



Kovalente Oberflächenfunktionalisierung von
ultrakleinen metallischen Nanopartikeln

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

Doctor Rerum Naturalium

vorgelegt von

Kai Klein

Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen

Anorganische Chemie

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/77372

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230414-080759-8

Alle Rechte vorbehalten.

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von April 2019 bis August 2022 am Institut der Anorganischen Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. Matthias Epple angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple

2. Gutachterin: Prof. Dr. Laura Hartmann

Vorsitzende: Prof. Dr. Bettina Siebers

Tag der Disputation: 23.11.2022

Wenn die Menschen nur über das sprächen, was sie begreifen, dann würde es sehr still auf der Welt sein.

- Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
2. Theorie	3
2.1. Stabilität von Dispersionskolloiden.....	3
2.2. Synthese von Goldnanopartikeln	5
2.3. Ultrakleine Goldnanopartikel.....	8
2.4. Klickchemie.....	10
3. Methoden.....	13
3.1. Kernspinresonanzspektroskopie	13
3.1.1. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie.....	16
3.1.2. NMR-Spektroskopie am Nanopartikel.....	17
3.1.3. Diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie	18
3.2. Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie	21
3.3. Analytische Scheibenzentrifugation.....	23
3.4. UV-Vis-Spektroskopie	25
3.5. Atomabsorptionsspektroskopie	27
3.6. Fluoreszenzspektroskopie	28
3.7. Infrarotspektroskopie	29
3.8. Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie.....	31
3.9. Konfokale Laserrastermikroskopie.....	32
3.10. Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT-Test.....	34
3.11. Supermikroskopie	36
4. Experimentelles.....	37
4.1. Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat (ISA).....	37
4.1.1. Sicherheitshinweis.....	37
4.1.2. Synthese	38
4.2. HaloTag-Liganden	39
4.2.1. <i>N</i> -(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)pent-4-ynamid (H1).....	39
4.2.2. <i>N</i> -(25-chloro-3-oxo-1-phenyl-7,10,13,16,19-pentaoxa-4-azapentacosan-2-yl)pent-4-ynamid (H2)	42
4.3. Tetrachlorogoldsäure (HAuCl ₄).....	45
4.4. Glutathion-terminierte ultrakleine Goldnanopartikel (AuGSH).....	45
4.5. Glutathion-Azid-terminierte ultrakleine Goldnanopartikel (AuN ₃)	46
4.6. Kupfer-katalysierte Cycloaddition (CuAAC) an der Partikeloberfläche	47

4.6.1. Goldnanopartikel mit Fluorescein (AuFAM).....	47
4.6.2. Goldnanopartikel mit Alexa-Fluorophor 647 (AuAF647).....	48
4.6.3. Goldnanopartikel mit <i>aggregation induced emission</i> (AIE)-Farbstoffen.....	48
4.6.4. Goldnanopartikel mit HaloTag-Liganden (AuH1 und AuH2).....	50
4.6.5. Goldnanopartikel mit molekularen Pinzetten (AuTweezer).....	51
4.7. Goldnanopartikel mit makromolekularen Liganden (AuMakro-N ₃)	52
4.7.1. Tweezer-Funktionalisierung von AuMakro-N ₃ (AuMakro-Tweezer)	53
5. Ergebnisse und Diskussion	55
5.1. Glutathion-terminierte ultrakleine Goldnanopartikel (AuGSH).....	55
5.2. Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat (ISA).....	69
5.3. Azidfunktionalisierung von GSH-funktionalisierten Nanopartikeln (AuN ₃).....	74
5.4. Fluoreszente Markierung der azidierten Nanopartikel.....	86
5.4.1. Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln in Krebszellen	92
5.4.2. Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln in Bakterien.....	94
5.4.3. Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln in 3D-Spheroide.....	98
5.5. CuAAC mit AIE-Farbstoffen	102
5.6. Goldnanopartikel mit HaloTag- <i>targeting</i> Liganden	108
5.6.1. HaloTag-Ligand 1 (H1).....	113
5.6.2. H1 am Nanopartikel Au(H1)	119
5.6.3. HaloTag-Ligand 2 (H2).....	126
5.6.4. H2 am Nanopartikel (AuH2)	131
5.7. Goldnanopartikel mit molekularen Pinzetten.....	134
5.7.1. Nanopartikel mit molekularen Pinzetten (AuTweezer)	135
5.7.2. Taspase1.....	139
5.7.3. Interaktion von AuTweezer mit Taspase1	142
5.8. Goldnanopartikel mit sequenzdefinierten Makromolekülen	147
5.8.1. Nanopartikel mit makromolekularen Liganden (AuMakro-N ₃).....	148
5.8.2. CuAAC von AuMakro-N ₃ mit molekularen Pinzetten (AuMakro-Tweezer)....	154
5.8.3. Survivin	160
5.8.4. Biologische Anwendung von AuMakro-Tweezer	162
6. Zusammenfassung	165
7. Conclusion.....	169
8. Literatur	173
9. Anhang.....	183
9.1. Abbildungen.....	183
9.2. Chemikalien.....	193

9.3. Publikationsliste	195
9.4. Konferenzteilnahmen.....	197
9.4.1. Poster	197
9.4.2. Vorträge	197
9.5. Eidesstattliche Erklärung	199
9.6. Lebenslauf / Curriculum Vitae.....	201
9.7. Danksagung	203

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AIE	Aggregations-induzierte Emission (<i>engl.: aggregation-induced emission</i>)
AF647	Alexa-Fluorophor-647
Asp	Asparaginsäure
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
AuAIE	Ultrakleine Goldnanopartikel mit AIE-Luminophoren geklickt
AuAF647	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Alexa-Fluorophor-647 geklickt
AuFAM	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Fluorescein geklickt
AuGSH	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Glutathion
AuMakro	Ultrakleine Goldnanopartikel mit makromolekularen Liganden
AuMakro-Tweezer	Ultrakleine Goldnanopartikel mit makromolekularen Liganden, die mit Monobutynyl-Tweezern funktionalisiert wurden
AuN ₃	Ultrakleine Goldnanopartikel mit azidiertem Glutathion
AuTweezer	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Monobutynyl-Tweezern geklickt
b	Breit (<i>engl.: broad</i>)
BADS	Benzylaziddiaminsuccinamid
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>engl.: blood-brain-barrier</i>)
bd	Breites Doublett (<i>engl.: broad doublet</i>)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl Schutzgruppe
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
C	Cystein
CAM	Hanessians Färbelösung aus Cer und Molybdän (<i>engl.: Hanessian's Stain, Cerium Molybdate</i>)
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>engl.: charge-coupled device</i>)
CDCl ₃	Deutertes Chloroform
CHO-K1	Zelllinie, die 1957 aus den Eierstöcken eines weiblichen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>) extrahiert wurde
CLR01	Monobutynyl-Tweezer
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie (<i>engl.: confocal laser-scanning microscopy</i>)

COSY	Korrelierte Spektroskopie (<i>engl.: correlated spectroscopy</i>)
Crml	Exportin1 (<i>Chromosomal Maintenance 1</i>)
CT-26	Darmkrebszellen der Maus (<i>engl.: murine colorectal carcinoma cells</i>)
CuAAC	Kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (<i>engl.: copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
d	Doublett
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doublett vom Doublett
dt	Doublett vom Triplett
DCM	Dichlormethan
DCS	Analytische Scheibenzentrifuge (<i>engl.: differential centrifugal sedimentation</i>)
DEPT135	<i>engl.: distortionless enhancement by polarization transfer with 135° radio pulse</i>
DHaA	Haloalkan Dehalogenase
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMEM	<i>engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOSY	Diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie (<i>engl.: diffusion ordered spectroscopy</i>)
DPBS	Dulbeccos mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.: Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
E	Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli Bakterien
EDC·HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDS	Ethylenglykoldiaminsuccinamid
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat

F	Phenylalanin
FAM	Fluorescein
FLAG	Oktapeptidsequenz zur Proteinadressierung
FFT	Fast-Fourier-Transformation
FID	Freier Induktionszerfall (<i>engl.: free induction decay</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FS	Fluoreszenzspektroskopie
FWHM	Halbwertsbreite
GCP	Guanidiniocarbonylpyrrol
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>engl.: green-fluorescent protein</i>)
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HeLa-Zellen	Zelllinie von Gebärmutterhalskrebs, benannt nach Henrietta Lachs (verstorben 1949)
HEPES	2-Ethan- <i>para</i> -sulfonsäure
H272F	Modifiziertes Fusionsprotein aus GST mit DhaA, mit Phenylalanin ²⁷² statt Histidin ²⁷²
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie (<i>engl.: high pressure liquid chromatography</i>)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (<i>engl.: high-resolution mass spectrometry</i>)
HRTEM	Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (<i>engl.: high-resolution transmission electron microscopy</i>)
HSAB	Harte und weiche Säuren und Basen (<i>engl.: hard and soft acids and bases</i>)
HSQC	Heteronukleare Quantenkorrelation (<i>engl.: heteronuclear single quantum correlation</i>)
HT2	Modifiziertes Fusionsprotein, ursprünglich bestehend aus DhaA und GST
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration

IR	Infrarotspektroskopie
ISA	Imidazolsulfonylazid Dihydrogensulfat
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (<i>engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
K	Lysin
kDa	Kilodalton (g/mol)
K(N ₃)	ε-Azidolysin
K(N ₃)CD	Tripeptid ε-Azidolysin-Cystein-Asparaginsäure
L	Leucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Multiplett
MA	Maleinsäure (<i>engl.: maleic acid</i>)
Makro-N ₃	Makromolekül (Cys-BADS-EDS-BADS-FITC)
MBP	Maltose-bindendes Protein (<i>engl.: maltose binding protein</i>)
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minuten
MLL	<i>engl.: Mixed-Lineage-Leukemia</i> Protein
MODE-K	Gesunde Darmepithelzellen der Maus (<i>engl.: mouse intestinal epithelial cells</i>)
MPLC	Mitteldruck-Flüssigchromatographie (<i>engl.: medium pressure liquid chromatography</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Asparagin
NA	Numerische Apertur
NES	Kernexportsignal (<i>engl.: nuclear export signal</i>)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>engl.: nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
NP	Nanopartikel
NP-DC	Normalphasendünnschichtchromatographie
PEG	Polyethylenglykol

PGSE	Gepulstes, graduelles Spin-Echo (<i>engl.: Pulsed Gradient Spin Echo</i>)
Phe	Phenylalanin
poly-His	Polymeres Histidin
ppm	Ein Millionstel (<i>engl.: parts per million</i>)
PSMA	Polystyrol- <i>block</i> -maleinsäureanhydrid (<i>engl.: poly(styrene-co-maleicanhydride)</i>)
PVC	Polyvinylchlorid
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
Q	Glutamin
q	Quartett
qi	Quintett
R	Arginin
R _f	Retentionsfaktor
RP-DC	Inversphasendünnschichtchromatographie (von <i>engl.: inverse phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RuAAC	Rutheniumkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (<i>engl.: ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.: sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>engl.: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SIM	<i>engl.: structured illumination microscopy</i>
SPAAC	Ringspannungsinduzierte Azid-Alkin Cycloaddition (<i>engl.: strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>engl.: Solid-Phase Peptide Synthesis</i>)
STORM	<i>engl.: stochastic optical reconstruction microscopy</i>
T	Threonin
t	Triplett

Taspase1	Threoninaspartase1
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin
Thr	Threonin
TFA	Trifluoressigsäure
TMR	Tetramethylrhodamin
TMS	Tetramethylsilan
TPE- <i>red</i>	Tetraphenylethylen
Tyr	Tyrosin
ULAP	<i>engl.: ultra-low attachment plates</i>
UV	Ultraviolett
UV-Vis	UV-Vis-Spektroskopie
V	Valin
Val	Valin
Vis	Sichtbar (<i>engl.: visible</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DLVO-Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek.....	4
Abbildung 2: Darstellung von GSH mit den drei Aminosäuren Glycin, Cystein mit Thiolgruppe und Glutaminsäure.....	5
Abbildung 3: LaMer-Modell für den Bottom-Up Ansatz der Nanopartikelsynthese. ^[36,37]	6
Abbildung 4: Vorschlag für den Mechanismus der CuAAC (adaptiert aus Literatur ^[68]).....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Zeeman-Aufspaltung des Eigendrehimpulses eines Atomkerns im homogenen Magnetfeld und Rotation eines Atomkerns um den Winkel θ und dessen Präzession.	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der PGSE-Sequenz.	19
Abbildung 7: Signaldämpfung als Funktion des Magnetfeldgradienten mit der Amplitude G	20
Abbildung 8: Elektrospray-Ionisation der Probe.	32
Abbildung 9: Vergleich eines Mikroskops mit (rechts) und ohne (links) Lochblende.....	33
Abbildung 10: Reduktion von MTT zum entsprechenden Formazan.	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Synthese von ultrakleinen Goldnanopartikel.....	55
Abbildung 12: UV-Vis-Spektrum der AuGSH Partikel.	58
Abbildung 13: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit GSH.	59
Abbildung 14: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuGSH.	59
Abbildung 15: HRTEM-Aufnahme der GSH-funktionalisierten ultrakleinen Nanopartikel.....	60
Abbildung 16: IR-Spektrum vom reinen Liganden GSH und den damit funktionalisierten Nanopartikeln AuGSH.....	61
Abbildung 17: ^1H -NMR-Spektrum von GSH (400 MHz, 100% D_2O , pH 10) und AuGSH (400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).	62
Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektrum von AuGSH (400 MHz, 100% D_2O , pH 10) zur quantitativen Bestimmung der Liganden-Konzentration.....	63
Abbildung 19: ^{13}C -NMR-Spektrum der GSH-funktionalisierten Nanopartikel (600 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).	65
Abbildung 20: ^{13}C -DEPT135-NMR-Spektrum von AuGSH Nanopartikeln (600 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).	66
Abbildung 21: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von AuGSH Nanopartikeln.	67
Abbildung 22: ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von ultrakleinen AuGSH Nanopartikeln.....	68
Abbildung 23: Mit Hilfe von ^{15}N -NMR-Spektroskopie ermittelter Vorschlag für eine mögliche Syntheseroute zur Azidierung einer Aminogruppe mittels Diazotransfer.	70
Abbildung 24: Potenzielle Nebenprodukte bei der Synthese von ISA.	70
Abbildung 25: ^1H -NMR-Spektrum von ISA (400 MHz, 100% D_2O) mit restlichem Ethylacetat (Signale in Klammern).	72
Abbildung 26: ^{13}C -NMR-Spektrum von ISA (400 MHz, 100% D_2O).	73
Abbildung 27: IR-Spektrum von Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat.	74
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Syntheseroute für die Herstellung von AuN_3 -Nanopartikeln mittels Diazotransfer.....	76
Abbildung 29: IR-Spektrum von AuGSH-Nanopartikeln im Vergleich zu umfunktionalisierten AuN_3 -Partikeln nach dem Diazotransfer.	76
Abbildung 30: Vergleich der UV-Vis-Spektren von AuGSH und AuN_3 nach der Umfunktionalisierung.....	78
Abbildung 31: Normierte Anzahlverteilung der DCS von ultrakleinen umfunktionalisierten AuN_3 -NPs im Vergleich zu den Vorläufer-Partikeln AuGSH.	78

Abbildung 32: HRTEM-Aufnahme der azidierten ultrakleinen Nanopartikel nach erfolgreicher Umfunktionalisierung.	79
Abbildung 33: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuN ₃	80
Abbildung 34: ¹ H-NMR-Spektrum von AuGSH (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10) und AuN ₃ (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).....	81
Abbildung 35: ¹³ C-DEPT135-NMR-Spektrum von AuN ₃ (600 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10) im Vergleich zu AuGSH (600 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).....	82
Abbildung 36: ¹ H- ¹³ C-HSQC-NMR-Spektrum der azidierten Nanopartikel (600 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).	83
Abbildung 37: ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von AuN ₃ -Nanopartikeln.	85
Abbildung 38: Schematische Darstellung der fluoreszent markierten Nanopartikel.	86
Abbildung 39: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, 10% D ₂ O in 90% 0.1 M NaOH in H ₂ O) von AuFAM im Vergleich zu freiem FAM-Alkin, (B) ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, 10% D ₂ O in 90% H ₂ O) von AuAF647 im Vergleich zu freiem AF647-Alkin.	88
Abbildung 40: (A) Kalibriergerade zur Bestimmung der Konzentration von FAM; (B) Kalibriergerade zur Bestimmung der Konzentration von AF647; (C) UV-Vis-Spektren der mit FAM und mit AF647 markierten Nanopartikel.	90
Abbildung 41: Fluoreszenzspektren von AuFAM und AuAF647.	91
Abbildung 42: CLSM-Bilder von fluoreszent markierten, ultrakleinen Goldnanopartikeln in HeLa-Zellen.	93
Abbildung 43: SIM-Bilder für die Aufnahme von fluoreszent markierten AuAF647 Nanopartikeln in E. coli Bakterien nach 1 h und nach 3 h.....	96
Abbildung 44: STORM-Bilder für die Aufnahme von fluoreszent markierten AuAF647 Nanopartikeln in E. coli Bakterien.	97
Abbildung 45: CLSM-Bilder von AuAF647 Nanopartikeln in Spherotide (500 Zellen, 3 Tage) der Darmkrebslinie CT-26 nach 2 h Inkubation.	99
Abbildung 46: CLSM-Bilder von AuAF647 Nanopartikeln in Spherotide (500 Zellen, 3 Tage) der gesunden MODE-K Zellen nach 2 h Inkubation.....	100
Abbildung 47: CLSM-Bilder in Nahaufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in Spherotide (1000 Zellen, 3 Tage) der gesunden MODE-K Zellen nach 24 h Inkubation.	100
Abbildung 48: CLSM-Bilder für die Aufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in menschliche Darmorganoide nach einer Inkubationszeit von 24 h.	101
Abbildung 49: Strukturen der verwendeten AIE-Farbstoffe aus der Arbeitsgruppe von Prof. J. Voskuhl.	103
Abbildung 50: DCS-Kurven der mit AIE-Liganden funktionalisierten Goldnanopartikelsysteme.	104
Abbildung 51: (A) Kalibriergeraden aus den UV-Vis-Messungen der freien AIE-Alkine; (B) UV-Vis-Spektrum der Nanopartikelsuspensionen.	104
Abbildung 52: Fluoreszenzemissionsspektren von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit AIE-Luminophoren.	106
Abbildung 53: CLSM Bilder von HeLa Kyoto Zellen nach Inkubation mit AuAIE Nanopartikeln.....	107
Abbildung 54: MTT-Test von HeLA Kyoto (H2B-mCherry) Zellen mit den AuAIE Nanopartikeln im Vergleich zu den freien Farbstoff-Alkinen.....	108
Abbildung 55: Darstellung der ersten verwendeten HaloTags.	110
Abbildung 56: Schematischer Mechanismus der Hydrolyse des HaloTag-Addukts durch die benachbarte Histidin ²⁷² -Seitenkette (A) und Verhinderung der Hydrolyse durch Einsetzen der hydrophoben Seitenkette Phenylalanin ²⁷² (B).....	111
Abbildung 57: Strukturmodelle von H272F (A) und HT2 (B) ohne gebundenen Liganden.	112
Abbildung 58: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) von H1-1 in CDCl ₃	114

Abbildung 59: Schematische Darstellung der Ergebnisse der NP-DC von H1-2 während der Säulenchromatographie.	115
Abbildung 60: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) von H1-2 in CDCl ₃ nach säulenchromatographischer Aufreinigung.	116
Abbildung 61: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) von H1-3 in CDCl ₃ . Die Boc-Schutzgruppe wurde erfolgreich abgespalten.	117
Abbildung 62: Schematischer Mechanismus für die Kupplung einer Amidbindung mit PyBOP (adaptiert aus Literatur ^[169]).	118
Abbildung 63: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des finalen H1-Liganden in CDCl ₃	119
Abbildung 64: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit H1-Liganden.	120
Abbildung 65: UV-Vis-Spektrum der AuH1-Partikel.	120
Abbildung 66: ¹ H-NMR-Spektrum von AuH1 (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).	121
Abbildung 67: Quantitatives ¹ H-NMR-Spektrum von AuH1 (400 MHz, 100% D ₂ O, pH 10) mit 2 mM Maleinsäure.	122
Abbildung 68: Konkurrenz-Assay der AuH1-Nanopartikel gegen einen TMR-HaloTag Liganden.	124
Abbildung 69: Größenausschlusschromatographie über eine Superose-6-(3.2/300)-Säule mit einem Gesamtvolumen von 2.4 mL.	125
Abbildung 70: ¹ H-NMR-Spektrum von H2-1 (400 MHz, DMSO-d ₆) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.	127
Abbildung 71: ¹ H-NMR-Spektrum von H2-2 (400 MHz, DMSO-d ₆) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.	128
Abbildung 72: ¹ H-NMR-Spektrum von H2-3 (400 MHz, DMSO-d ₆).	129
Abbildung 73: Schematischer Mechanismus für die Peptidkupplung mit EDC und NHS. ...	130
Abbildung 74: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) von H2 in DMSO-d ₆	130
Abbildung 75: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit H2-Liganden.	131
Abbildung 76: UV-Vis-Spektrum der AuH2 Partikel.	132
Abbildung 77: ¹ H-NMR-Spektrum von AuH2 (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).	133
Abbildung 78: Quantitatives ¹ H-NMR-Spektrum von AuH2 (400 MHz, 100% D ₂ O, pH 10) mit 2 mM Maleinsäure. Die Goldkonzentration betrug 3.285 g/L.	134
Abbildung 79: Struktur der molekularen Pinzette CLR01.	135
Abbildung 80: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit molekularen Pinzetten.	136
Abbildung 81: UV-Vis-Spektrum der mit CLR01 funktionalisierten Goldnanopartikel.	137
Abbildung 82: ¹ H-NMR-Spektrum von AuTweezer (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10). ...	138
Abbildung 83: Mechanismus für den Import des cis-Dimers von Taspase1 in den Zellkern durch Andocken von Importin α an den Loop.	141
Abbildung 84: Ergebnisse der SDS-PAGE des Pull-Down Assays mit AuTweezer.	142
Abbildung 85: Quantitative Ausmessung der Ergebnisse des Pull-Down Assays (Abbildung 84) mit AuTweezer mit Signifikanzlevel (p).	143
Abbildung 86: SDS-PAGE zur Veranschaulichung der Spaltprodukte der für die enzymatische Aktivität von Taspase1 eingesetzten Sonde.	145
Abbildung 87: Auftragung der Farbintensitäten mit Signifikanzwerten aus der SDS-PAGE für die enzymatische Aktivität von Taspase1 in Gegenwart der AuTweezer Nanopartikel.	145
Abbildung 88: Angepasste Auswertung der quantitativen Analyse für die enzymatische Aktivität von Taspase1 in Gegenwart von AuTweezer Nanopartikeln.	146
Abbildung 89: Darstellung des verwendeten sequenzdefinierten Oligomers.	148
Abbildung 90: UV-Vis-Spektrum der AuMakro-N ₃ -Nanopartikel.	149

Abbildung 91: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit Makro-N ₃ -Liganden.	151
Abbildung 92: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuMakro-N ₃	151
Abbildung 93: HRTEM-Aufnahme der mit Makro-N ₃ funktionalisierten ultrakleinen Nanopartikel.	152
Abbildung 94: IR-Spektrum von AuMakro-N ₃ -Nanopartikeln.	153
Abbildung 95: ¹ H-NMR-Spektrum von AuMakro-N ₃ (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10). .	154
Abbildung 96: Normierte Anzahlverteilung der DCS von ultrakleinen, umfunktionalisierten AuMakro-Tweezer Partikeln im Vergleich zu den Vorläufer-Partikeln AuMakro-N ₃	155
Abbildung 97: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuMakro-Tweezer.	156
Abbildung 98: HRTEM-Aufnahme der ultrakleinen AuMakro-Tweezer Nanopartikel.	156
Abbildung 99: UV-Vis-Spektrum der AuMakro-Tweezer Nanopartikel.	157
Abbildung 100: ¹ H-NMR-Spektrum von AuMakro-Tweezer (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).	158
Abbildung 101: Prozess für den Eintritt von Proteinen in den Zellkern durch verschiedene Importine.	161
Abbildung 102: CLSM-Bilder von AuMakro-N ₃ in HeLa-Zellen.	163
Abbildung 103: Großaufnahme des ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von AuN ₃ -Nanopartikeln.	183
Abbildung 104: DCS-Daten der mit FAM-Alkin und AF647 fluoreszent markierten Nanopartikel.	183
Abbildung 105: HRTEM-Aufnahme der mit FAM markierten ultrakleinen Nanopartikel nach erfolgreicher Umfunktionalisierung.	184
Abbildung 106: HRTEM-Aufnahme der mit AF647 markierten ultrakleinen Nanopartikel nach erfolgreicher Umfunktionalisierung.	184
Abbildung 107: UV-Vis-Messungen verschiedener Konzentrationen von FAM-Alkin zwecks Kalibration für eine Quantifizierung des am Partikel gebundenen Farbstoffes.	185
Abbildung 108: UV-Vis-Messungen verschiedener Konzentrationen von AF647-Alkin zwecks Kalibration für eine Quantifizierung des am Partikel gebundenen Farbstoffes.	185
Abbildung 109: 2D-Zellaufnahme von AuAF647 mit CT-26 und MODE-K Zellen nach 2 h Inkubation.	186
Abbildung 110: 2D-Zellaufnahme von AuAF647 mit CT-26 und MODE-K Zellen nach 24 h Inkubation.	187
Abbildung 111: UV-Vis-Kalibrationsmessungen der freien AIE-Alkine. (A) AIE-1; (B) AIE-2; (C) AIE-3.	188
Abbildung 112: Ortho-Ansicht der Aufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in E. coli Bakterien. Die Bilder wurden nach 1 h Inkubationszeit aufgenommen.	188
Abbildung 113: Ortho-Ansicht der Aufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in E. coli Bakterien. Die Bilder wurden nach 3 h Inkubationszeit aufgenommen.	189
Abbildung 114: UV-Vis-Messungen verschiedener Konzentrationen von CLR01 zwecks Kalibration für eine Quantifizierung am Partikel.	190
Abbildung 115: Mögliche Quantifizierung der auf die Oberfläche der ultrakleinen Goldnanopartikel geklickten molekularen Pinzetten.	190
Abbildung 116: Schematische Darstellung des Spaltung des rekombinanten Fusionsproteins für enzymatische Taspase1-Aktivität.	191
Abbildung 117: Vergrößerte Ansicht des ¹ H-NMR-Spektrum von AuMakro-N ₃ (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).	191
Abbildung 118: Vergrößerte Ansicht des ¹ H-NMR-Spektrum von AuMakro-Tweezer (400 MHz, 10% D ₂ O in H ₂ O, pH 10).	192

1. Einleitung

Ultrakleine, metallische Nanopartikel sind durch ihre sehr geringe Größe von <2 nm ein wichtiger Bestandteil in der nanomedizinischen Forschung geworden. Ultrakleine Goldpartikel stechen dabei besonders hervor, da sie im Gegensatz zu Silberpartikeln bioinert agieren und keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen.^[1,2,3] In vergangenen biologischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch die Zellmembran in Zellen eindringen und sogar Wirkstoffe durch die sonst sehr feste Blut-Hirn-Schranke (BBB) transportieren können.^[4,5,6] Eine fluoreszente Markierung dieser Partikel ermöglicht dabei die Lokalisierung im Zytoplasma. In selteneren Fällen konnten die Partikel sogar im Zellkern wiedergefunden werden.^[5]

Die spezifische Proteinadressierung ist dabei von besonderem Interesse, da viele durch z. B. fehlgefaltete Proteine verursachte Erkrankungen wie Alzheimer oder Demenz^[7,8,9] aktuell noch ein großes medizinisches Problem darstellen. Gerade für diese Leiden, welche in der Regel im Hirnbereich des Patienten ihre Ursache finden, ist die Überwindung der BBB besonders wichtig, da ansonsten keine Wirkstofffreigabe am Zentrum der Erkrankung möglich ist.

Mit einer Größenordnung von rund zwei Nanometern liegen ultrakleine Nanopartikel in demselben Größenbereich wie Proteine.^[10,11] Ein einzelner Nanopartikel kann dabei mehrere bindende Motive auf seiner Oberfläche immobilisieren. Diese Multiavidität der Nanopartikeloberfläche sorgt dabei für eine lokal erhöhte Ligandenkonzentration an den zu untersuchenden Proteinen, sodass noch bessere Bindungskonstanten erzielt werden können, als mit den freien Liganden möglich wäre.^[10,12,13,14]

Zusätzlich zu diesem breiten Anwendungsspektrum zeichnen sich ultrakleine Goldnanopartikel dadurch aus, dass sie im wässrigen Medium bei Normalbedingungen sehr effizient hergestellt werden können.^[15,16,17] Sie lassen sich einfach durch Ultrazentrifugation oder Spinfiltration aufreinigen und sind auch in biologischen Medien stabil in Suspension. Sie können mit unterschiedlichen Thiol-haltigen Liganden an ihrer Oberfläche funktionalisiert und je nach verwendetem Liganden auch bei unterschiedlichsten pH-Werten ohne Probleme verwendet werden.

Für eine spezifische Anwendung im biomedizinischen Spektrum müssen die Nanopartikel mit verschiedenen Funktionalitäten ausgestattet werden. *Van der Meer et al.* führten dazu bereits ausführliche Versuche durch, indem ultrakleine

Goldnanopartikel über eine kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) kovalent an ihrer Ligandenhülle funktionalisiert wurden. Dazu wurde ein Tripeptid aus ϵ -Azidolysin (K(N₃)), Cystein (C) und Asparaginsäure (D) verwendet, welches über die Thiolgruppe des Cysteins nach dem HSAB-Konzept eine starke, fast kovalente Bindung^[18,19,20,21] zur Oberfläche des Goldnanopartikels ausbildet und später über die Azidogruppe des Lysins mit Hilfe der CuAAC mit Alkin-tragenden Liganden kovalent funktionalisiert wurde. Die Ligandenhülle des Nanopartikels und ihre chemische Umgebung, sowie der durch die CuAAC neu ausgebildete Triazol-Linker konnten dabei über NMR-Experimente verfolgt und analysiert werden.^[22] Diese Synthesen von Nanopartikeln mit dem K(N₃)CD-Liganden sind jedoch sehr teuer und anfällig für Nebenreaktionen. So können die Azidogruppen während der Synthese durch das Natriumborhydrid gemäß einer Staudinger-Reduktion zu Aminen reduziert werden,^[23,24] wodurch die genaue Anzahl der nutzbaren Azide für weitere Funktionalisierungen nicht genau bekannt ist.

In dieser Arbeit wird daher ein deutlich günstigerer und genau quantifizierbarer Reaktionsweg für Azid-tragende, ultrakleine Goldnanopartikel vorgestellt. Goldnanopartikel mit Glutathion (GSH) werden über eine Reduktion mit dem starken Reduktionsmittel Natriumborhydrid in wässrigem Medium hergestellt. Anschließend werden sie auf chemischem Wege so verändert, dass die Aminogruppe des GSH zu einem Azid oxidiert wird, welches über CuAAC mit unterschiedlichen Liganden als Plattform für ein breites Anwendungsspektrum dienen kann. Die Nanopartikel werden mit unterschiedlichen Fluorophoren funktionalisiert und ihre Zellgängigkeit überprüft. Außerdem werden sie mit verschiedenen biologisch aktiven Liganden versehen, um sie bezüglich ihrer Wechselwirkung mit Proteinen zu untersuchen.

Zusätzlich zur Synthese einer geeigneten, breit anwendbaren Plattform für funktionalisierbare, ultrakleine, metallische Nanopartikel werden sequenzdefinierte, makromolekulare Liganden für Partikel eingesetzt. Die sequenzdefinierte Struktur ermöglicht es, verschiedene Liganden in bestimmten Abständen zueinander einzusetzen. Dadurch wird zusätzlich zur Multiavidität der Nanopartikel eine noch bessere Bindungskonstante zu Proteinen ermöglicht.

2. Theorie

Kolloidale Systeme umfassen eine Vielzahl von verschiedenen zweiphasigen Materialien. Dabei gilt nach IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) für alle diese Systeme, dass die dispergierte Phase in mindestens zwei räumlichen Dimensionen in einem Größenbereich von 1 nm – 1000 nm liegen muss.^[25,26] Kolloide können in Dispersionskolloide, Assoziationskolloide und Molekülkolloide eingeteilt werden. Assoziationskolloide bestehen in der Regel aus amphiphilen Molekülen, die in einem flüssigen Dispersionsmedium zu Mizellen assemblieren. Molekülkolloide hingegen werden durch Makromoleküle wie z. B. Proteine, Cellulose oder Kautschuk definiert, die in einer Dispersionsphase kolloidale Eigenschaften wie verminderte Sedimentation und Lichtbrechung durch den Tyndall-Effekt aufweisen.^[27] Metallische Nanopartikel als fein verteilte feste Phase in einer flüssigen Dispersionsphase (Suspension) gelten dabei als Dispersionskolloide.

2.1. Stabilität von Dispersionskolloiden

Nanopartikel besitzen eine sehr hohe spezifische Oberfläche. Im Vergleich zum Bulkmaterial weisen sie sehr viele Atome an der Oberfläche auf, die demnach in nicht abgesättigten kristallografischen Positionen liegen. Da dieser Zustand thermodynamisch ungünstig ist, neigen die Nanopartikel zu spontaner Agglomeration bzw. Aggregation. Durch diese Prozesse wird die spezifische Oberfläche dA verringert, sodass nach Gleichung 1 durch Absenkung der freien Enthalpie dG als Funktion der Oberflächenspannung γ ein thermodynamisch günstigerer Zustand erreicht wird.^[28,29]

$$dG = \gamma dA \quad (1)$$

Eine Korrelation der attraktiven van-der-Waals Wechselwirkungen und der elektrostatischen Abstoßung in kolloidalen Systemen wurde erstmals von *Derjaguin* und *Landau* 1941 präsentiert.^[30] Sieben Jahre später erweiterten *Verwey* und *Overbeek* diesen Ansatz zu einem Potentialverlauf (DLVO-Theorie, Abbildung 1), der in Abhängigkeit vom Abstand zweier betrachteter Nanopartikel die attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen zu einem Gesamtpotential zusammenfasst.^[31]

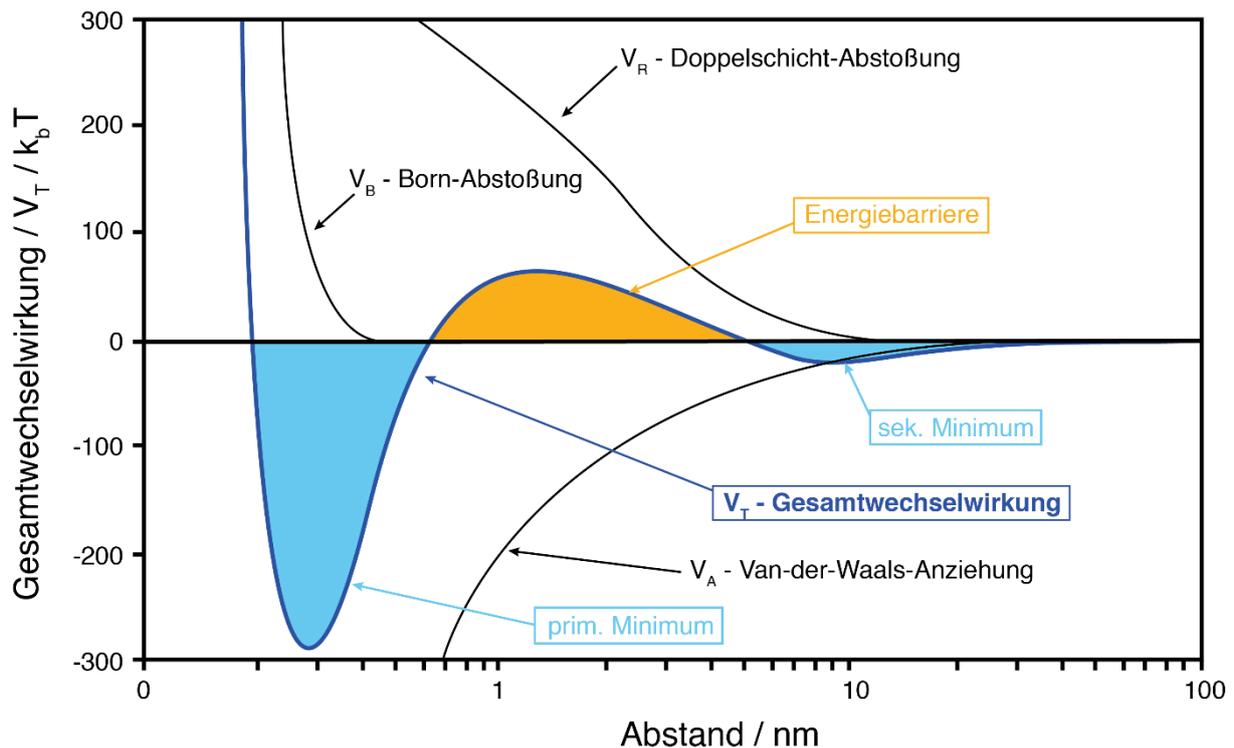


Abbildung 1: DLVO-Theorie nach *Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek* (adaptiert aus Literatur^[32]).

Die DLVO-Theorie beschreibt die Annäherung zweier elektrostatisch stabilisierter Nanopartikel. Sollten die Partikel zu nah aneinandergeraten, so fallen sie in einen thermodynamischen Tiefpunkt, das sekundäre Minimum. Dieser Zustand beschreibt die Agglomeration, also den losen Zusammenschluss der Teilchen eines kolloidalen Systems. Dabei handelt es sich um einen reversiblen Zustand, der beispielsweise wieder durch Ultraschall oder Änderung des pH-Wertes in eine stabile Suspension überführt werden kann. Nähern die Partikel sich allerdings noch näher einander an, so muss für einen festeren Zusammenschluss, der Aggregation im primären thermodynamischen Minimum, erst eine Energiebarriere überwunden werden, die sich aus den Oberflächenpotenzialen der beiden Partikel bildet.^[32]

Die DLVO-Theorie gilt nur für elektrostatisch stabilisierte Systeme, die Grundidee ist jedoch auch für andere Formen der Stabilisierung anwendbar. Bei der sterischen Stabilisierung kann die Potenzialkurve für die elektrostatische Abstoßung durch die repulsiven Kräfte sterischer Effekte substituiert werden. Dazu zählt z. B. eine Absenkung der Entropie des kolloidalen Systems, da die adsorbierten, stabilisierenden Polymerketten an der Oberfläche der Partikel bei Annäherung aneinander eine Einschränkung ihrer Bewegungsfreiheitsgrade erfahren. Die Ketten „verhaken“ sich

ineinander und können daher nicht mehr so viele Konformationen annehmen wie bei einem freischwimmenden Nanopartikel. Außerdem besteht in dem zwischen den Partikeln liegenden Volumen eine lokal erhöhte Ligandenkonzentration, welche die Partikel durch den entstehenden osmotischen Druck zur Herstellung eines Equilibriums auseinandertreibt.^[27,32,33] Eine dritte Form der Stabilisierung kann aus elektrostatischer und sterischer Stabilisierung zusammengesetzt werden. Glutathion (GSH) als vergleichbar großes Molekül mit zwei terminalen Carbonsäuregruppen bietet durch Deprotonierung an diesen Säuren zusätzlich zu seiner durch die Größe bestimmten sterischen Stabilisierung ebenfalls eine elektrostatische Repulsion (Abbildung 2). Über die Thiolgruppe der Cystein-Einheit in der Mitte des Moleküls kann der Ligand an die Oberfläche von Edelmetall-Nanopartikeln adsorbieren.^[18,19,20] Die beiden terminalen Säuregruppen an der Glutaminsäure und an dem Glycin stehen dabei nach außen in die Lösung und bieten die entsprechende Stabilität für den Nanopartikel durch repulsive Kräfte.

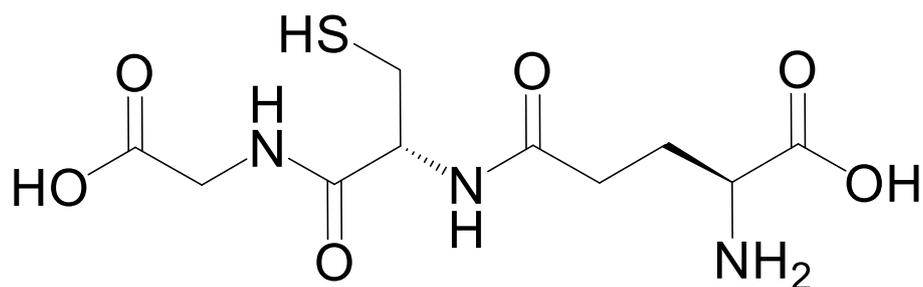


Abbildung 2: Darstellung von GSH mit den drei Aminosäuren Glycin, Cystein mit Thiolgruppe und Glutaminsäure. In neutralen bis basischen pH-Werten liegen beide Säuregruppen in deprotonierter Form vor.

