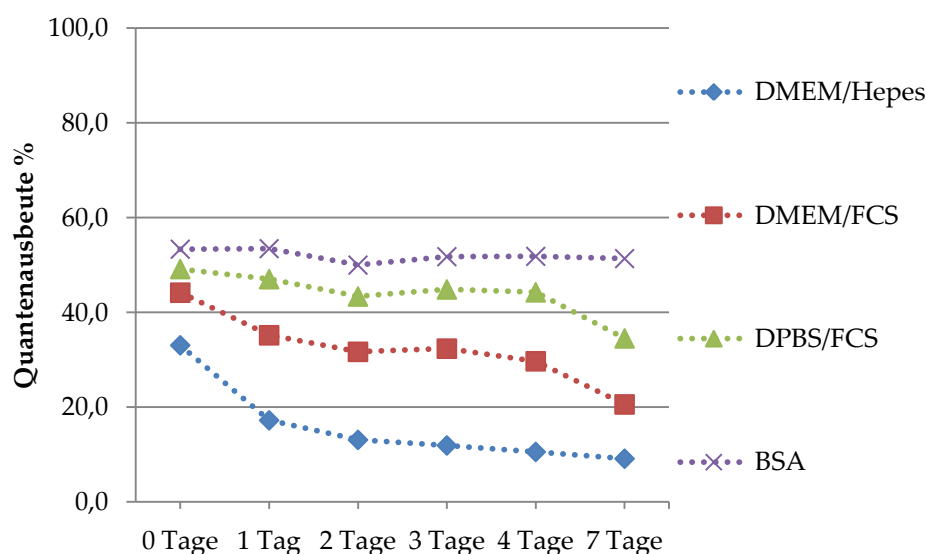


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH in DMEM + 10% HEPES, DMEM + 10% FCS, DPBS + 10%FCS und 1% BSA über einen Zeitraum von einer Woche

Die gemessenen Absorptions- und Emissionsspektren unterstrichen die Ergebnisse der ermittelten Quantenausbeuten dieses Partikelsystems (Abb. 43).

Die abnehmenden Intensitäten der Photolumineszenz in den DMEM-Medien mit der Zeit entsprachen den veränderten Quantenausbeuten. Scheinbar beeinflussten die

Bestandteile der Lösungen die Oberfläche des Partikel-Liganden-Systems. Folglich kam es zur Abnahme der Quantenausbeute.

Die Untersuchung der Nanopartikel in FCS-haltigen PBS zeigte nach einer Woche einen hohen Streuuntergrund im Absorptionsspektrum. Dieser Effekt könnte durch komplexbildende Prozesse der Proteine in FCS sowie der verschiedenen Salzkomponten der PBS-Lösung mit den Liganden an der Mizellenoberfläche hervorgerufen worden sein.

Die 1%ige BSA-PBS-Lösung verzeichnete keine Stabilitätsänderungen bei den QDs.

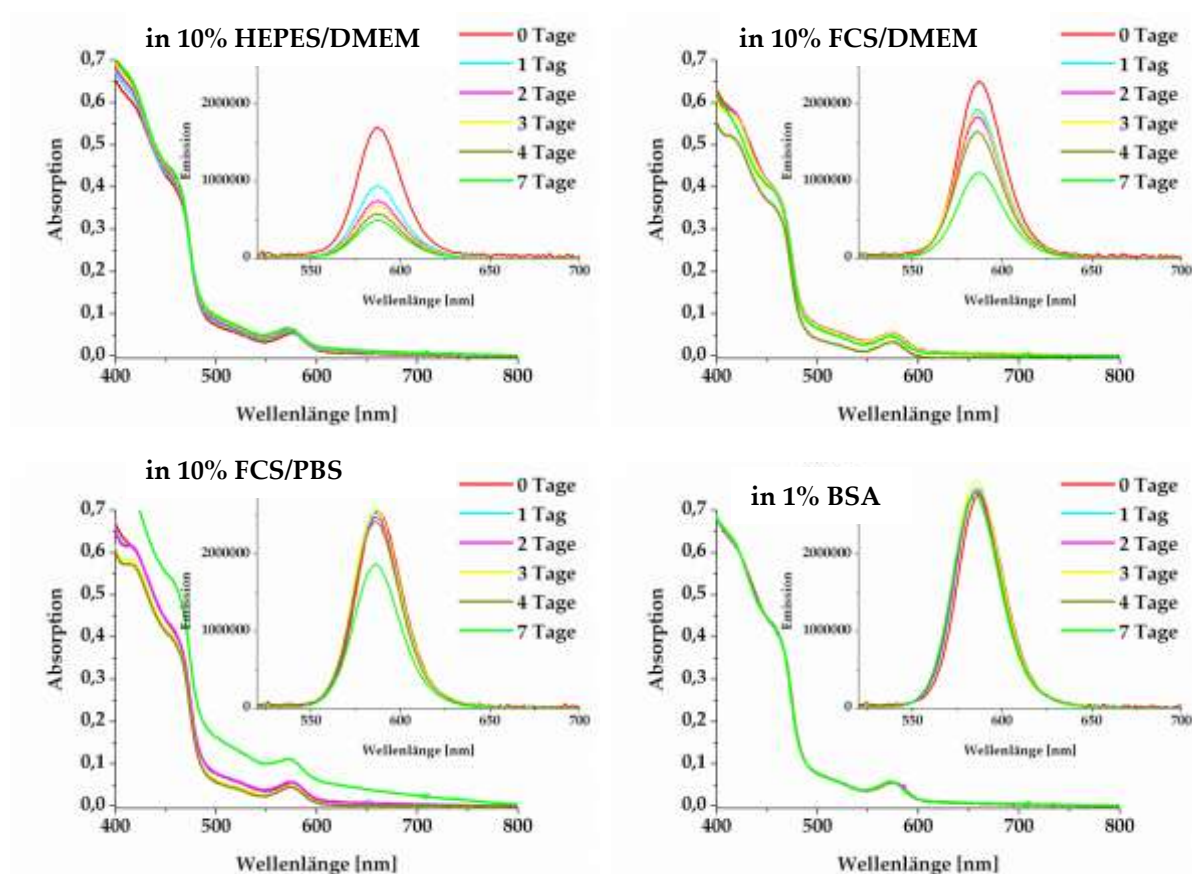


Abbildung 43: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

4.3.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden

Die Kurzzeitstabilitätsmessungen der Dot/Rods legten unterschiedlich starke Einflüsse der untersuchten Medien dar (Abb. 44).

In Triton X-100 gab es über einen Zeitraum von einem Tag keinerlei Veränderungen in den Eigenschaften der Partikel. Die Quantenausbeute betrug hier unverändert 51%.

Bei Glutaral war nur eine geringe Abnahme der Lumineszenz um 9% zu erkennen. Die EDTA-Lösung zeigte einige Messschwankungen über die Zeit auf die Mizellen. Hier blieben die Partikel hinsichtlich ihrer Quantenausbeute mit 31% stabil. Hingegen wurde der erhebliche Einfluss des Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid deutlich. Bereits zu Beginn konnten nur 50% der Quantenausbeute in Wasser detektiert werden (26%).

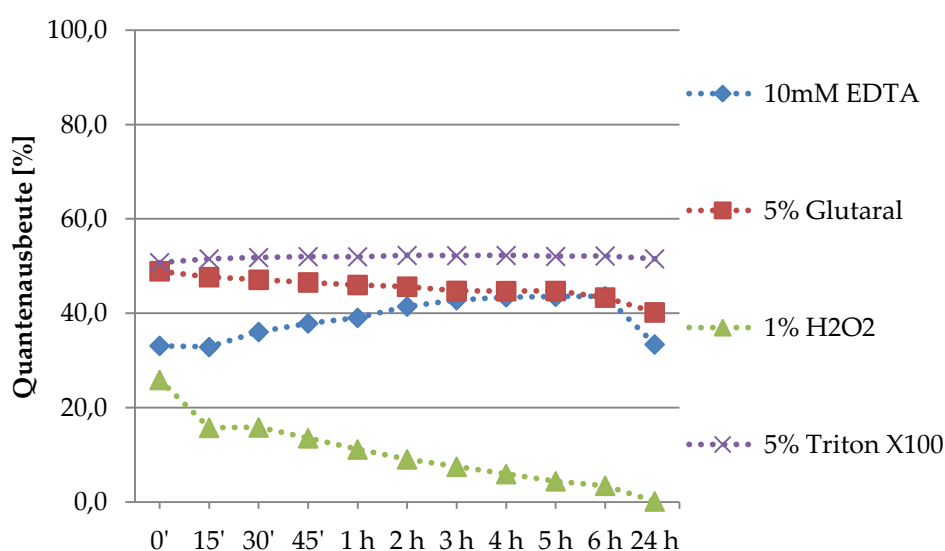


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100 über einen Zeitraum von 24 Stunden

Innerhalb kürzester Zeit nahm die Lumineszenz kontinuierlich ab bis am Ende keine Fluoreszenz mehr messbar ist. Die Teilchen waren durch den Einfluss der Radikale vollständig zerstört worden. Entsprechend nahmen die Intensitäten der Absorptions- und Emissionsmessungen ab. Die signifikanten Maxima der Absorptionsspektren waren schließlich nicht mehr messbar (Abb. 45).

Die übrigen Absorptionsverläufe zeigten keinerlei Änderungen oder Aggregationen der Partikel. Die Emissionen der Partikel sind in Triton X-100 unverändert, während in EDTA die vorher beschriebenen Schwankungen zeigten und in Glutaral die leichte Abnahme der Quantenausbeute darlegten.

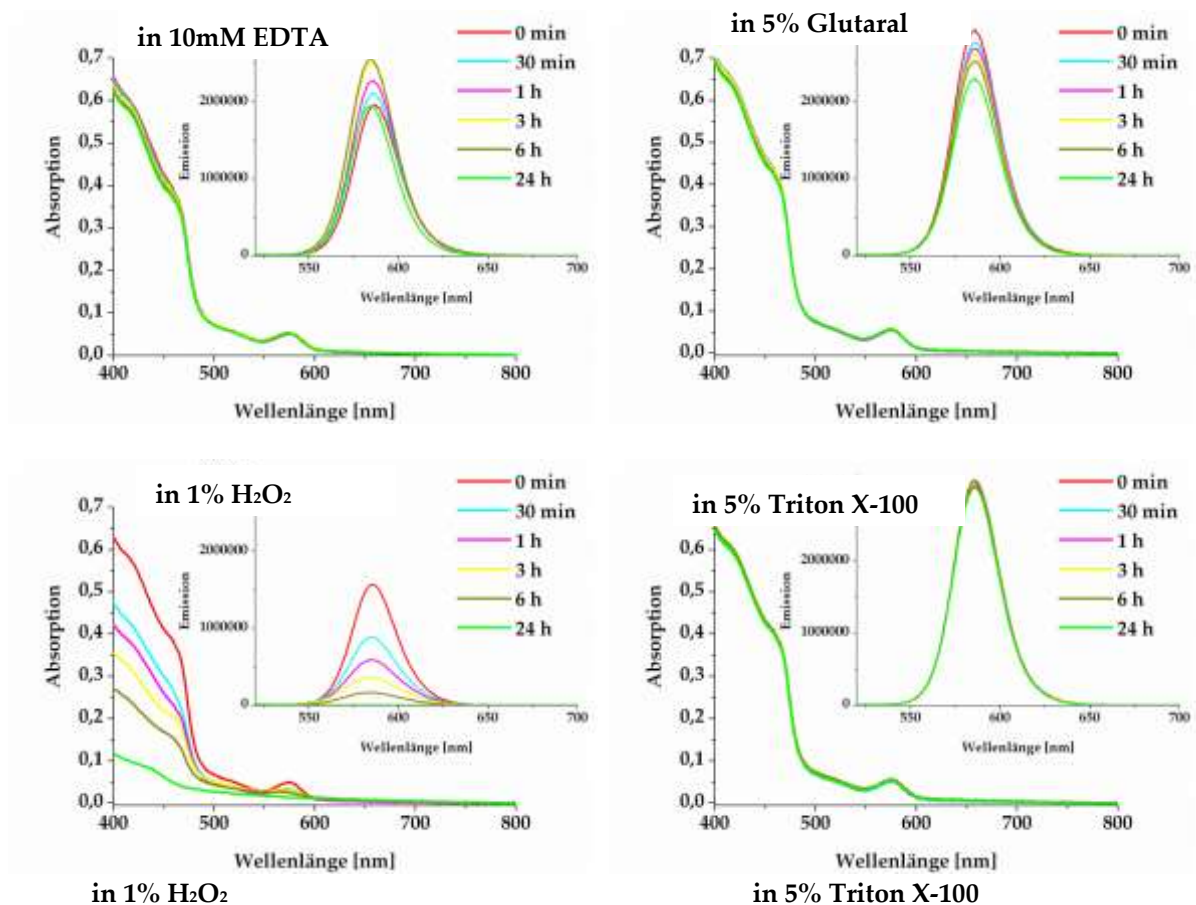


Abbildung 45: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

4.3.4 Dynamische Lichtstreuung

Die Untersuchungen der hydrodynamischen Durchmesser von den CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH zeigten im Großen und Ganzen über sechs Monate stabile und nahezu gleich große Partikel (Abb. 46).

Im Wasser bildeten sie im Schnitt 38 nm große Mizellen, wie auch im alkalischen PBS und im Natriumazid-Puffer.

Im sauren PBS blieben sie konstant 44 nm groß, während im neutralen PBS nach einem Monat eine Vergrößerung von 28 nm auf 44 nm deutlich wurde. Hier waren entsprechend den Absorptionskurven Aggregate vorhanden, die allerdings keine größeren Einflüsse auf den hydrodynamischen Durchmesser hatten.

Im Borat-Puffer waren nur leichte Schwankungen über die Zeit zu verzeichnen. Hier hatten die Mizellen eine Anfangsgröße von 33 nm und zum Ende 24 nm.

Die HWB der Partikel blieben in allen untersuchten Lösungen stabil bei 25 nm.

Das Dot/Rod-PI-*b*-PEO-OH-Teilchensystem war hinsichtlich der Partikelgröße über einen Zeitraum von sechs Monaten stabil. Verglichen mit den Absorptionsspektren sollten die Messungen in neutralem PBS sowie im Azid-Puffer kritisch betrachtet werden. In diesen Lösungen aggregierten die Teilchen und sanken auf den Boden der Messküvette. Folglich waren keine Partikel-spezifischen Absorptionsmaxima messbar. Die erhaltenen DLS-Größen konnten in diesem Beispiel das Vorhandensein leerer Mizellen oder freier Polymere aufzeigen.

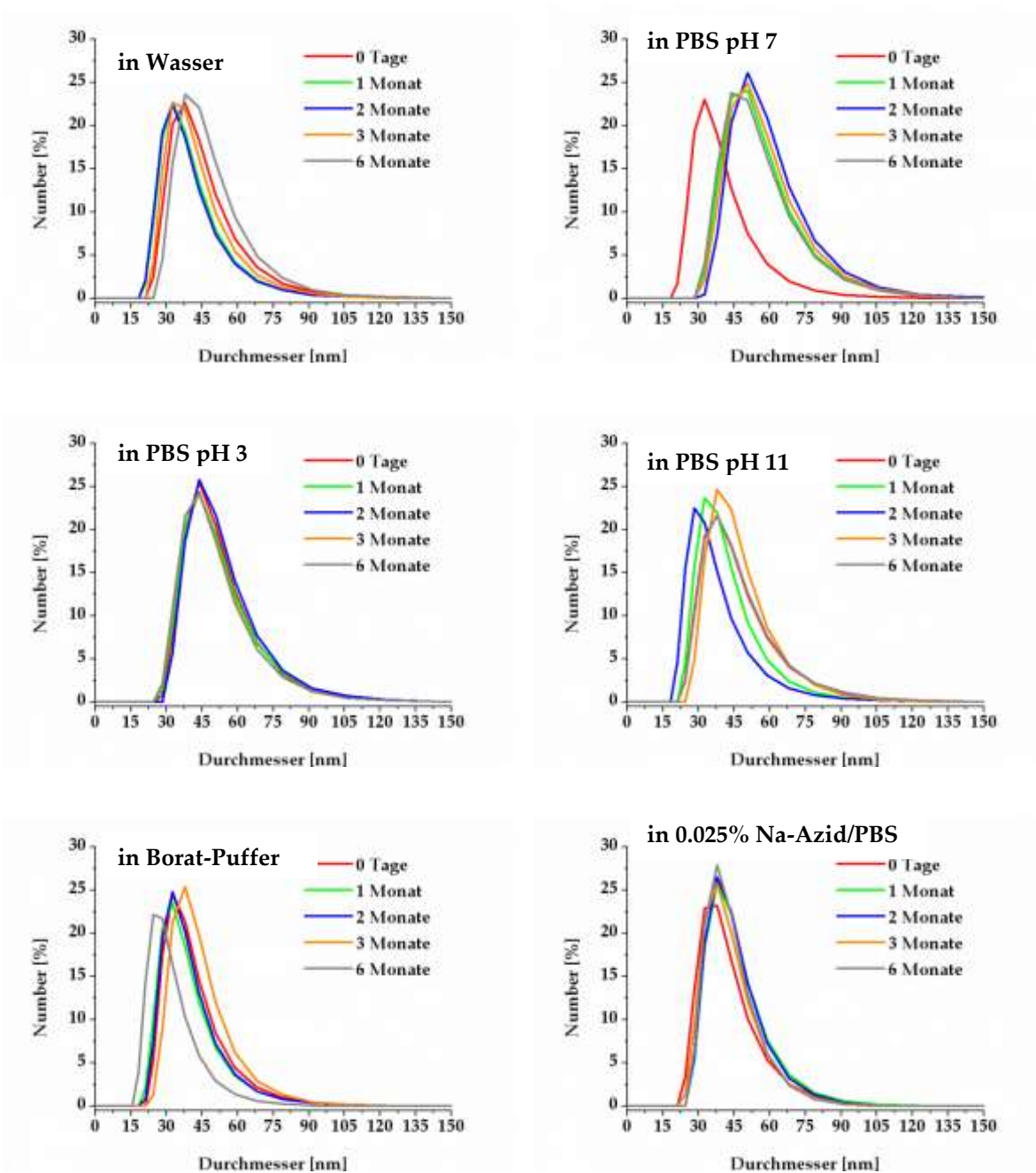


Abbildung 46: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

Die Zellmedien zeigten keinerlei Veränderungen hinsichtlich der Partikelgröße innerhalb der einen Woche (Abb. 47). Die HWB der Partikel betrugen in allen untersuchten Medien um die 20 nm und der hydrodynamische Durchmesser der Mizellen 35 nm.

In der BSA-haltigen PBS-Lösung konnten auf Grund des starken Proteinsignals bei 8 nm keine Partikel detektiert werden.

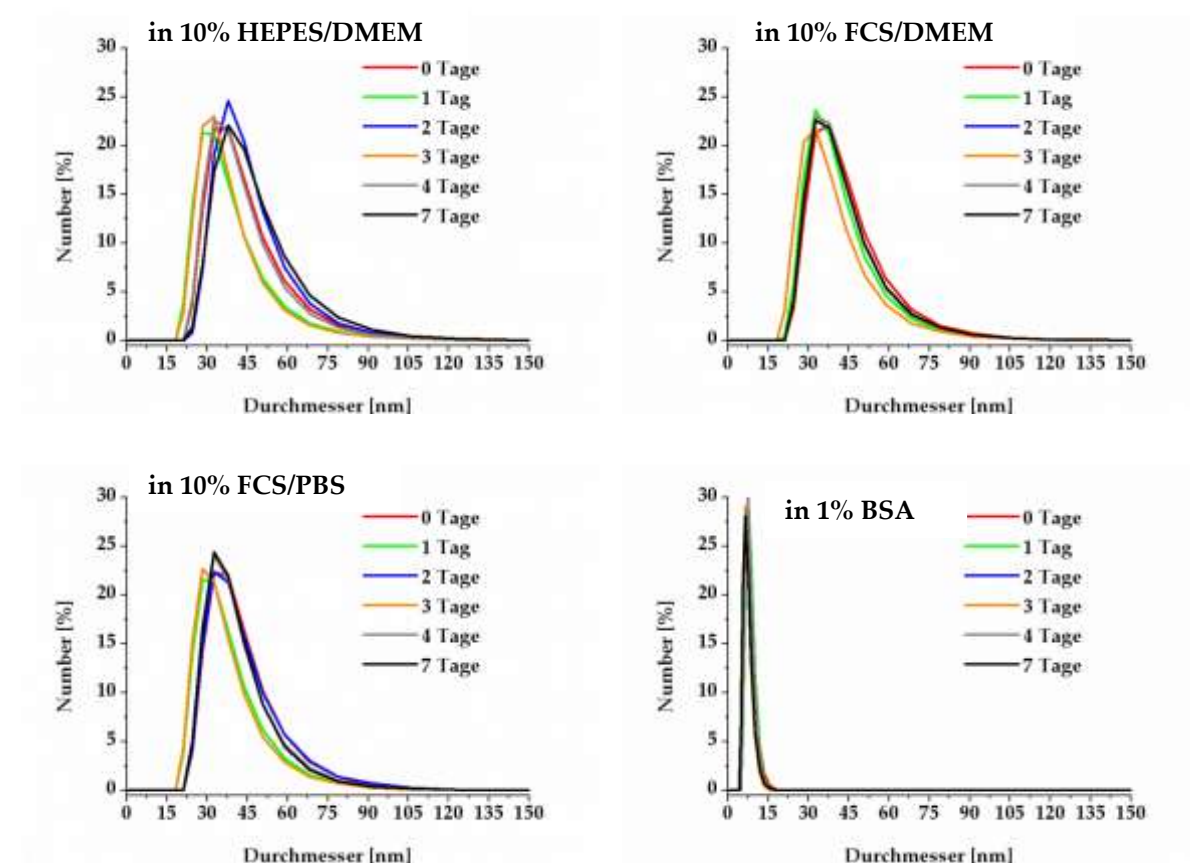


Abbildung 47: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

Die Messungen der hydrodynamischen Durchmesser in EDTA, Glutaral (je 38 nm) und Triton X-100 (24 nm) wiesen keine Veränderungen in der Stabilität des Partikel-Systems auf. Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Mizellen zeigte vergleichende Ergebnisse wie bereits bei neutralen PBS und dem Azid-Puffer beschrieben. Trotz abnehmender ODs und Quantenausbeuten bis hin zur vollständigen Abnahme der Absorptionsintensitäten, konnten Größen von 38 nm detektiert werden. Diese Durchmesser lassen eventuell auf leere Mizellen oder freie Polymere schließen (Abb. 48).

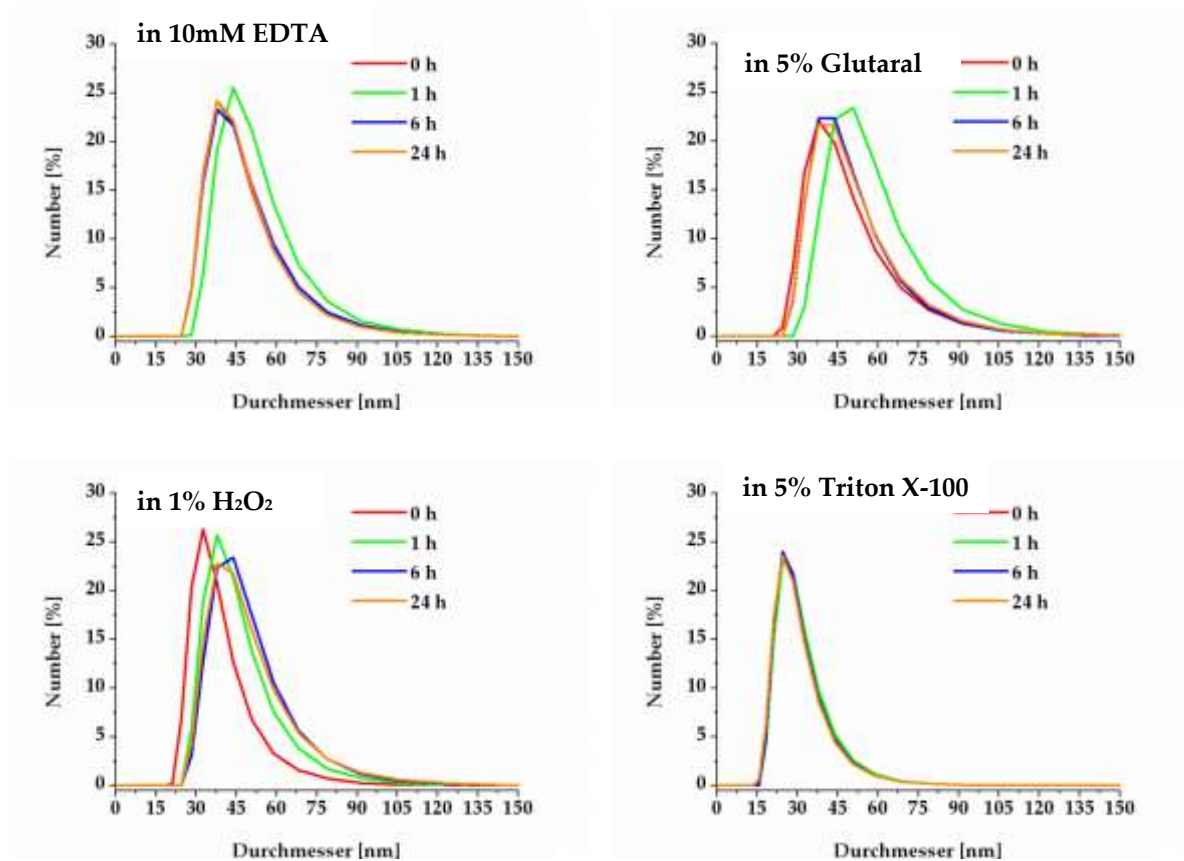


Abbildung 48: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

4.3.6 Lagerung bei -20 °C / 120 °C

Die extremen Temperatureinflüsse von -20 °C und 120 °C auf das Dot/Rod-System zeigten hauptsächlich Veränderungen in den Absorptionen und beim gemessenen hydrodynamischen Durchmesser (Abb. 49).

Bei -20 °C war ein hoher Streuuntergrund zu verzeichnen. Die Partikelgröße änderte sich entsprechend von 24 nm auf 68 nm.

Die autoklavierten Teilchen waren anfänglich 24 nm groß und vergrößern sich nach der Lagerung bei 120 °C auf 59 nm.

Die Quantenausbeuten änderten sich nicht bei diesen Temperatureinflüssen und blieben konstant bei 50%.

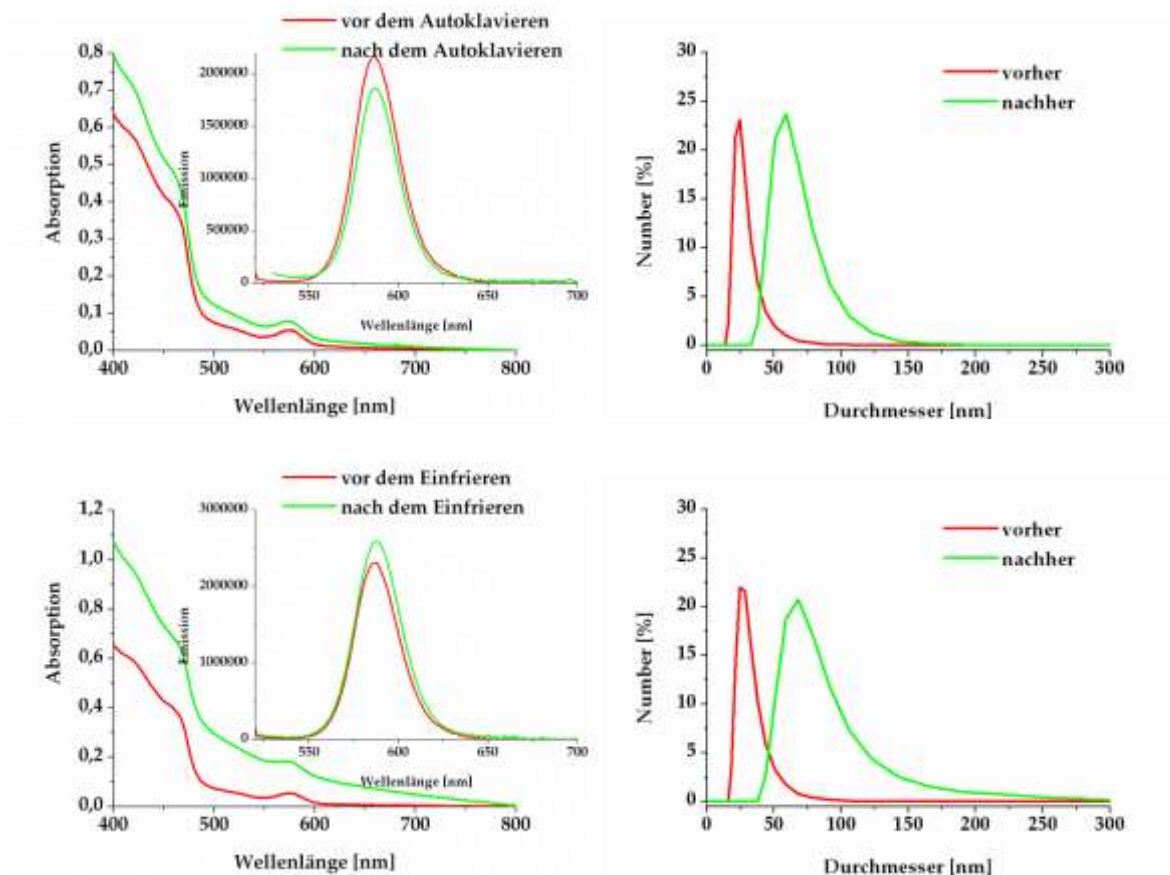


Abbildung 49: Graphische Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren (linke Bilder) sowie die hydrodynamischen Durchmesser (rechte Bilder) der CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (b) nach dem Autoklavieren (oben) und nach Lagerung bei -20 °C (unten) in Wasser.

Fazit:

Die Dot/Rods mit dem Diblock-Copolymer-Liganden wiesen in einigen Medien keine ausreichenden Stabilitäten auf.

Besonders in PBS pH7 und pH3 sowie im Azid-Puffer waren gravierende Änderungen zu sehen. Die Partikel aggregierten schon nach einer Woche und sanken auf den Boden der Messküvette. Entsprechend konnten keine Quantenausbeuten mehr bestimmt werden.

Die Untersuchungen der Partikel in den Zellmedien zeigten eine kontinuierliche Abnahme der Quantenausbeute.

Wasserstoffperoxid zerstörte das Nanoteilchen-Ligandensystem unter Verlust der Quantenausbeute. Im DLS waren allerdings keine großen Aggregate messbar. Anscheinend konnten die Mizellen nach wie vor gemessen werden, aber sie schirmen die Nanopartikel nicht mehr ab.

Der Ligandenaustausch mit diesem Partikelsystem muss in zukünftigen Studien optimiert werden, um höhere Quantenausbeuten und eine zufriedenstellende Abschirmung der Partikel zu erzielen.

4.4 CdSe/ZnCdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (Partikelsystem c)

In diesem Abschnitt werden Untersuchungen der im kontinuierlichen Fluss-Reaktor synthetisierten Nanopartikel dargestellt. Die Ligandenaustauschreaktion mit dem PI-*b*-PEO-OH wurde hier erst probeweise getestet und ist noch nicht optimiert. Daher konnten nur geringe qualitativ gute Mengen erhalten werden, die in den Langzeitstudien untersucht wurden.

Entsprechende Optimierungsverfahren hinsichtlich der Darstellung von größeren Mengen wasserlöslicher Reaktorpartikel, sowie die Studien an Kurzzeitstabilitäten in Zellmedien und salz- oder proteinhaltigen Lösungen sollten nachgeholt werden.

4.4.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Die Quantenausbeute der Reaktorpartikel betrug zu Beginn fast ausnahmslos 22%. Nur unter sauren Bedingungen lag die Quantenausbeute bei 17%. Dieser Unterschied war nicht besonders gravierend und zeigte trotzdem eine Konstanz zu Beginn der Untersuchungen (Abb. 50).

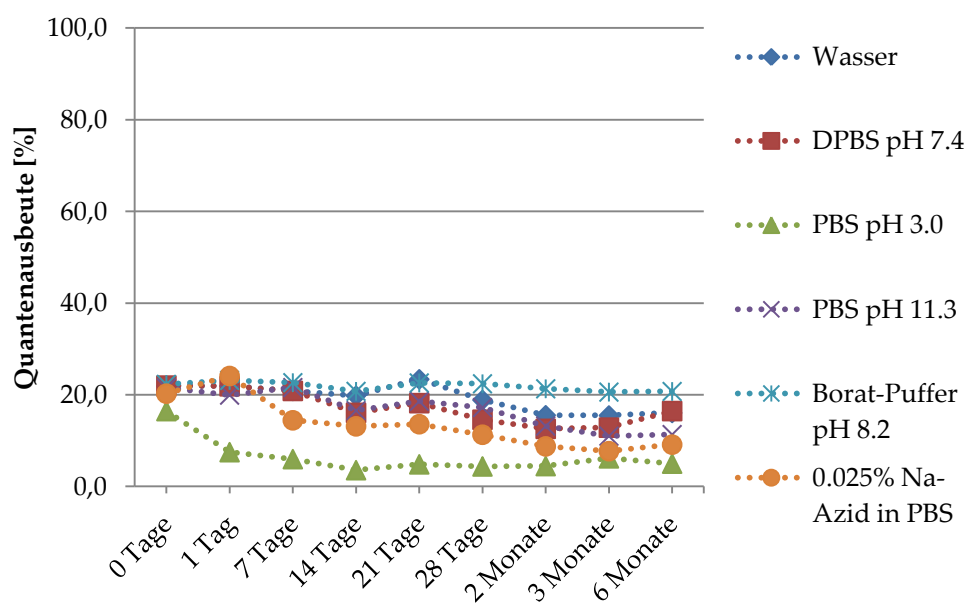


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/ZnCdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

Im Borat-Puffer waren die Partikel über den gesamten Zeitraum von sechs Monaten stabil.

Bei den Messungen in Wasser und neutralem PBS verringerte sich die Lumineszenz um nur 5% ab. Hier waren keine destabilisierenden Einflüsse zu verzeichnen.

Unter saurem Einfluss erfuhren die Partikel einen Verlust ihrer Quantenausbeute um 70%. Scheinbar wirkten hier die Protonen destabilisierend auf die Mizellenoberfläche und konnten so die Lumineszenz-Eigenschaften der Nanopartikel beeinflussen.

In den übrigen Medien, PBS pH 11 sowie Borat- und Natriumazid-Puffer, konnten nach sechs-monatiger Lagerung nur noch 10% Quantenausbeute gemessen werden. Die Hydroxid-Ionen und Salze dieser Medien beeinflussten durch eventuelle Komplexierungsreaktionen die mizellare Oberfläche der Partikel.

Die Absorptionsspektren zeigten über den gesamten Zeitraum nahezu gleichbleibende Verläufe (Abb. 51).

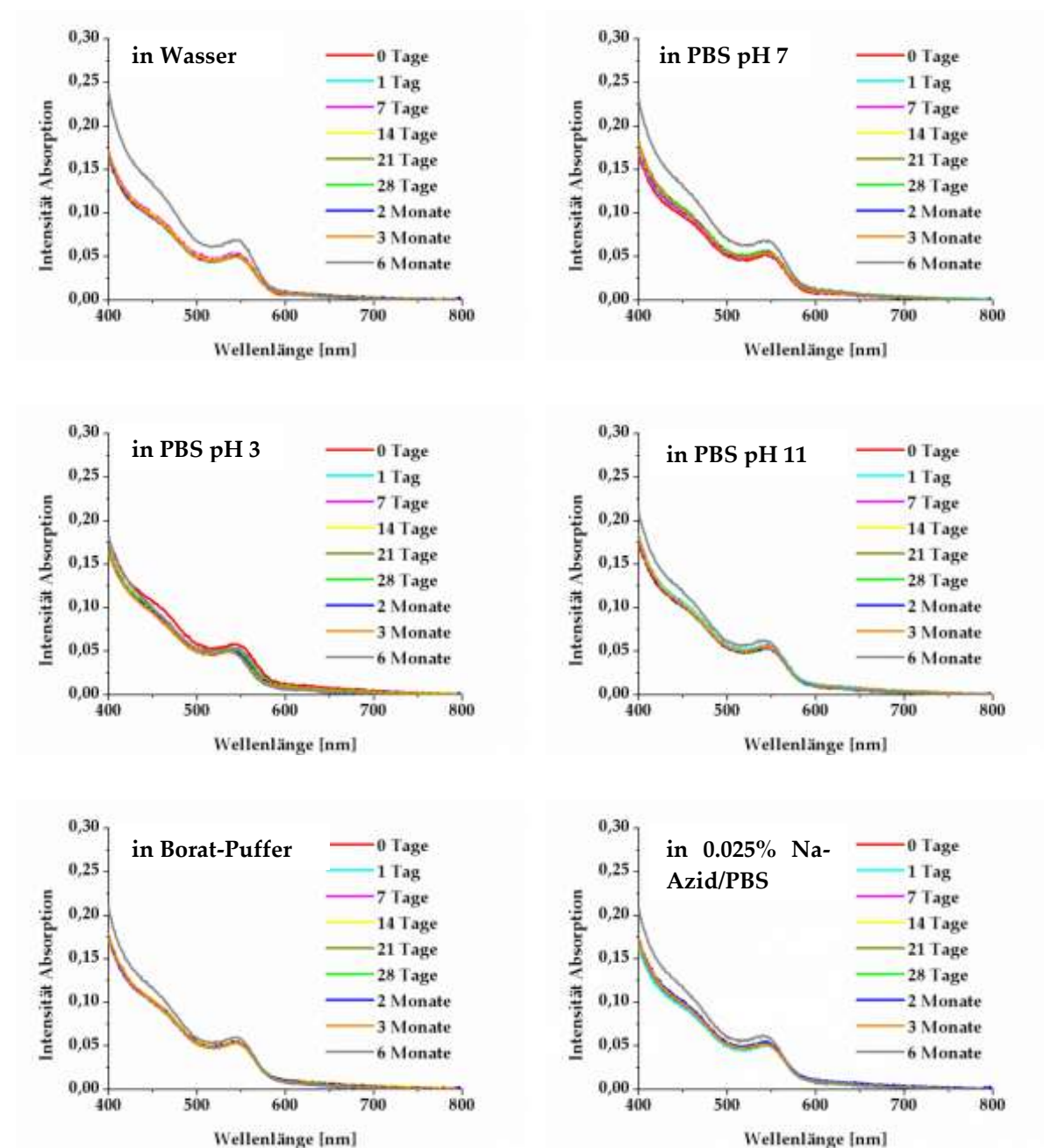


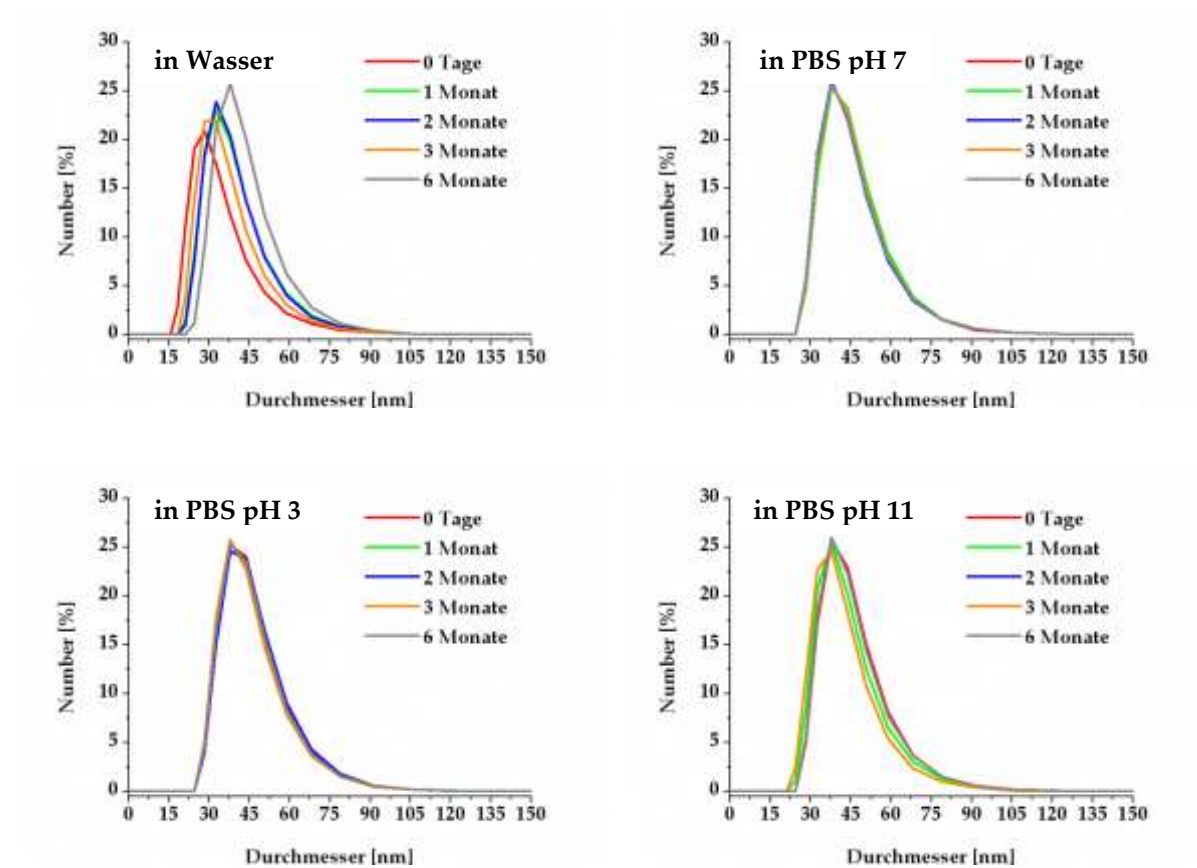
Abbildung 51: Absorptionsspektren der CdSe/ZnCdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (c) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

Nach sechs Monaten war in fast allen Medien, außer in PBS pH 3, eine geringe Erhöhung der OD zu verzeichnen. Dies konnten aggregierte Teilchen sein, bei denen ein Streuuntergrund detektierbar war. Der Verlauf der Absorptionsspektren ändert sich allerdings nicht weiter über die sechs Monate.

Zwar haben die Reaktorpartikel mit 22% bzw. 17% geringe Quantenausbeuten, dennoch blieben ihre optischen Eigenschaften über ein halbes Jahr nahezu konstant.

4.4.2 Dynamische Lichtstreuung

Bei der Langzeitmessung der hydrodynamischen Durchmesser der Reaktorpartikel waren bis auf leichte Schwankungen im Wasser bei allen Medien konstante und stabile Werte bei 38 nm ersichtlich (Abb. 52). Es gab keine Aggregationen über die Zeit, die Veränderungen in der Mizellengröße aufzeigten.



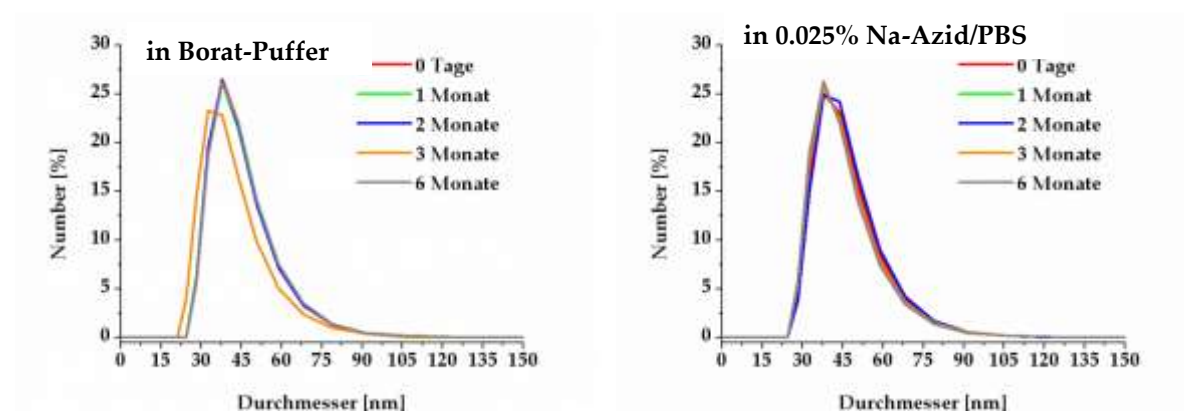


Abbildung 52: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnCdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Nanopartikel (c) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

Fazit:

Die im kontinuierlichen Fluss synthetisierten Teilchen blieben trotz ihrer niedrigen Quantenausbeute in allen untersuchten Langzeitmedien stabil hinsichtlich ihrer Partikelgröße.

Die mizellare Struktur des Ligandensystems schirmten die Teilchen nur in Wasser und neutralem PBS ausreichend ab. Der Einfluss von Protonen des PBS pH 3 wiesen hier die stärksten Veränderungen mit Quantenausbeuteverluste von 70% auf.

Dieses Partikelsystem muss hinsichtlich des Ligandenaustausches mit dem Diblock-Copolymer PI-*b*-PEO in zukünftigen Studien optimiert werden, um Quantenausbeuten von mindestens 40% zu erreichen und so eine noch bessere Abschirmung der Partikel zu erzielen.

Auf Grund der geringen Menge dieses Partikelsystems konnten die übrigen Messungen nicht durchgeführt werden. Nach Syntheseoptimierungen sollten auch in weiteren Arbeiten die entsprechenden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt und vergleichend bewertet werden.

4.5 CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol (Partikelsystem d)

4.5.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Die Stabilitätsstudie des mit Polystyrol zusätzlich umschichteten CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Partikelsystems zeigte über den gesamten Zeitraum von einem halben Jahr in Wasser, im neutralen und alkalischen PBS, sowie im Borat- und Natriumazid-Puffer keine Veränderung hinsichtlich den Quantenausbeuten. Allerdings waren diese mit nur 16% zu Beginn der Messungen sehr gering.

Unter sauren Bedingungen nahm die Lumineszenz nach sechs Monaten um 4% ab (Abb. 53). Die Protonen beeinflussten zwar die Partikel, aber nicht so ausgeprägt wie in den zuvor beschriebenen Teilchensystemen.

Bei diesem Partikel-Liganden-System bedarf es allerdings in zukünftigen Forschungsstudien noch an Optimierungsarbeit in Bezug auf höhere Anfangsquantenausbeuten. Diese sollten mindestens Werte um 40% erreichen.

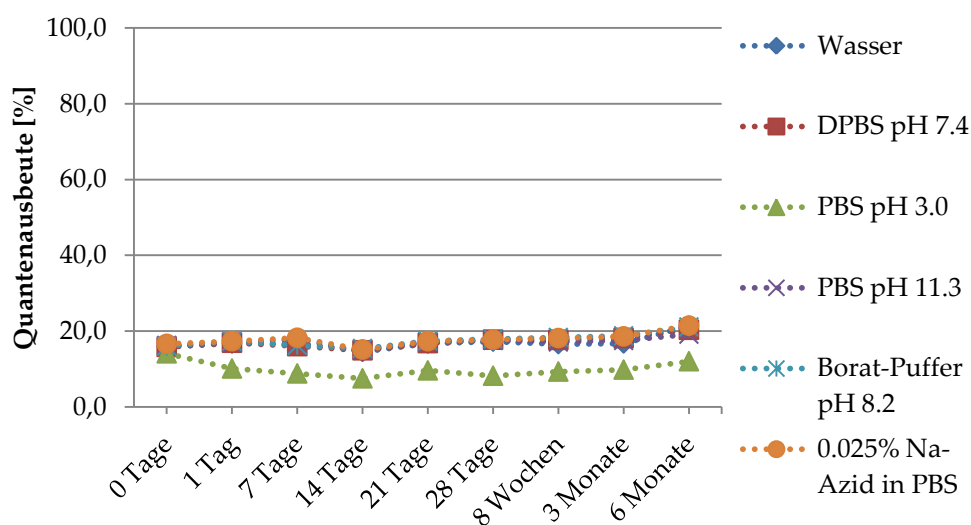


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

Die Absorptionsspektren zeigten nur im Natriumazid-Puffer leichte Verschiebungen der OD mit der Zeit. In den anderen untersuchten Medien blieb der Verlauf der Absorption kontinuierlich konstant. Es waren keine Streueffekte oder Aggregate sichtbar (Abb. 54).

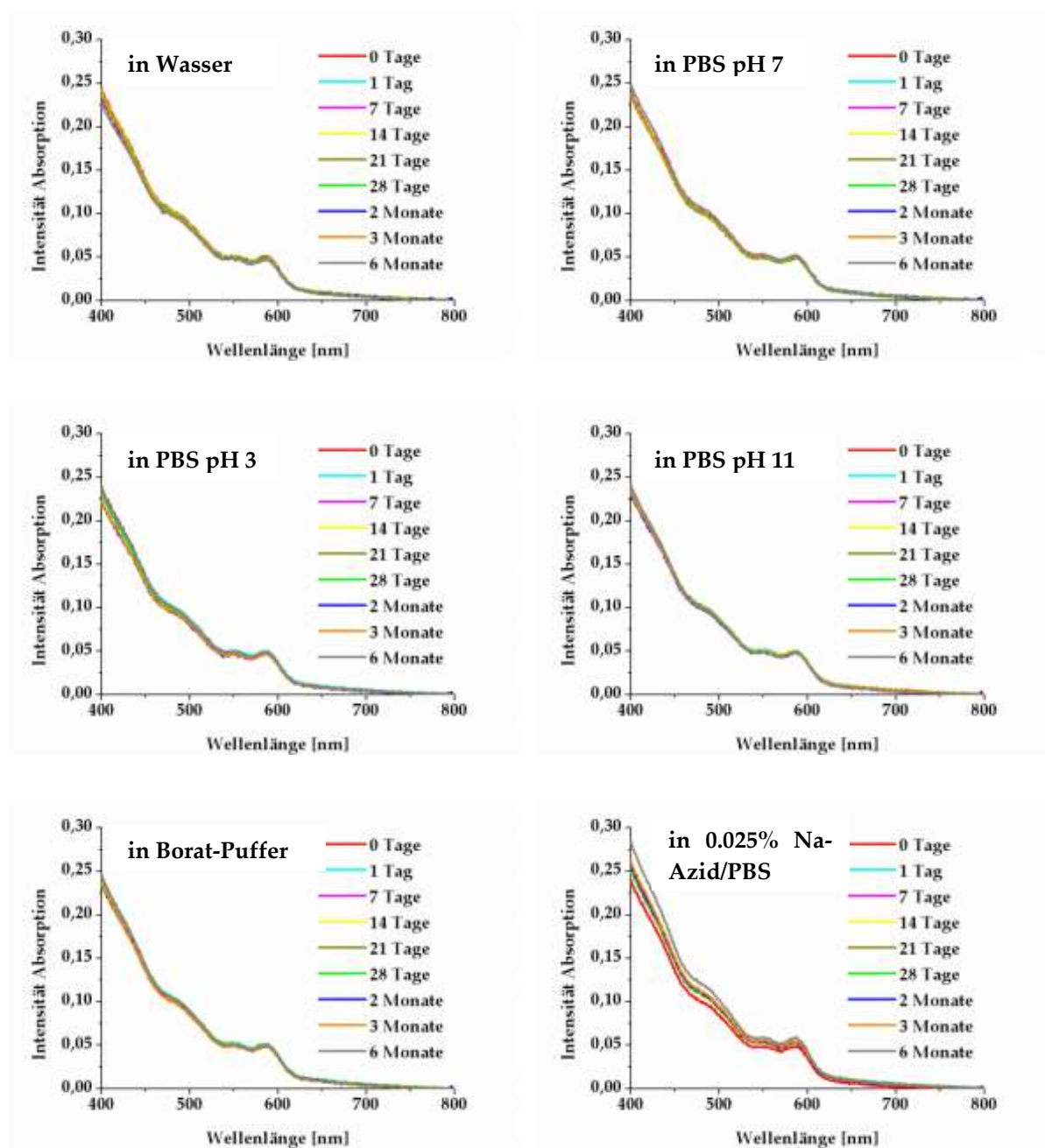


Abbildung 54: Absorptionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

4.5.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche

Die Mizellen mit den eingekapselten Partikeln zeigten auch in den Zellmedien keine gravierenden Änderungen in ihren Lumineszenzeigenschaften (Abb. 55).

Während im FCS-haltigen DMEM nur noch 63% der ursprünglichen Quantenausbeute nach sieben Tagen vorhanden waren, verblieben in den übrigen Medien immer noch 80% der anfänglichen Lumineszenz.

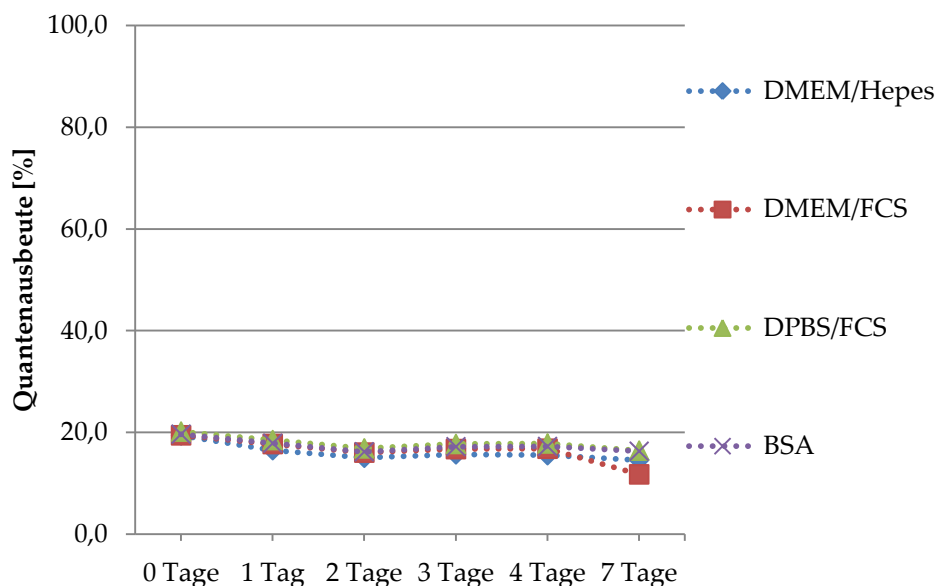


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol in DMEM + 10% HEPES, DMEM + 10% FCS, DPBS + 10%FCS und 1% BSA über einen Zeitraum von einer Woche

Das FCS in DMEM und PBS hatte einen enormen Einfluss auf den Absorptionsverlauf der Nanopartikel. Scheinbar kam es auch in diesem Fall zur Komplexbildung der in FCS vorhandenen Proteine mit der mizellaren Oberfläche der Partikel. In der Absorption war ein hoher Streuuntergrund unter der Kurve messbar (Abb. 56). Ansonsten blieben die Absorptionskurven in ihrem Verlauf unverändert. Die Emissionsspektren zeigten die entsprechenden Veränderungen der Quantenausbeuten in den Medien wie zuvor in Abb. 55 dargestellt.

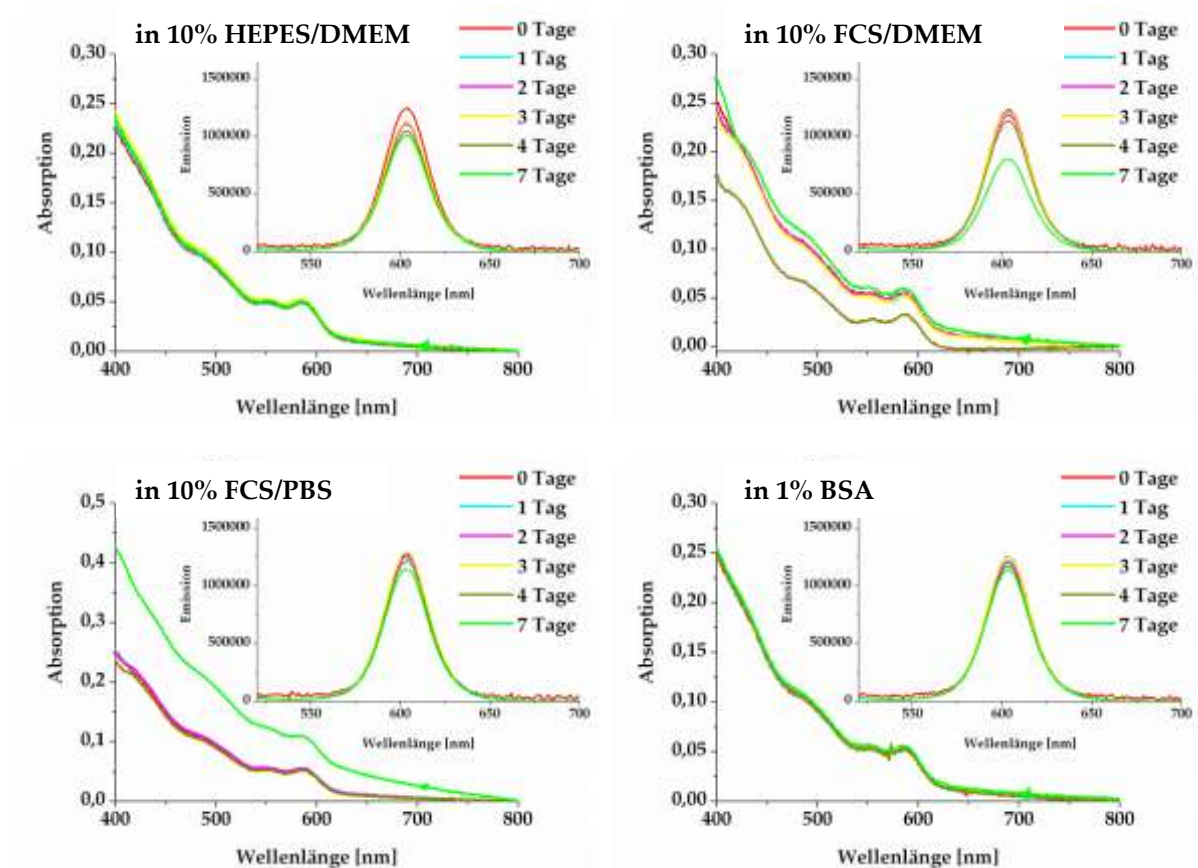


Abbildung 56: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

4.5.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden

In Glutaral und besonders in Wasserstoffperoxid-Lösung erfuhren die Partikel deutliche Verluste in den Quantenausbeuten. Schon zu Beginn dieser Untersuchungsreihe war im Wasserstoffperoxid nur 50% der Lumineszenz im Vergleich zu den übrigen Lösungen vorhanden. Bereits nach drei Stunden war keine Quantenausbeute mehr messbar. Selbst die zusätzliche Polystyrolschicht um das Partikel-Diblock-System verhinderte scheinbar kein Durchdringen der reaktiven Radikale des Wasserstoffperoxids.

Im Glutaral waren nach einem Tag noch 9% Quantenausbeute messbar.

In EDTA und Triton X-100 blieb diese bei etwa 16% nahezu konstant erhalten (Abb. 57).

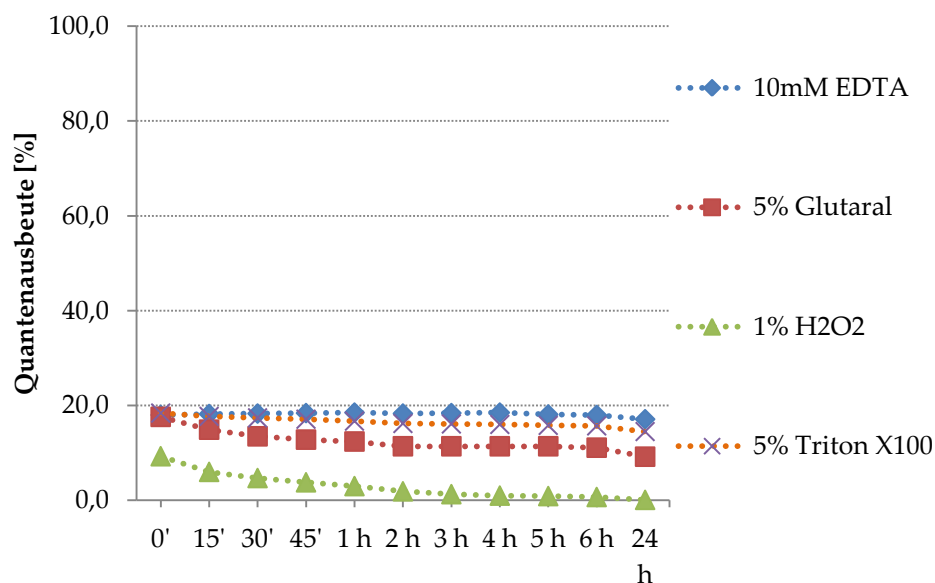


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100 über einen Zeitraum von 24 Stunden

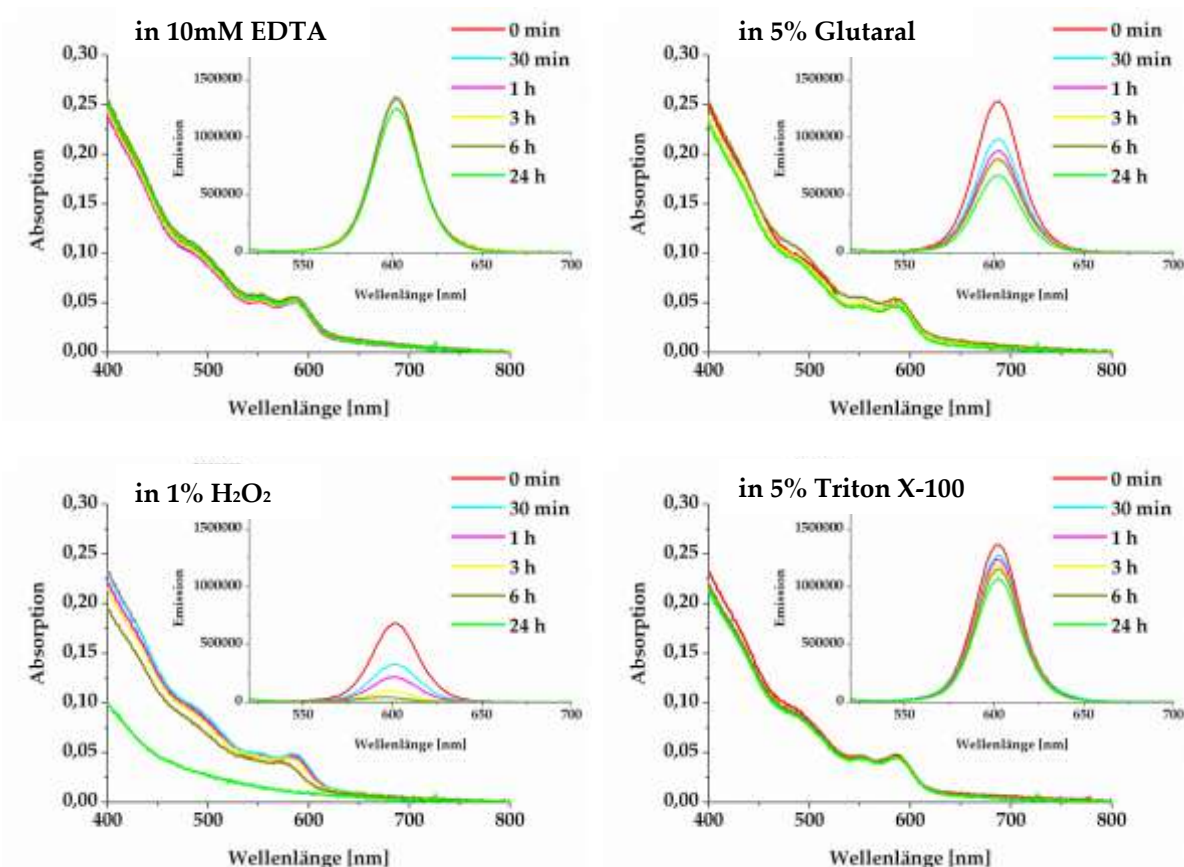


Abbildung 58: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

Die aufgenommenen Absorptions- und Emissionsspektren bestätigten die vorher erwähnten Veränderungen der Nanopartikel hinsichtlich ihrer Lumineszenzeigenschaften (Abb. 58).

In EDTA wurden keine Schwankungen erkennbar, in Triton X-100 kam es zu geringen Abnahmen in der Emission über die Zeit.

In Glutaral hingegen wurde die Verringerung der Quantenausbeute stärker deutlich, während in Wasserstoffperoxid die vollständige Löschung der Fluoreszenz mit dem Verschwinden der charakteristischen Absorptionsmaxima der Partikel einherging.

4.5.4 Dynamische Lichtstreuung

Auch dieses Partikelsystem bildete auf Grund seiner Diblock-Copolymer-Ligandenstruktur Mizellen, deren Größe mittels DLS ermittelt wurde (Abb. 59).

Da diese Teilchen mit einer weiteren Polystyrolschicht versehen wurden, waren höhere Werte im hydrodynamischen Durchmesser im Vergleich zum einfachen CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-System **a** zu erwarten.

In allen sechs untersuchten Langzeitstabilitäts-Medien gab es keine Veränderungen hinsichtlich der durchschnittlichen Größe der Partikel, diese betrug 59 nm. Es wurden nur geringe Schwankungen über die Zeit deutlich.

Ein besonderes Augenmerk waren allerdings die hohen HWB von 37 nm im Vergleich zu den bisher untersuchten Partikelsystemen. Die breitere Größenverteilung war scheinbar eine Folge der zusätzlichen Polystyrolschicht. Die Schichtdicke dieser Hülle könnte eventuell bei einzelnen Mizellen variieren.

Hier bedarf es in weiteren Arbeiten an Optimierung, um eine schmalere Größenverteilung und folglich kleinere HWB zu erhalten. Das könnte eventuell z.B. durch unterschiedliche Ligandenüberschüsse besonders in der Polystyrol-Reaktion gesteuert werden.