2.2. Synthese von Goldnanopartikeln

Die Synthese von Nanopartikeln läuft grundsätzlich auf einer von zwei möglichen Routen ab. Der *Top-Down* Ansatz beschreibt die Zerkleinerung des Bulkmaterials bis in die Größenordnung von wenigen Nanometern. Dazu wird das Bulkmaterial durch Mahlen oder durch physikalisch-chemische Einflüsse zerkleinert. Bei dem *Top-Down* Ansatz ist es möglich, größere Mengen Nanomaterialien mit einem Ansatz herzustellen. Allerdings fehlt es dem Produkt meist an morphologischer Kontrolle und Monodispersität.^[34,35]

Eine bessere Kontrolle über die Morphologie und chemische Struktur der Nanomaterialien liefert der *Bottom-Up* Ansatz. Dabei werden verschiedene Nanomaterialien von Grund auf aufgebaut. Metallische Nanopartikel werden beispielsweise aus ionischen Vorläufern mittels geeigneter Reduktionsmittel zu ihrer elementaren Form reduziert, wobei das Wachstum der Partikel durch das LaMer-Modell (Abbildung 3) beschrieben werden kann.^[36]

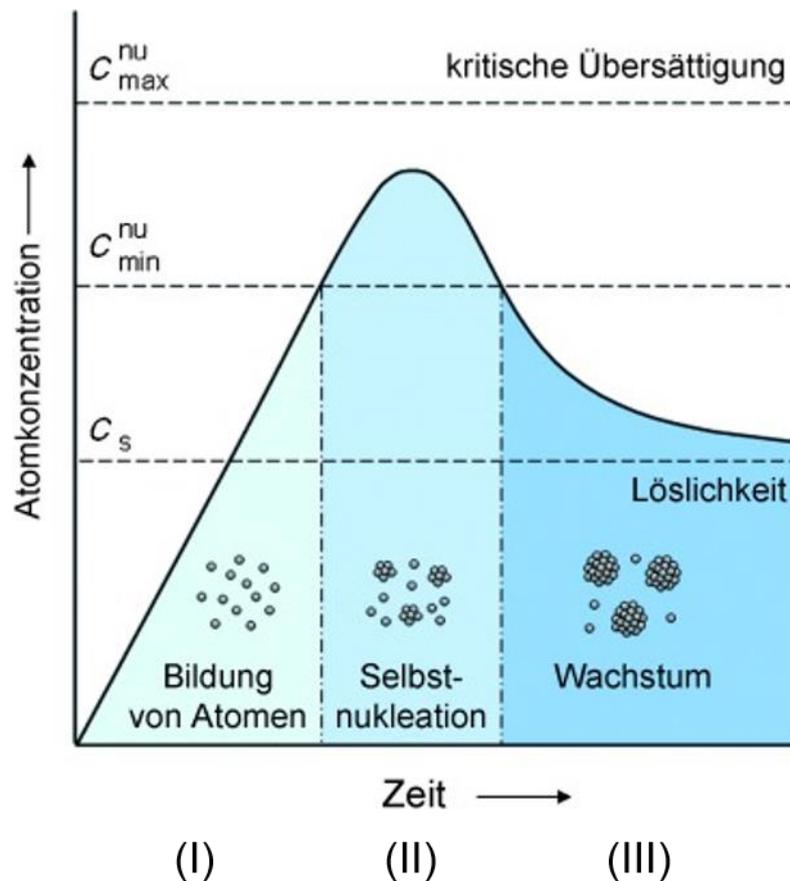


Abbildung 3: LaMer-Modell für den *Bottom-Up* Ansatz der Nanopartikelsynthese.^[36,37]

Die Atom- bzw. Keimkonzentration in Abhängigkeit von der Reaktionszeit lässt sich nach LaMer grundsätzlich in drei Phasen unterteilen. Die Abszisse als fortlaufende Zeitskala beginnt mit der Zugabe des Reduktionsmittels. Ab diesem Moment werden Ionen zu ihren elementaren Teilchen reduziert, die Atomkonzentration steigt also (I). Die Konzentration dieser Teilchen nimmt mit der Zeit zu, bis sie die Sättigungskonzentration c_s übertrifft und in den Bereich der Übersättigung trifft. Bei dieser Übersättigung der Lösung neigt das System dazu, die Konzentration der Atome zu senken, wodurch diese anfangen zu aggregieren (II). Da mehrere einzelne Teilchen sich in diesem Stadium zu weniger größeren zusammenlagern, sinkt die Gesamtkonzentration der Teilchen in der Suspension wieder bis zu einem Wert nahe

der Sättigungskonzentration (III), sodass das Gesamtsystem wieder in einem kinetisch stabilen Zustand vorliegt.^[37]

Die Konzentration sowie das Reduktionspotenzial des verwendeten Reduktionsmittels spielen für die Größe der resultierenden Partikel dabei eine wichtige Rolle. Sollte einer von beiden Werten, oder sogar beide erhöht werden, spiegelt sich das in einer Verringerung der Größe der Nanopartikel wider. Beide Szenarien führen zu einer schnelleren Reduktion der ionischen Vorläufer im Vergleich zu einem schwächeren oder weniger konzentrierten Reduktionsmittel, sodass die Konzentration der elementaren Teilchen schneller zunimmt. Dadurch liegen in einem vergleichbaren Zeitraum mehr potenzielle Kristallisationskeime vor, auf die sich die übrigen entstehenden Atome verteilen müssen, was wiederum zu einer kleineren mittleren Partikelgröße führt.^[38]

Ein prominentes Beispiel, das den Einfluss des Reduktionspotenzials auf die Größe der Partikel verdeutlicht, ist die klassische Synthese von Goldnanopartikeln nach *Turkevich*. *Turkevich et al.* haben Au^{III} -Ionen in der Siedehitze des Wassers in Gegenwart von Trinatriumcitrat zu Goldnanopartikeln reduziert. Dabei diente das Citrat als Reduktionsmittel und gleichzeitig als stabilisierender Ligand. Unter Abgabe von CO_2 wird das C-3 Kohlenstoff des Citrats von einem Alkohol zum Keton oxidiert, während die abgegebenen Elektronen von den Au^{III} -Ionen aufgenommen werden. Die resultierenden Goldnanopartikel wiesen einen Durchmesser von rund 20 nm auf und zeigten dadurch auch die klassische rote Färbung durch Oberflächenplasmonenresonanz.^[39]

Einige Jahre später gelang es *Brust et al.* durch die Verwendung des stärkeren Reduktionsmittels Natriumborhydrid (NaBH_4), sehr viel kleinere (~5 nm) Goldnanopartikel herzustellen. Sie verwendeten dazu ein Zweiphasensystem aus Wasser und Toluol sowie Tetrachlorogoldsäure (HAuCl_4) als metallhaltigen Vorläufer. HAuCl_4 wurde dabei mit Hilfe des Phasentransferkatalysators Tetraoctylammoniumbromid in die organische Phase überführt. In dem Toluol lag währenddessen Dodecanthiol in gelöster Form vor, welches das Au^{III} unter Oxidation zu Disulfiden zu Au^{I} reduzierte. Dabei wurde es in einem Überschuss eingesetzt, sodass die nicht-oxidierte Form nebenbei als stabilisierender Ligand agieren konnte. Der Reaktionsfortschritt der Reduktion zu Au^{I} konnte dabei rein optisch verfolgt werden, da die sehr farbintensive orangene Au^{III} -Lösung im Laufe der Reaktion farblos

wurde. An diesem Punkt wurde die Reaktion um NaBH_4 ergänzt, wodurch der finale Reduktionsschritt von Au^{I} zu Au^0 sehr schnell erfolgte und eine braune Suspension aus ultrakleinen Nanopartikeln ergab.^[40]

Ausgehend von der Synthese ultrakleiner Goldpartikel nach *Brust-Schiffrin* wurde der Syntheseansatz fortführend weiterentwickelt und verfeinert. Natriumborhydrid als wasserlösliches Reduktionsmittel eignet sich beispielsweise sehr gut, um biologisch relevante Partikelsynthesen im wässrigen Medium durchzuführen. *Ruks et al.* verwendeten dazu wasserlösliche, cysteinhaltige Peptide, welche direkt bei Reduktion der Tetrachlorogoldsäure *in situ* vorlagen und stabilisierende Effekte, sowie biologisch relevante Funktionen für die Nanopartikel lieferten.^[17] Auch *Schütze et al.* konnten durch eine *in situ*-Reaktion ultrakleine Goldnanopartikel herstellen, die verschiedenen Mercaptocarbonsäuren funktionalisiert und umfassend analysiert wurden.^[41]

2.3. Ultrakleine Goldnanopartikel

Der Übergang zu atomscharfen Clustern bezüglich der Größe von ultrakleinen Nanopartikeln ist fließend und nicht klar definiert. In der Regel werden perfekt monodisperse Systeme in dieser oder einer kleineren Größenordnung als Cluster definiert und polydispersere Systeme als kolloidale Nanopartikelsuspensionen. *Negishi et al.* stellten beispielsweise atomscharfe Goldcluster in Methanol her.^[42] Ultrakleine Nanopartikel zeichnen sich im Gegensatz zu ihren größeren Analoga durch eine extrem erhöhte Anzahl an kristallografisch nicht abgesättigten Oberflächenatomen aus. Diese Tatsache macht ultrakleine Partikel sehr interessant in Bezug auf Anwendungen in der Katalyse.^[43,44,45,46] Diese Anzahl an nicht abgesättigten Oberflächenatomen nimmt reziprok zur Partikelgröße zu. Bei Nanopartikeln mit einem Kerndurchmesser von 2 nm befinden sich demnach etwa 70 % aller Atome des Partikels an der Oberfläche, bei Nanopartikeln mit 1 nm Durchmesser sind es sogar 99%.^[47]

Wenn ultrakleine Nanopartikel mit Liganden funktionalisiert werden, deren Anzahl eine wichtige Rolle in der Analyse ihrer Effizienz widerspiegelt, so muss die Konzentration der Nanopartikel als Referenz für Berechnungen herangezogen werden. Im speziellen Fall von Gold mit einem Atomradius von 0.144 nm kann die Anzahl N der Atome pro Partikel über die dritte Potenz des Durchmessers d [in nm] unter Annahme einer

kugelförmigen Morphologie und der dichtesten Kugelpackung der Atome mit Gleichung 2 bestimmt werden.^[48] Darauf aufbauend kann über die Goldkonzentration direkt die Konzentration der Partikel berechnet werden.

$$N(\text{Au}) = 31d^3 \quad (2)$$

Generell für kugelförmige metallische Nanopartikel gilt für die Umrechnung der Metallkonzentration c_M in die Partikelkonzentration c_{NP} ein Zusammenhang über den Radius der Partikel r , der Dichte ρ des Metalls im Partikelkern und der Avogadrokonstanten N_A (Gleichung 3).^[49]

$$c_{NP} = \frac{c_M}{\frac{4}{3}\pi N_A \cdot \rho r^3} \quad (3)$$

Die insgesamt kleinere Anzahl an Atomen in dem metallischen Partikel, der den Kern des Nanopartikels ausmacht, verhindert zudem, dass Goldnanopartikel die typische rote Färbung durch Oberflächenplasmonenresonanz aufweisen. Grund dafür sind Quanteneffekte (vgl. Kapitel 5.1), die unterbinden, dass die Elektronen der Atomorbitale über den gesamten Partikel delokalisiert vorliegen und schwingen können.^[50,51,52,53] Durch dieses Phänomen sind ultrakleine Nanopartikel in besonderen Fällen dazu in der Lage, autofluoreszente Eigenschaften zu zeigen. Die fluoreszenten Eigenschaften sind jedoch von einigen Parametern abhängig. Dazu zählen Partikelgröße,^[54] Liganden^[55] und die Kristallinität des Kerns.^[50,56] Selbst die Art des Metalls im Kern kann weitgehende Einflüsse auf mögliche Fluoreszenz haben. So besitzen Partikel aus verschiedenen anderen Edelmetallen keine Fluoreszenzeigenschaften,^[57] was zudem auf einen möglichen Charge-Transfer zwischen Metall und Ligand hindeutet.^[50] Fluoreszenz durch den Liganden konnten bereits *Negishi et al.* an Glutathion-stabilisierten Goldclustern feststellen. Dabei fiel zudem ein extrem hoher Stokes-Shift, also ein Energieverlust der Emission im Vergleich zur Anregung auf.^[58] Beim Übergang der Synthese von Goldclustern zu ultrakleinen Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von rund 2.5 nm stellten *Liu et al.* zudem fest, dass das Emissionsmaximum der Autofluoreszenz mit der eingesetzten Menge an Glutathion korreliert.^[59] Demnach entsteht die Fluoreszenz in ultrakleinen Goldnanopartikeln und Goldclustern durch Immobilisierung des Liganden. Dabei werden die Freiheitsgrade des Liganden bei Adsorption an den metallischen Kern eingeschränkt, sodass dieser nicht mehr frei im Lösemittel rotieren kann. Die direkte Nähe zu anderen Liganden auf der Partikeloberfläche verstärkt diesen Effekt. Da der

Ligand die aufgenommene Energie nicht in Rotationsbewegungen abgeben kann, muss diese Abgabe in Form von Emission einiger Photonen erfolgen (vgl. *aggregation-induced emission*, Kapitel 5.5).^[60] Dieser Effekt gilt für Glutathion-stabilisierte Goldnanopartikel jedoch nur, solange die polymere Kette aus nicht vollständig reduzierten Au^I-Thiolat-Ketten die Oberfläche der Nanopartikel bedeckt.^[61]

2.4. Klickchemie

Klickreaktionen umfassen ein sehr breites Feld der funktionalisierenden Chemie. Nach *Sharpless et al.* ist eine Klickreaktion eine zuverlässige Reaktion, die in kleinen sowie großen Maßstäben das gewünschte Produkt liefert. Zudem muss sie stereoselektive Produkte in hohen Ausbeuten liefern, die auch stabil in biologischen Medien sind. Eine Klickreaktion verläuft ohne toxische Nebenprodukte bei milden Reaktionsbedingungen und wird auch nicht von Luft oder Wasser gestört. Potenziell vorkommende Nebenprodukte sollen ohne größeren Aufwand einfach zu entfernen sein, sodass ein sauberes und stabiles Produkt entsteht.^[62]

Nicht alle Klickreaktionen erfüllen jedoch diese Bedingungen. Die kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) beispielsweise ist ohne weitere Aufreinigung durch die vorhandenen Kupfer-Ionen zytotoxisch.^[63] Dennoch wird diese Form der Klickreaktionen häufig genutzt, da sie im Gegensatz zu der ringspannungsinduzierten Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC) sehr schnell und in höherer Ausbeute verläuft.^[64] Bereits im Jahre 1893 gelang es *M. Arthur* in einer durch Hitze katalysierten Klickreaktion Phtalsäureanhydrid mit Dibenzolimid über die Entstehung eines Triazols in einer Klick-Reaktion zu verbinden.^[65] Etwa 70 Jahre später entwickelte *R. Huisgen* für diese Klasse der 1,3 dipolaren Cycloadditionen einen Entwurf für den Reaktionsmechanismus, weshalb sie später nach ihm benannt wurden.^[63] Allerdings benötigten auch die von *Huisgen* entwickelten Cycloadditionsreaktionen eine erhöhte Temperatur von 100 °C und ergaben statt eines stereoselektiven Produktes eher ein Gemisch aus dem 1,4- und dem 1,5-substituierten Triazol. Das Problem des isomeren Gemisches wurde schließlich 2002 von *Fokin* und *Sharpless et al.* gelöst, indem Cu^I-Ionen als Katalysator eingesetzt wurde.^[66,67] Nach dem Reaktionsschema in Abbildung 4 liefert der Einsatz von Cu^I-Ionen ein stereoselektives 1,4-substituiertes Produkt.

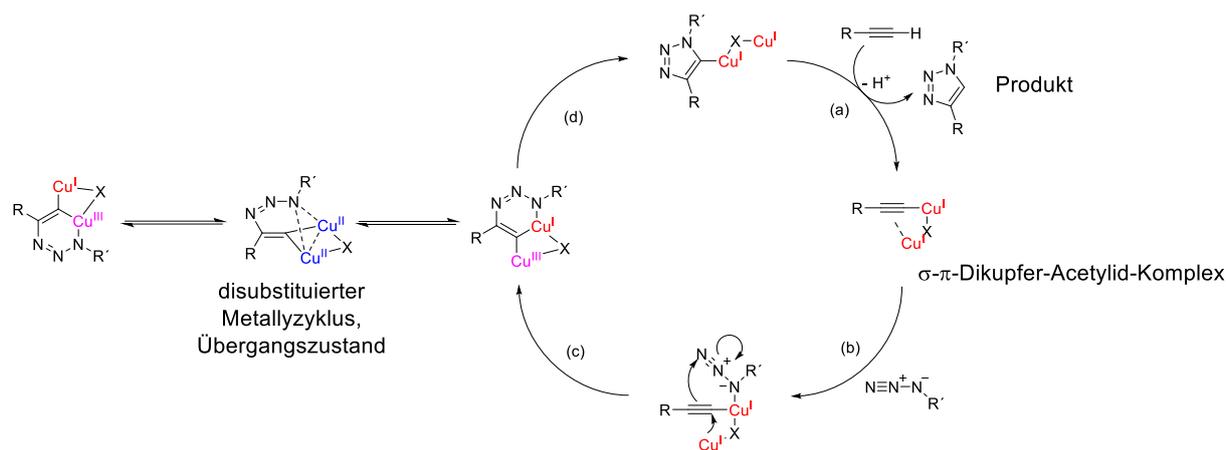


Abbildung 4: Vorschlag für den Mechanismus der CuAAC (adaptiert aus Literatur^[68]).

Der Mechanismus ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. 2007 stellten *Rodionov et al.* einen potenziellen Mechanismus vor, bei dem ein einfach positiv geladenes Cu^I-Ion kovalent in einen Übergangszustand eingebaut wird und durch seine elektronenziehenden Eigenschaften den nukleophilen Angriff des Azids begünstigt.^[69] Allerdings wurde dieser Mechanismus 2016 von *Zhu et al.* unter Vorschlag einer Alternative (Abbildung 4) revidiert. Dabei nähert sich zunächst ein Komplex aus chelatisierten Cu^I-Ionen der Alkynguppe an. Anschließend erfolgt eine σ -Hinbindung aus dem s-Orbital eines Kupferions unter Abspaltung eines Protons an das Alkin, während das Alkin über die Dreifachbindungen wiederum eine π -Rückbindung zu dem anderen Cu^I-Ion aufbaut (b). Nun erfolgt ein nukleophiler Angriff der Azidogruppe an das lewissaure Kupferion, welches zuvor das Proton substituiert hatte, während das π -gebundene Kupferion einen nukleophilen Angriff auf das C1-Kohlenstoff des Alkins ausübt und somit wiederum einen nukleophilen Angriff des C2-Kohlenstoffs aus dem Alkin auf das terminale Stickstoff der Azidogruppe katalysiert (c). Dabei wird das zuvor π -gebundene Kupferion zu einem Cu^{III}-Ion oxidiert. Der dabei entstehende Sechsring weist eine höhere Ringspannung auf, als der disubstituierte Metallzyklus, der als Übergangszustand der zwei enantiomeren Sechsringe (links in Abbildung 4) fungiert. Daher ist es über diesen Übergangszustand möglich, dass der Ring sich bei einer Konformationsänderung aufspaltet und unter Reduktion des Cu^{III}- zu einem Cu^I-Ion ein Cu^I-Triazolid gebildet wird (d), welches wiederum durch Deprotonierung zum einen den Reaktionskreislauf von Neuem startet und zum anderen das saubere 1,4-substituierte Produkt liefert (a).^[68]

Um die Effizienz der CuAAC noch weiter zu steigern ist der Einsatz von chelatisierenden Liganden wie Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)

denkbar. Dabei wird eine Deaktivierung der Cu^I-Ionen durch Komplexbildung unterbunden, was die Lebensdauer der katalysierenden Spezies erhöht. Dazu werden die Lewis-Säure-Eigenschaften des Kupferions erhöht, indem der Ligand durch seine Elektronegativität weitere Elektronendichte aus dem Kupferkern hinauszieht.^[70]

Im Gegensatz zum stereoselektiven 1,5-Produkt, welches über eine Ruthenium-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (RuAAC) hergestellt werden kann,^[71] handelt es sich bei dem 1,4-substituierten Produkt um die favorisierte Variante, gerade in Bezug auf die Funktionalisierung von Nanopartikeln. Ein 1,5-substituiertes Produkt würde aus sterischen Gründen nach innen auf die Oberfläche des Nanopartikels zurückfallen und entsprechend schlechter geklickt werden oder sogar die Partikel destabilisieren.

3. Methoden

3.1. Kernspinresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance*, NMR) zählt zu den absorptionspektroskopischen Methoden im Bereich der Radiowellen. Damit die Atomkerne gemessen werden können, müssen sie ein magnetisches Moment aufweisen, also eine ungerade Anzahl an Protonen und Neutronen. In diesem Fall präzessionieren die Kerne bei einem äußeren angelegten Magnetfeld H_0 , d. h. sie orientieren ihren Kernspin an dem Vektor des eingestrahlten Magnetfelds und weisen somit eine isotrope Verteilung der Richtungsquantelung ihrer Kernspins auf. Die magnetische Quantenzahl m der Atomkerne besitzt gegenüber diesem äußeren Magnetfeld eine Richtungsquantelung. Das bedeutet, dass der Eigendrehimpuls P der Kerne, der von der magnetischen Quantenzahl abhängt, entweder parallel oder antiparallel zu diesem ausgerichtet wird (Abbildung 5 (A)+(B)). Durch diese sog. Zeeman-Aufspaltung der Kernniveaus ist Anregung durch Radiowellen möglich. Zusammen mit der Kernspinquantenzahl l und dem Planck'schen Wirkungsquantum h kann der Eigendrehimpuls P der Kerne über Gleichung 4 berechnet werden.

$$P = \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{l \cdot (l + 1)} = \hbar m \quad (4)$$

Die Präzession, also eine gleichförmige Ausrichtung der Atomkerne, ist wichtig, um eine einheitliche Resonanzfrequenz zu erhalten. Antiparallel zum Magnetfeld ausgerichtete Atomkerne liegen energetisch tiefer als die parallel ausgerichteten. Diese Kerne werden durch die Radiowellen angeregt, wodurch ihr Kernspin verändert und der Eigendrehimpuls auch parallel ausgerichtet wird (Abbildung 5 (A)). Ohne äußeres Magnetfeld würden Kerne aus jeder möglichen räumlichen Orientierung angeregt werden, sodass keine eindeutige Resonanzfrequenz messbar wäre. Bei Relaxation vom angeregten (parallelen) Zustand zurück zum Grundzustand emittieren die Kerne elektromagnetische Strahlung, die in Form einer Resonanzfrequenz gemessen werden kann.^[72]

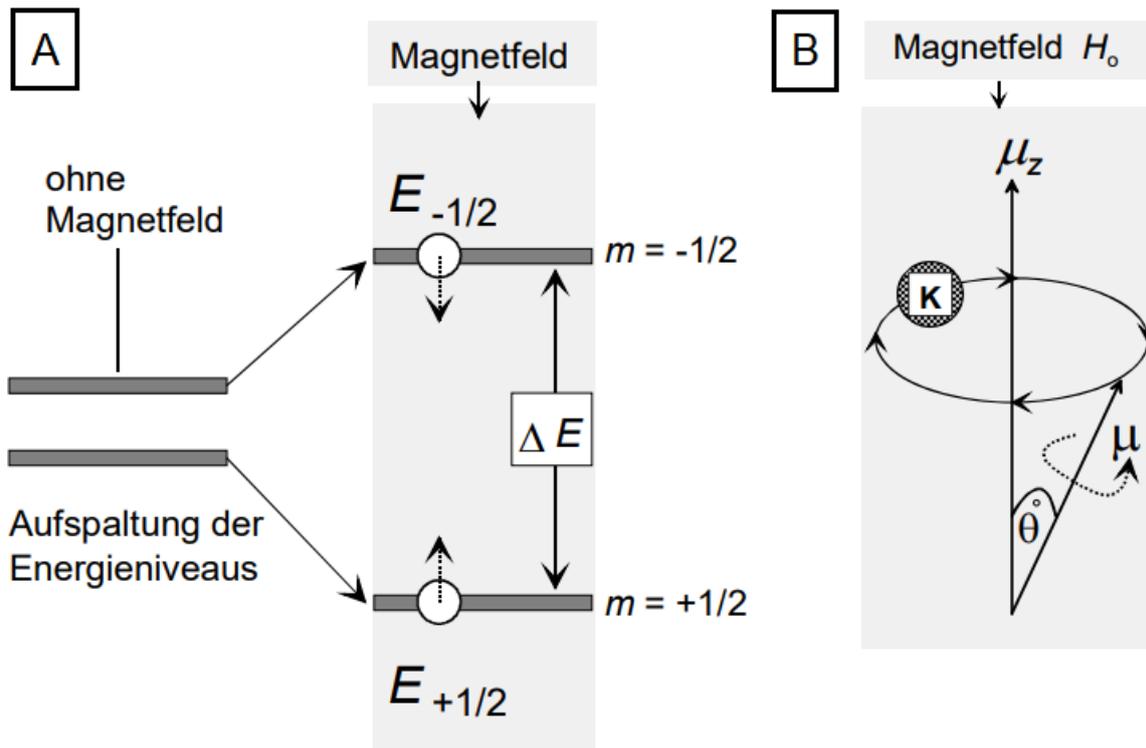


Abbildung 5: (A) Schematische Darstellung einer Zeeman-Aufspaltung des Eigendrehimpulses eines Atomkerns im homogenen Magnetfeld. (B) Rotation eines Atomkerns um den Winkel θ und dessen Präzession.^[72]

Die zur Anregung des Kernspins benötigte Energiedifferenz ΔE kann mithilfe des gyromagnetischen Verhältnisses γ bestimmt werden (Gleichung 5). Die dafür benötigte eingestrahlte Frequenz heißt Larmorfrequenz ν . Das gyromagnetische Verhältnis beschreibt im Grunde die Empfindlichkeit der untersuchten Kerne, indem es über den Radialwert des Präzessionswinkels eine kernabhängige und somit stoffspezifische Proportionalitätskonstante angibt. Kerne mit einem hohen gyromagnetischen Verhältnis wie ^1H (26.74 rad/(Ts)) reagieren somit stärker als Kerne mit einem niedrigeren Wert wie z. B. ^{13}C (6.73 rad/(Ts)). In Anbetracht der natürlichen Häufigkeit dieser beiden Isotope von 99.9% für ^1H und nur 1.1% für ^{13}C kann also festgestellt werden, dass ^1H -Kerne im NMR-Spektrum bis zu 360-mal stärkere Signale generieren.^[72,73]

$$\Delta E = E_{-1/2} - E_{+1/2} = h\nu = \gamma\hbar H_0 \quad (5)$$

Die untersuchte Probe beinhaltet jedoch nicht nur die Atomkerne, sondern auch zahlreiche Elektronen. Elektronen als bewegte elektrische Ladungsträger sind in der Lage, durch ein eigenes induziertes Magnetfeld das äußere Magnetfeld etwas

abzuschirmen. Durch diese effektive Magnetfeldstärke H_{eff} , die die Kerne wirklich erfahren, reagieren nicht alle gleichen Kerne genau gleich. Das bedeutet, dass Protonen von Ethanol eine andere Larmorfrequenz aufweisen als z. B. von Cystein. NMR-Spektroskopie bildet diese relative Verschiebung der Larmorfrequenz in ppm zum allgemeinen Standard Tetramethylsilan (TMS) ab. Bei Tetramethylsilan als allgemeiner Standard sind alle Protonen sowohl chemisch als auch magnetisch äquivalent, daher bilden sie ein großes Singulett am definierten Nullpunkt des Spektrums.

$$H_{eff} = H_0 - \sigma H_0 = (1 - \sigma)H_0 \quad (6)$$

Die effektive Magnetfeldstärke wird durch die Abschirmkonstante σ beeinflusst. Dabei gilt, dass die Kerne stärker abgeschirmt werden, wenn sie von einer hohen Elektronendichte umgeben sind, die ein entsprechend starkes Magnetfeld induzieren können. Funktionelle Gruppe können diese Abschirmung jedoch stark beeinflussen. Ketone ziehen durch ihren stark negativen mesomeren Effekt (-M-Effekt) eine hohe Dichte an Elektronen aus benachbarten Kernen heraus, sodass die Kerne in direkter Nachbarschaft dem äußeren Magnetfeld gegenüber entschirmt vorliegen und eine entsprechend stärkere Resonanz zeigen, also eine geringere Larmorfrequenz aufweisen und um einen Betrag δ vom definierten Nullpunkt verschoben sind.^[72]

$$\delta = 10^6 \cdot \frac{\nu_{Probe} - \nu_{Standard}}{\nu_{Standard}} \quad (7)$$

Die NMR-Spektroskopie zeichnet sich zudem dadurch aus, dass aufgrund von Spin-Spin-Kopplungen benachbarter Protonen Strukturaussagen über das vermessene Molekül möglich sind. Durch diese Kopplungen der Kerne untereinander spalten die Absorptionsniveaus der Kerne weiter so auf, dass eine Feinaufspaltung erkennbar wird. Die Spin-Spin-Kopplungen können dabei sowohl hetero- als auch homonuklear erfolgen, wobei meist durch speziell eingestrahlte Frequenzen eine heteronukleare Kopplung unterdrückt wird. Für die Protonenspektroskopie ist dies jedoch nicht notwendig, da durch benachbarte ^{13}C -Kerne aufgrund ihrer geringen natürlichen Häufigkeit und schlechteren Empfindlichkeit nur sehr schwache Kopplungssignale mit den Protonen zu erkennen sind. Diese zeichnen sich im Spektrum meist durch sog. Satelliten der eigentlichen ^1H -Signale aus und sind vernachlässigbar klein. Bei NMR-spektroskopischen Experimenten von beispielsweise ^{19}F - oder ^{31}P -Kernen (natürliche Häufigkeit 100%) sind jedoch sehr wohl bestimmte Entkopplungsmechanismen

notwendig. Spin-Spin-Kopplungen unter Wasserstoffkernen sind über mehrere Bindungen hinweg möglich und werden in geminale 2J - oder vicinale 3J -Kopplungen unterteilt. Die intramolekularen Kopplungen besitzen eine konstante Frequenz, die über den Frequenzabstand der Signale des Multipletts berechnet werden kann. In einem 1H -NMR-Spektrum wird durch Kopplungen von n benachbarten Kernen eine Feinaufspaltung von $n + 1$ mit binominalverteilten Intensitäten erreicht. Für die Aufspaltung von Signalen über geminale 2J -Kopplungen von zwei Protonen an demselben Kohlenstoffatom ist relevant, ob die Kerne magnetisch und chemisch äquivalent vorliegen. Eine chemische Äquivalenz ist gegeben, wenn die Kerne in jeglicher chemischen Reaktion genau gleich reagieren würden. Eine magnetische Äquivalenz ist gegeben, wenn die Kerne genau dieselbe chemische Umgebung erfahren. Dabei ist wichtig zu beachten, ob die untersuchten Protonen in Nachbarschaft zu einem stereogenen Zentrum im Molekül liegen (diastereomere Protonen). Durch die unterschiedlichen Reste des Stereozentrums erfahren die Kerne dann unterschiedliche starke elektronische Abschirmung und liegen daher nicht mehr magnetisch äquivalent vor, sodass auch hier eine Feinaufspaltung erkennbar wird.^[74]

3.1.1. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie zeichnet sich dadurch aus, dass anstelle einer eindimensionalen Frequenzachse zwei homo- oder heteronukleare Spektren miteinander kombiniert werden. Dabei wird je nach Messmethode ein unterschiedliches Korrelationssignal in der durch die Frequenzachsen aufgespannten Ebene abgebildet. Auf diese Weise sind nicht nur Kopplungen über zwei bis drei kovalente Bindungen zu erkennen, sondern teilweise Kopplungen über das gesamte Molekül hinweg. Das ist vor allem dann sehr hilfreich, wenn im eindimensionalen Spektrum verschiedene Signale überlagern und dadurch nicht mehr direkt voneinander unterscheidbar sind.

Bei einem 1H - 1H -COSY-NMR-Spektrum (*engl.: correlated spectroscopy*) werden zwei eindimensionale 1H -Spektren miteinander korreliert. Dabei werden die Spin-Spin-Kopplungen über das gesamte Molekül abgebildet. Neben einer entstehenden Diagonalen auf der Ebene, die lediglich Korrelationssignale derselben Kerne miteinander widerspiegelt, sind teilweise noch Signale abseits erkennbar, die für eine Kopplung über mehrere Bindungen hinweg stehen.^[75]

Bei einem ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum (*engl.: heteronuclear single quantum correlation*) wird eine Korrelationsebene eines ^1H - und eines ^{13}C -Spektrums dargestellt. Dabei werden nur Korrelationssignale abgebildet, die über eine direkte Bindung, also eine ^1J -Kopplung miteinander korrelieren. Auf diese Weise ist es möglich, Aussagen über die gesamte Struktur der untersuchten Probe zu treffen. Es ist möglich, dass mehrere Protonen eine sehr ähnliche chemische Verschiebung aufweisen und dadurch teilweise im eindimensionalen Spektrum stark überlagern. Über das ^1H - ^{13}C -HSQC kann trotzdem weiterhin differenziert werden, dass in dem entsprechenden Signal mehrere verschieden positionierte Protonen liegen. Dazu werden Kopplungen des ^1H -Signals mit mehreren ^{13}C -Signalen oder umgekehrt sichtbar dargestellt.^[75]

3.1.2. NMR-Spektroskopie am Nanopartikel

NMR-Spektroskopie an der Ligandenhülle von Nanopartikeln kann sich deutlich von der reiner Liganden unterscheiden. Charakteristisch für ein Spektrum mit Nanopartikeln sind eine mitunter starke Peakverbreiterung bis hin zum teilweisen Verschwinden einiger Signale, sowie eine auftretende Tieffeldverschiebung der Signale in Abhängigkeit vom Abstand zur Partikeloberfläche.^[22,76,77] Um dies zu erklären, müssen zunächst verschiedene Relaxationsprozesse der angeregten Kernspin definiert werden. Nach Einstrahlen des Radiowellenpulses gibt es zwei verschiedene Mechanismen der Energieabgabe. Bei einer longitudinalen Spin-Gitter-Relaxation wird die aufgenommene Energie an die Umgebung abgegeben und der Spin relaxiert parallel zum Magnetfeld zurück in den Grundzustand (T_1 -Relaxationszeit). Bei einer transversalen Spin-Spin-Relaxation relaxiert der angeregte Atomkern, indem er seine Energie an einen anderen Atomkern im Grundzustand überträgt, wodurch dieser wiederum angeregt wird (T_2 -Relaxationszeit). Durch diesen direkten Energieübertrag ist die Zeit für die Kernspinrelaxation der angeregten Kerne deutlich verkürzt.^[73,74]

Diese verkürzte T_2 -Relaxationszeit ist ausschlaggebend für die Breite des resultierenden Signals. Nach Gleichung 8 steht die Spin-Spin-Relaxationszeit reziprok proportional gegenüber der Halbwertsbreite $FWHM$ der Signale.^[76]

$$FWHM = \frac{1}{\pi T_2} \quad (8)$$

Als Folge dieser Spin-Spin-Relaxation zerfällt die Magnetisierung der Probe deutlich schneller, als wenn die angeregten Kerne durch Emission von Radiowellen zurück in den Grundzustand gelangen würden. Dieser zeitabhängige Zerfall der Magnetisierung (*engl.: free induction decay*, FID) wird im letzten Schritt über eine Fourier-Transformation in eine Funktion der relativen Resonanzfrequenz umgewandelt und resultiert so in der bekannten Form eines NMR-Spektrums.

3.1.3. Diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie

Die diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie (*engl.: diffusion ordered spectroscopy*, DOSY) ermöglicht über die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der NMR-aktiven Substanz in der Probe einen Einblick in den hydrodynamischen Durchmesser des diffundierenden Teilchens. Bei Proben, die Nanopartikel enthalten, ist es dadurch zudem möglich, gebundene von ungebundenen Liganden zu unterscheiden. Ungebundene Liganden weisen aufgrund ihrer geringeren Größe eine im Vergleich erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit auf. Für kugelförmige Teilchen kann über die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 9) der translationale Diffusionskoeffizient D zusammen mit der Boltzmann-Konstante k_B , der absoluten Temperatur T und der dynamischen Viskosität des verwendeten Lösemittelgemischs bei 25 °C η_d in den hydrodynamischen Durchmesser d_H umgerechnet werden.

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta_d D} \quad (9)$$

Um eine Diffusion der NMR-aktiven Kerne zu detektieren, werden diese zunächst gleichphasig entlang des eingestrahlten Magnetfeldes ausgerichtet. Dazu werden verschiedene hintereinandergeschaltete Radioimpulse verwendet. Experimente mit diesen unterschiedlichen Pulsen werden auch als *Pulsed Gradient Spin Echo* (PGSE) bezeichnet.^[78] Dabei wird zunächst ein Radiopuls eingestrahlt, der zu 90° orthogonal zur magnetischen Ausrichtung der Kerne steht, wodurch die Kerne aus ihrer Richtung ausgelenkt werden. Nach Auslenkung der Kerne wird eine Diffusionszeit Δ erwartet, in der die Kerne durch einen zur z-Achse linear angelegten, gepulsten Magnetfeldgradienten durch ihre Relaxation entlang des äußeren Magnetfeldes genau lokalisiert werden. Das ist möglich, da das graduelle Magnetfeld mit einer Pulslänge δ und einer an jedem Punkt unterschiedlichen Gradientenstärke g wirkt, was zu einer unterschiedlichen Magnetisierung der Probe entlang der z-Achse führt. Nach einer

Korrelationszeit τ wird dann ein dritter 90° Radiopuls auf die Probe geleitet, der die lokal dephasierten Kerne wieder ausrichtet. Da die Kerne in dieser Zeit allerdings durch das Probenvolumen diffundieren konnten, ist die durch den graduellen Impuls ausgelenkte Magnetisierung örtlich nicht mehr so aufgeteilt, dass ein erneuter gradueller Puls für eine vollständige Phasenumkehr sorgen könnte (Abbildung 6).

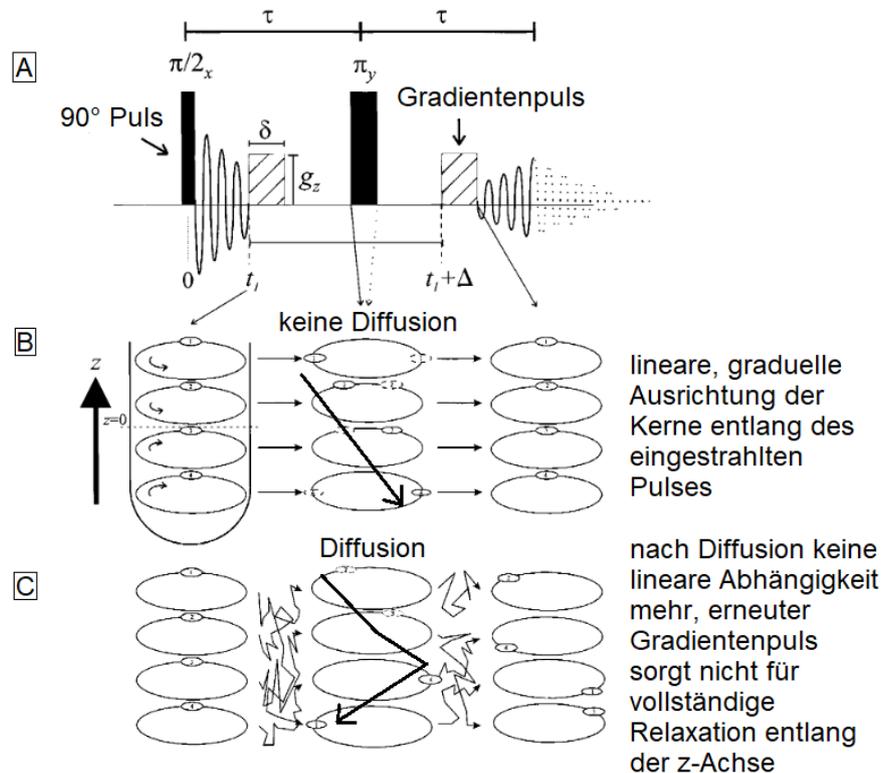


Abbildung 6: (A) Schematische Darstellung der PGSE-Sequenz. Zuerst wird ein 90° Puls eingestrahlt, der die Kerne ausrichtet, anschließend folgt der graduelle Puls zur Lokalisierung der Kerne. Nach dem zweiten graduellen Puls folgt dann das Auslesen der Signalintensität. (B) Die Kerne sind graduell entlang der z-Achse ausgerichtet. (C) Nach einer Diffusion über das Probenvolumen liegt die magnetische Ausrichtung der Kerne nicht mehr graduell vor, sondern statistisch verteilt, wodurch das entstehende Signal abgeschwächt wird (adaptiert aus Literatur^[79]).

Dadurch entsteht entlang der z-Achse eine von der Diffusionsgeschwindigkeit abhängige Dispersion der magnetischen Ausrichtung der Kerne, sodass je nachdem, wie viel die Kerne diffundieren konnten, eine mehr oder weniger starke Signaldämpfung auftritt (Abbildung 7). Der Grad dieser Signaldämpfung ist dabei abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit und somit für kleinere Systeme stärker als für größere.^[79,80,81]

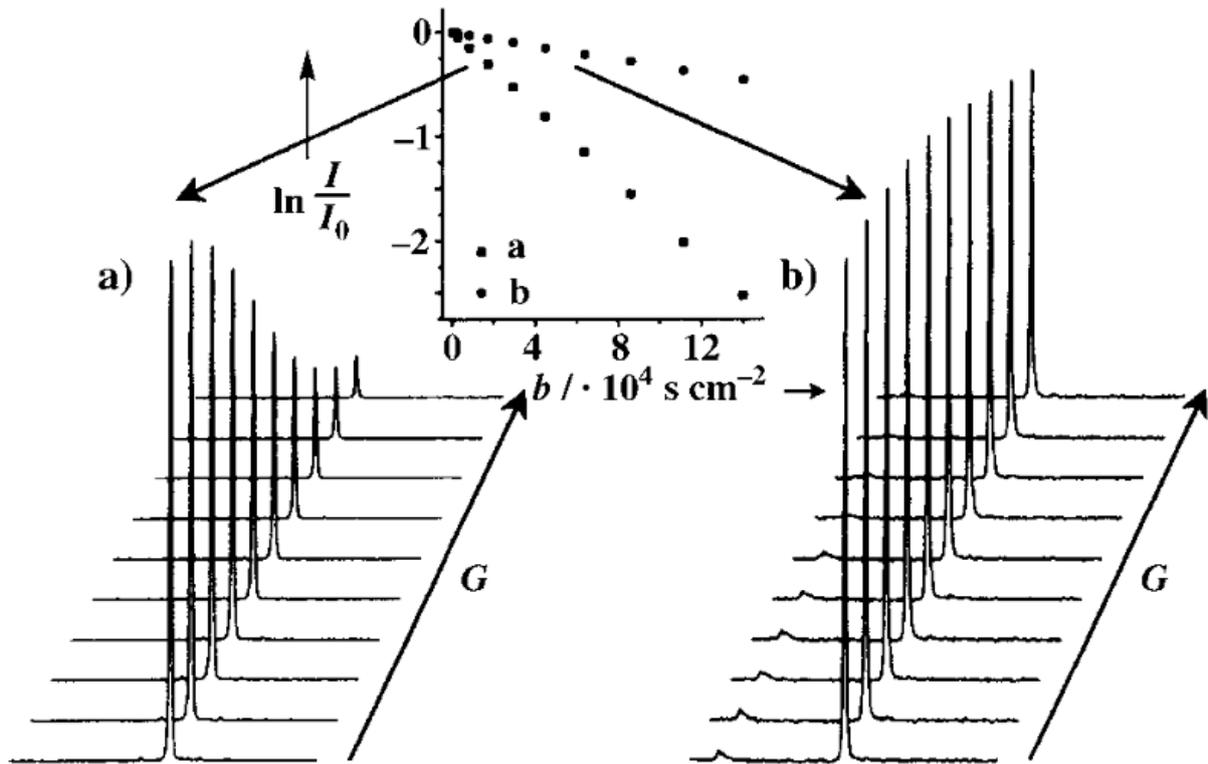


Abbildung 7: Signaldämpfung als Funktion des Magnetfeldgradienten mit der Amplitude G . Die Dämpfung ist dabei aufgrund der höheren Diffusionsgeschwindigkeit für kleine Systeme (A) signifikanter als für größere Systeme (B).^[81]

1965 gelang es Stejskal und Tanner unter der Voraussetzung einer konstanten Korrelationszeit τ eine linearisierte Gleichung für den Abfall der Signalintensität in Abhängigkeit zum translationalen Diffusionskoeffizienten D zu beschreiben. Dazu ist das logarithmische Verhältnis der eingestrahlten Intensität I zur transmittierten Intensität I_0 direkt proportional zum gyromagnetischen Verhältnis der Kerne γ , der Impulslänge δ , der Zeit der Diffusion Δ und dem Magnetfeldgradienten G . Diese linearisierte Form wird auch Stejskal-Tanner-Plot (Gleichung 10) genannt.^[82]

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D G^2 \quad (10)$$

Anhand dieser Gleichung ist bei einer linearen Auftragung vom Logarithmus der Intensitäten gegen $\gamma^2 \delta^2 G^2 (\Delta - \delta/3)$ der Diffusionskoeffizient als Betrag der Steigung abzulesen.

^1H - und ^{13}C - sowie COSY- und HSQC-Spektren wurden an Bruker Avance III Geräten mit einer Frequenz von jeweils 400 MHz oder 600 MHz vermessen. Dazu wurden die Proben aus in Wasser dispergierbaren Partikelsystemen zunächst auf ein Volumen von 540 μL verdünnt und anschließend um 60 μL D_2O ergänzt. Andere Stoffe und

Liganden wurden in ihrer Reinform in 600 μL eines entsprechenden deuterierten Lösemittels aufgenommen.

Quantitative NMR-Spektroskopie an Partikelsystemen wurde durchgeführt, nachdem die Partikel zunächst gefriertrocknet wurden, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Wasserunterdrückung auszuschließen. Danach wurden die Nanopartikel in insgesamt 540 μL Wasser redispergiert und anschließend um 60 μL einer 20 mM Maleinsäure-Lösung in 100% D_2O ergänzt.

DOSY-Experimente wurden von Dr. Christine Beuck an einem Bruker Avance III Gerät mit einer Frequenz von 700 MHz vermessen. Dazu wurden die Proben ebenfalls in 10% D_2O in Wasser dispergiert.