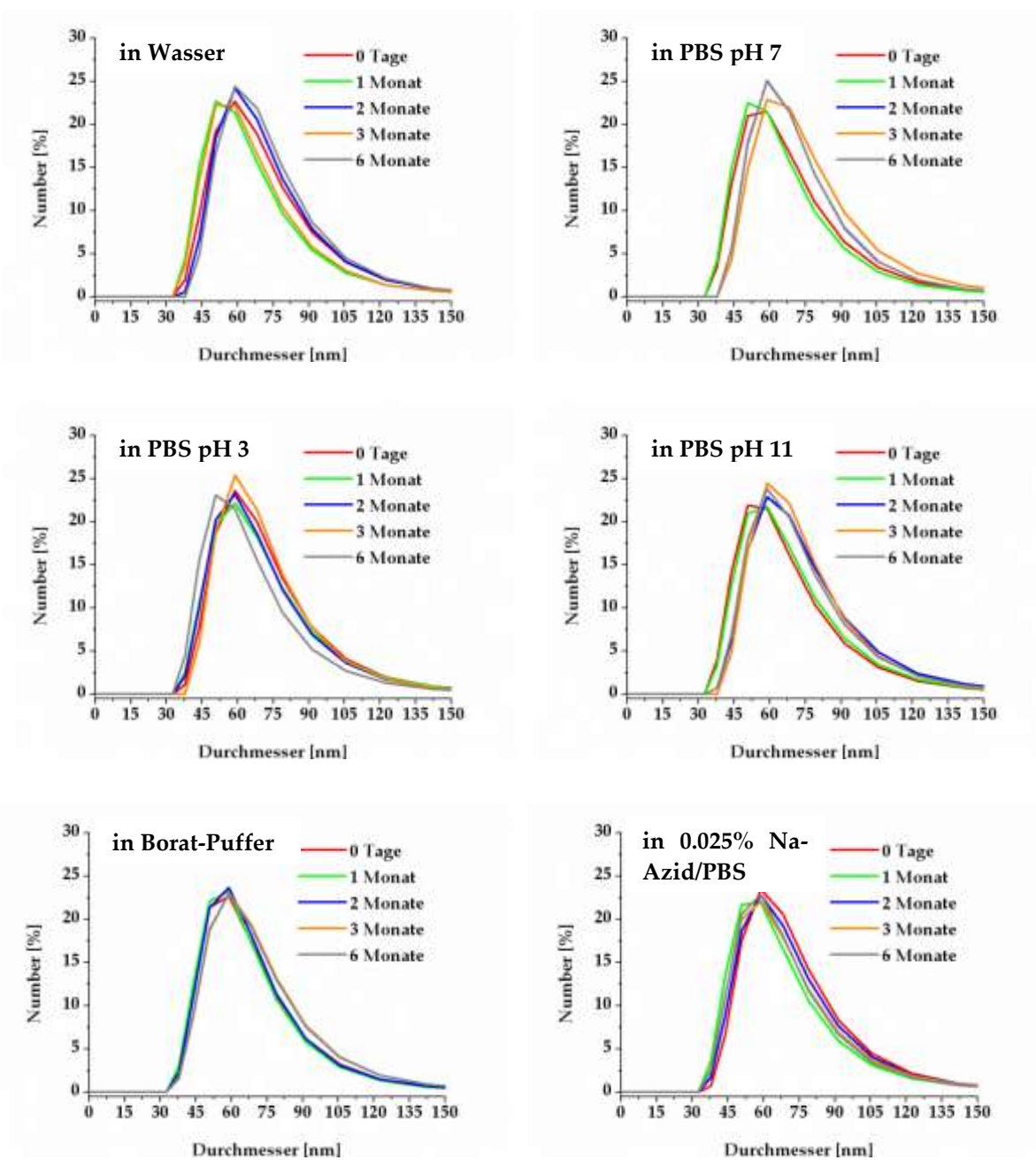


Abbildung 59: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

In den Abb. 60 und 61 sind die DLS-Kurven der Partikel in den Kurzzeitmedien dargestellt. In fast allen Zellmedien und salzhaltigen Lösungen konnten hydrodynamische Durchmesser von 59 nm gemessen werden. Es waren keine bedeutenden Änderungen zu verzeichnen. Nur in Glutaral und DMEM mit HEPES wiesen die Mizellen eine Größe von 68 nm auf.

Wasserstoffperoxid zeigte auch bei diesem Partikelsystem gleiches Verhalten wie bei den zuvor beschriebenen Beobachtungen der Teilchen. Nach einer Lagerung von 24 Stunden war eine vollständige Löschung der Nanopartikel zu verzeichnen, allerdings waren in der DLS Größen messbar, die auf vorhandene mizellare Strukturen hinwiesen. Diese waren scheinbar nicht mit Teilchen „gefüllt“.

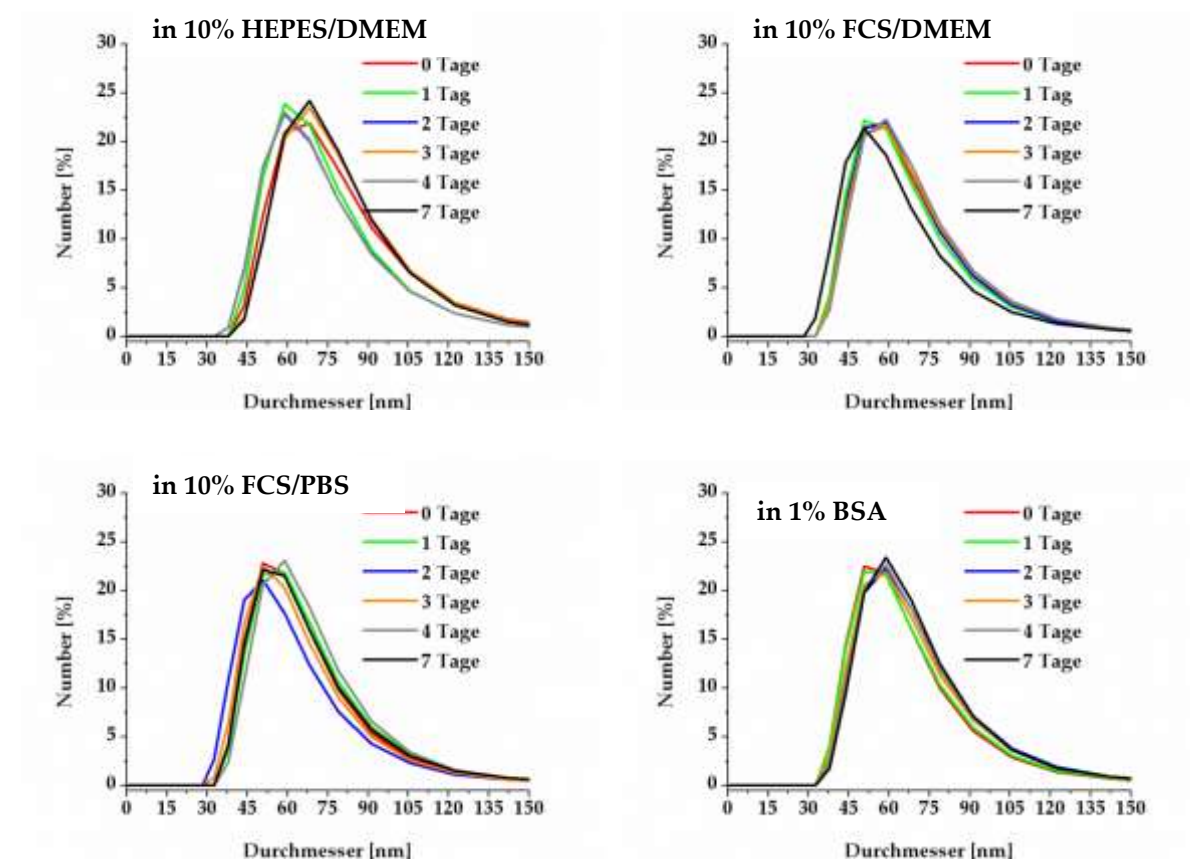


Abbildung 60: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

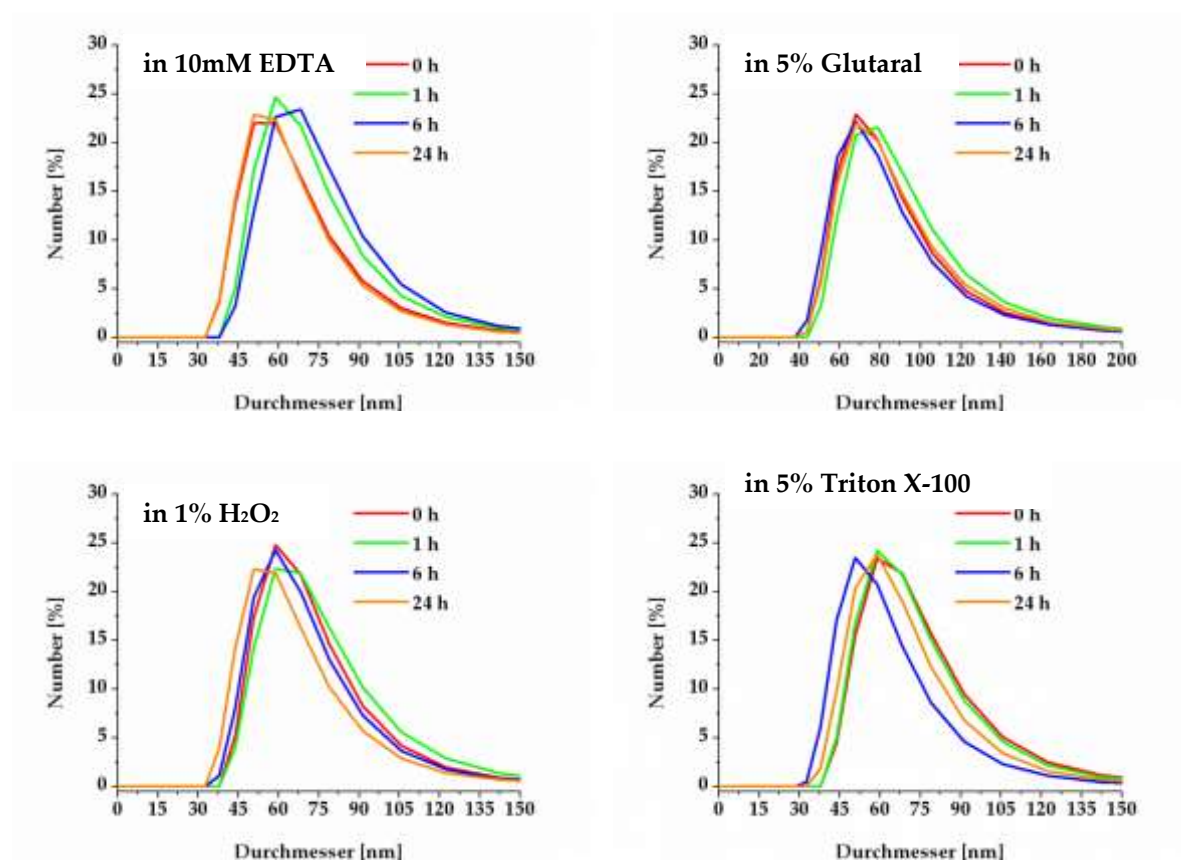


Abbildung 61: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

4.5.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C

Die in Wasser gelösten Partikel wurden nach Lagerung bei -20 °C und 120 °C hinsichtlich der Stabilität der Lumineszenz und Partikelgröße untersucht. Die aufgenommenen Absorptionsspektren zeigten einen hohen Streuuntergrund, der durch aggregierte Teilchen hervorgerufen wurde. Sowohl sehr niedrige als auch sehr hohe Temperaturen wirkten sich destabilisierend auf die Mizellen aus. Während die Lagerung bei -20 °C keine Auswirkungen auf die gemessene Quantenausbeute von 15% aufwies, war nach dem Autoklavieren eine geringe Abnahme in der Emission zu verzeichnen. (Abb. 62). Die bereits erwähnten Aggregationen der Teilchen zeigten sich in den veränderten, gemessenen hydrodynamischen Durchmesser. Die durchschnittliche Größe der Mizellen betrug zu Beginn 59 nm und veränderte sich nach Lagerung bei 120 °C auf 79 nm und bei -20 °C auf 91 nm. Die HWB erfuhren ebenso eine Veränderung von anfänglich 34 nm zu 57 nm. Beide Lösungen zeigten deutliche Trübungen, was einen destabilisierenden Effekt der mizellaren Struktur und die Aggregation dieser Partikel verdeutlichte.

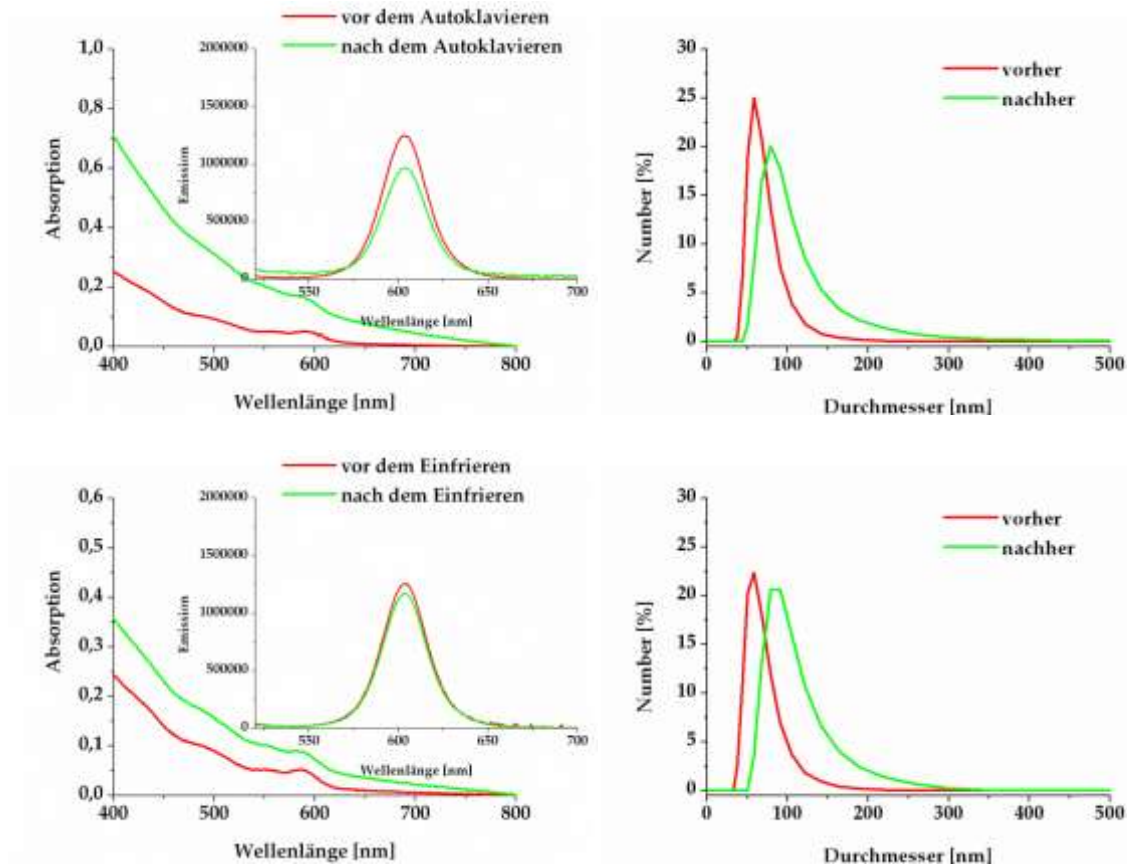


Abbildung 62: Graphische Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren (linke Bilder) sowie die hydrodynamischen Durchmesser (rechte Bilder) der CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (d) nach dem Autoklavieren (oben) und nach Lagerung bei -20 °C (unten) in Wasser

Fazit:

Dieses Partikelsystem besaß nach der Verkapselung sehr geringe Quantenausbeuten mit 16%. Die Teilchen zeigten jedoch in den meisten untersuchten Lösungen eine konstante Stabilität. Nur in DMEM/FCS, Glutaral und Wasserstoffperoxid waren Veränderungen in den Quantenausbeuten zu verzeichnen. In der Peroxidlösung kam es zur Auflösung der Partikel nach 24 Stunden. Ebenso destabilisierten die Lagerungsbedingungen bei -20 °C und 120 °C dieses Partikel-Ligandensystem. Sehr auffällig waren die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser um 60 nm und die HWB mit 37 nm im Vergleich zu den anderen Partikelsystemen der Stabilitätsreihe. Weder bei den Langzeit- noch bei den Kurzzeituntersuchungen änderte sich die Partikelgröße. Bei den Lagerungsbedingungen von -20 °C sowie 120 °C bildeten sich Aggregate, die zum einen bei der DLS-Messung deutlich wurden und zum anderen in der Absorption einen hohen Streuuntergrund aufzeigten.

Zwar sind gute Ansätze für eine bessere Abschirmung der QDs durch die zusätzliche Polystyrolschicht gegeben, allerdings muss in zukünftigen Studien das Augenmerk auf eine deutliche Erhöhung der Quantenausbeute gelegt werden. Die Verkleinerung der Partikel, z.B. durch Wahl kürzerer Polymere, sollte ebenso untersucht werden.

4.6 CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH (Partikelsystem e)

4.6.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Bei dem hier untersuchten Partikelsystem handelte es sich um dieselben hydrophoben Nanoteilchen wie bereits in den Kapiteln 4.2 und 4.5 beschrieben. Sie unterschieden sich jedoch deutlich in ihrer hydrophilen Ligandenhülle. Diese bestand aus einem mehrzähligen Thiol-PEO-Liganden, der über mindestens eine Thiol-Gruppe an die Nanopartikel-Oberfläche kovalent geknüpft ist. Durch diese andere Beschaffenheit der neu entstandenen Teilchenoberfläche ergaben sich andere Stabilitätseigenschaften als bei den bereits erwähnten mizellaren Diblock-Strukturen. Die Nanopartikel waren in allen gemessenen Langzeit-Medien über den gesamten Zeitraum von sechs Monaten hinsichtlich ihrer Lumineszenz stabil. Die Quantenausbeuten betrugen in allen Lösungen über den gesamten Zeitraum der Stabilitätsuntersuchung 25%.

Der Borat-Puffer zeigte über die Zeit sogar noch einen zusätzlich stabilisierenden Effekt. Hier erreichten die Nanoteilchen Quantenausbeuten von 30% (Abb. 63).

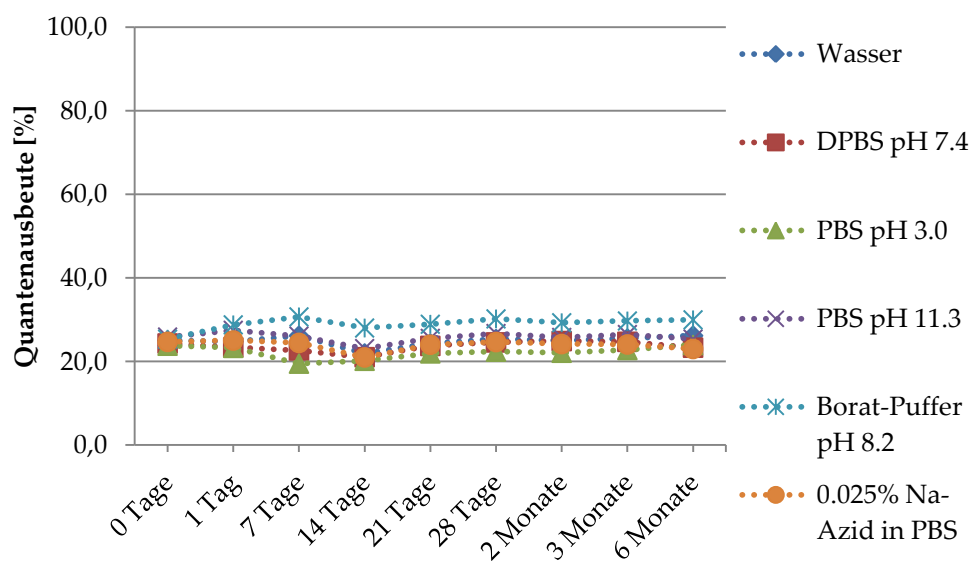


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

Die Absorptionsgraphen zeigten die typischen Maxima für CdSe/CdS/ZnS-Nanopartikel ohne Veränderungen über die Zeit (Abb. 64).

Nur im neutralen PBS waren geringe Abweichungen der OD nach einem halben Jahr zu erkennen. Es waren weiterhin keinerlei Streuartefakte oder Aggregationen in den Verlaufskurven zu verzeichnen.

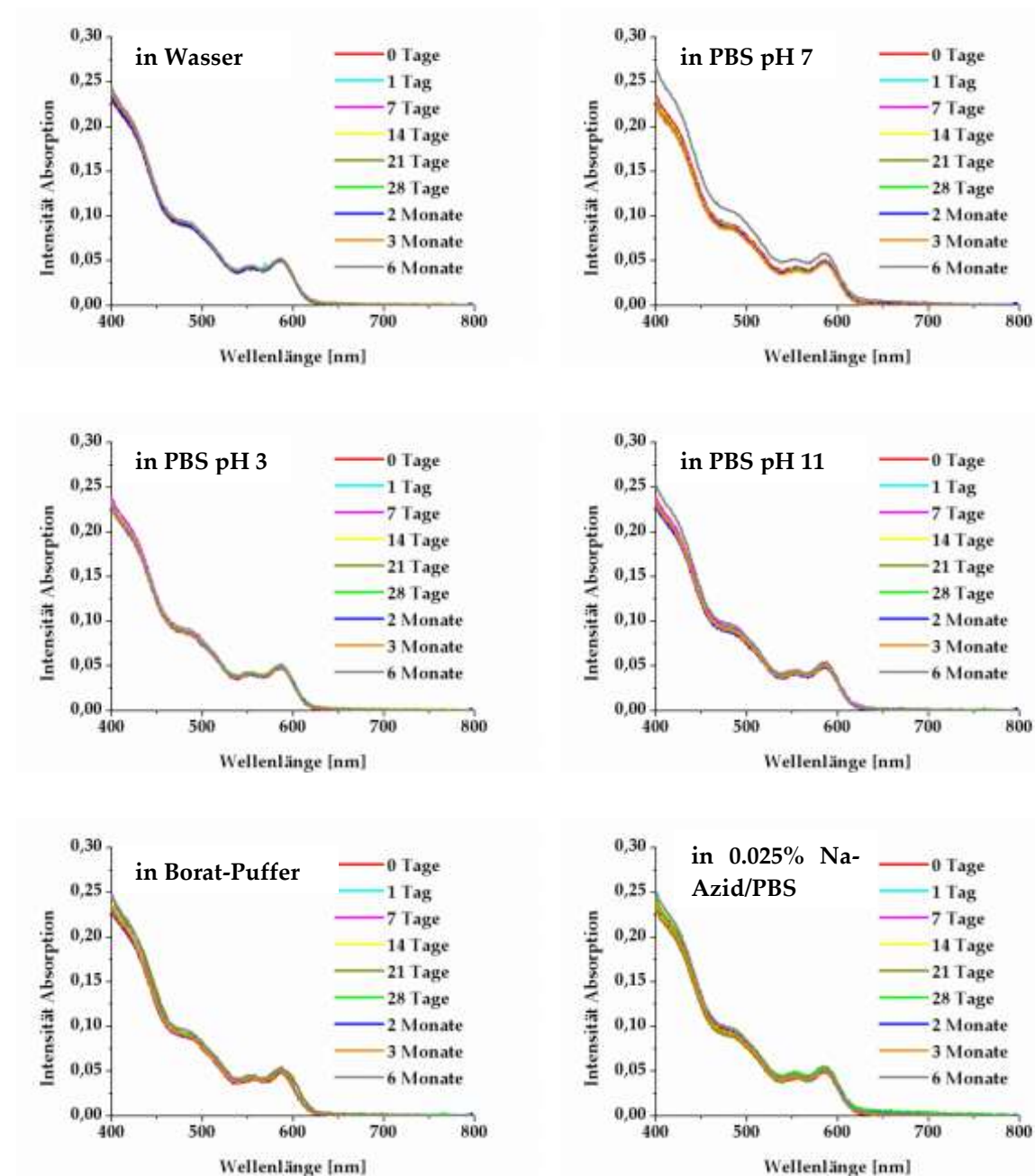


Abbildung 64: Absorptionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Nanopartikel (e) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

4.6.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche

Die Studien des Partikelsystems **e** in den Zellmedien zeigten ebenfalls über den gesamten Zeitraum von einer Woche eine kontinuierliche Stabilität (Abb. 65). Die Quantenausbeuten betrugen $23\% \pm 2\%$.

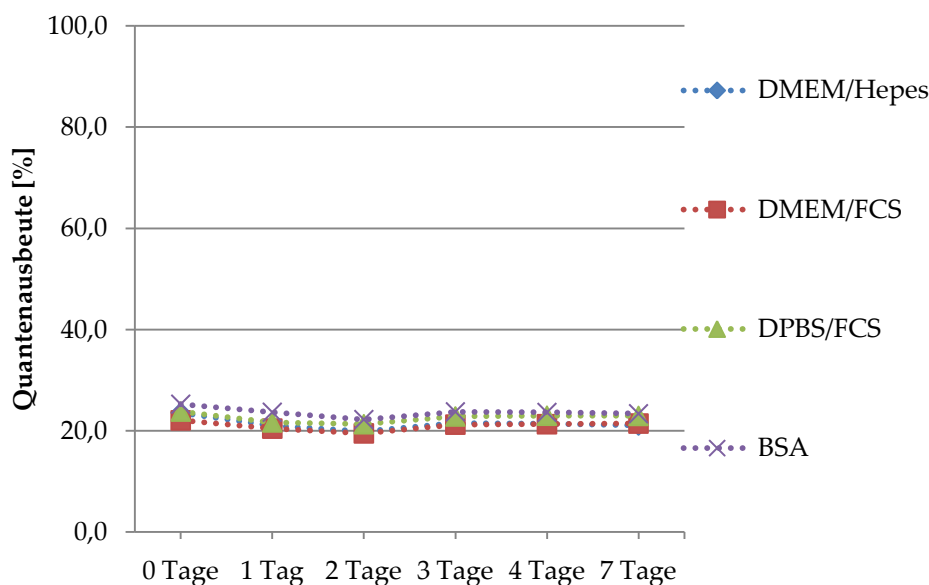


Abbildung 65: Schematische Darstellung der Quantenausbeute von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH in DMEM + 10% HEPES, DMEM + 10% FCS, DPBS + 10%FCS und 1% BSA über einen Zeitraum von einer Woche

Die Absorptionsspektren zeigten allerdings in den FCS-haltigen Medien DMEM und PBS starke Auffälligkeiten (Abb. 66).

Mit der Zeit kam es zu einem negativen Verlauf der Absorptionskurve. Zusätzlich wurde bei einer Wellenlänge von 430 nm ein weiteres Signal sichtbar. Diese Auffälligkeiten wurden eventuell durch den hohen Proteinanteil im FCS verursacht. Ansonsten kam es zu keiner Aggregatbildung der Partikel.

Die aufgenommenen Emissionsspektren zeigten ebenfalls eine entsprechende Konstanz ohne Abweichungen. Dies spiegelte die Ergebnisse der zuvor untersuchten Quantenausbeuten wider.

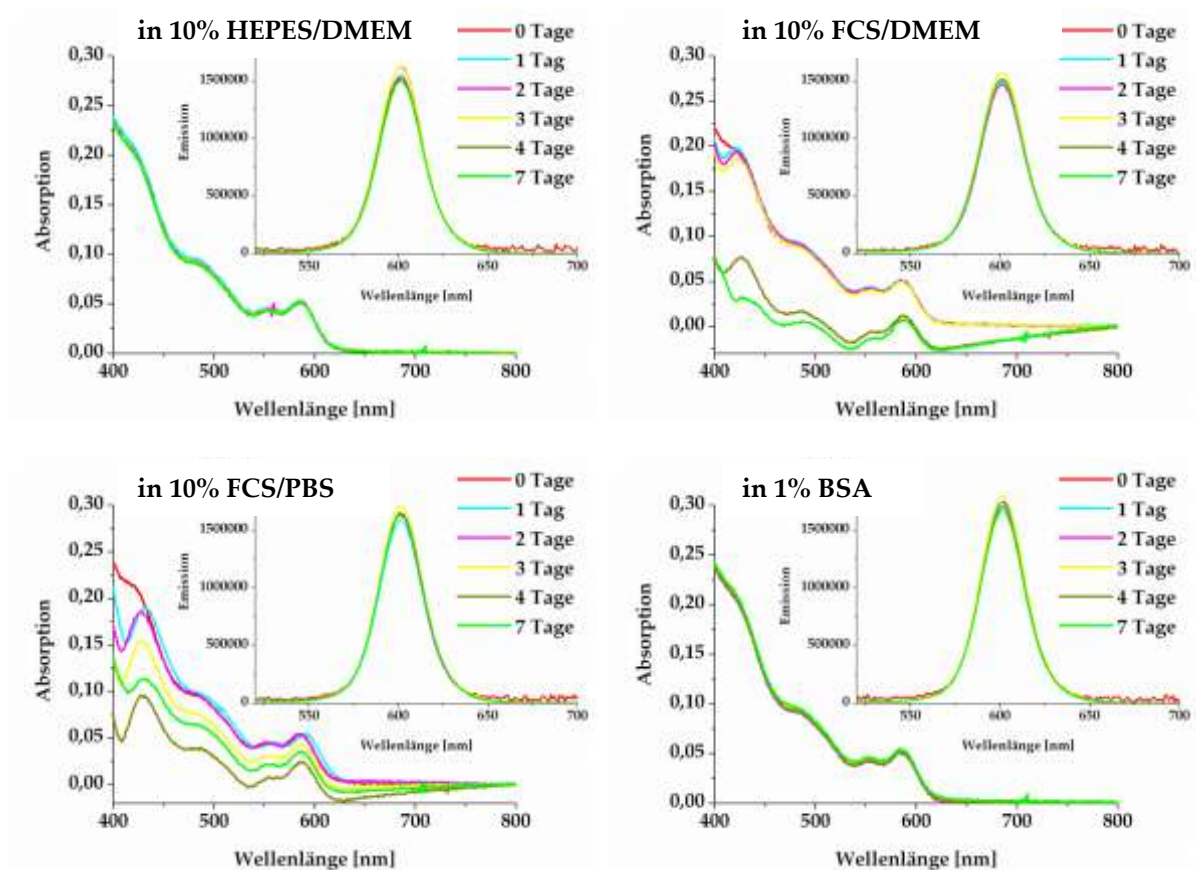


Abbildung 66: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Nanopartikel (e) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

4.6.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden

Bei den Kurzzeitstabilitätsmessungen in Glutaral und Triton X-100 waren keine Änderungen hinsichtlich der Quantenausbeute von 27% über 24 Stunden zu verzeichnen. EDTA und Wasserstoffperoxid destabilisierten die Nanopartikel. Während in EDTA die Lumineszenz von 21% auf 12% mit der Zeit kontinuierlich abnahm, wurden die Partikel durch den Einfluss der Radikale des Wasserstoffperoxids bereits nach einer Stunde zerstört und hatte eine vollständige Löschung der Fluoreszenz zur Folge (Abb. 67).

Die dazu aufgenommenen Absorptions- und Emissionsspektren bestätigten die beobachteten Ergebnisse hinsichtlich der Stabilität (Abb. 68). Nur im Wasserstoffperoxid waren Veränderungen in den Absorptionsverläufen über den gesamten Zeitraum erkennbar. Nach 24 Stunden konnten keine partikeltypischen Absorptionsbanden mehr detektiert werden. In den anderen Medien blieb der Kurvenverlauf der Absorptionsspektren über die Zeit konstant.

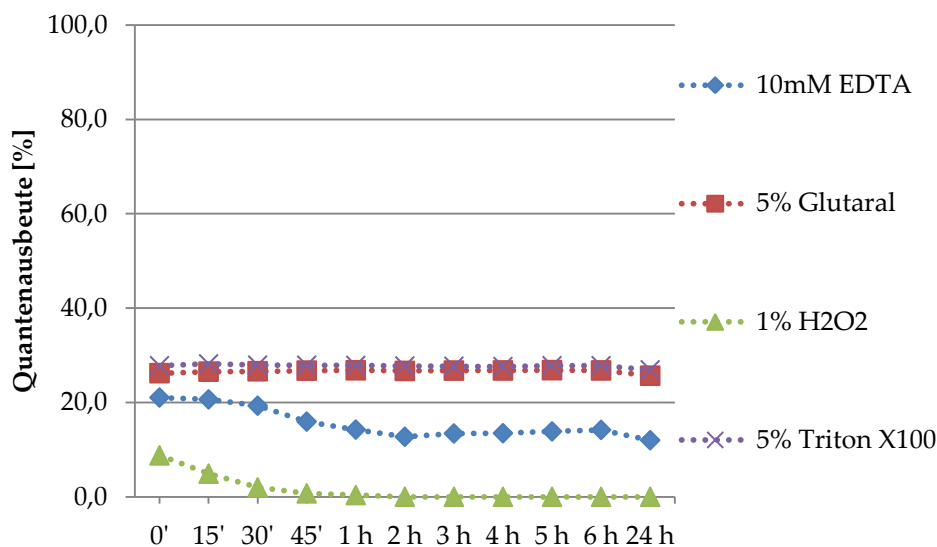


Abbildung 67: Schematische Darstellung der Quantenausbeute von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100 über einen Zeitraum von 24 Stunden

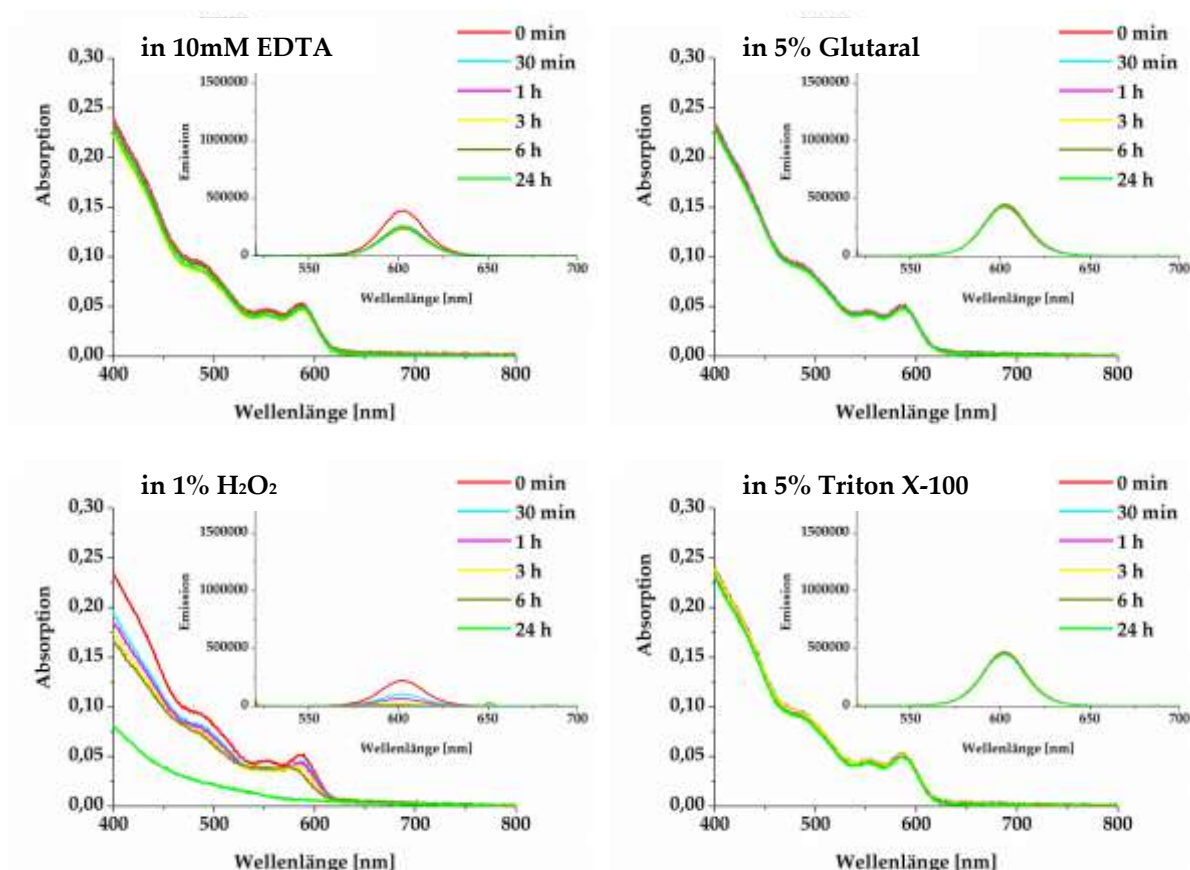


Abbildung 68: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Nanopartikel (e) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

4.6.4 Dynamische Lichtstreuung

Da dieses Partikelsystem aufgrund des Thiolliganden keiner Mizellenbildung unterlag, waren die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser wesentlich kleiner als bei den zuvor untersuchten Partikelsystemen. Diese betrugen im Schnitt 10 nm bis 14 nm (Abb. 69).

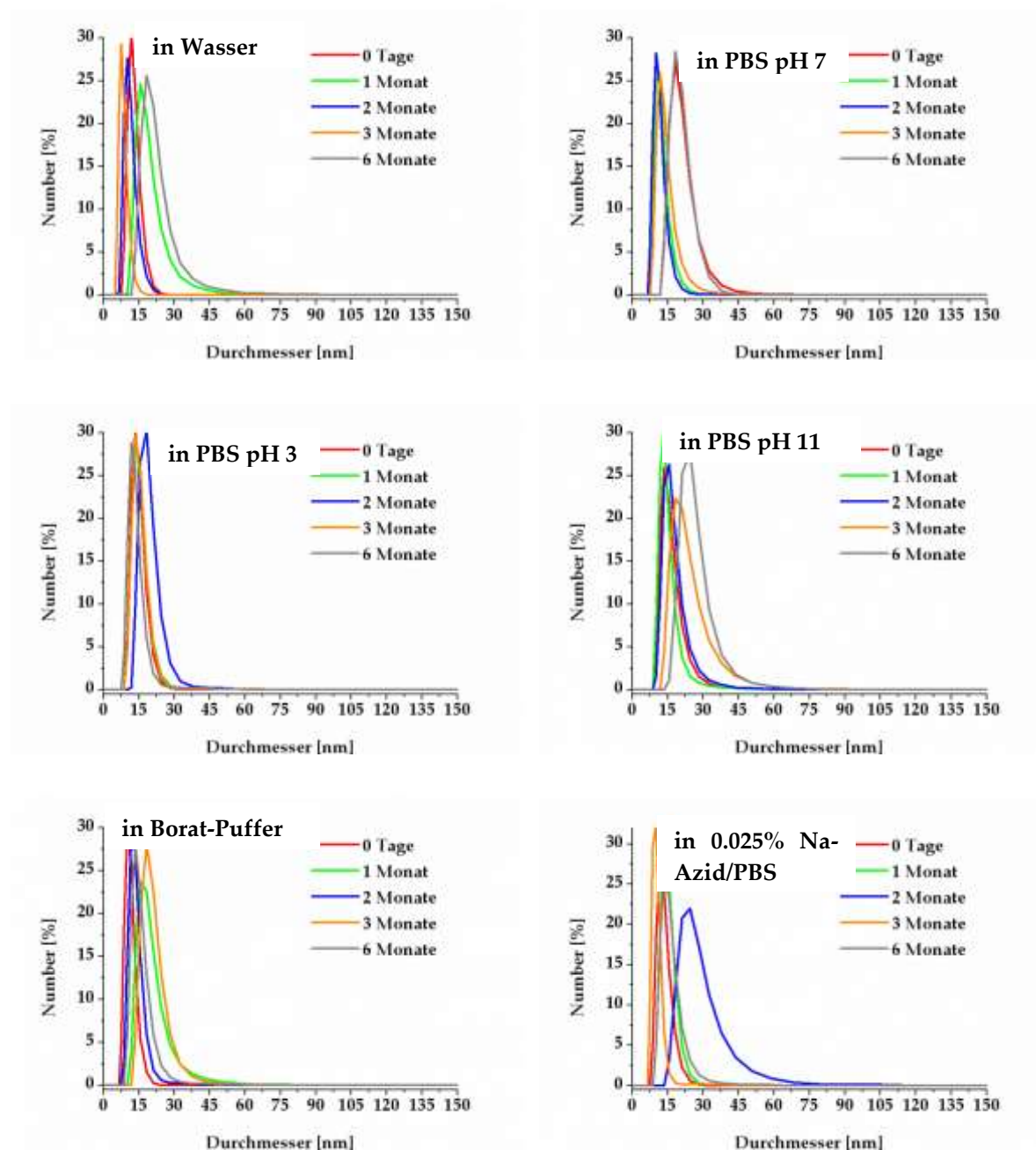


Abbildung 69: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Nanopartikel (e) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

Es kam über die Zeit immer wieder zu geringen Verschiebungen der Kurven, die scheinbar durch das bestehende Gleichgewicht von gebundenen und abgehenden Thiol-Liganden in Lösung verursacht wurde. Es war auch möglich, dass freie Liganden detektiert wurden und so die Größenverteilungen beeinflussten. Die HWB sind mit 7 nm bis 9 nm schmal und über den gesamten Zeitraum konstant.

Die Messungen der hydrodynamischen Durchmesser in den Zellmedien konnten nur in DMEM mit HEPES detektiert und ausgewertet werden. Diese betrugen im Durchschnitt 18 nm mit einer HWB von 9 nm.

In den FCS-haltigen Medien sowie im BSA-Puffer waren keine Partikelgrößen bestimmbar. Hier wurden die Signale der Proteine des jeweiligen Zellmediums bei 6 nm bzw. 7 nm detektiert (Abb. 70).

Derartige Artefakte könnten eventuell durch entsprechende Verdünnung der Lösungen behoben werden. Für den Fall der hier untersuchten Partikel und ihrer Vergleichbarkeit mit den anderen Teilchensystemen konnte die Konzentration jedoch nicht weiter verringert werden.

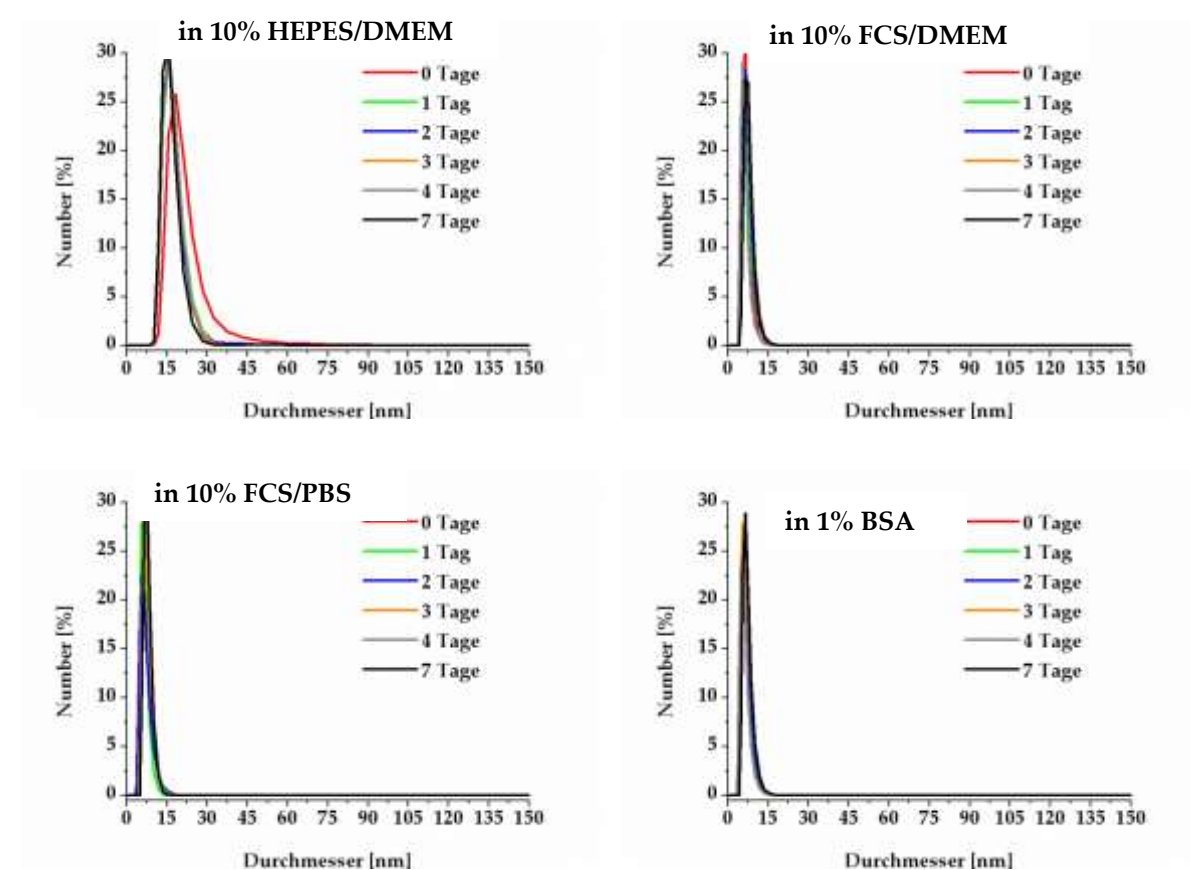


Abbildung 70: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (e) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

Das Partikelsystem **e** zeigte besonders in EDTA, Glutaral und Wasserstoffperoxid enorme Veränderungen in der Größe der Teilchen sowie in den HWB (Abb. 71).

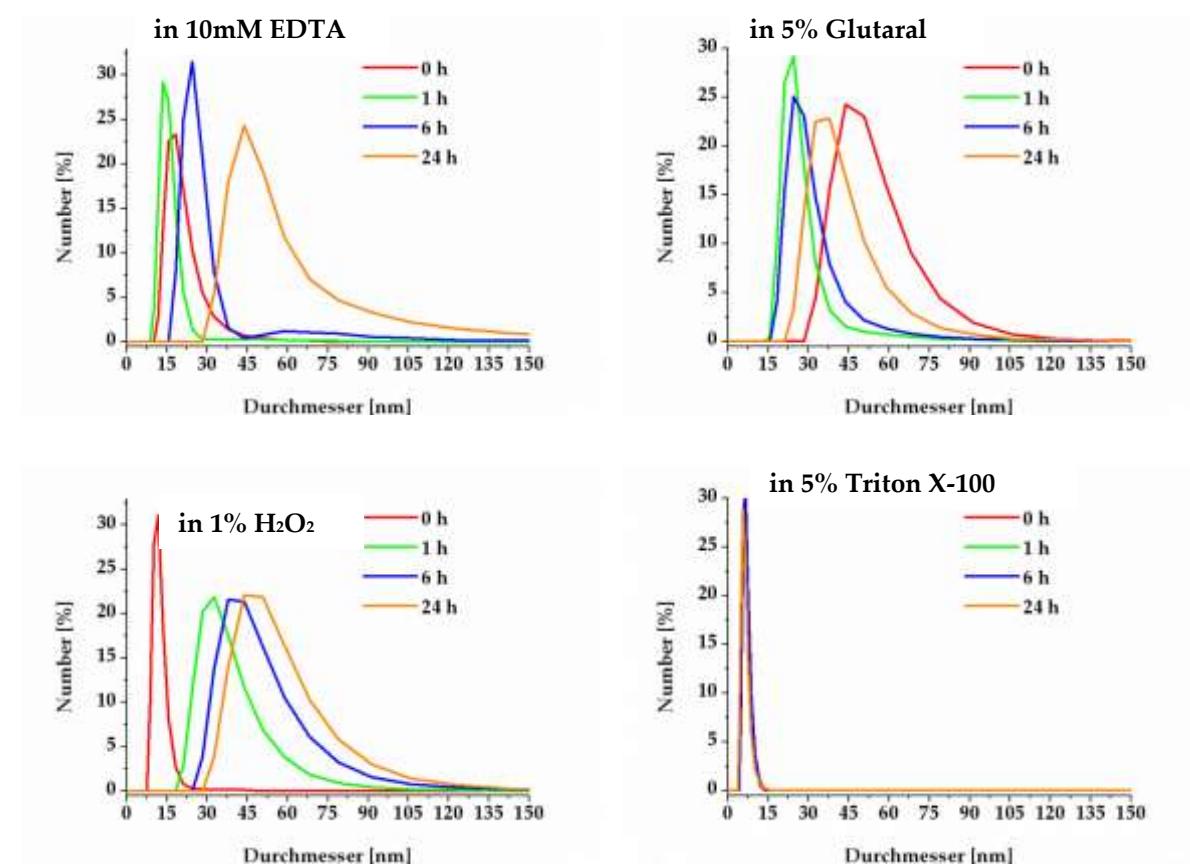


Abbildung 71: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Polystyrol-Nanopartikel (**e**) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

Die Lagerung in Wasserstoffperoxid führte anfänglich zur Bildung von Aggregaten. Zum Ende der Untersuchung waren unter diesen Bedingungen keine Partikel mehr vorhanden und konnten weder in der Absorption noch mittels DLS gemessen werden. Der hydrodynamische Durchmesser veränderte sich von 12 nm zu Beginn auf 44 nm nach 24 Stunden. Die messbaren großen Aggregate könnten eventuelle von freischwimmenden Polymeren in Lösung herrühren. Ebenso vergrößert sich die HWB mit der Zeit von 5 nm auf 31 nm.

In EDTA wurden in den ersten sechs Stunden geringe Verschiebungen der Partikelgröße von 13 nm bis 23 nm sichtbar. Nach einem Tag veränderte sich der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser auf 44 nm scheinbar unter Komplexierung des Salzes an der Ligandenoberfläche der Partikel. Die HWB entsprachen den gemessenen Werten aus den Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid.

Die Messungen in Glutaral wiesen bereits zu Beginn hydrodynamische Durchmesser von 44 nm. Nach einem Zeitraum von 24 Stunden waren die Teilchen 38 nm groß.

Diese Messungen korrelierten mit keinen der bisher aufgenommenen Werte der Partikelgröße. In diesem Fall sollten Wiederholungsstudien folgen, um etwaige Fehler zu korrigieren.

In Triton X-100 waren nur die Signale der Messlösung bei 7 nm detektierbar. Es konnten keine partikelspezifischen Angaben unter diesen Bedingungen gemacht werden.

4.6.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C

Die Partikel wurden bei -20 °C und bei 120 °C gelagert und hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht.

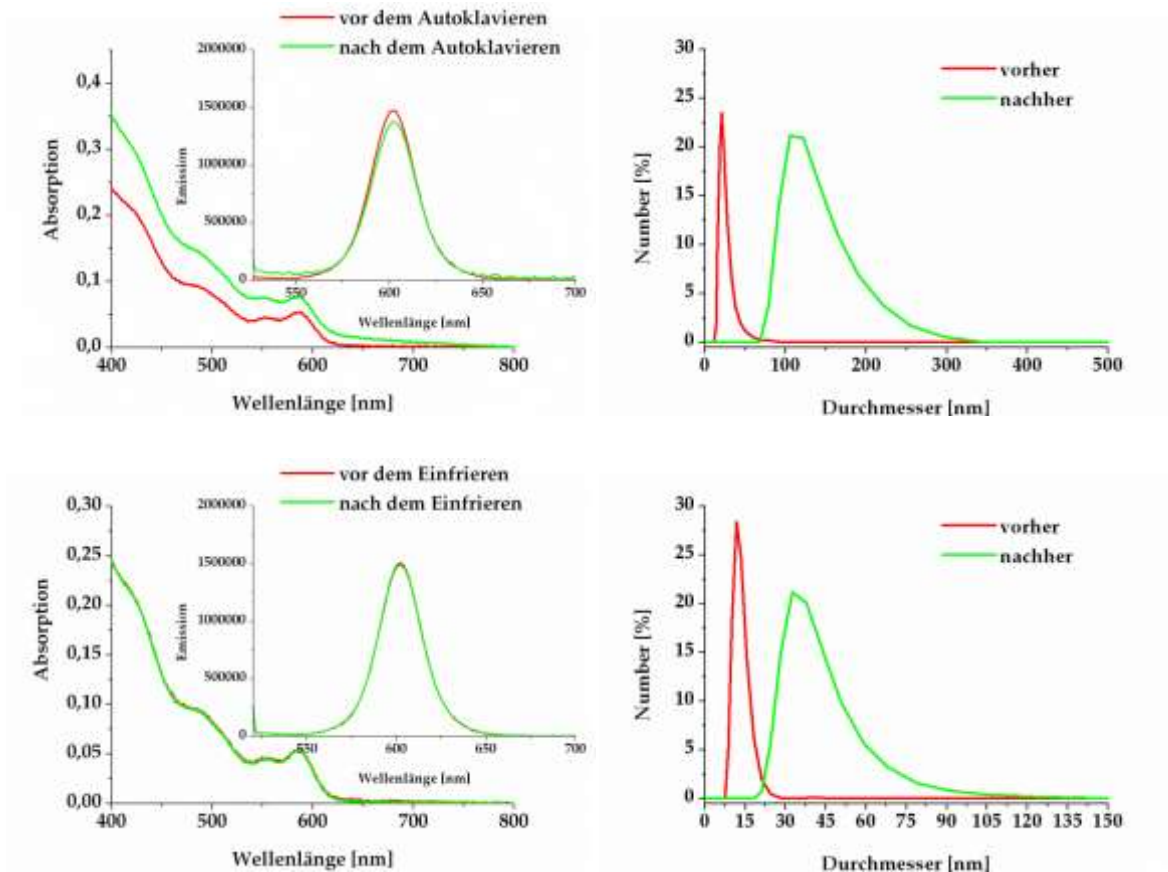


Abbildung 72: Graphische Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren (linke Bilder) sowie die hydrodynamischen Durchmesser (rechte Bilder) der CdSe/CdS/ZnS(SH)₃-PEO-OH-Nanopartikel (e) nach dem Autoklavieren (oben) und nach Einlagerung bei -20 °C (unten) in Wasser.

Beim Autoklavieren aggregierten die Nanoteilchen, was dem hohen Streuuntergrund im aufgenommenen Absorptionsspektrum zu entnehmen ist. Der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser betrug vor der Lagerung 21 nm und vergrößerte sich schließlich zu 113 nm. Ebenso veränderten sich die HWB von 21 nm zu 81 nm. Die Fluoreszenz und somit die Quantenausbeute erfuhr keine Veränderung und ist nahezu stabil bei 25%.

Die Teilchen waren unter den gegebenen Bedingungen hinsichtlich ihrer Lumineszenz stabil, wiesen allerdings große Aggregate auf. Diese könnten eventuell freie Liganden in Lösung darstellen.

Nach Lagerung des Partikel-Liganden-Systems bei -20 °C waren weder in der Absorption noch in der Emission Veränderungen zu verzeichnen. Die Quantenausbeute blieb stabil mit 26%. Allerdings kam es zu einer Vergrößerung des durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmessers von 12 nm auf 33 nm sowie der HWB von 6 nm auf 24 nm (Abb. 72).

Fazit:

Trotz vereinzelter Schwankungen, besonders in den hydrodynamischen Durchmessern, zeigte dieses Partikelsystem in vielen Medien eine stetige Konstanz. Dies war auf die hervorragende Stabilität durch eine ausgeprägte Chelatisierung der vorhandenen Thiolgruppen zurückzuführen. Dabei sollte beachtet werden, dass mit zunehmender Verdünnung ein entsprechender destabilisierender Effekt auf Grund abgehender Liganden von der Oberfläche eintritt.

Instabilitäten zeigten sich in den FCS-haltigen Medien (DMEM und PBS) sowie in Wasserstoffperoxid. Die teilweise starken Veränderungen der HWB konnten zum einen auf eventuelle Salzeffekte der verwendeten Lösungen zurück zu führen sein (Komplexbildungsreaktionen mit EDTA), zum anderen bestand bei diesem Ligandensystem ein Gleichgewicht von gebundenen und freien Liganden auf der Nanopartikeloberfläche in Lösung. Dieses Gleichgewicht konnte vermutlich zusätzlich von den Bestandteilen der untersuchten Medien beeinflusst sein. Entsprechend durchdrangen wahrscheinlich Salze oder Protonen sowie Radikale die Ligandenhülle der Nanoteilchen und beeinträchtigten so die Stabilitätseigenschaften.

4.7 CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von Ocean Nano Tech (Partikelsystem f)

4.7.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Das folgende Partikelsystem **f** wurde von der Firma *Ocean Nano Tech* kommerziell erworben. Dies sollte vergleichsweise zu den zuvor beschriebenen Teilchensystemen von der *CAN GmbH* sowie aus dem Arbeitskreis von Prof. Horst Weller der Universität Hamburg denselben Stabilitätsstudien unterzogen werden.

Bei diesen Nanoteilchen handelte es sich laut Datenblatt um sphärische CdSe/ZnS-QDs, die mit einer nicht weiter definierten aminfunktionalisierten PEG-Hülle versehen waren.

In den Langzeitmedien waren diese Partikel bis auf im sauren PBS über den gesamten Zeitraum von sechs Monaten nahezu stabil.

Sie besaßen in Wasser, im alkalischen PBS und im Borat-Puffer eine Anfangsquantenausbeute von 30%, im neutralen PBS und im Azid-Puffer waren es 25% bzw. 23%. Nach einem halben Jahr konnten noch 87% bis 96% der Fluoreszenz gemessen werden.

Im alkalischen Milieu war sogar in den ersten drei Monaten eine zunehmende Quantenausbeute zu verzeichnen. Grund hierfür könnten die vorhandenen Hydroxid-Ionen sein, die eventuell die Liganden-Oberfläche der Teilchen zusätzlich stabilisierten.

Unter sauren Bedingungen kam es bereits zu Beginn der Messung zu einem erheblichen Verlust der Quantenausbeute (etwa 2/3). Schließlich waren über die gesamte Zeit nur 4% messbar (Abb. 73).

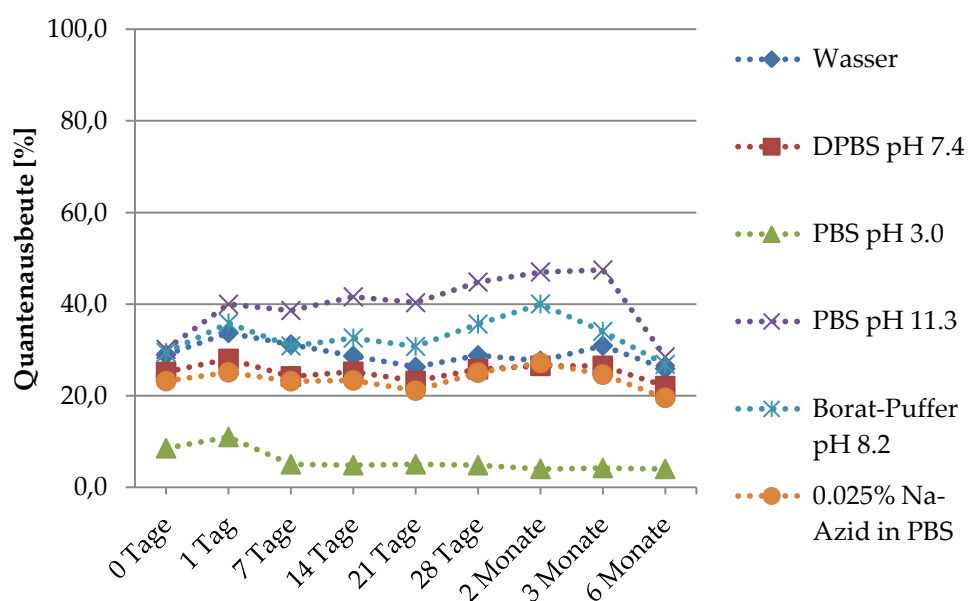


Abbildung 73: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/ZnS-PEO-NH₂ (*Ocean Nano Tech*) in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

Die Absorptionsspektren der Kern/Schale-Partikel wiesen keine Instabilitäten der Partikel auf. Es waren über die Zeit konstant bleibende Kurvenverläufe zu verzeichnen (Abb. 74).

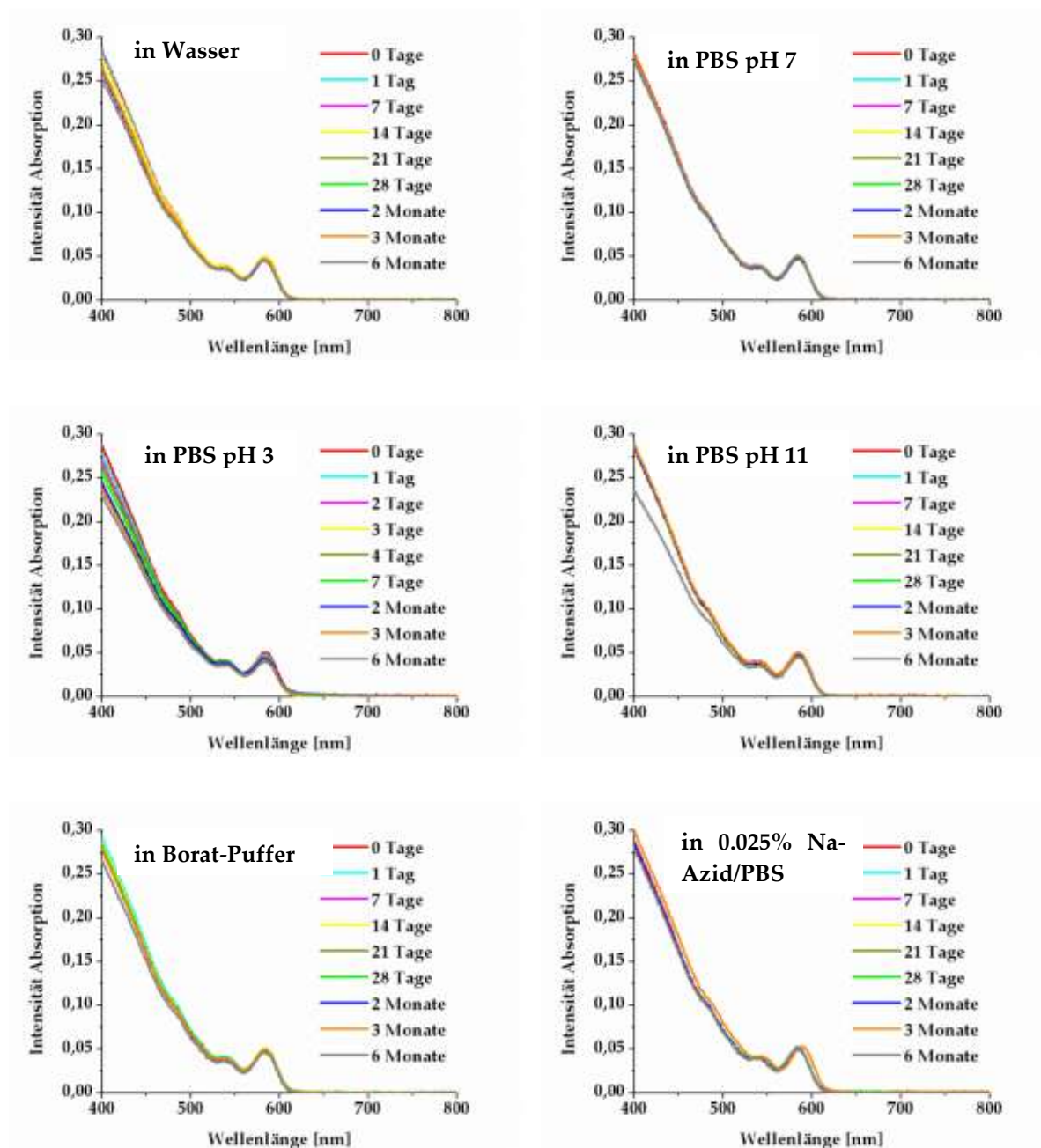


Abbildung 74: Absorptionsspektren der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel von *Ocean Nano Tech* (f) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

4.7.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche

Die Zellmedien DMEM mit HEPES und FCS sowie DPBS mit FCS wirkten destabilisierend auf das Partikelsystem f ein (Abb. 75).

In allen drei Medien verringerte sich die Lumineszenz von anfänglich 29% auf 16% in DMEM + HEPES, 13% DPBS + FCS und sogar 6% in DMEM mit FCS.

Im BSA-haltigen Puffer trat jedoch eine stabilisierende Wirkung der Partikel ein. Die Quantenausbeute stieg folglich von 29% auf 40%.

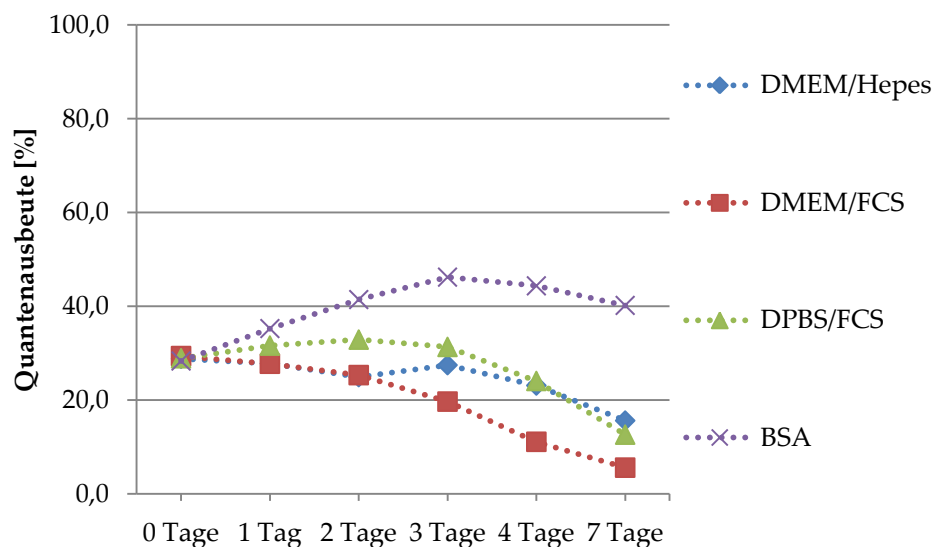


Abbildung 75: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von *Ocean Nano Tech* in DMEM + 10% HEPES, DMEM + 10% FCS, DPBS + 10%FCS und 1% BSA über einen Zeitraum von einer Woche

Allerdings zeigten die nachfolgenden Absorptionsspektren in BSA und auch in DMEM mit HEPES nach sieben Tage einen ausgeprägten Streuuntergrund.

Im FCS-haltigen Phosphatpuffer war die Absorptionskurve nach einer Woche zu negativen optischen Dichten verschoben. Da der Kurvenverlauf allerdings identisch mit den vorherigen Messungen war, entstand dieser Effekt scheinbar durch das für die Referenzmessung benötigte Medium ohne Partikel. Dies wies in diesem Zeitrahmen eine Trübung, eventuell hervorgerufen durch Proteinanteil dieser Pufferlösung, auf.

Die Emissionsspektren zeigten in den untersuchten Medien, mit Ausnahme der BSA-Lösung, die kontinuierliche Abnahme der Intensitäten und korrelierten so mit den Werten der zuvor erwähnten Quantenausbeuten (Abb. 76).

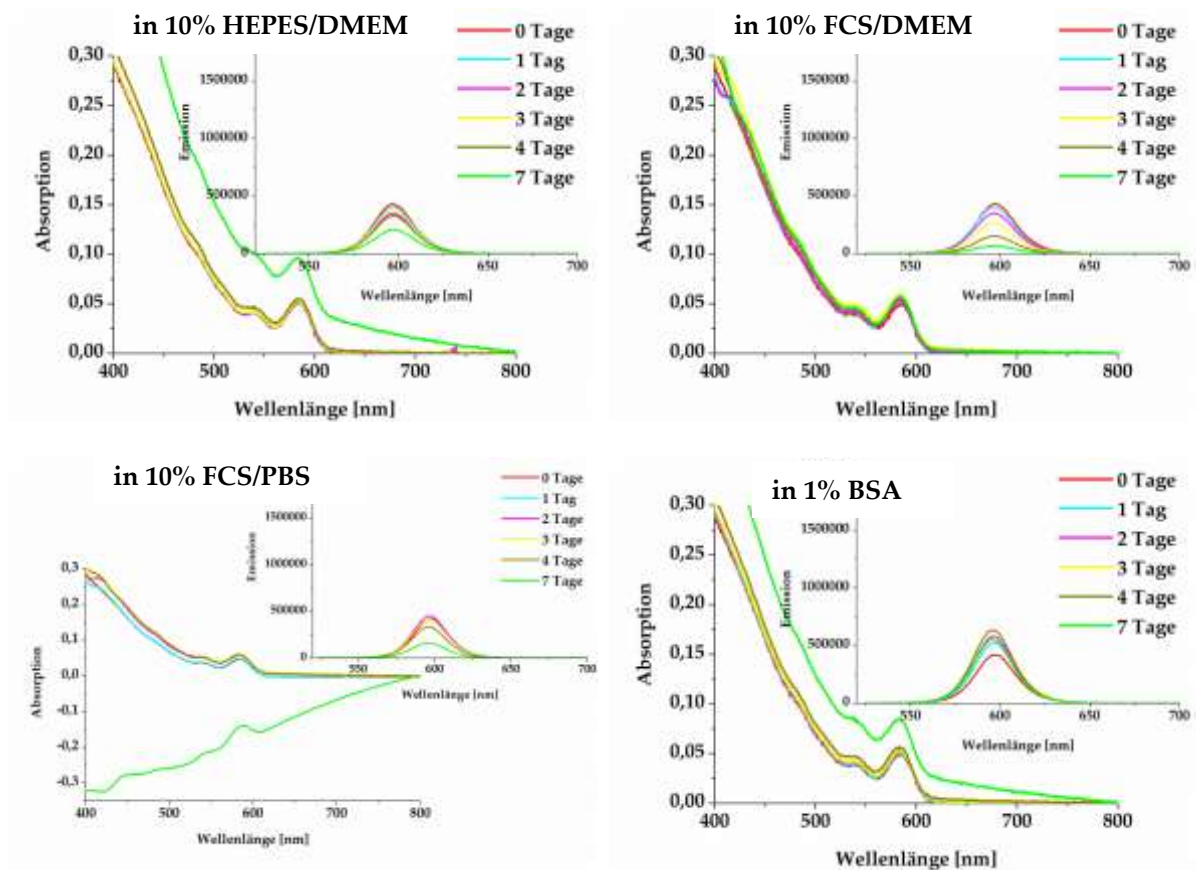


Abbildung 76: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel von Ocean Nano Tech (f) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

4.7.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden

Die 24-Stunden-Stabilitätsmessung zeigten in Triton X-100 und Glutaral recht konstant bleibende Quantenausbeuten. Diese lagen um die 33% bis 25%.

In EDTA kam es sofort zum Verlust der Lumineszenz um 50% und nahm sogar bis auf 8% bis zum Ende der Untersuchung ab. Dies deutete auf einen hohen destabilisierenden Einfluss durch eventuelle Komplexbildungsreaktionen des EDTA-Salzes mit der Ligandenoberfläche der Partikel hin.

Wurden die Partikel einer 1%igen Wasserstoffperoxid-Lösung ausgesetzt, zeigten diese, wie auch schon alle anderen Partikelsysteme zuvor, eine durch die Radikale hervorgerufene Zerstörung der Partikel und folglich die Fluoreszenzlöschung bereits nach einer knappen Stunde (Abb. 77).

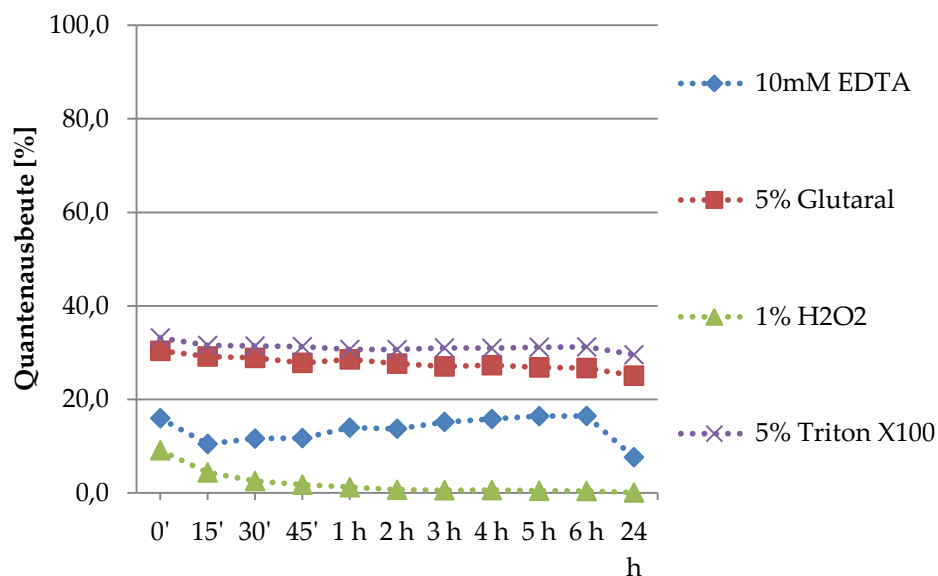


Abbildung 77: Schematische Darstellung der Quantenausbeuten von CdSe/ZnS-PEO-NH₂ (*Ocean Nano Tech*) in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100 über einen Zeitraum von 24 Stunden

Die konstant verlaufenden Absorptionskurven der Partikel in EDTA, Glutaral und Triton X-100 zeigten die entsprechende Stabilität in diesen Lösungen. Es waren keine Steuartefakte oder Löschungen der Partikel zu erkennen.

Anders verhielten sich die QDs in der Wasserstoffperoxid-Lösung. Bereits nach nur 30 Minuten ist hier eine Auflösung der Partikel ersichtlich. Die Emissionsspektren bestätigen die gemessenen Quantenausbeuten und stellen die entsprechenden Veränderungen über die Zeit dar. Auch dieses Partikelsystem wird schließlich vollständig gelöscht und zeigt keine Lumineszenz mehr (Abb. 78).

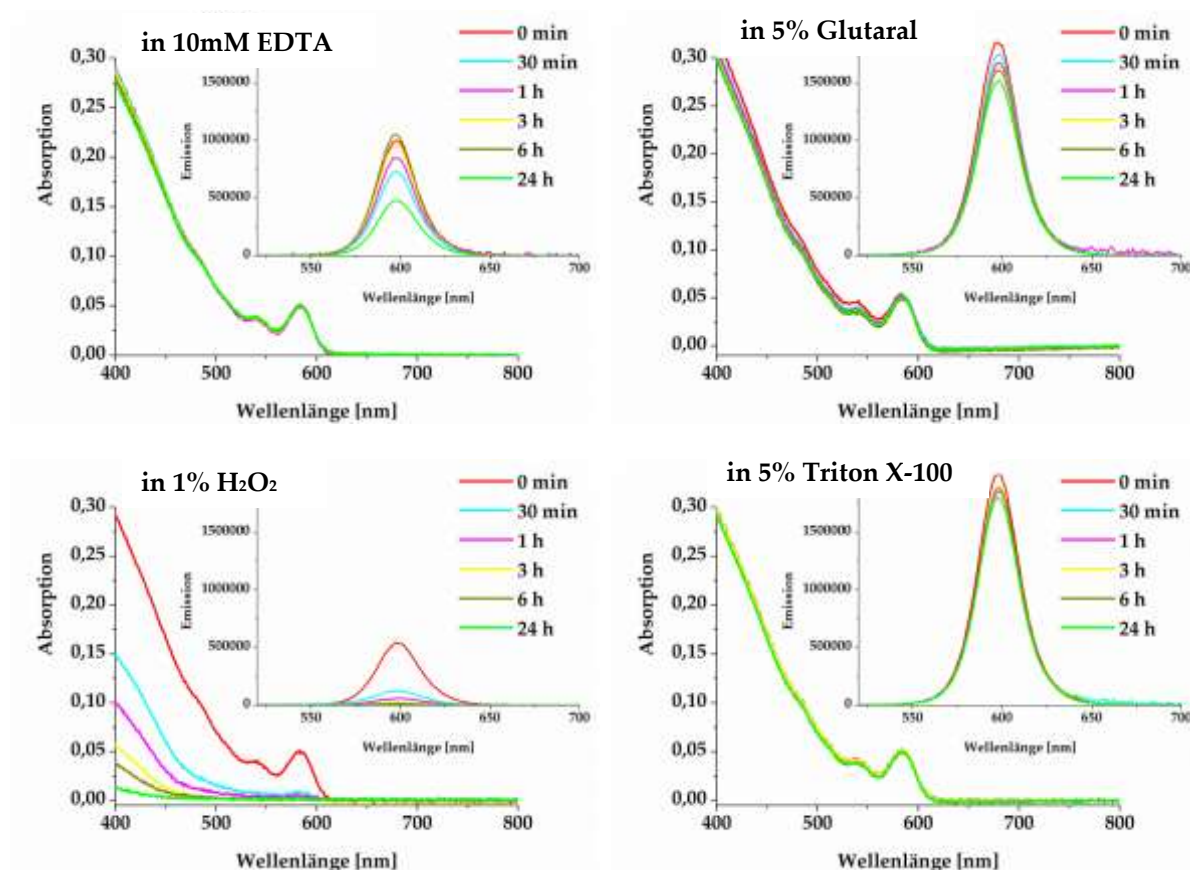


Abbildung 78: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel von *Ocean Nano Tech* (f) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden.

4.7.4 Dynamische Lichtstreuung

Die hydrodynamischen Durchmesser der *Ocean Nano Tech*-Teilchen blieben in den Langzeitmedien über den gesamten Zeitraum konstant bei 14 nm bis 16 nm (Abb. 79). Ebenso konstant waren die HWB und mit 7 nm sehr schmal. Dies deutete auf ein nicht mizellen-bildendes Ligandensystem hin, sondern ähnelte dem Partikelsystem e, welches mit dem Thiol-PEO-Liganden versehen war. Das für diese CdSe/ZnS-Teilchen verwendete aminfunktionalisierte PEG war vermutlich von geringer Größe, etwa bis 1000 g/mol. Dies war allerdings nicht aus den Datenblättern der Firma ersichtlich.

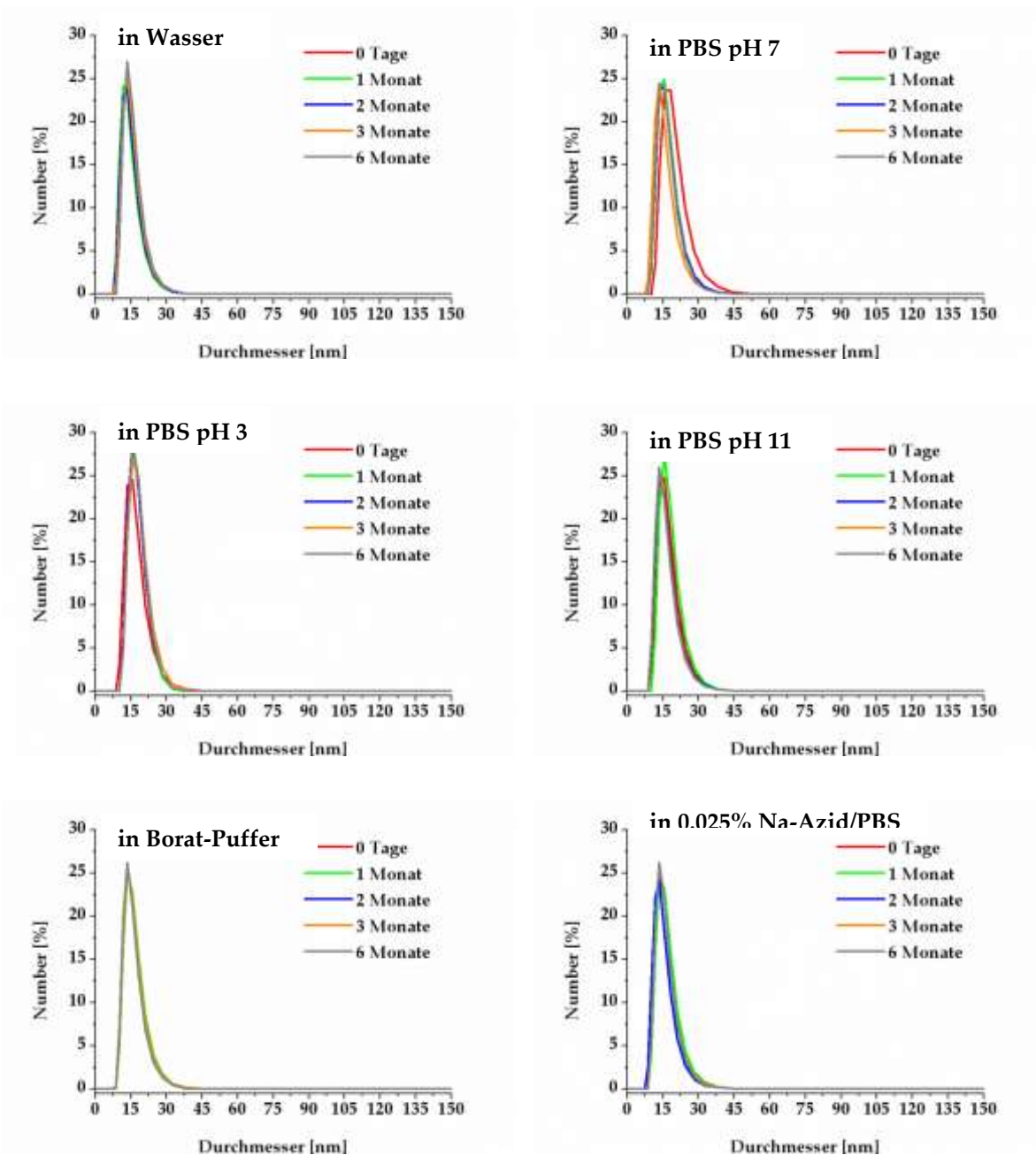


Abbildung 79: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel von Ocean Nano Tech (f) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

In der Untersuchungsreihe der Zellmedien waren nur in DMEM mit 10% HEPES Werte für den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel messbar. Diese variierten zwischen 16 nm und 21 nm. Die Messungen der Partikel in den übrigen Zellmedien wiesen nur die Signale der in den Lösungen enthaltenen Proteine auf (Abb. 80).

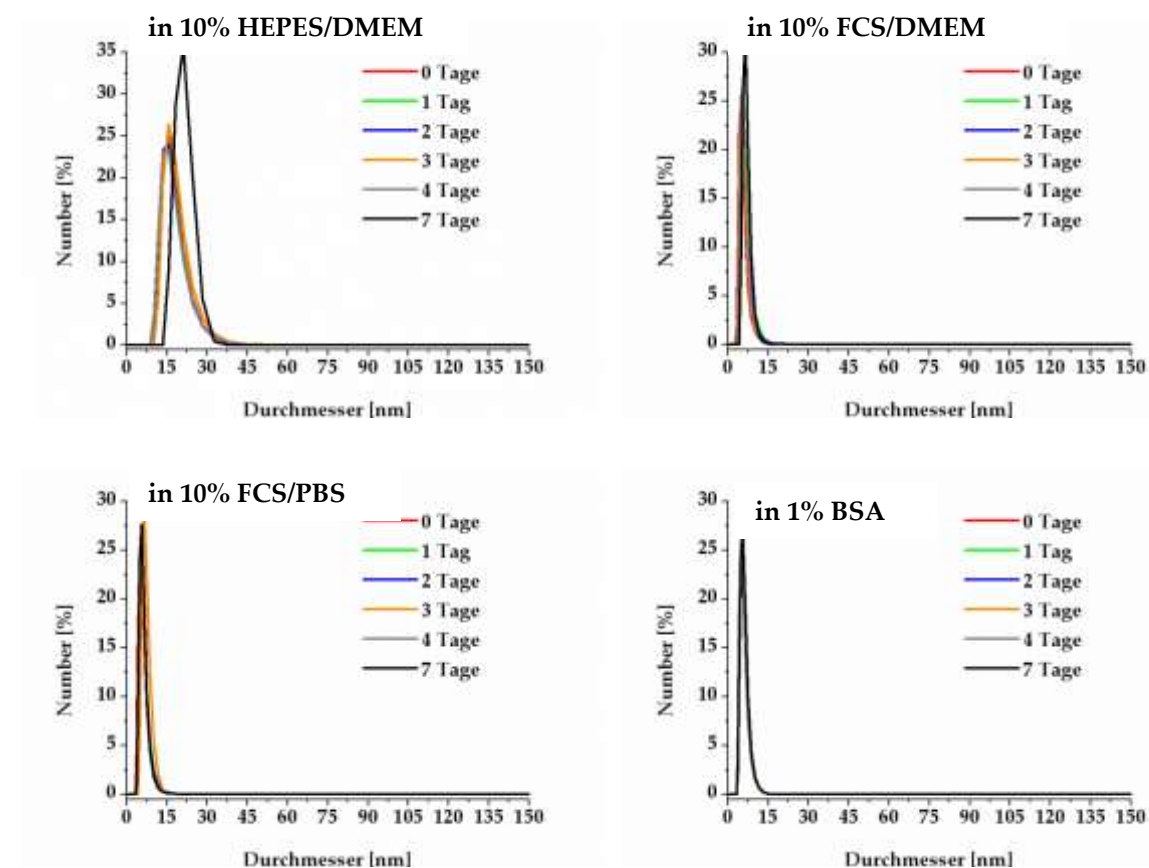


Abbildung 80: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel von Ocean Nano Tech (f) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

Die Partikelgröße in EDTA, Glutaral und Wasserstoffperoxid sind über den gesamten Zeitraum konstant die 15 nm. Selbst die Fluoreszenz-Löschung der Partikel in 1%iger Wasserstoffperoxid-Lösung hat keinen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser. Es gibt keine Hinweise auf Aggregationen der Teilchen. In Triton X-100 sind keine Nanopartikel messbar gewesen, sondern nur die stärker streuenden Bestandteile der in der Lösung befindlichen Inhaltsstoffe (Abb. 82).

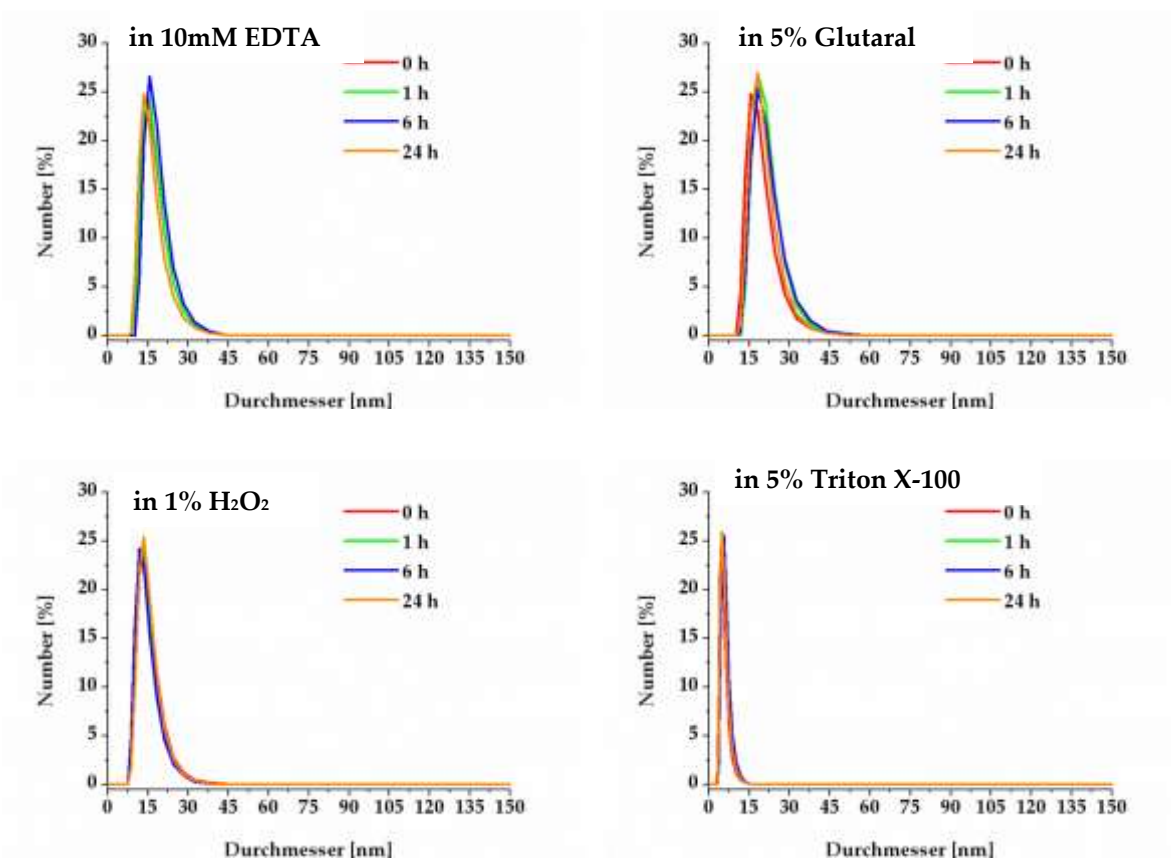


Abbildung 81: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel von Ocean Nano Tech (f) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden

4.7.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C

Die Ergebnisse zur Lagerung des Partikelsystems f bei -20 °C und 120 °C waren nahezu identisch mit denen vom Partikelsystem e, CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH (siehe Kapitel 4.6.5; Abb. 82).

Die Quantenausbeuten änderten sich bei -20 °C nicht und blieben bei 32% konstant. Auch die Absorptionskurve und die Partikelgröße blieben nach dem Einfrieren unverändert.

Beim Autoklavieren hingegen entstanden größere Aggregate bei durchschnittlich 122 nm. Hier war im Absorptionsspektrum ein hoher Streuuntergrund bei der gemessenen Kurve zu verzeichnen. Die Partikelgrößen veränderten sich von 14 nm zu 121 nm, ebenso vergrößert sich die HWB von 8 nm zu 90 nm. Trotz konstanter Fluoreszenz wurde durch die Lagerung bei hohen Temperaturen das Partikel-Liganden-System destabilisiert.

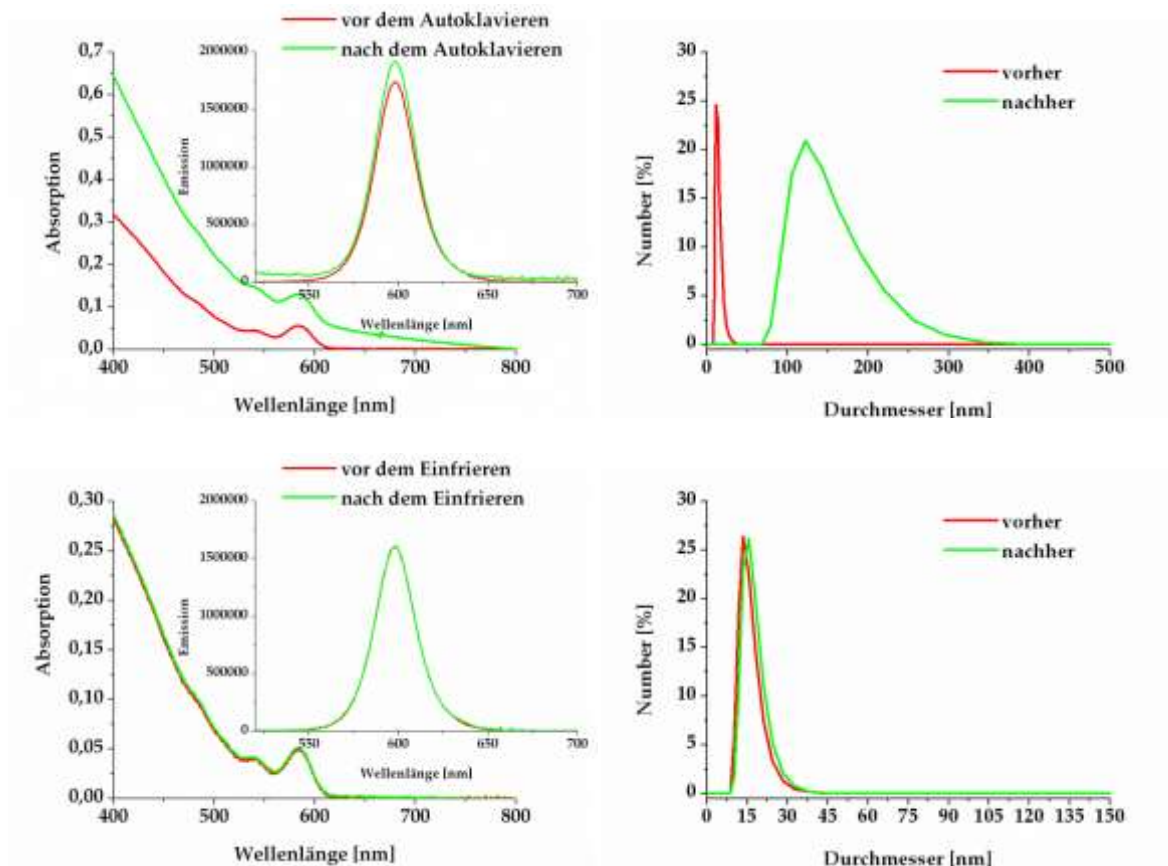


Abbildung 82: Graphische Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren (linke Bilder) sowie die hydrodynamischen Durchmesser (rechte Bilder) der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*Ocean Nano Tech*) (f) nach dem Autoklavieren (oben) und nach Einlagerung bei -20 °C (unten) in Wasser

Fazit:

Dieses Partikelsystem ähnelt dem mit den mehrzähligen Thiolliganden (siehe Kapitel 4.6) hinsichtlich der Stabilitätsergebnisse. Es wies noch höhere Quantenausbeuten (um 5% mehr) und konstantere HWB in den Medien auf.

4.8 CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von *life technologies*TM (Partikelsystem g)

4.8.1 Langzeitstabilität über 6 Monate

Ein zweites kommerzielles Partikelsystem, welches vergleichend zu den vorherigen Nanoteilchen untersucht wurde, war von der Firma *life technologies*TM. Auch hier handelte es sich um CdSe/ZnS-Partikel mit einem Amino-PEO-Liganden.

Diese zeigten in fast allen Langzeitmedien eine konstante Stabilität hinsichtlich der Quantenausbeute bei 49% über sechs Monate (Abb. 83).

Allerdings wirkten hier die Protonen aus dem PBS mit pH 3 destabilisierend auf das Partikel-Liganden-System. Bereits zu Beginn der Messung war die Quantenausbeute bei 44% und erreichte nach einem halben Jahr nur noch 20%. Dies sind noch gute akzeptable Werte für die Fluoreszenzeigenschaften im Vergleich zu den vorherigen untersuchten Partikel-Systemen.

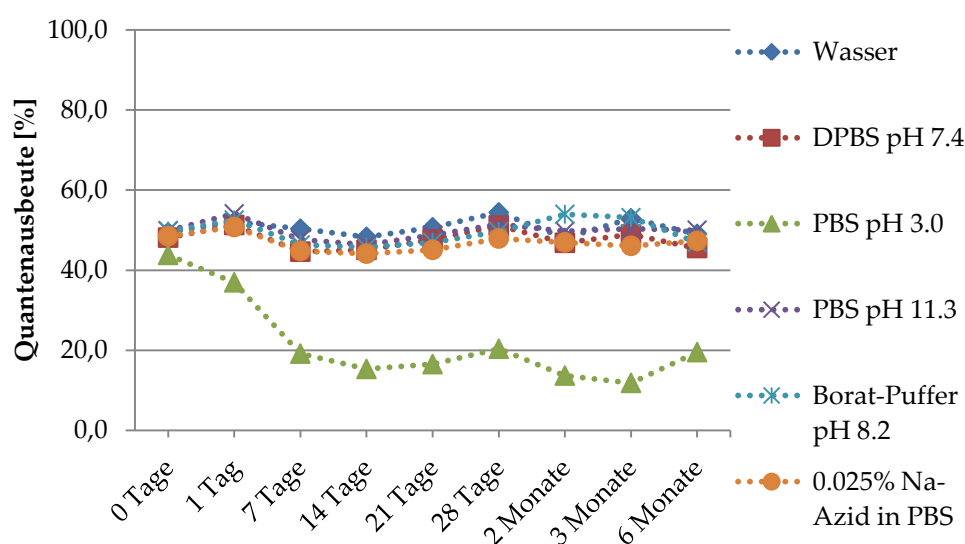


Abbildung 83: Schematische Darstellung der Quantenausbeute von CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von *life technologies*TM in Wasser, DPBS (pH 7), PBS (pH 3 und 11), Borat-Puffer und Natriumazid in PBS über einen Zeitraum von sechs Monaten

Die Absorptionsspektren dieses Nanopartikel-Ligandensystems zeigten über den gesamten Zeitraum von sechs Monaten konstante Kurvenverläufe (Abb. 84). Scheinbar schirmte die hier verwendete Ligandenhülle die QDs so gut ab, dass kaum Änderungen der Lumineszenzeigenschaften zu verzeichnen waren. Wie bereits erwähnt, wirkten nur die Protonen destabilisierend auf die Ligandenoberfläche der Partikel unter Abnahme der Quantenausbeute.

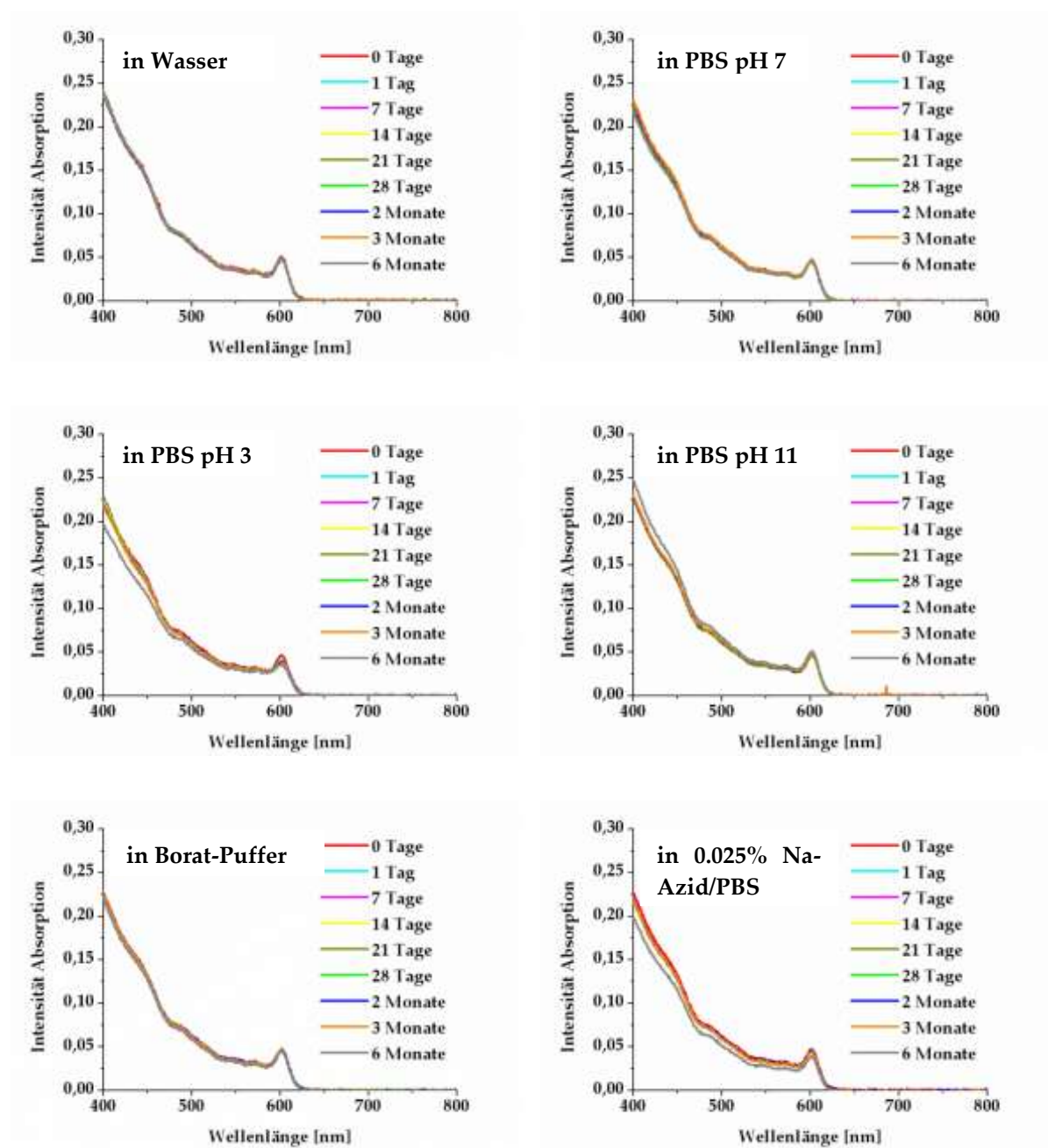


Abbildung 84: Absorptionsspektren der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies™*) (g) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate

4.8.2 Kurzzeitstabilität über 1 Woche

Die Kurzzeitstabilitätsuntersuchung wies nach einer Woche Lumineszenzverluste in den FCS-haltigen Medien um 38% und 66% sowie im BSA-Puffer um 32% auf. Nur im DMEM mit HEPES blieben die Partikel stabil und hatten eine Quantenausbeute von 50% (Abb. 85). Auch hier beeinflussten vermutlich speziell die Proteine des FCSs sowie vom BSA die Ligandenoberfläche und führten somit zur Verringerung der Lumineszenz der Nanopartikel.

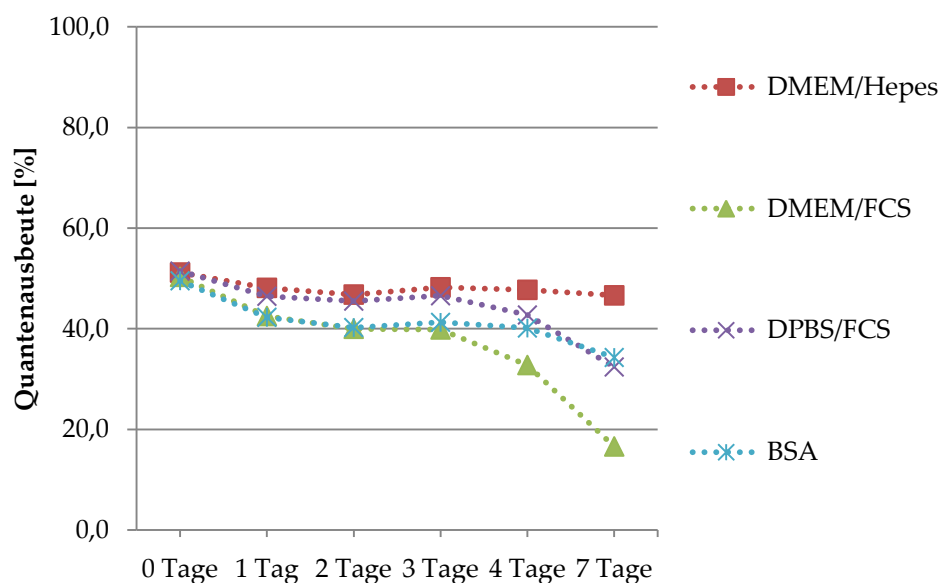


Abbildung 85: Schematische Darstellung der Quantenausbeute von CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologiesTM*) (g) in DMEM + 10% HEPES, DMEM + 10% FCS, DPBS + 10%FCS und 1% BSA über einen Zeitraum von einer Woche

Die Absorptionsspektren der Nanopartikel in den FCS-haltigen Medien wiesen erhöhte Streuuntergründe bereits nach drei Tagen in PBS und nach einer Woche im DMEM auf. Scheinbar destabilisierten die Proteine die Partikeloberfläche durch Komplexierungsreaktionen und bewirkten dadurch eine Reduzierung der Fluoreszenz. Dies ist in den aufgenommenen Emissionsspektren dargestellt (Abb. 86).

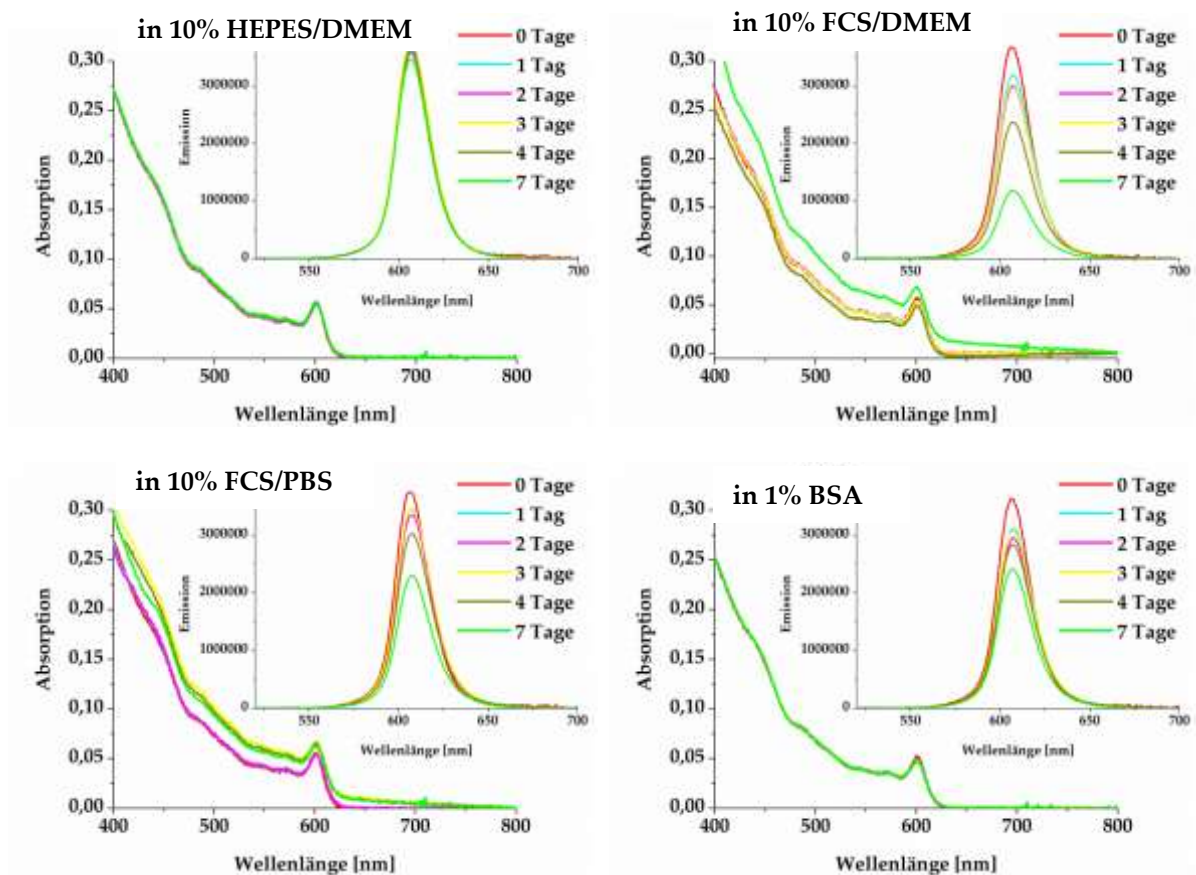


Abbildung 86: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies™*) (g) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

4.8.3 Kurzzeitstabilität über 24 Stunden

Anhand der Absorptions- und Emissionskurven in den untersuchten Medien über die Zeit, zeigte dieses Nanopartikelsystem in Glutaral und Triton X-100 die besten Stabilitätseigenschaften. Die Quantenausbeuten reduzierten sich innerhalb eines Tages lediglich um 5%, ausgehend von 45% in Glutaral und 50% in Triton X-100.

In EDTA war eine kontinuierliche Abnahme der Quantenausbeute von 26% auf 9% zu beobachten. Die prägnanten Absorptionsmaxima flachten mit der Zeit ab, was auf die Auflösung der Teilchen hindeutet.

Wasserstoffperoxid zeigte auch hier den stärksten Einfluss auf das Teilchen-Ligandensystem. Hier kam es bereits nach einer Stunde zur vollständigen Löschung der Partikel (Abb. 87 und 88). Dies wurde auch durch die Auflösung der Absorptionsbanden mit der Zeit verdeutlicht.

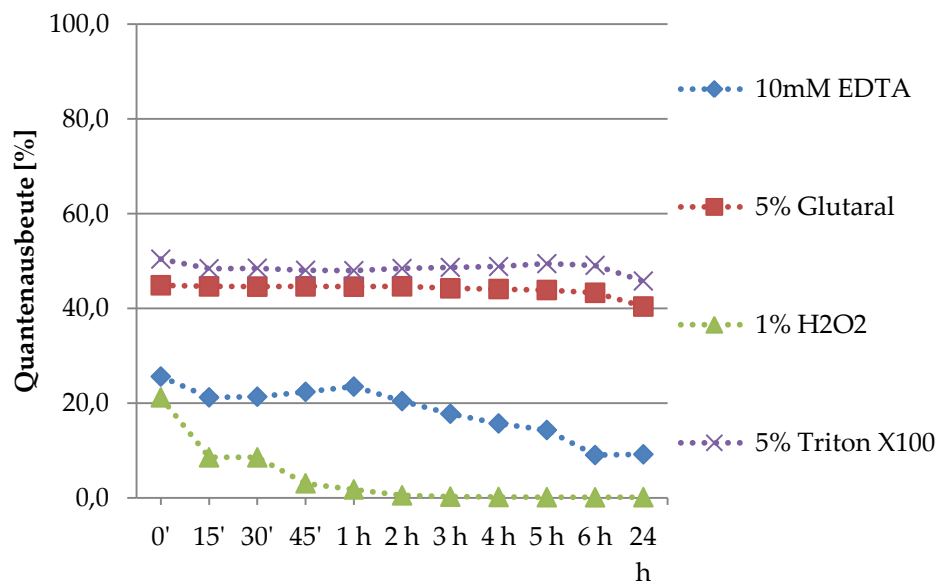


Abbildung 87: Schematische Darstellung der Quantenausbeute von CdSe/ZnS-PEO-NH₂ von *life technologies*TM (g) in EDTA, Glutaral, H₂O₂ und Triton X-100 über einen Zeitraum von 24 Stunden.

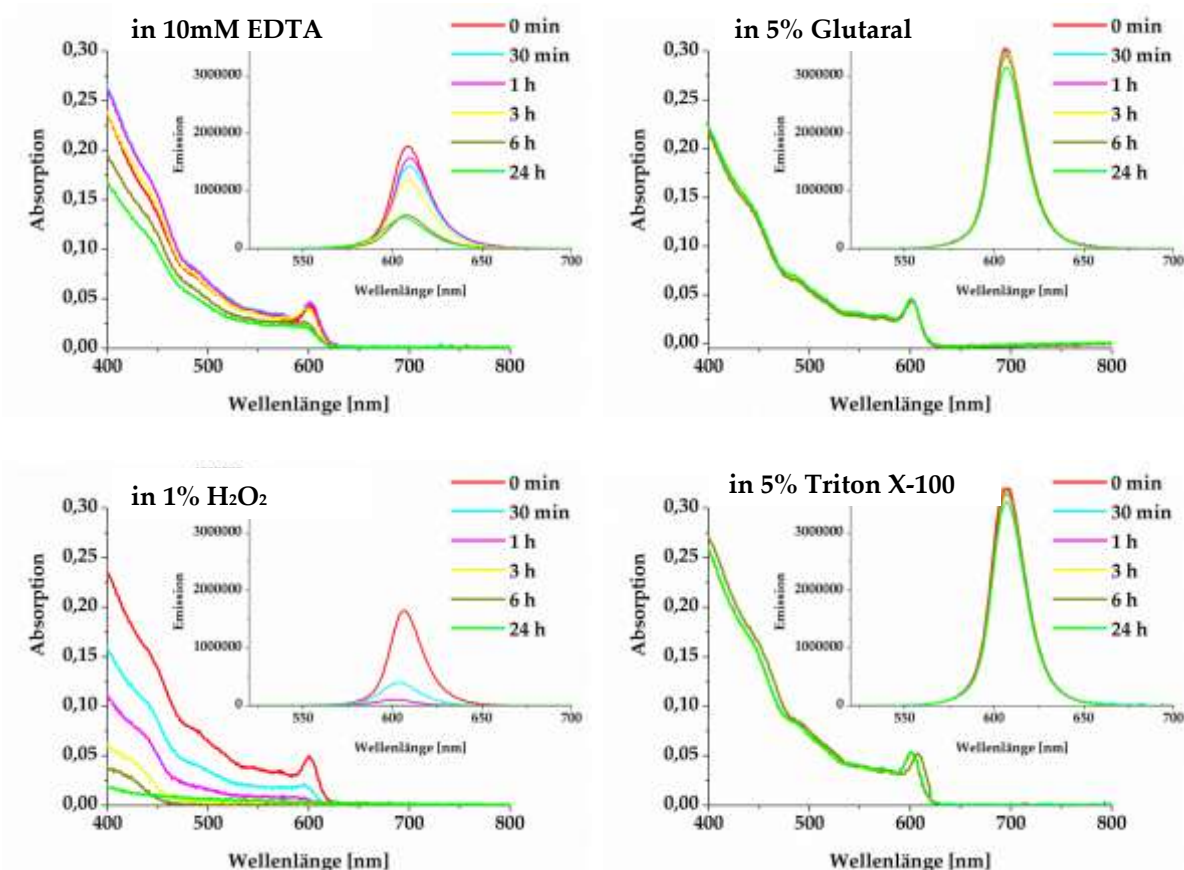


Abbildung 88: Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies*TM) (g) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden.

4.8.4 Dynamische Lichtstreuung CdSe/ZnS-PEO-NH₂ (g) *life technologies*TM

Bei den Messungen der hydrodynamischen Durchmesser in den Langzeitmedien waren in fast allen Lösungen minimale Schwankungen von maximal 5 nm zu erkennen (Abb. 89).

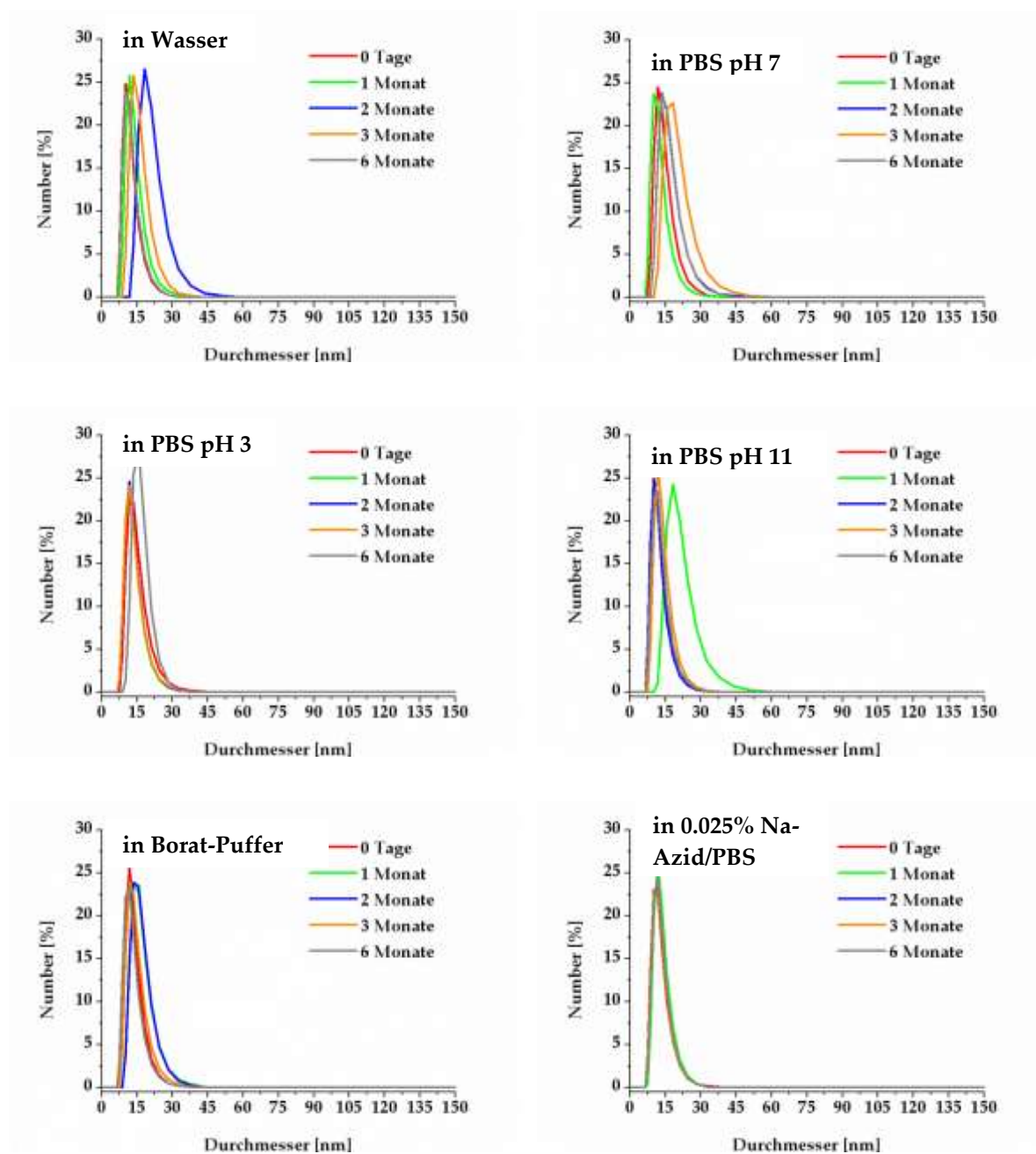


Abbildung 89: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies*TM) (g) in den Medien zur Langzeitstabilitätsuntersuchung über sechs Monate.

Die Partikelgrößen waren über den gesamten Zeitraum mit durchschnittlich 12 nm konstant. Diese hohe Stabilität deutete vermutlich auf einen kovalent gebundenen PEG-Liganden auf der ZnS-Oberfläche der Teilchen hin. Wie auch in den Partikelsystemen e und f waren die HWB mit 10 nm sehr schmal und wies so auf eine enge Größenverteilung der Partikel hin.

Die DLS-Messungen in den Zellmedien waren nur in DMEM mit HEPES auswertbar. Hier konnten konstante hydrodynamische Durchmesser von 12 nm gemessen werden.

In den übrigen Medien konnten vermutlich nur deren Inhaltsstoffe (Proteine) bei 5 nm bis 7 nm detektiert werden (Abb. 90).

Durch entsprechende Verdünnungen der Partikellösungen könnten diese Effekte beseitigt werden. Auf Grund der Vergleichbarkeit aller Partikelsysteme untereinander konnten diese Lösungen nicht weiter verdünnt werden. Dies zu testen bedarf noch einige weiterführender Studien in zukünftigen Arbeiten.

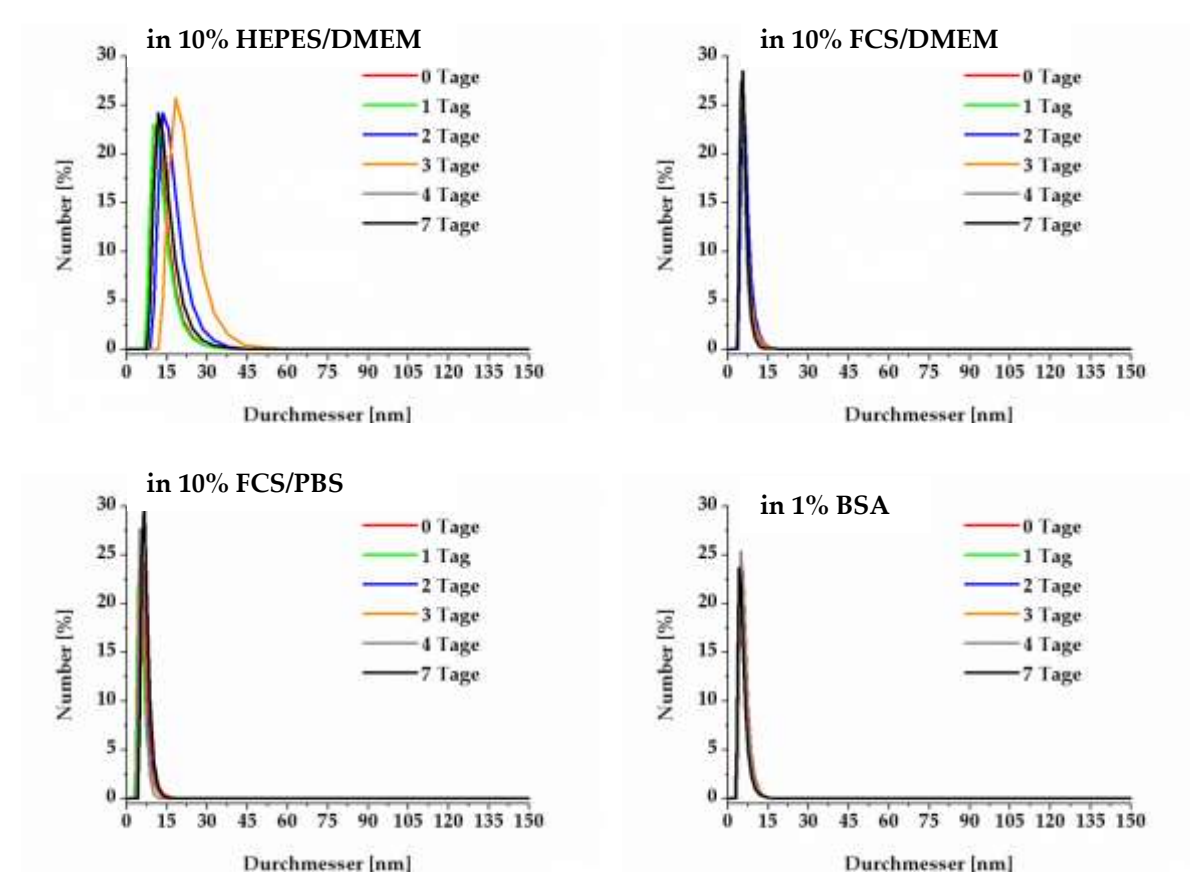


Abbildung 90: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies™*) (g) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über eine Woche

Etwas anders verhielt es sich in EDTA, Glutaral und Wasserstoffperoxid.

In Glutaral zeigten die Partikel hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers nur kleine Vergrößerungen von 12 nm auf 18 nm mit konstanten HWB von 9 nm.

In EDTA hingegen waren die gemessenen Partikel etwas größer mit anfänglich 18 nm und 24 nm am Ende der Untersuchung. Die HWB blieb dabei konstant bei 12 nm. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte eventuell durch komplexbildende Reaktionen des EDTA's mit den aminfunktionalisierten Liganden auf der Teilchenoberfläche.

In Wasserstoffperoxid waren nach 24 Stunden Aggregate von über 220 nm messbar. Diese entstammten scheinbar dem Polymer, da die Partikel vollständig zerstört. Dies konnte deutlich dem entsprechenden Absorptionsspektrum entnommen werden (Abb. 88).

In Triton X-100 waren keine Partikelgrößen bestimmbar, da die detektierten Signale von der Lösung selbst stammten (Abb. 91).

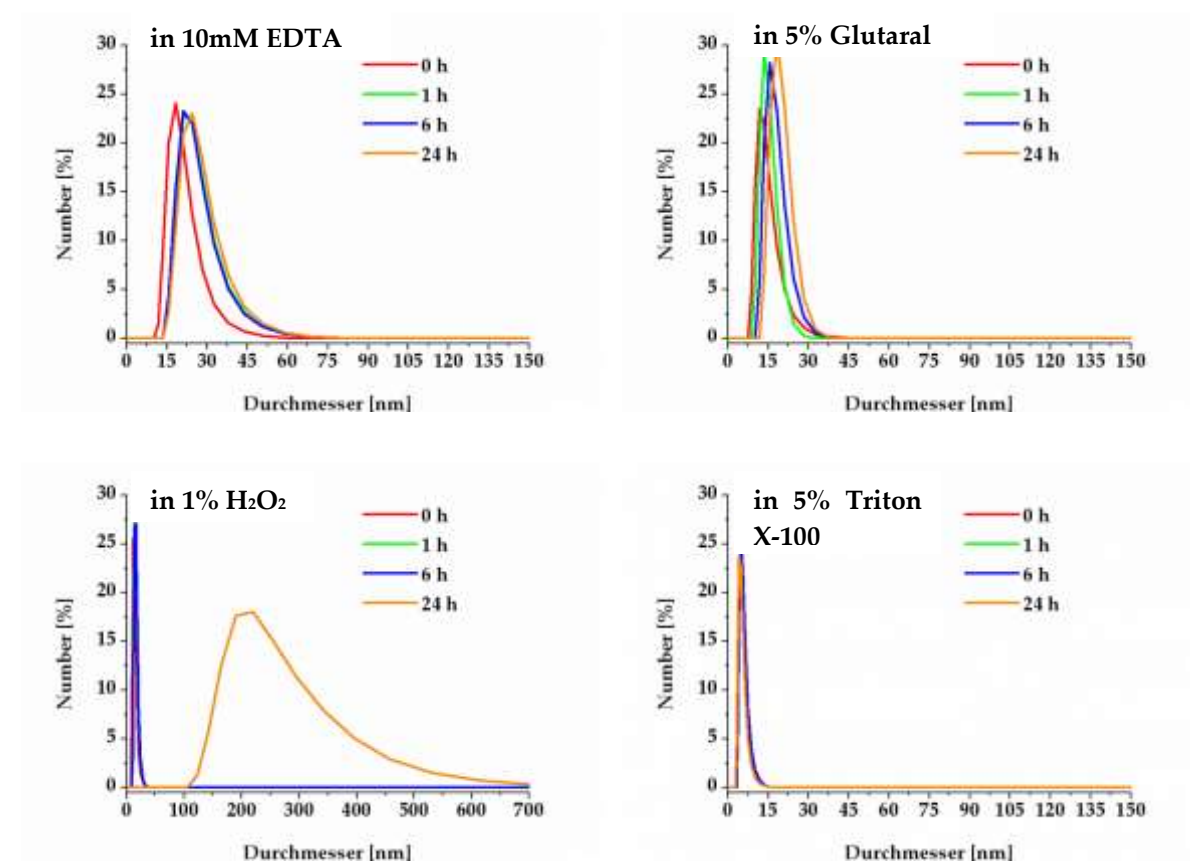


Abbildung 91: Graphische Darstellungen der hydrodynamischen Durchmesser der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies*TM) (g) in den Medien zur Kurzzeitstabilitätsuntersuchung über 24 Stunden.

4.8.5 Lagerung bei -20 °C / 120 °C

Die Untersuchungen dieser Partikel bei niedrigen und hohen Temperatureinflüssen zeigten vergleichsweise zu den vorherigen Systemen andere Ergebnisse (Abb. 92). Hier waren die Nanoteilchen weiter beständig nach Lagerung bei 120 °C. Die Quantenausbeute nahm unter diesen Bedingungen lediglich um 10% ab. Die Absorptionskurven zeigten keine Streuuntergründe. Allerdings wiesen die Untersuchungen der Partikelgrößen mittels DLS größere Aggregationen auf. Der hydrodynamische Durchmesser änderte sich hier von 14 nm auf 24 nm. Ebenso vergrößerte sich die HWB von 9 nm auf 13 nm.

Die Lagerung der wässrigen Partikel bei -20 °C wiesen hingegen starke Veränderungen hinsichtlich ihrer Stabilität auf. Entsprechend zeigte der Absorptionsverlauf einen hohen Streuuntergrund durch das Auftreten von Aggregaten. Weiterhin flachte das Absorptionsmaximum ab, was auf die nahezu vollständige Zerstörung der Partikel hindeutete. Ein geringer Teil an Partikeln schien allerdings noch intakt zu sein, da nach diesen Untersuchungen weiterhin Fluoreszenz messbar war. Die Messungen mittels DLS zeigten ebenfalls das Vorhandensein großer Aggregate von über 340 nm mit HWB von 105 nm.

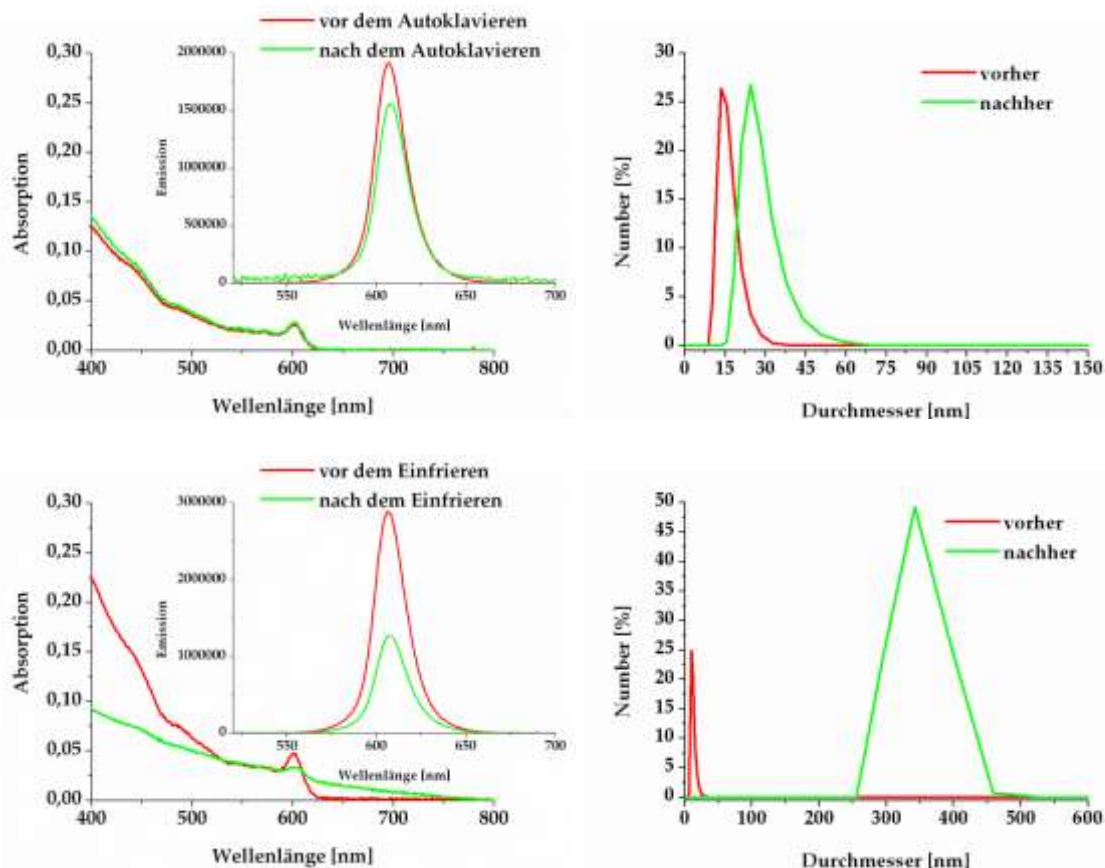


Abbildung 92: Graphische Darstellungen der Absorptions- und Emissionsspektren (linke Bilder) sowie die hydrodynamischen Durchmesser (rechte Bilder) der CdSe/ZnS-PEO-NH₂-Nanopartikel (*life technologies™*) (g) nach dem Autoklavieren (oben) und nach Einlagerung bei -20 °C (unten) in Wasser

Fazit:

Auch das zweite kommerzielle Partikelsystem zeigte besonders in den Langzeitstudien und nach Lagerung bei 120 °C gute Stabilitäten hinsichtlich der Quantenausbeute und Partikelgröße.

Starke Veränderungen wurden durch Protonen des PBS pH3, DMEM/FCS, EDTA und Wasserstoffperoxid sowie bei Lagerung von -20 °C hervorgerufen. Hier kam es zu hohen Quantenausbeuteverlusten und durch die Radikale der Peroxidlösung bzw. den sehr niedrigen Temperaturen zur Auflösung der Teilchen.

Die Teilchen waren sehr klein mit durchschnittlich 12 nm und besaßen eine schmale Größenverteilung (HWB von 10 nm).

4.9 DLS der verwendeten Medien

Zur Abschätzung möglicher Schwankungen bei den DLS-Messungen sind in Abb. 93 die Werte der verwendeten Medien-Lösungen dargestellt.

Die detektierten Größen lagen im Schnitt zwischen 0.6 nm und 7 nm. Diese hoben sich klar von den untersuchten Partikelgrößen ab und führten daher zu keinen Fehlinterpretationen.