3.2. Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie

Die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (engl.: *high-resolution transmission electron microscopy*, HRTEM) beschreibt ein bildgebendes Verfahren, bei dem eine dünne Probe mit einem gebündelten Elektronenstrahl bestrahlt wird. Elektronenmikroskope kommen zum Einsatz, wenn sehr kleine Strukturen (ca. 1 nm - 100 nm) untersucht werden sollen, die mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop aufgrund des Abbé-Limits nicht mehr aufgelöst werden können. Das Abbe-Limit beschreibt dabei die maximale Auflösung, also die minimale Distanz d , die zwei zu unterscheidende Punkte voneinander haben müssen, um auch als einzelne Strukturen erkannt zu werden. Diese Auflösung ist dabei abhängig von der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes (400 nm - 800 nm) sowie der numerischen Apertur, die sich aus dem Aperturwinkel θ und dem Brechungsindex n des durchstrahlten Mediums zusammensetzt [83].

$$d = \frac{\lambda}{n \sin \theta} \quad (11)$$

Um die Auflösung des bildgebenden Verfahrens zu erhöhen, muss das Abbé-Limit verringert werden. Dazu ist es ratsam, die Wellenlänge zu verringern.

Der Welle-Teilchen-Dualismus beschreibt für alle Objekte mit einer Ruhemasse (z. B. Elektronen) eine wellenförmige Fortbewegung, die ansonsten nur für Objekte ohne Ruhemasse (z. B. Photonen) gilt. Die De-Broglie-Wellenlänge λ_{DB} eines solchen

Teilchens setzt sich aus dem Planck'schen Wirkungsquantum h sowie dem Impuls p des entsprechenden Teilchens zusammen.

$$\lambda_{DB} = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{2m_e E_{Kin}}} \quad (12)$$

Im speziellen Fall des Elektrons ist die Wellenlänge also abhängig von der konstanten Ruhemasse m_e des Elektrons, sowie dessen kinetischer Energie E_{Kin} , die über die Beschleunigungsspannung einstellbar ist. Bei einer angelegten Beschleunigungsspannung von 100 kV beträgt die Wellenlänge der Elektronen also rund 3.7 pm.^[84]

Treffen die Elektronen auf die Probe, können elastische und inelastische Wechselwirkungen mit dieser auftreten. Inelastische Wechselwirkungen beruhen auf Elektron-Elektron-Interaktionen, beschreiben also die Interaktion von eingestrahnten Elektronen mit denen aus dem Probenmaterial. Elastische Wechselwirkungen werden durch starke Wechselwirkungen der eingestrahnten Elektronen mit dem Atomkern definiert. Bei Transmission durch die Probe wird ein Teil der eingestrahnten Primärelektronen am Probenmaterial gebeugt. Dadurch wird der zuvor gleichphasige Strahl aus Primärelektronen in transmittierte Elektronen ohne und welche mit Einfluss des Probenmaterials aufgespalten. Die beiden Strahlen können nach Transmission konstruktiv oder destruktiv miteinander wechselwirken, bis sie auf einen Fluoreszenzschirm fallen, dessen Bild mit einer CCD-Kamera ausgelesen wird. Das final ausgelesene Fluoreszenzmuster liefert aufgrund der geringen Wellenlänge der Elektronen eine atomare Auflösung und kann durch verschiedene Bildbearbeitungsverfahren noch in die Richtung verfeinert werden, dass selbst die Kristallstruktur der untersuchten Probe nach einer Fast-Fourier-Transformation (FFT) abgebildet werden kann.^[84,85]

HRTEM-Aufnahmen wurden von *Dr. Kateryna Loza* an einem FEI Titan der Firma Thermo Fischer durchgeführt. Die Messungen fanden im Forschungszentrum Jülich statt, nachdem die dispergierten Proben auf dünne Kupferträger aufgetragen wurden. Messungen am HRTEM erfolgten nach einer ausführlichen Charakterisierung der Proben über andere analytische Verfahren, damit ein ungefährender Größenbereich bereits im Vorfeld als bekannt vorgegeben werden konnte.

3.3. Analytische Scheibenzentrifugation

Die analytische Scheibenzentrifugation (engl.: *differential centrifugal sedimentation*, DCS) dient zur Größenbestimmung von in einer Probe enthaltenen Teilchen. Dabei wird der hydrodynamische Durchmesser D_H der sedimentierenden Partikel über die benötigte Sedimentationszeit t in einer rotierenden Scheibe über das Stokes-Gesetz (Gleichung 9) bestimmt. Dazu werden die Viskosität des Mediums η , die Dichte der Partikel ρ_{NP} , die mittlere Dichte des Sedimentationsmediums ρ_M , die Winkelgeschwindigkeit der rotierenden Scheibe ω sowie die Radien des Einspritzpunktes der Probe R_0 und des detektierenden Lasers R_L benötigt.^[86]

$$D_H = \sqrt{\frac{18\eta \cdot \ln\left(\frac{R_L}{R_0}\right)}{(\rho_{NP} - \rho_M)\omega^2 t}} \quad (13)$$

Die Größe der Partikel resultiert direkt aus der gegebenen Dichte der Partikel, sowie deren Sedimentationszeit (Gleichung 13). Allerdings ist die Dichte der Partikel nur sehr schwierig zu bestimmen. In der Regel wird daher die Dichte des reinen Partikelkerns angegeben, die allerdings immer größer ist, als die tatsächlich vorhandene und für die Sedimentation relevante Dichte. Die organische Ligandenhülle sowie die Hydrathülle der Teilchen werden dabei nicht berücksichtigt, weshalb der errechnete hydrodynamische Durchmesser kleiner ausfällt, als er tatsächlich ist.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass Partikel in einer kolloidalen Suspension durch Zentrifugation mit besonders hoher Umdrehungszahl schneller sedimentieren, als dass sie durch die Brown'sche Molekularbewegung wieder redispergieren. Dazu wird in die rotierende Scheibe ein Sedimentationsmedium (Saccharose-Lösung) unterschiedlicher Konzentrationen injiziert, sodass ein Dichtegradient entsteht, der von der Mitte der Scheibe zum Rand zunimmt. Die verwendeten Zuckerlösungen werden zudem mit einem schwerflüchtigen, nicht wasserlöslichen Stoff (meist n-Dodecan) überdeckt, damit auch über einen längeren Messzeitraum keine Änderung der Zuckerkonzentration durch Verdampfung von Wasser stattfinden kann. Auf diese Weise können über längere Messungen auch kolloidale Systeme mit Partikelgrößen < 2 nm aufgelöst werden. Nach einer Kalibration mit einem geeigneten Standard (z. B. Polyvinylchlorid (PVC), 483 nm), dessen Größe bekannt ist, kann die Messung der Probe erfolgen.^[86,87]

Wenn die Partikel in die Mitte der Scheibe injiziert werden, werden sie daraufhin durch die Zentrifugalkraft der Rotation der Scheibe nach außen hin beschleunigt. Durch die auf dem Sedimentationsweg graduell steigende Konzentration des Zuckers im Dispersionsmittel werden die Partikel kontinuierlich abgebremst. Der Dichtegradient führt somit zu einer stabileren Sedimentation durch Reduktion der Konvektionsströmung. Andernfalls würden größere Partikel schneller sedimentieren und durch diese Strömungsbewegung kleinere Partikel mitreißen. Dieses *Streaming* würde zu einer schlechteren Auftrennung zwischen großen und kleinen Partikeln führen.

Sobald die Partikel durch den Laserstrahl am äußeren Rand der Scheibe sedimentieren, erfasst der Detektor eine geringere Transmission. Die dafür benötigte Sedimentationszeit der kolloidalen Suspension wird anschließend in einen hydrodynamischen Durchmesser umgerechnet.^[87]

DCS-Messungen der Nanopartikel erfolgten an einer DC24000 der Firma CPS. Dazu wurde zunächst eine Messmethode erstellt, die die für ultrakleine Goldpartikel nötigen Parameter (Tabelle 1) beinhaltet. Das Medium in der Scheibe wurde aus zwei verschiedenen konzentrierten Saccharose-Lösungen zusammengesetzt. Dabei wurden immer 1.6 mL Lösung mit einem Gradienten von 0.2 mL pro Injektion so injiziert, dass die Lösung von innen nach außen an Dichte zunahm. Der eingestellte Dichtegradient wurde anschließend mit 0.5 mL n-Dodecan überdeckt. Der Gradient inklusive n-Dodecan wurde für 10 min bei 24000 rpm ruhen gelassen, bis der nächste Schritt der Messung mit der Hintergrundmessung des Mediums gestartet wurde. Anschließend wurden 0.1 mL der PVC-Standardsuspension injiziert und vollständig sedimentieren lassen (ca. 5 min). Zuletzt konnten dann 0.1 mL der Probensuspension injiziert und vermessen werden (ca. 6-8 h).

Tabelle 1: Parameter für DCS-Messungen von ultrakleinen Nanopartikeln.

Parameter	Betrag	Einheit
Parameter für die Probe		
Max. Durchmesser	0.1	µm
Min. Durchmesser	0.001	µm
Dichte	19.32	g/mol
Brechungsindex	1.47	
Absorption	1.962	K
Morphologischer Faktor (Kugel)	1	
Parameter für den Kalibrationsstandard		
x-Position des Maximums	0.483	µm
Halbwertsbreite	0.1	µm
Dichte	1.385	g/mL
Parameter für das Medium		
Dichte	1.045	g/mL
Brechungsindex	1.344	
Viskosität	1.2	cps

3.4. UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektroskopie (UV-Vis) dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Molekülen und Teilchen, die in einem Wellenlängenbereich von 200 - 400 nm (UV) oder 400 - 800 nm (Vis) elektromagnetische Strahlung absorbieren. Diese Absorption von Strahlung wird dadurch ermöglicht, dass die Elektronen eines Moleküls in unterschiedlichen angeregten Zuständen vorliegen können. Die Energieniveaus von Teilchen in einem molekularen Größenbereich liegen in der Regel gequantelt vor. Die Elektronen benötigen also eine gewisse Energie, um von dem Grundzustand in einen angeregten Zustand überzugehen. Dabei ist zu beachten, dass die unterschiedlichen elektronischen Zustände in einem Molekül von vibronischen und rotatorischen Zuständen überlagert werden. In Lösung sind die Rotationszustände in der Regel durch Adsorption von Lösemittelmolekülen gehemmt, weshalb hier nur die Vibrationszustände beachtet werden. Jeder elektronische Zustand setzt sich also aus vielen energetisch unterschiedlichen Vibrationszuständen zusammen (Molekülenergie), Daher werden in der UV-Vis-Spektroskopie entgegen der

Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) breite Banden anstatt schmaler Linien verzeichnet. Über die Einstein-Bohr-Beziehung wird ersichtlich, dass die Energie E elektromagnetischer Strahlung direkt proportional zu ihrer Frequenz ϑ bzw. antiproportional zur Wellenlänge λ ist. Über das Planck'sche Wirkungsquantum h und die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum c kann dieser Zusammenhang verdeutlicht werden.

$$E = h \cdot \vartheta = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (14)$$

In einem UV-Vis-Spektrum wird die Extinktion A_λ gegen die absorbierten Wellenlängen aufgetragen. Die Extinktion setzt sich dabei aus der eingestrahnten I_0 und transmittierten Intensität I bei bestimmten Wellenlängen zusammen.

$$A_\lambda = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)_\lambda \quad (15)$$

Die Intensität der transmittierten Strahlung ist zudem abhängig von der Konzentration c des absorbierenden Stoffes sowie der Strecke d , die das Licht durch diesen Stoff zurücklegen muss. Dazu kommt ein stoffabhängiger molekularer Extinktionskoeffizient ε_λ , der nur bei stark verdünnten Lösungen näherungsweise unabhängig von der Stoffkonzentration ist. Daher werden quantitative Aussagen über die Proben nur bei ideal verdünnten Lösungen möglich. Im Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 16) werden die Faktoren, von denen die Transmissionsintensität des Lichtes abhängt, zusammengefasst.

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (16)$$

Die UV-Vis-Spektroskopie zählt als Relativmethode. Es wird in der Regel zwischen zwei verschiedenen Bauweisen unterschieden: der Einstrahl- und Zweistrahlenspektrometer. Bei einem Einstrahl-UV-Vis-Spektrometer wird vor Vermessung der eigentlichen Probe ein Hintergrundspektrum mit derselben Küvette und entsprechendem Lösemittel aufgenommen, welches hinterher von den Spektren der Probensubstanz subtrahiert wird. Bei einem Zweistrahl-Spektrometer ist dieser Standard für Hintergrundmessungen fest in einem zweiten Strahlengang verbaut, der durch halbdurchlässige Spiegel ermöglicht wird. Durch diese Hintergrundmessungen werden mögliche unerwünschte Effekte wie z. B. Reflexion der Strahlung an der

Oberfläche der Küvette, sowie mögliche Absorptionen des Lösemittels aus den Spektren herausgerechnet.^[88]

Die Absorptionskurven im ultravioletten bis sichtbaren Wellenlängenbereich wurden an einem Cary Bio300 von Varian gemessen. Da es sich hier um ein Einstrahlspektrometer handelt, wurde dazu eine Quarzglasküvette mit einem Probenvolumen von 600 µL zunächst mit dem jeweiligen Löse- oder Dispersionsmittel gefüllt und eine Hintergrundmessung durchgeführt. Anschließend wurde die Küvette gut durchgespült und mit einer stark verdünnten Suspension oder Lösung der Probe gefüllt. Die Messung erfolgte anschließend in einem Wellenlängenbereich von 200 nm – 800 nm.

3.5. Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) dient ähnlich der UV-Vis-Spektroskopie ebenfalls zur qualitativen und quantitativen Bestimmung einer Probe, in diesem Fall allerdings bei einzelnen Atomen. Wie Moleküle auch, besitzen Atome energetisch unterschiedlich gelegene elektronische Niveaus. Das bedeutet, dass auch hier durch Absorption elektromagnetischer Strahlung eine Abschwächung des transmittierten Lichtes durch die Probe im Vergleich zum eingestrahlt Licht zu verzeichnen ist. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann daraus die Konzentration der Messsubstanz errechnet werden. Bei Atomen liegen die elektronischen Energieniveaus diskret vor, d. h. die Elektronen haben nur eine mögliche potenzielle Energie, die sie in einem Zustand annehmen können. Daher ist die Atomemission im Gegensatz zur UV-Vis-Spektroskopie nicht als breite Bande zu verzeichnen, sondern viel eher mit einem Strichcode vergleichbar, der aus einzelnen Linien bei bestimmten Wellenlängen zusammengesetzt ist.^[89]

Bei einer Flammen-AAS wird eine ionisierte Probe in eine reduzierende Flamme aus Acetylen und Lachgas (N_2O) eingespeist. Wenn Acetylen in der Flamme verbrennt, entstehen Kohlenstoffmonoxid und Kohlenstoffdioxid. Im plasmaförmigen Aggregatzustand sind die Elektronen aus diesen elektronenreichen Verbindungen nicht mehr an die Kerne der dazugehörigen Atome gebunden. Während Acetylen in der Flamme also oxidiert wird, werden währenddessen die Goldionen durch die freiwerdenden Elektronen reduziert.

Die nun in der Gasphase freiliegenden Atome werden mit einer zugehörigen elementspezifischen Wellenlänge bestrahlt. Die Hohlkathodenlampe besteht aus einer halbzyklindrischen Kathode mit dem zu untersuchenden Element und einer Wolfram/Nickel-Anode. Durch die Kathode wird erreicht, dass bei der erfolgenden Glimmentladung eine elementspezifische Strahlung freigesetzt wird. Die Intensität des auf die Probe treffenden Lichtes wird durch Absorption der Probenatome im Bereich der Resonanzlinien um einen Faktor geschwächt, der direkt proportional zur Konzentration der Atome ist. Das transmittierte Licht wird wellenlängenspezifisch mithilfe eines Monochromators detektiert und zeigt das entsprechende Transmissionsspektrum der Probe. Durch die direkte Korrelation der Absorbanz zur Probenkonzentration kann schließlich mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration errechnet werden.^[90]

AAS zur Bestimmung der Metallkonzentration in den Nanopartikelsuspensionen wurde von Robin Meya an einem Electron M-Series Spektrometer der Firma Thermo Fischer durchgeführt. Dazu wurden 10 μL der Nanopartikelsuspension entnommen und in 990 μL Königswasser aufgelöst. Die Lösung wurde danach mit Wasser auf 5 μL Probenvolumen aufgefüllt und an Herrn Meya übergeben. Nach Messung wurde die erhaltene Konzentration aus der abgegebenen Probe um den Verdünnungsfaktor (10 μL Probe zu 5 mL Gesamtvolumen, Verdünnungsfaktor: 500) hochgerechnet, sodass die Konzentration der Ursprungprobe erhalten wurde.

3.6. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie (FS) bedient sich der nach elektromagnetisch induzierter Anregung eines Moleküls spontan erfolgenden Emission eines Photons. Zunächst wird ein Elektron aus dem Grundzustand (S_0) durch Energieeintrag in den angeregten Singulettzustand (S_1) angehoben. Bei Molekülen gilt dabei zu beachten, dass die elektronischen Zustände nicht diskret sind, sondern in Lösung auch in unterschiedliche vibronische Zustände aufgeteilt werden. Je nach vibronischem Zustand zum Zeitpunkt der Anregung ist also eine leicht unterschiedliche Energie notwendig. Auch im angeregten S_1 -Zustand gilt die Unterteilung des elektronischen in mehrere vibronische Zustände, sodass auch der Zielpunkt des Elektrons variabel ist. Für die Relaxation zurück in den Grundzustand stehen anschließend mehrere Wege offen. Durch strahlungsfreie Prozesse relaxiert das Elektron zunächst in den untersten

vibronischen Zustand des S_1 -Zustandes, wobei Energie meist in Form von Wärme abgegeben wird. Von diesem Niveau aus kann es schnell (10^{-15} s) zurück in den Grundzustand relaxieren und dabei ein Photon abgeben, welches durch den Energieverlust der Relaxation in das unterste Schwingungsniveau des S_1 -Zustands leicht bathochrom verschoben im Vergleich zur Anregung vorliegt (Stokes-Shift). Diese einfache Form der Relaxation wird allgemein als Fluoreszenz bezeichnet. Die zweite Möglichkeit besteht in der langsamer (10^{-9} s) verlaufenden Phosphoreszenz, bei der das Elektron vor Relaxation in den S_0 -Zustand durch eine Umkehr seines Spins unter Energieverlust in den verbotenen Triplettzustand gelangt, von dem aus es dann später zurück in den S_0 relaxiert.^[91]

Fluoreszenzspektren wurden an einem Cary Eclipse Spektrometer der Firma Agilent Technologies gemessen. Die Probe wurde verdünnt in eine Fluoreszenzküvette (4 durchsichtige Seiten) aus Quarzglas gegeben und in den Strahlengang gestellt. Dann wurde das Anregungsspektrum der Probe aufgenommen, um die am besten geeignete Anregungswellenlänge für fluoreszente Aktivität zu bestimmen. Für ein Emissionsspektrum wurde dann die zuvor bestimmte Anregungswellenlänge eingestellt und die Probe damit bestrahlt. Die Fluoreszenz wurde anschließend in einem Winkel von 90° vermessen, um transmittierendes Licht auszuschließen.

3.7. Infrarotspektroskopie

Bei der Infrarotspektroskopie (IR) wird die Probe mit Wellenlänge im Infrarot-Bereich (2500 nm - 20000 nm, Wellenzahl: 4000 cm^{-1} - 500 cm^{-1}) bestrahlt. Der energetische Bereich von IR-Strahlung reicht nicht aus, um die Elektronen in Molekülen in höhere angeregte Zustände zu heben. Stattdessen werden durch Absorption dieser Strahlung Schwingungen und Rotationen im Molekül angeregt. Eine Voraussetzung für solche Interaktionen mit dem elektromagnetischen Charakter der Strahlung ist, dass das Molekül einen permanenten (z. B. H_2O) oder einen induzierbaren (z. B. CO_2) Dipolmoment besitzt. Bestimmte funktionelle Gruppe zeigen dabei charakteristische Schwingungen, die für diese Gruppen spezifisch sind und nicht durch den umliegenden Rest des Moleküls beeinflusst werden. Die induzierbaren Schwingungen lassen sich generell in zwei verschiedene Klasse aufteilen. Darunter fallen zum einen die Deformationsschwingungen δ , bei den der Bindungswinkel variabel verändert wird,

und zum anderen die Valenzschwingungen ν , bei denen die Atome über die Achse der Bindungslänge schwingen und somit deren Abstand variieren.

Die für die Anregung benötigte Energie kann mit dem Modell des harmonischen Oszillators beschrieben werden. Dabei muss zunächst die reduzierte Masse μ des schwingenden Systems (Gleichung 17) betrachtet werden, die sich aus den einzelnen Massen m_1 und m_2 beider schwingender Teilchen zusammensetzt.

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (17)$$

Mit der reduzierten Masse des Systems kann die für die zur Anregung benötigte Energie $V(r)$ schließlich mithilfe der Kraftkonstanten k , die die Stärke der chemischen Bindungen zweier Teilchen miteinander definiert, der Auslenkung r und der Schwingungsfrequenz des Systems ν berechnet werden.

$$V(r) = \frac{1}{2} k r^2 = 2\pi\mu\nu^2 r^2 \quad (18)$$

Demnach folgt außerdem, dass die benötigte Energie größer wird, je größer die Stärke der Bindungen beider betrachteter Schwingungspartner wird.^[72]

IR-Spektren wurden über ATR-Infrarotspektroskopie an einem Alpha Platinum Spektrometer der Firma Bruker gemessen. Diese Messungen sind sowohl in Flüssigkeit als auch im festen Aggregatzustand möglich. Für flüssige Proben wurde zunächst ein Tropfen des Dispersions- oder Lösemittels auf den Kristall gegeben, um den Hintergrund zu messen. Anschließend wurde die entsprechende Probe aufgegeben und gemessen. Für flüssige Proben wird der Stempel des Spektrometers nicht genutzt, da die Oberfläche des Tropfens bereits als Reflexionsfläche dient.

Feste Proben wurden nach einer Hintergrundmessung von Luft auf den Kristall gegeben und mit dem Stempel fixiert. Die Proben wurden 24mal gescannt, wobei das finale Spektrum dann als Mittelwert dieser 24 Scans abgebildet wurde.

Nanopartikelsuspensionen konnten nach Gefriertrocknung vermessen werden oder wurden direkt auf dem Kristall des Gerätes getrocknet.

3.8. Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie

Bei der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wird die zu untersuchende Probe über eine Elektrospraykanone zerstäubt. Dabei wird eine Lösung der Substanz durch eine dünne Kapillare geleitet, die zudem als Kathode für die angelegte elektrische Spannung fungiert. Gegenüber dieser kapillaren Kathode steht eine Ringanode, zu der eine hohe Spannungsdifferenz angelegt wird. Wenn die Lösung durch die Kapillare in Richtung der Anode beschleunigt wird, erfolgt demnach eine Ladungstrennung in den dispergierten Substanzen. Dadurch bildet sich an der Öffnung der Kapillare ein sog. Taylor-Kegel (Abbildung 8 (A)), an dessen Spitze einzelne Tröpfchen der Probensubstanz in Richtung der Anode emittiert werden. Aufgrund der Ladungstrennung in dem konisch zur Anode hin zulaufenden Spitzkegel erfolgt die Emission der Tröpfchen dann, wenn die relative Ladung des emittierten Volumens in einer größeren elektrostatischen Anziehung zur Anode resultiert, als die kohärenten Kräfte des Dispersionsmediums ausgleichen können.

Die Tröpfchen transmittieren die Anode durch die Öffnung in der Mitte und treten danach in einen vakuumierten Raum, in dem ein orthogonal zur Bewegungsrichtung der Tröpfchen verlaufendes elektrisches Potenzial angelegt wurde. Die geladenen Teilchen treffen dann je nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) auf unterschiedliche Stellen des Detektors (Abbildung 8 (B)), sodass eben dieses Verhältnis anhand der auftreffenden Position bestimmt werden kann.^[92]

Alle HR-ESI-MS-Daten wurden von *Dr. Florian Uteschil* generiert. Dazu wurde ein kleiner Teil der zu untersuchenden Probe (ca. 0.5 mg) in einem 1.5 mL HPLC-Gefäß mit Teflonmembran im Deckel abgefüllt. Die Probe wurde mit einem Lösemittelgradienten von MeOH zu Wasser (30:70 – 70:30 in 30 min) über eine HPLC-Säule aufgetrennt und nach Austritt aus der Säule mittels der ESI-Technik ionisiert, fragmentiert und gemessen. Bei den HR-Daten wurde zudem ein Vergleich von berechneten m/z -Verhältnissen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Abweichung des gemessenen Wertes in einem Rahmen von ± 0.001 zu finden war, womit das erhaltene Produkt bestätigt werden konnte.

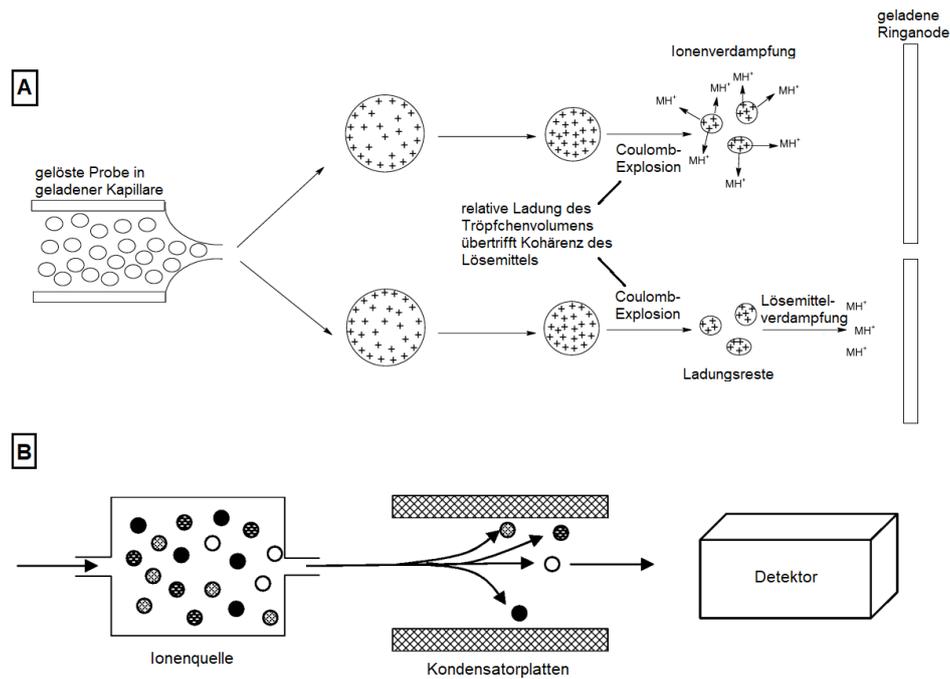


Abbildung 8: (A) Elektrospray-Ionisation der Probe. Die Probe wird über eine Kapillare geleitet und durch die Anode auf einem von zwei möglichen Wegen ionisiert. Nach Durchtreten der Ringanode, werden die Ionen anhand ihres m/z -Verhältnisses (B) unterschiedlich schnell auf die Kondensatorplatten fallen (hohes m/z fällt langsamer) und anschließend anhand der auftreffenden Position charakterisiert (adaptiert aus Literatur^[93]).

3.9. Konfokale Laserrastermikroskopie

Die konfokale Laserrastermikroskopie (*engl.: confocal laser scanning microscopy, CLSM*) ist eine spezialisierte Variante der optischen Mikroskopie. Der Name der Methode ist dabei direkt aus der Vorgehensweise abgeleitet. Das Besondere an dieser Methode ist, dass Brenn- und Beobachtungspunkt konfokal betrachtet werden können, d. h. beide Punkte werden gleichzeitig fokussiert. Dieses Vorgehen ermöglicht es, die Probe in unterschiedlichen Abschnitten entlang der z-Achse zu betrachten. Dazu wird ein fokussierter Laserstrahl über eine Linse auf die Probe gestrahlt. Die Linse verbreitert dabei den Strahl und fächert ihn in einem Maß auf, dass die höchste verbleibende Lichtintensität im Brennpunkt dieser Linse liegt. Die zurückfallende und von der (evtl. fluoreszierenden) Probe nach Anregung mit dem Laser emittierte Strahlung ist demnach zu diesem Zeitpunkt noch diffus in ihrer Intensität verstreut. Um diese diffuse Strahlung anhand ihres Ursprungs in der z-Ebene der Probe zu filtern, wird eine Lochblende eingesetzt (Abbildung 9), mit der sich der

Beobachtungsbrennpunkt genau einstellen lässt, sodass er mit dem Beleuchtungsbrennpunkt konfokal vermessen werden kann.

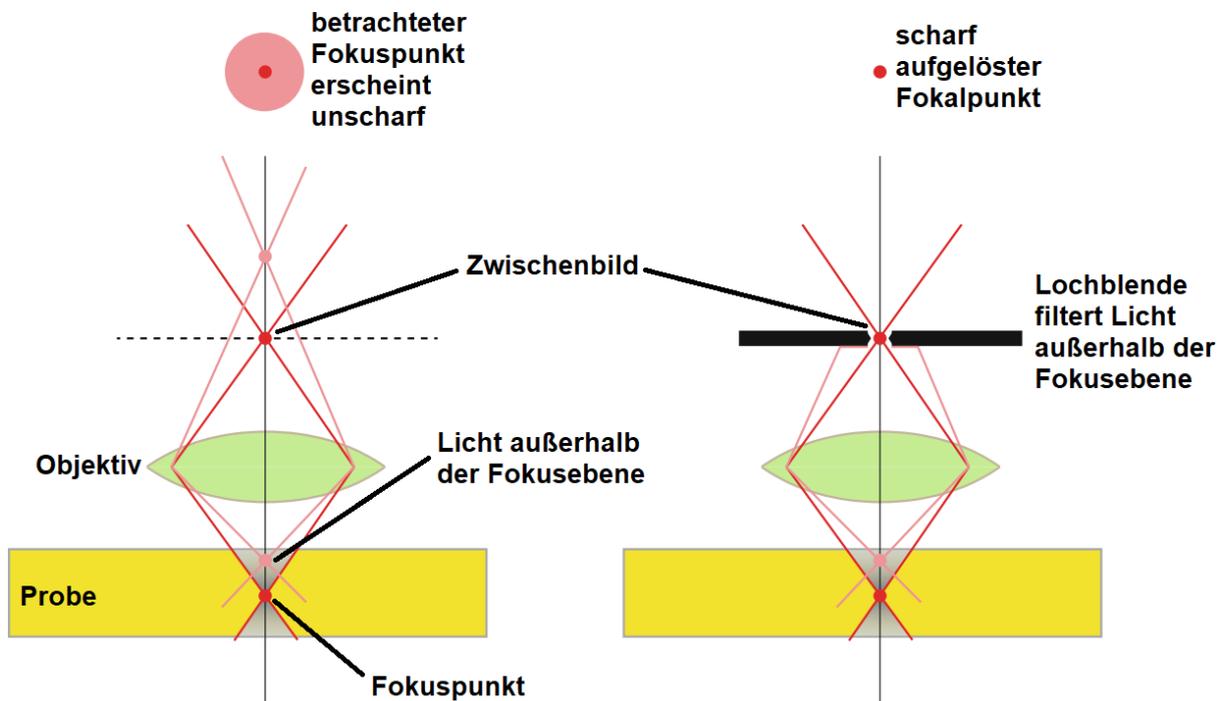


Abbildung 9: Vergleich eines Mikroskops mit (rechts) und ohne (links) Lochblende. Ohne Lochblende erscheint der Fokuspunkt unscharf, da noch Licht außerhalb des Brennpunkts der Linse beobachtet wird. Eine eingebaute Lochblende ermöglicht genaues Einstellen der betrachteten Ebene (adaptiert aus Literatur^[94])

Nach Ausrichtung der Lochblende bleibt nur noch der Teil des Lichtes auf der diffusen Mischung übrig, der aus der maximalen Intensität der Probenanregung hervorgetreten ist, sodass die betrachtete Ebene der Probe dadurch genau definiert vorliegt.

$$d_z = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (19)$$

Die Wellenlänge des verwendeten Lasers λ definiert zudem die möglichen noch auflösbaren Abstände der z-Ebene der Probe. Mit einer Wellenlänge von 500 nm ist es ohne Beugungseffekte durch die Lochblende (Beugungsmaximum $n = 1$) über ein Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von $NA = 1.4$ also nach Gleichung 19 noch möglich, einen Achsenabschnitt d_z mit einer minimalen Größe von etwa 255 nm aufzulösen.^[94]

CLSM Aufnahmen wurden von *Dr. Sebastian Kollenda* an einem TCS SP8 AOBS Mikroskop der Firma Leica generiert. Die fixierten und eingefärbten Zellen wurden

durch ein HCX PL Apo 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv in mehreren fokalen Ebenen entlang der z-Achse (~1 µm) untersucht.

Live-Cell-Imaging wurde von *Dr. Sebastian Kollenda* an einem TCS SP8 Mikroskop der Firma Leica durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in unterschiedlichen zeitlichen Abständen mit einem 63x/1.2 Wasserimmersionsobjektiv in mehreren fokalen Ebenen entlang der z-Achse (~1 µm) untersucht.

Aufnahmeexperimente wurden in einer 2x4 Mikrotiterplatte mit *ibiTreat*-modifizierter Oberfläche von *Dr. Sebastian Kollenda* durchgeführt. Es wurden 20000 Zellen pro Kavität ausgesät und über Nacht bei 37 °C in einer 5% CO₂-Atmosphäre mit 0.2 mL DMEM (*engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium*^[106]) inkubiert. Ähnlich wie bei den MTT-Tests wurden die Zellen anschließend mit 200 µL der entsprechenden Lösung (äquivalente Stoffmenge zur Beladung von 5 µg AuNP) oder Suspension (5 µg Au, 25 µg/mL) versehen und für 24 h inkubiert. Als Kontrolle wurde zudem eine Kavität unbehandelt mit reinem Medium und eine mit demselben Lösemittel wie die betrachteten Proben versehen. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit DPBS (*engl.: Dulbecco's phosphate buffered saline*^[107]) gewaschen und mit 4 Vol% Formaldehyd fixiert. Nach Fixierung der Zellen wurden das Aktin-Skelett, der Zellkern und je nach Anwendung auch die Lysosome eingefärbt. Für mCherry-Zellen war keine Einfärbung des Kerns notwendig, da der Kern durch das Histon-bindende Protein H2B bereits gefärbt vorlag.

Für Aufnahmen an lebenden Zellen (*Live-Cell-Imaging*) wurden die Zellen direkt nach Inkubation mit den aufzunehmenden Substanzen ohne weitere Bearbeitung am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.10. Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT-Test

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, der für die Bestimmung der Zellviabilität genutzt werden kann.^[95]

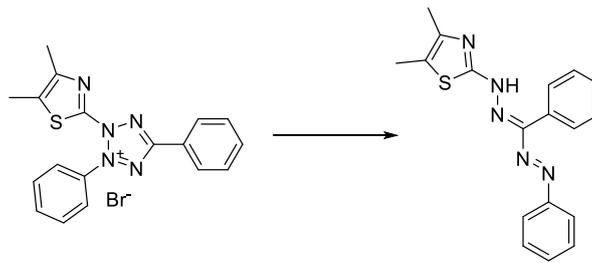


Abbildung 10: Reduktion von MTT zum entsprechenden Formazan.

Lebende Zellen wandeln über enzymatische Prozesse^[96] das wasserlösliche MTT in ein unlösliches Formazan um (Abbildung 10). Da das Formazan als unlösliches Produkt der Reaktion aus der Lösung ausfällt und daher stetig nachproduziert wird, ist es sehr wichtig, die Reaktionszeit hier konstant zu halten. Bei unterschiedlich langer Reduktionszeit würde demnach unterschiedlich viel Formazan bei konstanter Anzahl lebender Zellen produziert werden. Nach dieser bestimmten Zeit kann das Formazan mit z. B. DMSO aufgenommen und über UV-Vis-Spektroskopie durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 16) quantifiziert werden. Eine Kontrollgruppe mit einer bekannten Zahl lebender Zellen dient dabei als Referenzpunkt.^[97]

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Tests von *Dr. Sebastian Kollenda* überprüft. Zuerst wurden HeLa Zellen in einer 4x6 Mikrotiterplatte mit einer Dichte von 50000 Zellen pro Kavität ausgesät. Die Zellen wurden mit 0.5 mL DMEM über Nacht bei 37 °C in einer 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 500 µL der entsprechenden Lösung oder Suspension in DMEM inkubiert. Das reine Lösemittel wurde außerdem zu einer Kontrollgruppe gegeben. Nach 24 h unter Gegenwart der zu untersuchenden Substanzen wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen, um gelöste und schwach adhärierende Moleküle und Nanopartikel zu entfernen. Zum Einfärben wurden 5 mg MTT in 1 mL PBS gelöst und mit 4 mL DMEM verdünnt, um eine finale Konzentration von 1 mg/mL zu erhalten. 0.3 mL dieser Lösung wurden pro Kavität zu den Zellen gegeben, die anschließend für eine Stunde inkubiert wurden. Danach wurde die Lösung durch 0.3 mL DMSO ersetzt und die Zellen für weitere 30 min inkubiert. Das gelöste Formazan wurde quantitativ in einer 96er Mikrotiterplatte bei 570 nm ausgelesen.

3.11. Supermikroskopie

Die *Structured Illumination Microscopy* (SIM) und die *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (STORM) zählen zu den supermikroskopischen Verfahren und bieten eine höhere Auflösung als die CLSM, indem sie durch die Aufnahme mehrerer Bilder mit anschließender Berechnung des realen Bildes das Abbé-Limit umgehen.

Bei der SIM werden mehrere Bilder einer in der Probe festgelegten Ebene entlang der z-Achse entsprechend eines angelegten optischen Rasters aufgenommen. Die Bilder werden anschließend durch einen Computer mittels Fourier-Transformation in den reziproken Raum übersetzt. Anschließend werden die überlagerten Informationen der einzelnen betrachteten Punkte auf dem angelegten Raster in der Probe voneinander getrennt. Dies ist möglich, da die einzelnen Punkte entsprechend ihrer Position auf der Ebene ein minimal voneinander unterschiedliches Streumuster im reziproken Bild aufweisen. Nach Auftrennung des Bildes in unterschiedlich lokalisierte Punkte auf der Ebene kann es per Computer erneut zusammengesetzt werden. Dabei werden durch das Abbé-Limit entstandene unscharfe Kanten der Punkte rausgerechnet. Auf diese Weise kann bei einer minimalen Wellenlänge von 400 nm ein Auflösungslimit von 100 nm erreicht werden.^[98,99]

Bei der STORM werden die fluoreszenten Moleküle in der Probe nicht vollständig angeregt. Stattdessen werden immer nur einzelne Moleküle in einen fluoreszenten Zustand gebracht, die dann ohne die Streueffekte durch Interferenz mit der Emission anderer Moleküle sehr genau lokalisiert werden können. Bei der STORM werden daher sehr viele Bilder aufgenommen, bei denen viele unscharfe Punkte gemessen werden. Per Computer wird bei diesen abgebildeten, noch unscharfen Punkten der Mittelpunkt als lokalisiertes Signal berechnet. Durch die Aufnahme und Überlagerung sehr vieler Bilder kann anschließend ein vollständiges Bild der Probe erhalten werden. Dabei ist die Auflösung mit ca. 20 nm etwa zehnmal besser als bei der CLSM. Allerdings ist es dadurch nicht mehr möglich, Bildabschnitte entlang der z-Achse aufzunehmen.^[100]

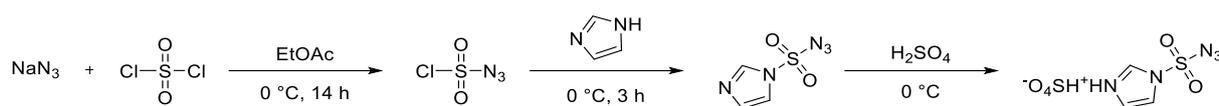
4. Experimentelles

4.1. Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat (ISA)

4.1.1. Sicherheitshinweis

Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat gilt wie die meisten azidhaltigen Substanzen als potenziell explosiver Gefahrstoff. Früher wurde Imidazol-1-sulfonylazid als farblose Flüssigkeit gewonnen. Allerdings wurde schnell festgestellt, dass die Substanz in dieser flüssigen Form äußerst anfällig gegenüber Hitze oder Schock reagiert und zu spontaner Detonation neigt.^[101] *Stick et al.* haben daher 2007 einen Syntheseweg vorgeschlagen, bei dem sie das Reagenz unter Zugabe von konzentrierter Salzsäure aus Acetonitril ausfällen konnten.^[102] Das Hydrochlorid galt zunächst als stabil, bis schließlich 4 Jahre später (2011) ein nachträglicher Sicherheitshinweis von *Stick et al.* veröffentlicht wurde, in dem es hieß, dass beim Aufkonzentrieren des Überstandes nach der Fällung eine Explosion stattgefunden habe. Außerdem erwähnten die Autoren, dass das Hydrochlorid stark hygroskopische Eigenschaften aufweist und somit über eine gewisse Zeit unter Abspaltung der hochexplosiven und giftigen Stickstoffwasserstoffsäure (HN_3) hydrolysieren kann.^[101] Dieser Prozess lässt sich allerdings schon rein optisch gut nachverfolgen, da dann in der sonst weißen, kristallinen Probe schwarze Kristalle zu sehen sind. Sollte das der Fall sein, muss das Imidazol-1-sulfonylazid-Hydrochlorid umgehend als azidhaltiger Gefahrstoff entsorgt werden. Dazu wird der Stoff in Wasser gelöst und unter Zugabe von Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) und in Ethanol vorgelöstem Iod zum entsprechenden Amin und Stickstoff reduziert. Nach Bekanntgabe der Instabilität des Hydrochlorids wurde 2012 von *Fischer et al.*^[103] und 2016 von *Potter et al.*^[104] ein Syntheseweg vorgeschlagen, bei dem das Produkt schließlich als Dihydrogensulfat unter Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure aus Ethylacetat gefällt wurde. Bei dem Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat (kurz: ISA) konnte bisher noch keine Explosion verzeichnet werden. Auch in der Zeitspanne dieser Arbeit konnte für das Dihydrogensulfat bisher keine schwarze Verfärbung der Kristalle beobachtet werden (Lagerzeitraum: 2,5 Jahre unter Argon bei 4 °C). Das Hydrochlorid hingegen zeigte nach einer Lagerung von ca. 6 Monaten unter Argon bei 4 °C einige schwarze Kristalle und wurde daraufhin umgehend wie oben beschrieben entsorgt. Dennoch gilt bei ISA wie auch generell bei anderen Aziden höchste Vorsicht im Umgang mit dieser Substanz, da das Hydrochlorid auch anfangs als stabil galt, was allerdings später revidiert wurde.