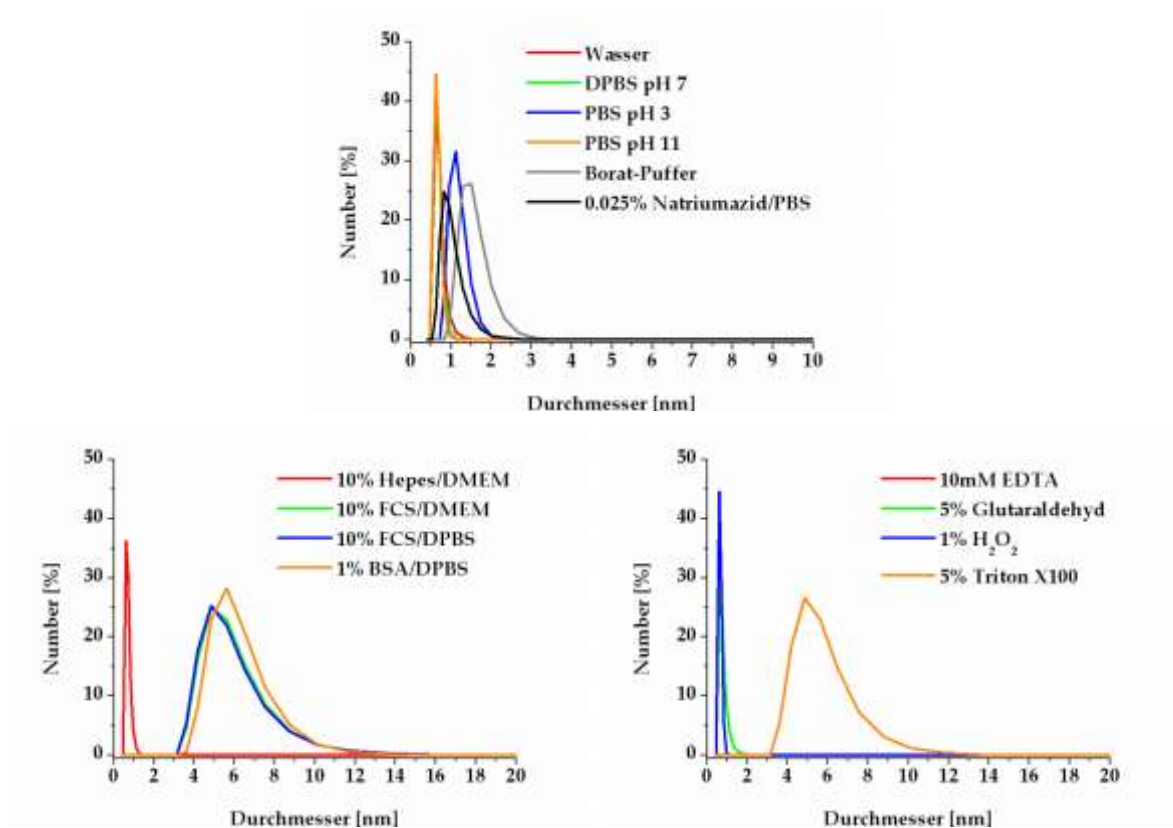


Abbildung 93: DLS-Daten der verwendeten Medien zur Stabilitätsuntersuchungen. *oben:* hydrodynamische Durchmesser der Langzeitmedien; *unten links:* hydrodynamische Durchmesser der Zellmedien; *unten rechts:* hydrodynamische Durchmesser der Kurzzeitmedien über 24 Stunden

4.10 Zeta-Potentiale der Partikelsysteme

Zur Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der entsprechenden Ligandensysteme sind von allen Partikelsystemen im Wasser die Zeta-Potentiale zu Beginn der Stabilitätsstudie und nach drei Monaten aufgenommen worden.

Dabei sind entsprechend den funktionellen Gruppen auf der Ligandenoberfläche für Hydroxy-Funktionalität der PI-*b*-PEO- sowie der (SH)₃-PEO-Teilchen Werte bei 10 mV bis 12 mV gemessen worden. Hier zeigten nur die Dot/Rods **b** eine deutliche Verringerung auf 5,4 mV von anfänglich 10,3 mV. Bei den übrigen hydroxyfunktionalisierten Partikeln waren lediglich Messschwankungen um maximal 3 mV zu verzeichnen.

Die aminfunktionalisierten Teilchen von *life technologies*TM zeigten die erwarteten leicht negativen Zeta-Potentiale um den Nullpunkt bei anfangs -0,6 mV und nach drei Monaten -3,6 mV. Theoretisch sollten auch die aminfunktionalisierten Partikel von *Ocean Nano Tech* entsprechende Werte zeigen, diese lagen allerdings um die 17 mV. Dies wären vergleichsweise typische Größen für Carboxyle oder Acrylate. Da eine genaue Vorgehensweise zur Darstellung dieser Partikel nicht vorliegt, können dazu keine weiteren Angaben gemacht werden.

Tabelle 2: Übersicht der Zeta-Potentialmessungen aller untersuchten Nanopartikel-Ligandensysteme in Wasser hinsichtlich ihrer Stabilität.

Partikelsystem	Zeta-Potential [mV]	
	0 Tage	3 Monate
CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (a)	8,7	12,1
CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (b)	10,3	5,4
CdSe/ZnCdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH (c)	10,8	9,9
CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH-PS (d)	11,8	14,8
CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-OH (e)	9,8	11,2
CdSe/ZnS-PEO-NH ₂ (f)	-0,6	-3,6
CdSe/ZnS-PEO-NH ₂ (g)	16,9	18,2

4.11 Toxizitätsmessungen von den Partikelsysteme der Stabilitätsreihe

Zuletzt wurden alle sieben Partikelsysteme hinsichtlich ihrer Toxizität auf der humanen Lungenkrebszelllinie A549 mittels des WST-8-Assays untersucht. Die Inkubation der Partikel mit einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 nM erfolgte auf den Zellen über 18 Stunden im Inkubator. Nach Zugabe und weiterer Inkubation von drei Stunden des WST-Reagenzes erfolgte eine Absorptionsmessung. Aus diesen Daten konnte auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden. Als Referenz wurde eine CdCl_2 -Lösung mit einer Konzentration bis zu 1000 μM verwendet.

In Abb. 94 sind die Ergebnisse der Toxizitätsmessung graphisch dargestellt.

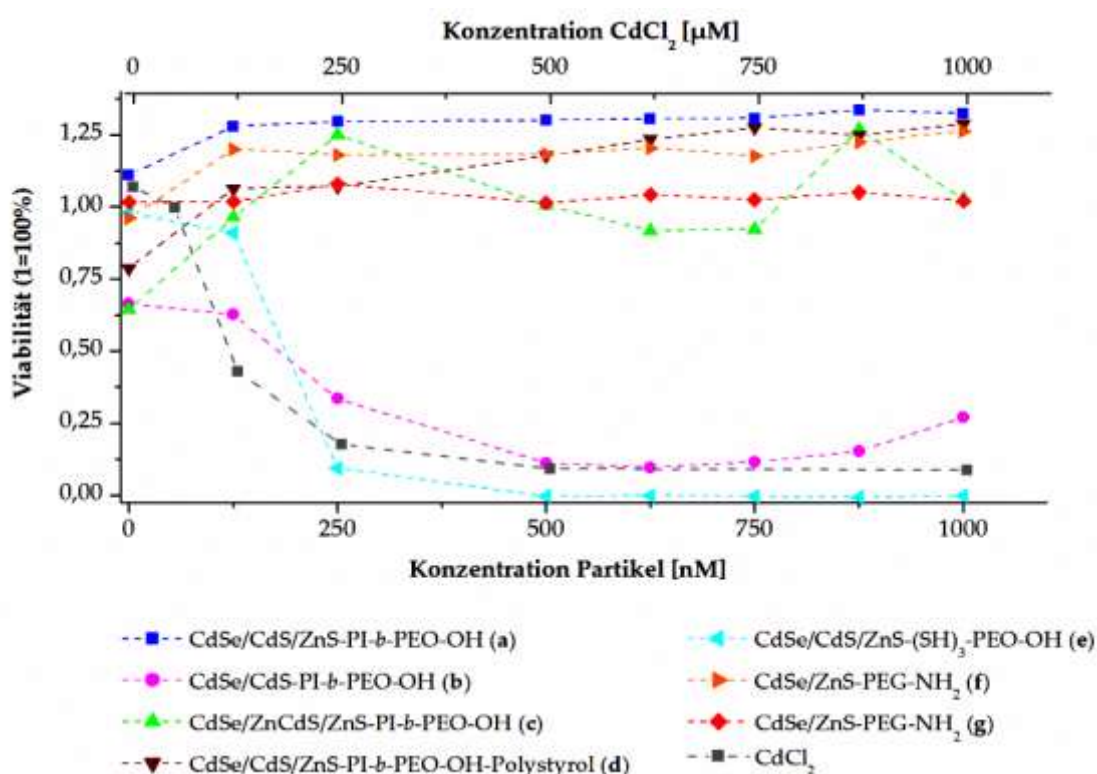


Abbildung 94: Übersicht zur Zytotoxizität verschieden konzentrierter Nanopartikel-Liganden-Systeme auf A549-Zellen. Zur Untersuchung diente der WST-8-Assay, wobei verschiedene Konzentrationen an CdCl_2 als Positivkontrolle verwendet wurden.

Die Kurve der CdCl_2 -Lösung zeigte ab etwa 125 μM einen stetigen toxischen Effekt auf die Zellen.

Vergleichend zu dieser Kurve waren die Dot/Rods, Partikelsystem **b**, sowie die Teilchen mit dem Thiol-Liganden, Partikelsystem **e**, toxisch. Das elongierte Nanopartikelsystem verfügt über einen höheren Cadmiumgehalt bezogen auf ein sphärisches Partikel. Die Konzentrationsangaben bezogen sich auf die jeweiligen Absorptionsspektren und wurden näherungsweise mit der nach Peng *et al.*

aufgestellten Formel bestimmt. ^[81] Diese bezieht sich allerdings nur auf sphärische CdSe-Kerne. Die Berechnung der Konzentrationen von Kern/Schale/Schale-Systemen und auch von den stäbchenförmigen Partikeln lieferten daher nur Näherungswerte. Die Toxizität der CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Teilchen wurde vermutlich durch das verwendete Ligandensystem ausgelöst. Scheinbar bildeten nicht alle Thio-Funktionalitäten Disulfid-Brücken zu der Partikeloberfläche aus. Damit konnte sich in Lösung ein Gleichgewicht von anhaftenden und abgehenden Thiolliganden ausbilden, wobei eventuelle freie Thiole toxisch auf die Zellen wirkten. Zum anderen war die Abschirmung der Partikel durch diese beweglichen Liganden nicht mehr gegeben, so dass dadurch auch Cadmiumatome die Toxizität mit verursachten. Die anderen Partikelsysteme zeigten keine toxischen Effekte auf die A549-Zellen in den untersuchten Konzentrationen.

4.12 Zusammenfassung

Alle hier dargestellten Partikelsysteme wurden unter denselben Bedingungen (in Quarzglasküvetten, bei 20 °C unter Lichtausschluss) in verschiedenen biologisch relevanten Medien hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht.

Sie wurden dafür ein halbes Jahr im Wasser, im neutralen DPBS sowie im sauren und alkalischen PBS, im Borat-Puffer und in einer Natriumazid-PBS-Lösung gelagert und in regelmäßigen Abständen spektroskopisch vermessen.

Für zelltypische Untersuchungen bzw. die Studie unter speziellen Salzeinflüssen wurden die Nanoteilchen in DMEM mit HEPES oder mit FCS, in DPBS mit FCS, in DPBS mit BSA, sowie in EDTA, in Glutaral, in Triton X-100 und in Wasserstoffperoxid untersucht. Diese Messungen erfolgten über sieben Tage bzw. 24 Stunden.

Schließlich wurden die wässrigen Partikelprouben den extremen Temperatureinflüssen von -20 °C im Gefrierschrank und 120 °C im Autoklaven ausgesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten zum Teil recht einheitliche Ergebnisse abhängig von dem jeweiligen Polymer, welches als hydrophile Ligandenoberfläche diente. Die Stabilität war dabei nicht abhängig von den verwendeten Partikelsystemen.

Zum einen wurden die standardisierten CdSe/CdS/ZnS-Nanoteilchen der CAN GmbH mit verschiedenen Oberflächen-Liganden modifiziert. Zum anderen wurden im kontinuierlichen Flusssystem synthetisierte CdSe/ZnCdS/ZnS-Partikel sowie CdSe/CdS-Dot/Rods, ebenfalls von der CAN GmbH bereit gestellt, in den Stabilitätsstudien untersucht. Als Ligandenhülle wurde einerseits das mizellenbildende PI-*b*-PEO-OH-Polymer, welches bei einem weiteren Teilchensystem mit einer zusätzlichen Polystyrol-Schicht umhüllt war, verwendet. Zum anderen diente ein mehrzähliger Thiol-PEO-Ligand zum Transfer der ursprünglich hydrophoben Partikel ins biologische wässrige Medium. Vergleichend dazu wurden zwei kommerzielle Partikelsysteme namenhafter Firmen hinzugezogen

und denselben Bedingungen ausgesetzt. Bei diesen Nanoteilchen von *Ocean Nano Tech* und *life technologies™* handelte es sich um CdSe/ZnS-QDs, die mit einer nicht weiter spezifizierten Amino-PEO-Hülle modifiziert waren.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Stabilitätsstudie der verschiedenen Nanopartikelsysteme in biologisch relevanten Medien im Überblick vergleichend dargestellt.

Tabelle 3: Überblick der Stabilitätsergebnisse im Vergleich aller Partikelsysteme:

	a CAN GmbH	b CAN GmbH	c CAN GmbH	d Universität Hamburg	e Universität Hamburg	f Ocean Nano Tech	g life technologies™
	QD- PI- <i>b</i> -PEO- OH	QD/DR- PI- <i>b</i> -PEO- OH	QD- PI- <i>b</i> -PEO- OH	QD- PI- <i>b</i> -PEO- OH-PS	QD- (SH) ₃ -PEO- OH	QD- PEG-NH ₂	QD- PEG-NH ₂
Wasser	++	++	++	++	++	++	++
PBS pH 7	++	-	++	++	++	++	++
PBS pH 3	-	-	-	-	++	-	-
PBS pH 11	++	+	+	++	++	++	++
Borat-Puffer	++	++	++	++	++	++	++
0.025% Na- Azid/PBS	+	-	+	+	++	++	++
DMEM + 10% Hepes	++	-		++	++	-	++
DMEM + 10% FCS	-	-		-	+	+	-
PBS + 10%FCS	-	-		-	+	+	+
1% BSA in PBS	++	++		++	++	-	+
EDTA	++	+		++	+	+	-
Glutaral	+	++		+	++	++	++
H ₂ O ₂	-	-		-	-	-	-
Triton X100	++	++		++	++	++	++
Lagerung bei -20 °C	-	-		-	++	++	-
Lagerung bei 120 °C	+	+		-	+	-	+
Toxizität	nicht toxisch	ab ~125nM toxisch	nicht toxisch	nicht toxisch	ab ~250nM toxisch	nicht toxisch	nicht toxisch

Legende: ++ sehr gute Stabilität + gute Stabilität - keine Stabilität

Das jeweilige Partikelsystem (Kern/Schale oder Kern/Schale/Schale) sowie deren Synthesarten (im Kolben oder im Fluss-Reaktor als sphärische Teilchen; als Dot/Rods) hatten einen entsprechenden Einfluss auf die Quantenausbeute in den

biologischen Lösungen. Die Stabilität hingegen wurde durch die Liganden und deren Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst.

Die stäbchenförmigen Nanoteilchen CdSe/CdS **b** sowie die CdSe/ZnS-Partikel **g** von *life technologies™*, die sowohl sphärische als auch elongierte Teilchen enthielten, wiesen mit etwa 50% die höchsten Quantenausbeuten auf. Dem schlossen sich die beiden Systeme CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH **e** und CdSe/ZnS-PEO-NH₂ **f** von *Ocean Nano Tech* mit 25% bzw. 30% Quantenausbeute an. Die im Reaktor synthetisierten Partikel CdSe/ZnCdS/ZnS **c** sowie die Standard-Batch-Teilchen CdSe/CdS/ZnS **a** fluoreszierten mit 23%, während dieselben Batch-Kern/Schale/Schale-Nanopartikel **d**, die mit einer weiteren Ligandenschicht versehen waren, nur eine Quantenausbeute von 16% erreichten.

Es zeigte sich bereits hier, dass je nach verwendetem Ligandensystem für den Transfer ins biologische Medium, die resultierende Quantenausbeute recht stark variierte. Somit wären von der Partikelart die Dot/Rods am besten geeignet, wenn diese mit einem kleinen PEG-Liganden (etwa um die 1000 g/mol) modifiziert würde. Dies sollte in zukünftige Arbeiten untersucht und entsprechend bewertet werden. Hinsichtlich der Stabilitäten zeigten die meisten Partikelsysteme bei den Langzeitstudien über ein halbes Jahr nur unter sauren Bedingungen destabilisierende Einflüsse unter Verlust ihrer Lumineszenz. Nur die CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-Teilchen **e** blieben in allen Langzeitmedien unverändert, während die Dot/Rods **b** im neutralen und sauren PBS sowie im Azid-Puffer agglomerierten. Dies waren vermutlich Effekte, die auf die größere Oberfläche der Stäbchen und auf der damit verbundenen höheren Materialmasse zurück zu führen war. In den Zellmedien DMEM mit HEPES oder FCS, DPBS mit FCS und DPBS mit BSA waren nur die im Batch hergestellten Kern/Schale/Schale-Partikel über den gesamten gemessenen Zeitraum von einer Woche stabil. Die mizellaren CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH **b** und die CdSe/ZnS-Partikel **f** von *Ocean Nano Tech* zeigten nur im BSA-haltigen Puffer konstante Quantenausbeuten und die Kern/Schale-Teilchen **g** in DMEM mit 10% HEPES-Zusatz. Allerdings erfuhren diese drei Partikel-Ligandensysteme in den übrigen Zellmedien eine stetige Abnahme ihrer Lumineszenz über die Zeit. In der letzten Kurzzeitstudie über 24 Stunden konnten Liganden-abhängige Ergebnisse hinsichtlich der Quantenausbeute beobachtet werden. Während alle Partikelsysteme keinerlei Veränderungen in 5%iger Triton X-100-Lösung erfuhren, zeigten die drei Diblock-Systeme **a**, **b** und **d** zusätzlich im 10 mM EDTA-Medium eine konstant bleibende Fluoreszenz. Die anderen drei Nanoteilchen-Systeme **e**, **f** und **g**, welche als Liganden ein einfaches PEG besaßen, behielten ihre Stabilität in einer 5%igen Glutaral-Lösung. Das bedeutet, dass das EDTA bei diesen Partikel-Liganden-Systemen eine destabilisierende Wirkung durch eventuelle Komplexbildungsreaktionen auf der Oberfläche der Ligandenhülle ausübte und somit das gesamte Teilchen destabilisierte. Dies war nur möglich, wenn auf der Partikeloberfläche ein Gleichgewicht von bindenden und abgehenden Liganden in wässrigen Lösungen bestand. Diese waren dann besonders leicht angreifbar für entsprechende Komplexbildungen. Bei den Partikeln mit den Diblock-Polymeren

schützte die gebildete Mizelle, in denen sich mehrere QDs befinden, vor solchen Komplexierungsreaktionen einiger Salze. In der 1%igen Wasserstoffperoxid-Lösung zeigten wiederum alle untersuchten Partikel nach 24 Stunden eine vollständige Fluoreszenzlöschung. Bei genauerer Betrachtung waren jedoch feine Unterschiede zwischen den Diblock-Partikeln und den PEGylierten Nanoteilchen zu erkennen. Die Mizellen hielten dem Radikaleinfluss des Wasserstoffperoxid länger stand als die einfach modifizierten Partikel **e**, **f** und **g**. Die Radikale benötigten drei Stunden bei den Diblock-Polymeren zum Durchdringen der Ligandenoberfläche und Auslöschen der Partikel, bei den Dot/Rods waren es sogar über sechs Stunden. Nach nur einer Stunde war bei den übrigen drei Nanoteilchen-Systemen keine Absorption und Quantenausbeute mehr messbar. Die Teilchen waren hier bereits schon vollständig zerstört.

Die Messungen der hydrodynamischen Durchmesser mittels DLS zeigten bei denen mit PI-*b*-PEO-verkapselten Nanopartikeln Werte um die 28 nm bis 44 nm. Dabei waren die im Kolben und die im Reaktor synthetisierten Kern/Schale/Schale-QDs mit 28 nm bis 33 nm und mit konstanten 38 nm in allen Medien über die gesamten gemessenen Zeiträume stabil. Die Dot/Rods hingegen zeigten auf Grund ihrer elongierten Form und daraus folgend ihren eigenen Eigenschaften unterschiedliche Werte um die 38 nm bis 44 nm. Die Partikel waren im neutralen und alkalischen PBS sowie im Azid-Puffer agglomeriert und auf den Boden der Messküvette gesunken. In den anderen Medien besaßen die Dot/Rods hydrodynamische Durchmesser von etwa 38 nm. Vergleichsweise zu diesen drei mizellen-bildenden Partikelsystemen hatten die mit Polystyrol umschlossenen Nanoteilchen im Schnitt 20 nm größere Mizellen gebildet. In DMEM mit HEPES sowie in Glutaral waren diese sogar bis an die 70 nm groß.

Für biologische Anwendungen wären wesentlich kleinere Partikel von großem Vorteil für eine barrierefreie Zugänglichkeit in und wieder aus Zellen. Deshalb ist eine Optimierung diesbezüglich gerade bei dem Diblock-Copolymer-System wünschenswert. Durch Verwendung wesentlich kleinerer Polymerblöcke, etwa um die 1000 g/mol bis 5000 g/mol, könnten Partikelgrößen um die 20 nm erreicht werden.

Die übrigen drei Partikelsysteme mit dem einfachen kurzkettigen PEG zeigten Größen um die 20 nm im hydrodynamischen Durchmesser. Die Teilchensysteme **e** und **f** waren im Schnitt 14 nm bis 18 nm groß. Während die Partikel von der Firma *Ocean Nano Tech* in allen untersuchten Medien konstant blieben, gab es bei den Teilchen mit dem thiolhaltigen PEG-Liganden speziell in EDTA, Glutaral und in Wasserstoffperoxid Abweichungen in der Größe bis zu 44 nm. In diesen Medien zeigten auch die Nanopartikel der Firma *life technologies™* recht unterschiedliche Ergebnisse. Während sie standardmäßig nur um die 12 nm groß waren, veränderten sie sich in EDTA auf 24 nm, in Glutaral auf 18 nm und in Wasserstoffperoxid entstanden Agglomerate mit Größen bis zu 220 nm.

Es zeigte sich, dass die Partikel mit einfachen PEG deutlich stabiler hinsichtlich der Lumineszenz blieben, aufgrund guter Bindungseigenschaften der Liganden auf der

Oberfläche (eventuell durch Chelatisierung hervorgerufen bei mehrzähligen Funktionalitäten), im Vergleich zu den PI-*b*-PEO-Teilchen. In allen untersuchten Partikel-Ligandensystemen traten vereinzelt Schwankungen hinsichtlich des hydrodynamischen Durchmessers auf. Hier reagierten die PI-*b*-PEO-Systeme empfindlicher als die übrigen PEG-Teilchen.

Vom Partikelsystem **a** waren zusätzlich Untersuchungen bei niedrigen (4 °C) und hohen (37 °C) Lagerungstemperaturen in den Langzeitmedien durchgeführt worden. Die im Wasser gelagerten Partikel zeigten bei 37 °C eine stetige Abnahme der Quantenausbeute. In den übrigen Medien hatten die Lagerungstemperaturen keinen Einfluss auf die Lumineszenz.

Schließlich waren die Partikel im Wasser zwei extremen Temperaturen ausgesetzt worden. Zum einen wurden die Veränderungen der Quantenausbeuten und Aggregationen nach Lagerung bei -20 °C untersucht. Hier zeigten nur die Nanoteilchen von *life technologies*TM Quantenausbeuteverluste von 50%. Die Fluoreszenzen der anderen Partikelsysteme wiesen kaum Änderungen auf. Im Hinblick auf die untersuchten Partikelgrößen mittels Bestimmung ihres hydrodynamischen Durchmessers zeigten nur die Nanoteilchen von *Ocean Nano Tech* eine konstante Stabilität, alle anderen Systeme waren aggregiert. Bei einer Behandlung aller wässrigen Teilchen im Autoklaven bei 120 °C waren alle aggregiert. Die Quantenausbeuten hingegen hatten sich jedoch kaum verändert.

Die Messungen der Zeta-Potentiale im Wasser zeigten zwar geringe Schwankungen über die Zeit, aber keine bedeutenden Effekte hinsichtlich einer veränderten Partikel-Liganden-Oberfläche.

Unter Verwendung des WST-Assays wurde die toxische Wirkung von Nanopartikeln auf die Lungenkrebszelllinie A549 untersucht. Diese Messung hatte ergeben, dass die Dot/Rods **b** und die QDs mit den mehrzähligen Thiol-PEO-Liganden **e** toxisch auf die Zellen wirkten. Die übrigen Nanoteilchen zeigten keine Toxizitätseffekte.

Teil II

Der zweite Teil dieser Arbeit untersuchte Biokonjugationsreaktionen ausgewählter Systeme aus den Stabilitätsstudien. Dazu wurden erste Reaktionsversuche der Staudinger Ligation erforscht, die in Zukunft noch weiterer Studien bedarf.

Nach erfolgten Kopplungsreaktionen der Nanopartikel mit Biomolekülen schlossen sich Zellaufnahmestudien dieser Systeme an.

4.13 Nicht spurlose Staudinger Ligation

4.13.1 Darstellung des Staudinger-Reagenzes

Das hier sogenannte Staudinger-Reagenz, 1-Methyl-2-diphenylphosphantereophthalat (MDT), sollte nach erfolgreicher Kopplungsreaktion mit Polymeren zur nicht spurlosen Staudinger Ligation eingesetzt werden (Abb. 95) ^[82]

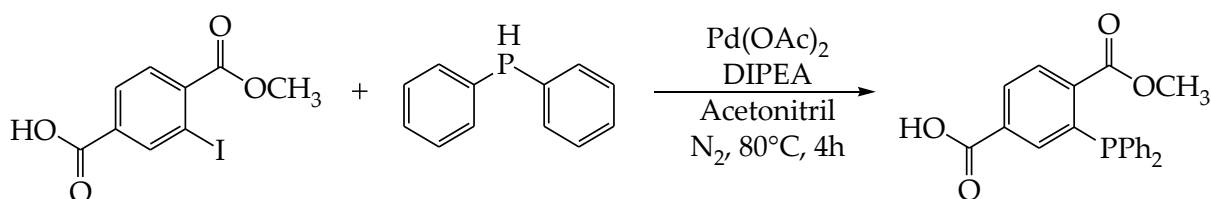


Abbildung 95: Darstellung des Staudinger-Reagenzes, 1-Methyl-2-diphenylphosphantereophthalat (MDT), unter katalytischen Bedingungen

Mechanismus:

Dazu wird 1-Methyl-2-iodoterephthalat mit Diphenylphosphan in einer palladium-katalysierten Reaktion umgesetzt (Abb. 96). ^[74] Hier kommt es zunächst zu einer oxidativen Addition des 1-Methyl-2-iodoterephthalates an das Palladiumacetat **1**. Dem schließt sich die Insertion des Diphenylphosphans an **2**, welches zuvor von der schwach nukleophilen Base *N,N'*-Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünig-Base) deprotoniert wird. Durch die basische Stickstofffunktion vom DIPEA wird Iodwasserstoffsäure gebunden und es bilden sich die entsprechenden Ammoniumsalze. Schließlich entsteht das gewünschte Produkt, 1-Methyl-2-diphenylphosphantereophthalat, unter Regeneration des Palladium(II)acetat-Katalysators **3**.

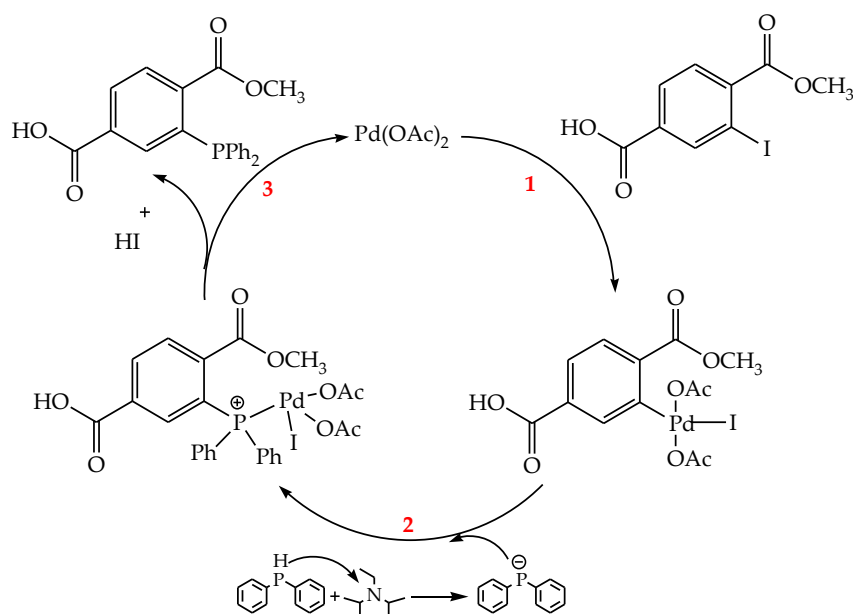


Abbildung 96: Reaktionsmechanismus zur Darstellung von MDT

- 1: oxidative Addition des 1-Methyl-2-iodoterephthalat an das Palladium(II)acetat
- 2: Insertion vom Diphenylphosphan-Anion zw. der Palladium- und Arylfunktion
- 3: reduktive Eliminierung unter Freisetzung des Produktes MDT sowie des Katalysators

Für eine optimale Synthese des MDTs mit Ausbeuten von 41-55% wurde unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet. Nach vier bis fünf Stunden Reaktionsdauer bei etwa 80 °C erfolgte die Reinigung des aufkonzentrierten Rohproduktes in mehreren Waschschritten mit Wasser und 1 M Salzsäure. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels, Dichlormethan, konnte der gelbe Feststoff nach Reinigung mit Methanol rein erhalten werden. Die mehrfachen Reinigungsschritte erklärten die geringe Ausbeute. Die Literatursausbeute beträgt 73%.^[69]

Das Reagenz konnte in weiteren Kopplungsreaktionen zum einen mit kommerziellen Polymeren, wie mPEGs, und zum anderen mit den im Arbeitskreis Weller dargestellten Diblock-Copolymeren, PI-*b*-PEO, verwendet werden.

4.13.2 Kopplungsreaktion des Staudinger-Reagenzes an Methoxypolyethylenglycolamin (Modellreaktion)

Anhand verschiedener kommerziell erhältlicher Polymere sollte die Kopplungsreaktion des Staudinger-Reagenzes modellhaft gezeigt werden. Aufgrund der einfachen Struktur wurde ein kurzkettiges Methoxypolyethylenglycolamin (mPEG-NH₂) (M ~ 2000 g/mol) als Reaktionspartner gewählt. Die terminale Aminogruppe dieses Polymers war einem elektrophilen Angriff leicht zugänglich, so dass hier ein optimaler Umsatz erwartet werden konnte. Bei erfolgreicher Kopplung

des MDTs kam es zur Ausbildung einer stabilen Amidbindung. Die Reaktion wurde abgewandelt nach Literatur ^[74] durchgeführt (Abb. 97).

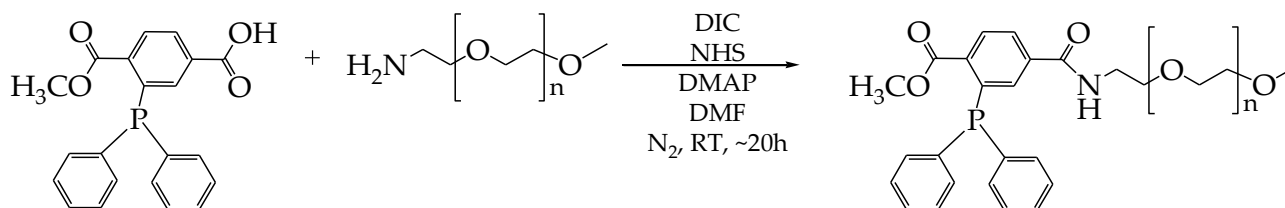


Abbildung 97: Kopplungsreaktion des aktivierten NHS-Esters mit einem mPEG

Mechanismus:

Zunächst wird das aktivierende Kupplungsreagenz *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) an die Carbonsäurefunktion des 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalates geknüpft unter Bildung eines Aktivesters **1**. Dieser reagiert dann mit dem *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zum hydrolysestabilen NHS-Ester **2**. Die „aktivierte Carbonsäure“ kann auf Grund der hohen Nukleofugie der NHS-Gruppe leicht mit Aminofunktionen zum entsprechenden Amid reagieren.

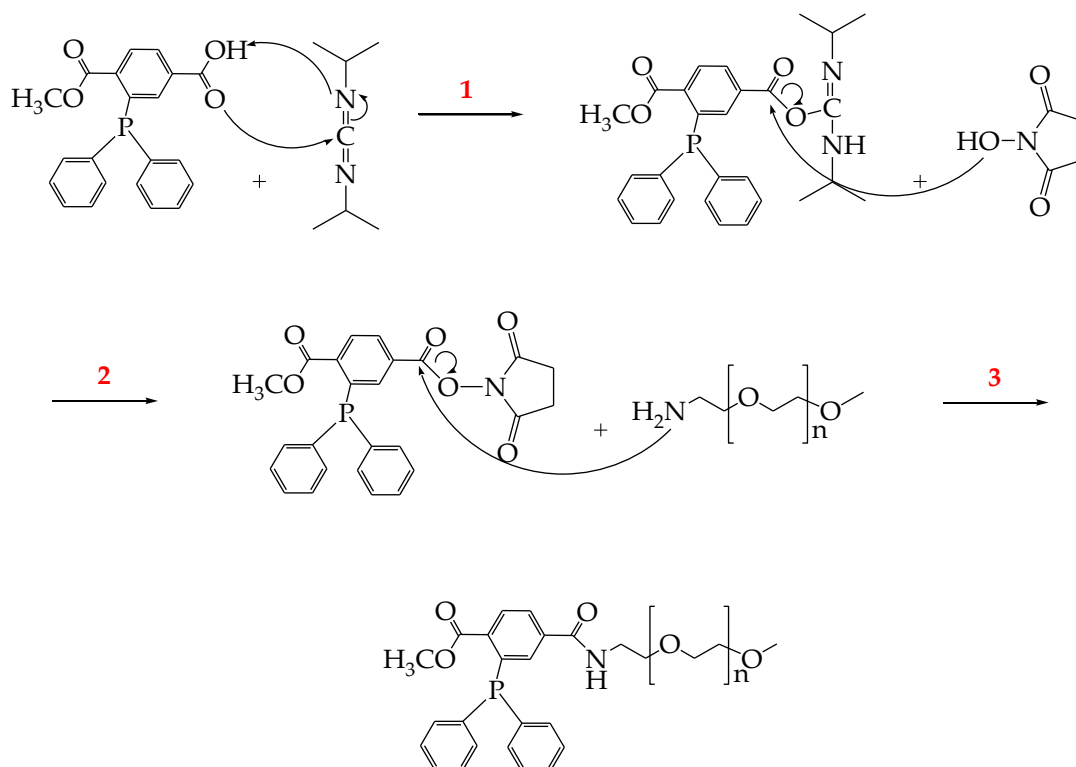


Abbildung 98: Reaktionsmechanismus zur Kopplung des MDTs an ein Polymer

1: Bildung eines Aktivesters von MDT unter Verwendung von DIC

2: Reaktion zum NHS-Ester

3: Kopplung der aktivierten Carbonsäure mit dem aminfunktionalisierten Polymer

In diesem Beispiel fand die Reaktion mit dem aminfunktionalisierten mPEG statt, was schließlich das gewünschte Produkt lieferte **3** (Abb. 98).

Dazu wurde das MDT mit NHS in Dimethylformamid (DMF) gelöst und unter Zugabe von DIC zur Reaktion gebracht. Nach einer halben Stunde wurde dann das Polymer hinzugefügt, welches mit dem aktivierten MDT koppeln konnte. Zur Beschleunigung der Kopplungsreaktion wurde der Acylierungskatalysator 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) zugesetzt und die Reaktionslösung für mindestens einen Tag unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Zur Reinigung des erhaltenen Kopplungsproduktes wurde es zunächst mit eiskaltem Diethylether gefällt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Fällung in einem Gefrierschrank oder im Eisbad durchgeführt. Der so erhaltene farblose, voluminöse Feststoff, wurde anschließend in Ethanol gelöst und bei -20 °C bis maximal 0 °C auskristallisiert.

Für die optimalen Reaktionsbedingungen wurden verschiedene Parameter, wie Reaktionstemperatur, Reaktionsdauer und Reaktandenüberschüsse untersucht.

Anhand der vorliegenden Stöchiometrie wurden das Polymer und das MDT äquimolar eingesetzt. Bei einer Reaktionsdauer von mindestens 19 bis 22 Stunden konnten bei Raumtemperatur Ausbeuten von 86% bis 94% erzielt werden. Allerdings waren NMR-spektroskopisch Verunreinigungen vorhanden. Es konnten neben den Signalen des Produktes auch die der Edukte bzw. Nebenprodukte aufgezeigt werden. Die Umsetzung der Reaktanden zum Produkt lag hier bei 18% bis 45%. Anhand dieser großen Spanne wird deutlich, dass keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden konnten. Gründe für die Schwankungen könnte eine unvollständige Umsetzung zum Aktivester des MDTs bzw. zum NHS-Ester sein. Weiterhin könnten die Zugänglichkeit der terminalen Aminogruppe, bzw. der sterisch anspruchsvollen MDT-Einheit durch Knäuelung der Polymerketten gehindert sein.

Da die Bildung des mit MDT-funktionalisierten mPEGs nicht den Erwartungen entsprach, wurde die Reaktion bei erhöhter Temperatur (40 °C) durchgeführt. Auch hier wurden die Reaktanden nicht vollständig umgesetzt. Die Ausbeute schwankte zwischen 27% und 50%.

Folglich wurde das MDT im 10fachen Überschuss zum Polymer eingesetzt, um zu gewährleisten, dass eine vollständige Umsetzung der Aminogruppen mit der aktivierten Form des MDTs zu gewährleisten. Nach Reaktion bei 40 °C über ein bis vier Tage wurden befriedigende Umsätze von 59% bis 68% erhalten.

4.13.3 Staudinger Ligation von mPEG-MDT mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid (Modellreaktion)

Das mit MDT funktionalisierte mPEG konnte nun mit organischen Aziden für die Staudinger Ligation verwendet werden. Bei der hier sogenannten *nicht spurlosen* Staudinger Ligation verbleibt die Phosphangruppe des MDT nach erfolgreicher

Kopplung mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid im Endprodukt (Abb. 99). Dieses war im ^1H -NMR spektroskopisch nachweisbar. Anhand der verbliebenen Phenyl-Protonen konnte die jeweilige Umsetzungsrate bestimmt werden.

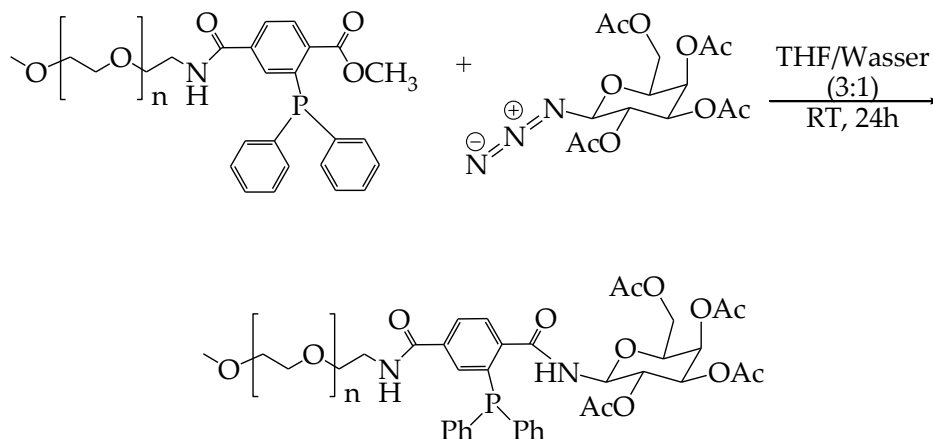


Abbildung 99: Staudinger Ligation von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid mit dem MDT-gekoppelten Polymer

Für die modellhafte Kopplung wurde 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid gewählt. Zur Bewertung für erfolgreiche Reaktionsumsätze können die Acetat-Gruppen NMR-spektroskopisch sehr gut nachvollzogen werden. Für biologische oder biochemische Anwendungen muss die entsprechende deacetylierte Form, das N-Galactosid, untersucht werden. Derartige Galactosylreste zeigen eine hohe Affinität zum Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R), ein Membranprotein, das von der menschlichen Leberzelllinie Hep-G2 im hohen Ausmaß exprimiert wird. [83,84] Durch die starke Bindung zu Glycoproteinen mit endständigen Galactose-Resten kann eine zelluläre Aufnahme erfolgen. Dieses System ist von großem Interesse für Studien zum rezeptorvermittelten Wirkstofftransport. [85]

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid-modifizierte fluoreszente Nanopartikel sollen hier galactosylierte Glykoproteine mimikieren, wobei die Spezifität der zellulären Aufnahmen in mikroskopischen Zelltests mit Hep-G2-Zellen untersucht werden sollen (siehe Kapitel 4.15). [86,87,88]

Ein großer Vorteil der Staudinger Ligation sind die milden Bedingungen. Es müssen keine hohen Temperaturen oder aggressive Chemikalien angewandt werden. Die Reaktion verläuft bei Raumtemperatur ein bis zwei Tage in einem Gemisch aus Wasser und Tetrahydrofuran (THF) (1:3). Hierbei konnten Ausbeuten von 70% bis 80% erhalten werden. [74,89] Dabei war es nicht erforderlich, 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid überschüssig zu verwenden. Dass der Zucker reproduzierbar gut verknüpft werden konnte, deutet scheinbar auf eine gute Zugänglichkeit der reaktiven Esterfunktion an der MDT-Einheit hin. Die Reinigung erfolgte anschließend durch Dialyse mittels Float A Lyzer im Wasser über mehrere Tage. Anschließend konnte das Produkt nach Trocknung nach Lyophilisierung rein erhalten werden.

4.13.4 Kopplungsreaktionen des Staudinger-Reagenzes an PI-*b*-PEO

Nachdem die Kopplung des Staudinger-Reagenzes mit dem kommerziellen, leicht zugänglichen Polymer (mPEG) reproduzierbare Ergebnisse lieferte, wurden die Reaktionsbedingungen auf das Diblock-Copolymer, Polyisopren-*b*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) übertragen. Dieses amphiphile Block-Polymer wurde von *Weller et al.* entwickelt und eignet sich hervorragend zur mizellaren Verkapselung hydrophober Nanopartikel zum Transfer in wässrige Lösungen. Dieser Ligand besteht zum einen aus dem hydrophoben Poly(isopren)- (PI) Block und der hydrophilen Polyethylenoxid (PEO)-Komponente (Abb. 100).^[90]

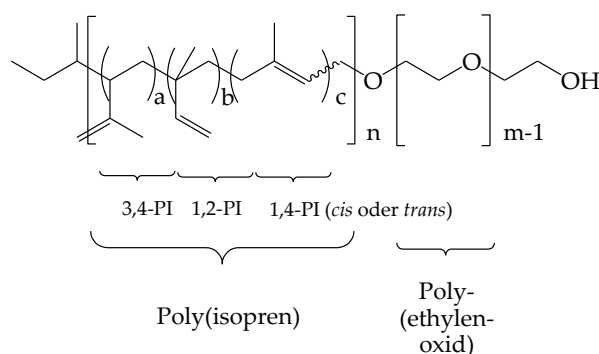


Abbildung 100: Chemische Struktur eines hydroxyfunktionalisierten Polyisopren-*b*-Polyethylenoxid (PI-*b*-PEO) - Diblock-Copolymers

Durch vielfältige Funktionalisierungsmöglichkeiten (-Aldehyd, -Alken, -Alkin, -Amin, -Azid, -Boronsäureester, -Carbonsäure, -Epoxid, -Halogen, -Hydroxyl, -Pentafluorophenylester, -Thiol, etc.) findet dieses Polymersystem bedeutende Anwendungsmöglichkeiten bei diversen biologischen Kopplungsstrategien.^[91]

Hier sollte nun das Polymer mit dem Staudinger-Reagenz (MDT) verknüpft (Abb. 101) und anschließend zur Staudinger Ligation verwendet werden.

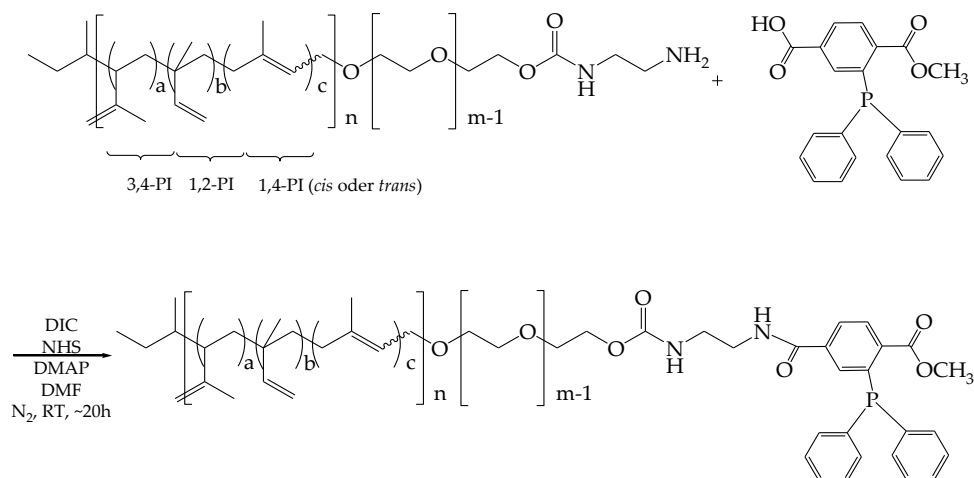


Abbildung 101: Kopplungsreaktion vom PI-*b*-PEO-Diblock-Copolymer mit dem Staudingerreagenz MDT

Die Reaktion konnte problemlos in DMF bei Raumtemperatur für etwa 20 bis 23 Stunden unter Zugabe der entsprechenden Reagenzien durchgeführt werden. Aber auch hier zeigte sich ein bedeutsamer Effekt bei der Variation an MDT-Überschuss bezüglich des Polymers. Während beim Einsatz gleicher Äquivalente Umsätze von bis zu 36% erhalten wurden, konnten diese bei Reaktionen mit 10fachem MDT-Überschuss auf 90% erhöht werden. Dies waren sogar bessere Ergebnisse als bei dem einfachen kurzkettigen mPEG. Die Reinigung erfolgte durch Fällung mit eiskaltem Diethylether und anschließender Kristallisation aus Ethanol. Die recht hohen Ausbeuten waren mit 77% bis annähernd 100% ähnlich wie beim kommerziellen mPEG.

4.13.5 Staudinger Ligation von PI-*b*-PEO-MDT mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

Der Versuch, die Reaktionsbedingungen des gekoppelten 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid an das Diblock-Copolymer zu übertragen, gelang problemlos (Abb. 102).

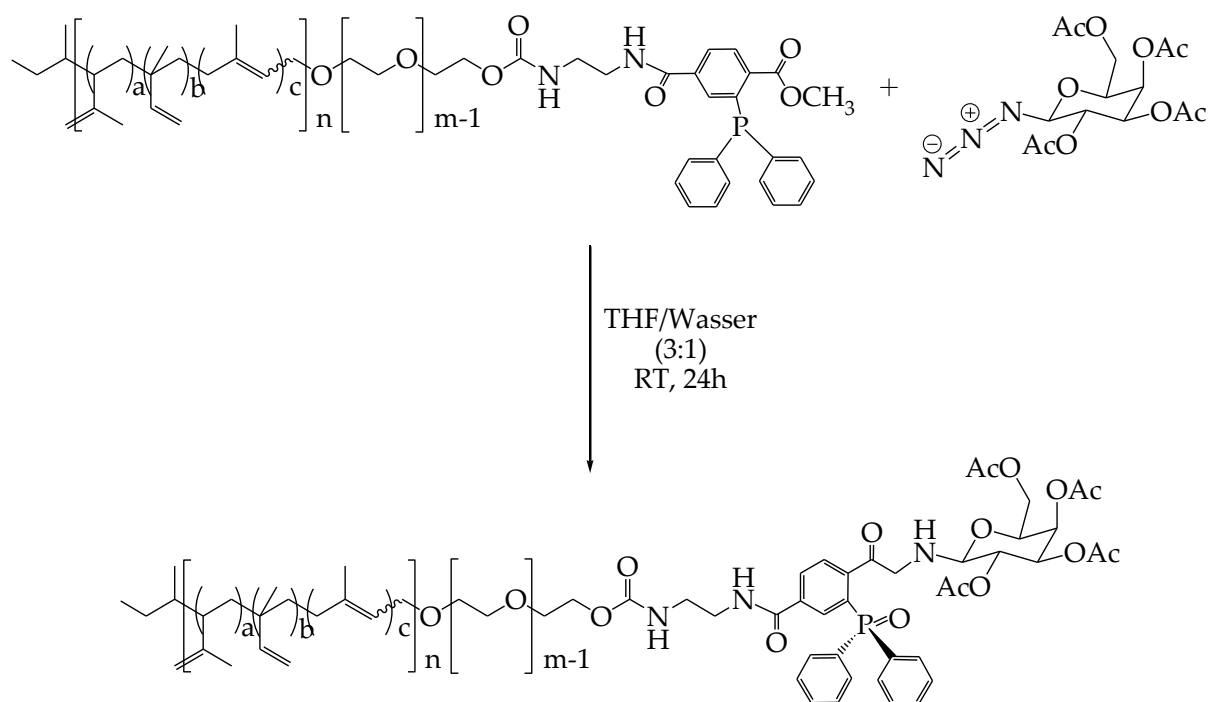


Abbildung 102: Staudinger Ligation von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid mit dem MDT-gekoppelten PI-*b*-PEO

Das MDT-funktionalisierte Diblock-Polymer PI-*b*-PEO löste sich erst allmählich im Wasser-THF-Gemisch. Auch hier konnte die Reaktion nach 20 bis 24 Stunden

erfolgreich beendet werden. Wie schon bei der Kopplung von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid mit dem mPEG-NH-MDT erwähnt, war auch hier kein Überschuss an 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid erforderlich. Eine erfolgreiche Konjugation erfolgte mit äquimolarem Einsatz der Reaktanden. Die NMR-Daten waren teilweise durch die zahlreichen Polymersignale (Polyisopren und Polyethylenoxid) kaum auswertbar. Die vereinzelt Staudinger-Produkte, die NMR-spektroskopisch auswertbar waren, zeigten Kopplungsumsätze hinsichtlich der im Zucker vorhandenen Acetatgruppen von 27% bis nahezu >95%. Diese doch sehr starken Schwankungen konnten auf die teilweise recht schwer zugänglichen Polymermoleküle zurück zu führen sein. Das verwendete PI-*b*-PEO hatte eine hohe Molmasse ($M \sim 12000$ g/mol) und wies auf Grund der zahlreichen Isopren- und Ethylenoxid-Einheiten große Probleme bei der Kopplung der Zuckermoleküle auf. Es war möglich, dass nur ein Teil der langen Polymerketten, die kinetisch als Knäuel vorliegen, optimal für die Zuckermoleküle angreifbar sind. Dann wiederum gab es Molekülketten, deren Reaktionszentrum für das Kopplungsreagenz unzugänglich war. Die Reinigung erfolgte auch hier unproblematisch mittels Dialyseverfahren über mehrere Tage in Wasser und anschließende Trocknung durch Lyophilisierung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Staudinger Ligation im Modellversuch an einem aliphatischen Polymer (mPEG-NH₂) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid reproduzierbare Ergebnisse mit Umsätzen bis 65% lieferte.

Die Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die Kopplung von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid mit dem Diblock-Copolymer (PI-*b*-PEO) war unproblematisch. Allerdings schwankten die Ausbeuten an gekoppelten Zuckermolekülen stark, vermutlich weil die terminale MDT-Gruppe im hochmolekularen Polymer sterisch blockiert ist.

Die so erhaltenen Ergebnisse wurden schließlich auf fluoreszierende Nanopartikel, umhüllt mit der hydrophilen PI-*b*-PEO-OH-Schicht übertragen. An diesem Polymer sollte zunächst das Staudinger-Reagenz MDT gekoppelt werden, um anschließend mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid zum Konjugationsprodukt zu reagieren.

4.13.6 Kopplungsreaktion des Staudinger-Reagenzes an QDs und anschließende Staudinger Ligation mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

Die Kopplung des Staudinger-Reagenzes erfolgte an drei verschiedenen Nanopartikel-Liganden-Systemen.

Zum einen wurden die standardisierten sphärischen Kern/Schale/Schale-Halbleiternanopartikel CdSe/CdS/ZnS verwendet.

Zum anderen wurden die stäbchenförmigen Dot/Rods CdSe/CdS zum Vergleich untersucht.

Beide Partikelsysteme wurden durch den Ligandenaustausch mittels der bereits erwähnten Spritzenpumpenmethode mit dem Diblock-Polymer, PI-*b*-PEO, ins Wasser überführt. Hierbei wurden allerdings schon unterschiedliche Polymer-Überschüsse verwendet, da die Größe und Beschaffenheit der Partikel stark voneinander abweichen. Anschließend erfolgte die Trennung von entstandenen leeren Polymermizellen mittels Sucrosegradienten.

Als ein drittes vergleichendes Partikelsystem wurden die sphärischen CdSe/CdS/ZnS-QDs mit einer anderen Polymerhülle ins Wasser überführt und anschließend mittels Staudinger Ligation gekoppelt. Hierbei diente ein dreizähliger Thiolligand zum Ligandenaustausch, der im Vorfeld unter einfachen Bedingungen modifiziert nach der Literatur ^[73] synthetisiert wurde.

Die zur anschließenden Staudinger Ligation verwendeten QDs bzw. QD/QRs sind hydroxyfunktionalisiert. Bisher wurden allerdings immer aminfunktionalisierte Polymere verwendet, da diese eine signifikant höhere Nukleophilie aufweisen.

Bei der Verkapselung von hydrophoben CdSe/CdS/ZnS-Partikeln mit dem hydroxyfunktionalisierten Diblock-Copolymer (PI-*b*-PEO-OH) erfolgt zunächst ein Ligandenaustausch mit PI-N3. (siehe Kapitel 2.8.2) Dies ist ein kurzkettiges Polyisopren mit einer terminalen 2,2'-Diaminodiethylamin-Funktion, die als Ankergruppe fungiert. Durch Selbstassemblierung des amphiphilen Polymers schließt sich eine Mizellenbildung an, die durch radikalische Polymerisation der Isopren-Einheiten stabilisiert werden.

An den weiteren Biokonjugationsreaktionen sind mutmaßlich nicht die terminalen Hydroxygruppen der PI-*b*-PEO-OH-Hülle, sondern nicht oberflächengebundene Amingruppen des PI-N3-Polymers beteiligt. Daher ist die Bestimmung von vorhandenen Amin-Gruppen unumgänglich. Als Testreagenz wird Trinitrobenzensulfonsäure (*Trinitrobenzene sulfonic acid*, TNBSA) verwendet, die mit Aminen reagiert. Das erhaltene gelbe Produkt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 335 nm. Mittels Kalibrierung mit Glycin als Referenzsubstanz wird der Amingehalt spektroskopisch bestimmt.

Das Durchführen von reproduzierbaren Reaktionen setzt die Verwendung von immer gleichbleibenden Stoffmengen der Reaktanden voraus. Bei aminfunktionalisierten QDs sind 80-150 Amin-Gruppen auf einer Mizelle vorhanden. Der Amintest bei hydroxyfunktionalisierten QDs weist einen Anteil von 30 bis 40 Aminen pro Mizelle auf.

Die ersten Versuche zur Umsetzung des Staudinger-Reagenzes mit amin- und hydroxyfunktionalisierten Nanopartikeln ergaben zunächst keine Unterschiede. Die Reaktionen wurden unter denselben bereits erwähnten Bedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.13.2, Abb. 98). Zunächst erfolgte die Aktivierung von MDT mit NHS und DIC in DMF. Anschließend wurde die Nanopartikel-Lösung und DMAP der

Reaktionslösung zugefügt. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur für 20 bis 25 Stunden. Das Staudinger-Reagenz MDT wurde im 1000fachen Überschuss eingesetzt. Ohne Reinigung des Zwischenproduktes wurden die Azido-Zucker, 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid bzw. 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid sowie 6-Azido-6-deoxy-D-glucose, äquimolar den mit MDT konjugierten QDs beigelegt. Die Staudinger Ligation verlief 24 Stunden bei Raumtemperatur. Zur Reinigung und Abtrennung überschüssiger MDT- und Zuckerderivate wurde die Reaktionslösung zunächst mittels Viva Spin 30000 MWOC zentrifugiert, mehrfach mit Wasser „gewaschen“ und schließlich spritzenfiltriert. Diesem Prozess schloss sich die Reinigung über den Sucrose-Gradienten an.

Im Vergleich zwischen eingesetzten amin- und hydroxyfunktionalisierten QDs zeigten sich nach der Staudinger Ligation Unterschiede. Während die hydroxyfunktionalisierten Partikel problemlos umgesetzt werden konnten, waren die konjugierten Amin-Teilchen nach der Kopplung nicht mehr stabil und aggregierten. Ein Grund hierfür könnte eine unzureichende Qualität und Stabilität der hydrophoben Nanopartikel sein, die verschiedenen Chargen entstammten.

In zukünftige Studien müssen Nanopartikel aus demselben Herstellungsprozess amin- und hydroxyfunktionalisiert für die Staudinger Ligation hinsichtlich des Reaktionsverhaltens und der Stabilität der Konjugationsprodukte vergleichend untersucht werden. Die Beschaffenheit der Polymere (Länge, lineare oder verzweigte Struktur) und somit die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen sind ebenso maßgebend für eine erfolgreiche Reaktion.

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung von Zell-Aufnahme-Studien solcher unterschiedlich gekoppelter Nanopartikel (siehe Kapitel 4.15).

4.14 Spurlose Staudinger Ligation

4.14.1 Darstellung des Raines-Reagenzes

Das sogenannte Raines-Reagenz (Diphenylphosphan)methanthiol (DPPM) sollte nach erfolgreicher Kopplungsreaktion mit Polymeren zur *spurlosen* Staudinger Ligation eingesetzt werden. Dieses konnte in einer Zweistufensynthese aus dem Acetylthiomethyldiphenylphosphan-Boran-Komplex isoliert werden (Abb. 103 und 104). Im Vergleich zum Staudinger-Reagenz MDT wurde bei der Kopplung von Azido-Zuckern die aromatische Phosphaneinheit unter Umlagerungsprozesse abgespalten. Es verbleibt eine stabile Amidbindung zwischen dem Ausgangspolymer und dem verknüpften Zucker.

Der sauerstoffempfindliche Komplex wurde mittels 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) in absolutem und entgastem Toluol deboraniert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit 1 M Salzsäure und gesättigter Natriumchlorid-Lösung

gewaschen. Als Produkt wurde der farblose Feststoff S-((Diphenylphosphan)methyl)ethanthioat) erhalten (Abb. 103). ^[71, 92,93]

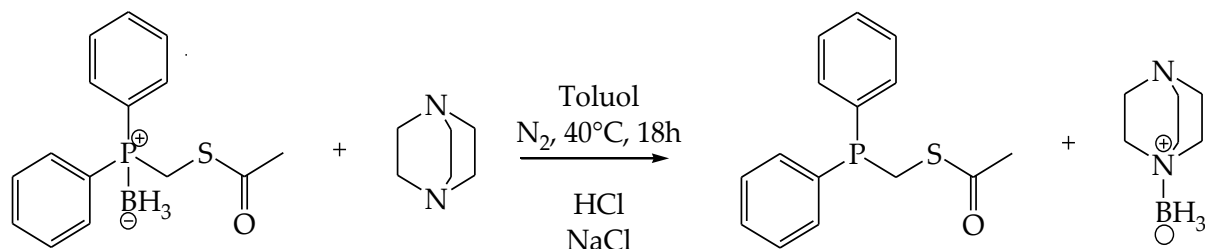


Abbildung 103: Deboranierung vom Acetylthiomethyldiphenylphosphan-Boran-Komplex

Unter Beachtung einer sauerstofffreien Reaktion konnten Ausbeuten bis 79% erhalten werden (die Literaturausbeute beträgt 95%). ^[71] Im NMR-Spektrum zeigten sich neben dem Hauptprodukt noch weitere Signale vom Edukt, DABCO und Lösungsmittel. Selbst nach mehrfachen sorgfältigen Reinigungsschritten konnten diese Verunreinigungen nicht entfernt werden. Folglich konnte das Endprodukt nicht rein erhalten werden. ^[94,95]

Die Reaktion des zweiten Syntheseschrittes wurde in Methanol unter Zugabe von 2 M Natronlauge unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Nach anschließender Entfernung des Lösungsmittels wurde der Reaktionsansatz mit Salzsäure versetzt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Das farblose, teilkristalline Produkt (DPPM) wurde im Vakuum getrocknet. Eine spezifische Angabe der Umsetzung war auf Grund der Verunreinigungen nicht möglich.

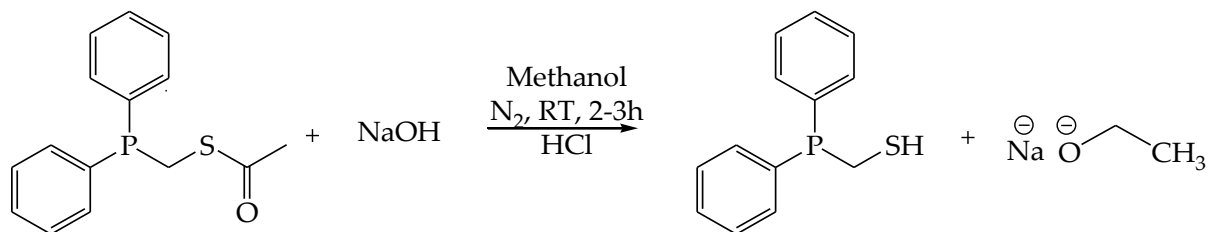


Abbildung 104: Darstellung des Raines-Reagenzes (Diphenylphosphan)methanthiol

Für fortführende Reaktionsversuche wurde das teilkristalline DPPM in DMF gelöst. Es wurden Modellreaktionen an zwei kommerziellen Polymeren, die sich in ihrer Funktionalität unterschieden, durchgeführt. Weiterführend sollte die Knüpfung des Raines-Reagenzes an das Diblock-Copolymer (PI-*b*-PEO-COOH) untersucht werden.

4.14.2 Kopplungsreaktion des DPPM an Methoxypolyethylenglycolen (Modellreaktionen)

Für die Kopplungsreaktionen des Raines-Reagenzes wurden zwei kommerziell erhältliche Polymere gewählt:

Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure und

Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester.

Beide Polymere bestehen aus einheitlichen PEG-Molekülen mit unterschiedlichen Carboxyfunctionalitäten. Diese eignen sich für Kopplungsreaktionen, im Fall für mPEG-Essigsäure mit den Aktivierungreagenzien CDI- oder DCC, zur Knüpfung stabiler Amidbindungen. Die Kopplungsreaktion erfolgte hier nicht über eine Amin-Gruppe sondern an einer endständigen Thiol-Einheit des Raines-Reagenzes. Nach diesem Reaktionsschema kommt es zur Ausbildung einer Thioester-Bindung zwischen dem Polymer und dem Phosphan nach *Raines*.

Die Kopplungsreaktion des bereits aktivierten mPEG-essigsäure-N-succinimidylesters mit dem Raines-Reagenz DPPM erfolgte in DMF bei Raumtemperatur bzw. bei 40 °C für etwa 24 Stunden unter Abspaltung des Succinimidylesters (Abb. 105). Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt zunächst durch Fällung mit eiskaltem Diethylether und anschließender Kristallisation mit Ethanol. Es konnten Ausbeuten um die 30% erhalten werden.

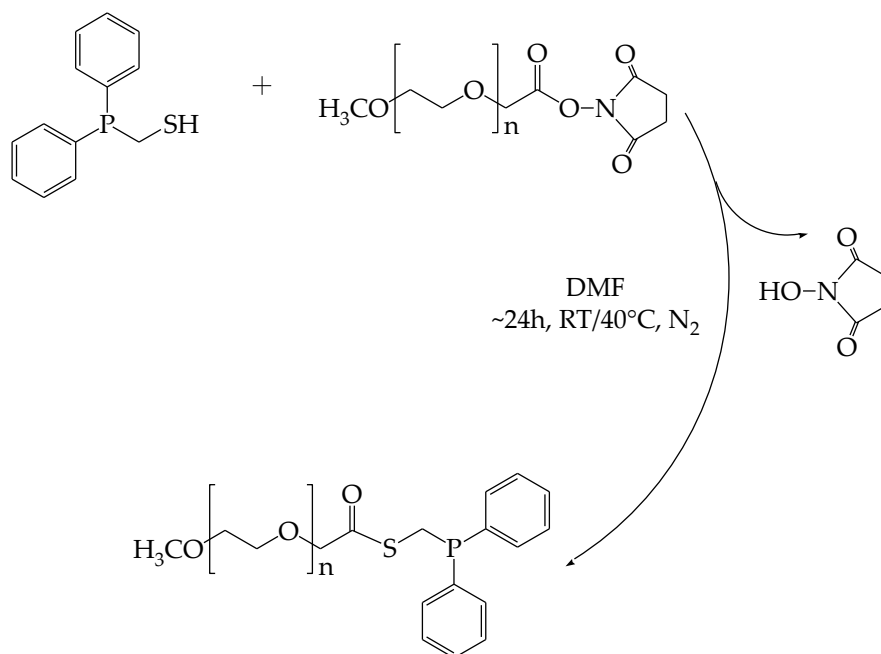


Abbildung 105: Kopplung des (Diphenylphosphan)methanthiol über die N-succinimidylester-Einheit des mPEGs

Bei der mPEG-essigsäure erfolgte zunächst die Aktivierung der Carboxy-Funktion mit DCC bzw. CDI. Die erforderlichen Reaktionsbedingungen der jeweiligen Aktivierungsform sind in Abb. 106 dargestellt.

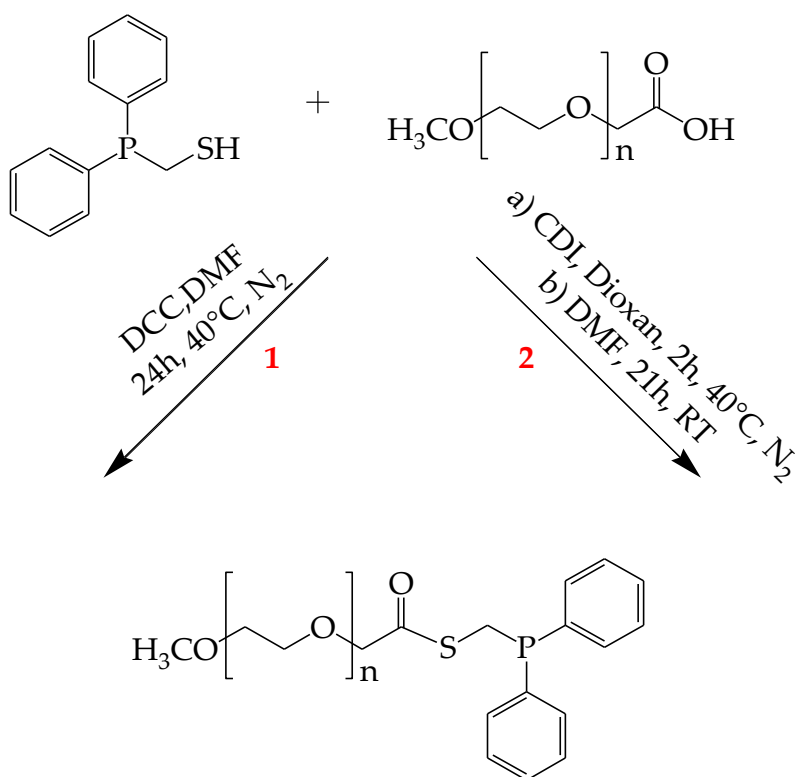


Abbildung 106: Kopplung des (Diphenylphosphan)methanthiol über die entsprechende Carboxyeinheit der Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure. Dazu sind zwei verschiedene Wege unterschiedlicher Kopplungsreagenzien (Dicyclohexylcarbodiimid – DCC und N,N'-Carbonyldiimidazol – CDI) dargestellt.

4.14.2.1 Reaktionsmechanismus zur DCC-Kopplung

Eines der häufigsten verwendeten Kopplungsreagenzien in der Peptidsynthese ist N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid **b** (Abb. 107).^[96]

Die DCC-Kopplung wurde in DMF unter Stickstoffatmosphäre für 24 Stunden bei 40 °C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Diethylether gefällt, im Ethanol auskristallisiert und anschließend getrocknet. Unter den gegebenen Bedingungen konnten keine Kopplungsprodukte mit dem Raines-Reagenz erhalten werden.

Die Reaktion findet an der terminalen Carboxy-Funktion der Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure **a** statt. Dies führt zur Bildung des

Aktivesters, einem *O*-Acylisoharnstoff **c**. Aufgrund der Wasserunlöslichkeit des DCCs findet die Kopplungsreaktion im organischen Lösungsmittel statt **1**.

Der als Nebenprodukt entstehende Dicyclohexylharnstoff (DCH) **e**, ist ebenfalls unlöslich in Wasser **2**. Damit lassen sich überschüssiges DCC und entstandenes DCH durch Reinigung mit organischen Lösungsmitteln entfernen.

Die DCC-Kopplung führt allerdings ein Problem mit sich. Vor allem im aprotischen, organischen Milieu (wie DMF) kommt es zur spontanen Bildung des inaktiven *N*-Acylisoharnstoff aus dem *O*-Acylisoharnstoff. Dies kann schließlich zu einer unvollständigen Umsetzung des Polymers mit dem DCC führen und erklärt die geringen bzw. gar keinen Umsätze dieser Reaktion.

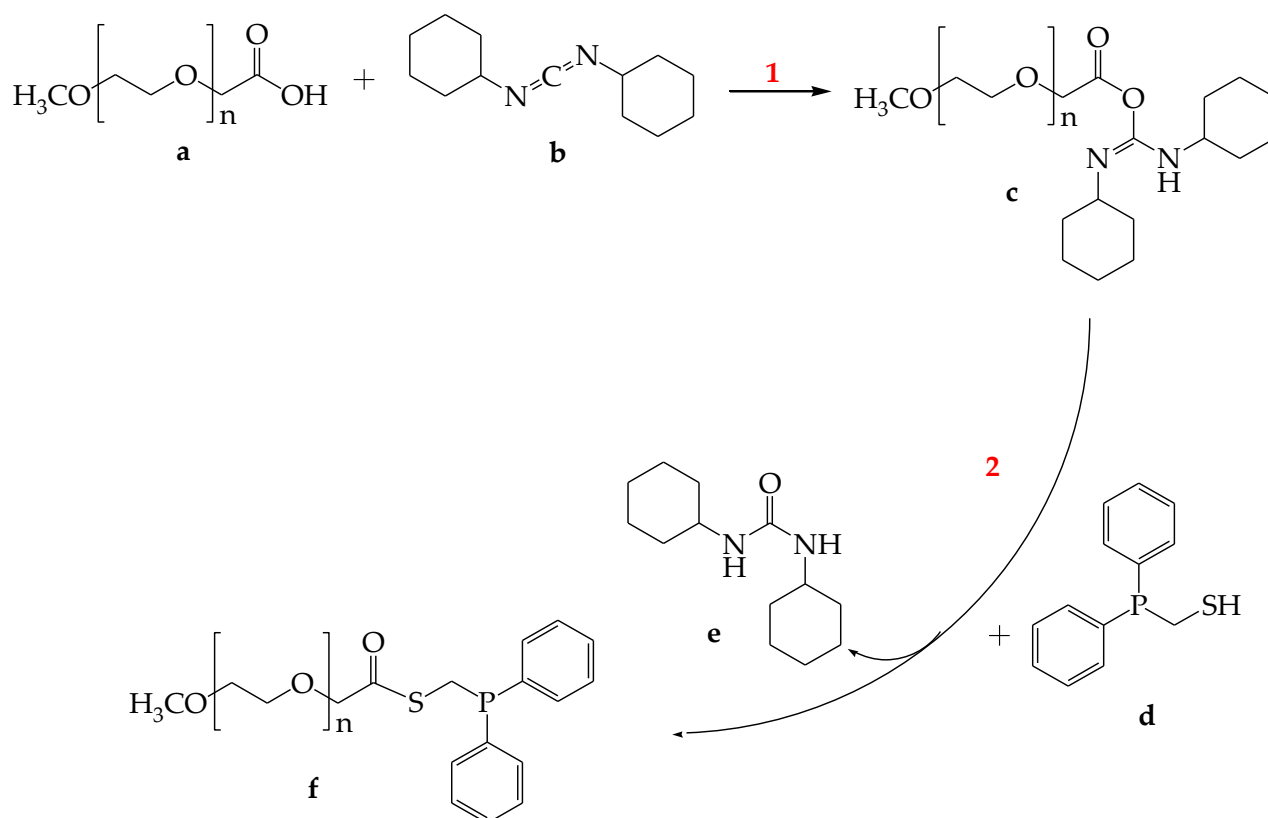


Abbildung 107: Reaktionsmechanismus zur DCC-Kopplung

Die NMR-spektroskopischen Daten zeigten zum Teil gekoppeltes Polymer, das selbst nach mehrfachen Reinigungsschritten mit Ethanol noch Verunreinigungen durch vorhandene Nebenprodukte aufweist. Weiterhin waren keine Signale der Phenyl-Protonen vom Raines-Reagenz im NMR-Spektrum nachweisbar. Aufgrund der geringen Menge an vermessener Probe sowie den hohen Polymeranteil könnte das bei einer Verschiebung von 7.37 ppm zu erwartende Aromaten-Signal im „Rauschen“ verschwinden.

4.14.2.2 Reaktionsmechanismus zur CDI-Kopplung

Eine zweite Methode zur Kopplung von carboxyfunctionalisierten Molekülen verläuft über die Aktivierung mit Carbonyldiimidazol **b** (CDI) (Abb. 108). Dieses Reagenz wird ebenfalls zur Darstellung aktivierter Carboxy-Verbindungen in der Peptidsynthese verwendet. [96]

Hierbei reagierte die Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure **a** mit CDI in Dioxan zwei Stunden bei 40 °C unter Stickstoffatmosphäre. Unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid und Imidazol bildete sich die aktive Zwischenstufe **c**, N-Acylimidazol. Dieses CDI-aktivierte mPEG wurde zunächst mit kaltem Diethylether als farbloser Niederschlag aus der Lösung gefällt und filtriert, um überschüssiges Kopplungsreagenz und Nebenprodukte zu entfernen. Anschließend erfolgte die Kopplungsreaktion mit dem thiolfunctionalisierten Raines-Reagenz **d** in DMF bei Raumtemperatur für 21 Stunden unter Abspaltung von Imidazol. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte zunächst durch Fällung mit eiskaltem Diethylether und anschließender Kristallisation mit Ethanol. Das NMR-Spektrum zeigte eine unvollständige Umsetzung zum Produkt **e** auf.

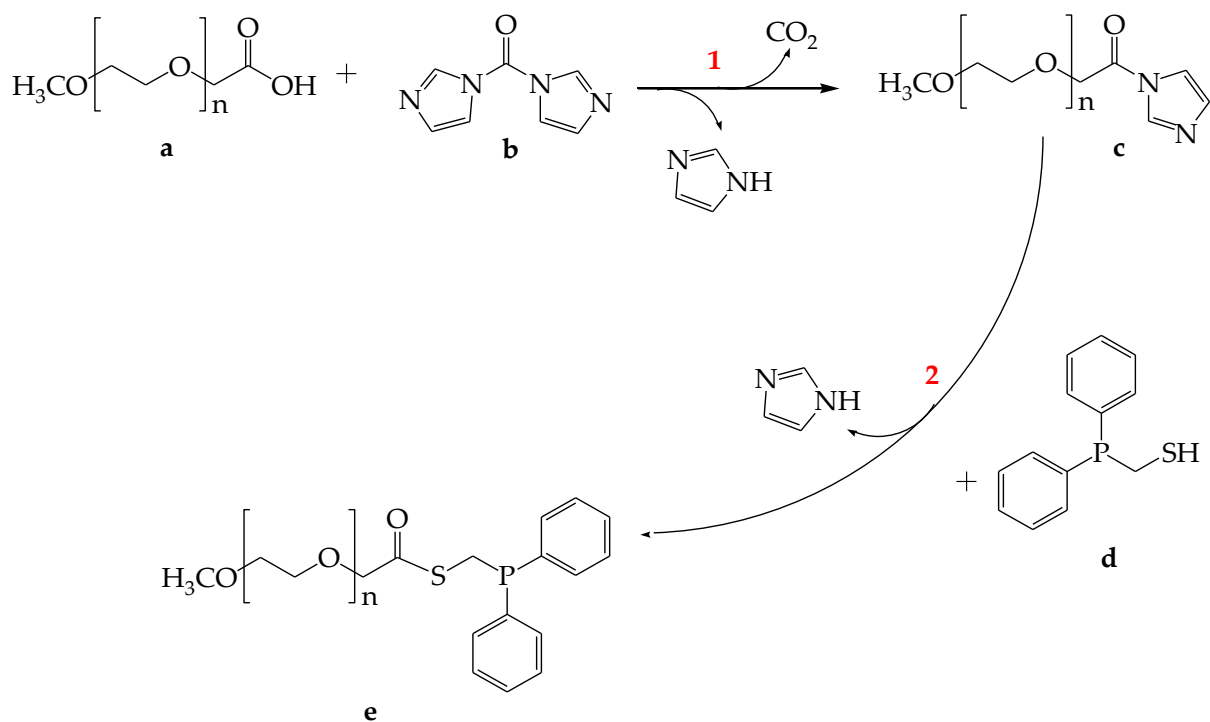


Abbildung 108: Reaktionsmechanismus zur CDI-Kopplung

Die Umsetzung der CDI-aktivierten Methoxypolyethylenglycol-5000-essigsäure lieferte Ausbeuten von 35%. Im ^1H -NMR-Spektrum waren jedoch keine Signale im aromatischen Bereich bei einer Verschiebung von 7.37 ppm detektierbar. Auch hier

wirkte sich der hohe Protonenanteil im Polymer problematisch bei der Signalzuordnung aus.

Die Kopplungsreaktion über die Aktivierung der Carboxy-Einheit des Polymers mit CDI lieferte bessere Ergebnisse als unter Verwendung mit DCC.

4.14.3 Staudinger Ligation diverser mPEGs mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid (Modellreaktionen)

Trotz teilweise verunreinigter und nicht vollständig umgesetzter mPEGs mit DPPM wurden Ligationsversuche nach Staudinger mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid durchgeführt (Abb. 109).

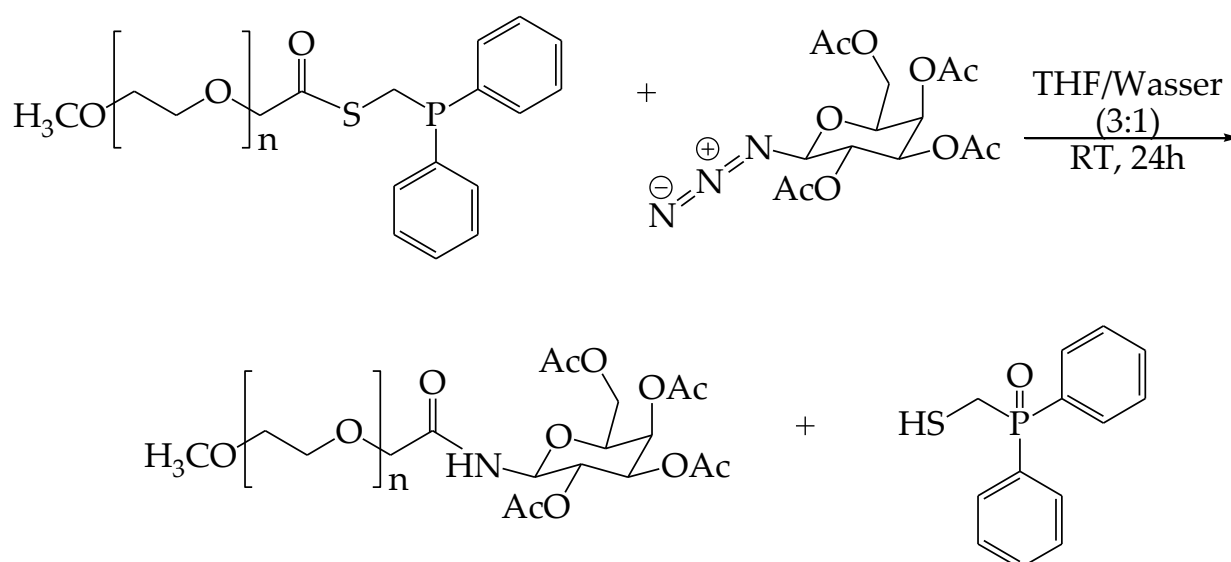


Abbildung 109: Schematische Darstellung der Staudinger Ligation nach Raines und Bertozzi.^[70, 71, 72]

Nach mehrfachen Reaktionsversuchen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden. Die Umsetzung des Zuckers mit dem jeweiligen „Raines“-Polymer wurde äquimolar in einem Gemisch aus THF und Wasser (3:1) bei Raumtemperatur für 24 Stunden durchgeführt. Das Produkt wurde anschließend durch Dialyse mittels Float A Lyzer mehrere Tage mit Wasser gereinigt. Es konnten Umsetzungen bis zu 67% erhalten werden. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte noch Signale vom Raines-Molekül, obwohl diese Ligation unter Abspaltung der Phosphaneinheit verläuft. Diese schlechten Umsetzungen der Reaktion sind bereits in der Literatur bekannt.^[71] Für zukünftige Arbeiten sollten chromatographische Reinigungsverfahren untersucht und den entsprechenden Eigenschaften der verwendeten Polymere und Zucker angepasst werden.

Diese Untersuchungen waren beim Umfang dieser Arbeit nicht mehr möglich.

4.14.4 Kopplungsreaktionen des Raines-Reagenzes an Diblock-Polymeren

Für die Kopplungsreaktion des Raines-Reagenzes mit einem carboxy-funktionalisiertem Diblock-Copolymer (PI-*b*-PEO-COOH) wurde die Aktivierung über DCC durchgeführt. Dazu reagierte DPPM im 10fachen Überschuss mit dem Polymer in DMF 20 Stunden bei Raumtemperatur (Abb. 110). Das gekoppelte Polymer wurde mit eiskaltem Diethylether gefällt und anschließend durch Kristallisation aus Ethanol isoliert. Das ^1H -NMR-Spektrum wies keine produktspezifischen Signale auf. Es fehlten die charakteristischen Signale im Aromatenbereich bei 7.37 ppm sowie das zu erwartende Signal der CH_2 -Gruppe bei 3.05 ppm. Da das Polymer mit einer Molmassen von 13800 g/mol sehr groß ist, schien die Zugänglichkeit der Carboxy-Einheit schwierig. Nach kinetischer Betrachtungsweise liegen solche Polymere in Knäuelform vor. Je größer solche Polymere sind, desto schwieriger werden Kopplungsreaktionen an den funktionellen Endgruppen.

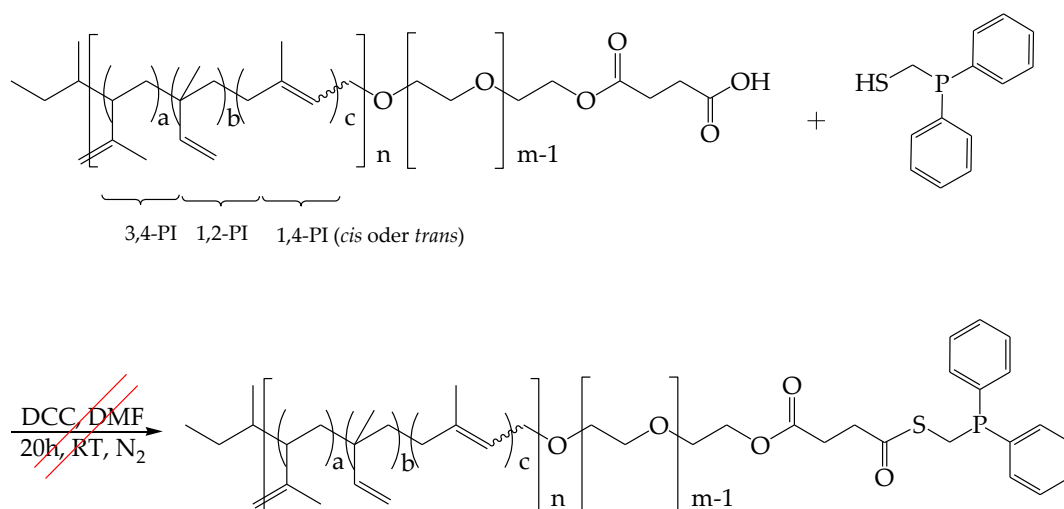


Abbildung 110: Kopplung von PI-*b*-PEO-COOH an DPPM über die DCC-Methode. Diese Reaktion lieferte nicht das gewünschte Konjugationsprodukt.

Reaktionsversuche zur Kopplung von DPPM an das Diblock-Copolymer mit CDI-Aktivierung wurden analog der Reaktion in Kapitel 4.14.2. beschrieben, durchgeführt. Die gewünschten Kopplungsprodukte konnten auch unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich dargestellt werden.

4.14.5 Staudinger Ligation von Diblock-Polymeren mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

Da die Verknüpfung des Diblock-Polymers mit dem Raines-Reagenz nicht funktionierte, konnte keine Staudinger Ligation mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid durchgeführt werden. Nach Möglichkeit sollte das herkömmliche Staudinger-Verfahren in einem Gemisch aus THF und Wasser (3:1) angewandt werden. Für die Reinigung könnte Dialyse in Wasser oder eine chromatographische Reinigung erfolgen. Abbildung 111 zeigt den geplanten Reaktionsablauf mit dem PI-*b*-PEO.

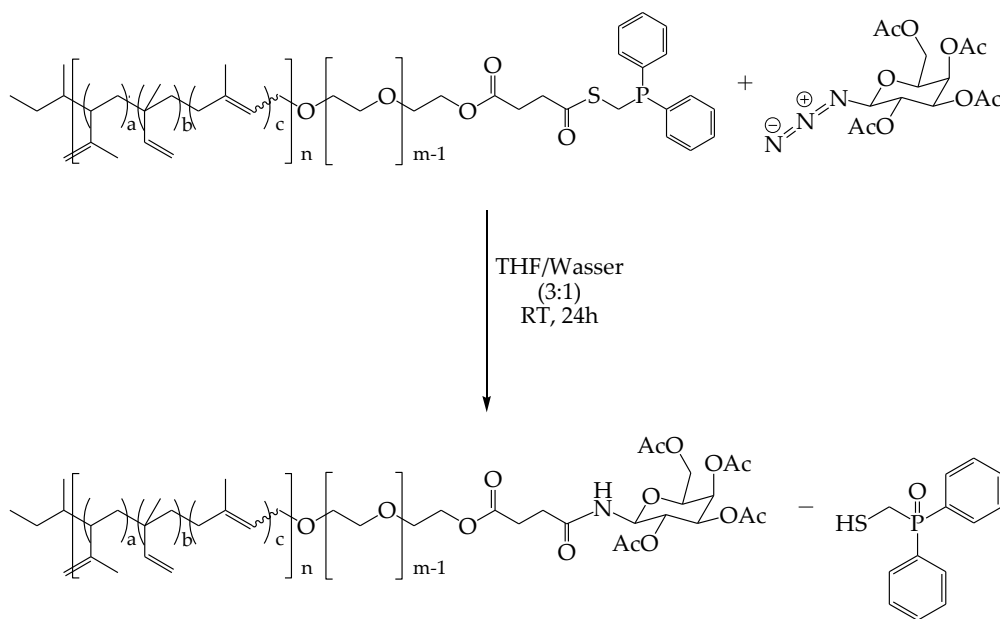


Abbildung 111: Theoretischer Reaktionsverlauf zur Staudinger Ligation von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid mit einem PI-*b*-PEO-Diblock-Copolymer

Fazit:

Für eine erfolgreiche Kopplungsreaktion zwischen Polymeren und Biomolekülen brachte die *nicht spurlose* Staudinger Ligation zufriedenstellende Ergebnisse hervor, die in Zukunft noch weiter untersucht und optimiert werden müssen. Die *spurlose* Ligationmethode lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. Während die Kopplungsreaktionen mit den kommerziellen mPEGs Produkte mit geringen Ausbeuten lieferte, waren mit den Diblock-Copolymer keine Umsetzungen möglich. Es müssen wahlweise bei beiden Kopplungsmechanismen die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur, Reaktandenüberschüsse oder Wahl der Lösungsmittel sowie die Reinigungsprozesse weiter untersucht und optimiert werden. Auch die Wahl der Kopplungsreagenzien sollte variiert und hinsichtlich der Staudinger- und Raines-Reagenzien genauer untersucht und aufeinander abgestimmt werden. Es wäre vielleicht so möglich, ein breites Spektrum an gekoppelten Polymeren für die *spurlose* und *nicht spurlose* Staudinger Ligation zu bekommen.

4.15 Zell-Aufnahmestudien von Nanopartikeln

Die nachfolgenden Kapitel zeigen die Ergebnisse der Zell-Aufnahme-Studien der mit Zucker modifizierten Nanopartikel mittels Staudinger Ligation.

Folgende Benennungen werden weiterführend verwendet:

NP1	CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-OH
NP1-Gal	CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Gal
NP1-Glu	CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Glu
NP2	CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-OH
NP2-Gal	CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT-Gal
NP2-Glu	CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT-Glu
NP3	CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-OH
NP3-Gal	CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Gal
NP3-Glu	CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Glu

Resultierend aus den zuvor beschriebenen Modellreaktionen wurden unter optimierten Bedingungen hydroxyfunktionalisierte QDs sowie QD/QRs mit MDT verknüpft, um anschließend 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid sowie 6-Azido-6-deoxy-D-glucose über die *nicht spurlose* Staudinger Ligation zu koppeln.

In Zellexperimenten sollten Unterschiede in den Affinitäten der Zucker hinsichtlich der Hep-G2-Zelllinie untersucht werden. Die Zellen exprimieren den ASGP-Rezeptor, der eine hohe Affinität zu Galactoseresten besitzt. ^[74] Folglich werden nur Interaktionen zwischen den Hep-G2-Zellen und den mit Galactose modifizierten QDs erwartet. Die mit Glucose konjugierten Nanopartikel sollen die entsprechende Negativkontrolle darstellen, da der Rezeptor gegenüber diesem Zucker keine Affinität besitzt. ^[76]

Hierzu wurden Aufnahmestudien der Partikel unter diversen Bedingungen, wie Varianz der Partikel-Konzentrationen und unterschiedlich lange Inkubationszeiten, getestet.

Für biologisch relevante Ergebnisse wurden die Zellstudien mit Partikelkonzentrationen von 50 nM bis 1000 nM im Zellmedium DMEM mit 10% FCS sowie Inkubationszeiten von zwei, vier und 12 Stunden durchgeführt. ^[97]

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die verwendeten Partikel derselben Konzentrationen und Inkubationszeiten ohne gekoppelten Zucker getestet. Die Studien erfolgten mit drei Partikelsystemen aus der Stabilitätsreihe:

- I. die sphärischen CdSe/CdS/ZnS-QDs modifiziert mit dem Diblock-Copolymer, PI-*b*-PEO-OH (entspricht dem Partikelsystem a der Stabilitätsreihe)

- II. die sphärischen CdSe/CdS/ZnS-QDs modifiziert mit dem mehrzähligen thiofunktionalisierten PEO-Liganden, $(SH)_3$ -PEO-OH (entspricht dem Partikelsystem **e** der Stabilitätsreihe)
- III. die elongierten CdSe/CdS-QD/QRs modifiziert mit dem Diblock-Copolymer, PI-*b*-PEO-OH (entspricht dem Partikelsystem **b** der Stabilitätsreihe)

Alle Zellversuche wurden schließlich mit der humanen Lungenkrebs-Zelllinie (A549) wiederholt. Diese sollten die Spezifität der Galactose-Affinität auf den Hep-G2-Zellen verdeutlichen. Die A549-Zellen sollten entsprechend keine Aufnahme von den Nanopartikeln aufzeigen.

Die optische Darstellung der Zellen erfolgte mittels dem *Thermo Scientific Cellomics® ArrayScan® VTI HCS Reader* (Abb. 112). Dabei handelt es sich um ein Mikroskop mit einem hoch quantitativen Aufnahmesystem (*High Content Screening*) für fluoreszierende Objekte und zur Analyse von fixierten und lebenden Zellen.



Abbildung 112: Thermo Scientific Cellomics® ArrayScan® VTI HCS Reader

Die optische Darstellung der Zellkerne erfolgte durch Färbung mit dem Farbstoff Hoechst33342 (Extinktion bei 350 nm, Emission bei 461 nm). Dieser ist zellpermeabel und bindet an alle Nukleinsäuren sowohl an lebenden als auch an toten Zellkernen. Im Fluoreszenzmikroskop können tote Zellen aufgrund ihrer erhöhten Intensität des eingelagerten Farbstoffes und der abgenommenen Größe der Kerne von vitalen Zellen unterschieden werden.

Für die Unterscheidung vom Kernfarbstoff und den aufgenommenen Nanopartikeln wurden bei der Untersuchung am *Thermo Scientific Cellomics® ArrayScan® VTI HCS Reader* zwei verschiedene Kanäle mit unterschiedlichen Filtern verwendet. Die Auswahl der Filter richtete sich nach den entsprechenden Anregungswellenlängen des fluoreszierenden Farbstoffes bzw. der Nanopartikel sowie deren Emissionsbereiche.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Zellkerne cyanblau und die Nanopartikel rot dargestellt. Es wurden zum Teil auch Autofluoreszenzen der Zellen deutlich, die dann ebenfalls schwach rot erschienen.

Zur Darstellung präziser artefaktfreier Bilder wurde ein Apotome als zusätzliche Mikroskopeinheit verwendet. Es können damit optische Schnitte und 3D-Darstellungen durch die Zellen erzeugt werden.

In Abb. 113 sind zunächst unbehandelte Hep-G2 Zellen dargestellt. Das linke Bild zeigt die Aufnahme eines Feldes im entsprechenden Well einer 96-Nunc-Platte mit dem 20x Objektiv. Die rechte Darstellung stellt zur besseren Verdeutlichung eine Vergrößerung des markierten Bereichs dar.

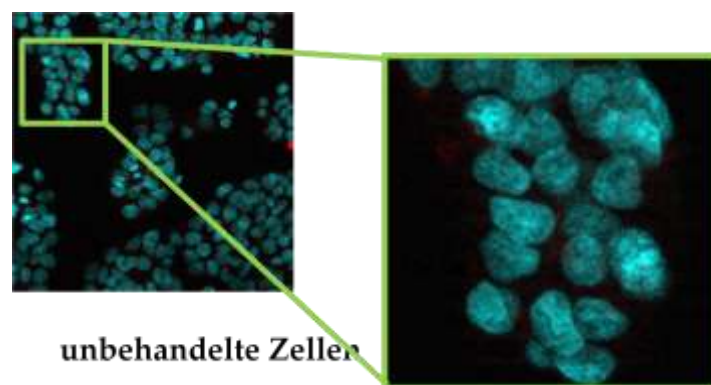


Abbildung 113: Darstellung unbehandelter Hep-G2 Zellen

4.15.1 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH (NP1)

Die nächsten Abbildungen zeigen die Zellkerne von behandelten Hep-G2 Zellen mit den PI-*b*-PEO-OH modifizierten QDs. Dazu wurden die Zellen für vier Stunden mit fünf verschiedenen Partikelkonzentrationen (1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM und 50 nM) inkubiert, anschließend mit DPBS gewaschen, mit dem Zellkernfarbstoff Hoechst33342 gefärbt und mittels Formaldehyd fixiert. In der Morphologie der Zellen waren keine Auffälligkeiten zu erkennen (Abb. 114). Allerdings wurde eine Partikel-Aufnahme der Zellen bei einer Konzentration von 50 nM deutlich. Dies ist sehr untypisch im Vergleich zu den übrigen getesteten Partikelkonzentrationen. Eventuelle zu dem Zeitpunkt der Inkubation auftretende Metabolismen der Zellen könnten eine Aufnahme fremdartiger Substanzen (hier die QDs) ermöglicht haben. Die übrigen Aufnahmen wiesen in vereinzelt Bereichen leichte Fluoreszenz der QDs auf, die möglicherweise von etwaigen Partikelrückständen herrühren, die durch die vorgenommenen Waschschrte nicht ausreichend entfernt werden konnten.

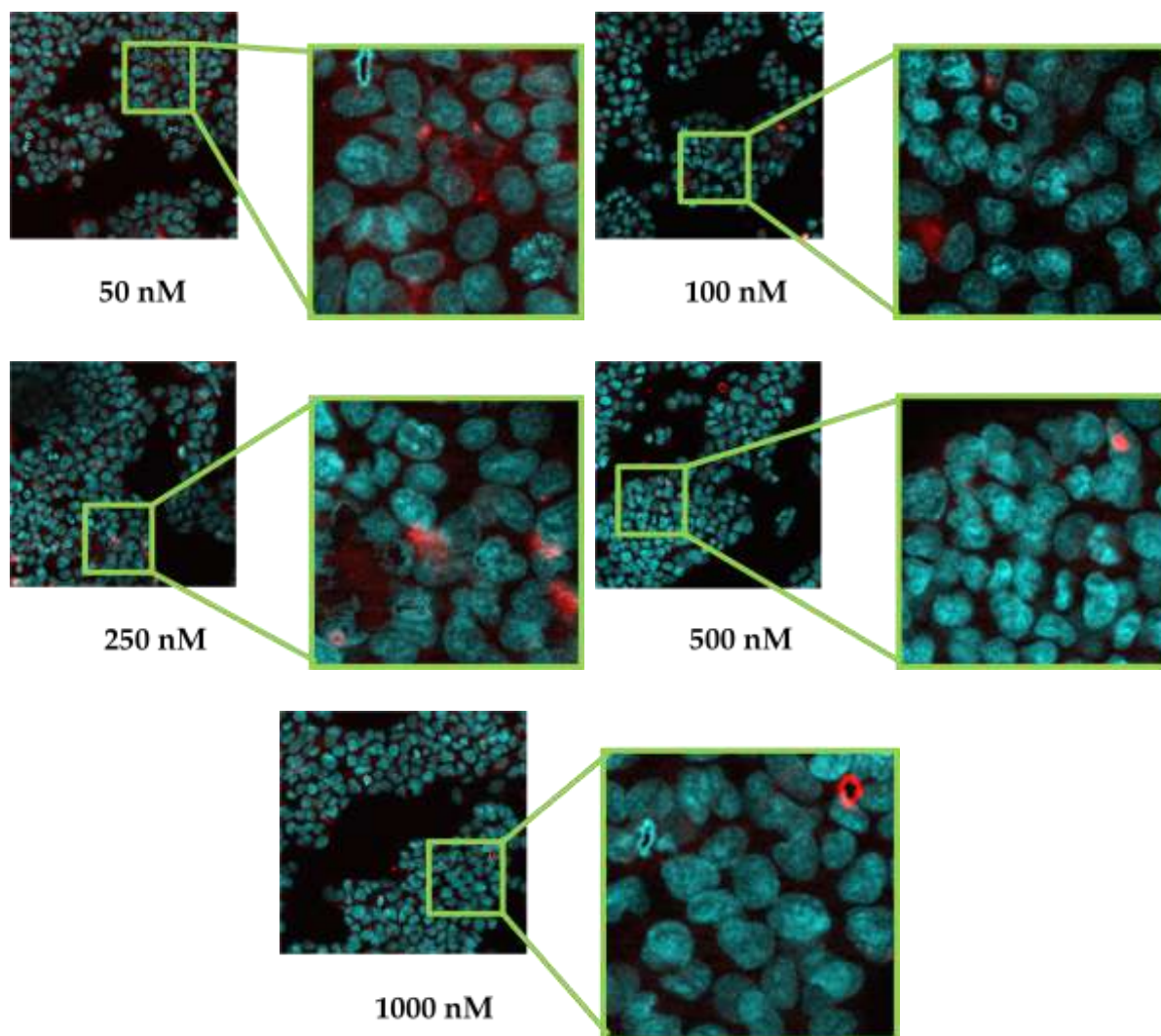


Abbildung 114: Bilder von Hep-G2-Zellen, die für vier Stunden mit verschiedenen konzentrierten NP1 (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM) inkubiert wurden. Die Teilchen sind hier rot dargestellt.

4.15.1.2 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-MDT konjugiert mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (NP1-Gal)

Die nachfolgenden Studien zeigten deutlich Aufnahmen von den QDs NP1-Gal (Abb. 115), die über das Staudinger-Molekül (MDT) mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid verknüpft waren (siehe Kapitel 4.13.6). Dies entsprach der spezifischen Zell-Aufnahme einer Galactose-Spezies bei Hep-G2-Zellen.

Dabei waren keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen erkennbar. Die Partikelaufnahme erfolgte in die Zellmembranen und war teilweise endoplasmatisch. Das heißt, spezifische Zellorganellen nahmen die Partikel besonders gut auf und leuchteten punktuell intensiver. Weiterhin zeigten die Zellen keine Abnormitäten in ihrer Form und Gestalt. Dieses Partikelsystem wies somit keine toxischen Effekte bei den untersuchten Konzentrationen auf.

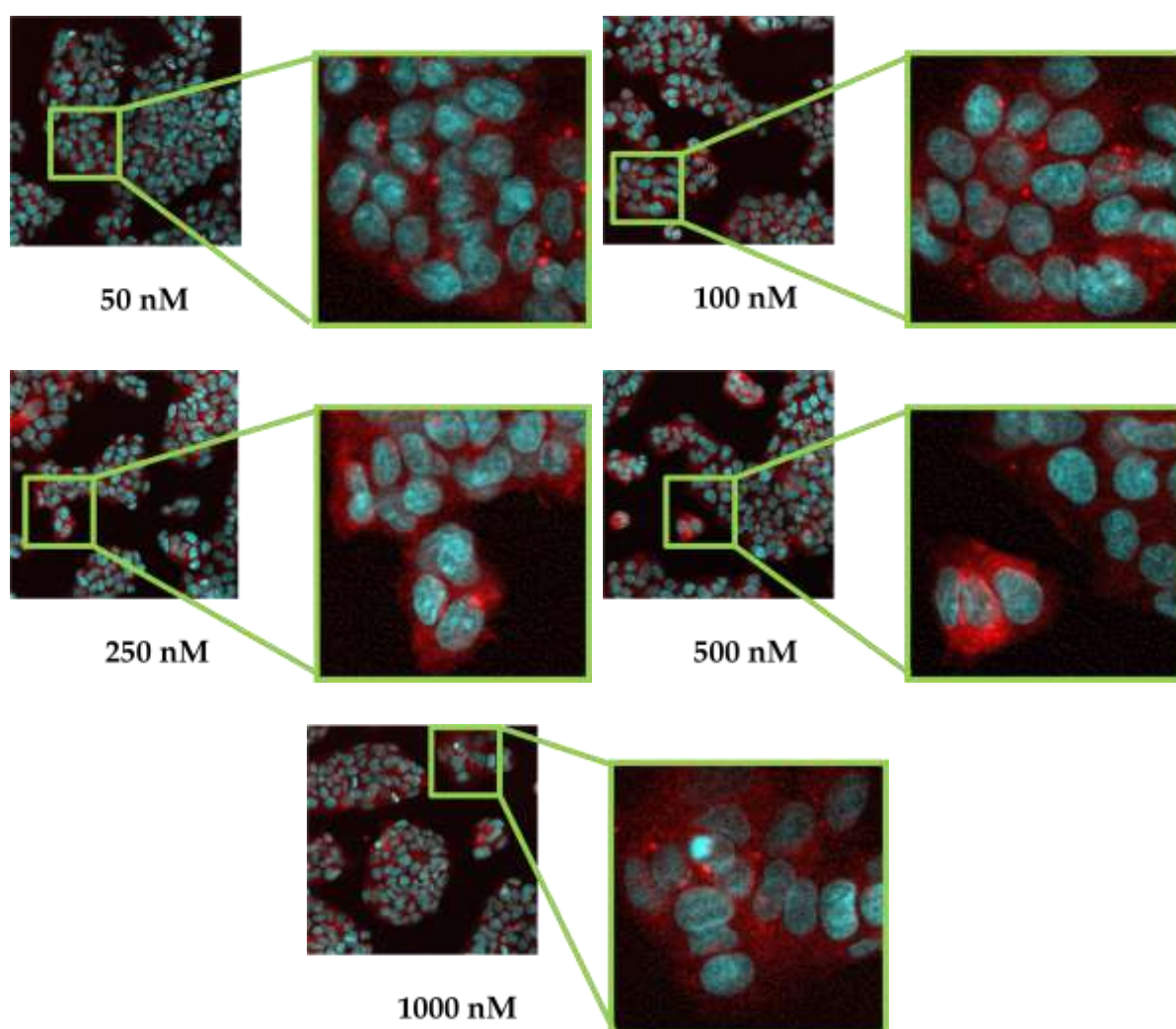


Abbildung 115: Bilder der Nanopartikelaufnahme an Hep-G2-Zellen von NP1-Gal (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Inkubationsdauer der Teilchen betrug vier Stunden. Bei allen Konzentrationen sind deutliche Aufnahmen erkennbar.

4.15.1.3 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-MDT konjugiert mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (NP1-Glu)

Die nachfolgenden Abbildungen stellten die entsprechenden Negativ-Versuche zu dem vorherigen Experiment dar. Die QDs wurden hier über dem MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose gekoppelt. Da Hep-G2-Zellen spezifisch Galactose aber nicht Glucose binden, sollten keine Partikel aufnehmen stattfinden.

Die Experimente bestätigten die theoretische Annahme. In den aufgenommenen Bildern waren keine Zell-Aufnahme der Partikel zu erkennen (Abb. 116).

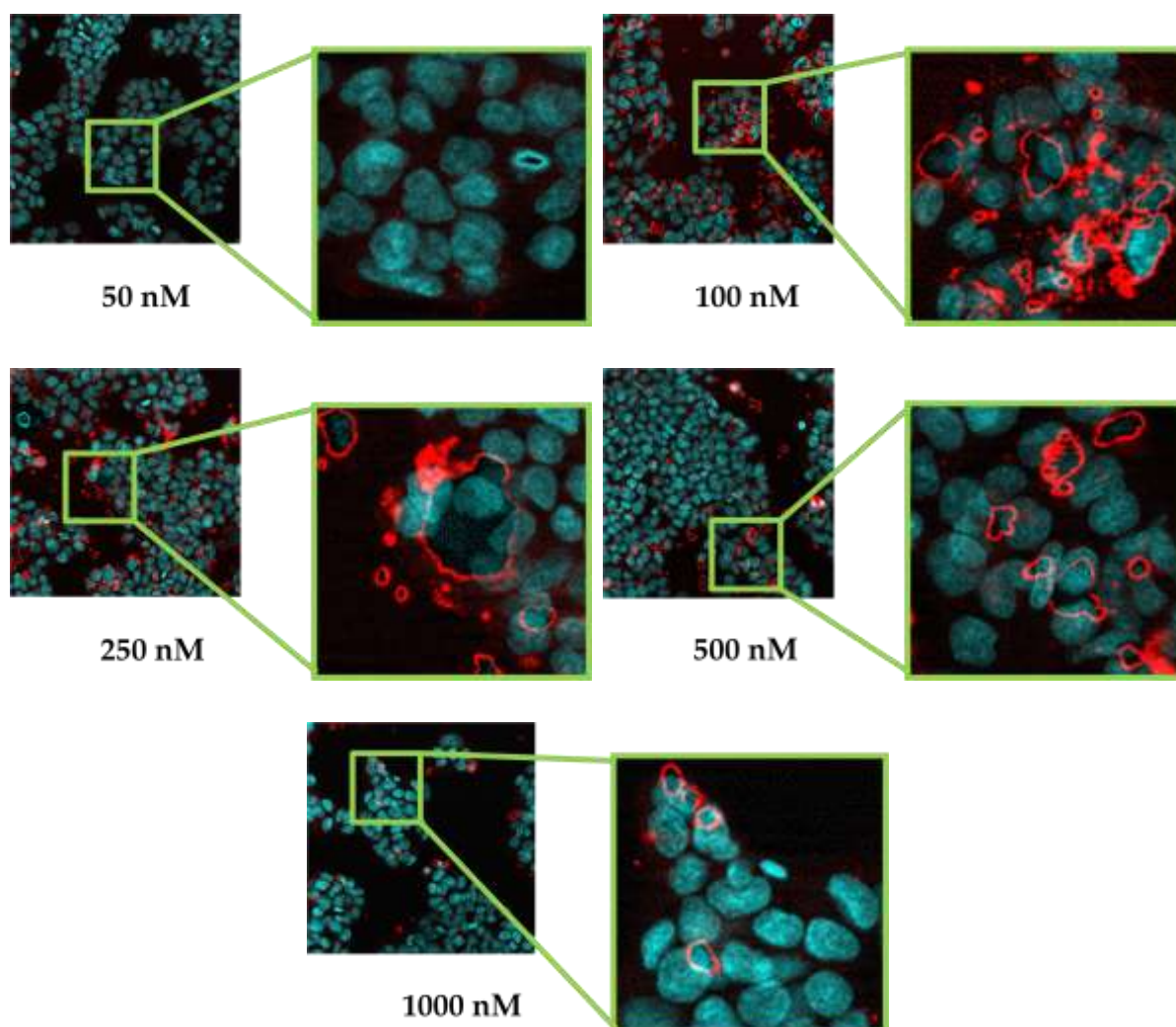


Abbildung 116: Bilder der Nanopartikelaufnahme an Hep-G2-Zellen von NP1-Glu (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Inkubationsdauer der Teilchen betrug vier Stunden. Es wurde keine Zell-Aufnahme sichtbar, lediglich bei den Konzentrationen 100 nM bis 1000 nM waren nicht weg gewaschene Partikelrückstände erkennbar.

Allerdings waren nach vier Stunden Inkubationszeit bei den vier höchsten Konzentrationen noch Partikelrückstände sichtbar, die scheinbar nicht restlos bei der Reinigung von den Zellen entfernt werden konnten. Diese erschienen in den Abbildungen ebenfalls rot und hafteten auf den Zellen. Bei diesen Aufnahmen waren durch die Apotome-Einstellungen ringförmige Strukturen der Partikel zu sehen. Sie erschienen bei sehr hohen Intensitäten. Durch den konfokalen Schnitt bildeten sich so derartige „Ring-Artefakte“.

In Abb. 117 ist vergleichsweise eine und dieselbe Aufnahme mit und ohne Apotome aufgenommen worden. Hier konnten die Auswirkungen der Einstellungen aufgezeigt werden. Während ohne Apotome die Zellen auf Grund ihrer dreidimensionalen Wachstumseigenschaft unscharf erschienen, wurden sie durch den konfokalen Schnitt präzise und klar dargestellt. Entsprechend waren die Effekte bei den Nanopartikeln ersichtlich.

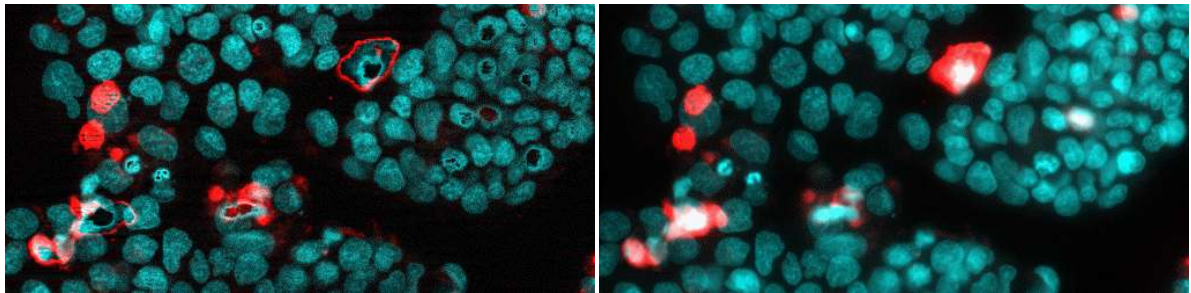


Abbildung 117: Unterschied derselben Aufnahme von Hep-G2-Zellen, *links* mit Verwendung des Apotomes und *rechts* ohne Apotome.

4.15.2. Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH (NP2)

Das zweite Partikelsystem unterscheidet sich vom ersten in dem hydrophilen Ligandensystem. Hier wurde an Stelle des mizellenbildenden Diblock-Copolymer ein mehrzähliger Thiolligand verwendet. Dieser war mit einer Molmasse von ~1000 g/mol sehr viel kleiner als das PI-*b*-PEO mit einer Masse von ~13900 g/mol. Entsprechend waren auch die Nanopartikel kleiner als die Mizellen von den QD-PI-*b*-PEO.

Die Hep-G2-Zellen zeigten bei den untersuchten Partikelkonzentrationen dieser QDs keine Aufnahmen (Abb. 118). Auffällig waren die Ergebnisse bei einer Konzentration von 500 nM. Hier hafteten die Partikel nach vierstündiger Inkubation teilweise auf den Zellen und konnten im Waschschrift nicht vollständig entfernt werden.

Die übrigen Partikelkonzentrationen zeigten in einigen Bereichen geringe Fluoreszenzen. Es kann hier nicht unterschieden werden, ob es sich um Autofluoreszenz-Artefakte der Zellen handelte oder eine tatsächliche Aufnahme der Partikel war.

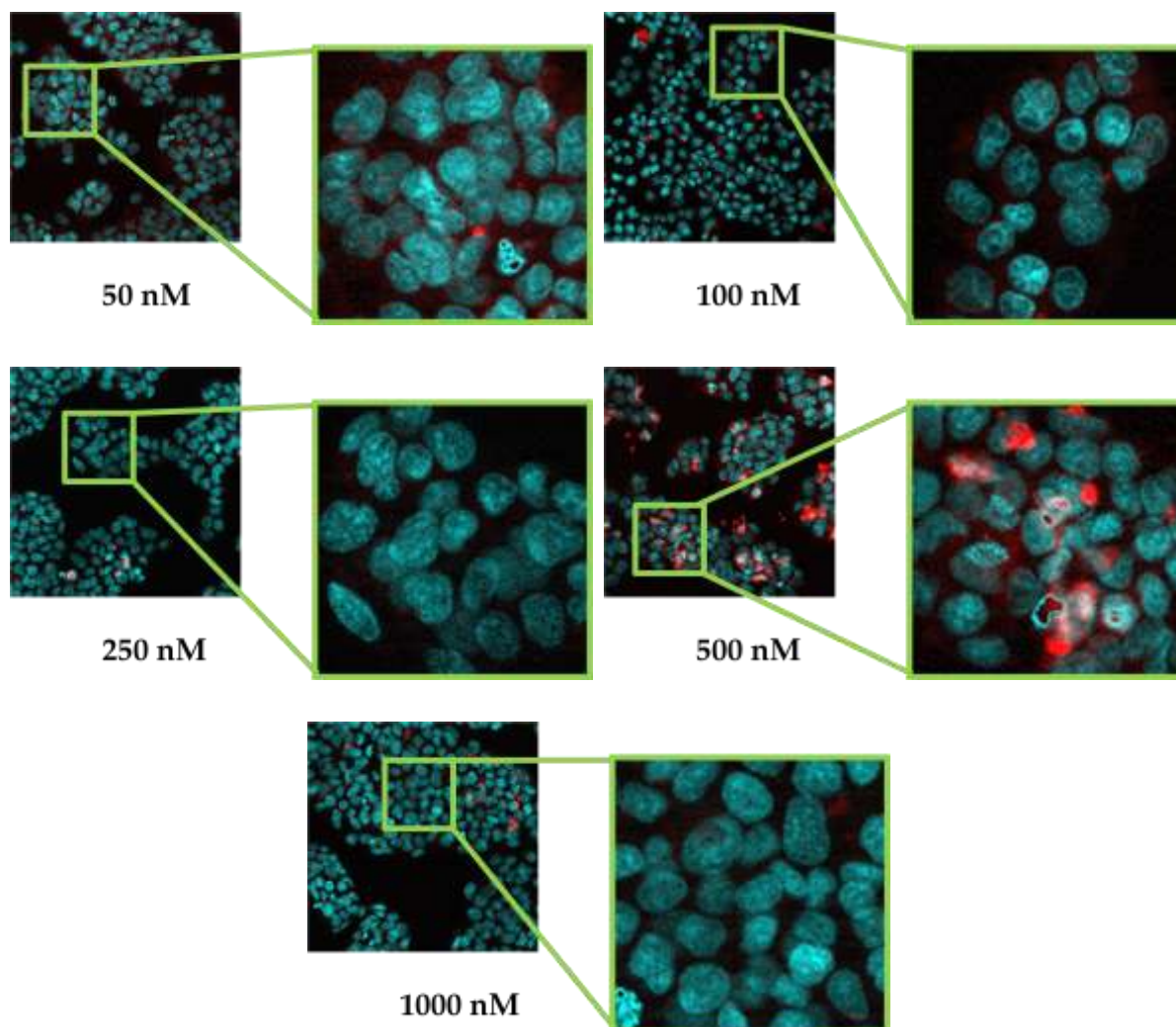


Abbildung 118: Bilder von Hep-G2-Zellen, die für vier Stunden mit verschiedenen konzentrierten NP2 (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM) inkubiert wurden.

4.15.2.1 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-MDT konjugiert mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (NP2-Gal)

Bei den Galactose-gekoppelten Nanopartikeln des Thiolligandensystems konnten deutliche Aufnahmen durch die Hep-G2-Zellen aufgezeigt werden (Abb. 119). Dies entsprach wieder den Erwartungen.

Hier waren optisch keine Unterschiede bei den verschiedenen Partikelkonzentrationen zu verzeichnen, die Partikelaufnahme durch die Zellen erfolgte hier konzentrationsunabhängig. Es waren somit schon geringe Mengen an NP2-Gal ausreichend.

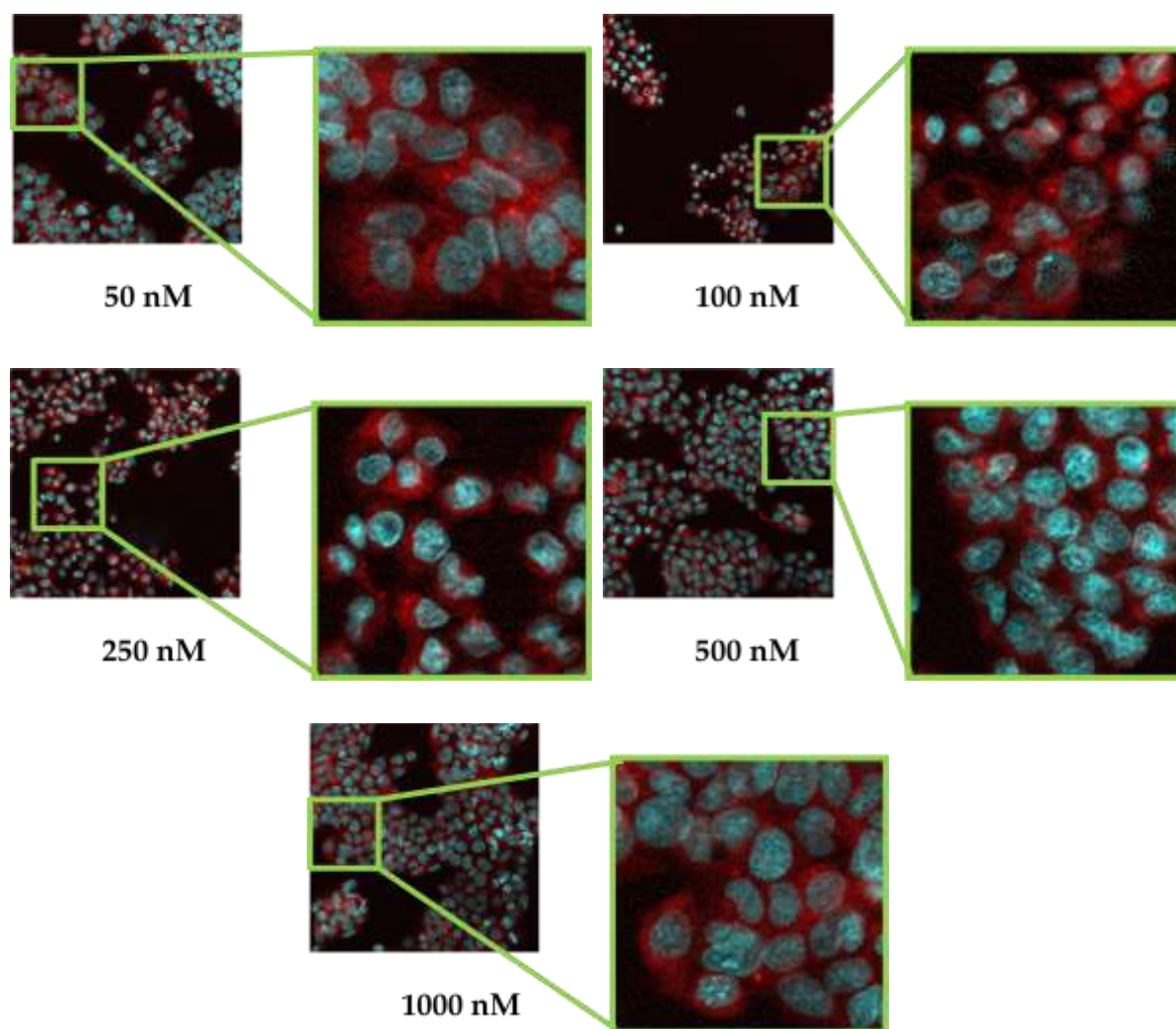


Abbildung 119: Bilder der Nanopartikelaufnahme an Hep-G2-Zellen von NP2-Gal (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Inkubationsdauer der Teilchen betrug vier Stunden. Bei allen Konzentrationen sind deutliche Aufnahmen erkennbar.

4.15.2.2 Zellaufnahmen von CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-MDT konjugiert mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (NP2-Glu)

Bei den Untersuchungen der mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose modifizierten Partikel fanden erwartungsgemäß keine Zellaufnahmen statt.

Es wurden nur vereinzelte Bereiche sichtbar, auf denen scheinbar Nanopartikel-Rückstände hafteten (Abb. 120). Hier konnte ein deutlicher Unterschied zu den Galactose-modifizierten Teilchen aufgezeigt werden. Während die Hep-G2-Zellen die NP-2-Gal spezifisch gebunden haben, zeigte das Glucose-Nanopartikel-System keine derartigen Affinitäten zu den Hep-G2-Zellen.

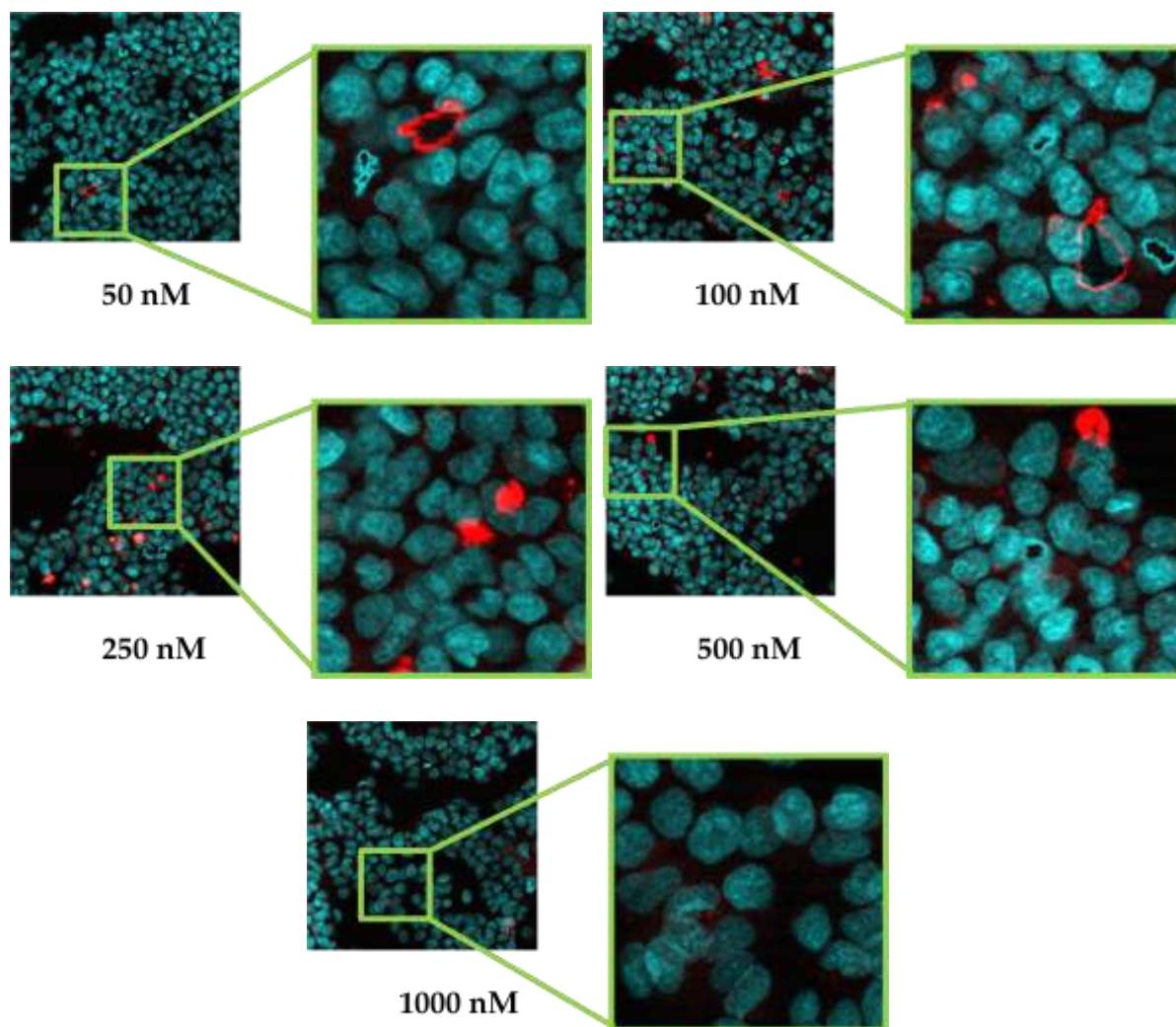


Abbildung 120: Bilder der Nanopartikelaufnahme an Hep-G2-Zellen von NP2-Glu (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Inkubationsdauer der Teilchen betrug vier Stunden. Es war keine Zell-Aufnahme sichtbar, lediglich zeigten die Konzentrationen 50 nM bis 500 nM Partikelrückstände auf.

4.15.3 Zellaufnahme von CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH (NP3)

Das dritte Partikelsystem besteht aus den stäbchenförmigen CdSe/CdS-Dot/Rods. Die Wasserlöslichkeit dieser Teilchen war wie auch beim ersten untersuchten Partikelsystem (NP1) durch das Diblock-Copolymer gegeben.

Ähnlich den Bildern des zweiten Teilchensystems (NP2) waren auch hier eventuelle Partikelrückstände auf den Zellen erkennbar sowie Autofluoreszenzeigenschaften durch die Zellen sichtbar (Abb. 121).

Es waren keine Partikel aufnehmen in die Zellen zu verzeichnen.

Allerdings kam es unter den gegebenen Bedingungen bei diesem Partikelsystem zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahl. Dies könnte eventuell durch etwaige Sucrosereste, die bei der Reinigung der Partikel möglicherweise in solchen verblieben, hervorgerufen worden sein. Durch diesen zusätzlichen Zuckergehalt, konnte anscheinend der Metabolismus der Zellen aktiviert werden, was eine sprunghafte Zunahme der Zellteilung zu Folge hatte.

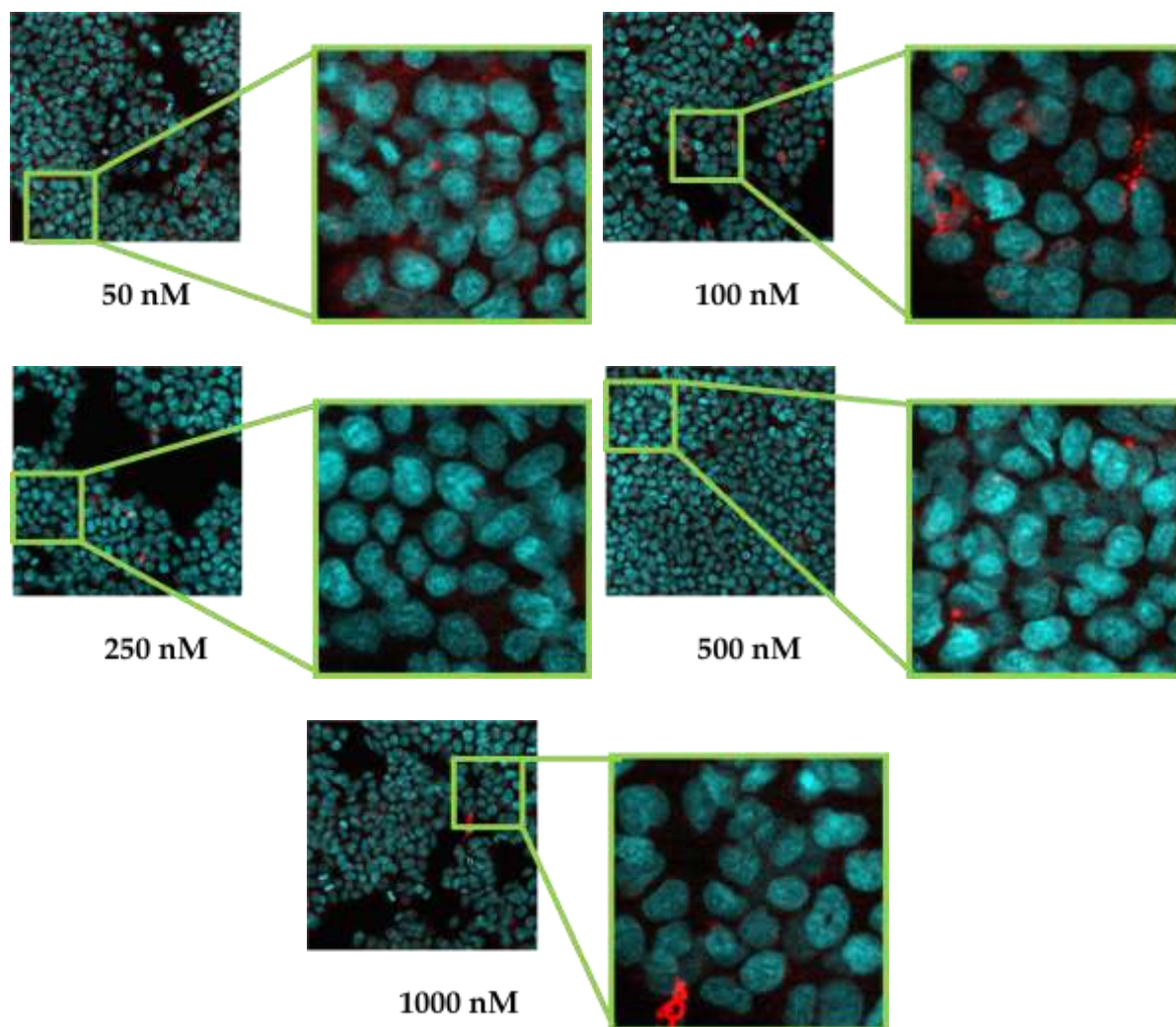


Abbildung 121: Bilder von Hep-G2-Zellen, die für vier Stunden mit verschiedenen konzentrierten NP3 (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM) inkubiert wurden.

4.15.3.1 Zellaufnahmen von CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-MDT konjugiert mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (NP3-Gal)

Die vierstündige Inkubation der Hep-G2-Zellen mit den 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid-gekoppelten Dot/Rods zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 122).

Während bei den höchsten Konzentrationen von 1000 nM und 500 nM wenig Aufnahmen der Partikel zu verzeichnen waren, kam es im Konzentrationsbereich von 50 nM bis 250 nM zu deutlichen Interaktionen der untersuchten Partikel mit den Hep-G2-Zellen. Weiterhin war bei diesem Partikelsystem auch ein hoher Anteil an scheinbar nicht abwaschbaren Rückständen zu erkennen, vor allem bei 500, 250 und 100 nM.