4.1.2. Synthese



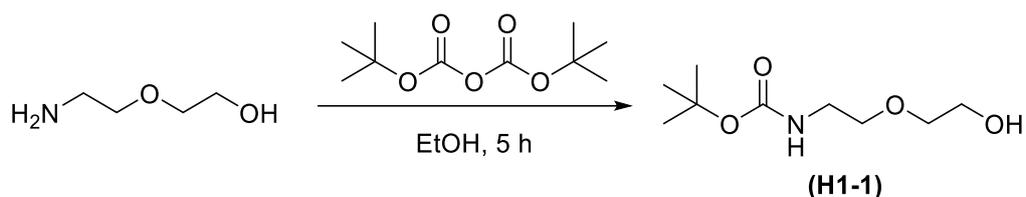
Zunächst wurde ein 500 mL Dreihalskolben dreimal ausgeheizt und mit Argon geflutet, um an die Glaswand adsorbiertes Wasser auszuschließen. Währenddessen wurden 300 mL Ethylacetat über Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. 231 mL des getrockneten Ethylacetat wurden dann unter einem Gegenstrom aus Argon über eine mit Molsieb gefüllte Glassäule in den Dreihalskolben überführt. Anschließend wurde Natriumazid (231 mmol, 15 g) als Feststoff zugegeben und durch starkes Rühren suspensiert. Die Suspension wurde über ein Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Unter Ausschluss von Luft wurde dann Sulfurylchlorid (1 äq., 231 mmol, 18.7 mL) langsam über einen Zeitraum von 10 min zugetropft, worauf ein Farbumschlag von weiß zu gelb zu beobachten war. Die Reaktion wurde dann über Nacht für 14 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Dabei wurde die gelbe Suspension langsam orange. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion erneut mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Imidazol (1.9 äq., 440 mmol, 30 g) wurde in einem Gegenstrom aus Argon als Feststoff über einen Zeitraum von ca. 15 min portionsweise zugegeben, woraufhin die Suspension langsam zu einem dunkelorange und milchigen Schlamm wurde. Nach 3 h Rühren bei 0 °C wurde die Reaktion mit 200 mL einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gequenchet. Nachdem die resultierende Gasentwicklung gestoppt hatte, wurde der pH-Wert überprüft um sicherzustellen, dass die Lösung basisch (pH > 9) vorliegt, damit unerwünschte explosive Nebenprodukte wie z. B. Stickstoffwasserstoffsäure (HN₃) oder Sulfuryldiazid (SO₂(N₃)₂) aus dem ersten Reaktionsschritt neutralisiert werden und eine Explosionsgefahr minimiert wird. Die entstandene Emulsion wurde dann in einen Scheidetrichter überführt und die wässrige Phase als azidhaltiger Abfall gesammelt. Die organische Phase wurde einmal mit Wasser und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden weiterhin gesammelt und später entsprechend der empfohlenen Entsorgung in den Sicherheitshinweisen entsorgt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und erneut in einen 500 mL Dreihalskolben überführt. Die Lösung von Imidazol-1-sulfonylazid in Ethylacetat wurde auf 0 °C abgekühlt, bevor unter starkem Rühren konzentrierte Schwefelsäure (1 äq., 231 mmol, 12.3 mL) langsam über einen Zeitraum von 10 min zugetropft wurde. Dabei war die Entstehung eines weißen, kristallinen Niederschlages zu beobachten. Nach vollständiger Zugabe der Schwefelsäure wurde die Suspension

für weitere 60 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde sie über einen Zeitraum von 60 min langsam auf Raumtemperatur gebracht. Das Produkt wurde über Vakuumfiltration vom Lösemittel getrennt und noch zweimal mit dem Rest des zu Beginn getrockneten EtOAc gewaschen. Anschließend wurde es final im Hochvakuum getrocknet, wobei eine Ausbeute von 73 % (169 mmol, 46 g) erzielt wurde.

Charakterisierung: **¹H-NMR (400 MHz, D₂O)**: δ/ppm = 9.24 (s, 1H), 7.74 (d, 1H), 7.38 (d, 1H). **¹³C-NMR (400 MHz, D₂O)**: δ/ppm = 137.70, 123.79, 119.96. **IR (ATR, fest)**: $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1}$ = 2176 (N₃), 1301 (S=O), 1125 (S=O). **HR-MS (ESI-pos.)**: m/z berechnet für [C₃H₃N₅O₂S+H]⁺ = 174.0080, gefunden 174.0078 g·mol⁻¹. **HR-MS (ESI-neg.)**: m/z berechnet für [HSO₄]⁻ = 96.9601, gefunden 96.9603 g·mol⁻¹.

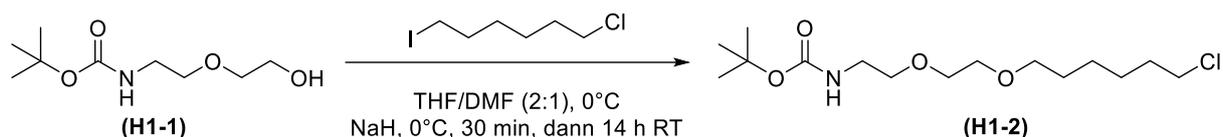
4.2. HaloTag-Liganden

4.2.1. N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)pent-4-ynamid (H1)



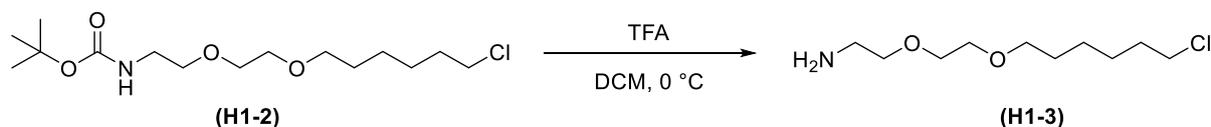
2-(2-Aminoethoxy)ethanol (20 mmol, 2.1 g) wurde in einem 100 mL Einhalskolben in 50 mL Ethanol gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und Di-*tert*-butyldicarbonat (1 äq., 20 mmol, 4.36 g, 4.27 mL) wurde zugegeben. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und für 5 h gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösemittel entfernt und das übrige farblose Öl mit 20 mL DCM und 20 mL H₂O verdünnt. In einem Scheidetrichter wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase weiter zweimal mit jeweils 10 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurde gesammelt, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösemittel wurde entfernt und übrig blieb das Produkt *tert*-Butyl-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)carbamate (**H1-1**) (91.4 %, 18.28 mmol, 3.75 g).

Charakterisierung: **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ/ppm = 3.72 (t, 2H), 3.58-3.51 (m, 4H), 3.31 (t, 2H), 1.43 (s, 9H).



Das entstandene Öl von **(H1-1)** wurde in einem 100 mL Einhalskolben in einem Gemisch aus 35 mL THF und 17,5 mL DMF aufgenommen. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt, bevor NaH (60 % in Mineralöl, 1.56 äq., 980 mg) als Feststoff zugegeben wurde. Die Emulsion wurde daraufhin für weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde 6-Chloro-1-iodohexan (1.5 äq., 27.48 mmol, 4.19 mL) zugegeben. Die Reaktion wurde weitere 20 min bei 0 °C gerührt, bis schließlich das Eisbad entfernt wurde und weitere 14 h über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Am nächsten Tag wurde die Reaktion erneut auf 0 °C abgekühlt und mit 40 mL gesättigter NH₄Cl-Lösung gequenchet. Die Emulsion wurde in einen Scheidetrichter überführt und das Produkt zweimal mit jeweils 20 mL EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde gesammelt und über MgSO₄ getrocknet und anschließend abfiltriert. Nach Entfernung des Lösemittels blieb ein gelbes Öl des Produktes *tert*-Butyl-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)carbamate **(H1-2)** übrig. Nach Aufreinigung über Säulenchromatographie (33 % EtOAc, 67 % Cyclohexan, R_f = 0.39) blieb ein farbloses Öl von **(H1-2)** zurück (54.05 %, 9.88 mmol, 3.20 g).

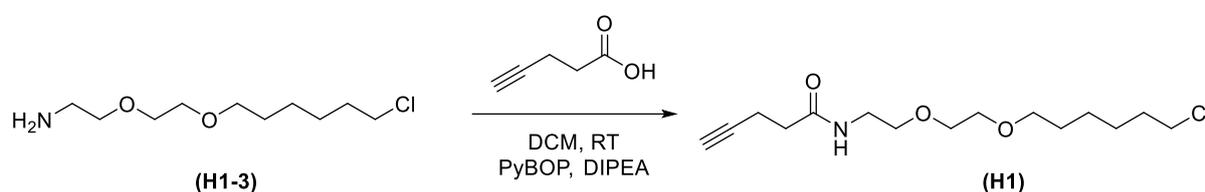
Charakterisierung: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 5.01 (b, 1H), 3.61-3.50 (m, 8H), 3.46 (t, 2H), 3.31 (t, 2H), 1.77 (qi, 2H), 1.61 (qi, 2H), 1.49-1.32 (m, 13H).



Nach vollständiger Aufreinigung wurde **(H1-2)** (4.18 mmol, 1.35 g) in 30 mL DCM gelöst. Die Lösung wurde mittels Eisbades auf 0 °C abgekühlt, bevor TFA (7.09 äq., 29.63 mmol, 5 mL) zugegeben wurde. Die Lösung wurde daraufhin weitere 2,5 h bei 0 °C gerührt. Der Kolben wurde mit Toluol aufgefüllt, welches anschließend bei vermindertem Druck entfernt wurde. Durch die Bildung eines Azeotrops von Toluol mit TFA^[105] konnte auf diese Weise das TFA größtenteils entfernt werden. Dabei war zudem ein Farbumschlag von gelb zu pink zu beobachten. Das pinke Öl wurde in 30 mL MeOH gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt, woraufhin es wieder eine gelbliche Farbe annahm. K₂CO₃ (2.85 äq., 11.93 mmol; 1.65 g) wurde als

Feststoff hinzugegeben und als Suspension gerührt, um restliches TFA zu neutralisieren. Nach 10 min wurde die Suspension abfiltriert und das MeOH unter vermindertem Druck entfernt. Das übrige gelbe Öl wurde dann mit 20 mL Wasser aufgenommen und viermal mit jeweils 20 mL EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde danach über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösemittel wurde entfernt, um das Produkt 2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethanamin (**H1-3**) zu erhalten (99.5 %, 4.16 mmol, 930.76 mg).

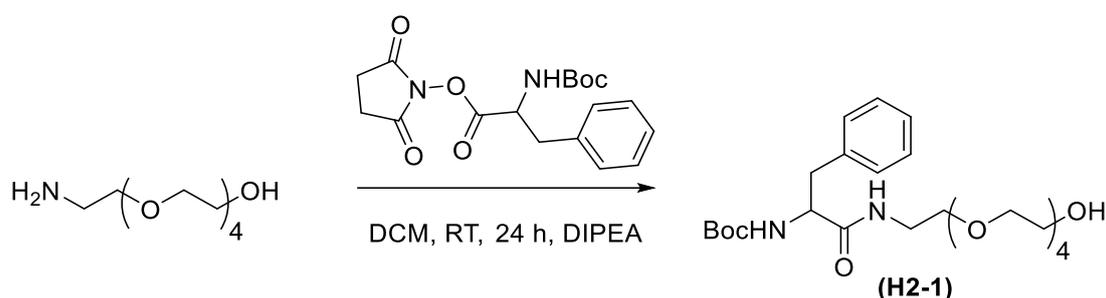
Charakterisierung: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 5.07 (b, 2H), 3.65-3.50 (m, 8H), 3.45 (t, 2H), 3.00 (t, 2H), 1.76 (qi, 2H), 1.58 (qi, 2H), 1.48-1.31 (m, 4H).



Ohne weitere Aufreinigung wurde ein Teil von (**H1-3**) (0.65 mmol, 145 mg) in 20 mL DCM gelöst, worauf ein Farbumschlag von gelb zu pink zu verzeichnen war. Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP, 1.2 äq., 0.78 mmol, 406 mg) und Diisopropylethylamin (DIPEA, 2.5 äq., 1.63 mmol, 280 µL) wurden zusammen mit Pentinsäure (1.2 äq., 0.78 mmol, 76.5 mg) in 15 mL DCM gegeben und für 15 min gerührt. Darauf wurde die Lösung mit der Pentinsäure in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und um die Lösung von (**H1-3**) ergänzt. Die Lösung verfärbte sich schwach orange und wurde über Nacht für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde die Reaktion bei 0 °C mit 30 mL Wasser gequenchet. Die Phasen wurden in einem Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit jeweils 20 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen aus DCM und EtOAc wurden vereint und das Lösemittelgemisch bei vermindertem Druck entfernt, bis ein gelbes Öl zurückblieb. Das Öl wurde erneut in 10 mL EtOAc aufgenommen, dann über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösemittel wurde entfernt und durch 5 mL Acetonitril ersetzt. Das rohe Produkt von (**H1**) wurde anschließend auf RP-18 Silica Gel aufgetragen und final über eine RP-18 MPLC (Gradient 1:2 ACN:H₂O zu 2:1 in 2 h) in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Voskuhl aufgereinigt (71.3 %, 0.46 mmol, 140.8 mg). Die Gesamtausbeute von (**H1**) lag somit bei 35.05 %.

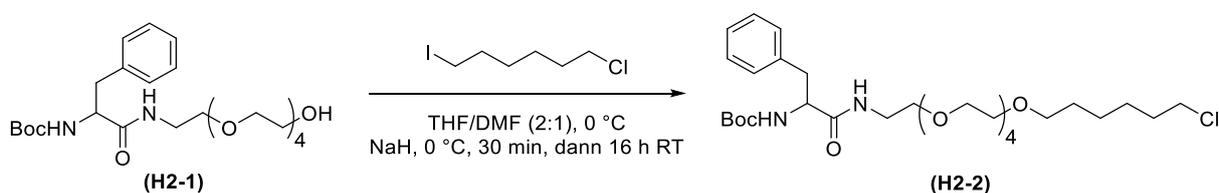
Charakterisierung: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 6.18 (b, 1H), 3.64-3.43 (m, 10H), 3.17 (se, 2H), 2.52 (dt, 2H), 2.39 (dt, 2H), 2.00 (t, 1H), 1.91-1.72 (m, 2H), 1.61 (qi, 2H), 1.51-1.33 (m, 4H). **HR-MS (ESI-pos.)**: m/z berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3+\text{H}]^+$ = 304.1674, gefunden 304.1670 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3+\text{Na}]^+$ = 326.1493, gefunden 326.1490 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4.2.2. *N*-(25-chloro-3-oxo-1-phenyl-7,10,13,16,19-pentaoxa-4-azapentacosan-2-yl)pent-4-ynamid (H2)



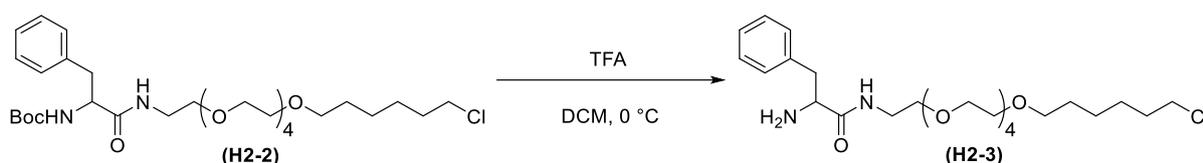
In einem 50 mL Einhalskolben wurde Boc-*L*-phenylalanin-*N*-hydroxysuccinimid (1.2 äq., 2.53 mmol, 880 mg) in 20 mL DCM vorgelegt. Dazu wurde $\text{NH}_2\text{-PEG5-OH}$ (2.11 mmol, 500 mg, 464.25 μL) gegeben. Die Lösung wurde mit DIPEA (2 äq., 4.2 mmol, 731.6 μL) basisch gestellt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt und übrig blieb ein leicht gelbliches Öl aus *tert*-Butyl-(1-hydroxy-16-oxo-18-phenyl-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecan-17-yl)carbamate (**H2-1**). Das Produkt wurde über Säulenchromatographie aufgereinigt (95 % DCM, 5 % MeOH, R_f = 0.21) und ergab final sauberes (**H2-1**) (76 %, 1.6 mmol, 753 mg).

Charakterisierung: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ/ppm = 7.37-7.16 (m, 5H), 6.94 (b, 1H), 4.43 (dd, 1H), 3.80-3.45 (m, 22H), 1.39 (s, 9H). **HR-MS (ESI-pos.)**: m/z berechnet für $[\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8+\text{H}]^+$ = 485.2857, gefunden 485.2858 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, berechnet für $[\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8+\text{Na}]^+$ = 507.2677, gefunden 507.2681 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Nach vollständiger Aufreinigung wurde **(H2-1)** (0.8 mmol, 376 mg) in einem 50 mL Einhalskolben in einem Gemisch auf 5 mL THF und 2,5 mL DMF gelöst. Die Lösung wurde durch ein Eisbad auf 0 °C abgekühlt, woraufhin NaH (60 % in Mineralöl, 1.81 äq., 50 mg) als Feststoff direkt zugegeben wurde. Nach Zugabe des NaH wurde die entstandene Emulsion weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde der Reaktion 6-Chloro-1-iodohexan (1.5 äq., 1.2 mmol, 183 µL) zugeführt und über Nacht für 14 h reagieren lassen. Nach Vollendung der Reaktionsdauer wurde die Reaktion bei 0 °C mit 40 mL gesättigter NH₄Cl-Lösung gequenchet und anschließend zweimal mit jeweils 25 mL EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt. Das übrige gelbe Öl, welches das Produkt *tert*-Butyl-(25-chloro-3-oxo-1-phenyl-7,10,13,16,19-pentaoxa-4-azapen-tacosan-2-yl)-carbammat **(H2-2)** enthielt, wurde anschließend über Säulenchromatographie (93.3 % DCM, 6.7 % MeOH, R_f = 0.54) aufgereinigt und ergab sauberes Produkt (76.9 %, 0.62 mmol, 371.1 mg).

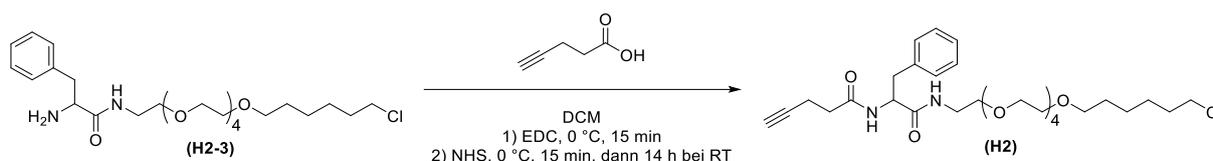
Charakterisierung: **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)**: δ/ppm = 7.30-7.04 (m, 5H), 3.97 (t, 1H), 3.80-3.45 (m, 22H), 1.86-0.76 (m, 21H). **HR-MS (ESI-pos.)**: m/z berechnet für [C₃₀H₅₁ClN₂O₈+H]⁺ = 603.3407, gefunden 603.3410 g·mol⁻¹, berechnet für [C₃₀H₅₁ClN₂O₈+Na]⁺ = 625.3226, gefunden 625.3232 g·mol⁻¹.



Um die Boc-Gruppe zu entschützen, wurde **(H2-2)** (0.17 mmol, 101 mg) in 3 mL DCM gelöst und bei 0 °C mit TFA (17.4 äq., 2.96 mmol, 0.5 mL) versetzt. Die nun pinke Lösung wurde für 2.5 h bei 0 °C gerührt, bis sie nach Abschluss der Zeit mit 20 mL Toluol verdünnt wurde und das Lösemittel danach bei vermindertem Druck entfernt wurde. Das verbleibende, nun wieder gelbe Öl wurde in 10 mL MeOH aufgenommen und bei 0 °C mit K₂CO₃ (3 äq., 0.51 mmol, 71 mg) vermischt, sodass übriges TFA neutralisiert wurde. Nach 10 min wurde die Lösung abfiltriert und das Lösemittel entfernt. Das gelbe Öl wurde in 10 mL H₂O aufgenommen und viermal mit jeweils 10 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über MgSO₄ getrocknet und schließlich abfiltriert. Erneut wurde das Lösemittel entfernt, was in

einem leicht gelblichen Öl von 2-Amino-*N*-(21-chloro-3,6,9,12,15-pentaoxahenicosyl)-3-phenylpropanamid (**H2-3**) resultierte (97.6 %, 0.166 mmol, 83.47 mg). Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt für den nächsten Schritt weiterverwendet.

Charakterisierung: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ/ppm = 7.48-7.05 (m, 5H), 3.99-3.09 (m, 23H), 1.81-0.75 (m, 12H). **HR-MS (ESI-pos.)**: m/z berechnet für $[\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{ClN}_2\text{O}_6+\text{H}]^+$ = 503.2882, gefunden 503.2889 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



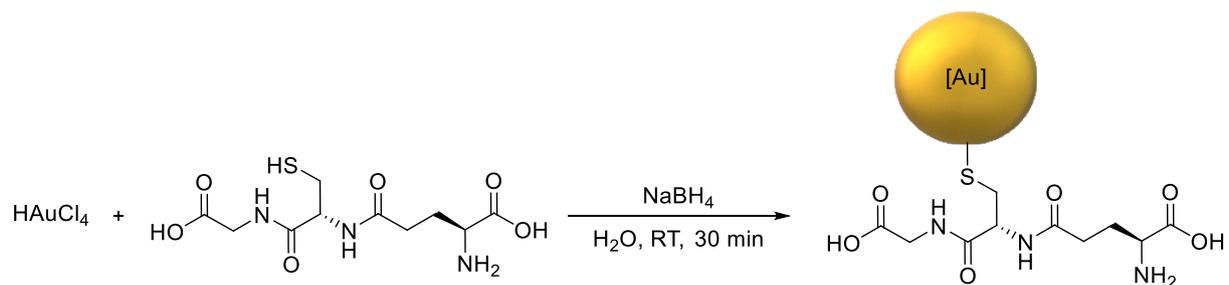
Um die Alkin-Funktion an das finale Produkt anzubringen, wurde zunächst *in situ* ein Aktivester der Pentinsäure hergestellt. Dazu wurde Pentinsäure (1 mmol, 98.1 mg) in 10 mL DCM gelöst und auf 0 °C abgekühlt. *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl, 1.3 äq., 1.3 mmol, 249.2 mg) wurde in 1 mL DCM gelöst und zugegeben. Die Lösung wurde 15 min gerührt, bis *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 1.3 äq., 1.3 mmol, 149.5 mg) zugegeben wurde. Nach weiteren 15 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion weitere 14 h über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde (**H2-3**) (0.16 äq., 0.16 mmol, 358 mg) in 5 mL DCM gelöst und zugegeben. Nach 8 h wurde die Reaktion mit 10 mL Wasser gequench und anschließend im Scheidetrichter in die jeweiligen Phasen aufgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit jeweils 10 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und anschließend wurde das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt in Form eines leicht gelblichen Öls wurde anschließend durch Säulenchromatographie (95 DCM, 5 % MeOH, R_f = 0.34) aufgereinigt, um das finale Produkt (**H2**) zu erhalten (69.96 %, 0.112 mmol, 65.3 mg). Damit betrug die Gesamtausbeute der Synthese von (**H2**) 39.9 %.

Charakterisierung: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ/ppm = 7.45-7.12 (m, 5H), 6.19 (b, 1H), 3.75-3.29 (m, 22H), 2.54 (dt, 2H), 2.42 (dt, 2H), 2.01 (t, 1H), 1.86-1.69 (m, 6H), 1.62 (qi, 2H), 1.52-1.33 (m, 4H). **HR-MS (ESI-pos.)**: m/z berechnet für $[\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{ClN}_2\text{O}_7+\text{H}]^+$ = 583.3145, gefunden 583.3149 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, berechnet für $[\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{ClN}_2\text{O}_7+\text{Na}]^+$ = 605.2964, gefunden 605.2969 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4.3. Tetrachlorogoldsäure (HAuCl₄)

Ultraleine Goldnanopartikel mit Glutathion wurden über eine *bottom-up* Synthese hergestellt. Dazu wurde zunächst elementares Gold (5 g) in 50 mL kochendem Königswasser (1 L = 218 mL 14.35 M HNO₃ und 782 mL 12.00 M HCl) gelöst. Die Lösung wurde solange gekocht, bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden war. Der dunkelorangene Feststoff wurde daraufhin in 400 mL 10 mM HCl aufgenommen, was in einer gelben Lösung resultierte. Die Lösung wurde abfiltriert und das Filtrat gesammelt. Der abfiltrierte Feststoff wurde wiederum in 100 mL 10 mM HCl aufgenommen und löste sich vollständig. Die beiden Lösungen wurden vereint und mittels AAS auf ihre Goldkonzentration hin bestimmt (99.8 %, $c_{\text{Au}} = 9.98 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 50.67 \text{ }\mu\text{M}$, $m_{\text{Au}} = 4.99 \text{ g}$).

4.4. Glutathion-terminierte ultraleine Goldnanopartikel (AuGSH)

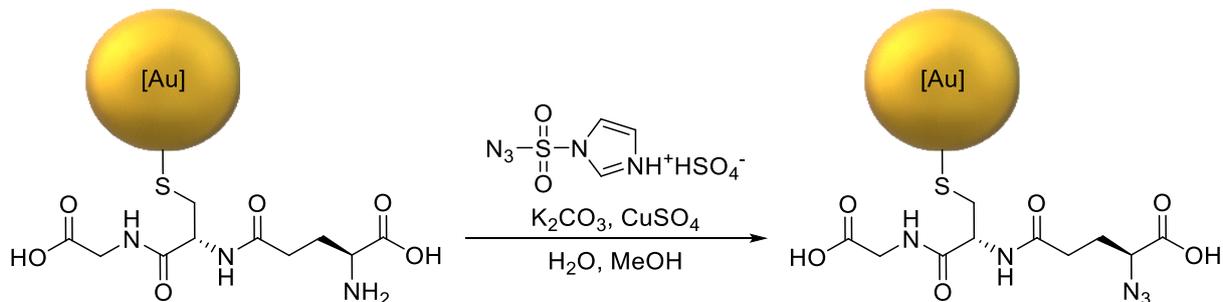


Für die Synthese der ultraleinen Glutathion-terminierten Goldnanopartikel wurde zunächst 5.01 mL der zuvor hergestellten Tetrachlorogoldsäure (253.85 μmol , 50 mg Au) in 350 mL Wasser vorgelegt. Dazu wurden 10 mL einer frisch angesetzten Glutathion-Lösung (4 äq., 1.02 mmol, 312.1 mg) zugegeben. Die gelbe Lösung verfärbte sich schlagartig hellbraun und wurde danach milchig-trüb und farblos. Die trübe Lösung wurde für 10 min gerührt, bis 5 mL einer frisch angesetzten eiskalten NaBH₄-Lösung (4 äq., 2.04 mmol, 38.59 mg) zugegeben wurden. Die Lösung verfärbte sich schlagartig dunkelbraun. Nach 30 min wurde die entstandene Suspension an Nanopartikeln in 50 mL Grainerröhrchen überführt und für 30 min bei 4000 rpm (2500 g) zentrifugiert. Der hellbraune Überstand wurde verworfen und der dunkelbraune Bodensatz der Gefäße wurde in Wasser aufgenommen und vereint. Die trübe Suspension wurde ein weiteres Mal für 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um überschüssiges, ungebundenes Glutathion sowie möglicherweise entstandene Disulfide zu entfernen. Erneut wurde danach der Überstand verworfen und der

dunkelbraune Bodensatz wurde in 15 mL 0.2 M NaOH-Lösung aufgenommen. Die dunkelbraune Suspension der Nanopartikel wurde dann in 3 kDa Amicon® Zentrifugenfilter überführt und dreimal für jeweils 45 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um eine konzentrierte Suspension an Glutathion-terminierten ultrakleinen Goldnanopartikeln zu erhalten (71 %, $m_{Au} = 35.51$ mg).

Charakterisierung: **¹H-NMR (400 MHz, H₂O:D₂O, 9:1)**: δ /ppm = 8.55-8.04 (b, 2H), 4.08-3.65 (b, 3H), 3.65-3.22 (bd, 2H), 2.88-2.42 (b, 2H), 2.39-2.00 (b, 2H). **¹³C-NMR (400 MHz, H₂O:D₂O, 9:1)**: δ /ppm = 176.46, 174.66, 174.37, 171.25, 56.80, 54.51, 43.84, 35.00, 31.69, 26.57.

4.5. Glutathion-Azid-terminierte ultrakleine Goldnanopartikel (AuN₃)



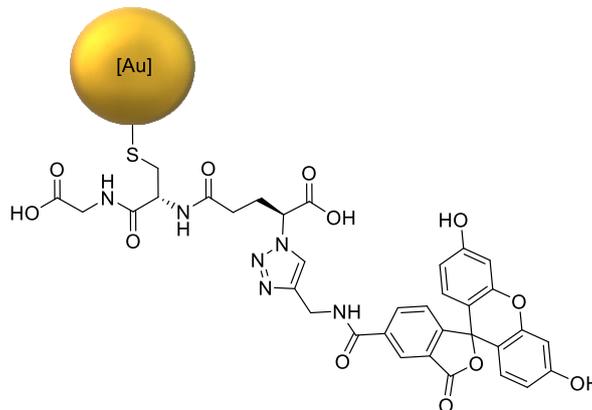
Um die Aminogruppe der Glutathion-Liganden an der Oberfläche der Nanopartikel weiter zu einem Azid umzufunktionalisieren, wurden AuGSH (15 mg Au, 308.32 nmol NP, 38.54 μ mol GSH) in 17 mL Wasser verdünnt und in 54 mL MeOH gegeben. Dazu wurde ISA (15 äq. zu GSH, 578.1 μ mol, 156.79 mg) in 5 mL Wasser gelöst und zugegeben, woraufhin die dunkelbraune, klare Suspension trüb wurde. Anschließend wurde schnell K₂CO₃ (15 äq. zu GSH, 578.1 μ mol, 79.89 mg) ebenfalls in 5 mL Wasser gelöst und zugegeben. Zu der trüben Suspension wurde 1 mL einer 5 mM CuSO₄·5H₂O-Lösung (0.13 äq., 5 μ mol, 1.25 mg Cu) gegeben, um die Reaktion zu starten. Außerdem wurde die Suspension mit 1 mL einer 1 M NaOH-Lösung und weiteren 25 mL Wasser aufgefüllt, bis die Trübung verschwand. Dann wurde die Reaktion für 72 h gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion mit weiteren 126 mL Wasser auf <30 % MeOH verdünnt und über 3 kDa Amicon® Zentrifugenfilter in sechs iterativen Schritten mit jeweils 15 mL Wasser für 45 min bei 4000 rpm (2500 g) gewaschen. Die aufkonzentrierte Suspension (86 %, $m_{Au} = 12.9$ mg) konnte anschließend für weitere Syntheseschritte verwendet werden.

Charakterisierung: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$, 9:1): δ/ppm = 8.89-7.90 (b, 2H), 4.23-3.93 (b, 1H), 3.93-3.54 (b, 2H), 3.53-3.18 (bd, 2H), 2.85-2.32 (bd, 2H), 2.32-1.78 (bd, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$, 9:1): δ/ppm = 177.17, 176.27, 175.37, 171.04, 64.84, 56.25, 43.76, 35.23, 32.51, 27.78.

4.6. Kupfer-katalysierte Cycloaddition (CuAAC) an der Partikeloberfläche

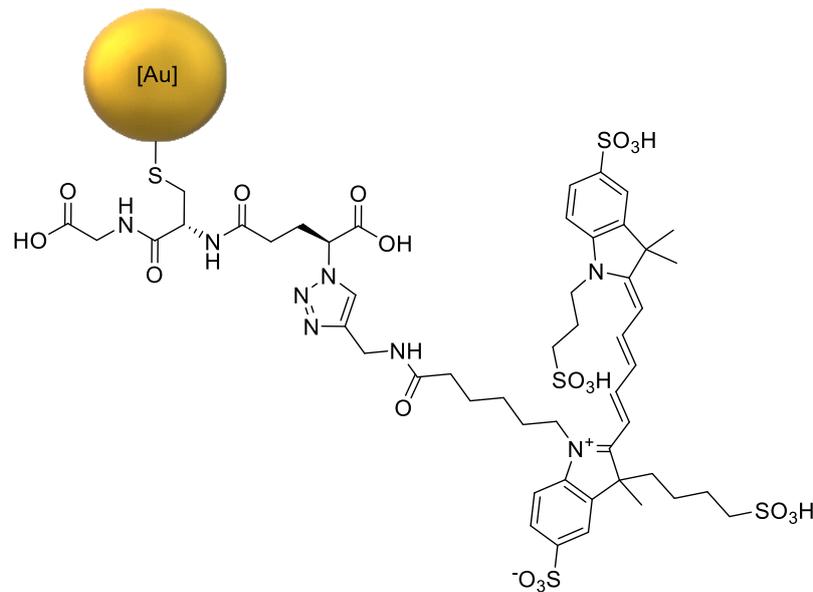
Für alle CuAAC wurde eine Stammlösung aus $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (1 mL, 5 mM) und Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA, 4 mL, 12.08 mM) verwendet. Die AuN_3 Nanopartikel wurden im entsprechenden Lösemittel vorgelegt und um das Alkin ergänzt. Danach wurde etwas von der Stammlösung zugegeben und die Reaktion final unter Zugabe von in Wasser gelöstem Natriumascorbat gestartet.

4.6.1. Goldnanopartikel mit Fluorescein (AuFAM)



Um die azidierten Nanopartikel mit Fluorescein zu markieren, wurde eine Suspension von AuN_3 (2 mg Au, 41.11 nmol NP, 4.85 μmol N_3) in 5 mL Wasser verdünnt. FAM-Alkin (0.4 äq. zu N_3 , 1.94 μmol , 802 μg) in 1 mL 0.1 M NaOH-Lösung gelöst und direkt zugegeben. Aus der Cu-Stammlösung wurde 388 μL (0.08 äq. zu N_3 Cu, 0.77 äq. zu N_3 THPTA) abgenommen und der Reaktion hinzugegeben. Anschließend wurde Natriumascorbat (0.77 äq. zu N_3 , 740 μg) in 1 mL Wasser gelöst und ebenfalls der Reaktion zugegeben. Die CuAAC wurde über Nacht für 14 h gerührt und am nächsten Tag analog zu AuN_3 über Spinfiltration aufgereinigt (ca. 7-9x), bis das Filtrat keine Fluoreszenz mehr aufwies (84 %, $m_{\text{Au}} = 1.68$ mg).

4.6.2. Goldnanopartikel mit Alexa-Fluorophor 647 (AuAF647)

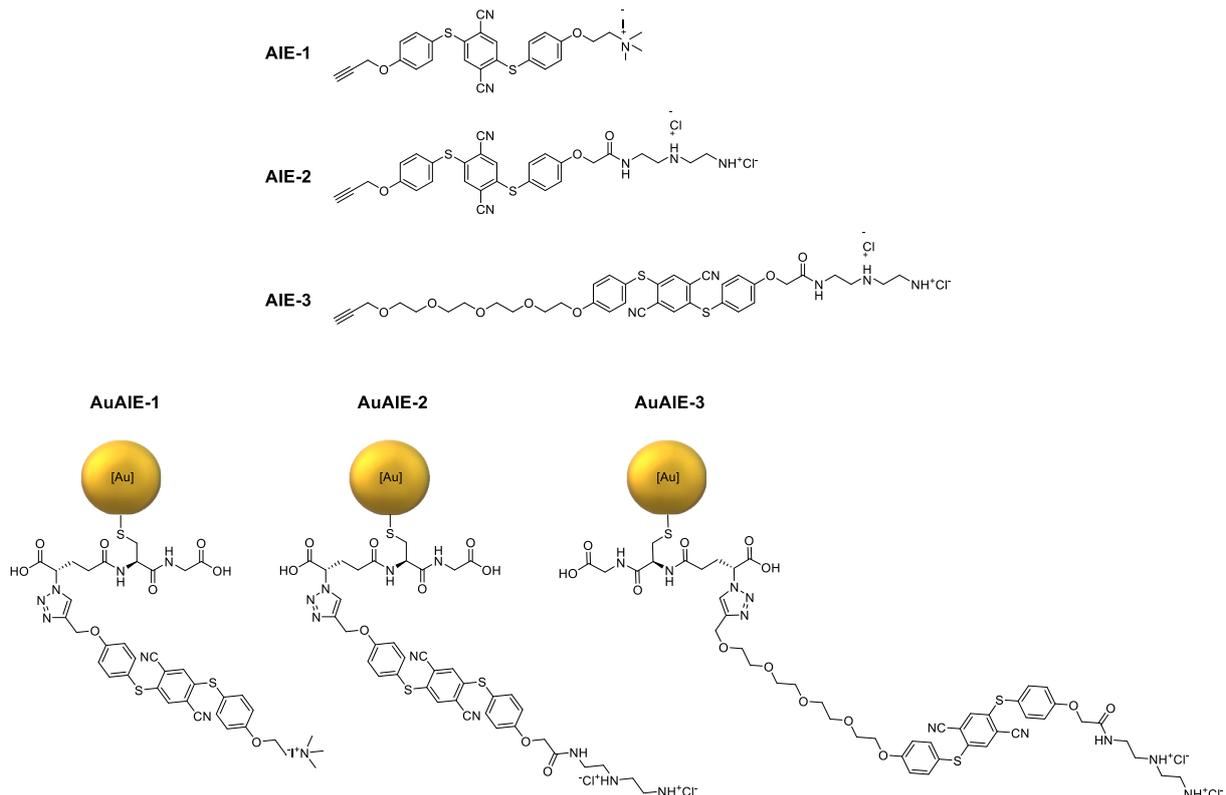


Um die Nanopartikel mit Alexa-Fluorophor 647 (AF647) zu markieren, wurde AF647 (0.4 äq. zu N_3 , 1.94 μmol , 1.76 mg) in 1 mL DMSO gelöst und zu 5 mL einer Suspension aus AuN_3 (2 mg Au, 41.11 nmol NP, 4.85 μmol N_3) gegeben, wodurch die Suspension kurzzeitig warm wurde. Nach Abkühlen wurden 388 μL der Cu-Stammlösung (0.08 äq. zu N_3 Cu, 0.77 äq. zu N_3 THPTA) und 1 mL Natriumascorbat-Lösung (0.77 äq. zu N_3 , 740 μg) nacheinander zugeben. Die Reaktion wurde über Nacht für 14 h gerührt und am nächsten Tag aufgearbeitet. Dazu wurde sie zunächst mit 15 mL Wasser auf <5 % DMSO verdünnt und danach analog zu AuFAM durch Spinfiltration aufgereinigt (81 %, $m_{Au} = 1.62$ mg).

4.6.3. Goldnanopartikel mit *aggregation induced emission* (AIE)-Farbstoffen

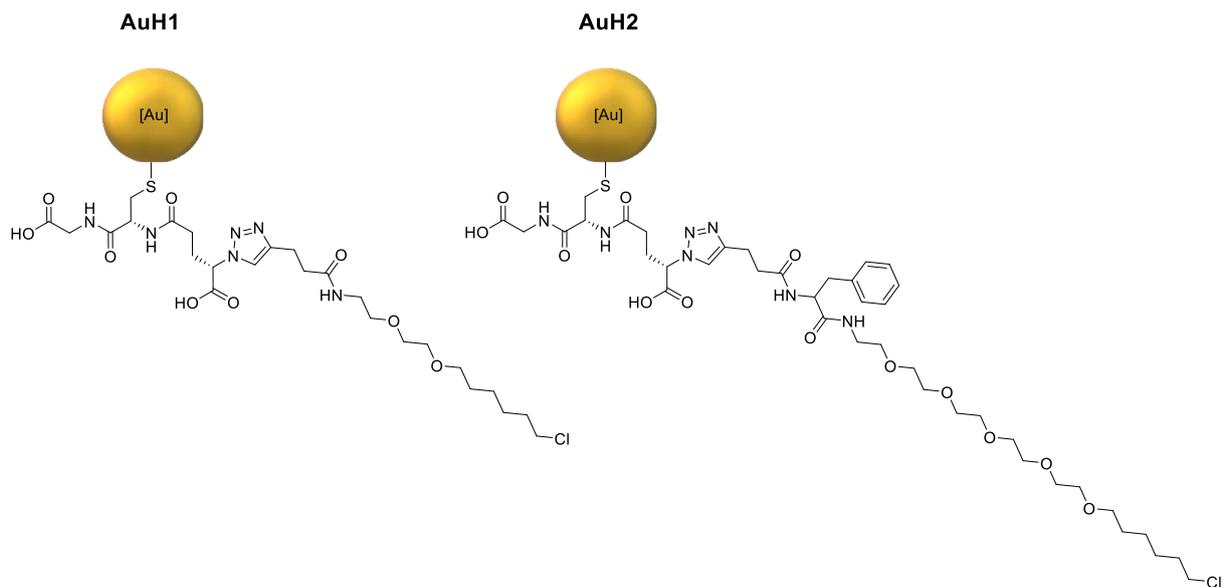
Die drei verwendeten AIE-Farbstoffe wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Voskuhl synthetisiert und analysiert. Die Liganden liegen jeweils als Salz vor, um die Löslichkeit in Wasser zu verbessern. Außerdem steigen in der Reihenfolge von **AIE-1** über **AIE-2** zu **AIE-3** auch die Größe und somit der erwartete Footprint der Liganden.

4. Experimentelles



Da diese drei Farbstoffe schlecht wasserlöslich sind, wurden sie alle in jeweils 1 mL DMSO vorgelöst (0.8 äq. zu N_3 , 3.88 μmol , 2.43 mg **AIE-1**; 2.44 mg **AIE-2**; 3.12 mg **AIE-3**). Die DMSO-AIE-Lösungen wurden jeweils zu 10 mL AuN_3 -Dispersionen (jeweils 2 mg Au, 41.11 nmol NP, 4.85 μmol N_3) gegeben und 10 min gerührt, bis sie nach der anfänglichen Erwärmung durch die DMSO-Wasser Mischung wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren. Dann wurden jeweils 0.388 mL der Cu-Stammlösung (0.08 äq. zu N_3 Cu, 0.77 äq. zu N_3 THPTA) ergänzt und die Reaktionen mit 1 mL Natriumascorbat-Lösung (0.77 äq. zu N_3 , 740 μg) gestartet. Nach 14 h wurden die Suspensionen analog zu AuAF647 mit Wasser auf <5 % DMSO aufgefüllt und über Spinfiltration aufgereinigt (87 % AuAIE-1, $m_{\text{Au}} = 1.74$ mg; 82 % AuAIE-2, $m_{\text{Au}} = 1.64$ mg; 89 % AuAIE-3, $m_{\text{Au}} = 1.78$ mg).

4.6.4. Goldnanopartikel mit HaloTag-Liganden (AuH1 und AuH2)

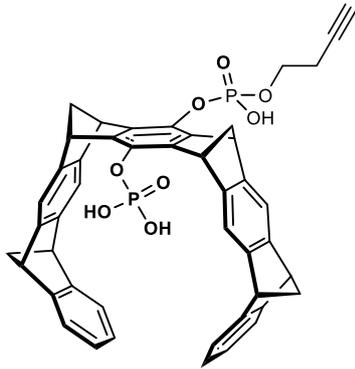


Analog zu den schwer wasserlöslichen AIE-Fluorophoren wurden die beiden HaloTag-Liganden **H1** und **H2** (0.4 äq., 1.94 μmol , 589.43 μg **H1**; 1131.33 μg **H2**) in jeweils 3 mL DMSO vorgelöst, bevor sie zur Reaktion mit den Nanopartikeln (jeweils 2 mg Au, 41.11 nmol NP, 4.85 μmol N₃) gebracht wurden. Von der Cu-Stammlösung wurden 388 μL (0.08 äq. zu N₃ Cu, 0.77 äq. zu N₃ THPTA) hinzugefügt, gefolgt von 0.1 mL Natriumascorbat-Lösung (0.77 äq. zu N₃, 740 μg). Anschließend wurden die Dispersionen zur Reaktion über Nacht für jeweils 14 h gerührt und am nächsten Tag mit Wasser auf <5 % DMSO verdünnt. Die funktionalisierten Nanopartikel wurden dann durch Spinfiltration in acht iterativen Schritten von ungeklicktem Liganden und restlichem DMSO aufgereinigt (76 % AuH1, $m_{\text{Au}} = 1.52$ mg; 83 % AuH2, $m_{\text{Au}} = 1.66$ mg).

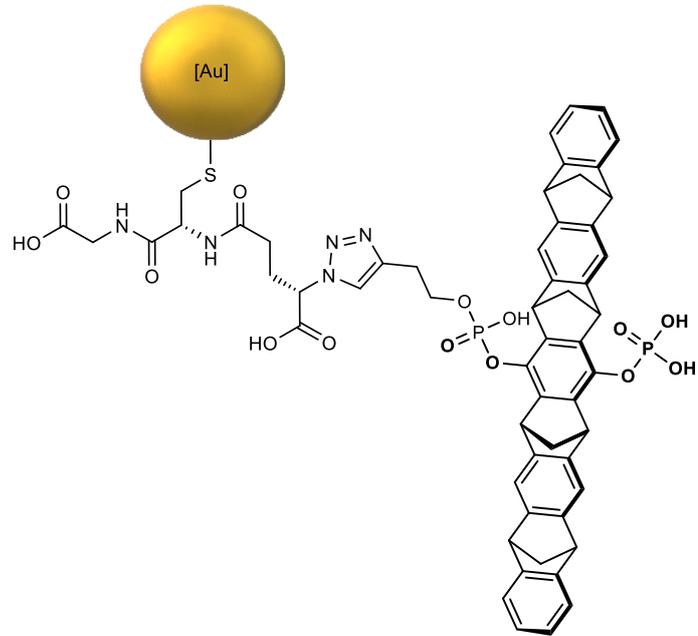
4.6.5. Goldnanopartikel mit molekularen Pinzetten (AuTweezer)

Der Monobutynyl-Tweezer (**CLR01**) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. T. Schrader bereitgestellt. Er verfügt über zwei Phosphorsäure-Gruppen, die in ihrer deprotonierten Form an positiv geladene Aminosäure in Proteinen koordinieren können, sowie über eine Alkin-Gruppe zur Anbringung an die Nanopartikel.