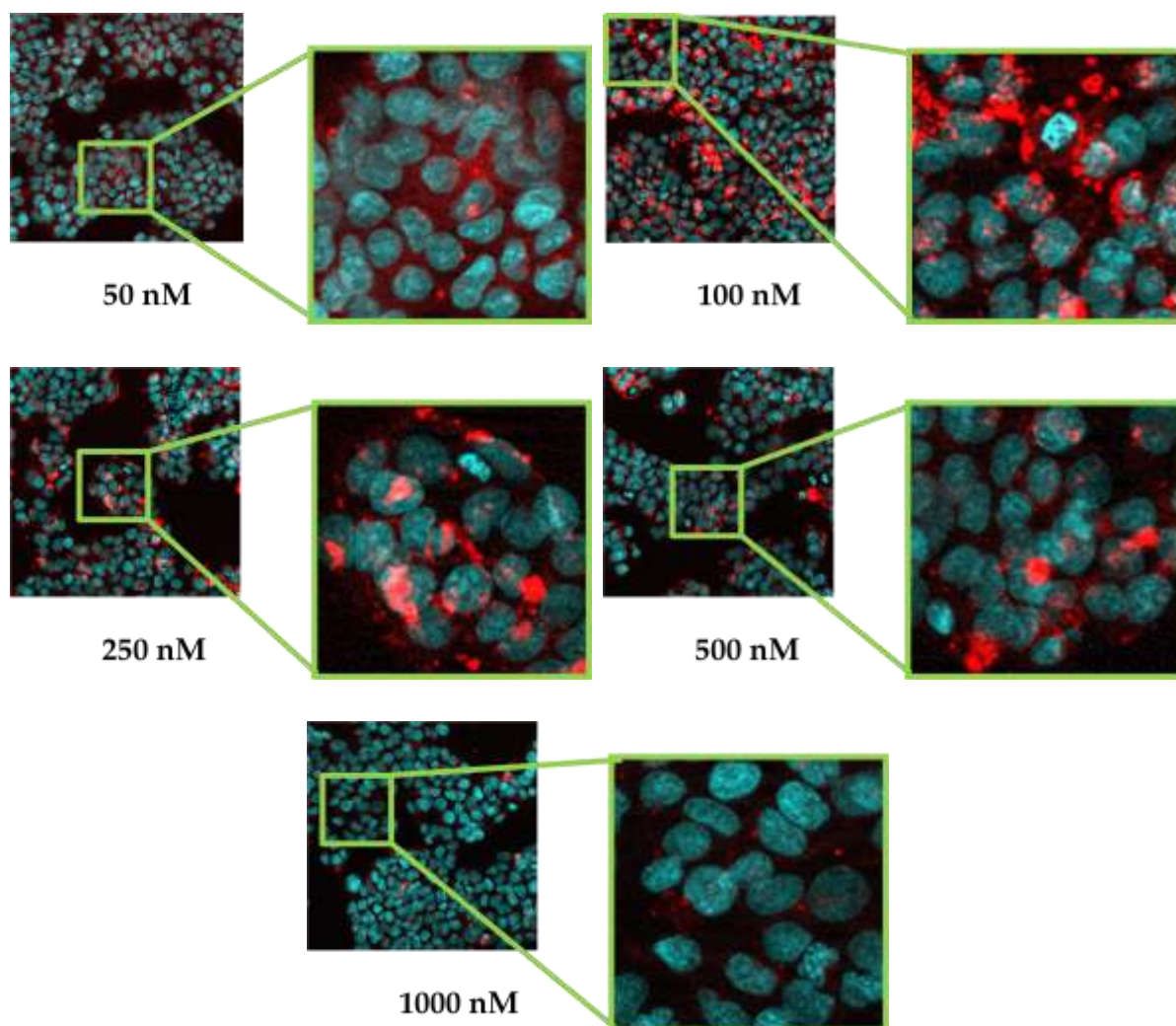


Abbildung 122: Bilder der Nanopartikelaufnahme an Hep-G2-Zellen von NP3-Gal (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Inkubationsdauer der Teilchen betrug vier Stunden. Bei den Konzentrationen von 50 nM bis 500 nM sind deutliche Aufnahmen sowie auch Partikelrückstände erkennbar.

Warum es zu einer Abnahme der Partikelaufnahme mit zunehmender Konzentration kam, konnte in dieser Arbeit nicht weiter geklärt werden. Es müssen in zukünftigen Arbeiten entsprechende Untersuchungen folgen, die dieses Verhalten bewerten.

Allgemein zeigt dieses Partikelsystem keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Probleme durch die anhaftenden Partikel auf den Zellen muss in weiterführenden Studien untersucht und verbessert werden. Hierbei sollte zunächst nochmal die Kopplung der Nanoteilchen mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid reproduziert werden. Dem sollten sich untersuchende Reinigungsschritte anschließen.

4.15.3.2 Zellaufnahme von CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-MDT konjugiert mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (NP3-Glu)

Die 6-Azido-6-deoxy-D-glucose-funktionalisierten Nanopartikel verhielten sich wider erwarten genauso wie die mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid gekoppelten Teilchen (siehe Kapitel 4.15.3.1).

Die Hep-G2-Zellen nahmen mit abnehmender Konzentration (ab 500 nM) bei einer Inkubationsdauer von vier Stunden die Partikel in ihrer Zellmembran auf. Besonders deutlich wurde diese Interaktion bei den geringsten Konzentrationen. (Abb. 123).

Die Beobachtungen dieses Partikelsystems widersprechen denen der zuvor dargestellten Ergebnisse. Die Zellaufnahmen dieses Partikelsystems entsprachen nicht den in der Literatur dargelegten Affinitäten des ASGP-Rezeptors bezüglich der Galactose. [56, 57, 58]

Scheinbar beeinflusste die Oberflächenbeschaffenheit der stäbchenförmigen Partikel die nachfolgenden Konjugationsschritte mit dem Staudinger-Reagenz sowie die sich anschließende Kopplung mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose.

Hier sind weiterführende Forschungsstudien durchzuführen, die die Beobachtungen dieser Versuchsreihe erklären. Es sollten dazu die durchgeführten Ligationsreaktionen nochmal überprüfend wiederholt und optimiert werden.

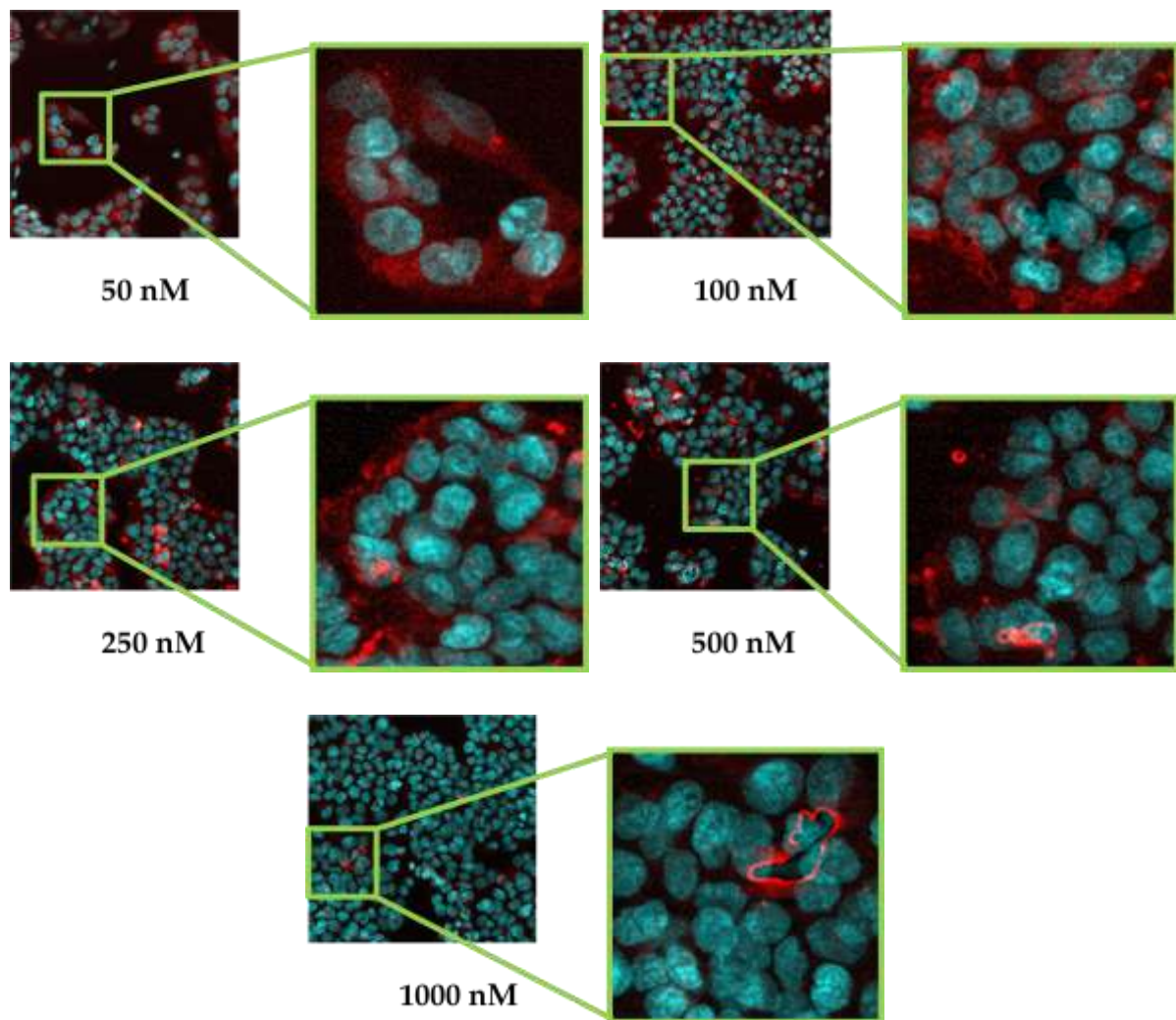


Abbildung 123: Bilder der Nanopartikelaufnahme an Hep-G2-Zellen von NP3-Glu (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Inkubationsdauer der Teilchen betrug vier Stunden. Wider erwarten wurden die Partikel von den Zellen aufgenommen (50 nM - 500 nM).

4.15.4 Vergleichende Aufnahmen von Nanopartikel an Hep-G2-Zellen

Nachfolgend sind ausgewählte Bereiche von behandelten Hep-G2-Zellen dargestellt. Sie wurden vier Stunden mit den jeweiligen Nanopartikelsystemen (NP1, NP2 und NP3) sowie ihren modifizierten Kopplungsprodukten (NP1-Gal + NP1-Glu, NP2-Gal + NP2-Glu, NP3-Gal + NP3-Glu) im Konzentrationsbereich von 50 nM bis 1000 nM inkubiert.

Die linken Abbildungen der Übersicht zeigen die Ergebnisse der Zell-Nanopartikel-Interaktionen. Die Zellaufnahmestudien der mit Galactose modifizierten Teilchen sind in der Mitte, der Glucose-Teilchen sind rechts abgebildet.

Es sollen die konzentrationsabhängigen Aufnahmen der unterschiedlichen Partikel-Liganden-Systeme dargestellt werden.

4.15.4.1 NP1 + NP1-Gal + NP1-Glu

Die Hep-G2-Zellen zeigten bei geringer QD-Konzentration (50 nM) unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Interaktionen.

Die NP1-Gal wurden hier von den Zellen aufgenommen, was den Aussagen über die Affinität des ASGP-Rezeptors zu Galactose entspricht. Allerdings waren auch bei den unmodifizierten Partikeln (NP1) geringe Fluoreszenzen an den Zellen sichtbar. Dies könnte durch etwaige Autofluoreszenzeffekte der Zellen hervorgerufen worden sein. In den weiteren Untersuchungen zeigte dieses Partikelsystem mit höherer Konzentration keine Interaktionen mit den Zellen, was die Vermutung der Autofluoreszenz unterstützte.

Die Ergebnisse der übrigen Konzentrationen unterschieden sich nicht voneinander. Die unmodifizierten Partikeln wurden von den Zellen nicht aufgenommen.

Während NP1-Gal die erwarteten Aufnahmen in die Zellen zeigten, wiesen die NP1-Glu eventuelle Nanopartikel-Rückstände auf den Zelloberflächen auf (Abb. 124). Diese könnten scheinbar durch anhaftende Eigenschaften des 6-Azido-6-deoxy-D-glucoses auf den Zellen verbleiben. Bei einer Konzentration von 50 nM waren derartigen Rückstände nicht vorhanden.

Für zukünftige Studien sollten hierbei die Reinigungsschritte optimiert werden (häufigere und längere Reinigungsschritte, Varianz des Waschpuffers).

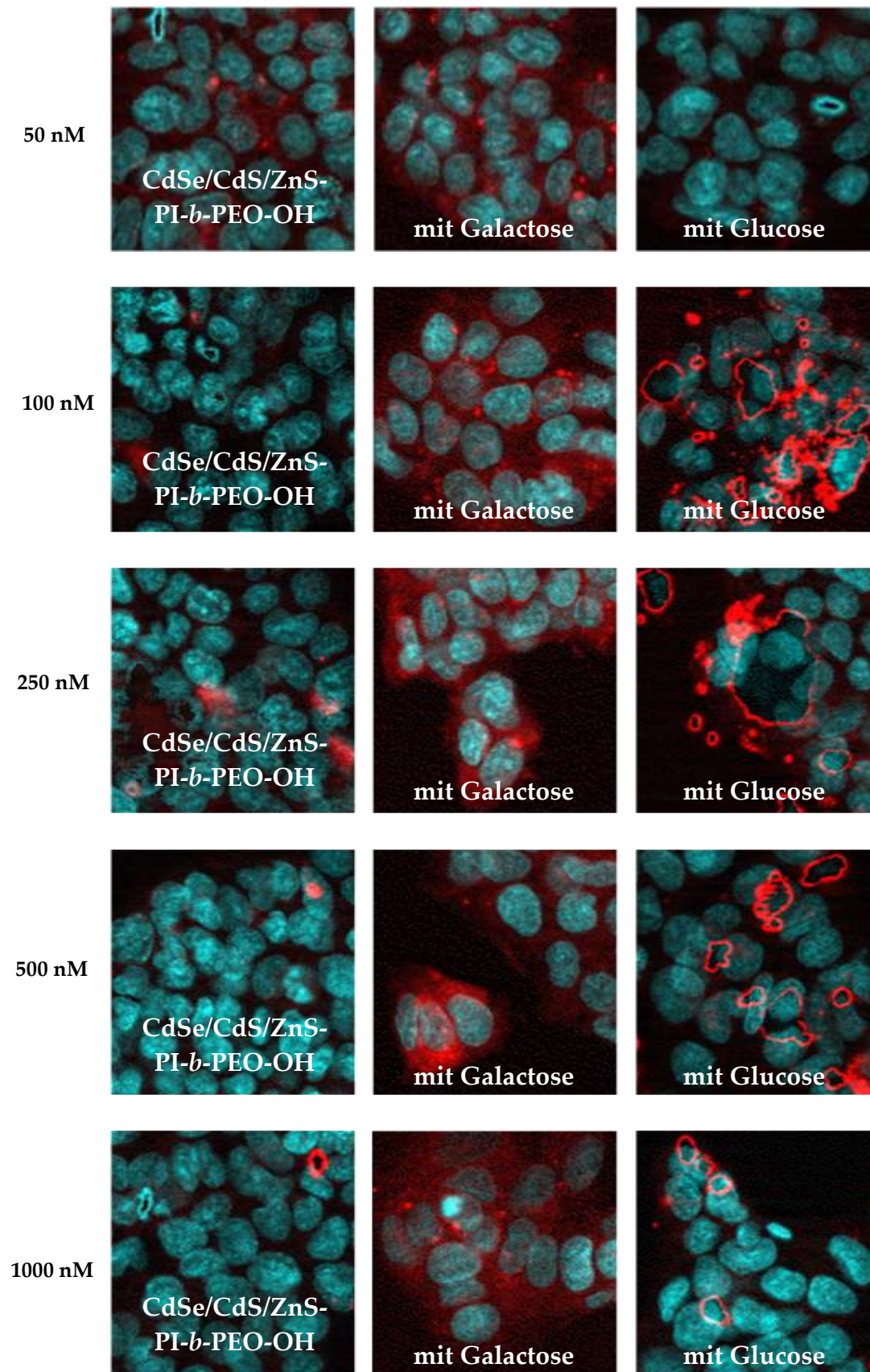


Abbildung 124: Vergleichende Übersicht von NP1 (links), NP1-Gal (mitte) und NP1-Glu (rechts)

4.15.4.2 NP2 + NP2-Gal + NP2-Glu

Die nachfolgenden Darstellungen in der Abb. 125 zeigten diverse Aufnahmen an Hep-G2-Zellen durch die QDs mit den mehrzähligen Thiolliganden sowie deren Zuckermodifikationen.

Die NP2 zeigten auch hier erwartungsgemäß keine Aufnahmen mit den Hep-G2-Zellen. Allerdings kam es bei einer Konzentration von 500 nM zu fluoreszierenden Bereichen, die scheinbar durch anhaftende Partikelrückstände auf der Zelloberfläche herrührten. Da dieser Effekt bei keiner anderen Konzentration wiederkehrte, konnten etwaige Zellinteraktionen mit dem unmodifizierten QDs ausgeschlossen werden.

Die mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid gekoppelten Nanopartikel (NP2-Gal) wurden konzentrationsunabhängig von den Hep-G2-Zellen sehr gut aufgenommen. Auch hier bestätigten sich die Affinität des ASGP-Rezeptors zu dem Galactoserest und der sich anschließende Transport in die Zellen.

Die NP2-Glu hingegen zeigten in dieser Untersuchungsreihe erwartungsgemäß keine Aufnahme und unterstreicht damit die spezifische Interaktionen der Hep-G2-Zellen zu NP2-Gal. Allerdings waren auch hier anhaftende Partikelrückstände an den Zelloberflächen vorhanden.

Die bereits erwähnten zukünftigen Studien zur Optimierung der Reinigung nach der Inkubation der Partikel müssen auch für dieses Teilchensystem durchgeführt werden.

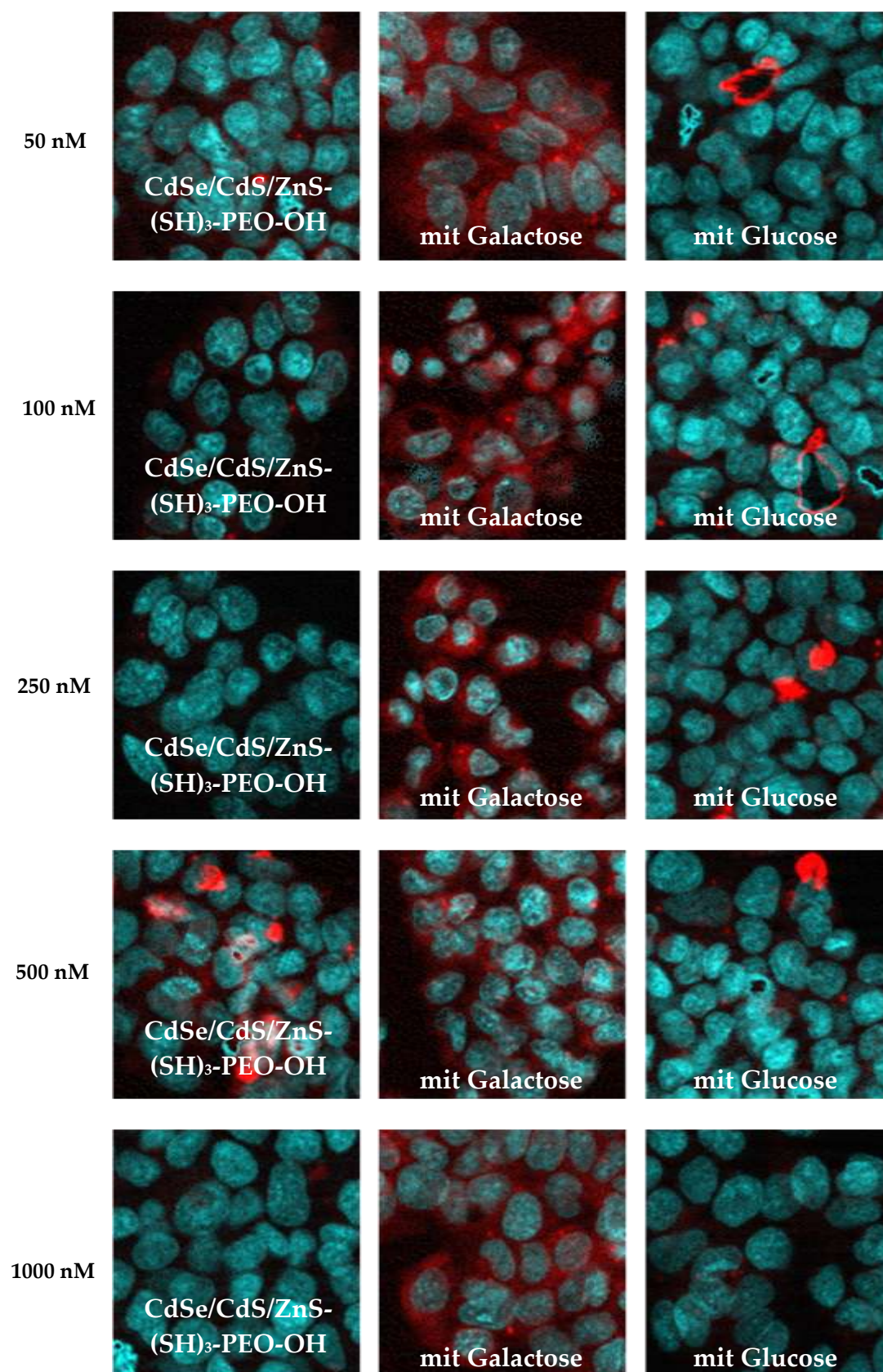


Abbildung 125: Vergleichende Übersicht der NP2 (links), NP2-Gal (mitte) und NP2-Glu (rechts)

4.15.4.3 NP3 + NP3-Gal + NP3-Glu

Das mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid sowie 6-Azido-6-deoxy-D-glucose modifizierte Dot/Rod-Partikelsystem zeigte vergleichsweise zu den zuvor beschriebenen Partikelsystemen andere Ergebnisse hinsichtlich der Interaktionen zu den Hep-G2-Zellen (Abb. 126).

Die unkonjugierten Partikel (NP3) wiesen bei den geringsten Konzentrationen (50 nM und 100 nM) geringe Fluoreszenzen auf. Es konnte nicht unterschieden werden, ob es sich um Aufnahme in die Zellen oder nur um Partikelrückstände handelte. Mit zunehmenden Konzentrationen waren erwartungsgemäß keine Aufnahmen in die Zellen zu verzeichnen.

Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Interaktionen der Hep-G2-Zellen mit den Zucker-konjugierten Partikeln (NP3-Gal und NP3-Glu). Beide Systeme wiesen gleichermaßen Aufnahme in die Hep-G2-Zellen auf. Es wurde keine spezifische Affinität der Galactose-Partikel zu dem ASPG-Rezeptor deutlich. Mit zunehmender Teilchenkonzentration schwächte jedoch die Aufnahme in die Zellen ab.

Wiederholende Untersuchungen konnten keine erwartungsgemäßen Ergebnisse hinsichtlich der unspezifischen Zellaufnahme durch NP3-Glu liefern. Zur Analyse der Ursachen für dieses Verhalten der Nanopartikel bezüglich der Hep-G2-Zellen müssen noch weitere Studien in Zukunft durchgeführt werden.

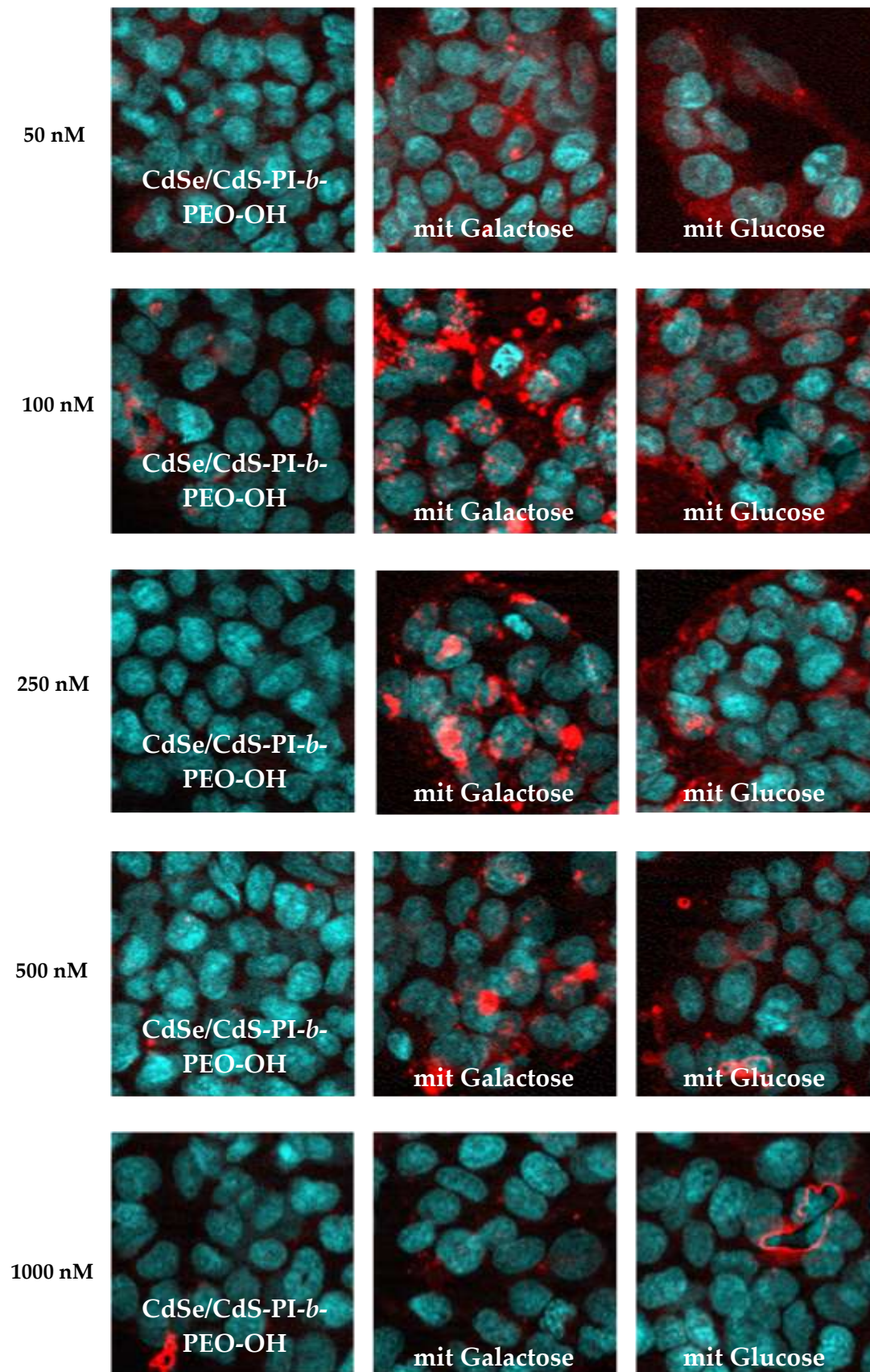


Abbildung 126: Vergleichende Übersicht der NP3 (links), NP3-Gal (mitte) und NP3-Glu (rechts)

4.15.4.4 Vergleichende Übersicht der Inkubationsdauer von 2 und 20 Stunden

In den nachfolgenden Darstellungen der Zellen sind die Experimente nach zwei Stunden und 20 Stunden Inkubation der Partikel (NP1 Abb. 127, NP1-Gal Abb. 128 und NP1-Glu Abb. 129) vergleichend gezeigt.

Es wird deutlich, dass bereits zwei Stunden Partikelinkubation für Zell-Aufnahme ausreichend waren. Je länger die Inkubationsdauer und je höher die eingesetzte Partikelkonzentration, desto mehr Partikelrückstände waren auf den Zellen zu verzeichnen.

Die vergleichenden Ergebnisse der unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden der NP2, NP2-Gal sowie NP2-Glu auf die Zellen sind in den Abb. 130 bis 132 dargestellt.

Hier zeigte sich deutlich der toxische Effekt dieses Nanopartikel-Liganden-Systems bei langen Inkubationszeiten und hohen Partikelkonzentrationen. Während bei den unmodifizierten Nanopartikeln bereits Konzentrationen von 250 nM bei einer Inkubationsdauer von 20 Stunden ausreichten, waren die 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid-verknüpften Teilchen mit 500 nM toxisch und die 6-Azido-6-deoxy-D-glucose-gebundenen QDs mit 1000 nM. Dies ließ sich zum einen an die geringer werdende Zellzahl erkennen und zum anderen waren diese Zellen deutlich kleiner, abgerundet und in ihrer Fluoreszenzintensität sehr viel stärker als die intakten Zellen. Weiterhin kam es durch die toxischen Effekte zu einer verstärkten Partikelaufnahme in die Zellen. Sie waren anscheinend permeabel für alle in der Lösung befindlichen Substanzen geworden, also auch für die Nanoteilchen unabhängig von ihrer jeweiligen Modifikation.

Ansonsten sind entsprechende Zellaufnahmen durch die Galactose-QDs, wie bereits nach vierstündiger Inkubation gezeigt, bzw. keine Aufnahmen bei den unmodifizierten und Glucose-gekoppelten Nanoteilchen dargestellt.

Die Abb. 133(NP3), Abb. 134 (NP3-Gal) sowie die Abb. 135 (NP3-Glu) zeigten die Zellaufnahmestudien der Dot/Rods nach zwei und 20 Stunden Inkubation auf Hep-G2-Zellen. Auch hier wurden, wie beim zuvor untersuchten Partikelsystem (NP2), toxische Effekte bei erhöhten Konzentrationen und langen Inkubationszeiten sichtbar. Scheinbar erfolgte eine erhöhte Partikelaufnahme in die Zellen durch zunehmende Toxizität.

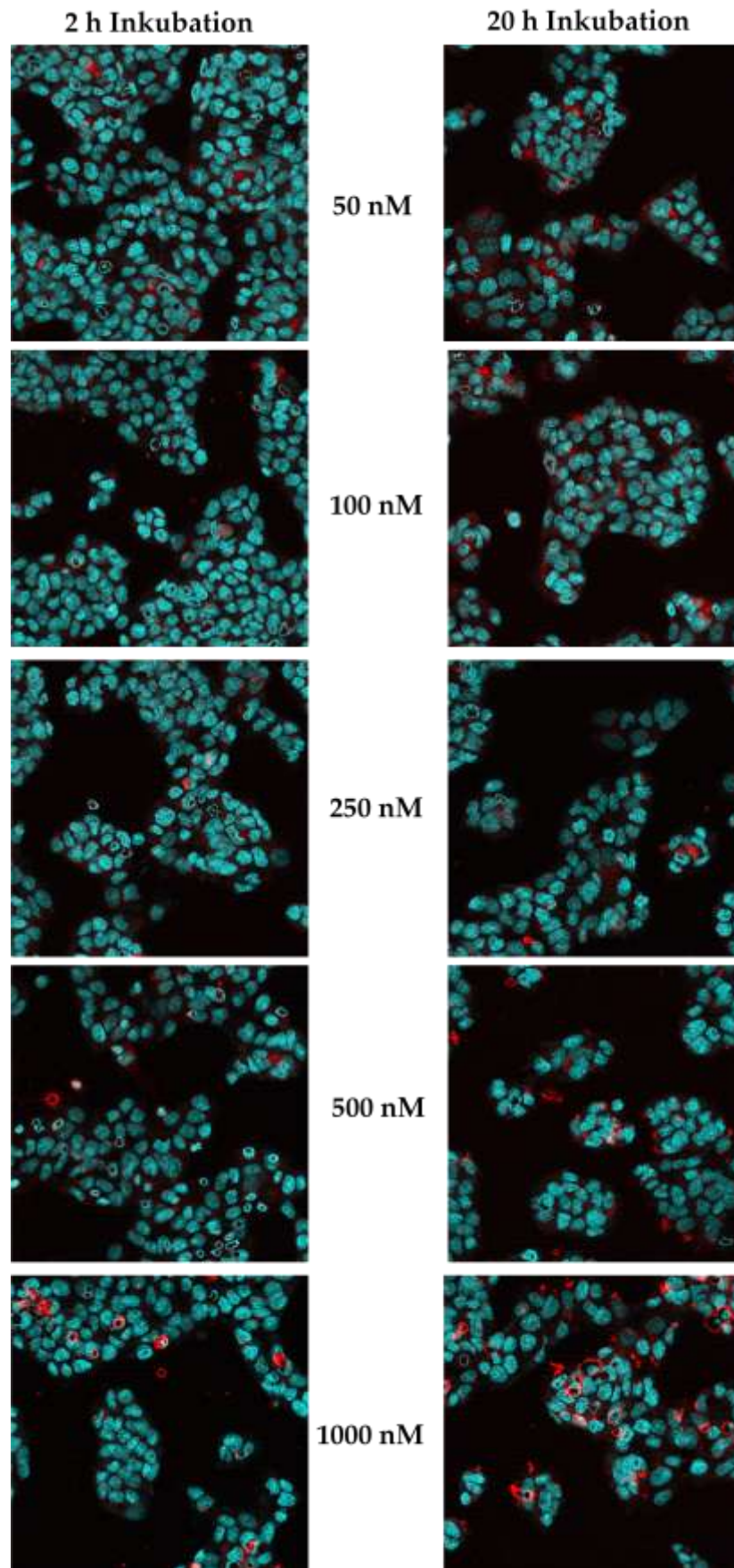


Abbildung 127: Vergleichende Darstellungen von NP1 auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

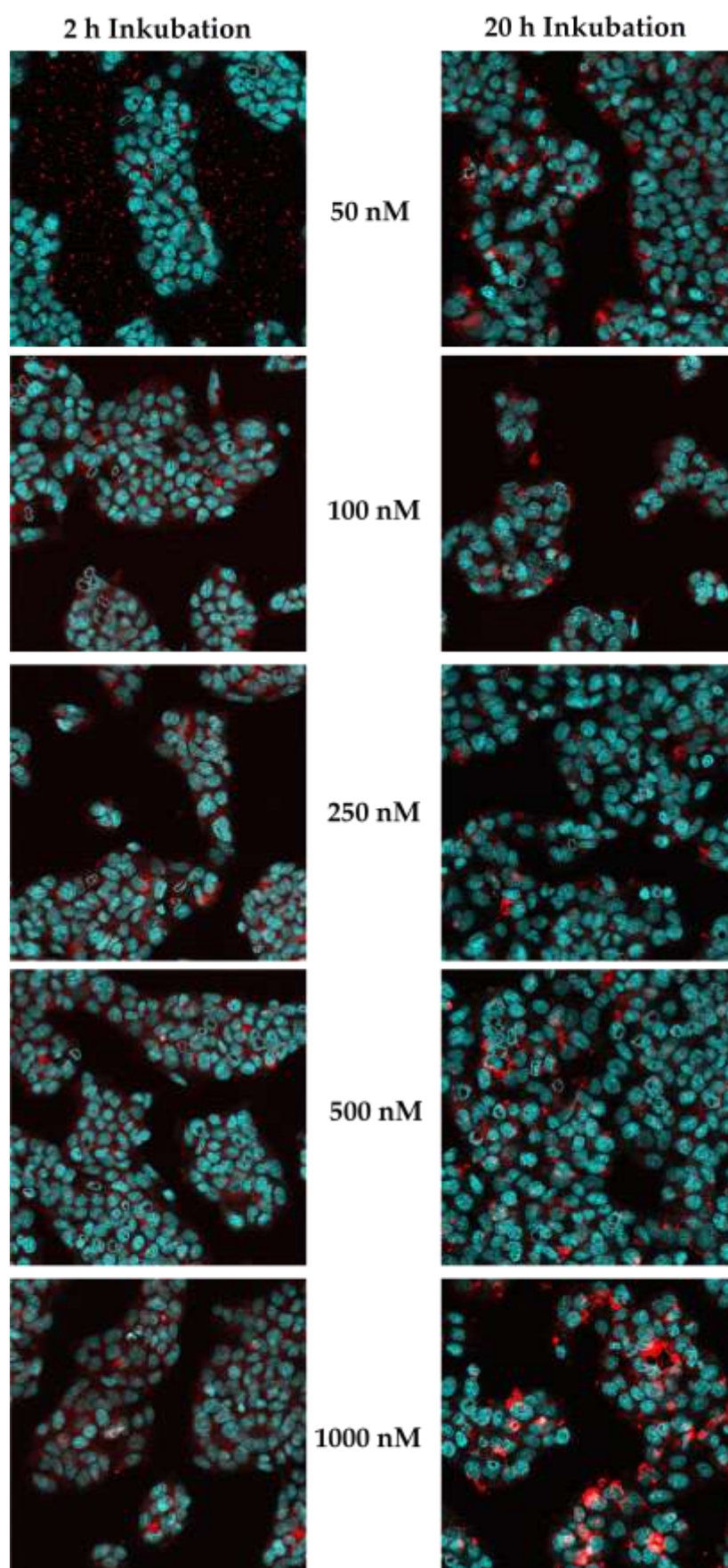


Abbildung 128: Vergleichende Darstellungen von NP1-Gal auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

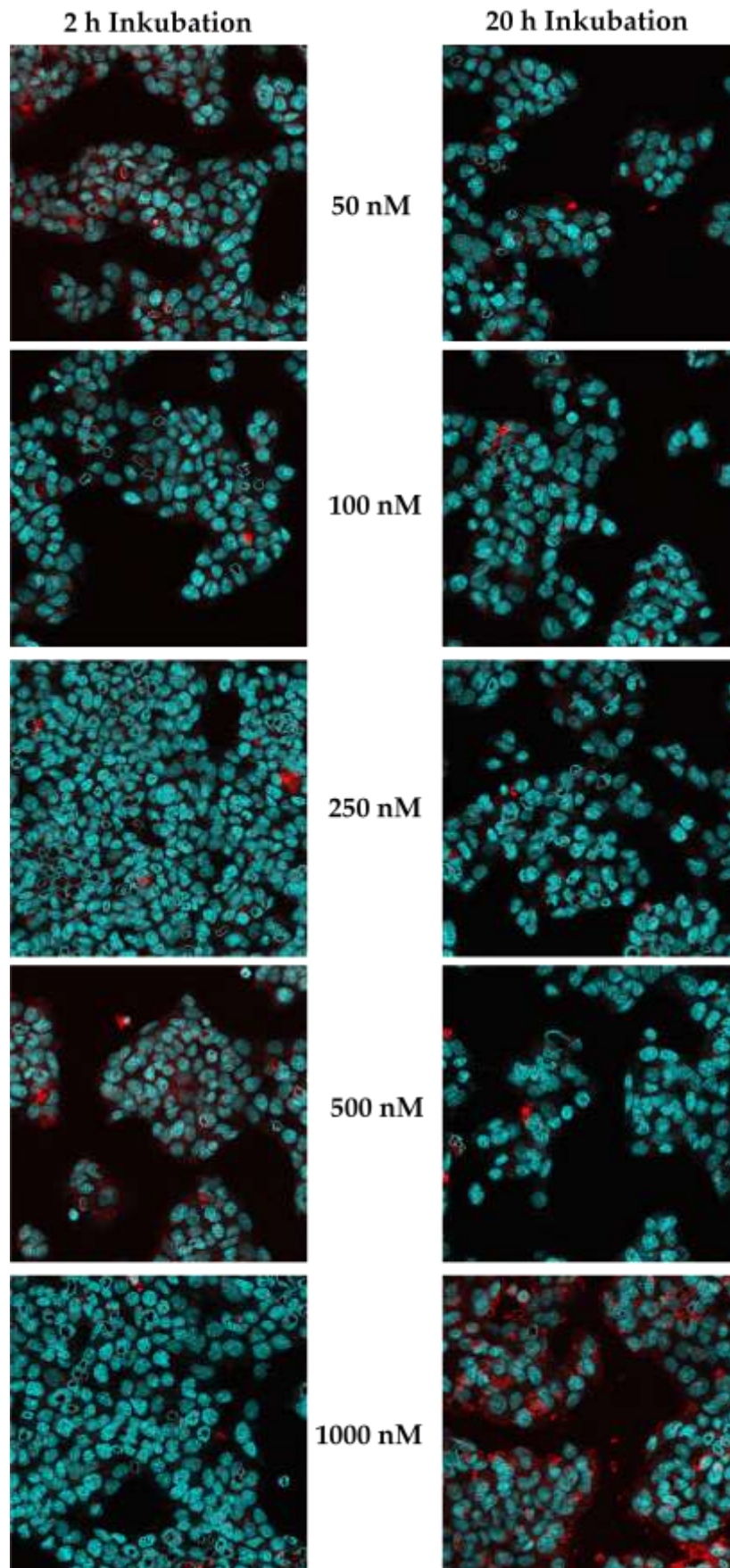


Abbildung 129: Vergleichende Darstellungen von NP1-Glu auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

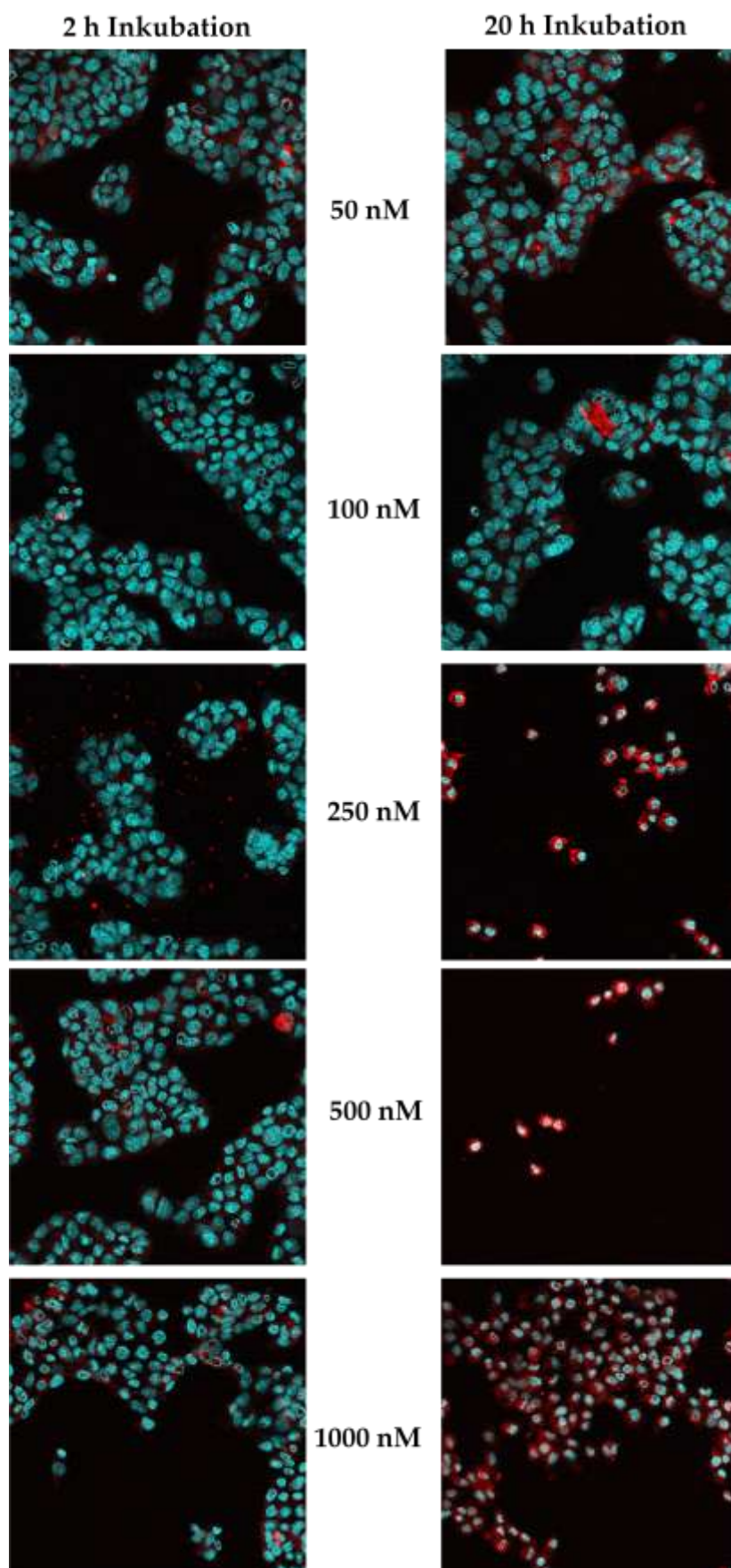


Abbildung 130: Vergleichende Darstellungen von NP2 auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

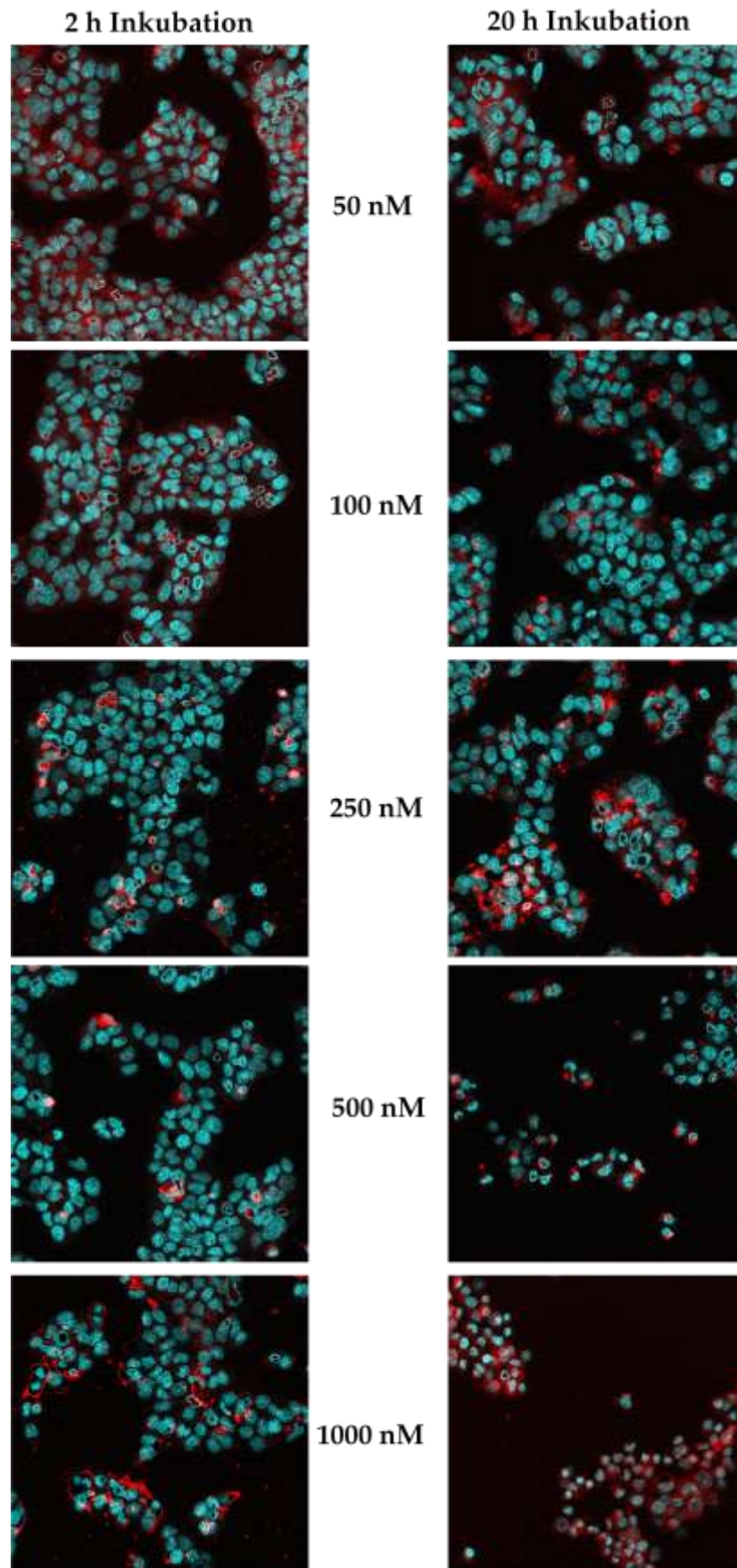


Abbildung 131: Vergleichende Darstellungen von NP2-Gal auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

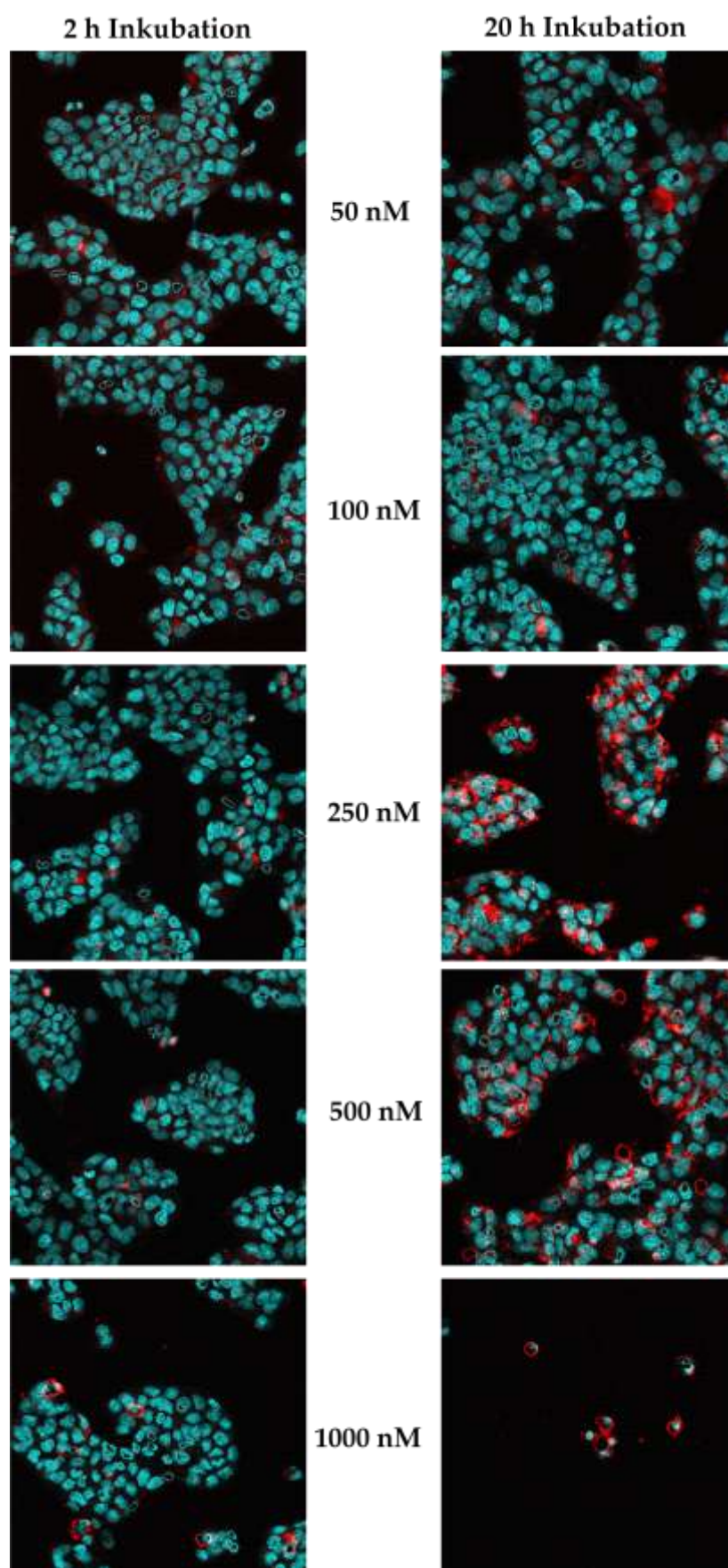


Abbildung 132: Vergleichende Darstellungen NP2-Glu auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

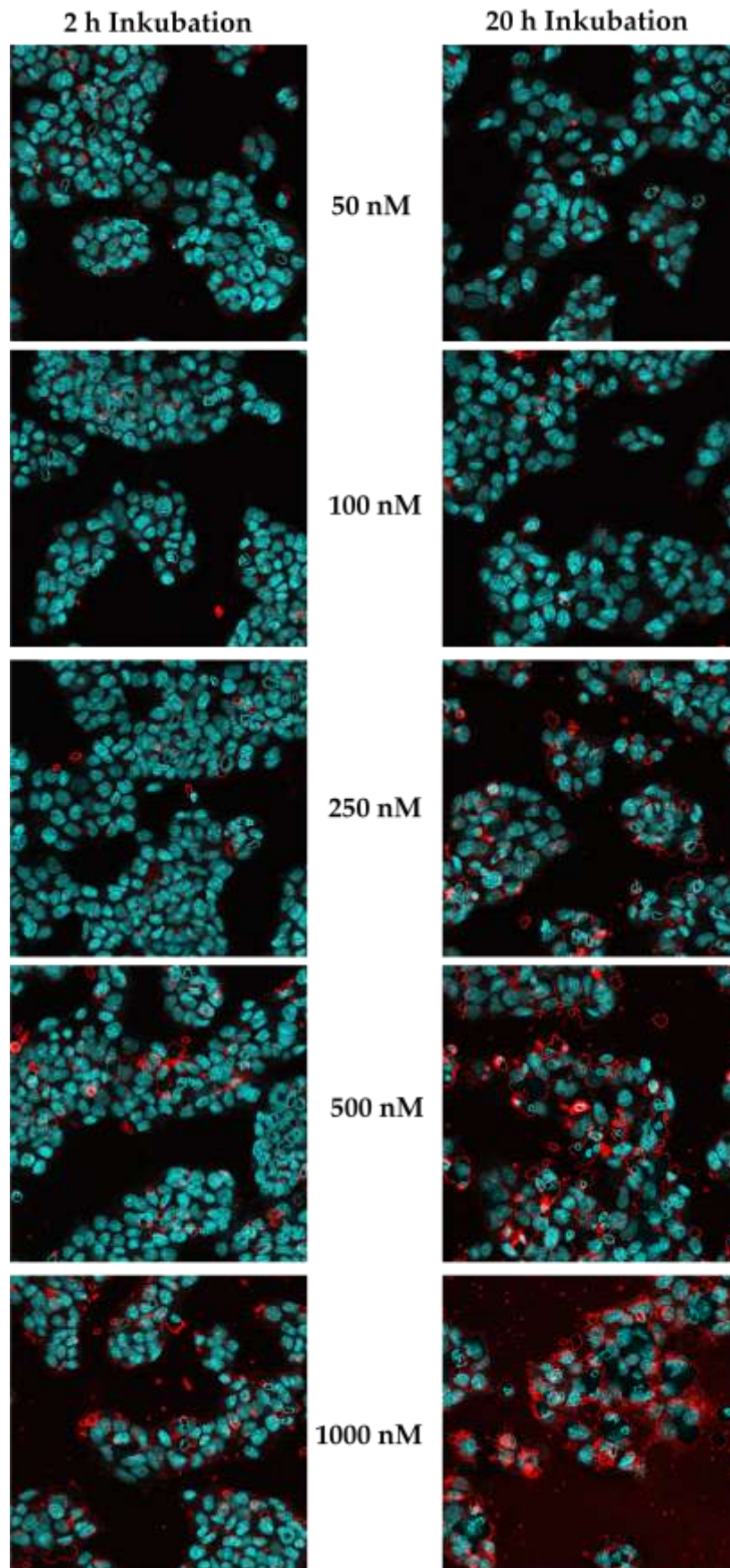


Abbildung 133: Vergleichende Darstellungen von NP3 auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

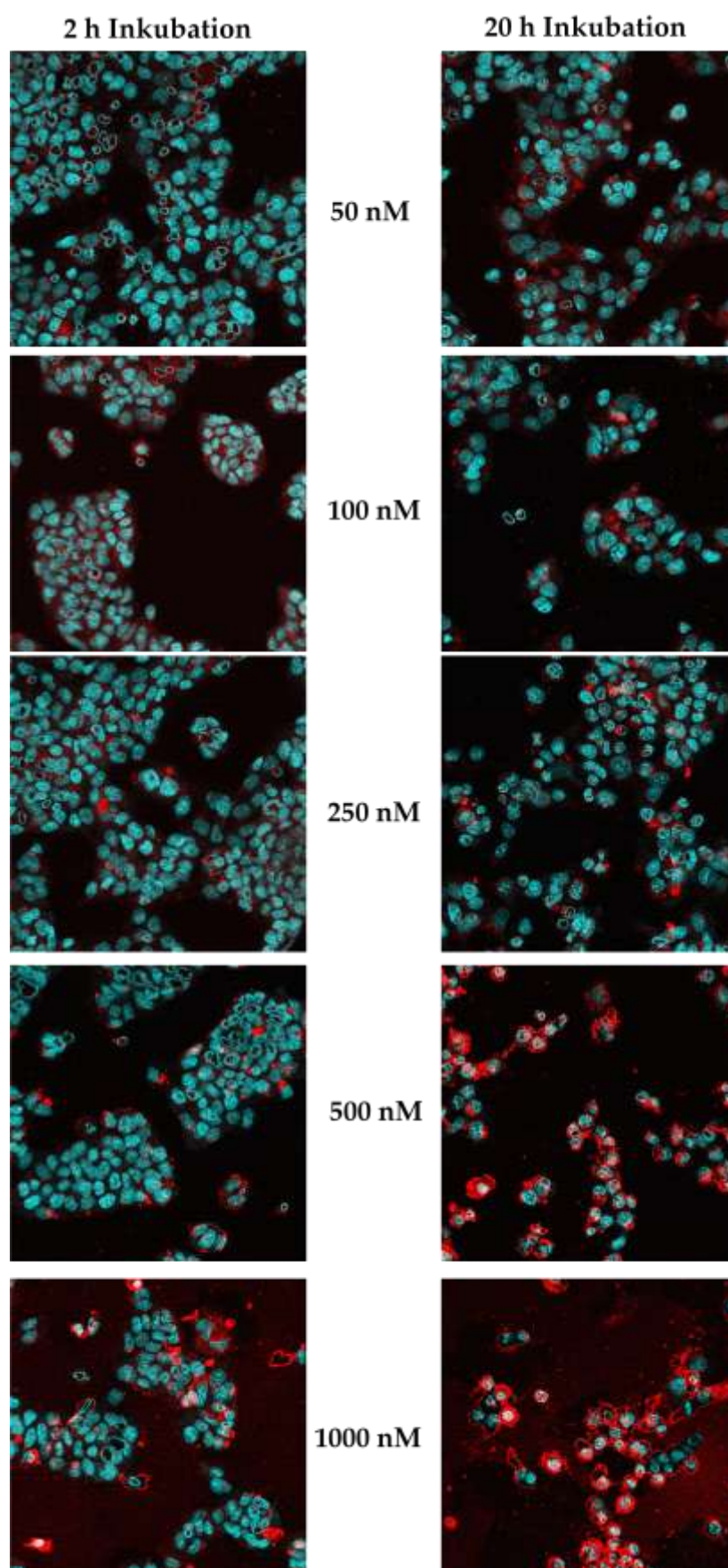


Abbildung 134: Vergleichende Darstellungen von NP3-Gal auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

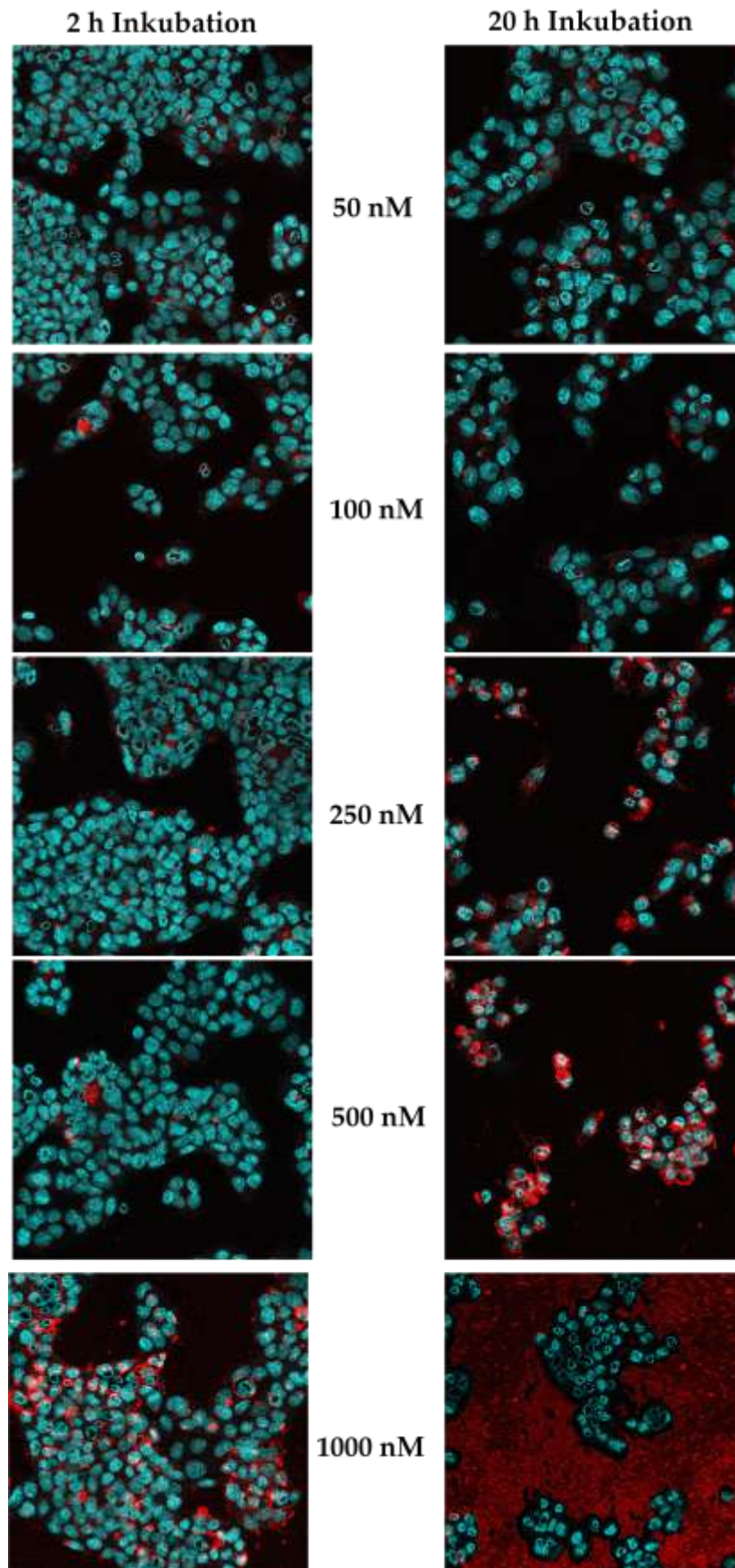


Abbildung 135: Vergleichende Darstellungen von NP3-Glu auf Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und 20 Stunden.

4.15.5 Aufnahmestudien von NP1/Gal/Glu, NP2/Gal/Glu und NP3/Gal/Glu an der humanen Lungenkrebszelllinie A549

Die vorherigen Untersuchungen an der Leberzelllinie Hep-G2 wurden unter denselben Bedingungen an den humanen Lungenkrebszellen A549 durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass die mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid konjugierten Partikel eine hohe Affinität zu dem ASPG-Rezeptor haben und damit zellspezifisch von den Hep-G2-Zellen aufgenommen werden.

Es wurden die gleichen Partikelkonzentrationen sowie dieselben Inkubationszeiten untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 136 bis 144 dargestellt.

Bei dem ersten Partikelsystem NP1 (CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH) wurden weder bei den unkonjugierten Teilchen noch bei denen mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose modifizierten QDs Interaktionen zu den A549-Zellen deutlich. Die Zellen zeigten auch keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Morphologie und wiesen somit keine toxischen Effekte durch die Partikel auf.

Die Zellstudien mit den anderen beiden Nanopartikel-Systemen zeigten andere Ergebnisse.

Hier wiesen beide Partikelarten NP2 und NP3, unabhängig vom konjugierten Zucker, im Konzentrationsbereich von 250 nM bis 500 nM nach einer 20stündigen Inkubationszeit toxische Effekte auf. Scheinbar nahmen hier die Zellen auf Grund von etwaigen Veränderungen in ihrem metabolischen Zyklus die Nanopartikel auf. Die Zellen waren deutlich kleiner und abgerundet, was ein Hinweis auf Zelltod ist. Ebenso hatte sich die Anzahl der Zellen mit zunehmender Partikelkonzentration stark verringert. Die Zellbilder belegen die bereits durchgeführten Toxizitätstests (siehe Kapitel 4.16).

Nach einer vierstündigen Inkubationsdauer der Teilchen traten keine toxischen Effekte und keine Aufnahmen in die Zellen auf. Vereinzelt Detektionen von fluoreszierenden Bereichen konnten auf eventuelle anhaftende Partikelrückstände zurückzuführen sein. Vor allem die NP3-Teilchen zeigten mit zunehmender Konzentration einen hohen Anteil solcher Partikelrückstände auf den Zelloberflächen.

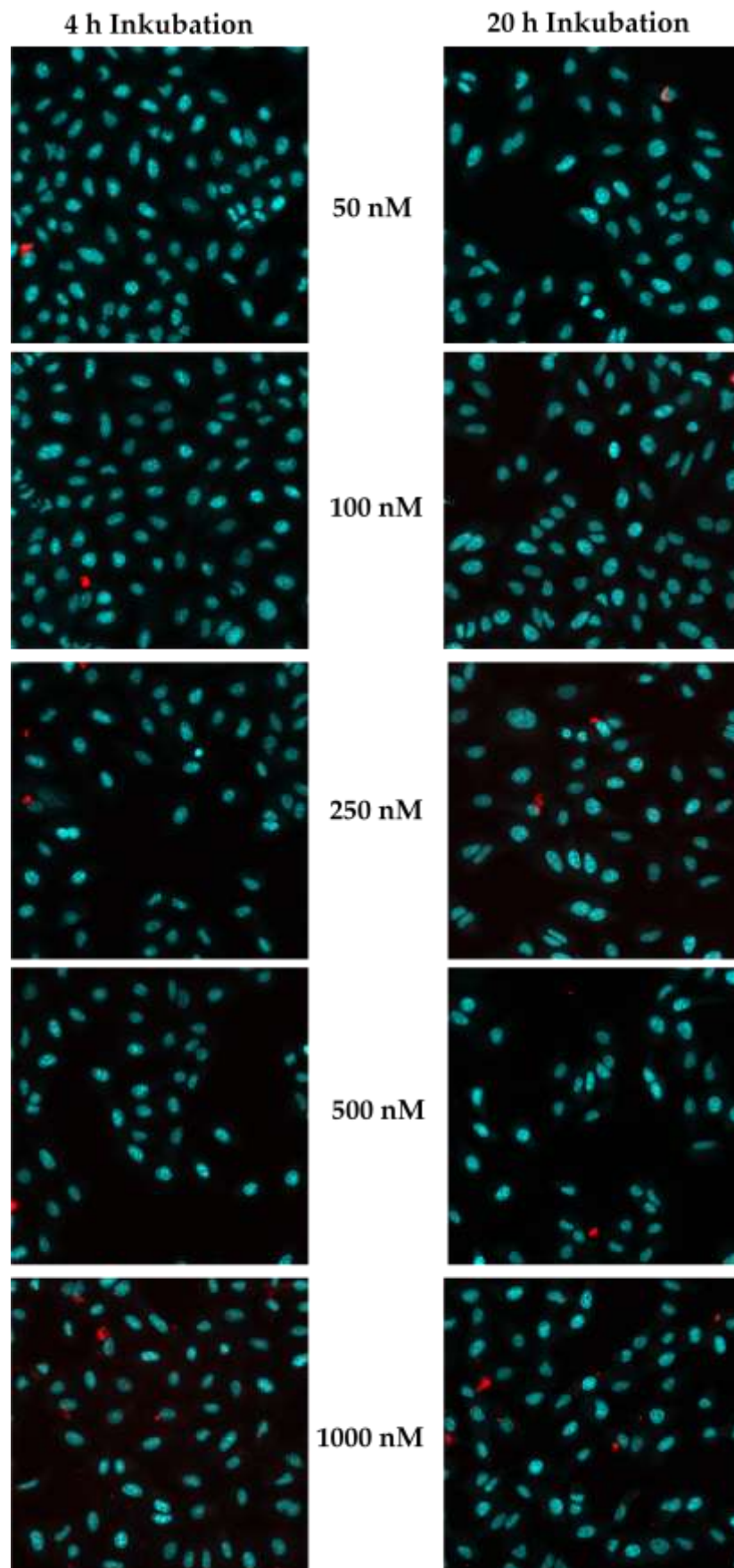


Abbildung 136: Vergleichende Darstellungen der NP1 auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

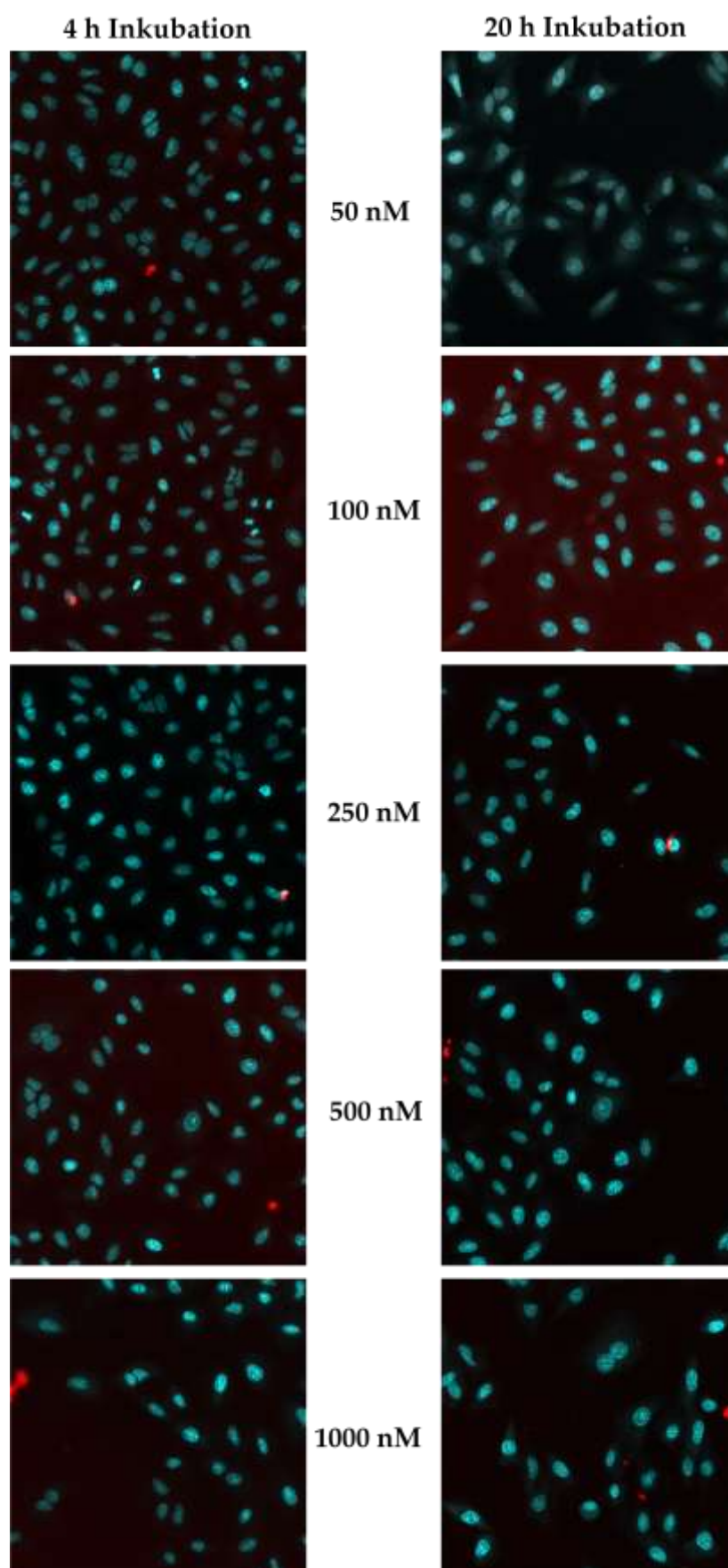


Abbildung 137: Vergleichende Darstellungen der NP1-Gal auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

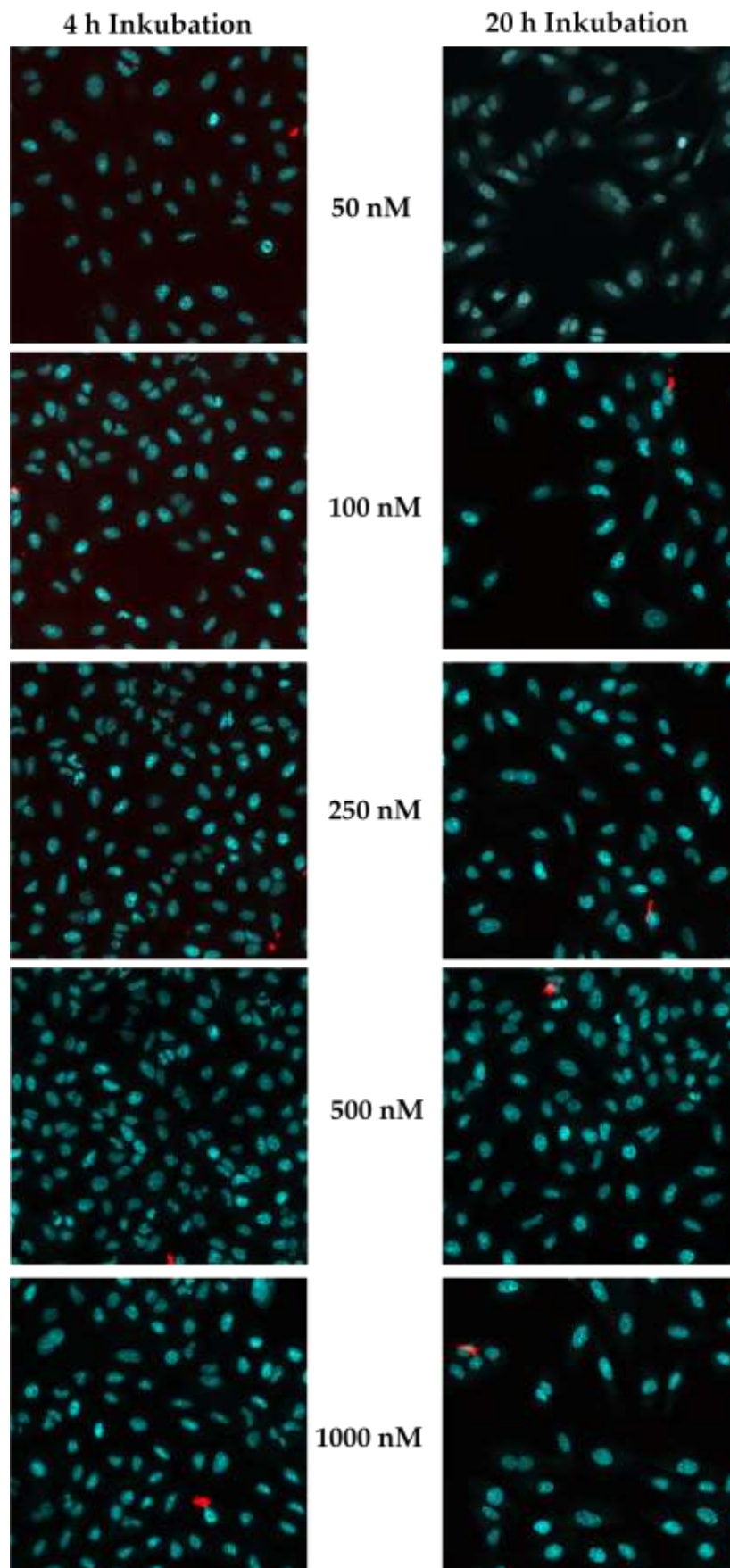


Abbildung 138: Vergleichende Darstellungen der NP1-Glu auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

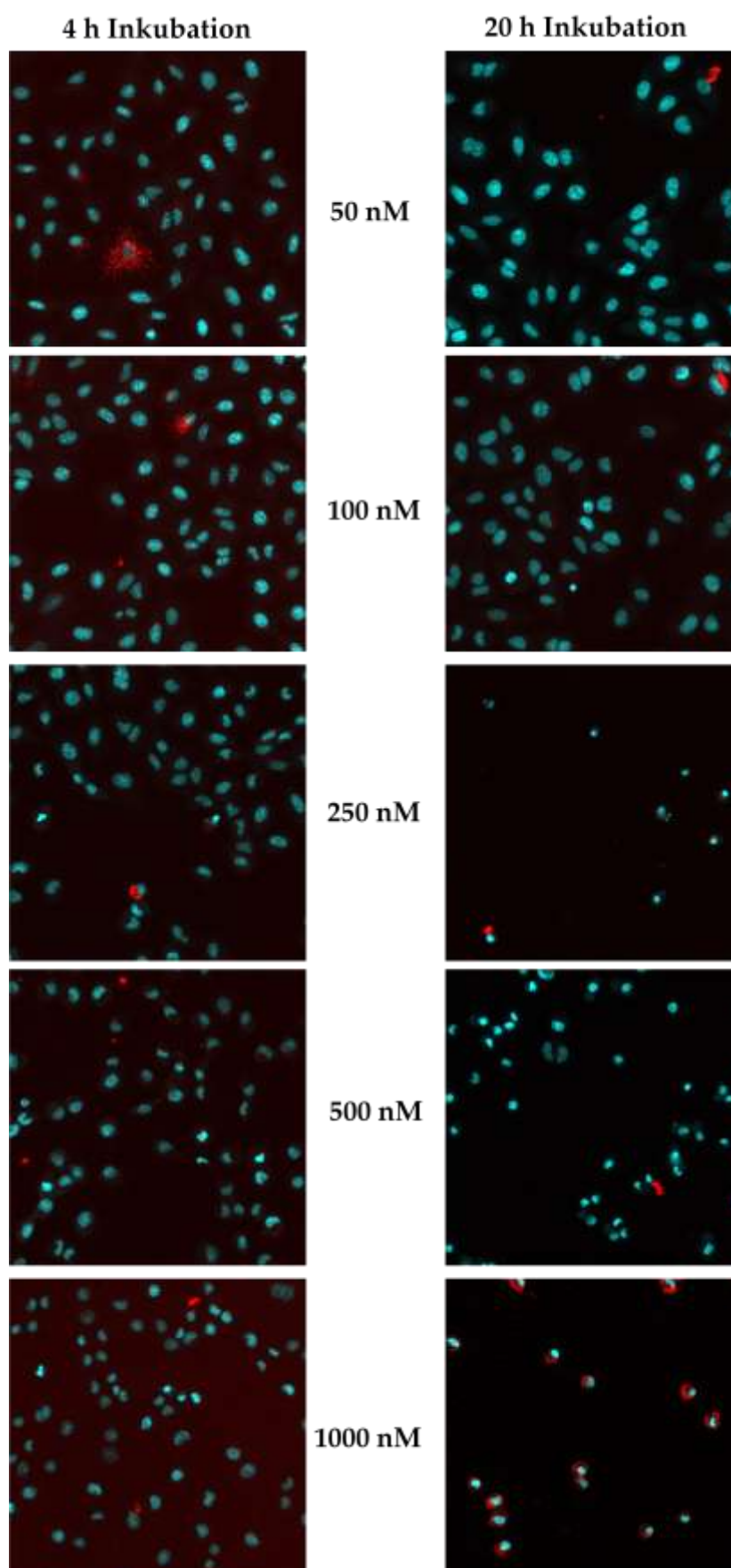


Abbildung 139: Vergleichende Darstellungen der NP2 auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

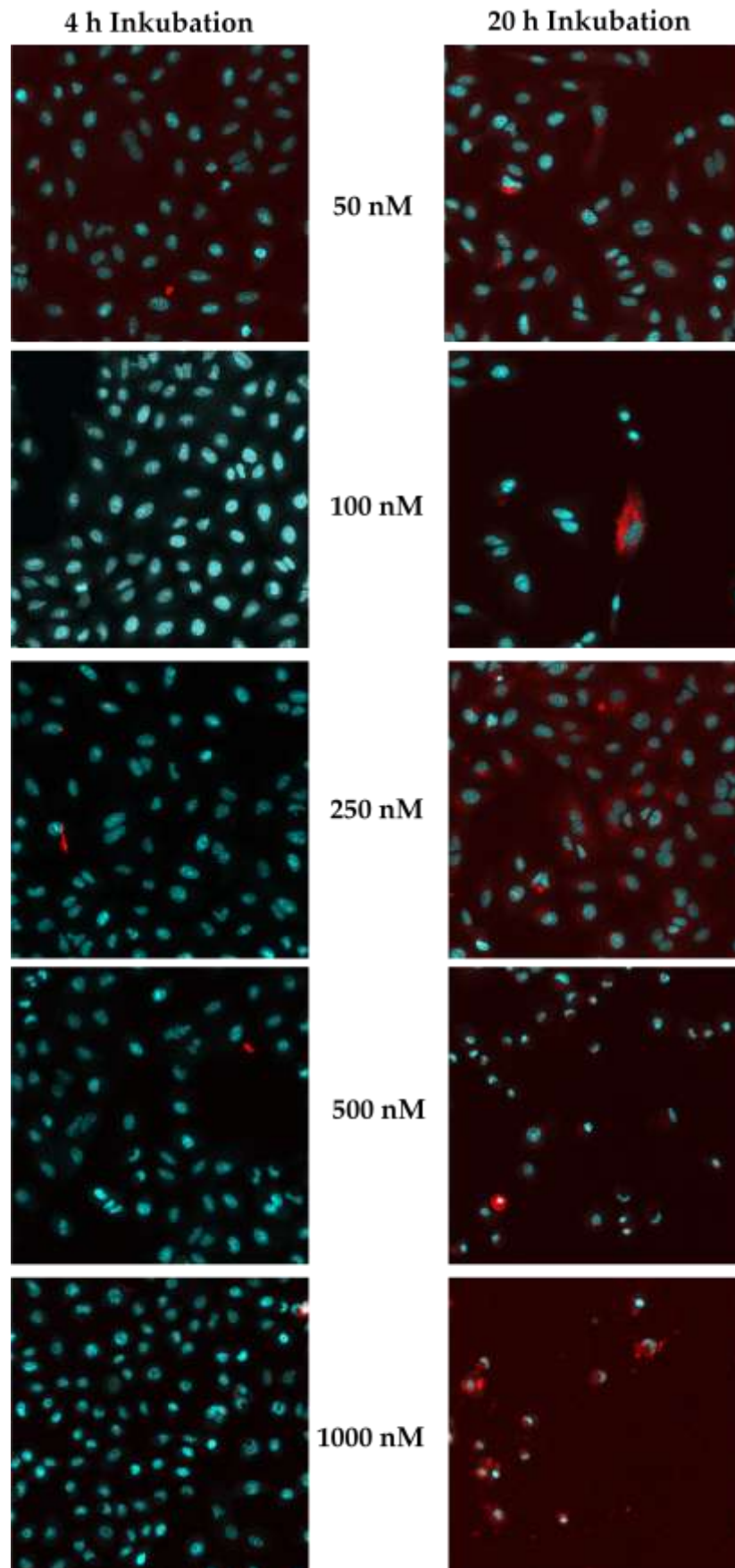


Abbildung 140: Vergleichende Darstellungen der NP2-Gal auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

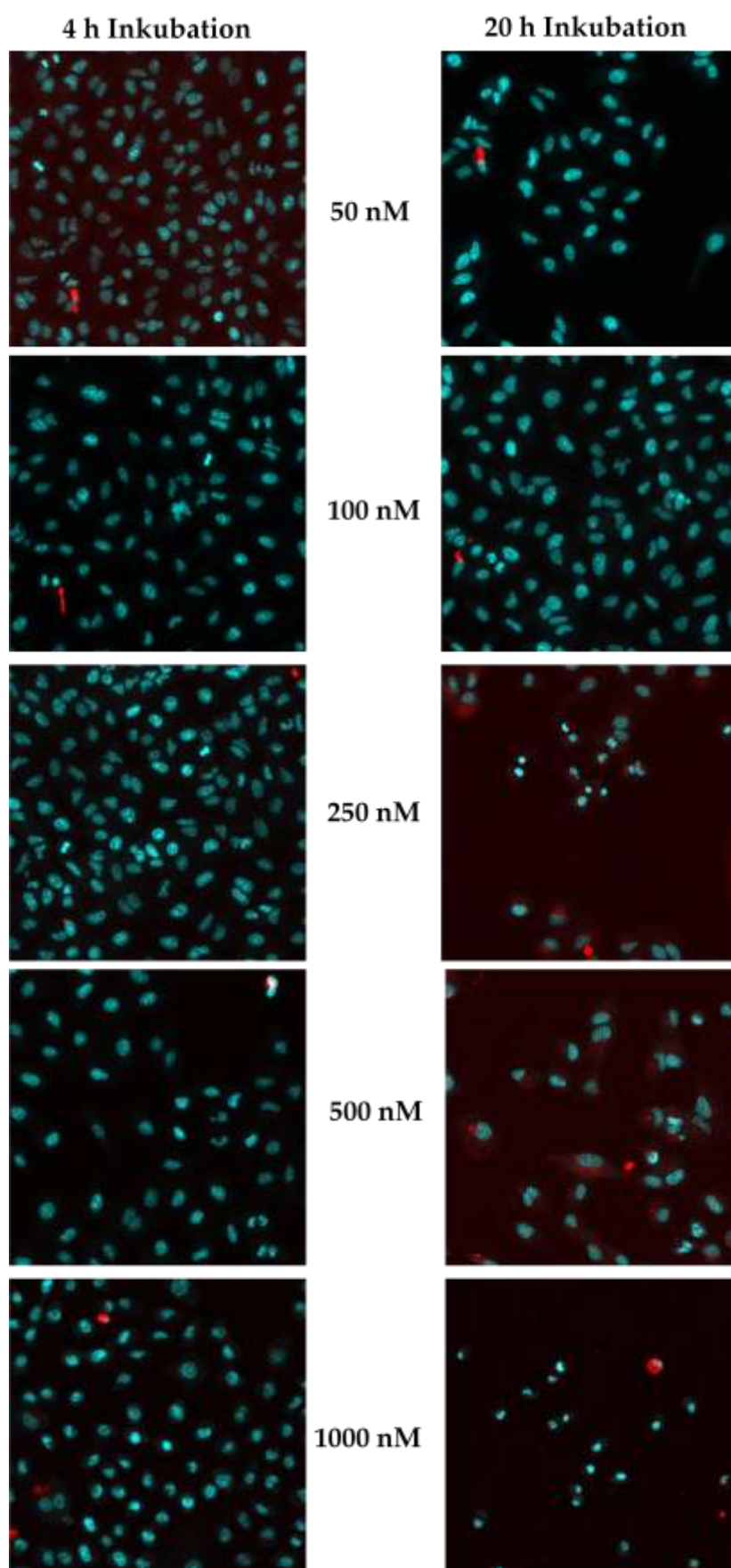


Abbildung 141: Vergleichende Darstellungen der NP2-Glu auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

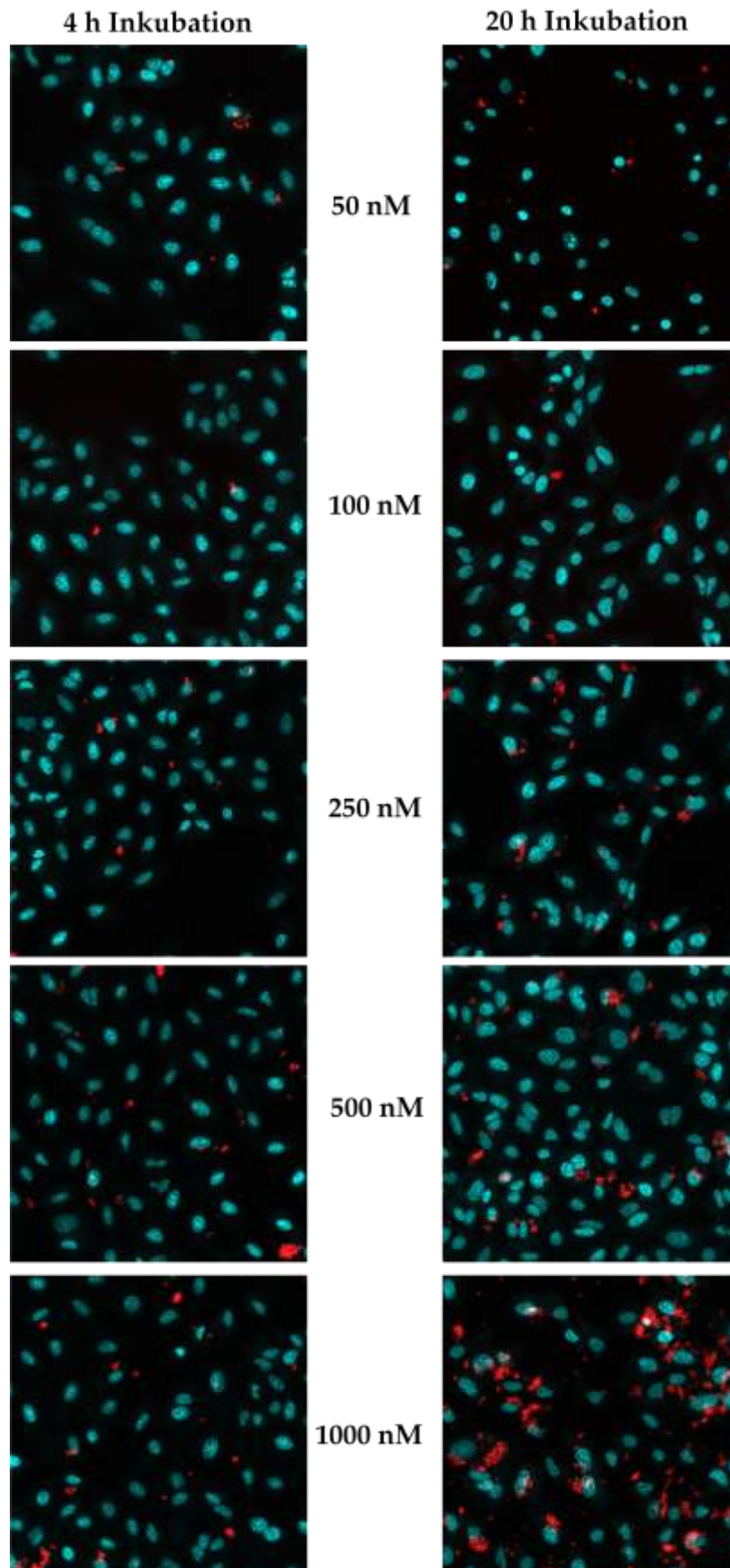


Abbildung 142: Vergleichende Darstellungen der NP3 auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

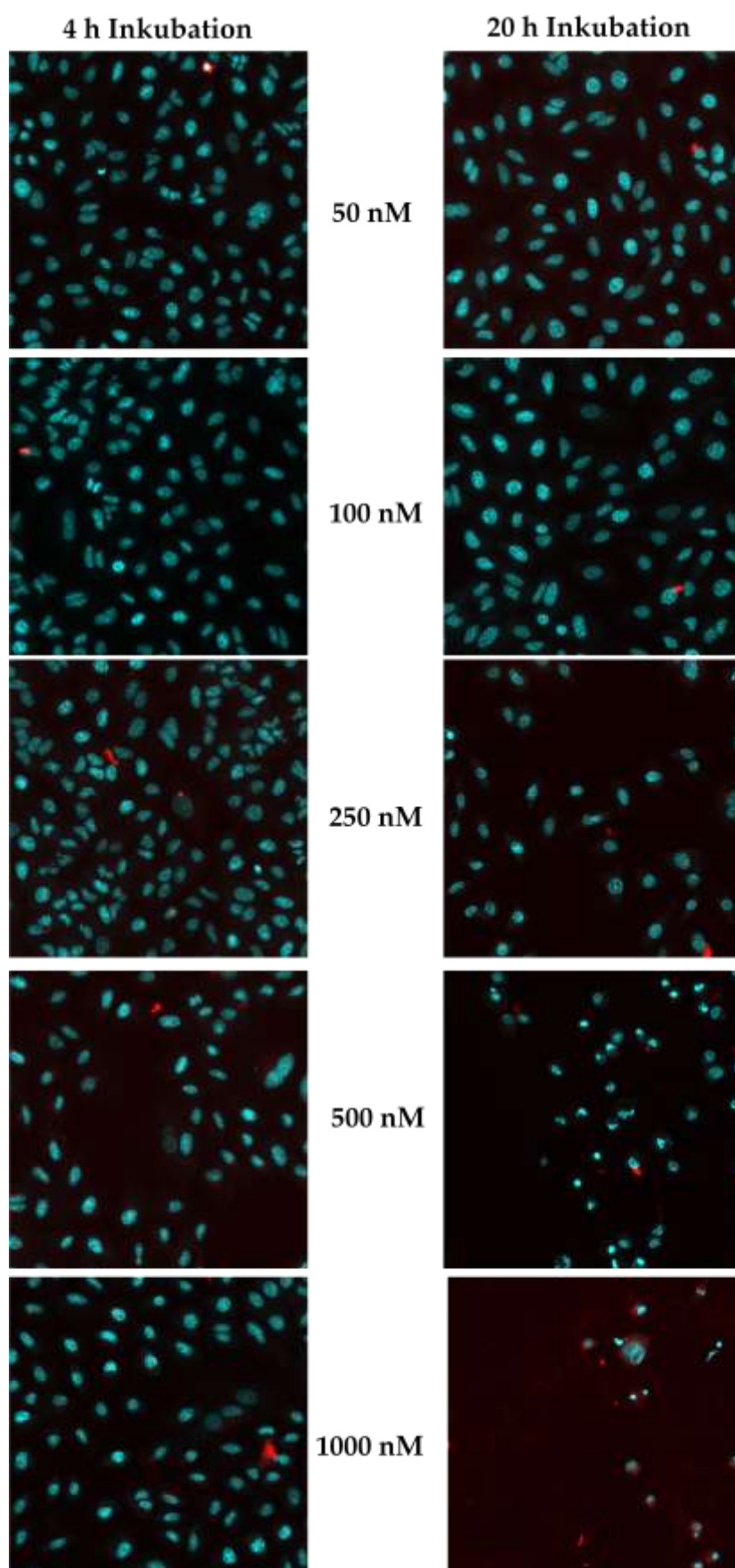


Abbildung 143: Vergleichende Darstellungen der NP3-Gal auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

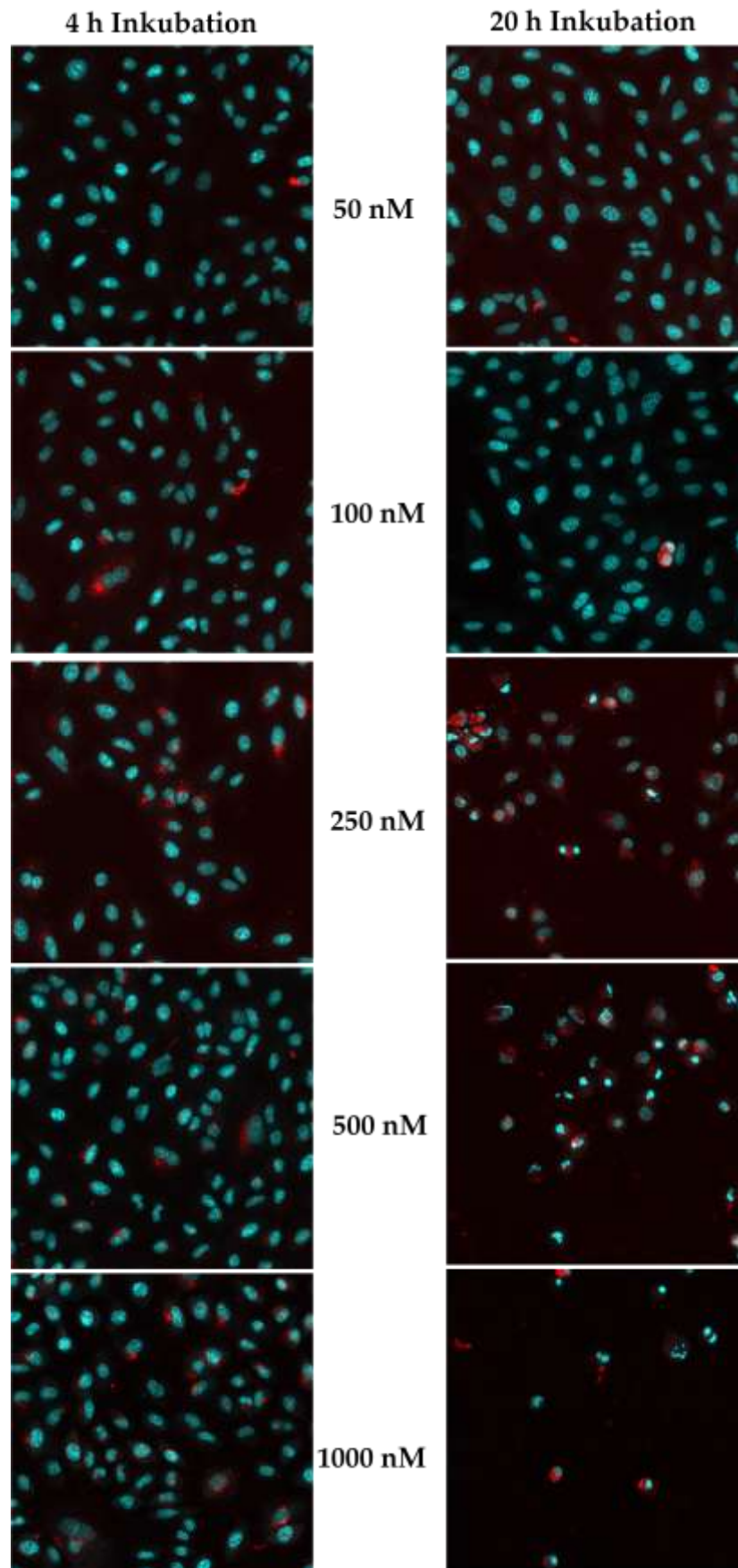


Abbildung 144: Vergleichende Darstellungen der NP3-Glu auf A549-Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von vier und 20 Stunden.

Zusammenfassend konnten in den Zellstudien die spezifische Bindung von 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid-modifizierten Nanopartikeln an die Leberzelllinie Hep-G2 durch die gute Affinität des ASPG-Rezeptors gezeigt werden. Der vergleichende Gegenversuch mit der Lungenkrebszelllinie A549 bestätigte diese Annahme. Hier waren keine Partikel aufnehmen durch die Zellen zu verzeichnen.

Die NP1/2-Glu-Teilchen wurden weder von den Hep-G2- noch von den A549-Zellen aufgenommen. Allerdings kam es bei beiden Zelllinien mehr oder weniger zu Artefakten von anhaftenden Partikelrückständen auf den Zelloberflächen.

Die A549-Zellen zeigten nach vierstündiger Partikelinkubation keine Aufnahmen. Wird die Inkubationsdauer auf 20 Stunden verlängert, traten jedoch bei den NP2- und den NP3-Teilchen ab Partikelkonzentrationen von 250 nM toxische Effekte an den Zellen auf. Die Toxizität könnte eventuell zu einem veränderten Metabolismus der Zelle und folglich unabhängig von der konjugierten Zuckerart zur Partikelaufnahme führen.

Zur sinnvollen Verarbeitung von Ergebnissen bei Zellaufnahmestudien sind geringe Partikelkonzentrationen (50 nM bis 100 nM sind ausreichend) sowie kurze Inkubationszeiten (bis maximal vier Stunden) zu wählen. Nur dann können biologisch verwertbare Daten erhalten werden.

Für Toxizitätsuntersuchungen von Nanopartikeln sollten entsprechend hohe Konzentrationen über längere Zeit auf den Zellen beobachtet werden.

Weiterführende Arbeiten im Hinblick auf derartige Zellstudien sollten mit den Partikelsystemen von *Ocean Nano Tech* sowie *life technologies*TM nachgeholt werden. Diese aminfunktionalisierten Teilchen liefern für die Staudinger-Reaktion gute Grundvoraussetzungen zur erfolgreichen Kopplung. Da in dieser Arbeit erste Versuche auf dem Gebiet der Staudinger Ligation erfolgten, konnten keine weiteren Ausführungen mit anderen Nanopartikeln statt finden.

4.16 Toxizitätsuntersuchungen der mit Zucker konjugierten Partikel

Die sechs mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose gekoppelten Partikelsysteme wurden mittels des WST-8-Assays auf ihre Toxizität gegenüber den Lungenkrebszellen A549 getestet (Abb. 145).

Wie schon die mit dem Cellomics aufgenommenen Zellbilder zeigten, reagierten die NP2/Gal/Glu sowie NP3/Gal/Glu ab dem Konzentrationsbereich von 250 nM bis 500 nM toxisch. Dabei waren keine Unterschiede zwischen 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid- und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose-gekoppelten Partikeln zu erkennen.

Die NP1-Gal/Glu Partikel hatten keinen Einfluss auf die untersuchten Zellen. Die Viabilität der Zellen blieb bei diesem Partikelsystem konzentrationsunabhängig bestehen.

Diese Toxizitätsergebnisse korrelierten mit den Untersuchungen der entsprechenden Nanoteilchen aus der Stabilitätsstudie (siehe Kapitel 4.11).

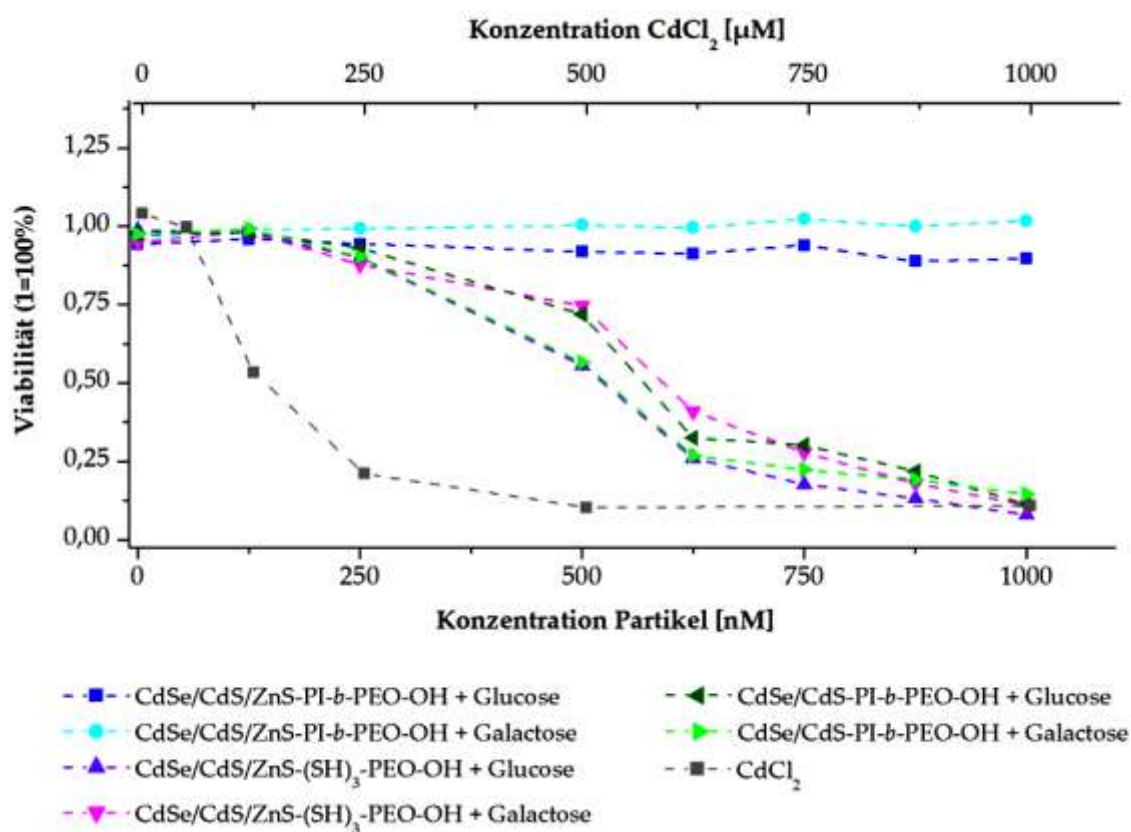


Abbildung 145: Übersicht zur Zytotoxizität verschieden konzentrierter Nanopartikel-Liganden-Systeme, gekoppelt mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose auf A549-Zellen. Zur Untersuchung diente der WST-8-Assay. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an CdCl_2 inkubiert.

5 Experimentalteil

5.1 Synthese von (SH)₃-PEO-OH (nach Literatur ⁸⁰)

In einem 50 mL Dreihalskolben wurde Polyethylenglycol(1000)monoacrylat (Monomer-Polymer and Dajac Labs, LOT: 21-98-3, 4.035 g, $4.035 \cdot 10^{-3}$ mol) in Trichlormethan (20 mL) gelöst, anschließend mit Pentaerythritoltetrakis (3-mercaptopropionat) (488.66 g/mol, 1.28 g/mL, 764 μ L, $2 \cdot 10^{-3}$ mol) und N-Ethyldiisopropylamin (129.24 g/mol, 0.782 g/mL, 331 μ L, $2 \cdot 10^{-3}$ mol) versetzt und für 70.5 Stunden bei 50 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionslösung wurde zum Abkühlen ins Eisfach gestellt. In einem 250 mL Einhalskolben wurden 100 mL eiskalter Diethylether vorgelegt. Unter starkem Rühren wurde die kalte Reaktionslösung mittels Spritze zugetropft. Dabei fiel ein farbloser Niederschlag aus, der mittels Membranpumpenvakuum filtriert wurde. Das Produkt wurde in Wasser (20 mL) gelöst und lyophilisiert. Es konnte ein farbloser Feststoff erhalten werden (3.11 g, 104% Ausbeute). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein ¹H-NMR in CDCl₃ aufgenommen.

¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃ bei δ 7.26 ppm): δ 4.24 (t, 2H), 4.16 (m, 4H), 3.80-3.45 (m, 90H), 2.80-2.73 (m, 6H), 2.67-2.61 (m, 6H).

5.2 Ligandenaustausch:

CdSe/CdS/ZnS (CAN GmbH; Lot.: SAB-0-110-15) mit (SH)₃-PEO-OH

Nanopartikel-Vorbereitung

Die QDs, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Carsten Ott (CAN GmbH), wurden mit Ethanol (1 mL) gefällt und zentrifugiert (5 min, 10000rpm, Minispinn). Der farblose Überstand wurde dekantiert und die Partikel in Hexan (950 μ L) aufgenommen. Für die Bestimmung der Konzentration nach Peng *et al.* wurden 5 μ L der QD-Lösung in 2995 μ L Hexan gelöst und in einer Quarzglasküvette spektroskopisch vermessen.

Liganden-Vorbereitung

In einem 50 mL Zentrifugenröhrchen wurde der Ligand (SH)₃-PEO-OH (~1488 g/mol, 1.124 g, $7.55 \cdot 10^{-4}$ mol) in Trichlormethan (10 mL) gelöst und mit einer 0.2 M Zinkacetat/TOP-Lösung (3.8 mL, $7.6 \cdot 10^{-4}$ mol) versetzt. Zum Fällern des Zn-komplexierten Liganden wurde Hexan (35 mL) hinzugegeben. Der voluminöse

farblose Niederschlag wurde abermals zentrifugiert (5 min, 4025 x g). Dieser Vorgang wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt.

Ligandenaustausch

In einem 50 mL Zweihalskolben wurde der mit Zink vorkomplexierte Ligand in Trichlormethan (20 mL) mit den CdSe/CdS/ZnS-QDs (272 μ M, 735 μ L, $1.999 \cdot 10^{-7}$ mol) versetzt. Die Lösung wurde unter Stickstoffatmosphäre bei 45 °C unter Lichtausschluss gerührt. Nach 21 Stunden wurde die Reaktion beendet und die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Partikel wurden aus Hexan (80 mL) gefällt und zentrifugiert (5 Minuten, 4025 x g). Die gefällten Nanopartikel wurden in Trichlormethan (15 mL) aufgenommen und ein zweites Mal mit Hexan (35 mL) gefällt und zentrifugiert (5 min, 4025 x g). Das Pellet wurde unter Stickstoffstrom (2 Stunden) getrocknet und in Reinstwasser (20 mL) aufgenommen. Es hatte sich ein Großteil gelöst. Die Nanopartikel-Lösung wurde abgenommen und spritzenfiltriert (Millipore Millex-GP, Hydrophilic PES 0.22 μ m). Es konnten 17 mL einer 4.3 μ M Lösung erhalten werden.

5.3 Stabilitätsuntersuchung

Die Stabilitätsmessungen aller Nanopartikel-Lösungen sowie die Referenz-Lösung Rhodamin 6G wurden in Quarzglasküvetten der Firma Starna durchgeführt. Diese haben eine Schichtdicke von 1 cm.

Folgende Lösungen wurden für die Stabilitätsstudien verwendet:

5.3.1 Ansetzen der biologisch relevanten Medien - Langzeitmedien über 6 Monate

- I. Reinstwasser
- II. DPBS (pH 7.43) von Lonza, N° 7111, 0.0095 M (PO_4), Cat. N°: BE 17-512F, Lot: 2MB109
- III. PBS (0.01 M, pH 2.93)
hergestellt aus einer 1 M Stammlösung von KH_2PO_4 (6.8020 g; in 0.0499 mol) in Reinstwasser (50 mL) gelöst. ^[98]
Von dieser Stammlösung wurden 500 μ L in Reinstwasser (49.5 mL) gelöst und anschließend ein pH Wert von 3 mit einer 0.1 M HCl-Lösung eingestellt.
- IV. PBS (0.01 M, pH 11.05)
hergestellt aus einer 1 M Stammlösung von K_2HPO_4 (8.7043 g; in 0.0499 mol) in Reinstwasser (50 mL) gelöst. ^[85]
Von dieser Stammlösung wurden 500 μ L in Reinstwasser (49.5 mL) gelöst und anschließend ein pH Wert von 11 mit einer 1 M NaOH-Lösung eingestellt.
- V. Borat-Puffer (20 mM, pH 8.49)

Es wurde Borsäure (0.0612 g; in $9.8981 \cdot 10^{-4}$ mol) in Reinstwasser (45 mL) gelöst. Anschließend wurde ein pH Wert von ~8 mit 1 M NaOH-Lösung eingestellt und die Lösung auf 50 mL mit Reinstwasser aufgefüllt.

VI. 0.025% Natriumazid in DPBS

Von einer 25%igen Natriumazid-Lösung wurden 50 µL in DPBS (49.95 mL) gelöst.

5.3.2 Ansetzen der biologisch relevanten Medien - Kurzzeitmedien über 1 Woche

VII. 10% HEPES in DMEM

Es wurden HEPES (5 mL) mit DMEM (45 mL) versetzt.

VIII. 10% FCS in DMEM

Es wurden FCS (5 mL) mit DMEM (45 mL) versetzt.

IX. 10% FCS in DPBS

Es wurden FCS (5 mL) mit DPBS (45 mL) versetzt.

X. 1% BSA in DPBS

Es wurde BSA (0.500 g; in $\sim 7.576 \cdot 10^{-6}$ mol) in DPBS (50 mL) gelöst. Der gemessene pH Wert betrug 7.36.

5.3.3 Ansetzen der biologisch relevanten Medien - Kurzzeitmedien über 24 Stunden

XI. EDTA (10 mM)

Es wurde EDTA (0.146 g; in $4.996 \cdot 10^{-4}$ mol) in Reinstwasser (46 mL) und unter Zusatz von 1 M NaOH-Lösung (4 mL) gelöst.

XII. Glutaral in DPBS (5%)

Es wurde von einer 50%igen Glutaral-Lösung 5 mL mit DPBS (45 mL; Lonza, Lot: 2MB109, BE17-512F) versetzt.

XIII. H₂O₂ (1%)

Es wurde von einer 30%igen H₂O₂-Lösung 1.6 mL mit Reinstwasser (48.4 mL) versetzt.

XIV. Triton X-100 (5%)

Es wurde Triton X-100 (2.5 mL) mit Reinstwasser (47.5 mL) versetzt.

5.3.4 Herstellung der Farbstofflösung Rhodamin 6G als Referenz für die Quantenausbeutebestimmung

Zur Bestimmung der relativen Quantenausbeuten wurden Verdünnungsreihen der Referenzprobe (Rhodamin 6G) und der zu untersuchenden Nanopartikel-Probe hergestellt.

Die höchste Konzentration der jeweiligen Lösung musste im Absorptionsmaximum eine geringere optische Dichte als 0.1 haben, um etwaige Reabsorptionseffekte zu vermeiden. Die optischen Dichten der jeweiligen Verdünnungen wurden bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt (da sich hier ein Plateau des Referenzfarbstoffes befindet und damit der Messfehler auf Grund der geringen Steigung am niedrigsten ist) und in die entsprechende Absorptionsintensität (f) umgerechnet:

$$f = 1 - 10^{-OD} \quad \text{Gl. 4}$$

Die Anregung des Referenzfarbstoffes sowie der Proben im Emissionsspektrometer erfolgte schließlich bei einer Wellenlänge von 500 nm. Die erhaltenen Emissionsintegrale wurden gegen die berechneten Absorptionsintensitäten graphisch aufgetragen. Aus den linearen Steigungen und den Brechungsindizes konnten die Fluoreszenzquantenausbeuten mit geringem Fehler berechnet werden.

Zunächst wurde eine Stammlösung der Referenzlösung Rhodamin 6G (100 µg/mL; 100 µL) und Ethanol Uvasol (900 µL) hergestellt. Aus dieser Lösung wurden drei weitere Verdünnungen hergestellt:

Lösung 1 entspricht einer Rhodamin 6G Messlösung mit einer Konzentration von 0.5 µg/mL. Dazu wurden 450 µL von der Stammlösung in 8550 µL Ethanol Uvasol gelöst.

Lösung 2 entspricht einer Rhodamin 6G Messlösung mit einer Konzentration von 0.25 µg/mL. Dazu wurden 4500 µL von der Lösung 1 (0.5 µg/mL) in 4500 µL Ethanol Uvasol gelöst.

Lösung 3 entspricht einer Rhodamin 6G Messlösung mit einer Konzentration von 0.125 µg/mL. Dazu wurden 4500 µL von der Lösung 2 (0.25 µg/mL) in 4500 µL Ethanol Uvasol gelöst.

Lösung 4 entspricht einer Rhodamin 6G Messlösung mit einer Konzentration von 0.0625 µg/mL. Dazu wurden 4500 µL von der Lösung 3 (0.125 µg/mL) in 4500 µL Ethanol Uvasol gelöst.

5.3.5 Messlösungen der Nanopartikel-Proben

Die zur Stabilität vermessenen Proben sollten in ihrem jeweiligen Absorptionsmaximum eine optische Dichte von 0.05 haben. Dazu wurde von allen Partikelsystemen eine definierte Menge ihrer Stammlösung in Reinstwasser am Cary 50 Spektrophotometer der Firma Varian spektroskopisch vermessen. Nach Bestimmung der optischen Dichte im Maximum des ersten Absorptionspeaks wurde die entsprechende Nanopartikel-Menge, der den Wert von 0.05 an diesem Punkt annimmt, im jeweiligen Medium abgemessen.

Für die Quantenausbeutebestimmung wurde die wässrige Probenlösung der Nanopartikelsysteme mit drei weiteren Verdünnungen hergestellt. Die Berechnung der Quantenausbeute in den übrigen Medien erfolgte aus den Vergleich der aufgenommenen Emissionsspektren und den daraus resultierenden Flächen unter den Kurven. Alle Proben wurden im Emissionsspektrometer bei 500 nm angeregt, um eine genaue Vergleichbarkeit zu erhalten.

Für die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels Dynamischer Lichtstreuung wurden dieselben Proben-Lösungen in den Quarzglasküvetten verwendet.

Die Messung des Zeta-Potentials erfolgte in einer Mehrfach-Zelle, der sogenannten Dip-Cell. Diese wurde mit ~750 μL Proben-Lösung in Wasser befüllt und am Malvern-Gerät vermessen.

Das Autoklavieren wurde von den wässrigen Proben in entsprechende Probengefäße im Autoklaven *Systec VX 65* für 20 Minuten bei 120 °C durchgeführt.

5.4 Darstellung von 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalat (MDT) ^[82]

In einem 25 mL 2-Halskolben wurden 1-Methyl-2-iodoterephthalat (MIP, 306.054 g/mol, 0.6837 g, $2.234 \cdot 10^{-3}$ mol) und Palladium(II)acetat (224.5 g/mol, 0.0052 g, $2.316 \cdot 10^{-5}$ mol) in absolutem und entgastem Acetonitril (7 mL) gelöst. Dazu wurde *N,N'*-Diisopropylethylamin (129.24 g/mol, 0.74 g/cm³, 781 μL , $4.47 \cdot 10^{-3}$ mol) gegeben und anschließend die braun-farbene Lösung mehrmals entgast und mit Stickstoff geflutet. Schließlich wurde Diphenylphosphan (186.19 g/mol, 1.070 g/cm³, 390 μL , $2.235 \cdot 10^{-3}$ mol) injiziert. Die rotbraune Lösung wurde unter Rückfluss im Stickstoffstrom für 4.5 Stunden gerührt. Nach Reaktionsende wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösung im Vakuum konzentriert. Der dunkelrote Rückstand wurde in Dichlormethan (45 mL) aufgenommen und mit Wasser (25 mL) sowie 1 M Salzsäure (25 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer entfernt. Der orange-gelb-farbene Feststoff wurde mit eiskaltem Methanol (10 mL) gewaschen, filtriert und nochmals mit Methanol (20 mL) gespült. Um den Feststoff quantitativ zu erhalten, wurde

dieser mit Dichlormethan (10 mL) vom Filterpapier gelöst. Nach vorsichtigem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Trocknen, konnte ein gelber kristalliner Feststoff erhalten werden (358.9 mg, $9.851 \cdot 10^{-4}$ mol, 44% Ausbeute). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 8.10-8.05 (m, 2H), 7.68-7.67 (d, 1H), 7.36-7.26 (m, 10H), 3.75 (s, 3 H).

5.5 Kopplung von MDT mit Methoxypolyethylenglycolamin (Modellreaktion) ^[82]

In einem 25 mL Zweihalskolben wurden *N*-Hydroxysuccinimid (8.1 mg, 115.087 g/mol, $7.038 \cdot 10^{-5}$ mol) und 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalat (24.8 mg, 364.331 g/mol, $6.807 \cdot 10^{-5}$ mol) in Dimethylformamid (2 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (126.20 g/mol, 0.815 g/mL, 10.7 μL , $6.91 \cdot 10^{-5}$ mol) für 30 Minuten unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach Zugabe des Polymers Methoxypolyethylenglycolamin (mPEG-NH₂, 91.6 mg, 2000 g/mol, $4.58 \cdot 10^{-5}$ mol) wurde die Lösung für weitere 30 Minuten unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde 4-Dimethylaminopyridin (122.168 g/mol, 8.2 mg, $6.712 \cdot 10^{-5}$ mol) zugegeben und bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach 19 Stunden Reaktionszeit, wurde zu der klaren gelben Lösung eiskalter Diethylether (8 mL) gegeben. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag der bei 0 °C für 50 Minuten (4024 x g) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (5 mL) bei ~30 °C gelöst und anschließend im Eisbad kristallisiert. Der farblose Niederschlag wurde abermals bei 0 °C für 1 Stunde (4024 x g) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert. Der Rückstand wurde unter Stickstoffstrom getrocknet. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (28.0 mg, $1.20 \cdot 10^{-5}$ mol, 26% Ausbeute, 25% Umsetzung). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 8.10-8.05 (m, 0.5H), 7.68 (d, 1H), 7.35-7.31 (m, 2.5H), 3.64 (m, 161H), 3.37 (s, 3 H).

5.6 Staudinger Ligation: MDT-NH-mPEG mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid ^[81]

Es wurden MDT-NH-mPEG (2332 g/mol, 24.6 mg, $1.055 \cdot 10^{-5}$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-azid (373.315 g/mol, 4.9 mg, $1.313 \cdot 10^{-5}$ mol) in einem Gemisch aus THF/Wasser (1.5 mL/0.5 mL) bei Raumtemperatur gerührt. Nach gut 23 Stunden wurde die Reaktion beendet. Zu der klaren Lösung wurde eiskalter Diethylether (8 mL) gegeben. Es bildete sich eine trübe wässrige Phase. Zum Fällern des Produktes wurde dieses bei 0 °C für 1 Stunde ($4024 \times g$) zentrifugiert. Das Produkt wurde im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurde ein hellgelber Feststoff erhalten (21.9 mg, $8.11 \cdot 10^{-6}$ mol, 89% Ausbeute, 50% Umsetzung). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 aufgenommen.

$^1\text{H NMR}$

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 8.10-8.05 (m, 0.5H), 7.77-7.41 (m, 7H), 5.41-5.37 (m, 0.5H), 5.24-5.18 (dd, 0.5H), 5.14-5.09 (m, 0.5H), 5.07-5.04 (m, 0.5H), 4.17-4.08 (m, 0.5H), 4.02-3.96 (dd, 0.5H), 3.64 (m, 181H), 3.37 (s, 3 H), 2.16, 2.01, 1.99, 1.96 (s, 6H).

Durch Verunreinigungen im Produkt konnte teilweise keine eindeutige Zuordnung aller NMR-Signale erfolgen.

5.7 Kopplung von MDT mit PI-*b*-PEO-NH₂

In einem 25 mL Dreihalskolben wurden *N*-Hydroxysuccinimid (8.6 mg, 115.087 g/mol, $7.473 \cdot 10^{-5}$ mol) und 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalate (24.9 mg, 364.331 g/mol, $6.834 \cdot 10^{-5}$ mol) in Dimethylformamid (2 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (10.6 μL , 126.20 g/mol, 0.815 g/mL, $6.862 \cdot 10^{-5}$ mol) für 30 Minuten unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Dann wurde das Polymer PI-*b*-PEO-NH₂ (103.8 mg, 11800 g/mol, $8.797 \cdot 10^{-6}$ mol) sowie noch weiteres DMF (2 mL) hinzugefügt und weitere 30 Minuten unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde 4-Dimethylaminopyridin (7.3 mg 122.168 g/mol, $5.975 \cdot 10^{-5}$ mol) zugegeben und bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktion wurde nach 20.5 Stunden beendet. Zu der klaren gelben Lösung wurde eiskalter Diethylether (10 mL) gegeben. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der bei 0 °C für 80 Minuten ($4024 \times g$) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (5 mL) bei ~ 30 °C gelöst und anschließend im Eisbad für 30 Minuten kristallisiert. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der bei 0 °C für 75 Minuten ($4024 \times g$) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert. Das Produkt wurde im Stickstoffstrom über Nacht getrocknet. Es wurde ein gelb-hellbraun-farbener

Feststoff erhalten (82.5 mg, $6.78 \cdot 10^{-6}$ mol, 80% Ausbeute; 25% Umsetzung). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 8.07-8.03 (m, 0.5H), 7.69-7.64 (m, 0.5H), 7.37-7.31 (m, 3H), 5.89-5.67 (m, 16H, PI), 5.01-4.58 (m, 104H, PI), 3.83-3.45 (m, 788H, PEG).

Auch hier sind keine eindeutigen Signalzuordnungen möglich auf Grund von Überlagerungen diverser Peaks sowie eventueller Verunreinigungen.

5.8 Staudinger Ligation: MDT-NH-PI-*b*-PEO mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden MDT-NH-PI-*b*-PEO (~ 12146 g/mol, ~ 0.0518 g, $4.2648 \cdot 10^{-6}$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-azide (373.315 g/mol, 0.0014 g, $3.7502 \cdot 10^{-6}$ mol) in einem Gemisch aus THF/Wasser (1.5 mL/0.5 mL) bei Raumtemperatur gerührt. Nach etwa 25 Stunden wurde die Reaktion beendet. An der Glaswand befand sich farbloser transparenter Feststoff. Die Lösung wurde mit Reinstwasser (10 mL) versetzt und mittels Float A Lyzer (500MWO) vier Tage dialysiert und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (16.5 mg, 35% Ausbeute, 50-60% Umsatz). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 8.08 (m, 0.5H), 7.69-7.65 (m, 3.5H), 7.53-7.46 (m, 6.5H), 5.73-5.71 (m, 16H, PI), 5.42 (dd, 0.6H, Zu), 5.18-5.13 (dd, 0.5H, Zu), 5.04-5.01 (m, *H, Zu), 4.90-4.46 (m, 114H, PI), 4.45 (m, 0.6H, Zu), 4.33-4.30 (m, 0.3H, Zu), 4.18-4.15 (m, 0.7H, Zu), 3.82-3.46 (m, 1040H, PEG), 2.17, 2.09, 2.06, 1.99 (s, *H, Zu).

* nicht integrierbar, auf Grund von Signalüberlagerungen durch das Polymer

5.9 Kopplung von MDT an CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH

In einem 50 mL Glasröhrchen wurden 1-Methyl-2-diphenylphosphantereophthalat (6.2 mg, 364.331 g/mol, $1.7017 \cdot 10^{-5}$ mol) und *N*-Hydroxysuccinimide (2.4 mg, 115.087 g/mol, $2.0854 \cdot 10^{-5}$ mol) in Dimethylformamid (1 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (126.20 g/mol, 0.815 g/mL, 2.2 μL , $1.4208 \cdot 10^{-5}$ mol) für eine Stunde gerührt. Danach wurden die CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-QDs in Wasser (SAL-0-133h, 2.8 mL, 5.8 μM , $1.4 \cdot 10^{-8}$ mol) hinzugefügt und für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend

wurde 4-Dimethylaminopyridin (122.168 g/mol, 2.2 mg, $1.8008 \cdot 10^{-5}$ mol) zugegeben, die Glaswand mit Wasser (2 mL) gespült und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für etwa 24 Stunden gerührt. Ohne weitere Aufarbeitungsschritte folgten die Staudinger Ligationen mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose.

5.9.1 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-MDT mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid

Es wurde 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (Aldrich, 513989, 205.169 g/mol, 0.0045 g, $2.1933 \cdot 10^{-5}$ mol) zu der Reaktionslösung von Kapitel 5.9 gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 21 Stunden wurde die Reaktion beendet. Die Lösung wurde zunächst mittels Viva Spin 30000 MWOC zentrifugiert (10 Minuten, 3800 x g). Die konzentriertere Lösung (~2 mL) wurde zwei Mal mit je 5-10 mL Wasser „gewaschen“ und erneut zentrifugiert (10+25 Minuten, 3800 x g). Zur Abtrennung größerer Aggregate wurde die trübe Lösung mittels 0.8 μ m Spritzenfilter filtriert. Schließlich wurde die Probe über einen Sucrosegradienten gereinigt (siehe Kapitel 5.12).

5.9.2 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-PI-*b*-PEO-OH-MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose

Es wurde 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (Aldrich, 712760, 205.17 g/mol, 0.0035 g, $1.7059 \cdot 10^{-5}$ mol) zu der Reaktionslösung von Kapitel 5.9 gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 21 Stunden wurde die Reaktion beendet. Die Lösung wurde zunächst mittels Viva Spin 30000 MWOC zentrifugiert (10 Minuten, 3800 x g). Die konzentriertere Lösung (~2 mL) wurde zwei Mal mit je 5-10 mL Wasser „gewaschen“ und erneut zentrifugiert (10+25 Minuten, 3800 x g). Zur Abtrennung größerer Aggregate wurde die trübe Lösung mittels 0.8 μ m Spritzenfilter filtriert. Schließlich wurde die Probe über einen Sucrosegradienten gereinigt (siehe Kapitel 5.12).

5.10 Kopplung von MDT an CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH

In einem 50 mL Glasröhrchen wurden 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalat (6.0 mg, 364.331 g/mol, $1.6469 \cdot 10^{-5}$ mol) und *N*-Hydroxysuccinimid (2.5 mg, 115.087 g/mol, $2.1723 \cdot 10^{-5}$ mol) in Dimethylformamid (1 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (126.20 g/mol, 0.815 g/mL, 2.2 μ L, $1.4208 \cdot 10^{-5}$ mol) für eine Stunde gerührt. Dann

wurden die CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-OH-QDs in Wasser (3.3 mL, 4.2 μ M, 1.4 $\cdot$ 10⁻⁸ mol) hinzugefügt und für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurde 4-Dimethylaminopyridin (122.168 g/mol, 2.3 mg, 1.8827 $\cdot$ 10⁻⁵ mol) zugegeben, die Glaswand mit 2 mL Wasser gespült und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für etwa 24 Stunden gerührt. Ohne weitere Aufarbeitungsschritte folgten die Staudinger Ligationen mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose.

5.10.1 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-MDT mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid

Es wurde 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (Aldrich, 513989, 205.169 g/mol, 0.0041 g, 1.9984 $\cdot$ 10⁻⁵ mol) zu der Reaktionslösung von Kapitel 5.10 gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 21 Stunden gerührt. Die Lösung wurde dann mittels Viva Spin 30000 MWOC zentrifugiert (10 Minuten, 3800 $\times$ g). Die konzentriertere Lösung (~2 mL) wurde zwei Mal mit je 5-10 mL Wasser „gewaschen“ und erneut zentrifugiert mittels Viva Spin 100000 (10+25 Minuten, 3800 $\times$ g). Zur Abtrennung größerer Aggregate wurde die trübe Lösung mittels 0.8 μ m Spritzenfilter filtriert. Schließlich wurde die Probe über einen Sucrosegradienten gereinigt (siehe Kapitel 5.12).

5.10.2 Staudinger Ligation: CdSe/CdS/ZnS-(SH)₃-PEO-MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose

Es wurde 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (Aldrich, 712760, 205.17 g/mol, 0.0034 g, 1.6572 $\cdot$ 10⁻⁵ mol) zu der Reaktionslösung von Kapitel 5.10 gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 21 Stunden wurde die Reaktion beendet und die Lösung zunächst mittels Viva Spin 30000 MWOC zentrifugiert (10 Minuten, 3800 $\times$ g). Die konzentriertere Lösung (~2 mL) wurde zwei Mal mit je 5-10 mL Wasser „gewaschen“, erneut zentrifugiert (10+25 Minuten, 3800 $\times$ g) und anschließend mittels 0.8 μ m Spritzenfilter von größeren Aggregaten getrennt. Schließlich wurde die Probe über einen Sucrosegradienten gereinigt (siehe Kapitel 5.12).

5.11 Kopplung von MDT an CdSe/CdS-(Dot/Rods)-PI-*b*-PEO-OH

In einem 50 mL Glasröhrchen wurden 1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalat (6.1 mg, 364.331 g/mol, 1.674 $\cdot$ 10⁻⁵ mol) und *N*-Hydroxysuccinimid (~2.4 mg, 115.087 g/mol, 2.0854 $\cdot$ 10⁻⁵ mol) in Dimethylformamid (1 mL) gelöst. Die

Reaktionslösung wurde nach Zugabe von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (126.20 g/mol, 0.815 g/mL, 2.2 μ L, $1.4208 \cdot 10^{-5}$ mol) für eine Stunde gerührt. Dann wurden die CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-OH-Dot/Rods in Wasser (SAL-0-141h, 2.8 mL, 5.8 μ M, $1.4 \cdot 10^{-8}$ mol) hinzugefügt und für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurde 4-Dimethylaminopyridin (122.168 g/mol, 2.0 mg, $1.637 \cdot 10^{-5}$ mol) zugegeben, die Glaswand mit 2 mL Wasser gespült und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 24 Stunden gerührt. Ohne weitere Aufarbeitungsschritte folgten die Staudinger Ligationen mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid und 6-Azido-6-deoxy-D-glucose.

5.11.1 Staudinger Ligation: CdSe/CdS-PI-*b*-PEO-MDT mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid

Es wurde 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid (Aldrich, 513989, 205.169 g/mol, 0.0040 g, $1.9496 \cdot 10^{-5}$ mol) zu der Reaktionslösung von Kapitel 5.11 gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 21 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mittels Viva Spin 30000 MWOC zentrifugiert (10 Minuten, 3800 x g). Die konzentriertere Lösung (~2 mL) wurde zwei Mal mit je 5-10 mL Wasser „gewaschen“ und erneut zentrifugiert (10+25 Minuten, 3800 x g). Anschließend wurde die trübe Lösung mittels 0.8 μ m Spritzenfilter von größeren Aggregaten befreit. Schließlich wurde die Probe über einen Sucrosegradienten gereinigt (siehe Kapitel 5.12).

5.11.2 Staudinger Ligation: CdSe/CdS-(Dot/Rods)-PI-*b*-PEO-OH-MDT mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose

Es wurde 6-Azido-6-deoxy-D-glucose (Aldrich, 712760, 205.17 g/mol, 0.0018 g, $8.7732 \cdot 10^{-6}$ mol) zu der Reaktionslösung (Kapitel) gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 21 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung zunächst mittels Viva Spin 100000 MWOC zentrifugiert (10 Minuten, 3800 x g). Die konzentriertere Lösung (~2 mL) wurde zwei Mal mit je 5-10 mL Wasser „gewaschen“, abermals zentrifugiert (10+25 Minuten, 3800 x g) und schließlich mit einem 0.8 μ m Spritzenfilter von größeren Aggregaten getrennt. Zuletzt wurde die Probe über einen Sucrosegradienten gereinigt (siehe Kapitel 5.12).