Butynyl-Tweezer (CLR01)



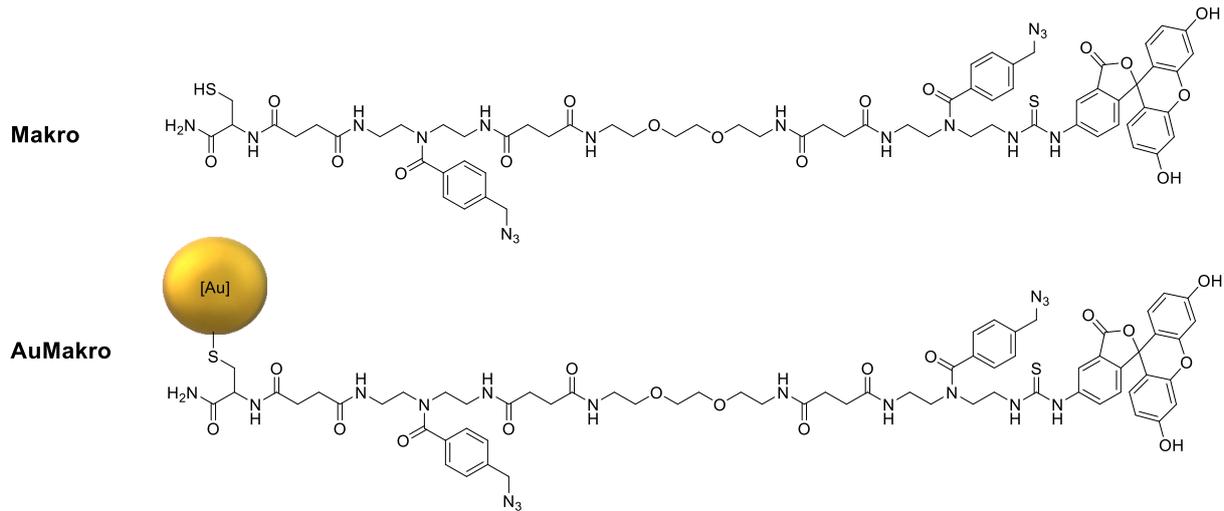
AuTweezer



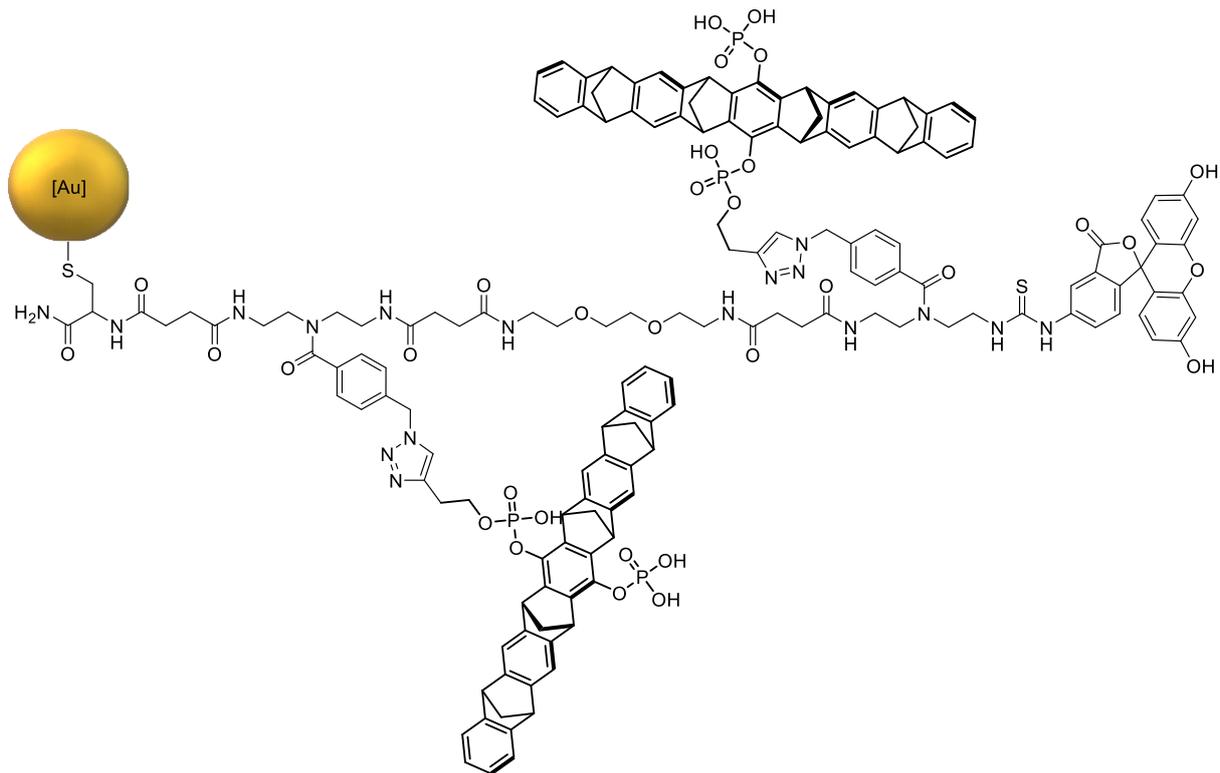
Für die Klickreaktion wurden zunächst AuN₃-Nanopartikel (2 mg Au, 41.11 nmol NP, 4.85 μmol N₃) in 5 mL Wasser vorgelegt. **CLR01** (0.4 äq. zu N₃, 1.94 μmol, 1,51 mg) wurde in 2 mL MeOH gelöst und zu den Nanopartikeln gegeben. 388 μL der Cu-Stammlösung (0.08 äq. zu N₃ Cu, 0.77 äq. zu N₃ THPTA) und Natriumascorbat (0.77 äq. zu N₃, 740 μg) wurden addiert und die CuAAC für 14 h über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurden die Nanopartikel über Spinfiltration analog zu AuFAM aufgereinigt (82 %, $m_{Au} = 1.64$ mg).

4.7. Goldnanopartikel mit makromolekularen Liganden (AuMakro-N₃)

Das Makromolekül wurde in der Arbeitsgruppe von *Prof. L. Hartmann* in Düsseldorf über Festphasensynthese hergestellt (vgl. Kapitel 5.8). Es verfügt über eine Thiol-Gruppe zur direkten Anbindung an die Goldoberfläche, sowie zwei Azid-Gruppen für folgende Funktionalisierung über CuAAC und einem terminalen Farbstoff.



Etwas von der anfangs hergestellten Tetrachlorogoldsäure (25.39 μmol , 5 mg Au) wurde auf 50 mL Wasser verdünnt. Die Lösung wurde mit 5 mL 0.1 M NaOH-Lösung basisch eingestellt. Das Makromolekül (1.2 äq., 30.47 μmol , 43.53 mg) wurde in 10 mL MeOH gelöst und zugegeben. Die Lösung wurde für 30 min gerührt, bevor 1 mL einer frisch angesetzten eiskalten NaBH_4 -Lösung (4 äq., 101 μmol , 3.84 mg) zugesetzt wurde. Es war ein leichter Farbumschlag von fluoreszierend gelb-grün ins Bräunliche mit grünem Schimmer zu beobachten. Die Nanopartikel wurden für weitere 30 min gerührt und dann in 3 kDa Amicon® Zentrifugenfiltern einmal mit 15 mL 0.1 M NaOH-Lösung und danach mit jeweils 15 mL Wasser für je 45 min bei 4000 rpm (2500 g) solange aufgereinigt, bis im Filtrat keine Fluoreszenz mehr zu verzeichnen war (ca. 12-15x) und saubere Partikel erhalten wurden (73 %, $m_{\text{Au}} = 3.65$ mg).

4.7.1. Tweezer-Funktionalisierung von AuMakro-N₃ (AuMakro-Tweezer)

Die zuvor hergestellten AuMakro-Nanopartikel (2 mg Au, 41.11 nmol NP, 6.17 μmol N₃) wurden auf 8 mL mit Wasser verdünnt. **CLR01** (0.4 äq. zu N₃, 2.47 μmol , 1.92 mg) wurde in 2 mL 0.1 M NaOH-Lösung aufgenommen und hinzugegeben. Anschließend wurden 494 μL der Cu-Stammlösung (0.08 äq. zu N₃ Cu, 0.77 äq. zu N₃ THPTA) und Natriumascorbat (0.77 äq. zu N₃, 941 μg) in 1 mL Wasser der Reaktion zugeführt, woraufhin über Nacht für 14 h gerührt wurde. Am nächsten Tag wurden die Nanopartikel analog zu AuTweezer aufgereinigt (93 %, $m_{\text{Au}} = 1.86$ mg).

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Glutathion-terminierte ultrakleine Goldnanopartikel (AuGSH)

Als Grundlage für die meisten Synthesen funktionalisierter Nanopartikel in dieser Arbeit dient das unechte Tripeptid Glutathion (GSH). GSH ist bereits seit einigen Jahren als sehr guter Ligand für Goldnanopartikel bekannt, da es über eine Thiolgruppe verfügt, die attraktive Wechselwirkungen zum metallischen Goldkern ausbildet. Außerdem sind in GSH zwei Carbonsäuregruppen enthalten, die für eine gute elektrostatische Stabilisierung sorgen.^[108] Zunächst wurde für die Synthese der Vorläufer Tetrachlorogoldsäure aus elementarem Gold hergestellt. Dazu wurde ein 5 g schwerer Barren aus 24 Karat Reingold in Königswasser in der Siedehitze gelöst und einmal mit Salzsäure abgeraucht, bevor die entstandenen orangefarbenen Nadeln in Wasser aufgenommen wurden. Die Konzentration des Goldes wurde mittels Flammen-AAS bestimmt und die nun analysierte Goldsäure wurde für die Synthesen der Nanopartikel verwendet.

Die Synthese der Nanopartikel selbst erfolgte *in situ*, d. h. in direkter Gegenwart zum stabilisierenden Liganden GSH. Die Gold(III)-Ionen aus der Goldsäure wurden dabei in Wasser zunächst von den Thiolen des GSH zu Gold(I)-Ionen reduziert. Dabei wird die Lösung trüb und milchig, da sich schwerlösliche oligomere Gold(I)-Thiolat-Ketten bilden.^[58] Nach einiger Zeit wurde dann das stärkere Reduktionsmittel Natriumborhydrid hinzugegeben, woraufhin eine bräunliche Suspension aus GSH-funktionalisierten ultrakleinen Goldnanopartikel entstand. Eine schematische Darstellung der Reaktion ist zur Veranschaulichung in Abbildung 11 dargestellt.

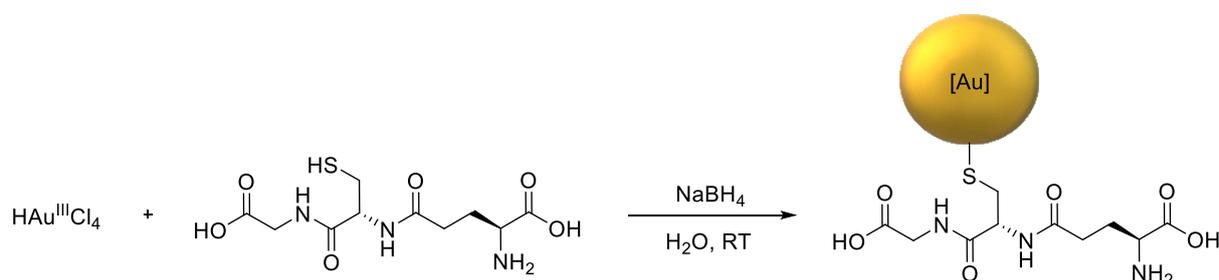


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Synthese von ultrakleinen Goldnanopartikel (Partikel und Ligand nicht maßstabsgetreu).

Dass bei der Reduktion mit einem starken Reduktionsmittel wie NaBH_4 ultrakleine Nanopartikel entstehen, lässt sich wie in Kapitel 2.2 dargestellt mit dem Modell nach LaMer beschreiben. Nach der Synthese der Partikel und Aufreinigung mittels

Spinfiltration muss das entstandene Produkt eingehend analysiert werden. Dabei werden die Partikel mittels DCS und HRTEM auf ihre Größe und mittels NMR-Spektroskopie auf ihre chemische Umgebung hin überprüft. Die UV-Vis-Spektroskopie dient dabei als indirekter Nachweis für die Größe, indem über ausbleibende Plasmonenresonanz zumindest die Existenz von größeren Partikeln ausgeschlossen werden kann. Außerdem muss für weitere synthetische Schritte die Konzentration der Partikel und der Liganden bekannt sein. Diese Werte wurden jeweils mittels AAS und NMR-Spektroskopie bestimmt.

Die UV-Vis-Spektroskopie eignet sich aufgrund der schnellen Durchführbarkeit sehr gut, um nach der Synthese eine Übersicht über die ungefähre Größe der Nanopartikel zu erhalten. Ultrakleine Nanopartikel zeigen im Gegensatz zu ihren größeren Äquivalenten keine Plasmonenresonanz. Plasmonenresonanz ist ein Phänomen, das auftreten kann, wenn Licht auf einen kleinen, leitfähigen Festkörper trifft. Das Bändermodell in Kombination mit dem Modell der Molekülorbitale eignet sich dabei gut, um die Plasmonenresonanz zu erklären. Als Plasmon wird allgemein eine orthogonal zur einfallenden elektromagnetischen Strahlung über den Festkörper schwingende Elektronenwolke beschrieben.^[50,51,52,109] Die Elektronen können dabei nur über den Kristall schwingen, wenn sie über mehrere Atome hinweg delokalisiert vorliegen können. Um das zu erklären, werden häufig die Molekülorbitaltheorie und das Bändermodell herangezogen. Elektronen liegen bei einzelnen Atomen immer auf diskreten Energieniveaus vor, d. h. durch die genau bestimmte potenzielle Energie, die sie elementspezifisch besitzen, ist der Abstand zum Atomkern als Konstante zu betrachten. Liegen nun mehrere Atome vereint als großes Molekül, oder wie in diesem Fall als metallischer Kristall vor, so interagieren die einzelnen Atomorbitale zu einem Molekülorbital. Bei einem Molekülorbital verändern sich die Energieniveaus der Atomorbitale, indem sie aufspalten. Zwei einfach besetzte Atomorbitale bilden demnach ein doppelt besetztes HOMO (höchstes besetztes Molekülorbital; *engl. highest occupied molecular orbital*) und ein leeres LUMO (tiefstes unbesetztes Molekülorbital; *engl. lowest unoccupied molecular orbital*).^[34,35]

Bilden viele einzelne Atome in diesem Zusammenschluss des Nanopartikels miteinander ein großes Molekülorbital, so rücken die entstehenden Energieniveaus in den aufgespaltenen oberen und unteren Bereichen immer näher zusammen. Sind genug Atomorbitale an dem Molekülorbital beteiligt, liegen die zuvor diskreten

Energieniveaus nicht mehr diskret vor, d. h. die Elektronen können durch die Niveaus tunneln. Sobald das möglich ist, ist allgemein die Rede von einem Band. Die entstehenden Bänder werden dabei ähnlich wie HOMO und LUMO eingeteilt, nur dass das energetisch höherliegende Band als Leitungsband und das tieferliegende als Valenzband bezeichnet wird. Elektronen im Valenzband sind energetisch noch an ihren Atomkern gebunden und dementsprechend nicht über den Kristall delokalisiert. Metalle wie Gold haben allerdings die Eigenschaft, dass sie leitfähig sind. Vereinfacht gesagt, bedeutet das, dass das Valenzband und das Leitungsband sich energetisch zumindest berühren, meistens aber sogar überlappen. Dadurch können die Elektronen über die Energieniveaus bis in den höchsten Zustand tunneln und liegen somit über den gesamten Nanopartikel delokalisiert vor. Wenn elektromagnetische Strahlung auf diesen leitfähigen Zusammenschluss einer ausreichend hohen Anzahl an Atomen trifft, so werden die Elektronen in das Leitungsband angehoben und es kann dazu kommen, dass die Oberflächenplasmonen in Resonanz mit der Frequenz des eingestrahlten Lichts treten. Dabei wird Licht mit einer entsprechenden Wellenlänge absorbiert und die Energie in Bewegungsenergie der Elektronen umgewandelt. Bei ultrakleinen Partikeln liegen jedoch nicht genug einzelne Atomorbitale zusammen, sodass die Bildung von Valenz- und Leitungsband ausbleibt. Dadurch bleiben hier die Elektronen weiterhin auf diskreten Energieniveaus und an ihren entsprechenden Atomkernen gebunden. Eine Leitfähigkeit und somit eine Oberflächenplasmonenresonanz ist also hier nicht möglich.^[50,51,52,109]

Dieses Ausbleiben der Plasmonenresonanz ist für die GSH-funktionalisierten Goldnanopartikel (AuGSH) in Abbildung 12 dargestellt und liefert somit den schnellen, indirekten Nachweis für die ultrakleine Größe der Probe.

Als direkte Nachweise für die Größe der Nanopartikel wurden die Scheibenzentrifuge (*engl. differential centrifugal sedimentation*, DCS), diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie (*engl. diffusion-ordered NMR-spectroscopy*, DOSY) und die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (*engl. high resolution transmission electron microscopy*, HRTEM) genutzt.

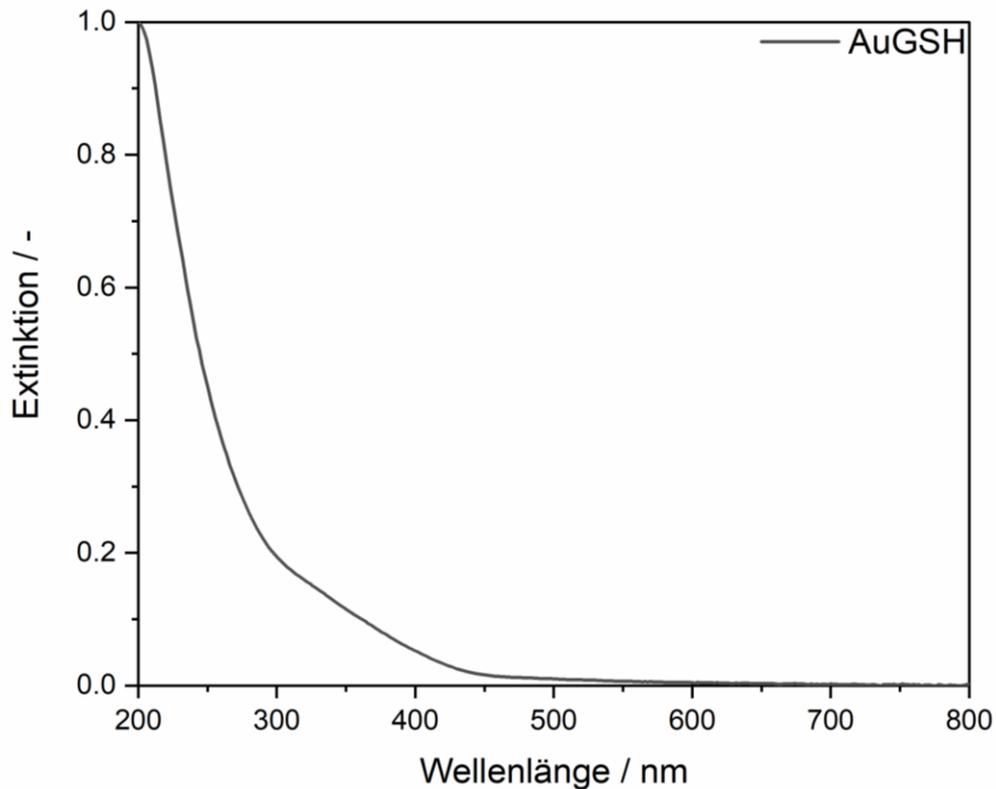


Abbildung 12: UV-Vis-Spektrum der AuGSH Partikel. Es ist keine Plasmonenbande bei 520 nm zu erkennen. Das kann als indirekter Nachweis für die ultrakleine Größe der Partikel gedeutet werden.

Abbildung 13 zeigt die normierte Anzahlverteilung der ultrakleinen AuGSH Partikel in der DCS, die mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $d_H = 1.5 \text{ nm} \pm 0.2 \text{ nm}$ in einem erwarteten Bereich von $<2 \text{ nm}$ liegen. Hier ist allerdings zu beachten, dass wie in Kapitel 3.3 erwähnt, der errechnete hydrodynamische Durchmesser der Partikel etwas unterschätzt wird. Das liegt daran, dass bei immer kleiner werdenden Partikeln die Diffusion durch das Lösemittel relativ betrachtet immer mehr Einfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit nimmt.^[110] Außerdem liegt hier ein systematischer Fehler vor, da die wirkliche Dichte der Partikel bedeutend geringer ist, als die für die Berechnung eingesetzte Dichte von elementarem Gold.

Verglichen mit der DCS liefert die DOSY also einen größeren Erwartungswert, da hier die Diffusion der Nanopartikel inklusive ihrer organischen Ligandenhülle im Lösemittel beobachtet wird. Nach Gleichung 10 entspricht der Betrag der Steigung der linearen Regression in der Stejskal-Tanner-Auftragung (Abbildung 14) dem translationalen Diffusionskoeffizienten D der Nanopartikel.

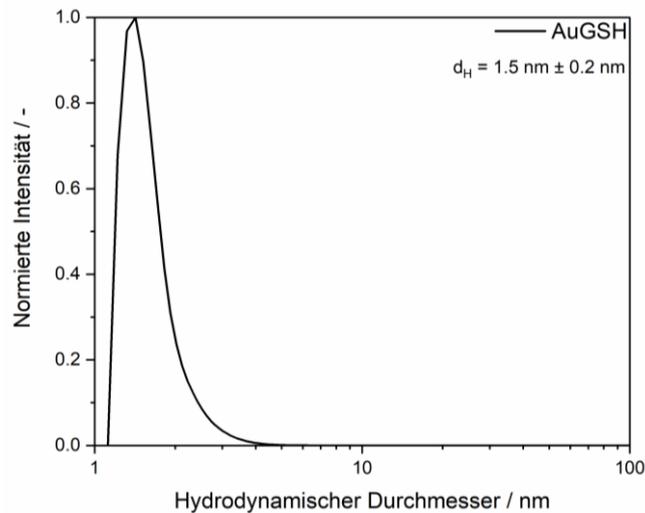


Abbildung 13: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit GSH.

Unter der durch HRTEM bestätigten Annahme, dass die Nanopartikel eine kugelförmige Morphologie aufweisen, kann mithilfe dieses Diffusionskoeffizienten zusammen mit der Boltzmann-Konstante k_B , der absoluten Temperatur T und der dynamischen Viskosität η des Lösemittel aus 10% D₂O in 90% H₂O über die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 9) der hydrodynamische Durchmesser d_H errechnet werden.

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} = \frac{1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} \cdot 298 \text{ K}}{3\pi \cdot 8.95 \cdot 10^{-4} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}} \cdot 1.467 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 3.32 \cdot 10^{-9} \text{ m} = 3.32 \text{ nm}$$

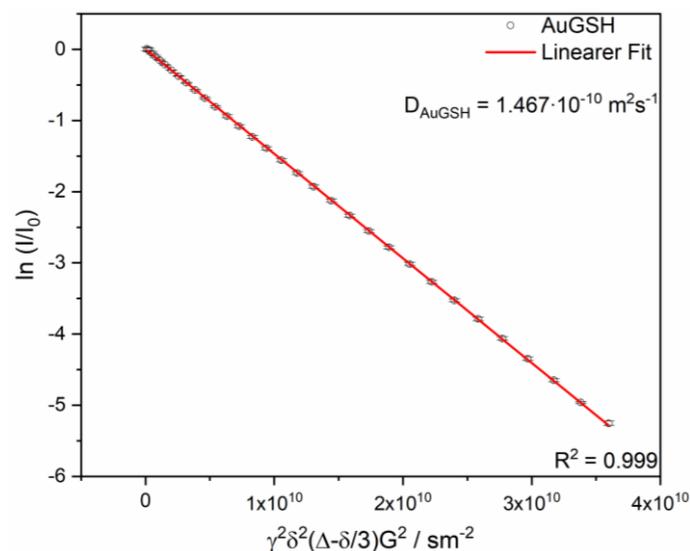


Abbildung 14: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuGSH (gemessen von *Dr. C. Beuck*). Der Betrag der Steigung entspricht nach Gleichung 10 dem translationalen Diffusionskoeffizienten der Nanopartikel.

Durch die HRTEM wird zudem ein kleiner Einblick in die Probe gewährt, der jedoch als nicht repräsentativ zu betrachten ist, da die betrachtete Menge nur einen sehr kleinen Bruchteil der gesamten Probe ausmacht. Allerdings liefert die atomscharfe Auflösung wertvolle Hinweise auf die Struktur und Form der Nanopartikel. Abbildung 15 zeigt eine HRTEM-Aufnahme der AuGSH Partikel sowie ein zugehöriges Histogramm, welches einen mittleren Kerndurchmesser von $d = 1,7 \text{ nm} \pm 0,9 \text{ nm}$ bei 510 manuell ausgemessenen Partikeln ergibt.

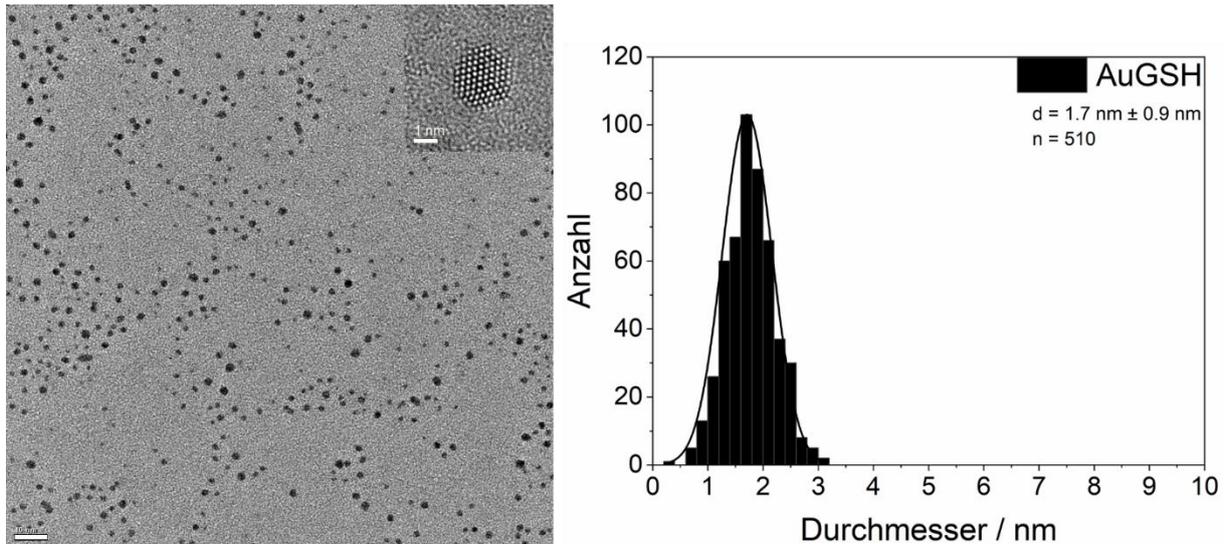


Abbildung 15: HRTEM-Aufnahme der GSH-funktionalisierten ultrakleinen Nanopartikel, erstellt von *Dr. K. Loza* im Forschungszentrum Jülich. Der Maßstab beträgt im großen Bild 10 nm, im kleinen Inset 1 nm. Es wurden 510 Partikel ausgemessen.

Anhand des HRTEM Bildes ist eine kugelförmige Überstruktur der Nanopartikel zu erkennen. Dies ist wichtig für andere Analysemethoden wie DOSY oder DCS, bei denen der hydrodynamische Durchmesser durch einen Diffusionskoeffizienten errechnet wird. Die Umrechnung erfolgt über die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 9), die nur für sphärische Partikel gilt. Dadurch, dass die Partikel aus dieser Synthese eine weitgehend runde Form aufweisen, kann den errechneten Größen also eine gewisse Signifikanz zugeordnet werden.

Neben der Größe der entstandenen Nanopartikel muss auch die chemische Umgebung betrachtet werden. Dazu wurde zunächst ein kleiner Teil der Partikelsuspension gefriergetrocknet. Der resultierende Feststoff wurde dann mittels Infrarotspektroskopie (IR) vermessen. Ein gutes Indiz für die Anlagerung von Glutathion an die Goldoberfläche ist das Verschwinden der Thiol-Streckschwingung bei $\tilde{\nu} = 2521 \text{ cm}^{-1}$.^[111] Aktuelle Arbeiten sprechen bei der Gold-Schwefel-Bindung von

einer Physisorption, also einer physikalischen Anlagerung des Schwefels an die Goldoberfläche.^[19,20] Dabei wird die S-H-Bindung so stark deformiert, dass die Bande für die Streckschwingung gänzlich verschwindet. Die beiden Amidbanden der C-O-Valenzschwingung bei $\tilde{\nu} = 1521 \text{ cm}^{-1}$ und der N-H-Deformationsschwingung bei $\tilde{\nu} = 1589 \text{ cm}^{-1}$ bleiben dabei vollständig erhalten,^[112] was ein Zeichen dafür ist, dass der Ligand lediglich über die Thiol-Gruppe an die Oberfläche des Nanopartikels anlagert.

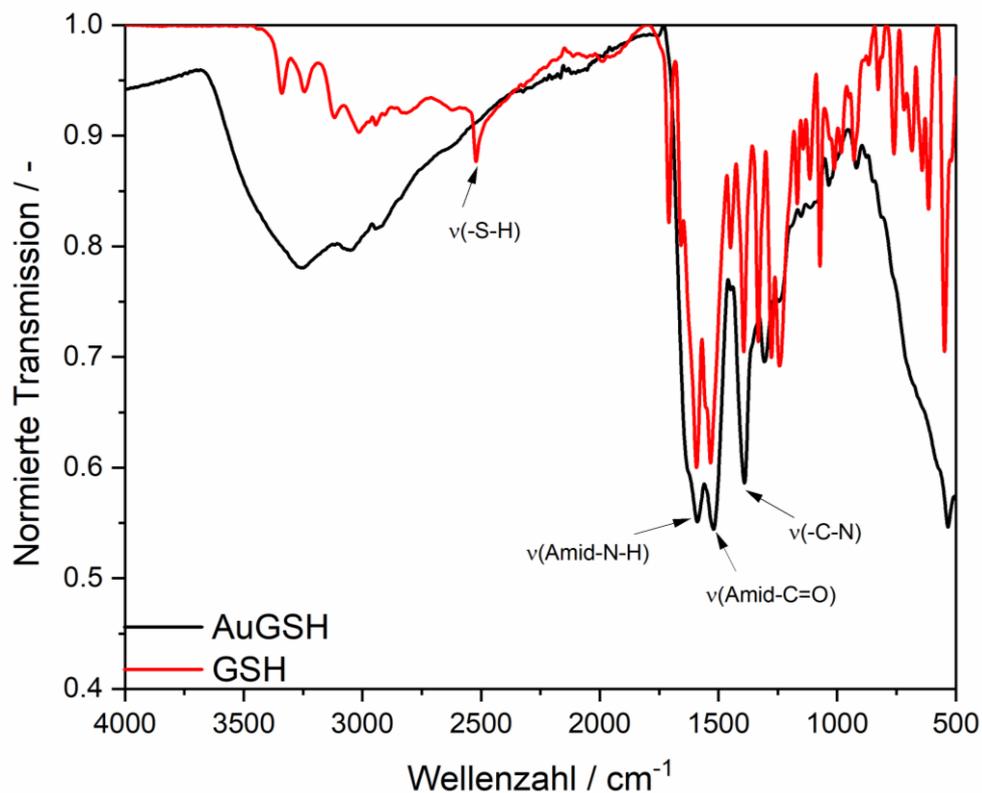


Abbildung 16: IR-Spektrum vom reinen Liganden GSH (rot) und den damit funktionalisierten Nanopartikeln AuGSH (schwarz). Die Thiolbande des Liganden ist verschwunden, was für eine erfolgreiche Anbindung an die Partikel spricht.

Nach diesen ersten Hinweisen für eine erfolgreiche Anlagerung von GSH an die Goldoberfläche kann die chemische Umgebung des Goldkerns noch weiter mittels verschiedener NMR-spektroskopischer Verfahren analysiert werden. NMR-Spektroskopie ist üblicherweise bei größeren Nanopartikeln nicht anwendbar, da durch eine Reduktion der Relaxationszeit der Kernspins die Signale stark verbreitert werden und entweder nicht mehr aufgelöst werden können, oder durch die Empfindlichkeit der Methode nicht mehr sichtbar gemacht werden können. Bei ultrakleinen Nanopartikeln mit einem Kerndurchmesser $< 2 \text{ nm}$ ist die Relaxationszeit allerdings noch in einem Rahmen, in dem das entsprechende Signal in verbreiteter Form noch gut abgebildet

werden kann.^[17,22] Die GSH-funktionalisierten Nanopartikel konnten dementsprechend mit dieser Methode vermessen und mit dem freien Liganden verglichen werden. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 17 dargestellt.

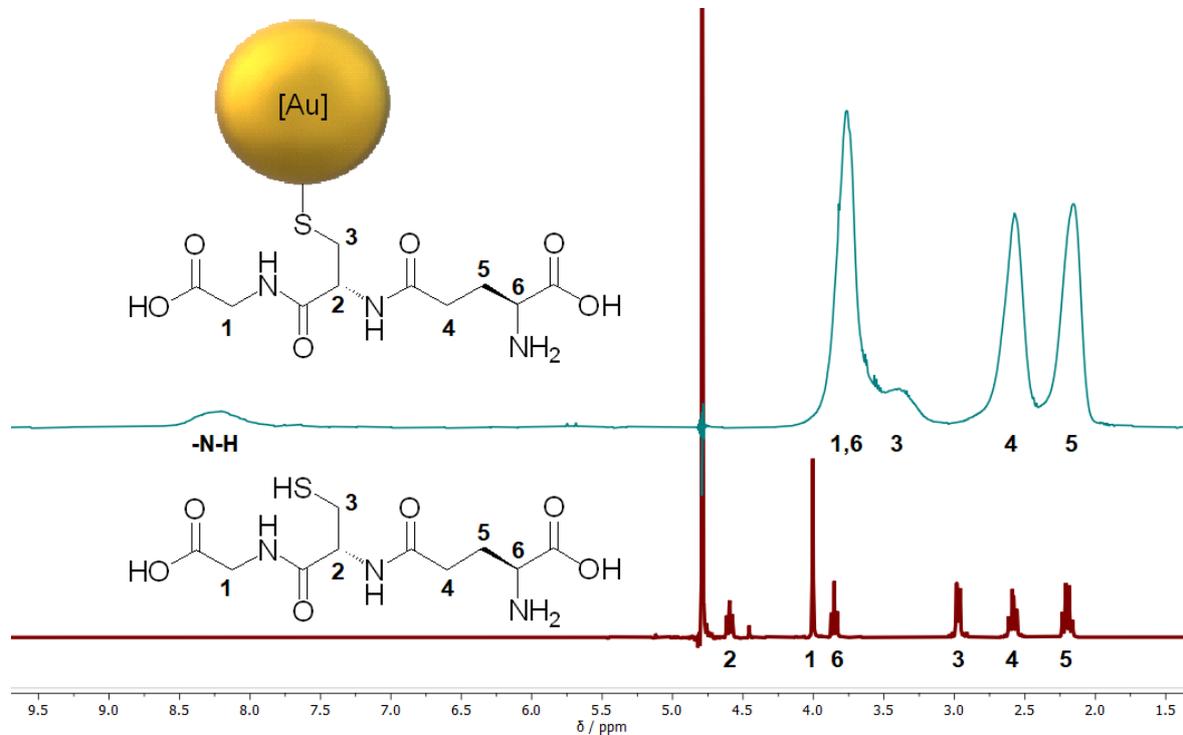


Abbildung 17: ^1H -NMR-Spektrum von GSH (400 MHz, 100% D_2O , pH 10) und AuGSH (400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).

Die Signalverbreiterung des Liganden am Nanopartikel ist deutlich zu erkennen. Durch die breiteren Signale gehen zudem jegliche Informationen über die Multiplizität der Signale verloren. Das Signal des Protons an der 2-Position ist vollkommen verloren gegangen, da es durch seine Nähe zum Wassersignal bei 4.79 ppm^[113] zusammen mit dem Wasser unterdrückt wurde. Azidene Protonen wie die der Amide sind beim freien Liganden nicht zu sehen, da dieser in 100% D_2O gelöst vermessen wurde. Azidene Protonen tauschen in protischen Lösemitteln mit den Protonen des Lösemittels aus, werden also hier hauptsächlich durch NMR-inaktive Deuteriumkerne repräsentiert und sind somit unsichtbar. Erst am Partikel werden diese Signale wieder sichtbar, da hier nur 10% D_2O verwendet wurde und der Rest weiterhin durch ^1H -Protonen ausgetauscht wird und somit im NMR-Spektrum erkennbar abgebildet werden kann. Die Signale der Protonen in 1- und 6-Position liegen beim ungebundenen GSH sehr nah aneinander. Dadurch fallen sie am Partikel ähnlich der Multiplizitäten der anderen Signale in einen großen, breiten Peak zusammen. Das Proton in 3-Position liegt zudem stark verschoben vor, da es durch die Nähe zum elektronenreichen Goldkern etwas

mehr vom äußeren Magnetfeld abgeschirmt wird. Die Signale der Methylengruppen an 4- und 5-Position zeigen breite singuläre Signale, die erst in der Basis zusammenlaufen. Diese Signale eignen sich aufgrund ihrer Abgeschlossenheit von den anderen Signalen und genau bekanntem Integral von vier Protonen am besten für eine quantitative NMR-Analyse. Dazu wurden 7.48 mg der Partikel gefriergetrocknet und anschließend in 540 μL D_2O aufgenommen und mit 60 μL 20 mM Maleinsäure (MA) in D_2O (Stammlösung: 232.2 mg / 100 mL) versetzt. Das entsprechende NMR-Spektrum ist in Abbildung 18 gezeigt.

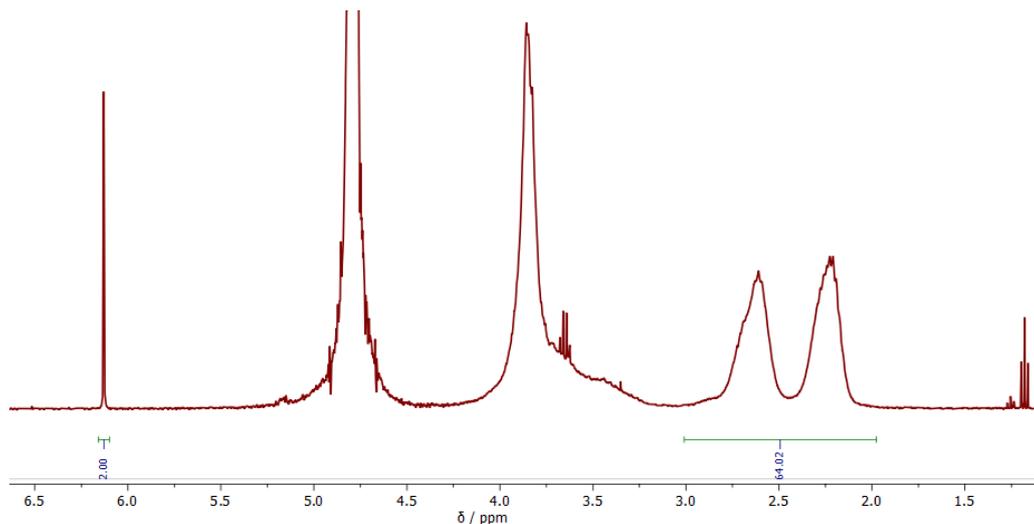


Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektrum von AuGSH (400 MHz, 100% D_2O , pH 10) zur quantitativen Bestimmung der Liganden-Konzentration. Die Partikel wurden nach Trocknung in 540 μL D_2O redispergiert und mit 60 μL 20 mM Maleinsäure in 100% D_2O ergänzt. Die finale Konzentration von Maleinsäure betrug 2 mM, die der Nanopartikel betrug 256.08 μM . Bei 4.79 ppm ist das Signal von restlichem H_2O und HDO zu erkennen. Außerdem ist während der Gefrier Trocknung Ethanol (Triplet bei 1.17 ppm und Quartett bei 3.65 ppm) als unrelevante Verunreinigung auf die Partikel übergegangen.

In den 600 μL Probenvolumen liegt nun eine Konzentration von 2 mM MA (c_{MA}) vor. Maleinsäure besitzt genau zwei chemisch und magnetisch äquivalente Protonen, die in einem Singulett bei 6 ppm zusammenlaufen. Da die Konzentration und die Anzahl der Protonen hier bekannt sind, wird das Integral der Protonen der Maleinsäure auf $\int MA = 2$ gesetzt. Anschließend können relativ dazu Rückschlüsse auf die Konzentration von GSH gezogen werden, indem das Integral der vier Protonen an der 4- und der 5-Position betrachtet wird. Für ein 1:1-Verhältnis zu Maleinsäure müsste das Integral der Protonen von GSH ($\int 4,5$) also genau vier ergeben. Da das nicht der Fall ist, kann über das Verhältnis zum Soll-Wert und über die bereits bekannte

Konzentration von MA die tatsächlich vorliegende Konzentration c_{GSH} berechnet werden.

$$c_{GSH} = \frac{4,5}{4} \cdot c_{MA} = \frac{64.02}{4} \cdot 2 \text{ mM} = 32.01 \text{ mM}$$

Um nun die Anzahl der Liganden pro Nanopartikel zu bestimmen, muss die Konzentration der Goldnanopartikel c_{NP} bestimmt werden. Es wurden genau 7.48 mg bezogen auf Gold gefriergetrocknet und für die Messung redispergiert. Über die Dichte $\rho_{Au} = 19302 \text{ kg/m}^3$ ^[114] von Gold und das Volumen V_{NP} eines Nanopartikels kann dann die Konzentration der Nanopartikel bestimmt werden. Der Radius der Partikel r wird dabei mit 1 nm nur näherungsweise beschrieben um eine gewisse Vergleichbarkeit über die Oberflächenbeladung der Partikel mit verschiedenen Liganden zu erhalten.^[17,22]

$$c_{NP} = \frac{c_{Au}}{N_A \cdot \rho \cdot V_{NP}} = \frac{c_{Au}}{N_A \cdot \rho \cdot \frac{4}{3} \pi r^3} = \frac{12.46 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{N_A \cdot 19302 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot (10^{-9} \text{ m})^3} = 256.08 \text{ } \mu\text{M}$$

Sobald beide Konzentrationen bekannt sind, kann die Anzahl N_{GSH} der Liganden pro Partikel über das Verhältnis der beiden Werte errechnet werden.

$$N_{GSH} = \frac{c_{GSH}}{c_{NP}} = \frac{32.01 \text{ mM}}{256.08 \text{ } \mu\text{M}} = 125$$

Diese 125 Liganden auf der Oberfläche des Goldkerns benötigen auch einen gewissen Raum. Um vergleichbare Werte diesbezüglich zu generieren wird daher die Oberfläche A berechnet, die jeder Ligand für sich beansprucht.

$$A_{NP} = 4\pi r^2 = 4\pi \cdot (1 \text{ nm})^2 = 12.57 \text{ nm}^2$$

$$A_{GSH} = \frac{A_{NP}}{N} = \frac{12.57 \text{ nm}^2}{125} = 0.1 \text{ nm}^2$$

Zusätzlich zum ^1H -NMR-Spektrum wurde von den GSH-funktionalisierten Nanopartikeln ein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit von nur rund 1.1% und der geringen Empfindlichkeit des ^{13}C -Kerns generell, ist hier allerdings eine hohe Probenmenge notwendig. Die im Folgenden aufgezeigten ^{13}C -NMR-Spektren wurden alle mit eine auf Gold bezogenen Konzentration von ca. 25 g/L vermessen, also rund 15 mg Gold in den 600 μL Probenvolumen des NMR-Röhrchens. Das entsprechende ^{13}C -Spektrum ist in Abbildung 19 dargestellt. Die am

stärksten entschützten ^{13}C -Kerne sind die, die in direkter Nachbarschaft ein über eine Doppelbindung gebundenes Sauerstoff-Atom aufweisen, also die Carbonyl-Kohlenstoffe. Der Sauerstoff kann über mesomere Wechselwirkungen durch die Doppelbindung sowie seine deutliche höhere Elektronegativität^[34,35] viel Elektronendichte aus den ^{13}C -Kernen ziehen, weshalb diese Kohlenstoffe sehr weit ins Tieffeld des Spektrums verschoben sind. Ansonsten ist vor allem anzumerken, dass die Signale für die Kohlenstoffe in 2- und 3-Position sehr stark verbreitert vorliegen. Diese Kohlenstoffe gehören zur goldbindenden Cysteineinheit des Glutathions und liegen daher in direkter Nachbarschaft zum metallischen Kern. Ähnlich wie im ^1H -NMR-Spektrum sind diese Kohlenstoffe am stärksten durch die Signalverbreiterung durch die verkürzte Kernspinrelaxationszeit betroffen.

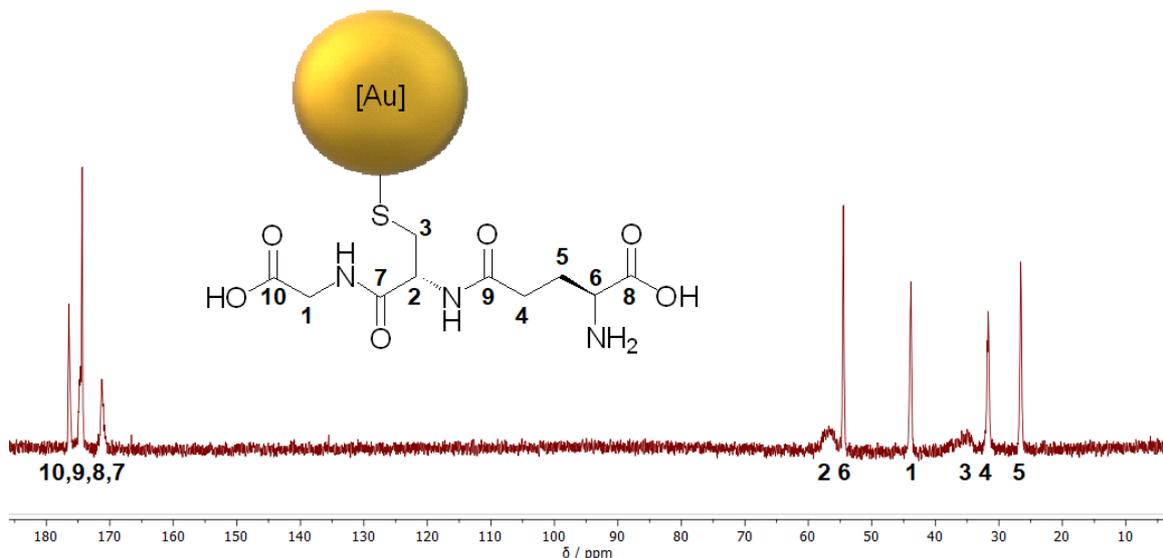


Abbildung 19: ^{13}C -NMR-Spektrum der GSH-funktionalisierten Nanopartikel (600 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).

Über ein ^{13}C -DEPT135-Spektrum können zudem einige Phaseninformationen über die Kohlenstoffe gewonnen werden. In dieser Messmethode werden CH_2 -Gruppen negativ, sowie CH - und CH_3 -Gruppen positiv dargestellt, wodurch weitere Informationen über die Struktur gewonnen werden können. Quartäre Kohlenstoffe wie die der Carbonyle werden hingegen gar nicht dargestellt.^[115] Ein entsprechendes Spektrum für die AuGSH Partikel ist in Abbildung 20 dargestellt. Mit dieser Methode können nun die beiden Kohlenstoffe der 2- und 3-Position voneinander unterschieden werden. C-3 als CH_2 -Kohlenstoff zeigt im DEPT135 ein negatives Signal und kann daher eindeutig dem verbreiterten Signal bei 35 ppm zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu kann das verbreiterte Signal bei 57 ppm dann eindeutig dem CH -

Kohlenstoff an der 2-Position zugeordnet werden. Außerdem ist C-6 als stereomeres Kohlenstoffatom eindeutig bei 55 ppm nachzuweisen.

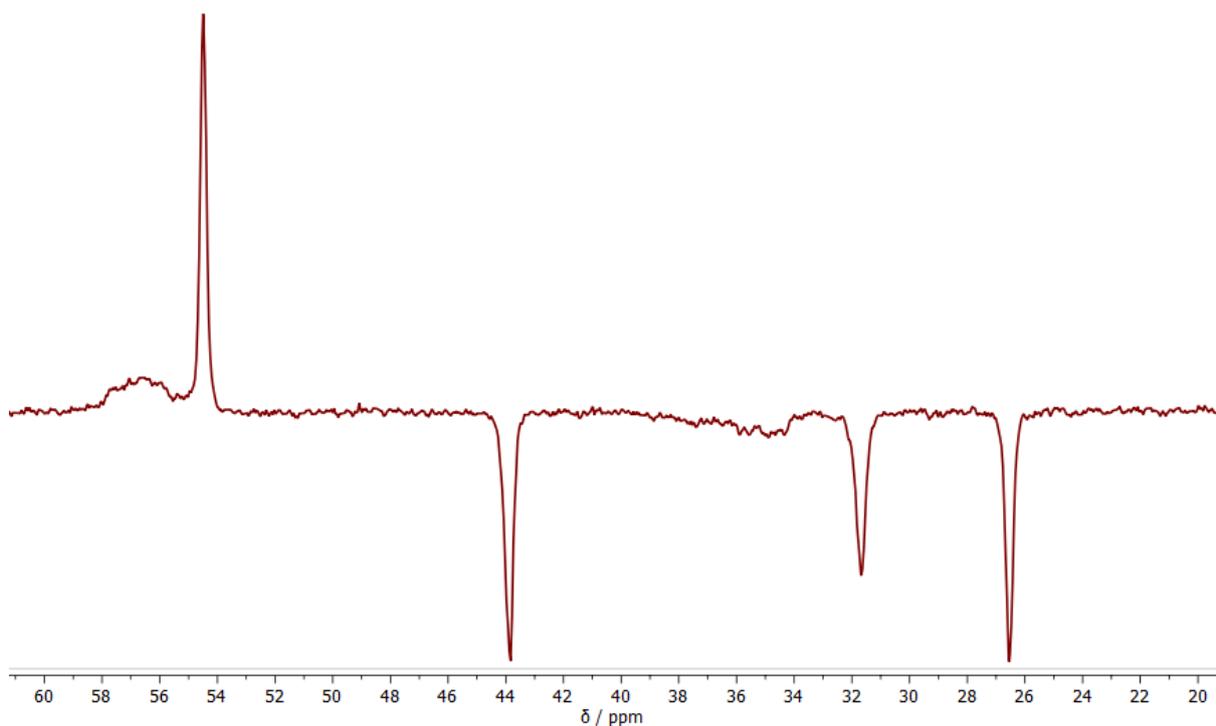


Abbildung 20: ^{13}C -DEPT135-NMR-Spektrum von AuGSH Nanopartikeln (600 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).

Zweidimensionale NMR-Spektroskopie liefert zudem Auskünfte über die genaue Struktur des Liganden. In einem ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum werden Korrelationsignale von direkt zueinander benachbarten Protonen angezeigt. Dadurch kann weiterhin zwischen den Protonen an der 4- und 5-Position unterschieden werden. Die beiden Protonen an der 5-Position sollten demnach ein Korrelationssignal zu dem großen, breiten Signal bei 3.8 ppm zeigen, da hier in diesem Bereich auch das stereomere Proton der 6-Position liegt. Dieser Zusammenhang ist deutlich in Abbildung 21 zu erkennen. Außerdem sollte das H-6 keine Korrelation zu den Protonen der 4-Position zeigen, wobei H-4 und H-5 wiederum eine starke Korrelation zueinander aufweisen.

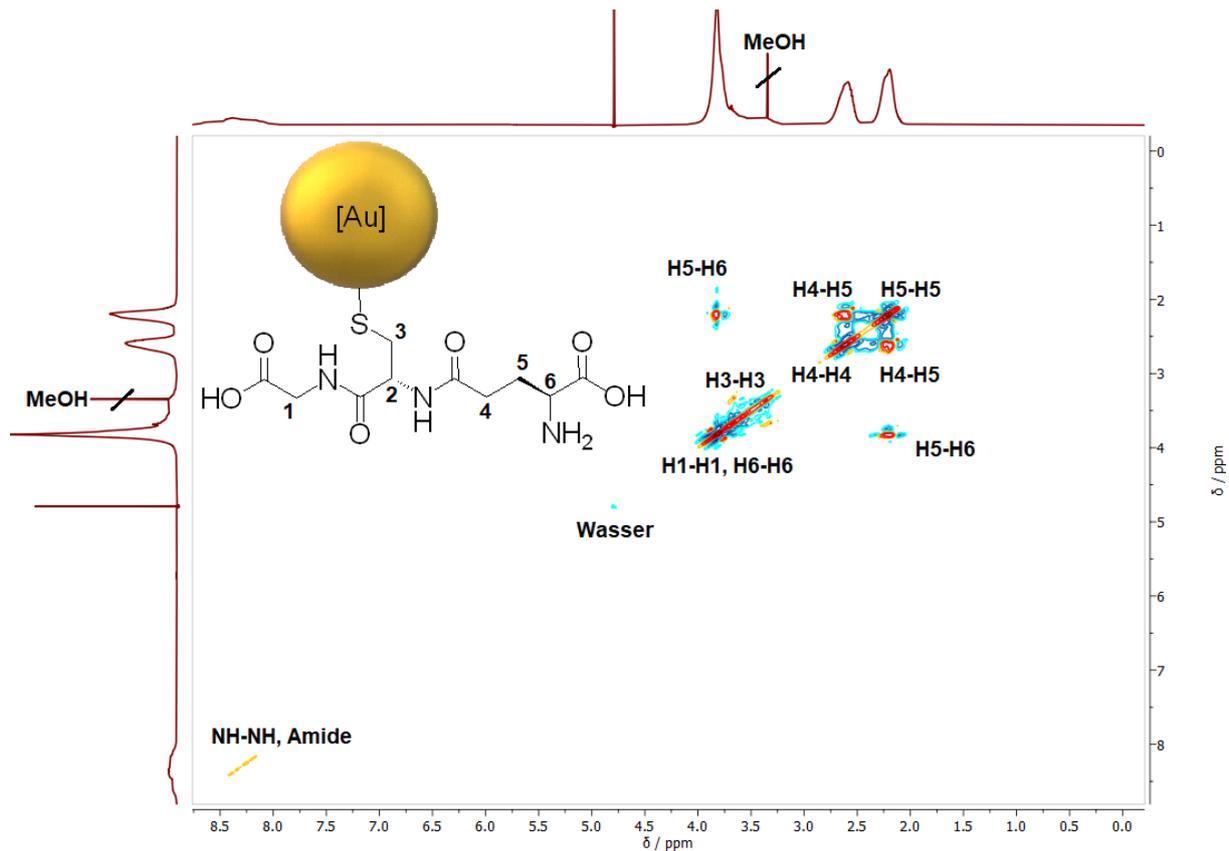


Abbildung 21: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von AuGSH Nanopartikeln. Kleine Reste von Methanol sind noch in der Probe zu finden, da die Nanopartikel in Spinfiltern aufgereinigt wurden, die vorher mit einer Methanol-haltigen Lösung ausgespült wurden.

Da nun die Zuordnung der Protonensignale der 4- und 5-Position erfolgreich war, können auch die Kohlenstoffe aus der vorherigen Zuordnung vollständig bestätigt werden. Dies ist mit Hilfe des ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrums möglich. Bei einem ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum wird ein zweidimensionales Korrelationsspektrum von ^1H - und ^{13}C -Kernen aufgetragen. Die entsprechenden eindimensionalen Spektren wurden bereits in den Abbildungen 17 und 19 dargestellt. Das Korrelationsspektrum ist in Abbildung 22 zu sehen. Hier sollten Korrelationssignale nur für direkt zueinander benachbarte ^1H - und ^{13}C -Kerne zu sehen sein, d. h. alle Signale in dem zweidimensionalen Spektrum stammen von unterschiedlichen Kernen an derselben Position im Liganden. Das verbreiterte Signal des Kohlenstoffs C-2 zeigt keine Korrelationen, da das Signal des zugehörigen Protons vollständig von der Wasserunterdrückung der Messung herausgerechnet wurde. Das Signal des Kohlenstoffs C-3 zeigt hingegen eine schwache Korrelation zum Wasserstoff H-3, da die Intensität des Wasserstoffatoms durch die direkte Nähe zum Goldkern stark beeinträchtigt wird.

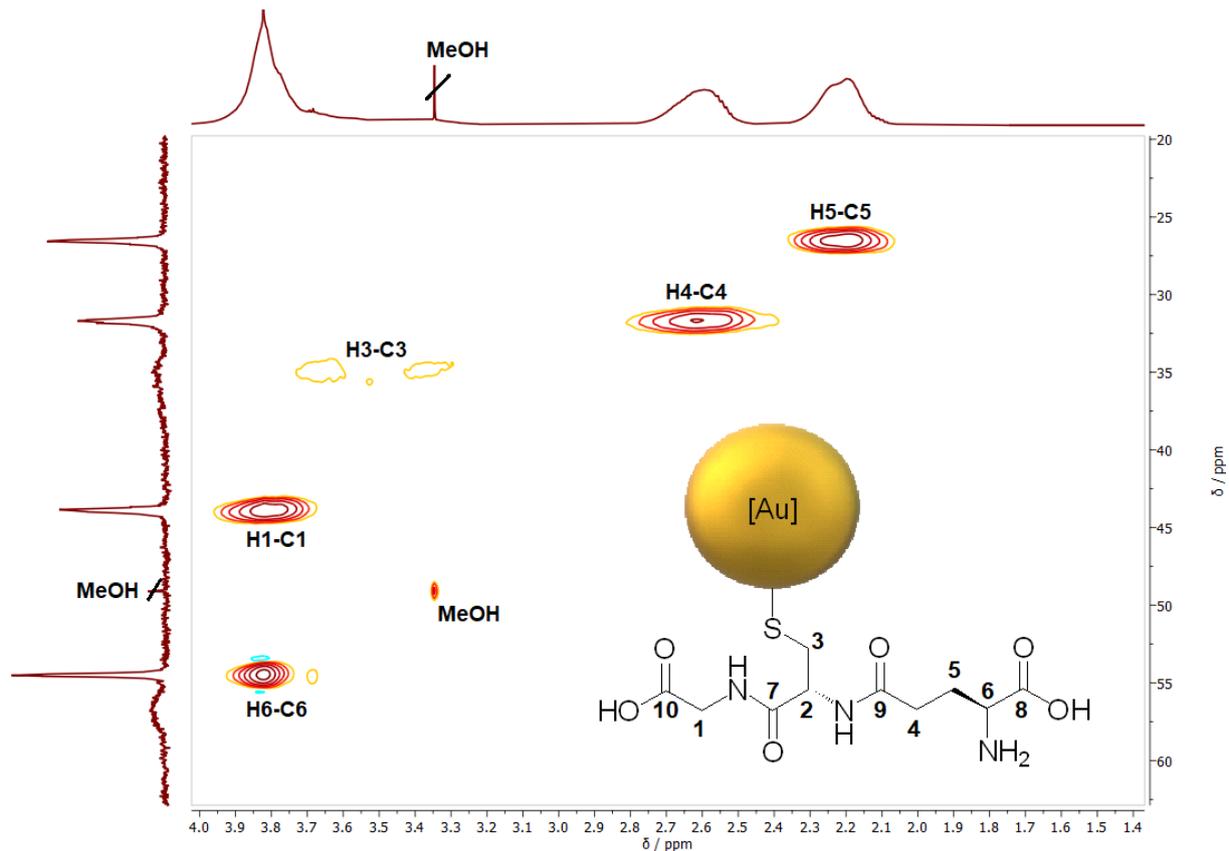


Abbildung 22: ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von ultrakleinen AuGSH Nanopartikeln. Durch die ausgiebige NMR-spektroskopische Untersuchung konnte die Ligandenhülle der ultrakleinen GSH-funktionalisierten Nanopartikel vollständig bestimmt werden. Die Partikel bewegen sich in einem ultrakleinen Größenbereich von <2 nm, was indirekt durch UV-Vis-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie, sowie direkt durch DCS und HRTEM bestätigt werden konnte. Das Ausbleiben der Plasmonenbande im UV-Vis-Spektrum bestätigt die Abwesenheit größerer Partikel. Die NMR-Spektroskopie bestätigt wiederum, dass auch Partikel im ultrakleinen Größenbereich vorliegen, da größere Partikel durch die immens erhöhte Kernspinrelaxationszeit keine auswertbaren Spektren liefern würden. Beide Methoden in Kombination mit der DCS und HRTEM bestätigen also den Erhalt ultrakleiner Nanopartikel, die zudem mit GSH funktionalisiert waren.

5.2. Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat (ISA)

In dieser Arbeit sollen die Partikel mit GSH als Gerüst dienen, um unterschiedliche funktionelle Liganden an der Goldoberfläche zu immobilisieren. Dazu muss an der organischen Ligandenhülle der Nanopartikel eine Möglichkeit geschaffen werden, weitere synthetische Schritte zur Funktionalisierung einzugehen. Zunächst bietet sich augenscheinlich eine einfache Peptidkupplung über die beiden Säuregruppen oder die Aminogruppe an, allerdings stellt diese Art der Funktionalisierung bei dem vorliegenden System ein Problem dar. Die Nanopartikel liegen nach der Synthese für gewöhnlich in einem basischen, wässrigen Dispersionsmedium vor. Daher würde eine standardmäßige Peptidkupplung über die Aktivierung der Carbonsäure mittels Aktivestern^[116] nur sehr geringe Ausbeuten bringen bzw. nicht funktionieren, da die aktivierten Carbonsäureester direkt wieder zur einfachen Carbonsäure hydrolysiert werden würden.^[117]

Eine mögliche Lösung für diese Problem liefert die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (kurz: CuAAC), auch Kupfer-Klick-Reaktion genannt. Eine Klick-Reaktion findet per Definition in milden Reaktionsbedingungen mit hohen Ausbeuten statt und kann in der Regel auch in Wasser durchgeführt werden. Dadurch bildet sie die optimale Grundlage für den Umgang mit Biomolekülen und Molekülen bzw. funktionellen Liganden, die später in biologischen Systemen Anwendung finden sollen. Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, ist die CuAAC mit Kupfer außerdem auch noch selektiv für ein 1-4-disubstituiertes Produkt, bei dem das Azid und das Alkin über ein neu geformtes Triazol miteinander kovalent verbunden werden. Die CuAAC an Nanopartikeln ist noch relativ neu in der Forschung. Vorangegangene Arbeiten berichten jedoch von erfolgreich synthetisierten Produkten.^[118]

Um GSH-funktionalisierte Nanopartikel als etablierte, sehr stabile Partikelsysteme für die Anwendung der CuAAC kompatibel zu machen, muss demnach also eine Azid-Gruppe in den Liganden eingeführt werden. In der Literatur lassen sich für die Umwandlung von Aminogruppen zu Aziden einige potenziell anwendbare Syntheserouten finden.^[104] Die meisten davon beinhalten den sog. Diazo-Transfer, bei dem von einer vorhandenen Azidogruppe eines Donor-Moleküls zwei Stickstoffe auf das freie Amin eines Akzeptor-Moleküls übertragen werden. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig erforscht, jedoch konnte mittels ¹⁵N-NMR-Spektroskopie bestätigt werden, dass lediglich zwei Stickstoffe übertragen werden und keine

vollständige Substitution der Aminogruppe durch ein Azid stattfindet.^[119,120] Ein vorgeschlagener Mechanismus für diese Transferreaktion ist in Abbildung 23 dargestellt.

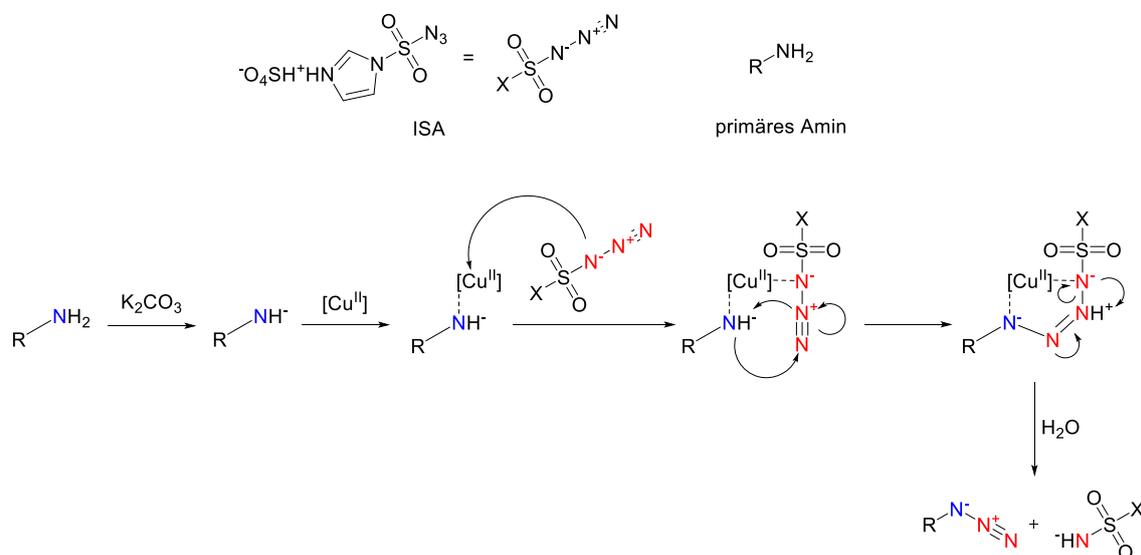


Abbildung 23: Mit Hilfe von ¹⁵N-NMR-Spektroskopie ermittelter Vorschlag für eine mögliche Syntheseroute zur Azidierung einer Aminogruppe mittels Diazotransfer (adaptiert aus Literatur^[121]).

Ein Molekül, das für diese Transferreaktion geeignet ist, ist das Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat (kurz: ISA). Die Synthese von ISA ist vergleichsweise einfach und an zwei Tagen als Eintopfreaktion durchführbar. Wie andere Azide jedoch auch, gilt das Produkt als potenziell explosiver Gefahrstoff und muss daher mit besonderer Vorsicht gehandhabt werden (vgl. Kapitel 4.1.1). Während der Synthese können zudem äußerst explosive Nebenprodukte wie Stickstoffwasserstoffsäure (HN₃) und Sulfuryldiazid (SO₂(N₃)₂) entstehen, weshalb durchgehend ein hohes Maß an Aufmerksamkeit erforderlich ist. Sollte es während der Synthese zu ungewöhnlichen Geräuschen (z. B. eine Art „Zischen“) oder anderen Hinweisen auf Gefahr kommen, ist die Reaktion unverzüglich mit Wasser zu neutralisieren und als azidhaltiger Abfall wie in Kapitel 4.1.1. beschrieben zu entsorgen.

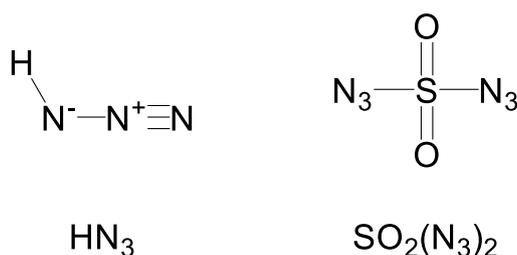


Abbildung 24: Potenzielle Nebenprodukte bei der Synthese von ISA.

Nachdem die Reaktionslösung über Nacht unter Inertatmosphäre gerührt wurde, musste schließlich Imidazol als Feststoff hinzugegeben werden. Dies sollte sehr langsam und kontrolliert geschehen, da bei der nukleophilen Substitution von Azidosulfurylchlorid an Imidazol ein Proton von Imidazol abgespalten wird, welches mit potenziell nicht reagiertem Natriumazid zu HN_3 reagieren kann (vgl. Reaktion von NaN_3 mit Säuren) und als giftiges und explosives Gas aus dem Reaktionsgefäß emporsteigt.

Nach der vollständigen Zugabe von Imidazol und Abklingen der vorgeschriebenen Reaktionszeit wurde die Reaktion mit einer gesättigten, wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung abgebrochen und neutralisiert. Vor dem Ausschütteln war auch hier unbedingt darauf zu achten, dass der pH-Wert der Lösung im basischen Bereich ($\text{pH} > 8$) liegt, da auch hier ansonsten wieder Explosionsgefahr besteht.

Im Vergleich zum korrespondierenden Hydrochlorid-Salz stellt das gewonnene Produkt eine deutlich geringere Gefahr dar, da es weniger hygroskopisch und auch weniger anfällig für Hitzeeinwirkung und mechanische Belastung ist.^[103,104]

Nach dem Ausfällen mit Schwefelsäure wird das finale Produkt als reaktionsträges Dihydrogensulfat-Salz getrocknet. Der Feststoff aus weißen, nadelförmigen Kristallen zeichnet sich durch einen unangenehmen, stechenden Geruch aus, welcher auch bei fortwährender Trocknung nicht gänzlich verschwindet. Das Produkt wurde mit einem restlichen Ethylacetat-Gehalt von ca. 1 mol% (bestimmt über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie) gelagert. Zum einen, da sich das restliche Lösemittel auch bei Trocknung über einen ganzen Tag an der Hochvakuumpumpe nicht entfernen ließ, zum anderen aber auch, damit das Produkt nicht vollständig trocknet und somit reaktiver wird. Das restliche Ethylacetat stellte sich auch bei Anwendung des Produktes nicht als Problem heraus.

Nachdem ISA aus der Reaktion gewonnen und getrocknet wurde, konnte es schließlich vollständig analysiert werden. Dazu wurden verschiedene Methoden angewandt. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 25) zeigt die erwarteten drei Signale der Protonen des Imidazol-Rings, sowie kleinere Signale für Ethylacetat. Die Signale 2 und 3 sind entsprechend der direkten Nachbarschaft zueinander als Doubletts zu erkennen, Signal 1 zeigt durch die starke Abschirmung ein Singulett.

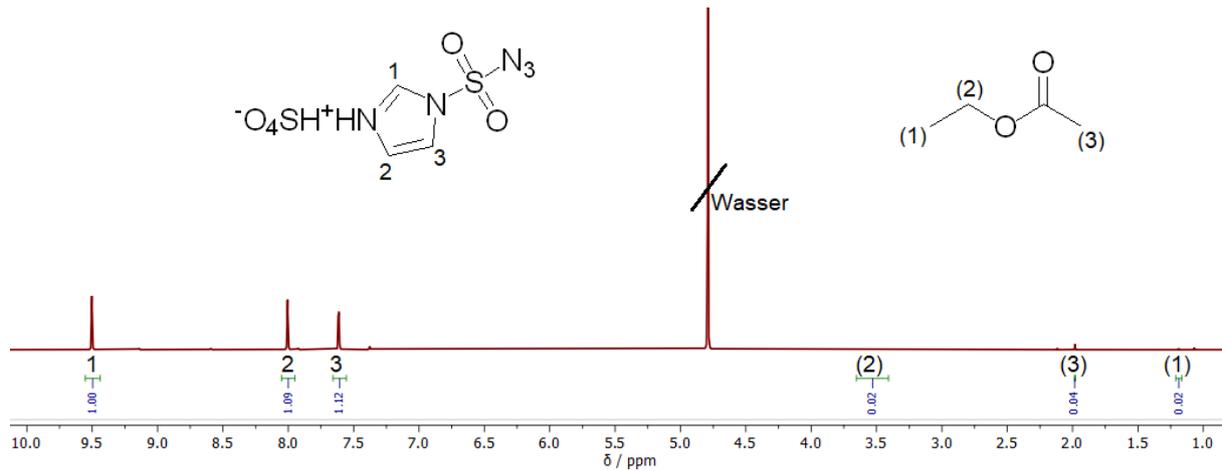


Abbildung 25: ^1H -NMR-Spektrum von ISA (400 MHz, 100% D_2O) mit restlichem Ethylacetat (Signale in Klammern).

Aus den Integralen kann analog zu der Berechnung der GSH-Konzentration in Kapitel 5.1 nun der Anteil an Ethylacetat in der Gesamtprobe ermittelt werden. Dazu wird das Integral $\int(3)$ der CH_3 -Gruppe in (3)-Position genommen. Für ein 1:1-Verhältnis zu ISA müsste dieses Integral relativ zu denen der ISA-Protonen einen Betrag von drei annehmen. Hier ist es allerdings viel geringer, sodass der molare Anteil von Ethylacetat χ_{EtOAc} über einen Dreisatz berechnet werden muss.

$$\chi_{\text{EtOAc}} = \frac{\int(3)}{3} \cdot 100\% = \frac{0.04}{3} \cdot 100\% = 1.3\%$$

Zusätzlich zum ^1H -NMR-Spektrum wurde auch ein ^{13}C -NMR-Spektrum (Abbildung 26) zur weiteren Analyse aufgenommen. Analog zum ^1H -NMR-Spektrum sind auch hier drei Signale zu erkennen, die den Kohlenstoffatomen des Imidazolrings zugeordnet werden können. Die Kohlenstoffe des verbliebenen Ethylacetats sind hingegen nicht zu erkennen, da zusätzlich zu dem geringen molaren Anteil an der Gesamtprobe die natürliche Häufigkeit, sowie die generelle Empfindlichkeit der Kerne dann nicht mehr ausreicht um entsprechend abgebildet zu werden.

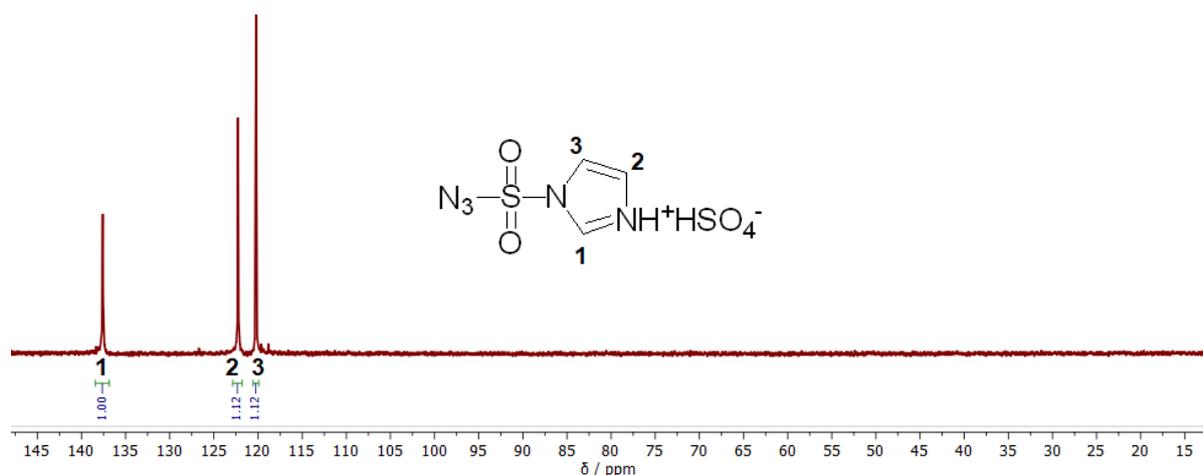


Abbildung 26: ¹³C-NMR-Spektrum von ISA (400 MHz, 100% D₂O). Die drei einzelnen Kohlenstoffe des Imidazolrings liefern scharfe Singulets, während das verbleibende Ethylacetat in der Probe nicht mehr zu erkennen ist.

Nach dieser Analyse des Gerüsts des Moleküls gilt es noch zu überprüfen, ob tatsächlich das Hydrogensulfat-Anion gebunden ist. Ein erstes Anzeichen besteht darin, dass das Produkt als weißer, nadelförmiger Feststoff aus dem Ethylacetat der Reaktionslösung auskristallisiert ist. Salze sind in der Regel schlecht löslich in aprotischen Lösemitteln wie EtOAc. Um einen direkten Nachweis für Kation und Anion des Moleküls zu erhalten, wurde ISA in einer HR-ESI-MS vermessen. Dabei wurde nacheinander ein Spektrum im Positiv- und Negativmodus aufgenommen und mit einem berechneten Wert verglichen. Die entsprechenden Werte konnten im Positivmodus für das Imidazol-Gerüst und im Negativmodus für das Hydrogensulfat-Anion detektiert werden (siehe Kapitel 4.1.2), sodass eine erfolgreiche Synthese des Salzes bestätigt werden konnte.

Die Azidogruppe und damit das Herzstück des hergestellten Moleküls wurde über Infrarotspektroskopie (IR) nachgewiesen. Die Azidogruppe ist allgemein bekannt für ihre sehr prominente Streckschwingung bei ca. $\tilde{\nu} = 2100 \text{ cm}^{-1}$.^[122] Das IR-Spektrum des hergestellten ISA ist in Abbildung 27 zu sehen und zeigt deutlich diese Streckschwingung der Azidogruppe bei $\tilde{\nu} = 2176 \text{ cm}^{-1}$.

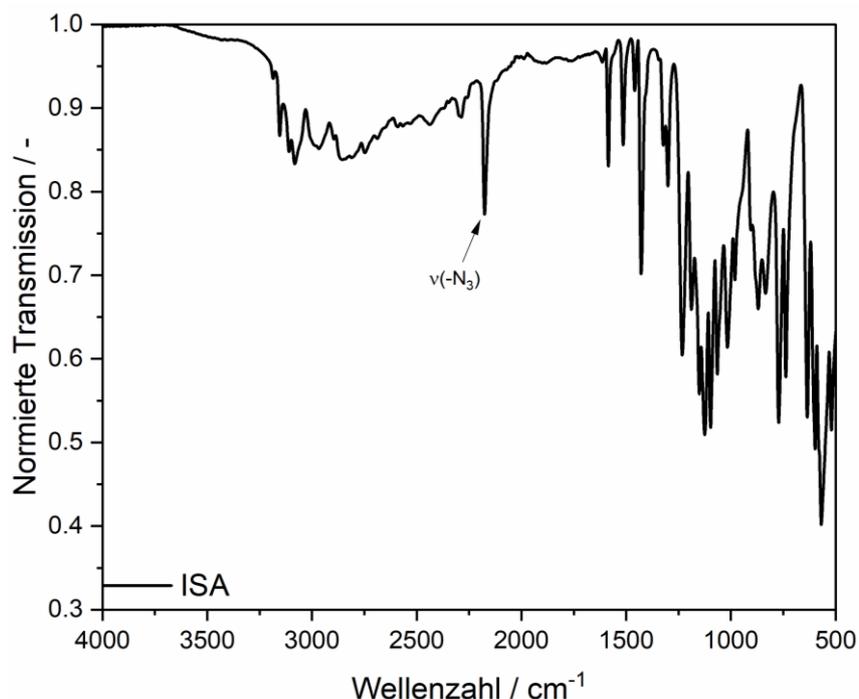


Abbildung 27: IR-Spektrum von Imidazol-1-sulfonylazid-Dihydrogensulfat. Die Azid-Streckschwingung ist deutlich zu erkennen.

5.3. Azidfunktionalisierung von GSH-funktionalisierten Nanopartikeln (AuN_3)

Ultrakleine Nanopartikel können durch zentrifugale Filtration einfach von kleineren, ungebundenen Molekülen abgetrennt werden. Daher bietet es sich an, jegliche chemische Veränderungen der Ligandenhülle vorzunehmen, wenn der Ligand bereits am Nanopartikel immobilisiert vorliegt. Im Gegensatz zu Funktionalisierungsreaktionen in Lösung können auf diese Weise aufwändige Schritte zur Aufreinigung eingespart werden, womit dieser Syntheseansatz prinzipiell vergleichbar mit einer Festphasensynthese^[123] ist.

Die GSH-funktionalisierten Nanopartikel weisen verschiedene funktionelle Gruppen an ihrer Oberfläche auf. Da diese Synthese im wässrigen Medium stattfindet, sind standardisierte Funktionalisierungsmethoden für die Säure- und Aminogruppen allerdings schwer umzusetzen. Eine Lösung dafür bietet das zuvor hergestellte ISA. Die Aminogruppe des GSH-Liganden sollte theoretisch über einen Diazotransfer zu einem Azid umgesetzt werden können. Im Folgenden wird dieser synthetische Schritt erklärt und das entstandene Produkt vollständig analysiert.

Für die Funktionalisierungsreaktion wurden die GSH-terminierten Nanopartikel zunächst in Wasser verdünnt vorgelegt. ISA und Kaliumcarbonat wurden nacheinander zugegeben und hinterher noch um eine katalytische Mengen Kupfersulfat ergänzt. Die Reaktion wurde über drei Tage gerührt und schließlich durch Spinfiltration aufgereinigt und mittels IR analysiert. Die erwartete sehr prominente Azidschwingung bei ca. $\tilde{\nu} = 2100 \text{ cm}^{-1}$ blieb jedoch aus. Daher wurden verschiedene weitere Ansätze ausprobiert, um die Aminogruppe erfolgreich umzufunktionalisieren.

Eine Literatursynthese für einen Diazotransfer auf einen Aminozucker fand in 100% Methanol statt.^[104] Entsprechend wurden die Nanopartikel ohne weitere Verdünnung in Methanol gegeben und auch hier mit den drei Reaktionspartnern versetzt. Die Suspension wurde schnell trüb und auch am nächsten Tag war weiterhin keine klare Reaktionslösung zu erkennen. Daher wurde die Reaktion abgebrochen und nach Abfiltrieren des ausgefallenen Feststoffs das Produkt untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieser entstandene Feststoff nicht redispergierbar war und auch mit konzentrierter Natronlauge, die über eine Deprotonierung der Säuregruppen für eine gewisse kolloidale Stabilität sorgen sollte, blieb er immer noch als fester Bodensatz zurück. Dennoch wurde ein Teil des Feststoffs mittels IR untersucht, wobei eine Azidbande detektierbar war. Allerdings ist ungewiss, ob hier tatsächlich die Ligandenhülle der Nanopartikel umfunktionalisiert wurde, oder lediglich etwas vom ISA in der untersuchten Probe eingebettet war.

In den nächsten Versuchen wurden anhand dieser beiden Ansätze einige Mischungsverhältnisse von MeOH zu Wasser ausprobiert. Einer dieser Ansätze stellte sich dann schließlich als erfolgreich heraus. Die Nanopartikel wurden in ein Lösemittelgemisch aus 2:1 MeOH:H₂O überführt und um ISA, K₂CO₃ und CuSO₄ ergänzt. Nach einer anfänglichen Trübung wurde das System weiterhin mit Natronlauge versetzt und mit Wasser aufgefüllt, bis keine Trübung mehr zu erkennen war. Die Suspension an Nanopartikeln wurde dann über zwei Tage gerührt und schließlich mittels Spinfiltration aufgereinigt. Bei diesem Aufreinigungsschritt kann es passieren, dass ein bräunlicher Feststoff im Spinfilter ausfällt. Dies ist allerdings sehr selten und kann zudem einfach gelöst werden. Dazu wird die Suspension aus dispergierten Nanopartikeln aus dem Spinfilter entfernt und der übrige braune Bodensatz in 0.25 M NaOH aufgenommen. Nach Aufnahme können diese Partikel der

restlichen Suspension wieder zugeführt werden. Nach vollständiger Aufreinigung der azidierten Nanopartikel (AuN_3) können diese dann umfangreich analysiert werden.

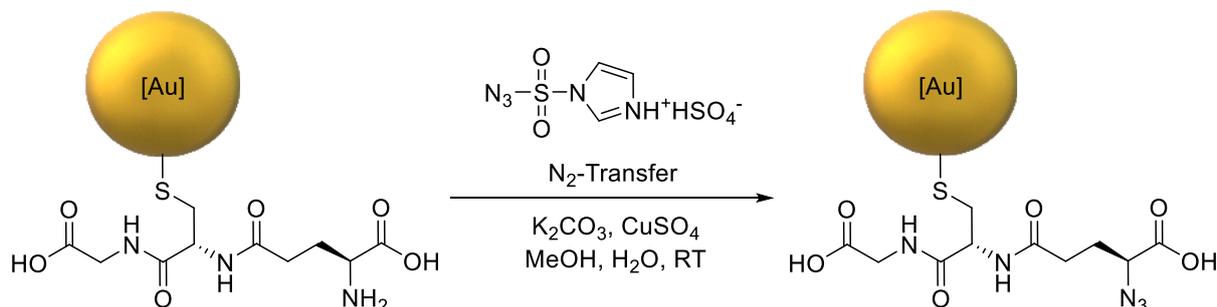


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Syntheseroute für die Herstellung von AuN_3 -Nanopartikeln mittels Diazotransfer.

Ein allererstes Indiz für eine erfolgreiche Umfunktionalisierung lässt sich aus dem IR-Spektrum der Nanopartikel ableiten. Dabei dürfte das Spektrum für AuN_3 im Vergleich zu AuGSH unverändert vorliegen mit Ausnahme der neu auftretenden N_3 -Streckschwingung. Ein Vergleich der beiden IR-Spektren ist dazu in Abbildung 29 dargestellt.

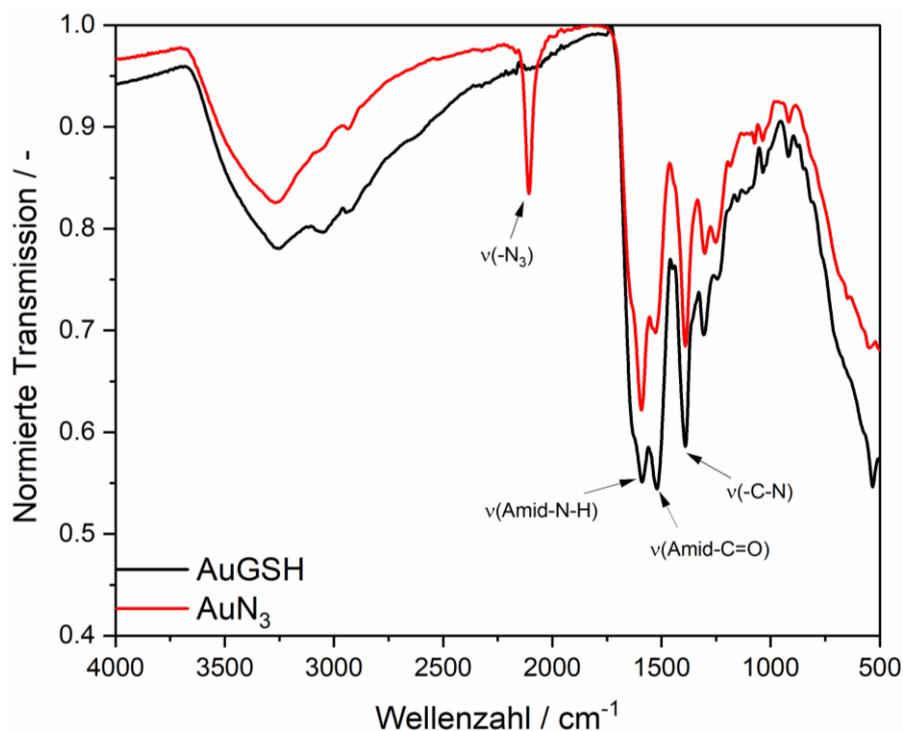


Abbildung 29: IR-Spektrum von AuGSH -Nanopartikeln (schwarz) im Vergleich zu umfunktionalisierten AuN_3 -Partikeln (rot) nach dem Diazotransfer.