5.12 Reinigung der Zucker-gekoppelten Partikel über den Sucrosegradienten

Die Reinigung über den Sucrosegradienten erfolgt unter sterilem Arbeiten an einer Sterilbank mit autoklavierten Reinstwasser. Dazu wird ein Röhrchen (glasklar, Nalgene) mit unterschiedlich konzentrierter Sucrose und der entsprechenden Partikelprobe vorsichtig beschichtet (Abb. 146). Dabei sollte eine Vermischung der Phasen ausgeschlossen werden.

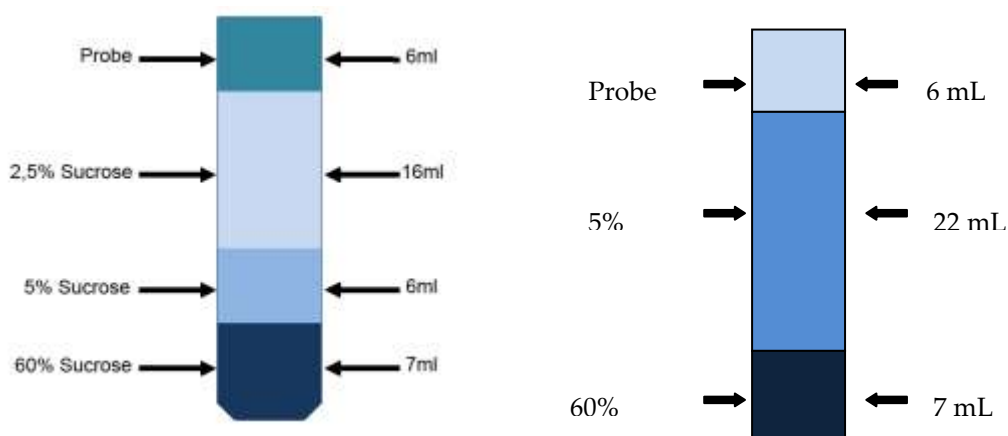


Abbildung 146: Schematische Darstellung der Schichtung des Sucrosegradienten.

links: Sucrose-Reinigung von NP1-Gal und NP1-Glu sowie NP2-Gal und NP2-Glu,
rechts: Sucroseschichtung von NP3-Gal und NP3-Glu.

Anschließend wurden die Probengefäße für 15 Stunden bei 16 °C und 50000 x g zentrifugiert (Rotor: SA300). Die so erhaltenen Banden wurden auf den Zentrifugengefäßen markiert und gradientenweise vereint. Zum Schluss wurde die Sucrose mittels Viva Spin 20 (100000 MWOC PES) bei 20 °C und 4000 x g entfernt. Dabei wurde die jeweilige Partikelprobe mit Wasser gewaschen und konzentriert.

Tabelle 4: Spektroskopiemessungen und Konzentrationsbestimmungen der Staudingerprodukte

Probe	x μL /x μL H ₂ O	c [μM]	QY	DLS
CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Galactose	50/2950	2.25	18.9%	50/53/47
CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Glucose	50/2950	3.21	20.1%	54/57/54
CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT-Galactose	50/2950	2.38	24.3%	13/9/17
CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT-Glucose	50/2950	2.70	19.9%	6/22/23
CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Galactose	50/2950	3.07	25.6%	45/44/44
CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Glucose	50/2950	0.93	26.3%	47/41/42

Alle Partikelproben wurden nochmals mittels Viva Spin 20 (100000 MWOC PES) konzentriert.

Tabelle 5: Konzentrationsbestimmungen und Mengenangaben der Staudinger-Produkte

Probe	x μL /x μL H ₂ O	c [μM]	vorhandene Menge
CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Galactose	20/980	13.5	~430 μL
CdSe/CdS/ZnS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Glucose	20/980	13.5	~530 μL
CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT-Galactose	20/980	7.25	~630 μL
CdSe/CdS/ZnS-(SH) ₃ -PEO-MDT-Glucose	20/980	8.29	~530 μL
CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Galactose	20/980	12.9	~650 μL
CdSe/CdS-PI- <i>b</i> -PEO-MDT-Glucose	20/980	7.84	~570 μL

5.13 Darstellung von S-((diphenylphosphan)methyl)ethanethioat ^[78]

In einem 50 mL Rundkolben wurden Acetylthiomethyl-diphenylphosphan-boran-komplex (Aldrich, LOT: 1409638V, 288.15 g/mol, 0.6230 g, $2.1621 \cdot 10^{-3}$ mol) und 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (112.17 g/mol, 0.2432 g, $2.1681 \cdot 10^{-3}$ mol) in absolutem Toluol (30 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C unter Stickstoffatmosphäre für 23.5 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Dichlormethan (12.5 mL) gelöst, mit 1 M HCl (12.5 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (12.5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde ein farbloser Feststoff mit öligem Anteil erhalten (467.2 mg, $1.703 \cdot 10^{-3}$ mol, 79% Ausbeute). Zur Analyse wurde von dem Feststoff ein ¹H-NMR in CDCl₃ aufgenommen.

¹H-NMR

(400 MHz, CDCl₃ bei δ 7.26 ppm): δ 7.46–7.41 (m, 4H), 7.37–7.35 (m, 6H), 3.52 (d, 2H), 2.29 (s, 3H) ppm.

5.14 Darstellung von (Diphenylphosphan)methanthiol ^[99]

In einem 50 mL Rundkolben wurde S-((diphenylphosphan)methyl)ethanethioat (274.31 g/mol, 0.4633 g, $1.6889 \cdot 10^{-3}$ mol) in Methanol (9 mL) gelöst. Anschließend wurde nach Zugabe von Natriumhydroxid (2 M, 12.4 mL) die Lösung für drei Stunden unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Methanol an der Vakuumpumpe entfernt. Zu der alkalischen Lösung wurde zum Ansäuern 4 M Salzsäure-Lösung (7.5 mL) gegeben. Die Lösung wurde dann drei Mal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mittels Rotationsverdampfer eingengt. Das Produkt wurde an der Vakuumpumpe getrocknet. Es konnte ein

farbloser Feststoff mit öligem Anteil erhalten werden (417 mg, $1.79 \cdot 10^{-3}$ mol, 90% Ausbeute). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H -NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 7.46–7.41 (m, 4H), 7.37–7.35 (m, 6H), 3.07 (m, 2H), 1.40 (dd, 1H) ppm.

5.15 DCC-Kopplung von Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure mit Diphenylphosphanmethanthiol (Modellreaktion) ^[96]

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure ((Sigma Aldrich, $\geq 80\%$, LOT: 0001372617), 5000 g/mol, 0.0188 g, $3.76 \cdot 10^{-6}$ mol), Diphenylphosphanmethanethiol ($c \sim 0.03745$ mol/L, 1 mL, $3.745 \cdot 10^{-5}$ mol) und Dicyclohexylcarbodiimid (206.33 g/mol, 0.0015 g, $7.2699 \cdot 10^{-6}$ mol) in DMF (1 mL) gelöst und bei 40 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach ~24 Stunden wurde die Reaktion beendet. Zu der Lösung wurde eiskalter Diethylether (10 mL) gegeben. Dabei fiel ein farbloser Niederschlag aus, der bei 0 °C für 90 Minuten zentrifugiert (4024 x g) wurde. Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (5 mL) bei ~30 °C gelöst und anschließend im Eisbad für 15 Minuten kristallisiert. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der bei 0 °C für eine Stunde (4024 x g) zentrifugiert wurde. Das Produkt wurde im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (58.7 mg, $8.02 \cdot 10^{-5}$ mol). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in deuteriertem DMSO aufgenommen. Es konnten keine Polymer-Peaks detektiert werden. Die Kopplung hatte unter diesen Bedingungen nicht funktioniert.

5.16 CDI-Kopplung von Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure mit Diphenylphosphanmethanethiol (Modellreaktion) ^[96]

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure (Sigma Aldrich, $\geq 80\%$, LOT: 0001372617, 5000 g/mol, 0.0500 g, $1 \cdot 10^{-5}$ mol), und 1,1'-Carbonyldiimidazol (162.15 g/mol, 0.0160 g, $9.867 \cdot 10^{-5}$ mol) in Dioxan (2 mL) aufgenommen und bei 40 °C für gut zwei Stunden unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Es befand sich etwas Feststoff in der Lösung. Die Lösung wurde mit eiskaltem Diethylether (6 mL) versetzt, wobei das CDI-aktivierte mPEG als heller Niederschlag ausfiel und mit einem 10 μm Filter abgetrennt wurde. Dieser Feststoff wurde in DMF (1 mL) aufgenommen und mit Diphenylphosphanmethanethiol ($c \sim 0.03745$ mol/L, 2.7 mL, $1.011 \cdot 10^{-4}$ mol) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für etwa 21 Stunden gerührt. Zu der klaren hellgelben Lösung wurde eiskalter Diethylether (15 mL)

gegeben. Dabei fiel ein voluminöser farbloser Niederschlag aus, welcher bei 0 °C für eine Stunde zentrifugiert (4024 x g) wurde. Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (10 mL) bei ~30 °C gelöst und anschließend ins Eisfach zum Kristallisieren gestellt. Das so erhaltene farblose Produkt wurde schließlich bei 0 °C für 75 Minuten (10397 x g, 10000 DRZ) zentrifugiert und im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (56.2 mg, quantitative Ausbeute, 35% Umsatz). Zur Analyse wurde von der Probe ein ¹H-NMR in CDCl₃ aufgenommen.

¹H-NMR

(400 MHz, CDCl₃ bei δ 7.26 ppm): δ 7.55–7.46 (m, 3.5H), 3.83–3.53 (m, 500H), 3.38 (s, 3H), 1.38 (m, 1H) ppm.

5.17 Reaktion von Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester mit Diphenylphosphanmethanthiol (Modellreaktion)

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester (Fluka, >80%, Lot: 0001346089, 5000 g/mol, 0.0188 g, 3.76·10⁻⁶ mol) und Diphenylphosphanmethanthiol (c~0.03745 mol/L, 1 mL, 3.745·10⁻⁵ mol) in DMF (1 mL) gelöst und anschließend bei 40 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach ~24 Stunden wurde die Reaktion beendet und die klare Lösung mit eiskaltem Diethylether (10 mL) versetzt. Dabei fiel ein voluminöser farbloser Niederschlag aus, der bei 0 °C für 90 Minuten zentrifugiert (4024 x g) wurde. Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (5 mL) bei ~30 °C gelöst und anschließend im Eisbad für 15 Minuten kristallisiert. Der Niederschlag wurde schließlich bei 0 °C für eine Stunde (4024 x g) zentrifugiert und im Stickstoffstrom getrocknet. Es konnte ein farbloser Feststoff erhalten werden (28.3 mg; 144% (das Produkt war anscheinend nicht ganz trocken, 23% Umsatz). Zur Analyse wurde von der Probe ein ¹H-NMR in DMSO aufgenommen.

¹H-NMR

(400 MHz, DMSO bei δ 2.50 ppm): δ 7.61–7.54 (m, 2.5H), 3.51 (m, 403H), 3.26 (s, 3H), 1.48 (m, 1H) ppm.

Die Probe wies noch einige Signale von Lösemittelresten (Ethanol und Diethylether) auf.

5.18 Reaktion von Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester mit Diphenylphosphanmethanthiol (Modellreaktion)

In einem 10 mL Glasröhrchen wurde Methoxypolythylenglycol-5000-essigsäure-N-succinimidylester (Fluka, >80%, Lot: 0001346089, 5000 g/mol, 0.0501 g, $1.002 \cdot 10^{-5}$ mol) in DMF (1 mL) aufgenommen und mit Diphenylphosphanmethanthiol ($c \sim 0.03745$ mol/L, 2.7 mL, $1.011 \cdot 10^{-4}$ mol) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für weitere 21 Stunden gerührt. Die klare hellgelbe Lösung wurde abermals mit eiskaltem Diethylether (15 mL) versetzt, wobei ein voluminöser farbloser Niederschlag ausfiel. Dieser wurde bei 0 °C für eine Stunde zentrifugiert ($4024 \times g$). Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (10 mL) bei ~ 30 °C gelöst und anschließend ins Eisfach zum Kristallisieren gestellt. Der farblose Niederschlag wurde schließlich bei 0 °C für 75 Minuten zentrifugiert ($10397 \times g$). Der Rückstand wurde unter Stickstoffstrom getrocknet. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (38.4 mg, 74% Ausbeute, 29% Umsetzung). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H -NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 7.57–7.41 (m, 3H), 3.65 (m, 478H), 3.38 (s, 3H), 1.33 (m, 1H) ppm.

Diese Probe war ebenfalls etwas verunreinigt. Eine Signalzuordnung der Verunreinigung wurde nicht durchgeführt.

5.19 Staudinger Ligation: Kopplung von DPPM-CO-mPEG (5000) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden DPPM-CO-mPEG (5000) (~ 5214 g/mol, 0.0201 g, $3.8550 \cdot 10^{-6}$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid (373.315 g/mol, 0.0015 g, $4.0181 \cdot 10^{-6}$ mol) in einem Gemisch aus THF/Wasser (1.5 mL/0.5 mL) bei Raumtemperatur für 25 Stunden gerührt. Die Lösung wurde mit Reinstwasser (10 mL) versetzt und mittels Float A Lyzer (500MWO) eine Woche dialysiert. Anschließend konnte das Produkt, ein farbloser Feststoff, durch Lyophilisation erhalten werden (15.6 mg, 33% Umsetzung). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H -NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 7.79–7.74 (m, 1H), 7.55–7.47 (m, 1.5H), 5.42 (d, 0.4H, Zu), 5.13 (m, 0.5H, Zu), 5.03 (dd, 0.4H, Zu), 4.59 (d, 0.5H, Zu), 4.00 (m, 0.7H, Zu), 3.82–3.53 (m, 488H), 3.37 (s, 3H), 2.16, 2.08, 2.06, 1.98 (s, 4H, Zu) ppm.

Es wurden Signale von Verunreinigungen detektiert, hier jedoch nicht weiter ausgewertet. Weiterhin konnten noch Signale vom DPPM gemessen werden.

5.20 Staudinger Ligation: DPPM-(essigsäure)-mPEG (5000) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden DPPM-(essigsäure)-mPEG (5000) (~ 5214 g/mol, 0.0185 g, $3.5481 \cdot 10^{-6}$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid (373.315 g/mol, 0.0025 g, $6.6997 \cdot 10^{-6}$ mol) in einem Gemisch aus THF/Wasser (1.5mL/0.5 mL) bei Raumtemperatur für etwa 25 Stunden gerührt. Die Lösung wurde mit Reinstwasser (10 mL) versetzt und mittels Float A Lyzer (500MWO) eine Woche dialysiert und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (13.6 mg, 67% Umsatz). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H -NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 7.57–7.45 (m, 1H), 5.42 (d, 0.6H, Zu), 5.16 (m, 0.6H, Zu), 5.03 (dd, 0.6H, Zu), 4.59 (d, 0.6H, Zu), 4.00 (m, 0.6H, Zu), 3.64 (m, 348H), 3.37 (s, 3H), 1.48 (m, 1H), 2.17, 2.09, 2.06, 1.98 (s, 8H, Zu) ppm.

Auch bei dieser Staudinger Ligation konnten noch wenige DPPM-Signale detektiert werden.

5.21 Staudinger Ligation: Kopplung von DPPM-(essigsäure)-mPEG (5000) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden DPPM-(essigsäure)-mPEG (5000) (~ 5214 g/mol, 0.0276 g, $5.2934 \cdot 10^{-6}$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid (373.315 g/mol, 0.0021 g, $5.6253 \cdot 10^{-6}$ mol) in einem Gemisch aus THF/Wasser (1.5mL/0.5 mL) bei Raumtemperatur 25 Stunden gerührt. Die Lösung wurde mit Reinstwasser (10 mL) versetzt und mittels Float A Lyzer (500MWO) eine Woche dialysiert. Nach Lyophilisieren der Lösung wurde ein farbloser Feststoff erhalten (5.1 mg, 55% Umsatz). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H -NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 7.58–7.46 (m, 2H), 5.42 (m, 0.5H, Zu), 5.16 (m, 0.5H, Zu), 5.04 (dd, 0.6H, Zu), 4.60 (d, 0.6H, Zu), 4.01 (m, 0.8H, Zu), 3.66 (m, 707H), 3.38 (s, 3H), 2.17, 2.09, 2.06, 1.99 (s, 8H, Zu) ppm.

Auch bei dieser Staudinger Ligation konnten noch wenige DPPM-Signale detektiert werden.

5.22 DCC-Kopplung von PI-*b*-PEO-COOH mit Diphenylphosphanmethanthiol

In einem 10 mL Glasröhrchen wurden PI-*b*-PEO-COOH (13800 g/mol, 0.05085 g, $3.681 \cdot 10^{-6}$ mol), Diphenylphosphanmethanthiol (1 mL, $3.745 \cdot 10^{-5}$ mol) und DCC (0.00089 g, $4.313 \cdot 10^{-6}$) in DMF (1 mL) gelöst und unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach fast 20.5 Stunden wurde die Reaktion beendet. Zu der Lösung wurde eiskalter Diethylether (10 mL) gegeben und bei 0 °C für 1.5 Stunden zentrifugiert (4024 g). Der Überstand wurde dekantiert, der Rückstand in absolutem Ethanol (5 mL) bei ~30 °C gelöst und anschließend im Eisbad für 30 Minuten kristallisiert. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der bei 0 °C für 1.5 Stunden (4024 x g) zentrifugiert und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet wurde. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (53.3 mg, <10% Umsetzung). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen.

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3 bei δ 7.26 ppm): δ 7.86–7.74 (m, 1H), 7.56–7.46 (m, 1H), 5.89–5.68 (m, 16H, PI), 5.06–4.57 (m, 108H, PI), 3.83–3.47 (m, 880H, PEG).

Im Spektrum fehlen eindeutige Signale vom DPPM (Aromaten-Bereich und CH_2 -Gruppe bei 3.05 ppm). Durch etwaige Verunreinigungen und Überlagerungen von Polymer-Signalen, konnte zum Teil keine eindeutige Zuordnung der Peaks durchgeführt werden.

5.23 Staudinger Ligation: DPPM-CO-PI-*b*-PEO mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid^[100]

Es wurden DPPM-CO-PI-*b*-PEO (14014 g/mol, 19.0 mg, $1.356 \cdot 10^{-6}$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid (373.315 g/mol, 6.1 mg, $1.634 \cdot 10^{-5}$ mol) in einem Gemisch aus THF/Wasser (1.5 mL/0.5 mL) bei Raumtemperatur für etwa 21 Stunden gerührt. Zu der klaren Lösung wurde eiskalter Diethylether (7.5 mL) gegeben. Es bildete sich eine trübe wässrige Phase. Zum Fällen des Produktes wurde dieses bei 0 °C für 75 Minuten (4024 x g) zentrifugiert. Es war nichts ausgefallen. Die untere wässrige Phase war trübe. Das Produkt wurde mittels Rotationsverdampfer vollständig vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde das Produkt mittels Spectra/Por® CE Float-A-Lyzer® G2 (SpectrumLabs.com) gereinigt. Dazu wurde ein MWCO 3.5–5 kD Float A Lyzer (5 mL) vorbereitet. Die

Membran wurde für ~40 Minuten im Reinstwasser vorbehandelt. Anschließend wurde das Reinstwasser ausgewechselt und das Produkt in 5 mL Reinstwasser aufgenommen. Das Produkt wurde mittels Dialyseverfahren etwa eine Woche gereinigt und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (14 mg, 73% Ausbeute). Zur Analyse wurde von der Probe ein ^1H -NMR in CDCl_3 aufgenommen. Es konnten keine Peaks detektiert werden, die Hinweise auf einen gekoppelten Zucker geben.

5.24 Toxizitätsmessungen - WST-8 Assay

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Nanopartikeln und Zellen bzw. Liganden und Zellen wurde das Quick Cell Proliferation Assay Kit II von BioVision verwendet. Dieses basiert auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen das Tetrazoliumsalz zum gelb-orangefarbenen Formazan zu reduzieren. Dazu wurden 10000 Zellen der Zelllinie A-549 in jedem Well einer 96-Well Platte von Greiner ausplattiert. Nach 28 Stunden Wachstum der Zellen wurden diese mit verschiedenen konzentrierten Nanopartikel-Lösungen (125 nM bis 1000 nM) verdünnt in DMEM mit 10% HEPES-Zusatz für etwa 18.5 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Als Referenzprobe dienten verschiedene Konzentrationen einer CdCl_2 -Lösung (50 μM bis 1000 μM). Die adhärennten Zellen wurden mit DPBS gewaschen und anschließend mit dem WST-Reagenz nach der Anleitung des Kits versetzt. Nach vier Stunden im Inkubator erfolgte die Aufnahme der Absorptionsspektren von den Proben bei 460 bis 620 nm mit dem TECAN Infinite 200 plate reader.

5.25 Zell-Aufnahmestudien von Nanopartikeln mit Hep-G2- und A549-Zellen

Die Vorbereitung der Zellexperimente wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Für die Zellaufnahme-Studien wurden sogenannte 96-Well-Platten von Nunc verwendet. Diese wurden zunächst mit einer definierten Anzahl an Zellen (20000 Zellen pro Well) ausplattiert. Nach zwei Tagen im Inkubator wurden entsprechend den Konzentrationsreihen die Nanopartikelproben in DMEM mit 10% FCS-Zusatz auf die Zellen gegeben und für vier Stunden weiter inkubiert. Anschließend wurden die Probenlösungen entfernt und die Zellkerne mittels Hoechst für eine halbe Stunde gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit 3.7%iger Formaldehydlösung in DPBS fixiert, und zweimal mit Reinstwasser gewaschen. Danach konnte die Platte über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt und nach Bedarf am Cellomics untersucht werden.

Die Zellaufnahmen wurden mit dem *ArrayScan® VII HCS Reader* des Cellomics durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Einstellungen getestet zur optimalen Darstellung der Zell-Aufnahmen durch die nicht modifizierten Nanopartikel sowie

den Teilchen, die über Staudinger Ligation mit Galactose oder Glucose gekoppelt wurden. Die Messungen bei den Hep-G2-Zellen konnten unter Verwendung der Apotome-Einheit mit den folgenden Filtern erhalten werden:

Channel 1: XF100-Hoechst (Darstellung der Zellkerne, dieser Filter zeigt keinen bis kaum sichtbaren Hintergrund im Vergleich zum XF93 Hoechst)

Channel 2: XF32-Tritc (sensitive) (Darstellung der Nanopartikel)

Bei der A549-Zelllinie war die Apotome-Einheit nicht notwendig, da sich diese Zellen sehr gut planar auf den Boden der 96 Well-Platte anordneten. Die Filter-Einstellungen konnten von den Hep-G2-Zellen übernommen werden. Im Nachfolgenden ist eine Übersicht zum verwendeten Plattenschema dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht vom Plattenschema zur Inkubation verschieden konzentrierter Nanopartikel-Systeme auf Hep-G2- und A549-Zellen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	20000 Kontrolle	H ₂ O
C	H ₂ O	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Gal 1000 nM 14,8 µL/18 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Glu 1000 nM 14,8 µL/18 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Gal 1000 nM 27,4 µL/17 2,6 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Glu 1000 nM 24 µL/176 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Gal 1000 nM 15,5 µL/18 4,5 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Glu 1000 nM 25,6 µL/17 4,4 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-OH 1000 nM 34 µL/166 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-OH 1000 nM 48 µL/152 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- OH 1000 nM 34 µL/166 µL	200 00 Ko n- trol le	H ₂ O
D	H ₂ O	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Gal 500 nM 7,5 µL/192, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Glu 500 nM 7,5 µL/192, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Gal 500 nM 13,7 µL/18 6 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Glu 500 nM 12 µL/188 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Gal 500 nM 7,8 µL/192 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Glu 500 nM 12,8 µL/18 7 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-OH 500 nM 17 µL/183 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-OH 500 nM 24 µL/176 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- OH 500 nM 17 µL/183 µL	200 00 Ko n- trol le	H ₂ O
E	H ₂ O	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Gal 250 nM 3,8 µL/196 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Glu 250 nM 3,8 µL/196 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Gal 250 nM 6,9 µL/193 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Glu 250 nM 6 µL/194 µ L	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Gal 250 nM 3,9 µL/196 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Glu 250 nM 6,4 µL/193, 6 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-OH 250 nM 8,5 µL/191, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-OH 250 nM 12 µL/188 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- OH 250 nM 8,5 µL/191, 5 µL	200 00 Ko n- trol le	H ₂ O
F	H ₂ O	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Gal 100 nM 1,5 µL/198, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Glu 100 nM 1,5 µL/198, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Gal 100 nM 2,8 µL/197 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Glu 100 nM 2,4 µL/197, 6 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Gal 100 nM 1,6 µL/198, 5 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Glu 100 nM 2,6 µL/197, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-OH 100 nM 3,4 µL/196, 5 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-OH 100 nM 4,8 µL/195 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- OH 100 nM 3,4 µL/196, 5 µL	200 00 Ko n- trol le	H ₂ O
G	H ₂ O	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Gal 50 nM 0,8 µL/199 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-Glu 50 nM 0,8 µL/199 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Gal 50 nM 1,4 µL/198, 6 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-Glu 50 nM 1,2 µL/199 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Gal 50 nM 0,8 µL/199 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- Glu 50 nM 1,3 µL/198, 7 µL	CdSe/CdS/ ZnS-PI-b- PEO-OH 50 nM 1,7 µL/198 µL	CdSe/CdS/ ZnS-(SH)- PEO-OH 50 nM 2,4 µL/197, 6 µL	CdSe/CdS/ PI-b-PEO- OH 50 nM 1,7 µL/198 µL	200 00 Ko n- trol le	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

6 Methoden

Zur Untersuchung von Eigenschaften und Qualität der Nanopartikel wurden nachfolgende Standard-Charakterisierungsmethoden angewandt.

6.1 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren der untersuchten Halbleiternanopartikelsysteme wurden am Cary 50 Spektrophotometer der Firma Varian zwischen 400 und 800 nm aufgenommen. Die Bestimmung der Nanopartikel-Konzentrationen erfolgte entsprechend den Berechnungen auf Basis von CdSe-Kernen nach *Peng et al.* ^[81]

6.2 Emissionsspektroskopie

Die Emissionsspektren der Nanopartikel wurden am Fluoreszenzspektrometer der Firma MUT aufgenommen. Dabei wurden die Spektren zwischen 500 und 800 nm aufgezeichnet.

6.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde am Malvern Zetasizer Nano ZS durchgeführt. Dabei wurde eine Dreifach-Messung je 20 Mal aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten (Starna). Die hydrodynamischen Durchmesser wurden unter Verwendung der Dispersion Technology Software Ver. 5.02 (Malvern Instruments Ltd.) berechnet.

Das Verfahren der Dynamischen Lichtstreuung erlaubt die Bestimmung von Partikelgrößen und Makromolekülen vom Mikrometerbereich bis hin zu unter einem Nanometer. Dabei wird durch dieses Messverfahren die Brown'sche Bewegung der Teilchen gemessen, die von deren Größe abhängig ist. Werden Partikellösungen mit Laserlicht bestrahlt, kommt es zu Intensitäts-Fluktuationen des gestreuten Lichts. Kleine Partikel streuen das Licht in alle Richtungen, wobei ein Fleckenmuster entsteht. Solch ein Muster wird durch die konstruktive und destruktive Interferenz der von den Teilchen hervorgerufenen gestreuten Strahlung verursacht (Abb. 147).

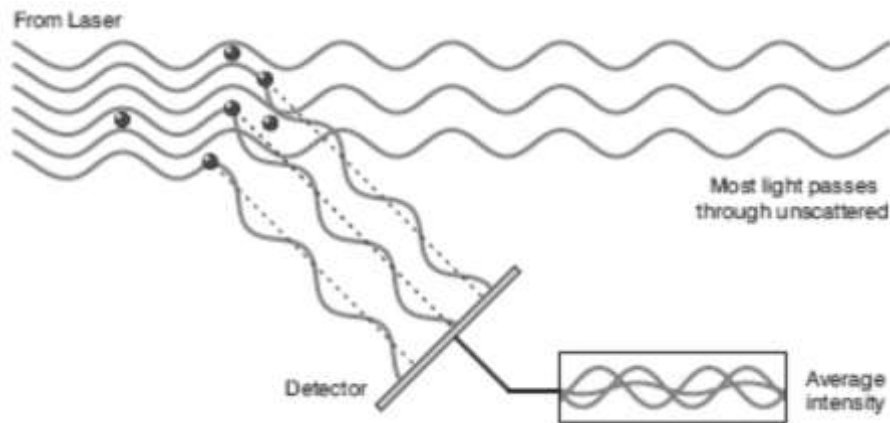


Abbildung 147: Schematische Darstellung der konstruktiven und destruktiven Interferenzen, die zur Bildung eines Fleckenmusters führen. ^[101]

Dieses Beispiel zeigt Partikel, die sich nicht bewegen. In Lösung befindliche Nanoteilchen verhalten sich allerdings anders. Die Nanopartikel unterliegen der sogenannten Brown'schen Bewegung. Es kommt zur Kollisionen der bewegten Teilchen mit den ihnen umgebenen Solvensmolekülen. Dabei bewegen sich kleinere Partikel schneller als die größeren. Werden diese Partikel mit Licht bestrahlt streuen sie dieses in Abhängigkeit ihrer Größe mit unterschiedlichen Winkeln. Kleine Teilchen streuen das Licht im breiten und größere Teilchen im schmalen Winkel (Abb. 148).

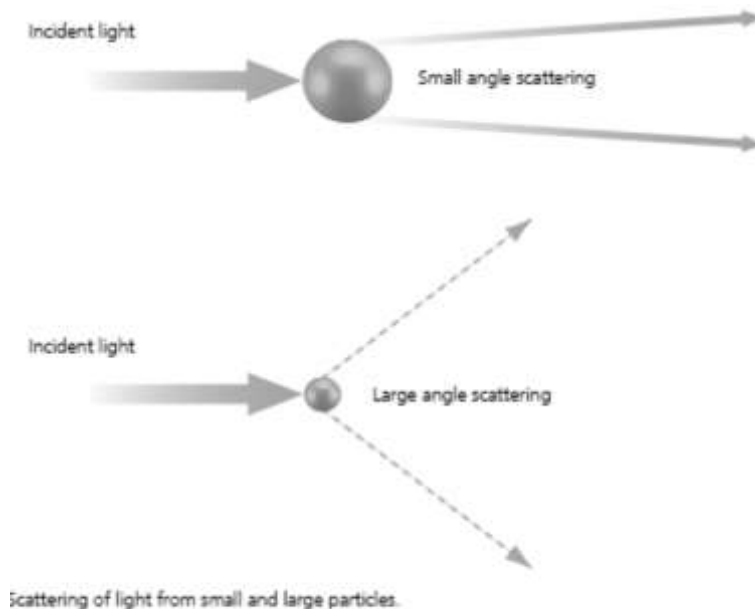


Abbildung 148: Darstellung der Streuwinkel in Abhängigkeit von der Partikelgröße. ^[102]

Die Abhängigkeit zwischen der Partikelgröße und ihrer Geschwindigkeit durch die Brown'sche Bewegung ist in der Stokes-Einstein-Beziehung definiert:

$$D_0 = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad \text{Gl. 5}$$

mit	D_0	Translations-Diffusions-Koeffizient
	k	Boltzmann-Konstante $(1.3806488(13) \cdot 10^{-23} \text{ J/K})$
	T	Temperatur
	η	Viskosität des Lösungsmittels
	R_H	hydrodynamischer Radius des Partikels

Die gemessene Partikelgröße entspricht dem sogenannten hydrodynamischen Durchmesser. Dieser ist stets größer als der Kerndurchmesser des Partikels und hat denselben Translations-Diffusions-Koeffizient D_0 wie das gemessene Teilchen. Der Translations-Diffusions-Koeffizient hängt sowohl von der Partikelkerngröße als auch von der Oberflächenstruktur und von der Konzentration und Art der in der Lösung enthaltenen Ionen ab. Resultierend aus den DLS-Messungen werden intensitätsabhängige Größenverteilungen der Nanopartikel erhalten. Das bedeutet, dass sehr große Teilchen einen prägnanten Einfluss auf das erhaltene Messergebnis haben.

Der Aufbau eines DLS-Messinstrumentes besteht aus einer Laserlichtquelle, welche mit Hilfe von einer Linse auf die Messprobe fokussiert wird. Ein im 173 °-Winkel zum Laserstrahl befindlicher Detektor sammelt die gestreute Lichtintensität, die durch die Partikel hervorgerufen werden. Diese Intensitätsfluktuationen des gestreuten Lichts werden in elektrische Pulse umgewandelt. Mittels eines digitalen Korrelators kann die entsprechende Teilchengröße durch Verwendung einer Autokorrelationsfunktion berechnet werden.

6.4 Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Die Transmission-Elektronen-Mikroskopie der Partikel erfolgte am Jeol JEM Mikroskop bei 100 kV. Zur Probenvorbereitung wurde ein Tropfen einer Nanopartikel-Wasser-Lösung auf ein Kohlenstoff-beschichtetes Kupfer-Grid platziert.

6.5 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die ^1H -NMR Spektren wurden mit einem Bruker AMX400 Spektrometer bei einer Frequenz von 400 MHz aufgenommen. Für die Vorbereitung wurden 1-10 mg der zu

analysierenden Probe in einem geeigneten deuterierten Lösungsmittel aufgenommen (Chloroform-d1, DMSO-d6). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software MestReC 4.5.6.0.

6.6 Cellomics ArrayScan

Der Array Scan Reader ist ein Teil der automatischen High Content Screening (HCS) Plattform und basiert auf einer Weit-Feld-Epifluoreszenz Zelldarstellung. Dazu wurden geeignete fluoreszierende Farbstoffe zum Färben von Zellkernen oder -organellen verwendet. Der Reader erkennt automatisch die entsprechende Zellstruktur, fokussiert, misst und analysiert diese über Ort und Zeit. Durch Verwendung mehrerer Filtersätze sind Aufnahmen mehrerer unterschiedlich fluoreszierender Farbstoffe bzw. Nanopartikel zur selben Zeit möglich. Je nach Anregungs- und Emissionswellenlänge der verwendeten Proben müssen die geeigneten Filter eingestellt werden. Für die Messung kommt eine Quecksilber-Xenon-Lampe zum Einsatz. Das Gerät verfügt über diverse Anwendungssoftware, die für entsprechende biologische Tests ausgewählt werden können. Durch optimierte Algorithmen erfolgt eine automatische, quantitative Auswertung der spezifizierten biologischen Informationen der Assays durch die aufgenommenen Bilder der Zellen durch den ArrayScan Reader.

7 Zellkultur

7.1 Humane Lungenkrebszellen A-549

A-549 Zellen wurden kommerziell erworben (DSMZ, ACC 107). Die Zellsuspensionen wurden in Kunststoffflaschen in 440 mL DMEM (von LONZA, Cat. No.: BE12-604F, Lot: 3MB049) mit 50 mL FCS (von LONZA, Cat.No.: 14-471F, Lot: 0SB003), 5 mL Penicillin/Streptomycin (von GIBCO, Cat.No.: 15140-122, Lot: 1078514) sowie 5 mL Na-Pyruvate (von LONZA, Cat.No.: BE13-115E, Lot: 8MB139) kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

7.2 Hep-G2 Zellen (*hepatocellular carcinoma*)

Die Leberzellen wurden ebenfalls kommerziell erworben (DSMZ, ACC 180). Die Zellsuspensionen wurden in Kunststoffflaschen in 445 mL RPMI 1640 (von LONZA, Cat. No.: 14-471F, Lot: 0SB003) mit 50 mL FCS (von LONZA, Cat.No.: 14-471F, Lot: 0000100968) sowie 5 mL Penicillin/Streptomycin (von GIBCO, Cat.No.: 15140-122, Lot: 79326) sowie 5 mL Na-Pyruvate (von LONZA Cat.No.: BE13-115E Lot: 8MB139) kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

7.3 WST-8 Assay

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Nanopartikeln und Zellen bzw. Liganden und Zellen wurde das Quick Cell Proliferation Assay Kit II von BioVision verwendet. Dieses basiert auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen das Tetrazoliumsalz zum gelb-orangefarbenen Formazan zu reduzieren.

8 Zusammenfassung

In dieser Studienarbeit wurden zunächst Untersuchungen diverser Nanopartikelsysteme hinsichtlich ihrer Stabilitäten für biologische Anwendungen und zytotoxischen Eigenschaften in Abhängigkeit ihrer Teilchen- und Ligandenbeschaffenheit durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass sphärische Teilchen eine höhere Stabilität in den untersuchten biologisch relevanten Medien aufwiesen als vergleichsweise die stäbchenförmigen Partikel (siehe Partikelsystem b). In Abhängigkeit von der Ligandenoberfläche zeigten die QDs modifiziert mit dem mehrzähligen Thiolliganden (Partikelsystem e) unter allen getesteten Bedingungen eine hinreichende Stabilität. Nur die Lagerung in Wasserstoffperoxid löste bei allen Nanopartikel-Ligandensystemen früher oder später eine vollständige Auflösung der Teilchen mit Einhergehen der Fluoreszenzlöschung aus. Die sphärischen Partikel mit der mizellaren Ligandenhülle (Partikelsysteme a, c und d) sowie die kommerziellen Teilchen (Partikelsysteme f und g) waren in den meisten Medien stabil. Dabei konnten nahezu einheitlich Ergebnisse in Bezug der Instabilität der Lösungen erhalten werden. Besonders Protonen, die FCS-haltigen Zellmedien oder auch die Lagerungsbedingungen bei -20 °C zeigten sehr starke Einflüsse auf die QDs.

Nach abgeschlossener Studie der Biostabilität und unter Berücksichtigung der vorhandenen Quantität der Nanopartikel wurden drei Teilchensysteme für nachfolgende Kopplungsreaktionen mittels der Staudinger Ligation ausgewählt.

Hierzu mussten die Reaktionsbedingungen der sogenannten *nicht spurlosen* und *spurlosen* Staudinger Ligation untersucht und bewertet werden. Dazu dienten zuerst Modellreaktionen nach bekannter Literatur an kommerziellen kurzkettigen mPEGs. Es zeigte sich, dass der Reaktionsverlauf der *nicht spurlosen* Ligation zufriedenstellende Ergebnisse liefert, während die *spurlose* Staudinger Ligation erfolglos blieb und weiterer Forschung bedarf. Folglich konnten die Reaktionsbedingungen der *nicht spurlosen* Staudinger Ligation auf die im *Arbeitskreis Weller* synthetisierten Diblock-Copolymere übertragen werden.

Im Anschluss wurden die ausgewählten Nanopartikel (a, b und e) mittels dieses Verfahrens mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid sowie 6-Azido-6-deoxy-D-glucose modifiziert. Zwar zeigten die Teilchen mit mizellarer Ligandenoberfläche (a und b) in dem Zellmedium (10%FCS + DMEM) über einen Zeitraum von einer Woche keine Stabilität, die sich anschließenden Zelltests wurden allerdings innerhalb von zwei bis 20 Stunden durchgeführt.

Abschließende Untersuchungen wurden zu den Zellaufnahmestudien der modifizierten Nanopartikel gemacht. Hierzu konnten die spezifischen Affinitäten der mit 1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid konjugierten sphärischen Teilchen an die Leberzelllinie Hep-G2 über den ASGP-Rezeptor aufgezeigt werden, ebenso zeigten die mit 6-Azido-6-deoxy-D-glucose verknüpften sphärischen Partikeln erwartungsgemäß keine Interaktionen mit den Zellen. Die Ergebnisse der Zelltests

mit dem elongierten Partikelsystem (b) wiesen Aufnahmen in die Zellen unabhängig vom konjugierten Zuckerrest auf.

Schließlich konnte mit dem WST-8 Assay gezeigt werden, dass die QD/QRs (b) ab einer Partikelkonzentration von 125 nM sowie die mit dem mehrzähligen Thiolliganden modifizierten QDs ab 250 nm zytotoxisch reagierten. Die übrigen Teilchensysteme zeigten keinerlei toxische Effekte auf die untersuchten Zellen bis zu Partikelkonzentrationen von 1 μ M.

Da die in dieser Arbeit anfänglichen Studien zur Staudinger Ligation auf Grund des Umfangs nicht tiefgründiger untersucht werden konnten, sollte für weiterführende Studien das Augenmerk besonders auf die Erforschung von geeigneten Reaktionsbedingungen bei der *spurlosen* Staudinger Ligation gerichtet sein. Dem sollten sich Biokonjugationen mit den übrigen Partikelsystemen aus der Stabilitätsreihe für Zellaufnahmestudien anschließen.

9 Summary

In this study work investigations of various nanoparticle-systems were carried out first concerning their stabilities for biological applications and cytotoxic properties in dependence of the particle materials and the ligand state.

It could be shown that spherical particles had a higher stability in the examined biologically relevant media than comparatively the rod-shaped particle (see particle system b). In dependence of the ligand surface the QDs modified with a tridentate Thiol ligand (particle system e) showed an enough stability under all tested conditions. Only the storage in hydrogen peroxide released with all nanoparticle ligand systems sooner or later an entire dissolving of the particles with walking along the fluorescence deletion. The spherical particle with the micellelike ligand shell (particle systems a, c and d) as well as the commercial particles (particle systems f and g) were stable in most media. Besides, results could be received nearly uniformly in relation of the instability of the solutions. The protons and the FCS-containing cell media or also the storage terms with -20 °C showed very strong influence on the QDs-stability.

According to concluded study of the biostability three particle systems were selected for the following coupling reactions.

Moreover the reaction terms of the so-called nontraceless and traceless Staudinger Ligation had to be investigated and be valued. Model reactions served first for it after known literature in commercial short mPEGs. The nontraceless ligation delivers satisfactory results, while the traceless ligation remained fruitless and needs farther research. Consequently the reaction terms of the nontraceless ligation could be transferred on the diblock-copolymere-ligands synthesised in the working group of Prof. Weller. The nanoparticles (a, b and e) were modified with 1-Azido-1-deoxy-D-galactopyranosid and 6-Azido-6-deoxy-D-glucose.

Following investigations were made the cell-uptake studies of the modified nanoparticles. Moreover the specific affinities of the spherical particles conjugated with 1-Azido-1-deoxy-D-galactopyranosid could be indicated to the liver cell line Hep-G2 about the ASGP-receptor, also the spherical particles tied up with 6-Azido-6-deoxy-D-glucose showed as expected no interactions with these cells. The results of the cell tests with the rodlike particle system (b) showed intakes in the cells independent of the conjugated sugar rest.

Finally could be shown with the WST-8 Assay that the QD/QRs (b) at particle concentration of 125 nM as well as QDs modified with the multidentate thiol ligand of 250 nM shown cytotoxic effects. The remaining particle systems were not toxic up to particle concentrations of 1 µM at the investigated cells.

The first studies to the Staudinger Ligation could not more profound because of the circumference of this work. For continuing studies should be the attention directed particularly upon the investigation of suitable reaction terms of the traceless Staudinger Ligation. In addition should join bioconjugations with the remaining particle systems from the stability row for cell-uptake studies.

10 Literatur

- [1] K.H. Bennemann, J. Koutecky, *Small Particles and Inorganic Clusters*, North Holland, Amsterdam, **1985**.
- [2] M.D. Morse, *Chem. Rev.*, **1986**, (86), 1049.
- [3] P. Jena, B.K. Rao, S.N. Khanna, *Physics and Chemistry of Small Clusters*, Plenum, New York, **1986**.
- [4] Henglein, *Chem. Rev.*, **1989**, (89), 1861.
- [5] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.*, **2010**, (122), 1402–1437.
- [6] K.E. Sapsford, K.M. Tyner, B.J. Dair, J.R. Deschamps, and I.L. Medintz, *Anal. Chem.*, **2011**, (83), 4453–4488.
- [7] Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y.F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto, *Nano Lett.*, **2004**, (4), 2163.
- [8] Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A.M. Javier, H.E. Gaub, S. Stlze, N. Fertig, W. Parak, *Nano Lett.*, **2005**, (5), 331.
- [9] H.S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B.I. Ipe, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, *Nat. Biotech.*, **2007**, (25), 1165.
- [10] R.E. Bailey, A.M. Smith, S. Nie, *Physica E*, **2004**, (25), 1.
- [11] W.W. Yu, E. Chang, R. Drezek, V.L. Colvin, *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, **2006**, (348), 781.
- [12] H.T. Uyeda, I.L. Medintz, J.K. Jaiswal, S.M. Simon, and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (11), 3870–3878.
- [13] X. Gao, L. Yang, J.A. Petros, F.F. Marshall, J.W. Simons, S. Nie, *Science*, **2005**, (16), 63.
- [14] W. Liu, M. Howarth, A.B. Greytak, Y. Zheng, D.G. Nocera, A.Y. Ting, and M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, (130), 1274.
- [15] X. Gao, L. Yang, J.A. Petros, F.F. Marshall, J.W. Simons and S. Nie, *Current Opinion in Biotechnology*, **2005**, (16), 63.
- [16] E.B. Voura, J.K. Jaiswal, H. Mattoussi, S.M. Simon, *Nat. Med.*, **2004**, (10), 993.
- [17] Y. Jun, J. Choi, and J. Cheon, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, (45), 3414–3439.
- [18] N. Lewinski, V. Colvin, and R. Drezek, *Small*, **2008**, (1), 4.
- [19] A.M. Smith, H.Duan, M.N. Rhyner, G.Ruan and S.Nie, *Chem. Phys.*, **2006**, (8), 3895–3903.
- [20] C.M. Niemeyer, *Angew. Chem.*, **2001**, (113), 4254–4287.

- [21] H.M. Matoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, (122), 12142.
- [22] J. Aldana, Y.A. Wang, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, (123), 8844.
- [23] W.C.W. Chan, S. Nie, *Science*, **1998**, (281), 2016.
- [24] S.F. Wuister, I. Swart, F. van Driel, S.G. Hickey, C. de Mello Donego, *Nano Lett.*, **2003**, (3), 503.
- [25] K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Komoto, S. Maenosono, Y. Yamaguchi, K. Yamamoto, *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, **2003**, (302), 496.
- [26] H.G. Bagaria, E.T. Ada, M. Shamsuzzoha, D.E. Nikles, D.T. Johnson, *Langmuir*, **2006**, (22), 7732.
- [27] M.S. Nikolic, M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Förster, and H. Weller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, (45), 6577.
- [28] E. L. Bentyen et al., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, (16), 1488.
- [29] H. Kloust et al., *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117, (44), 23244-23250.
- [30] H. Duan, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, (129), 3333.
- [31] . Mekis et al., *J. Phys. Chem. B*, **2003**, (107), 7454.
- [32] A.P. Alivisatos, *Science*, **1996**; (271), 933.
- [33] Dissertation, M. Nagel, Universität Hamburg, *Größen- und formselektive Synthese von PbS-Nanopartikeln und deren Kristallisation in 2D und 3D Übergittern*, **2007**.
- [34] D. Bertram, H. Weller, *Physik Journal I*, **2002**, (2), 47.
- [35] H. Weller, *Angew. Chem.*, **1993**, (105), 43.
- [36] A. Nethercot Jr, *Phys. Rev. Lett.*, **1974**, (33), 1088–1091.
- [37] C.G. van de Walle, J. Neugebauer, *Nature*, **2003**, (423), 626–628.
- [38] http://dic.academic.ru/pictures/dewiki/51/350px-Franck-Condon-Prinzip_svg.png.
- [39] R.F. Kubin, A.N Fletcher, *Journal of Luminescence*, **1982**, (27), 455-462.
- [40] W.W. Yu, E.Chang, R.Drezek, V.L. Colvin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2006**, (348), 781–786.
- [41] H. Chen, J. Yeh, L. Wang, H. Khurshid, N. Peng, A.Y. Wang, and H. Mao, *Nano Res.*, **2010**, 3(12), 852–862.
- [42] C.J. Lin, R.A. Sperling, J.K. Li, T.Y. Yang, P.Y. Li, M. Zanella, W.H. Chang, and W.J. Parak, *small*, **2008**, (3), 334–341.
- [43] E.E. Lees, T.L. Nguyen, A.H.A. Clayton, and P. Mulvaney, *ACS Nano*, **2009**.

-
- [44] M. Thiry, H. Weller, *ACS Nano*, **2011**, (6), 4965–4973.
- [45] E. Pösel, S. Fischer, S. Foerster, and H. Weller, *Langmuir*, **2009**.
- [46] C. Schmidtke, H. Weller, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, (117), 8570–8578.
- [47] R. Gill, M. Zayats, I. Willner, *Angew. Chem.*, **2008**, (120), 7714–7736.
- [48] E. Pösel, H. Weller, *ACS Nano*, **2012**, (4), 3346–3355.
- [49] R. Jin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, (47), 6750.
- [50] C. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C.N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke, and E. Rühl, *Langmuir*, **2012**, (28), 7598–7613.
- [51] M. Thiry et al., *ACS Nano*, **2011**, (6), 4965–4973.
- [52] K. Susumu, H.T. Uyeda, I.L. Medintz, T. Pons, J.B. Delehanty, and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, (129), 13987–13996.
- [53] B.C Mei, K. Susumu, I.L. Medintz, H. Mattoussi, *Nature Protocols*, **2009**, (3).
- [54] A.H. Faraji, P. Wipf, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, (17), 2950–2962.
- [55] H. F. Krug, K. Kern, J. M. Knirsch, *Health and Environmental*, **2006**, (5), 153–185.
- [56] L.Y.T. Chou, K. Ming and W.C. W.Chan, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, (40), 233–245.
- [57] R. Hardman, *Environmental Health Perspectives*, **2006**, (2).
- [58] F. Torres, B. Fadeel, *Accounts of Chem. Res.*, **2013**, (3), 733–742.
- [59] K.M. Tsoi, Q. Dai, B.A. Alman, W.C.W. Chan, *Accounts of Chem. Res.*, **2013**, (3), 662–671.
- [60] F.M. Winnik, D. Maysinger, *Accounts of Chem. Res.*, **2013**, (3), 672–680.
- [61] H.F. Krug, P. Wick, *Angew. Chem.*, **2011**, (123), 1294–1314.
- [62] T.K. Sung, S. Krishendu, K. Chaekyu, V.M. Rotello, *Accounts of Chem. Res.*, **2013**, (3), 681–691.
- [63] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect*, **2005**, (113), 823–839.
- [64] T.C. King-Heiden, P.N. Wicinski, A.N. Mangham, K.M. Metz, D. Nesbit, J. A. Pedersen, R. J. Hamers, W. Heideman, R. E. Peterson, *Environ. Sci. Technol.*, **2009**, 43 (5), 1605–1611.
- [65] N. Lewinski, V. Colvin, and R. Drezek, *small*, **2008**, 4, No. 1, 26–49.
- [66] Brunner et al., *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, (40), 4374.
- [67] Hussain et al., *Toxicol. in vitro*, **2005**, (19), 975.
- [68] Magrez et al., *Nano Lett.*, **2006**, (6), 1121.
-

- [69] Worle-Knirsch et al., *Nano Lett.*, **2006**, (6), 1261.
- [70] Zhang et al., *Nanosci. Nanotechnol.*, **2007**, (7), 497.
- [71] A.K. Salem et al., *Nat. Mat.*, **2003**, (2), 668.
- [72] P. Held, Senior Scientist, Applications Dept., *BioTek Instruments, Inc.*, BioTek Instruments, **2009**.
- [73] <http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>
- [74] S.S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J.C.M. van Hest, *Angew. Chem.*, **2011**, (123), 8968–8989.
- [75] E. Saxon, C.R. Bertozzi, *Science*, **2007** (287).
- [76] K.M. Gatta's-Asfura, C.L. Stabler, *Biomacromolecules*, **2009**, (10), 3122–3129.
- [77] B.L. Nilsson, L.L. Kiessling, R.T. Raines, *Org. Lett.*, **2000**, (13), 19369-1941.
- [78] M.B. Soellner, B.L. Nilsson, R.T. Raines, *J. Org. Chem.*, **2002**, (67), 4993-4996.
- [79] B.L. Nilsson, L.L. Kiessling, R.T. Raines, *Org. Lett.*, **2001**, (1), 9-12.
- [80] Dissertation, M. Thiry, Universität Hamburg, *Biofunktionalisierung von Nanopartikeln mittels mehrzähliger, thiol-basierter Polyethylenoxid-Liganden*, **2010**.
- [81] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, *Chem. Mater.*, **2003**, (15), 2854.
- [82] K.M. Gatta's-Asfura, C.L. Stabler, *Biomacromolecules, Supporting Information*, **2009**, (10), 3122–3129.
- [83] Dissertation, H. Berthold, Universität Hamburg, *Synthesis of a Phthalocyanine Scaffold as a Core of Highly Glycosylated Dendritic Structures and a Novel Fluorenyl Spiro-Annulated Phthalocyanine*, **2008**.
- [84] J.-H Park, E.-W. Cho, S. Y. Shin, Y.-J. Lee, K. L. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, (244), 304.
- [85] Y. Li, G. Huang, J. Diakur, L. Wiebe, *Curr Drug Deliv.*, **2008**, 5 (4), 299-302.
- [86] A. Davit-Spraul, M.L. Pourci, T. Soni, A. Lemonnier, *Mefabohsm*, **1994**, Vol. 43, No. 8, 945-952.
- [87] R. Karinaga et al., *Biomaterials*, **2006**, (27) 1626–1635.
- [88] Chian-Hui Lai, Chia-Yi Lin, Huan-Ting Wu, Hau-Shien Chan, Yung-Jen Chuang, Chien-Tien Chen, Chun-Cheng Lin, *Adv. Funct. Mater.*, **2010**, (20), 3948–3958.
- [89] *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, (43), 3106 –3116.
- [90] E. Pösel et al., *ACS Nano*, **2012**, (4), 3346–3355.
- [91] Dissertation, E. Pösel, Universität Hamburg, *PEO-ligand design for biofunctionalisation of hydrophobic nanoparticles and their use in theragnostics*, **2009**.

- [92] Y. Gourdel, A. Ghanimi, P. Pellon and M. Le Corre, *Tetrahedron Letters*, **1993**, (28), 4523-4526.
- [93] *Aldrich chemfiles*, **2010**, Vol. 10, Num. 2.
- [94] A. Tam, M.B. Soellner, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, (129), 11421-11430.
- [95] M.B. Soellner, B.L. Nilsson, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, (128), 8820-8828.
- [96] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, **2008**.
- [97] Zheng-Jiang Zhu, Yi-Cheun Yeh, Rui Tang, Bo Yan, Joshua Tamayo, Richard W. Vachet, Vincent M. Rotello, *Nature Chemistry*, **2011**, (3), 963-968.
- [98] K.M. DeAngelis, *cshprotocols.org*, **2007**.
- [99] *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, (129), 11421-11430.
- [100] *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, (128), 8820-8828.
- [101] Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317, Issue 2.2, March **2005**.
- [102] Malvern Instruments Limited, *A basic guide to particle characterization*, **2012**.
- [103] www.pHreschProducts.com

11. Anhang

11.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
AO	Atomorbital
a. u.	<i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAN GmbH	Centrum für Angewandte Nanotechnologie
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPPM	(Diphenylphosphan)methanthiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>Eg</i>	Bandlücke
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae / et alia</i> (und andere)
FCS	Fetales Kälberserum
FWHM	<i>full width at half maximum</i> (Halbwertsbreite)
HDA	Hexadecylamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HOMO	<i>highest occupied molecule orbital</i> (höchstes, besetztes Molekülorbital)
HWB	Halbwertsbreite/n
HWHM	<i>half width at half maximum</i> (Halbwertsbreite)
LB	Leitungsband
LCAO	<i>linear combination of atomic orbitals</i> (Linearkombination von Atomorbitalen)
LUMO	<i>lowest unoccupied molecule orbital</i> (niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital)
MDT	1-Methyl-2-diphenylphosphan-terephthalat
MO	Molekülorbital

mPEG	Methoxypolyethylenglycol
NADH	<i>nicotineamido adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>nicotineamido adenine dinucleotide phosphate</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
pH	potentia Hydrogenii
PI	Polyisopren
PI-N ₃	2,2'-Diaminodiethylamin-block-polyisopren
PL	Photolumineszenz
PS	Polystyrol
QD(s)	Quantum Dot(s)
QDQR(s)	Quantum Dot/Quantum Rod(s)
QR(s)	Quantum Rod(s)
QY (QA)	<i>Quantum Yield</i> (Quantenausbeute)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Superoxidanionradikal und Hydroxyradikal)
TDPA	Tetradecylphosphonsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THF	Tetrahydrofuran
TNBSA	<i>Trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TOP	Tri- <i>n</i> -octylphosphin
TOPO	Tri- <i>n</i> -octylphosphinoxid
UV	ultra-violett
VB	Valenzband
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>
z.B.	zum Beispiel

11.2 Übersicht der verwendeten Chemikalien

Substanzen	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
0.025% Natriumazid	06, 09 Gefahr	300-400-410 EUH: 032	273-309-310
1,1'-Carbonyldiimidazol	05, 07 Gefahr	302-314	280 305+351+338 310
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	02, 07 Gefahr	228-302-315-319- 335-412	210-261-273 305+351+338
1-Azido-1-deoxy- β -D-galactopyranosid	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Dieser Stoff ist gemäß Richtlinie 67/548/EWG nicht als gefährlich eingestuft		
1-Methyl-2-iodoterephthalat	06 Gefahr	301-315-319	301+310 305+351+338
4-Dimethylaminopyridin	06 Gefahr	310-301-315-319	302+352 305+351+338
6-Azido-6-deoxy-D-glucose	07 Achtung	302-312-332	280
Acetonitril	02, 07 Gefahr	225-332-302-312- 319	210 305+351+338 403+235
Acetylthiomethyl-diphenylphosphan-boran-komplex	07 Achtung	315-319-335	261 305+351+338
Borsäure	08 Gefahr	360FD	201 308+313
Chloroform-d	08, 07 Achtung	302-315-351-373	281
Dichlormethan	08 Achtung	351	281 308+313
Dicyclohexylcarbodiimid	06, 05 Gefahr	311-302-318-317	280 305+351+338
Diethylether	02, 07 Gefahr	224-302-336 EUH: 019-066	210-240 403+235
Dimethylformamid	02, 07, 08 Gefahr	360D-226-332-312-31 9	201 302+352 305+351+338 308+313
Dimethylsulfoxid-d6	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Dieser Stoff ist gemäß Richtlinie 67/548/EWG nicht als gefährlich eingestuft.		
Dioxan	02, 07, 08 Gefahr	225-351-319-335 EUH: 019-066	210-261-281 305+351+338

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Diphenylphosphan	02, 07 Gefahr	250-315-319-335	222-231-261 305+351+338 422
EDTA	07 Achtung	319	305+351+338
Ethanol	02 Gefahr	225	210
Ethylacetat	02, 07 Gefahr	225-319-336 EUH: 066	210-240 305+351+338
Formaldehydlösung	06, 08, 05 Gefahr	351-331-311-301- 314-317	301+310 303+361+353 305+351+338 320-361-405-501
Glutaral	06, 08, 05, 09 Gefahr	331-301-314-334- 317-400	280 305+351+338 270-260-273 308+313
HEPES	keine Piktogramme	GHS- keine H-Sätze	keine P-Sätze
Hexan	02, 08, 07, 09 Gefahr	225-361f-304-373-315 -336-411	210-240-273 301+310 331 302+352 403+235
Dikaliumhydrogenphosphat	keine Piktogramme	GHS- keine H-Sätze	keine P-Sätze
Kaliumdihydrogenphosphat	keine Piktogramme	GHS- keine H-Sätze	keine P-Sätze
Magnesiumsulfat	keine Piktogramme	GHS- keine H-Sätze	keine P-Sätze
Methanol	02, 06, 08 Gefahr	225-331-311-301- 370	210-233-280 302+352
Methoxypolyethylenglycol amin	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Dieser Stoff ist gemäß Richtlinie 67/548/EWG nicht als gefährlich eingestuft.		
Methoxypolyethylenglycol- 5000-essigsäure	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Dieser Stoff ist gemäß Richtlinie 67/548/EWG nicht als gefährlich eingestuft.		
Methoxypolyethylenglycol- 5000-essigsäure-N- succinimidylester	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Keine gefährliche Substanz oder kein gefährliches Gemisch im Sinne der EG-Richtlinien 67/548/EWG oder 1999/45/EG		
N,N'- Diisopropylcarbodiimid	02, 06, 05, 08 Gefahr	226-317-318-330-334	210-280 - 302+352 304+340 305+351+338 309+310

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin	02, 06, 05 Gefahr	225-301-314-412	210-273-280 301+310 305+351+338 - 310
Natriumchlorid	<i>keine</i> GHS- Piktogramme	<i>keine H-Sätze</i>	<i>keine P-Sätze</i>
Natriumhydroxid	05 Gefahr	314-290	280 301+330+331 309+310 305+351+338
<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin	02, 05, 06 Gefahr	225-301-314-412	210-273-280 301+330+331 305+351+338 309-310
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	<i>keine</i> GHS- Piktogramme	<i>keine H-Sätze</i>	<i>keine P-Sätze</i>
Palladium(II)acetat	05 Gefahr	318	280 305+351+338
Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat)	07, 09 Achtung	302-317-410	273-280-501
Polyethylenoxid-1000-monoacrylat	08 Gefahr	340-350	201 308+313
Rhodamin 6G	07 Achtung	302	-
Salzsäure-Lösung (1 M)	05, 07 Gefahr	290-314-335	234-260 304+340 303+361+353 305+351+338 309+311 501
Sucrose	<i>keine</i> GHS- Piktogramme	<i>keine H-Sätze</i>	<i>keine P-Sätze</i>
Tetrahydrofuran	02, 07, 08 Gefahr	225-319-335-351 EUH: 019	210-233-243 305+351+338
Toluol	02, 08, 07 Gefahr	225-361d-304-373-31 5-336	210 301+310 331 302+352
Trichlormethan	08, 07 Achtung	302-315-351-373	302+352 314
Triton X-100	07, 09 Achtung	302-31-411	273 305+351+338
Wasserstoffperoxid	03, 05, 07 Gefahr	271-332-302-314	220-261-280 305+351+338 310
Zinkacetat	07, 09 Achtung	302-410	262-273

11.3 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge



01	explosionsgefährlich
02	entzündbar
03	oxidierend
04	Gase unter Druck
05	ätzend
06	akute Toxizität
07	Achtung/Gefahr
08	gesundheitsgefährlich
09	umweltgefährdend

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 Wurfstücke.
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.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden 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 angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350	Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350 i	Kann bei Einatmen Krebs 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 schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H360 F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
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 Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)
H361 f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361 d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H361 fd	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. 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 bei 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 hervorrufen.
EUH 206	Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
EUH 207	Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
EUH 208	Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen 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 Gebrauchsanleitung 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.
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 aufbewahren.
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.
P222	Kontakt mit Luft nicht zulassen.
P223	Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen 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	Explosionssgeschützte 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 tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282	Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
P283	Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.
P284	Atemschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231 + P232	Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
P235 + P410	Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

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 Kennzeichnungsetikett).
- 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.
- 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 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 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 Entfernung.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P378 ... zum Löschen verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.

- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301 + P310 BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P301 + P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P301 + P330 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- + P331
- P302 + P334 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P302 + P350 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P302 + P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P303 + P361 BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten
- + P353 Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304 + P340 BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P304 + P341 BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P305 + P351 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
- + P338 Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306 + P360 BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P307 + P311 BEI EXPOSITION: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P308 + P313 BEI EXPOSITION ODER FALLS BETROFFEN: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P309 + P311 BEI EXPOSITION ODER UNWOHLSEIN: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
- P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- + P375
- P371 + P380 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- + P375

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 Auskleidung 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 + P404	In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
P403 + P233	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403 + P235	Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410 + P403	Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410 + P412	Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P411 + P235	Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren

P 500-Reihe: Entsorgung

P501	Inhalt / Behälter ... zuführen.
------	---------------------------------

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Horst Weller für die Bereitstellung und die gegebenen Freiheiten zur Bearbeitung dieses interessanten Themas.

Herrn Prof. Alf Mews danke ich für die Zweitgutachtung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Frank Schröder-Oeynhausen und allen Mitarbeitern der CAN GmbH für die herzliche Aufnahme, der netten Zusammenarbeit und freundlichen Atmosphäre während dieser Zeit bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Charis Schlundt für die zahlreichen Zellkulturarbeiten sowie für die netten und erheiternden Gespräche.

In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Katja Werner und Marieke Dieckmann für die Diskussionen der Zelltests bedanken.

Vielen Dank an Herrn Dr. Daniel Neß für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Reaktorpartikel und Hilfestellungen bei offenen Fragen.

Ein großes Dankeschön soll auch an Carsten Ott, Maria Kappler, Tobias Jochum, Christian Schmidtke sowie Hauke Kloust gehen. Vielen Dank für die (Un)Mengen an Nanopartikel zur Stabilitätsuntersuchung. Ich weiß Eure Arbeit dahinter sehr zu schätzen.

Ich danke Herrn Dr. Christoph Gimmler und Herrn Dr. Theo Schotten für die Korrekturlesungen meiner Arbeit.

Für die TEM-Aufnahmen danke ich Daniela Weinert.

Für die schöne Atmosphäre und abwechslungsreichen, erheiternden Gesprächen in den Mittagspausen bedanke ich mich bei Charis, Daniel und Dominique.

Der größte Dank gebührt Dir, Maiko. Du hast mir die Kraft und Ausdauer in den letzten 10 Jahren gegeben und so viel Verständnis für mich und meine Marotten gehabt. Ohne Deine Unterstützung hätte ich nie dieses Studium absolvieren können. Danke, dass Du immer zu mir standest und mich in den tiefsten Momenten zum Weitermachen ermutigt hast. Vielen Dank für die letzten Wochen, in denen Du Dich unermüdlich um unsere wundervollen Jungs gekümmert hast, damit ich etwas Ruhe für den Endspurt hatte. Wir finden jetzt unseren Weg, den wir immer beschreiten wollten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich von Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Ich versichere, dass ich keine früheren Promotionsversuche an dieser oder einer anderen Hochschule unternommen habe.

Ich erkläre mich mit einer Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit einverstanden.

10. April 2014

Manuela Gehring