Im Vergleich mit dem IR-Spektrum von AuGSH ist hier lediglich die Azid-Bande bei $\tilde{\nu} = 2104 \text{ cm}^{-1}$ neu dazugekommen und spricht für eine erfolgreiche Umsetzung der

Aminogruppe. Eine quantitative Analyse erwies sich jedoch als schwierig. Für eine Quantifizierung mittels IR-Spektroskopie ist eine bekannte Konzentration der Partikelsuspension notwendig. Dabei treten einige Probleme auf. Zum einen ist eine Festkörperkonzentration (bekannte Menge NPs in KBr-Pressling) keine Option, da hier eine sehr hohe Menge an Nanopartikeln notwendig wäre und Probleme mit inhomogenen Verteilungen auftreten können. Zum anderen ist eine Konzentration als flüssige Suspension nur schwierig zu realisieren, da über die Dauer einer Messung auch Verdunstungseffekte bei dieser kleinen Probenmenge eine Auswirkung auf die Konzentration haben. Zudem ist im wässrigen Medium immer auch die Absorption der Strahlung durch Wasser zu berücksichtigen, da die Kombinationsbande der O-H-Streckschwingung und H-O-H-Deformationsschwingung einen breiten Bauch um $\tilde{\nu} = 2100 \text{ cm}^{-1}$ aufweist.^[124] In Anbetracht der absorbierenden Stoffmenge in den 2 μL Probenvolumen ist dabei selbst bei einer Goldkonzentration von $>100 \text{ g/L}$ immer noch eine deutlich höhere Menge an Wasser an der Entstehung der Bande beteiligt als der zu betrachtende Ligand. Eine potenziell denkbare Methode, um dies zu umgehen, wäre, Wasser als Hintergrund zu vermessen bzw. eine IR-Kurve von reinem Wasser später rechnerisch zu subtrahieren. Allerdings muss dafür die Schichtdicke des wässrigen Tropfens in beiden Messungen exakt gleich sein und selbst dann spielen immer noch die Verdunstungseffekte eine bedeutende Rolle. Dadurch würden potenziell errechnete Werte einen sehr großen Fehler aufweisen und wären somit nicht repräsentativ und aussagekräftig.

Eine geeignete alternative Methode zur Quantifizierung ist die zweidimensionale NMR-Spektroskopie, die später in diesem Kapitel vorgestellt wird. Bevor die Partikel mittels NMR-Spektroskopie vermessen werden können, muss zunächst sichergestellt werden, dass keine größeren Aggregate während der Umfunktionalisierung entstanden sind. Dazu werden dieselben größenbestimmenden Methoden angewendet wie auch schon bei AuGSH. Es wäre potenziell denkbar, dass durch die Anwesenheit von Schwefelsäure im ISA (starke Wechselwirkung zwischen Schwefel und Gold) einige der GSH-Liganden abgespalten werden und somit instabilere Nanopartikel entstehen, die unter Umständen aggregieren können. Um die Anwesenheit größerer NPs auszuschließen, wurde daher ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen, welches in Abbildung 30 dargestellt ist. Auch hier ist kein Anzeichen einer Plasmonenresonanz zu erkennen, womit auch hier indirekt bestätigt werden kann, dass die Nanopartikel weiterhin im ultrakleinen Bereich vorliegen.

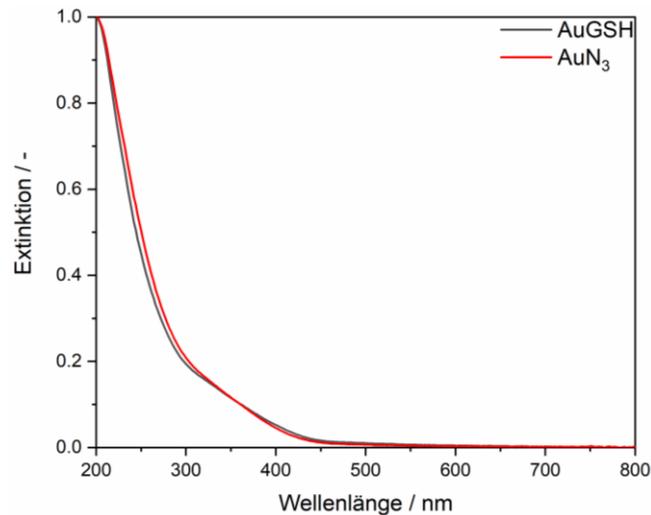


Abbildung 30: Vergleich der UV-Vis-Spektren von AuGSH (schwarz) und AuN₃ (rot) nach der Umfunktionalisierung.

Als weiteres Verfahren für eine Veranschaulichung der Größenverteilung der gesamten Probe, wurden die AuN₃-NPs zusätzlich mittels DCS vermessen und mit den AuGSH-NP verglichen. Die normierte Anzahlverteilung ist dazu in Abbildung 31 gezeigt. Dabei ist kein großer Unterschied in der Größenverteilung ersichtlich, außer dass die AuN₃-NP mit $d_H = 1.5 \text{ nm} \pm 0.4 \text{ nm}$ eine leicht erhöhte Standardabweichung aufweisen, welches durch die auftretende Schulter zu erklären ist. Diese bewegt sich jedoch in einem Rahmen, der auch unter Berücksichtigung des UV-Vis-Spektrums als unsignifikant betrachtet werden kann. Der Großteil der Nanopartikel liegt weiterhin im ultrakleinen Größenbereich von $<2 \text{ nm}$ vor und ist damit für NMR-spektroskopische Analysen geeignet.

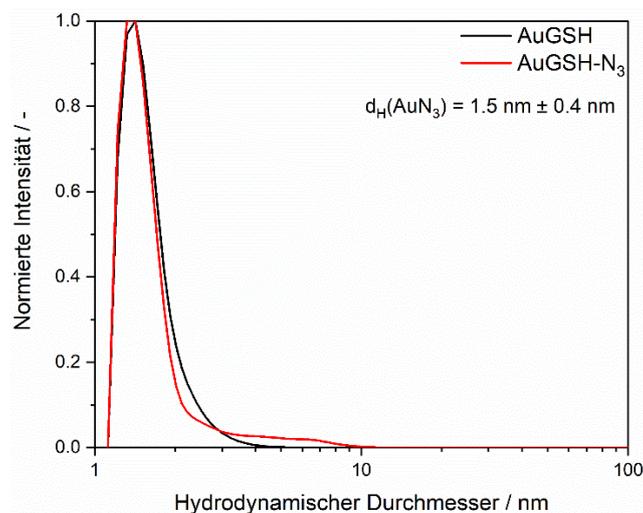


Abbildung 31: Normierte Anzahlverteilung der DCS von ultrakleinen umfunktionalisierten AuN₃-NPs (rot) im Vergleich zu den Vorläufer-Partikeln AuGSH (schwarz).

Damit die Ergebnisse der DCS als Vergleich herangezogen werden können, muss allerdings noch sichergestellt werden, dass die Partikel weiterhin eine kugelförmige Morphologie aufweisen. Dazu wurden die AuN₃-NPs mittels HRTEM untersucht.

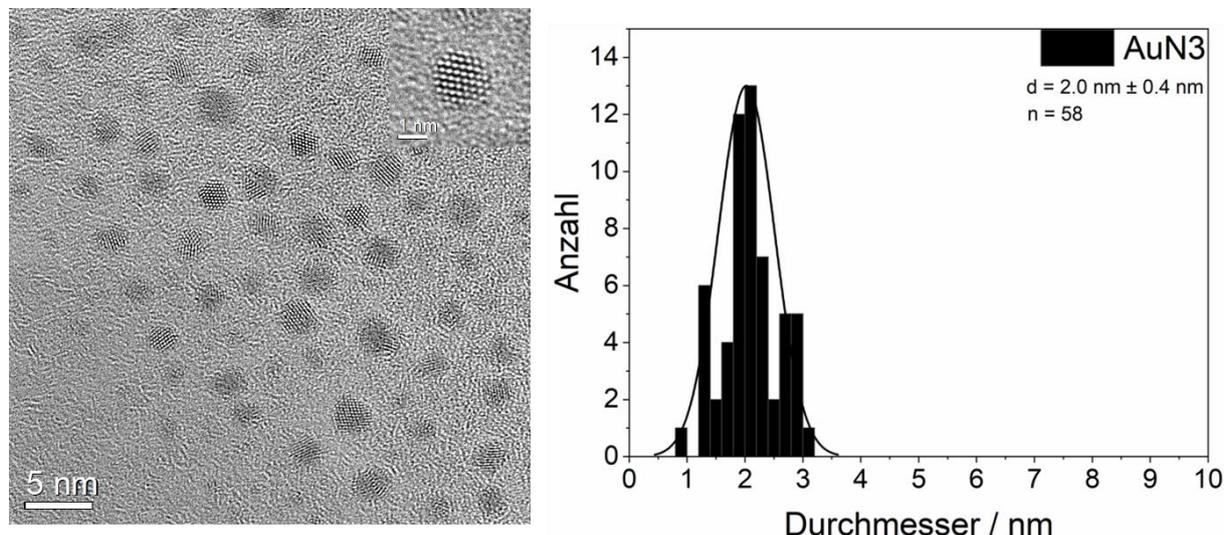


Abbildung 32: HRTEM-Aufnahme der azidierten ultrakleinen Nanopartikel nach erfolgreicher Umfunktionalisierung, erstellt von *Dr. K. Loza* im Forschungszentrum Jülich. Der Maßstab beträgt im großen Bild 5 nm, im kleinen Inset 1 nm. Es wurden 58 Partikel ausgemessen.

Wie sich herausstellt, ist die übergeordnete Morphologie der Nanopartikel auch weiterhin kugelförmig und unverändert. Der Kerndurchmesser der azidierten Nanopartikel erscheint leicht vergrößert ($d_H = 2.0 \text{ nm} \pm 0.4 \text{ nm}$) im Vergleich zu den AuGSH-Partikeln ($d = 1.7 \text{ nm} \pm 0.9 \text{ nm}$). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die HRTEM lediglich einen sehr kleinen Ausschnitt der Probe abbilden kann und daher kein wirklich relevanter Vergleich der Größe beider Partikelsorten möglich ist. Bessere Ergebnisse liefern Methoden wie die DCS oder DOSY, die eine Größenverteilung über die gesamte Probe hinweg abbilden können.

Als Vergleich zur DCS wurden die Partikel daher auch mittels DOSY vermessen (Abbildung 33). Dabei zeigte sich ein leicht höherer hydrodynamischer Durchmesser bei der DOSY, was aufgrund der unterschätzten Werte der DCS zu erwarten war. Mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 3.36 nm der Ligandenhülle, können die Nanopartikel allerdings auch nach Umfunktionalisierung noch als ultraklein eingestuft werden.

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} = \frac{1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} \cdot 298 \text{ K}}{3\pi \cdot 8.95 \cdot 10^{-4} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}} \cdot 1.450 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 3.36 \cdot 10^{-9} \text{ m} = 3.36 \text{ nm}$$

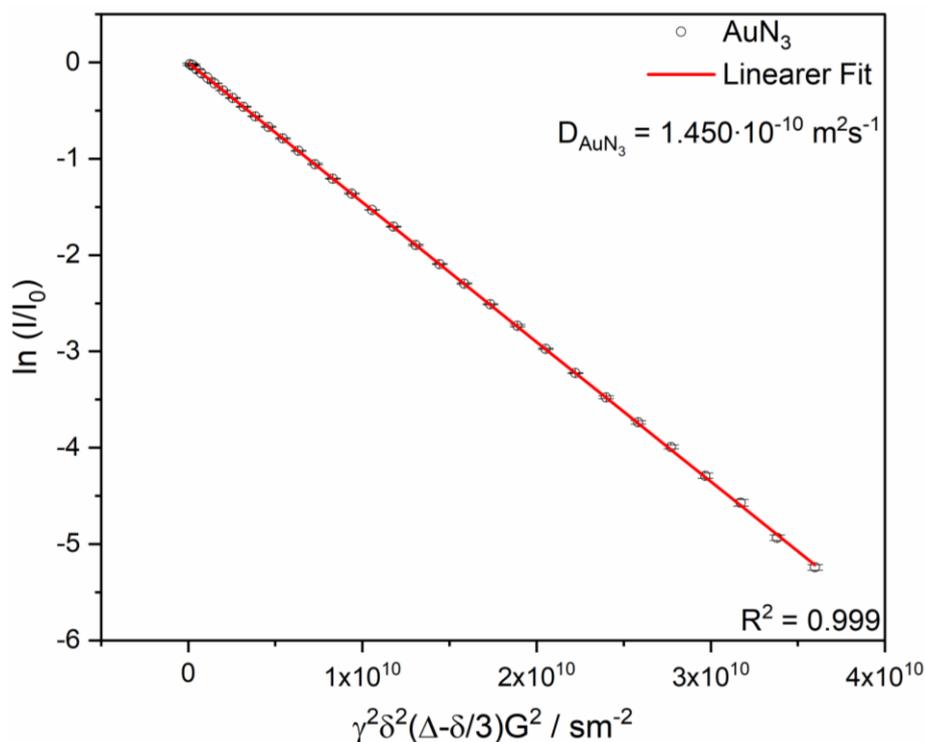


Abbildung 33: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuN_3 (gemessen von Dr. C. Beuck). Der Betrag der Steigung entspricht nach Gleichung 10 dem translationalen Diffusionskoeffizienten der Nanopartikel.

Zusammen mit der DCS, DOSY und UV-Vis-Spektroskopie kann also postuliert werden, dass die Nanopartikel die Umfunktionalisierung auch in Gegenwart der Schwefelsäure aus dem ISA-Salz sehr gut überstehen. Die IR-Spektroskopie liefert zudem einen ersten Einblick darauf, dass die chemische Umgebung der Ligandenhülle um einige Azidogruppen erweitert wurde. Eine quantitative Aussage ist mit den bisher vorgestellten Methoden allerdings noch nicht möglich. Da die Partikel aber als ultraklein bestätigt werden konnten, können weitere Analysen mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden.

Nach gründlicher Aufreinigung wurden die azidierten Nanopartikel auf ein Volumen von 540 μL mit H_2O verdünnt und anschließend mit 60 μL D_2O aufgefüllt.

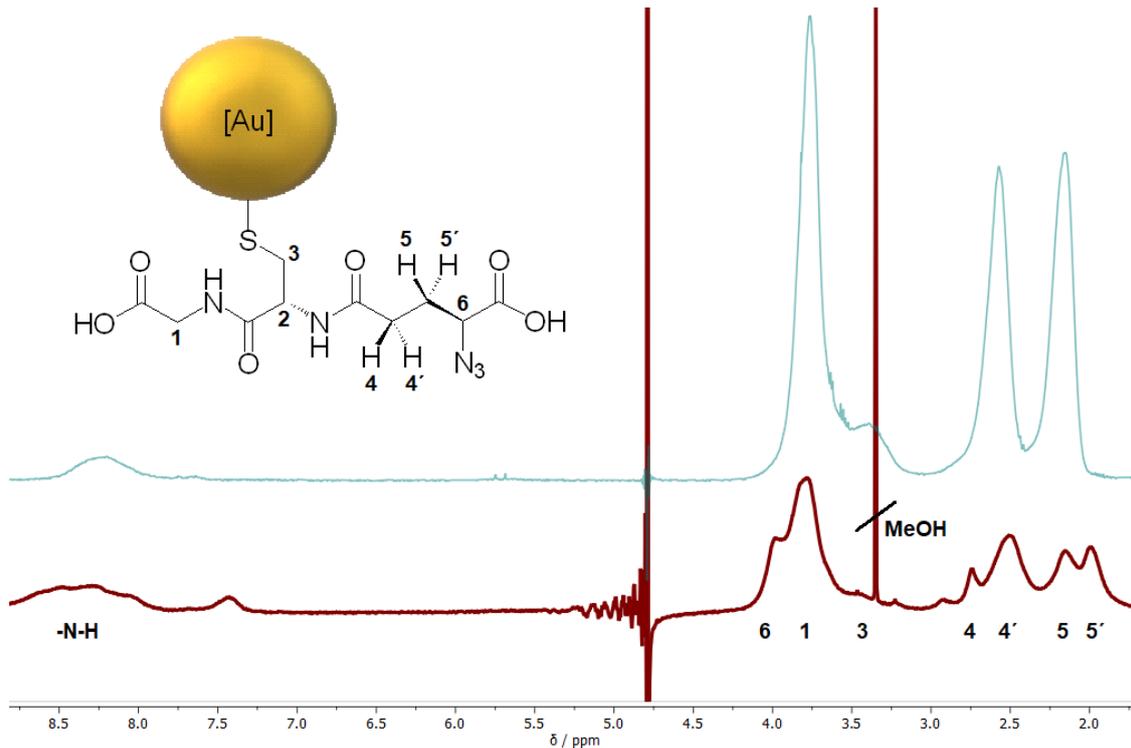


Abbildung 34: ^1H -NMR-Spektrum von AuGSH (blau, 400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10) und AuN_3 (rot, 400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10). Bei 4.79 ppm ist die Wasserunterdrückung zu erkennen. Außerdem sind noch Reste von Methanol in der Probe enthalten (3.34 ppm), die sich auch nach mehrmaligem Aufreinigen über Spinfilter nicht entfernen ließen.

Im Vergleich zu den vorher hergestellten AuGSH Nanopartikeln, sind im ^1H -NMR-Spektrum von den azidierten Partikeln (Abbildung 34) deutliche Unterschiede zu erkennen. Zum einen existiert keine Aminogruppe mehr, die einen positiven mesomeren Effekt mit ihrem freien Elektronenpaar auf die benachbarte 6-Position ausüben kann. Daher und durch die im Vergleich ebenfalls stärkeren negativen induktiven Effekte ist das Proton an der 6-Position deutlich stärker entschirmt und zeigt somit eine stärkere Resonanz zum äußeren Feld. Dadurch ist dieses Proton im Vergleich zu AuGSH etwas tieffeldverschoben und liegt nicht mehr mit den Protonen der 1-Position unter demselben Signal. Stattdessen ist es jetzt besser als linksseitige Schulter des Signals zu beschreiben. Zum anderen ist ein sehr interessanter Effekt bei den Protonen der 4- und 5-Positionen zu erkennen. Die zuvor als Singulett klassifizierten Signale zeigen nun eine deutliche Aufspaltung im ^1H -NMR-Spektrum. Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass die Protonen in Nachbarschaft zum stereomeren Zentrum der 6-Position nur noch chemisch, aber nicht magnetisch zueinander äquivalent sind. Die Protonen 4 und 5 stehen räumlich betrachtet näher an der Azidogruppe, als ihre direkten Nachbarn 4' und 5'. Dadurch erfahren sie wie das

Proton H-6 ebenfalls, eine stärkere Entschirmung und entsprechend zu leicht höheren Frequenzen verschobene Resonanz auf das äußere Feld. Somit sind H-4 und H-5 nicht mehr mit den Protonen H-4' und H-5' unter demselben Signal, sondern als eigenständige Signale zu erkennen. Das ^1H -NMR-Spektrum dient also in Kombination mit dem IR-Spektrum der Partikel (Abbildung 29) als erstes Indiz für eine erfolgreiche Umwandlung der Aminogruppe zu einem Azid.

Weitere Information zur erfolgreichen Azidierung liefert zudem das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abbildung 35) der Partikel. Dazu wurde eine sehr konzentrierte Suspension mit einer auf Gold gerechneten Konzentration von ca. 17 g/L zur Messung bereitgestellt. Der Vergleich zu den Vorläufer-Partikeln (blau) zeigt eine deutliche Verschiebung des Kohlenstoffsignals zur 6-Position, während auch die Kohlenstoffe der 4- und 5-Positionen leichte Verschiebungen zeigen. Dieser Effekt ist so zu erklären wie auch die chemischen Verschiebungen der Protonen. Die Azidogruppe besitzt kein freies Elektronenpaar und fungiert somit nicht als Elektronendonator wie eine Aminogruppe. Zusätzlich dazu weist sie auch noch stärkere, negative induktive Effekte auf und zieht Elektronendichte aus den benachbarten Kernen, weshalb diese eine stärkere Resonanz zeigen.

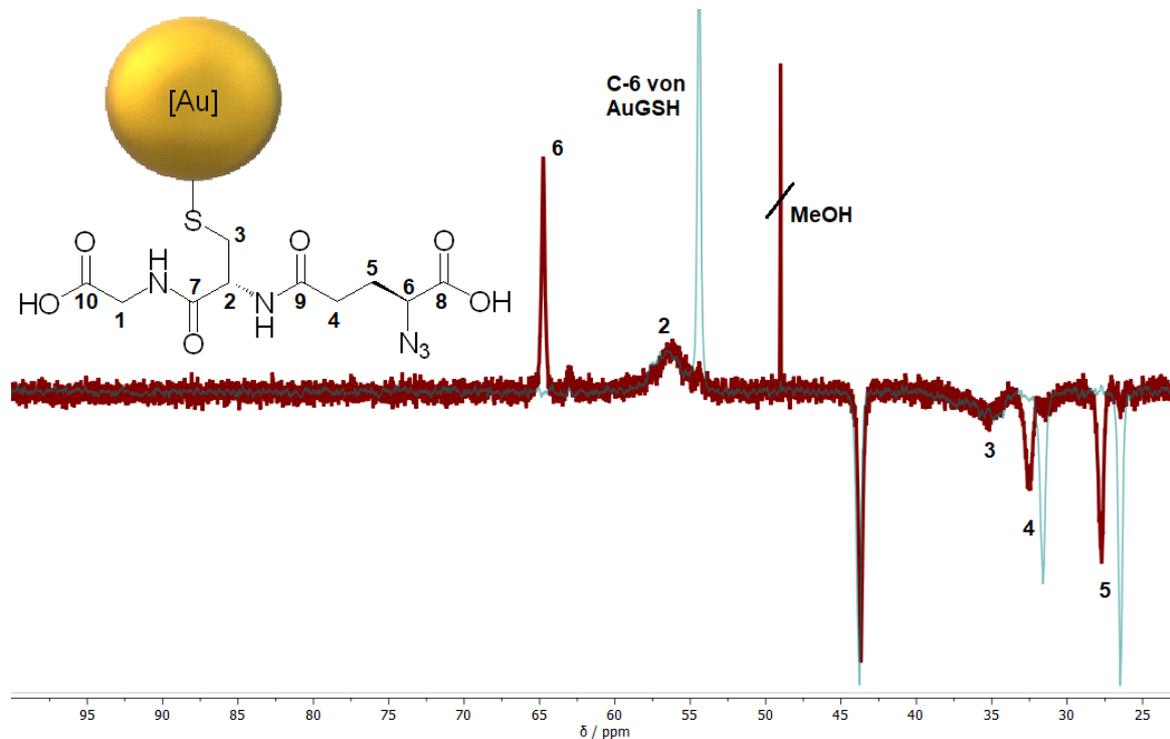


Abbildung 35: ^{13}C -DEPT135-NMR-Spektrum von AuN₃ (rot, 600 MHz, 10% D₂O in H₂O, pH 10) im Vergleich zu AuGSH (blau, 600 MHz, 10% D₂O in H₂O, pH 10).

Bei genauem Hinsehen ist noch ein kleiner Peak an der Stelle zu erkennen, an der bei AuGSH das C-6 Kohlenstoffatom sichtbar war. Allerdings überschneidet es sich stark mit dem benachbarten, breiten Signal von C-2 und eignet sich daher in diesem Spektrum nicht für eine Quantifizierung der Azidogruppen. Lediglich die Aussage, dass die Reaktion annähernd quantitativ verlief, lässt sich mit Zuversicht aufstellen. Um dieses Problem zu umgehen, eignet sich die zweidimensionale NMR-Spektroskopie sehr gut. Dabei sollten C-6 und C-2 deutlich voneinander zu unterscheiden sein, zumal für eine potenzielle H-2-C-2 Kopplung kein Signal erwartet wird, da das entsprechende Proton vollständig in der Wasserunterdrückung verschwinden sollte. Abbildung 36 zeigt das ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum der azidierten Partikel.

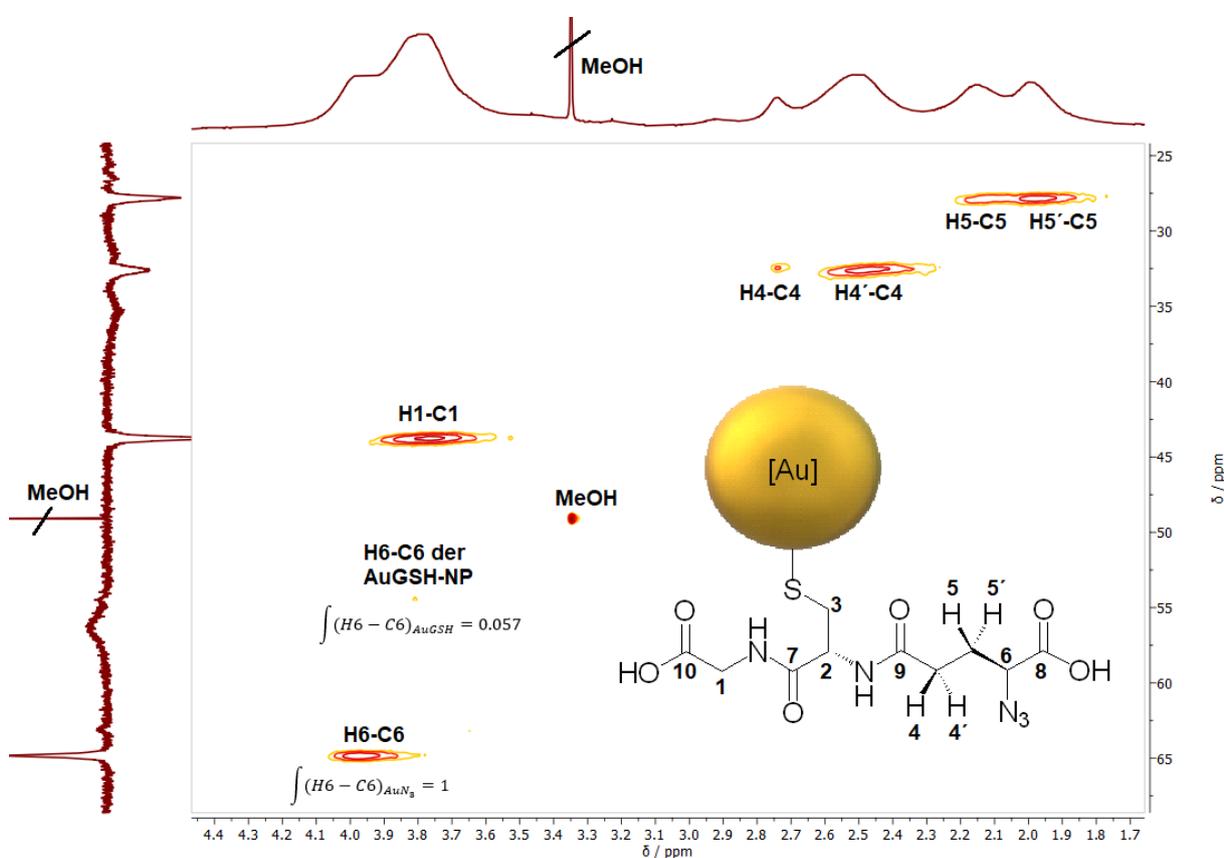


Abbildung 36: ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum der azidierten Nanopartikel (600 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10). Bei genauem Hinsehen ist ein kleines Korrelationssignal bei 3.81-54.5 ppm zu erkennen, welches von restlichen AuGSH-NP stammt. Das betrachtete Korrelationssignal für das Proton der 6-Position, die jetzt mit einer Azidogruppe funktionalisiert ist, liegt bei 3.98-64.8 ppm.

Mit Hilfe des HSQC-Spektrums können die Azide jetzt quantitativ analysiert werden. Dazu werden Integrale über die beiden H6-C6-Kopplungssignale gezogen und der prozentuale Anteil γ eines Signals bestimmt.

$$Y_{AuN_3} = \frac{\int(H6 - C6)_{AuN_3}}{\int(H6 - C6)_{AuN_3} + \int(H6 - C6)_{AuGSH}} \cdot 100\% = \frac{1}{1.057} \cdot 100\% = 94.6\%$$

Nach der Berechnung des prozentualen Umsatzes von Amin zu Azid kann jetzt über die Anzahl der vorher bestimmten Aminogruppen die Anzahl N_{N_3} der auf der Oberfläche des Goldpartikels immobilisierten Azidogruppen bestimmt werden.

$$N_{N_3} = 0.946 \cdot N_{GSH} = 0.946 \cdot 125 = 118$$

Ein Nanopartikel trägt also etwa 118 Azide. Dieser Wert wird später für alle möglichen Berechnung der Äquivalente eingesetzter Liganden als Referenz herangezogen. Eine Äquivalenz von 0.4 entspräche demnach beispielsweise einer eingesetzten Ligandenzahl von ca. 47 Liganden pro Nanopartikel.

Um die Analyse der azidierten Nanopartikel zu vervollständigen, wird als nächstes noch das 1H - 1H -COSY-NMR-Spektrum betrachtet. Dabei gilt es zu untersuchen, ob sich die chemische Umgebung der Signale der Liganden signifikant geändert hat, bzw. ob die Grundstruktur des Glutathions noch intakt ist. Ein vollständiges 1H - 1H -COSY-NMR-Spektrum der Probe wird dazu im Anhang gezeigt, wirklich relevant für die analytische Auswertung ist hier nur der Bereich von ca. 1.8 ppm – 4.1 ppm (Abbildung 37), in dem die relevanten Signale des GSH-Skeletts zu sehen sind. Die Signale der Protonen an der 3-Position sind aufgrund des restlichen Methanols und der ohnehin schon geringen Intensität leider nicht mehr in der zweidimensionalen Korrelation zu erkennen. Stattdessen wird aber sehr deutlich, dass das Signal des Protons der 6-Position aus dem großen, als Singulett erscheinenden Peaks bei 3.9 ppm hervortritt und zu höheren Frequenzen chemisch verschoben vorliegt. Das ist daran zu erkennen, dass nur die linksseitige Schulter dieses Signals eine Korrelation zu den Protonen der 5-Position aufweist, während die Protonen der 1-Position wie erwartet keine Korrelation zeigen. Außerdem ist das Korrelationsmuster der Protonen der 4- und 5-Positionen bemerkenswert. Das Signal des Protons H-4, welches mit der Azidogruppe zusammen auf derselben Seite des Moleküls steht, ist nicht intensiv genug, um gut aufgelöste Korrelationen zu zeigen. Allerdings ist an den Kopplungen H4/H4'-H5 und H4/H4'/H5' deutlich zu erkennen, dass das der Azidogruppe entgegenstehende Proton H4' eine Kopplung zu beiden Nachbarn der 5-Position aufbaut, womit hier die direkte Nachbarschaft weiterhin bestätigt werden kann. Ebenfalls ist anhand der Korrelation H5-H5' eine Korrelation nebenständig zur

Diagonalen im Spektrum zu erkennen, die eine bestehende Kopplung zwischen beiden diastereomeren Protonen der 5-Position bestätigt, womit diese als nicht mehr magnetisch äquivalent bestätigt werden können.

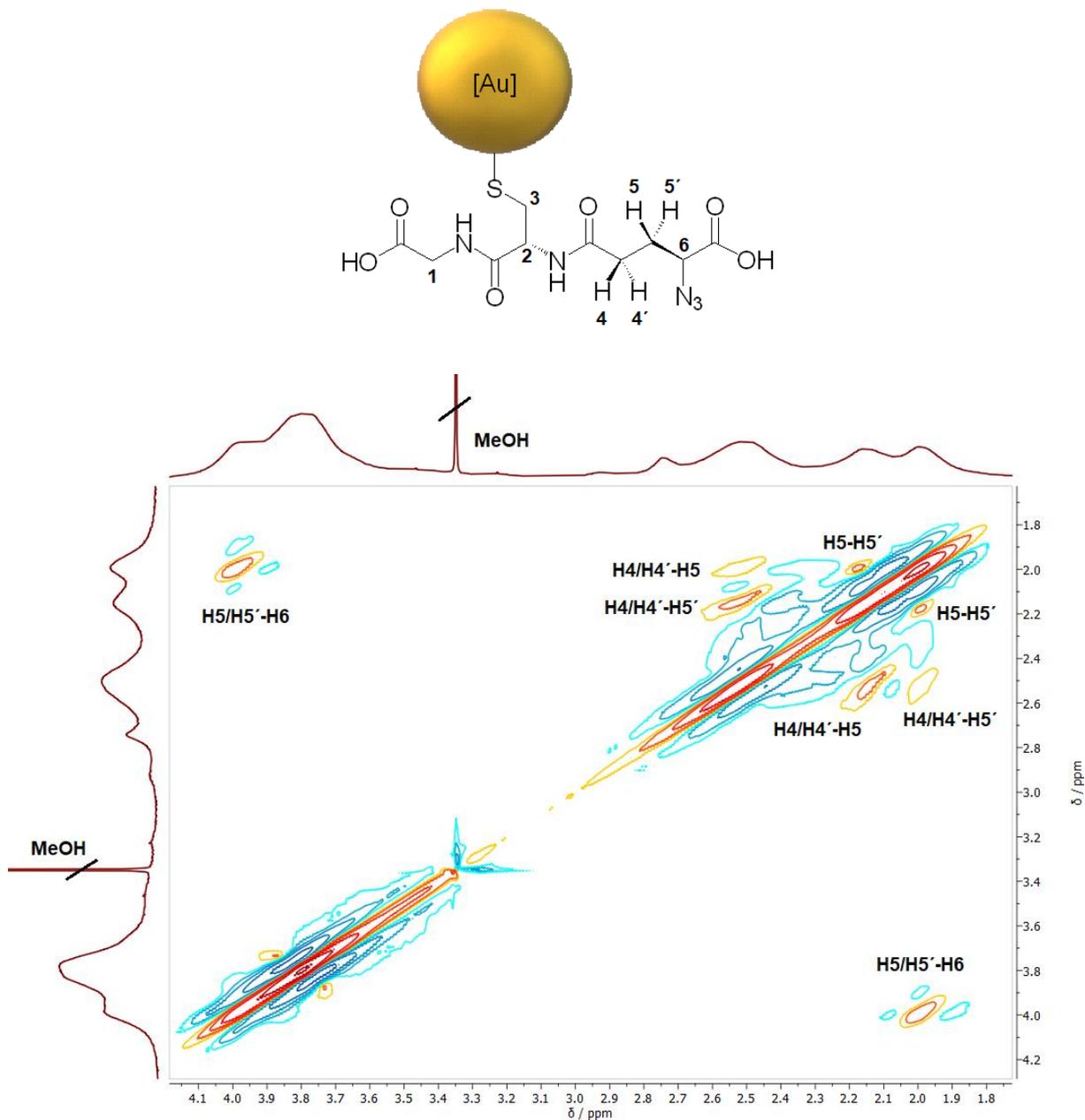


Abbildung 37: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von AuN_3 -Nanopartikeln. Leichte Spuren von Methanol sind noch zu erkennen. Hier ist die Aufspaltung der diastereomeren Protonen deutlich zuzuordnen.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die chemische Umfunktionalisierung der Aminogruppe zu einem Azid mittels Diazotransfer erfolgreich verlief. Anhand der DCS, DOSY und HRTEM können die Partikel weiterhin als ultraklein definiert werden. Außerdem hat sich, wie aus den diversen NMR-

spektroskopischen Untersuchungen ersichtlich wurde, gezeigt, dass in der Tat eine chemische Veränderung der Ligandenhülle stattgefunden hat. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte einen signifikanten Shift der Kohlenstoffe an den 4- und 5- Positionen sowie eine erhebliche Verschiebung des Kohlenstoffs der 6-Position. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte zudem, dass die Protonen der 4-, 5- und 6-Positionen eine deutlich veränderte chemische Umgebung erfahren als noch zuvor mit der benachbarten Aminogruppe. Die Quantifizierung der Azide erwies sich zunächst als schwierig, konnte aber mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie gelöst werden und lieferte einen sehr guten Umsatz von ca. 95%. Die analysierten Nanopartikel können nach diesen Analysen für eine Reihe verschiedener CuAAC eingesetzt werden.

5.4. Fluoreszente Markierung der azidierten Nanopartikel

Im Folgenden soll die Möglichkeit der kovalenten Oberflächenfunktionalisierung durch das kupferkatalysierte Anklicken von zwei fluoreszenten Farbstoffmolekülen validiert werden. Das Anklicken von Farbstoffmolekülen ermöglicht zudem einige Zellaufnahmestudien. Es wurden zwei verschiedene Fluorophore verwendet, um unterschiedliche spektrale Bereiche der Emissionswellenlängen abzudecken. Einer emittiert grünliches Licht bei 488 nm (FAM) und der andere emittiert im *deep-red* Bereich bei 647 nm (Alexa-Fluorophor 647, kurz: AF647).^[125] Die funktionalisierten Nanopartikel sind schematisch in Abbildung 38 dargestellt.

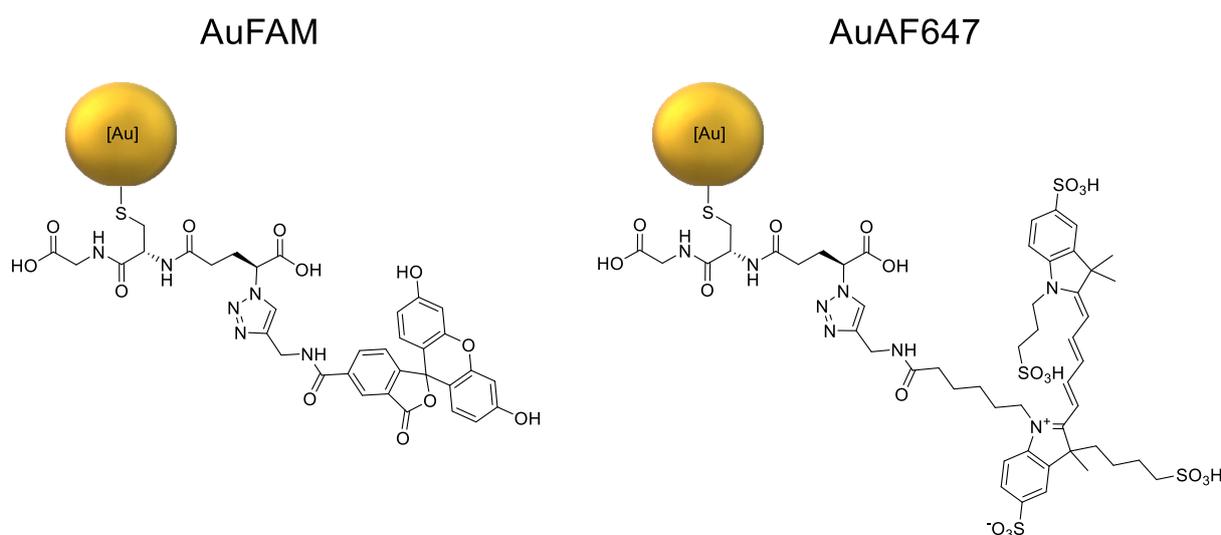


Abbildung 38: Schematische Darstellung der fluoreszent markierten Nanopartikel.

Die Nanopartikel wurden mittels DCS und HRTEM (siehe Anhang) auf ihre Größe untersucht, wobei kein signifikanter Unterschied zur Größe und Morphologie der AuGSH und AuN₃ Partikel ersichtlich wurde. Zum Zweck der besseren Vergleichbarkeit wird daher wie für die Vorgänger-Partikel auch ein Kerndurchmesser von 2 nm angenommen. Die wichtigsten Kenngrößen der fluoreszenten Nanopartikel sind in Tabelle 2 dargestellt.

Eine erfolgreiche Anbindung der Farbstoffe konnte mittels NMR-Spektroskopie (Abbildung 39) bestätigt werden. In beiden Fällen verschwindet nach Anbringung an die Partikeloberfläche das Signal des Alkin-Protons H-11. Außerdem sind die Signale der Farbstoffe deutlich verbreitert im Vergleich zu den Spektren der freien Fluorophore.

Eine quantitative Bestimmung der angebundenen Fluorophore ist mittels NMR-Spektroskopie allerdings nicht möglich, da die Signale mit diversen anderen Signalen des GSH-Liganden und auch des Farbstoffes verschmelzen. Zudem ist das Signal-Rausch-Verhältnis für eine Quantifizierung nicht geeignet. Die NMR-Spektren wurden in einer Mischung aus 90% H₂O und 10% D₂O aufgenommen, während das starke Wassersignal unterdrückt wurde. Bei dieser Wasserunterdrückung (4.79 ppm) werden die Integrale der umliegenden Signale teilweise stark verfälscht, was wiederum zu einer Verfälschung einer möglichen Quantifizierung führen würde. Die GSH-Signale liefern daher kein gutes Referenzsignal als Bezugspunkt zur Ligandenbestimmung.

Da eine Quantifizierung der fluoreszenten Liganden über die NMR-Spektroskopie nicht möglich war, wurden die Partikel mittels UV-Vis-Spektroskopie vermessen. Um die Anzahl der gebundenen Farbstoffmoleküle zu bestimmen, mussten die Partikel zunächst sehr gründlich aufgereinigt werden. Dazu wurden sie solange in iterativen Schritten mit Wasser durch Spinfiltration gewaschen, bis das Filtrat vollständig farblos war. Da die Filtrationsleistung der Spinfilter nicht konsistent ist, wurde nach vollständiger Entfärbung des Filtrats noch zweimal gewaschen, um ganz sicher zu gehen, dass keine ungebundenen Farbstoffmoleküle mehr vorhanden waren. Anschließend wurden die Suspensionen auf eine Gold-Konzentration von 10 µg/mL (205.5 nM NP) verdünnt und in der UV-Vis-Spektroskopie vermessen. Um damit die Zahl der gebundenen Farbstoffmoleküle zu bestimmen, wurde zunächst das freie Farbstoff-Alkin bei genau bestimmten Konzentrationen vermessen (siehe Anhang), um eine Kalibrationsgerade (Abbildung 40 (A) und (B)) zu ermitteln.

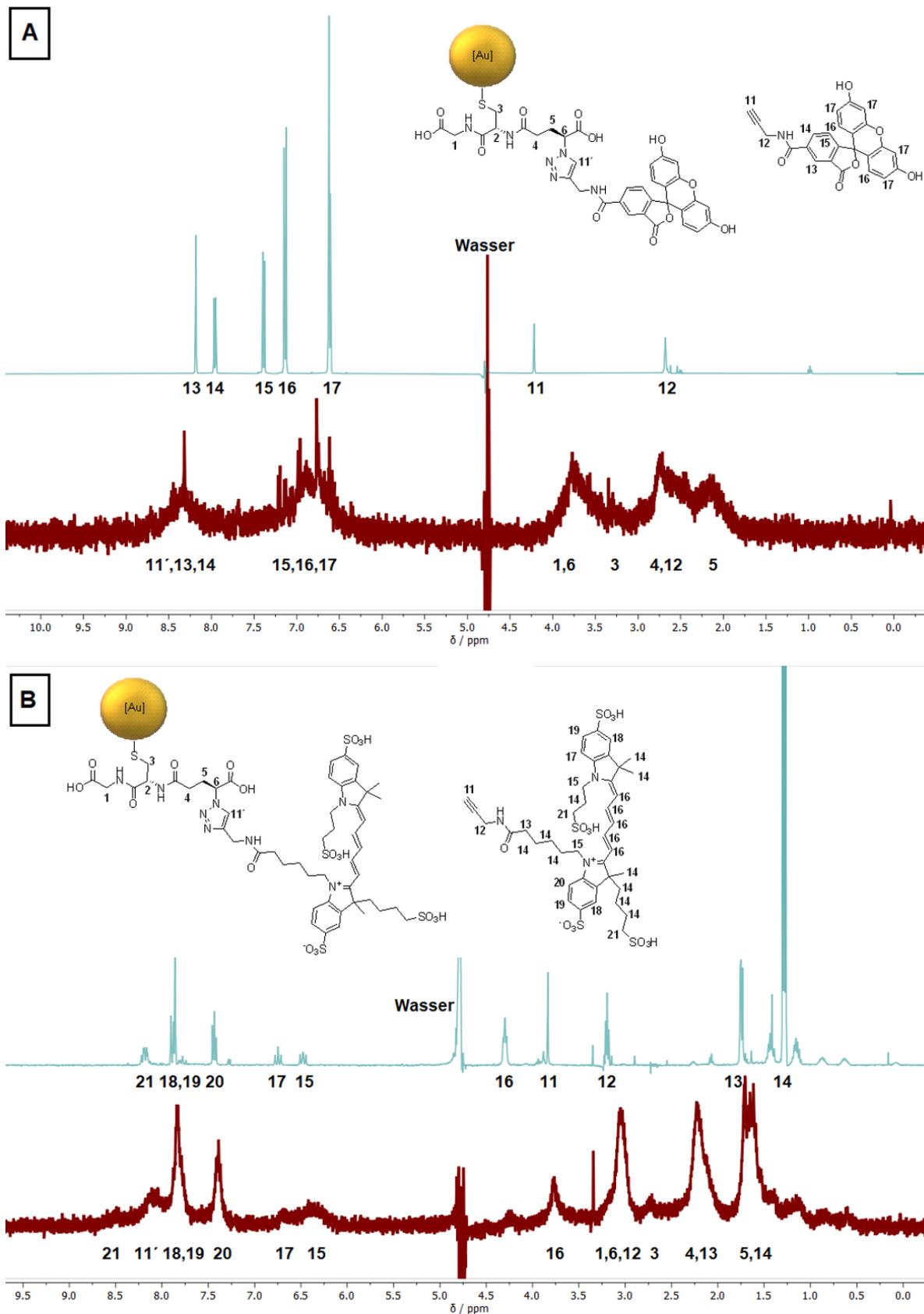


Abbildung 39: (A) ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, 10% D_2O in 90% 0.1 M NaOH in H_2O) von AuFAM (rot) im Vergleich zu freiem FAM-Alkin (blau), (B) ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, 10% D_2O in 90% H_2O) von AuAF647 (rot) im Vergleich zu freiem AF647-Alkin (blau).

Die Farbstoffsignale wurden mit einer geraden Basislinie integriert, um den Einfluss der Untergrund-Absorption der Nanopartikel zu minimieren. Eingesetzt in die Geradengleichungen der Kalibrationen, können mit diesen Integralen $\int(450 \text{ nm} - 530 \text{ nm})_{FAM}$ und $\int(500 \text{ nm} - 700 \text{ nm})_{AF647}$ nach dem Schema $\int(\lambda_1 \text{ bis } \lambda_2)$ auf diese Weise die molaren Konzentrationen der Farbstoffe c_{FAM} und c_{AF647} in den Partikelsuspensionen berechnet werden.

$$\int(450 \text{ nm} - 530 \text{ nm})_{FAM} = 2.04 \cdot c_{FAM} [\mu\text{M}] \leftrightarrow c_{FAM} [\mu\text{M}] = \frac{y_{FAM}}{2.0}$$

$$c_{FAM} [\mu\text{M}] = \frac{2.59}{2.04} [\mu\text{M}] = 1.27 \mu\text{M}$$

$$c_{AF647} [\mu\text{M}] = \frac{27.20}{11.37} [\mu\text{M}] = 2.39 \mu\text{M}$$

Da die Nanopartikel mit einer bekannten Konzentration von $c_{NP} = 205.5 \text{ nM}$ gemessen wurden, kann nun die errechnete Konzentration der Farbstoffmoleküle in den Suspensionen auf die Anzahl der Nanopartikel normiert werden, um final die Anzahl N der gebundenen Farbstoff pro Nanopartikel zu bestimmen.

$$N_{FAM/NP} = \frac{c_{FAM}}{c_{NP}} = \frac{1.27 \mu\text{M}}{205.5 \text{ nM}} = 6.2 \approx 6$$

$$N_{AF647/NP} = \frac{c_{AF647}}{c_{NP}} = \frac{2.39 \mu\text{M}}{205.5 \text{ nM}} = 11.6 \approx 12$$

Tabelle 2: Analytische Daten von AuGSH, AuN₃, AuFAM und AuAF647 Nanopartikeln. Die Berechnung basieren auf Annahme eines Kerndurchmesser der Partikel von 2 nm zwecks besserer Vergleichbarkeit. Die entsprechenden Ausbeuten beziehen sich auf die für die jeweilige für die Reaktion eingesetzte Goldmenge.

Partikel	Hydrodynamischer Durchmesser (DCS) / nm	Kerndurchmesser (HRTEM) / nm	Ausbeute basierend auf Au / %	Anzahl pro NP / -	Molekularer Fußabdruck pro Ligand / nm ²	Reaktionseffizienz / %
AuGSH	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.9	71	125	0.10	-
AuN ₃	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.4	86	118	0.11	94 (Azidierung)
AuFAM	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.5	84	6	2.1	13 (CuAAC)
AuAF647	1.4 ± 0.2	2.5 ± 1.1	81	12	1.05	25 (CuAAC)

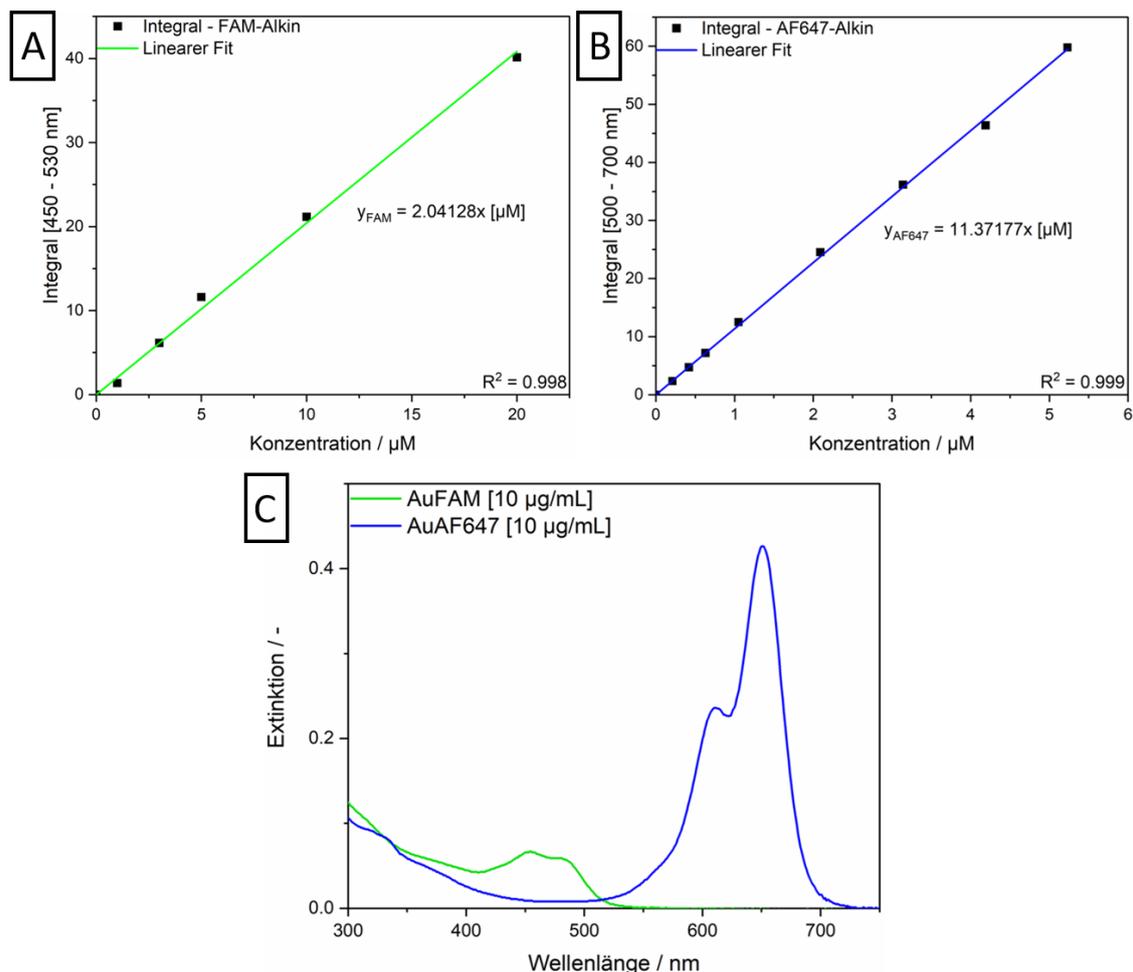


Abbildung 40: (A) Kalibrierungsgerade zur Bestimmung der Konzentration von FAM; (B) Kalibrierungsgerade zur Bestimmung der Konzentration von AF647; (A) und (B) zeigen jeweils das Integral der entsprechenden Farbstoff-Absorptionssignal von entweder 450 nm – 530 nm (FAM, (A)) oder das Integral von 500 nm – 700 nm (AF647, (B)). Die entsprechenden UV-Vis-Spektren der unterschiedlichen Farbstoffkonzentration sind im Anhang zu finden. (C) UV-Vis-Spektren der mit FAM (grün) und mit AF647 (blau) markierten Nanopartikel bei einer Nanopartikelkonzentration von 205.5 nM (10 µg Au / mL).

Es wurden 0.4 Äquivalente Farbstoff-Alkin im Verhältnis zu den vorhandenen Azidgruppen (118) eingesetzt, dies entspricht etwa 47 potenziell gebundenen Fluorophoren pro Nanopartikel bei einer idealisierten Ausbeute von 100%. Demnach konnten Klick-Effizienten von 13% für das FAM-Alkin und 25% für das AF647-Alkin erzielt werden. Die zusammengefassten Ergebnisse sind vergleichsweise in Tabelle 2 aufgelistet.

Für potenzielle Zellaufnahmestudien und Lokalisierungsexperimente in Zellen muss sichergestellt sein, dass die Nanopartikel entgegen ihrer größeren Äquivalente nicht in der Lage dazu sind, die Emission der Fluorophore zu quenchen. Große Nanopartikel ab ca. 10 nm Kerndurchmesser quenchen so stark, dass keine Emission mehr sichtbar ist.^[126,127] Sollte das auch der Fall für die ultrakleinen Partikel sein, so wird eine Lokalisation innerhalb der Zelle unmöglich. Das fluoreszente Verhalten der Nanopartikel wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie (Abbildung 41) untersucht.

Die ultrakleinen Partikel zeigten wie zu erwarten keine signifikanten Quenching-Effekte, sodass sie als geeignete Proben für potenzielle Zellaufnahmestudien klassifiziert werden konnten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die Kurven des Fluoreszenzspektrums in Abbildung 41 normiert. AuFAM weist einen Stokes-Shift von $\Delta\lambda_{AuFAM} = 28 \text{ nm}$ und AuAF647 von $\Delta\lambda_{AuAF647} = 18 \text{ nm}$ auf. Indem zwei verschiedene spektrale Bereiche (grün und *deep-red*^[125]) mit diesen beiden Partikeltypen abgedeckt werden, bieten sie ein weitläufiges Anwendungsspektrum u. A. in der Biologie.

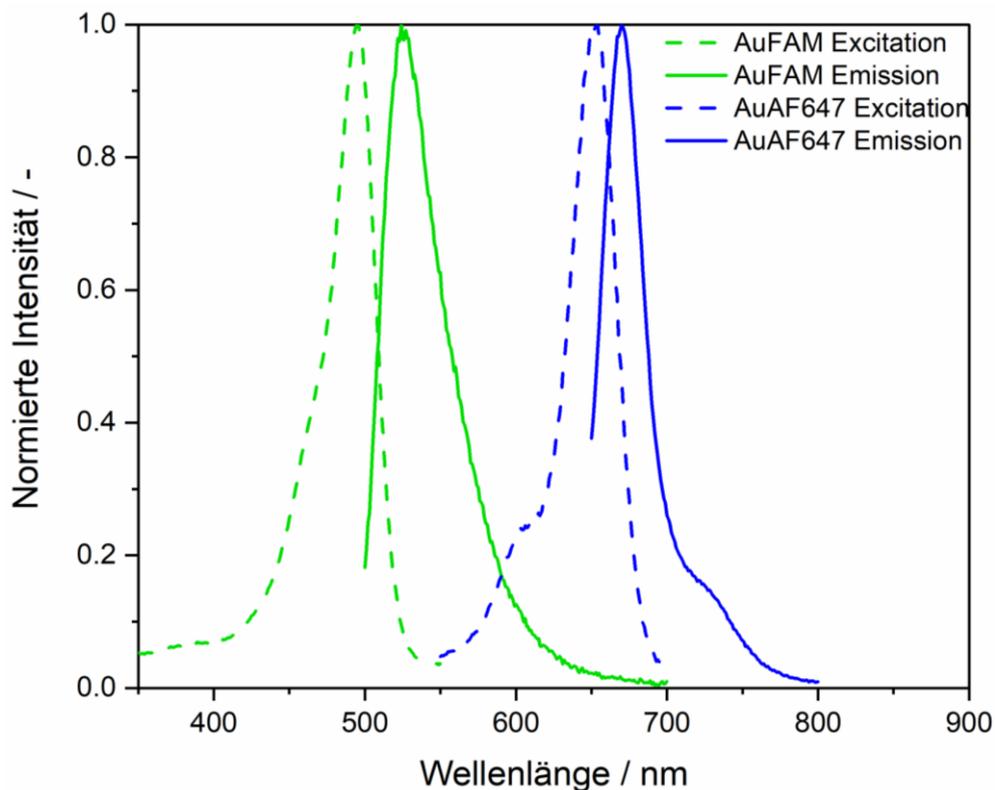


Abbildung 41: Fluoreszenzspektren von AuFAM (grün) und AuAF647 (blau).

5.4.1. Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln in Krebszellen

Die Aufnahme von fluoreszenten Stoffen in Zellen eignet sich sehr gut, um spezielle Bereich innerhalb der Zelle einzufärben und anschließend durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) zu lokalisieren. So wird zum Beispiel häufig das Actin-Skelett der Zelle mit Alexa-Fluor 568 Phalloidin in einem rötlichen Farbton eingefärbt und der Zellkern mit HOECHST in blau. In diesem Fall eignen sich die AuAF647 Partikel nicht gut zum Einfärben, da die Absorptions- und Emissionsbanden sich teilweise mit der Anregung und Emission des Aktin-Skeletts überschneiden könnten. Stattdessen werden in diesem Fall eher die AuFAM Nanopartikel verwendet, da sie außerhalb des Spektralbereichs der bereits verwendeten Farbstoffe für die Zellstrukturen absorbieren und emittieren. Ziel dieser Versuche ist es, selektiv bestimmte Farbstoff mit einem Laser anzuregen und dann die Emission lokalisiert auszulesen, um Rückschlüsse über mögliche Vorgänge innerhalb der Zelle zu ziehen. Dazu werden die gewonnenen Bilder grafisch überlagert, um die Emission von unterschiedlichen Signalen co-lokalisieren zu können. Überlagert z. B. das Bild der Partikelemission mit dem blauen Atomkern aus demselben z-Ebenenabschnitt, so kann davon ausgegangen werden, dass die Nanopartikel bis in den Zellkern vorgedrungen sind. Durch den entsprechenden z-Ebenenabschnitt kann dabei ausgeschlossen werden, dass die Nanopartikel auf oder unter dem Zellkern liegen.

Ultrakleine Nanopartikel sind dafür bekannt, durch die Zellmembran in die Zelle und in seltenen Fällen sogar bis in den Zellkern eindringen zu können.^[6] Dabei konnte beobachtet werden, dass eine generell eher positiv geladene Oberfläche die Penetration der Zellmembran noch begünstigt.^[128] In Abbildung 42 sind Zellaufnahmebilder der zuvor beschriebenen fluoreszenten Nanopartikel AuFAM und AuAF647 zu sehen. Als Negativkontrolle wurden zudem die Farbstoff-Alkine in einer äquivalenten Menge in Abwesenheit der Nanopartikel eingesetzt, d. h. die Konzentration der Farbstoffe ist mit und ohne NP genau gleich. Die Farbstoffe alleine konnten nicht in die Zelle eindringen, wohingegen die an den Partikeln gebundenen Farbstoffe deutliche fluoreszente Signale in den Zellen zeigten. Dazu wurden z-Ebenenabschnitte gewählt, die mit etwas Abstand zur Zellmembran in der Mitte der Zellen lokalisiert sind, um eine potenzielle Adhäsion der Nanopartikel an der Zellmembran auszuschließen. Diese Bilder liefern so also zusätzlich zu dem direkten Nachweis mittels NMR-Spektroskopie noch einen indirekten Nachweis für die kovalente Bindung an die Partikeloberfläche, indem hiermit bewiesen ist, dass der

Eintritt in die Zelle durch die Nanopartikel in einem signifikanten Rahmen ermöglicht wird.

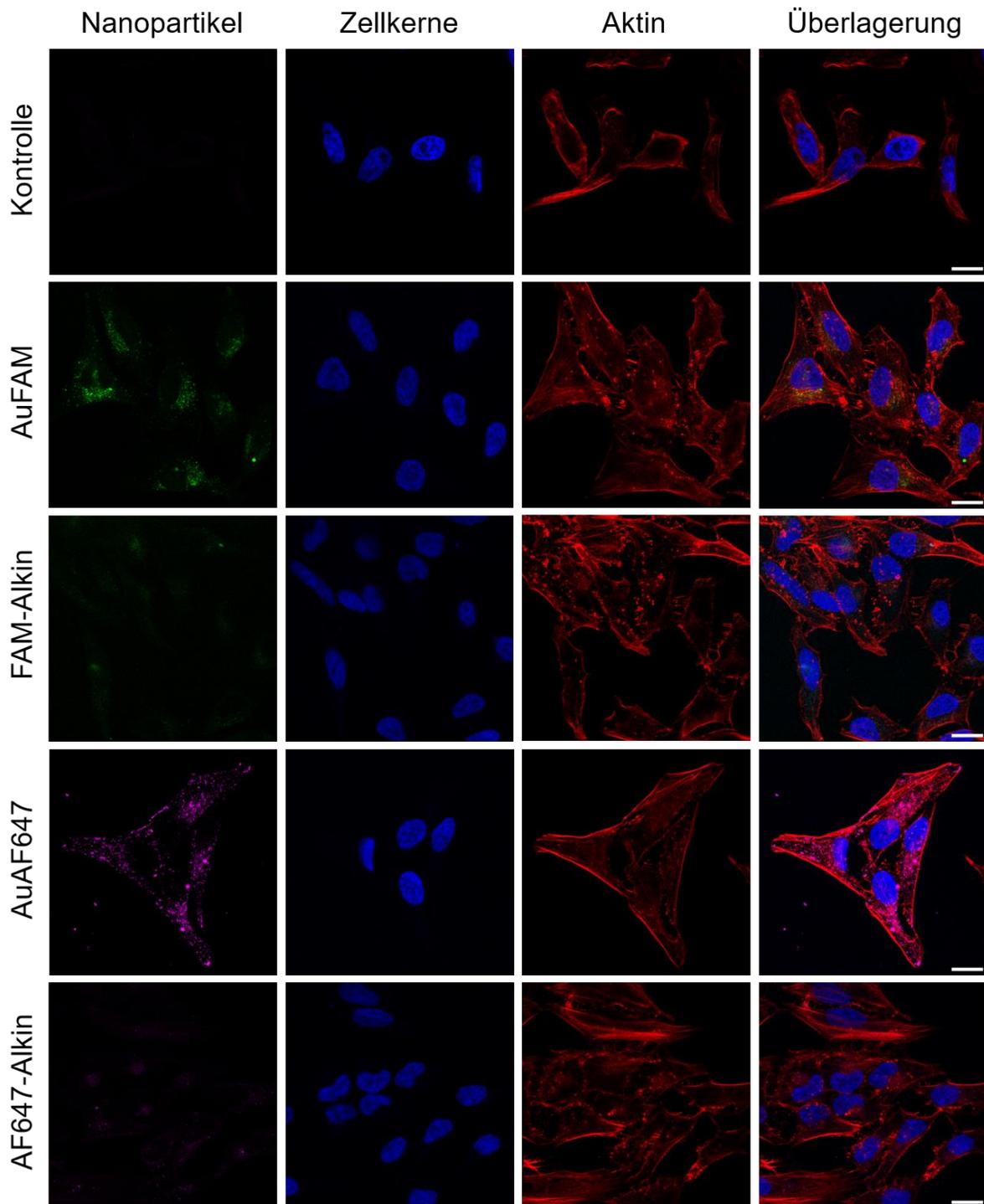


Abbildung 42: CLSM-Bilder von fluoreszent markierten, ultrakleinen Goldnanopartikeln in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden jeweils für 24 h mit 5 µg (auf Au bezogen) Nanopartikeln inkubiert, danach gewaschen, gefärbt und mikroskopiert (durchgeführt von *Dr. S. Kollenda*). Der Maßstab beträgt 20 µm, als Farbstoffe wurden DAPI (Zellkern) und Alexa Fluor 568 Phalloidin (Aktin) verwendet.

Der genaue Mechanismus dieser Endozytose (Zelleintritt) bei ultrakleinen Nanopartikeln ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt. *Sokolova et al.* haben die Aufnahme von fluoreszent markierten Nanopartikeln in Gegenwart verschiedener Endozytose-Inhibitoren getestet. Dabei wurde ersichtlich, dass offenbar verschiedene Endozytosewege eine Rolle für die Aufnahme der Nanopartikel spielen, da die verwendeten Inhibitoren jeweils nur teilweise die Fluoreszenzintensität der Zellen nach Aufnahme abgeschwächt haben. Der effektivste Weg für die Inhibition der Partikelaufnahme war ohne jegliche Inhibitoren bei 4 °C zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass es sich um einen aktiven Prozess von Seiten der Zellen und nicht um einen rein durch Diffusion gesteuerten Prozess handelt. Das bestätigt zudem die Tatsache, dass freie Farbstoffmoleküle ohne Anbindung an die Partikeloberfläche nicht in die Zellen eindringen konnten.^[129]

5.4.2. Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln in Bakterien

Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen besitzen Bakterien eine feste, mehrschichtige Zellwand, durch die die Aufnahme von Nanopartikeln deutlich erschwert wird. Die Zellwand von Bakterien reguliert die Interaktion mit dem umgebenden Medium und ist zudem durch ihre Dicke auch für Nanopartikel deutlich schwerer zu durchdringen. *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien besitzen als gram-negative Bakterien eine Zellwand, die aus einer proteinhaltigen Zellmembran aus Phospholipiden besteht. Diese wiederum ist mit einer dicken Peptidoglycan-Schicht bedeckt, die durch die Selektivität der angebundenen Zuckersequenzen nur sehr spezifische Interaktionen eingeht.^[130] *Butler et al.* berichteten daher, dass die Größe der Partikel für die Aufnahme in Bakterien von entscheidender Bedeutung ist, was auf eine passive Diffusion durch die Proteinkanäle der Zellwand hindeutet. Aktive Prozesse wie etwa bei eukaryotischen Zellen spielen demnach eine untergeordnete Rolle.^[131] Diese passive Diffusion ist stark durch die Größe der Nanopartikel beeinflusst, sodass beispielsweise Partikel mit über 20 nm Durchmesser nicht mehr an diesem Prozess teilhaben können.^[131,132] Der durchschnittliche Durchmesser speziell für die Poren in der Zellwand von *E. coli* Bakterien beträgt etwa 4 nm,^[133] weshalb es den funktionalisierten ultrakleinen Nanopartikeln gerade so möglich sein sollte, in diese Bakterien einzudringen. Im Jahr 2005 konnte die Aufnahme von 1 nm – 10 nm großen Silberpartikeln in *E. coli* Bakterien von *Morones et al.* bestätigt werden, was wiederum

die These der passiven Diffusion durch die Poren der Zellwand verstärkt.^[134] Silbernanopartikel eignen sich jedoch nicht für gezielte, steuerbare Anwendungen, da sie sich für gewöhnlich im biologischen Medium langsam auflösen und unter Abgabe von Ag⁺-Ionen unselektive cytotoxische Effekte zeigen.^[1] Daher wurde die Aufnahme von Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von etwa 5 nm in *E. coli* Bakterien im Jahre 2018 von *Kumar et al.* untersucht. Allerdings waren die Partikel mit zellpenetrierenden Peptiden funktionalisiert, was die Vermutung nahelegt, dass die Endozytose allein durch diese Peptide gesteuert wurde.^[135]

Wenn ultrakleine Goldnanopartikel ohne zellpenetrierende Peptide durch die Zellwand in die Bakterien eindringen können, würden sie sich von den bisher getesteten Partikelsorten am besten für spezifische Einsätze in bakteriellen Studien eignen. Aufgrund der Diffusion durch die Zellwand wird davon ausgegangen, dass möglichst kleine Partikel (<2 nm) am besten durch die Zellwand diffundieren könnten. Daher wurde die Aufnahme von ultrakleinen, fluoreszent markierten AuAF647 Nanopartikeln an *E. coli* Bakterien getestet und mittels supermikroskopischer Verfahren wie SIM und STORM analysiert.

Für die sehr kleinen Bakterien reicht die Auflösung eines CLSM in der Regel nicht aus. Daher werden supermikroskopische Methoden wie SIM oder STORM verwendet. Die Auflösung dieser supermikroskopischen Verfahren ist im Gegensatz zu CLSM mit 200 nm deutlich verbessert, sodass bei SIM bis zu 100 nm und bei STORM bis zu 20 nm aufgelöst werden können.^[98,99,100] Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde konnte über SIM-Bilder (Abbildung 43) beobachtet werden, dass die Nanopartikel bereits sehr effizient von den Bakterien aufgenommen wurden. Die Partikel lagen dabei fein verteilt im Zytoplasma der Zellen vor und zeigten keine Tendenz, an der Zellwand oder anderen Orten überproportional stark vertreten zu sein. Nach drei Stunden Inkubationszeit zeigte sich, dass durch die hohe Zellteilungsrate von *E. coli* Bakterien (x2 alle 20 min^[136,137]) bereits sehr viele Bakterien ohne GFP in der Probe vorlagen und daher nicht mehr durch ihre Fluoreszenz dargestellt werden konnten.^[138] Die Nanopartikel sind demnach in der ca. 500-fachen Bakterienmenge verteilt und zeigen nur noch schwache Signale. Außerdem sind einige rote Punkte sichtbar, die scheinbar nicht im Inneren einer Zelle lokalisiert werden können. Sehr wahrscheinlich liegen diese aber einfach in jüngeren Bakterien, die nur selbst nicht fluoreszieren. Die jeweiligen Ortho-Ansichten der Bakterien bestätigen, dass die Nanopartikel innerhalb

der Zellen und nicht als Agglomerate oder Aggregate an der Außenseite der Zellwand lokalisiert sind. Die Aufnahmen wurden als Schnitte der z-Ebene durchgeführt, die genau auf der Ebene innerhalb der Bakterien liegt.

Zusätzlich zu den SIM-Bildern wurden die Bakterien nach Aufnahme der Nanopartikel mit STORM verbildlicht (Abbildung 44). Es ist zu erkennen, dass die Nanopartikel vermehrt mit den Fluoreszenzsignalen der Bakterien colokalisiert werden können. Einige Nanopartikelsignale sind diffus über den Raum des Bildes verteilt, was darin zu begründen ist, dass die Bakterien ohne weitere Aufreinigung freier Nanopartikel nach 1 h Inkubationszeit direkt vermessen wurden. STORM bietet keine Möglichkeit der optischen Schnitte entlang der z-Achse, sodass keine klare Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Nanopartikel, die mit den Bakterien colokalisiert werden können, auch wirklich innerhalb der Zellen vorliegen oder nur auf bzw. unter der Zelle oder akkumuliert an der Zellwand. Allerdings lassen die höhere Fluoreszenzintensität an den Bakterienpositionen im Kanal der Nanopartikel, sowie die Ergebnisse der SIM-Bilder darauf schließen, dass die Aufnahme der Nanopartikel erfolgreich war.

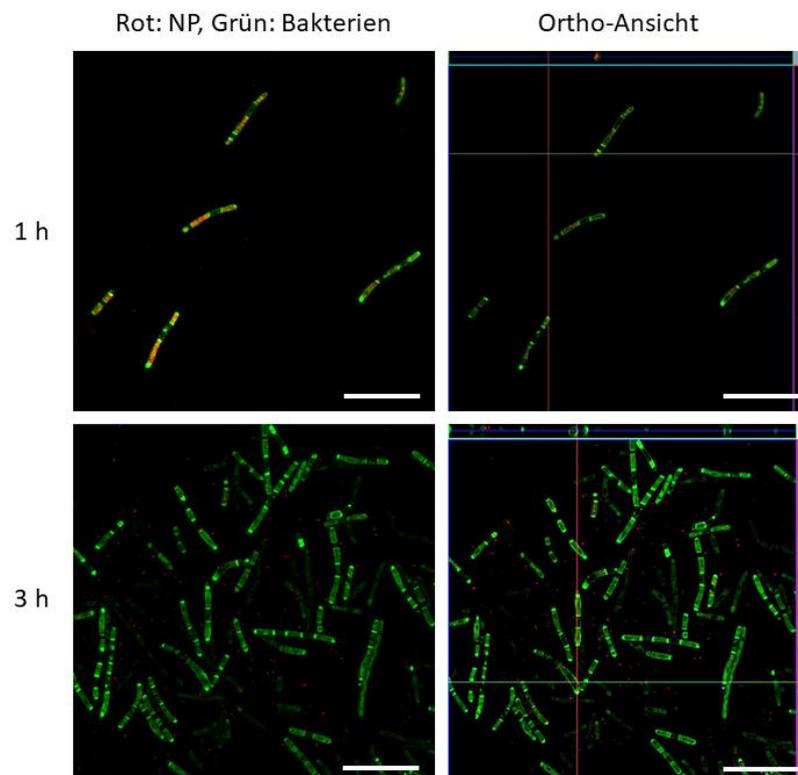


Abbildung 43: SIM-Bilder für die Aufnahme von fluoreszent markierten AuAF647 Nanopartikeln in *E. coli* Bakterien nach 1 h und nach 3 h (durchgeführt von *Dr. N. Biatas*). Der Maßstab beträgt 5 µm. Die Nanopartikel sind in rot dargestellt und die Bakterien durch die Expression von GFP in grün. Vergrößerte Aufnahmen der Ortho-Ansichten sind im Anhang zu finden.

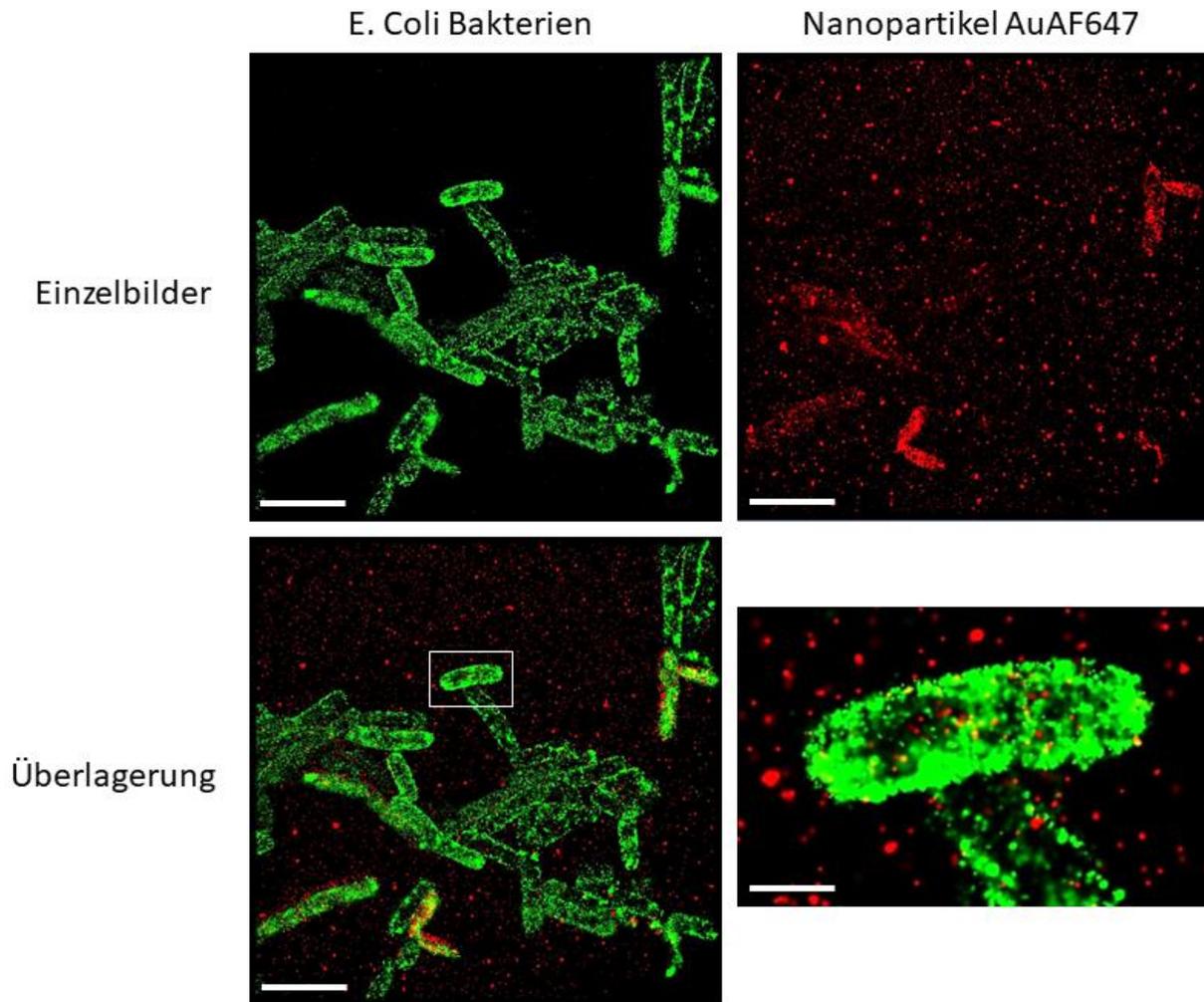


Abbildung 44: STORM-Bilder für die Aufnahme von fluoreszent markierten AuAF647 Nanopartikeln in *E. coli* Bakterien (durchgeführt von *Dr. N. Biatas*). Der Maßstab beträgt 1 μm bzw. 250 nm für die vergrößerte Ansicht unten rechts. Die Nanopartikel sind in rot dargestellt und die Bakterien durch die Expression von GFP in grün.

Anhand dieser Ergebnisse und eines Vergleichs mit der Literatur bezüglich der Aufnahme von Nanopartikeln in Bakterien^[133] kann demnach postuliert werden, dass die Größe der Nanopartikel eine bedeutende Rolle in der Effizienz der Aufnahme der Nanopartikel einnimmt. Ultrakleine Goldnanopartikel sind diesbezüglich von besonderem Interesse, da sie bioinert in die Bakterien eindringen, ohne die Zellwand zu schädigen, oder wie Silber im Inneren der Zelle durch Auflösung zytotoxische Effekte verursachen. Außerdem bieten die Nanopartikel über den neuen Weg zur kovalenten Oberflächenfunktionalisierung durch Azidierung des GSH-Liganden ein breites Spektrum an möglichen funktionellen Liganden, die in einem einfachen Schritt an die Partikel angebracht werden können. So könnten z. B. Antibiotika synthetisch an die Nanopartikeloberfläche geklickt werden, die dann durch den Nanopartikel die repulsiven Effekte von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen überwinden und in

das innere der Zellen eindringen können. Aufgrund stetig wachsender Anzahl dieser von außen betrachtet antibiotikaresistenten Bakterienstämme bedarf es entweder neuer Medikamente oder neuer Applikationswege, um diese Resistenzen zu überwinden.^[139,140]

5.4.3. Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln in 3D-Spheroide

Verschiedene Darmkrankheiten wie z. B. Darmkrebs oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn etc.) stellen insbesondere in Entwicklung- und Schwellenländern eine ernstzunehmende medizinische Herausforderung dar.^[141] Eine Behandlung solcher Krankheiten ist in der Regel nicht trivial, da Medikamente durch die mit verschiedenen Zellen dicht gepackte innere Oberfläche des Darms nur schwer in den Organismus gelangen können.^[142] Auf Nanopartikeln basierende Systeme können jedoch teilweise diese Barriere durchdringen.^[143] Ultrakleine Nanopartikel sind nicht in der Lage, Fluoreszenz zu quenchen^[126,127] und eignen sich durch die variablen Möglichkeiten der kovalenten Oberflächenfunktionalisierung durch CuAAC gut als breit anwendbares Modell, sofern sie in der Lage sind, durch die dicht gepackte Zellschicht an der inneren Oberfläche des Darms zu gelangen.

Als Brückenmodell zwischen *in vivo* Experimenten an Versuchstieren und *in vitro* Experimenten an einfachen 2D-Zellkulturen wurden für diese Versuche Darm-mimetische 3D-Spheroide aus Darmkrebszellen der Maus (*engl.: murine colorectal carcinoma cells*, CT-26) und gesunden Darmepithelzellen der Maus (*engl.: mouse intestinal epithelial cells*, MODE-K) von *Dr. V. Sokolova* hergestellt.^[144] Das 2D-Zellmodell zeigte eine gute Aufnahme der AuAF647 Nanopartikel (vgl. Kapitel 5.4) schon nach zwei Stunden und nach 24 Stunden waren die Nanopartikel sogar diffus in den Zellkernen zu finden (siehe Anhang). Die Ergebnisse für gesunde MODE-K Zellen, sowie für die Darmkrebslinie CT-26 waren nahezu identisch, sodass kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme von ultrakleinen Goldpartikeln festgestellt werden konnte.

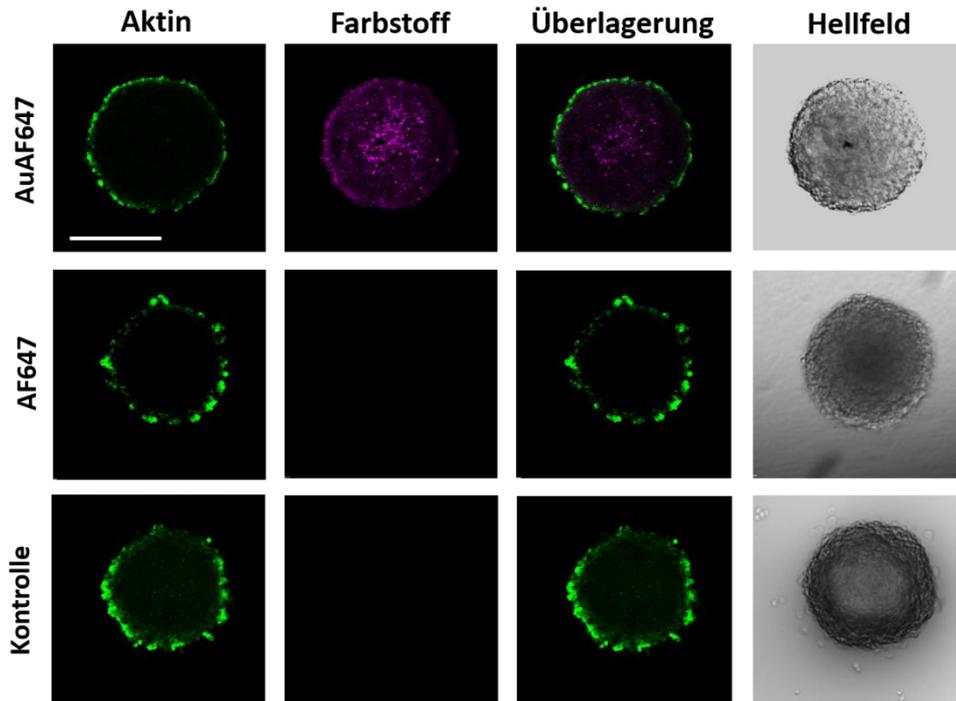


Abbildung 45: CLSM-Bilder von AuAF647 Nanopartikeln in Spheroide (500 Zellen, 3 Tage) der Darmkrebslinie CT-26 nach 2 h Inkubation (aufgenommen von Dr. V. Sokolova). Der Maßstab beträgt 200 μm . Das Aktin-Gerüst der Zellen in den Spheroide wurde mit Alexa-Fluor 488 eingefärbt und die Zellkerne mit DAPI.

Als nächstes wurden 3D-Modelle jeweils aus beiden Zelllinien erstellt, um zu prüfen, ob die Nanopartikel auch in dem Modell einer dicht gepackten Oberfläche durch die Zellen diffundieren können. Dazu wurden CT-26 (Abbildung 45) bzw. MODE-K (Abbildung 46) Zellen auf sog. *ultra-low attachment plates* (ULAP) gegeben und verschiedene Spheroide aus unterschiedlich hohen Mengen an Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Der optimale Zeitpunkt bzw. die optimale verwendete Zellmenge wurde anhand von Tests auf Zellviabilität, Hypoxie (Sauerstoffarmut), und die Anzahl apoptotischer (toter) Zellen auf 1000 Zellen und 3 Tage für MODE-K bzw. auf 500 Zellen und 3 Tage für CT-26 festgelegt.^[144] Die AuAF647 Nanopartikel (violett) sind deutlich auch im Inneren beider Sorten Spheroide zu erkennen. Der freie, in Wasser gelöste Farbstoff zeigt keine Signale innerhalb der Spheroide und auch das Färbemittel für das Aktingerüst der einzelnen Zellen ist lediglich an der äußeren Oberfläche der Spheroide zu finden, da es dem Anschein nach nicht in der Lage ist, durch die eng gepackten Zellen zu diffundieren.

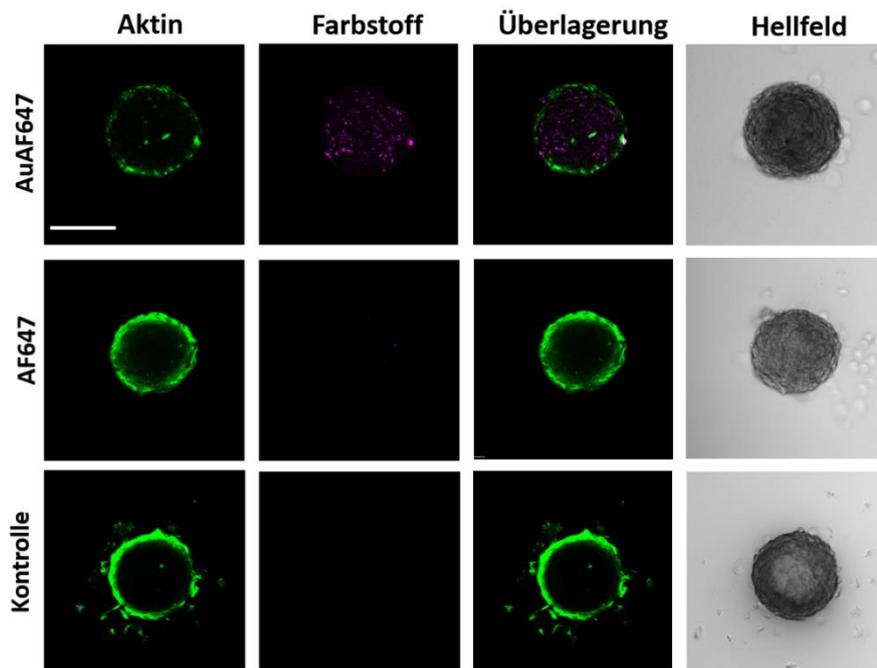


Abbildung 46: CLSM-Bilder von AuAF647 Nanopartikeln in Spheroide (500 Zellen, 3 Tage) der gesunden MODE-K Zellen nach 2 h Inkubation (aufgenommen von *Dr. V. Sokolova*). Der Maßstab beträgt 200 μm . Das Aktin-Gerüst der Zellen in den Spheroiden wurde mit Alexa-Fluor 488 eingefärbt und die Zellkerne mit DAPI.

Zusätzlich zu der Gesamtaufnahme der Spheroide war es möglich, an der Oberfläche der 3D-Modelle über die CLSM einige einzelnen Zellen aufzulösen (Abbildung 47). Dabei ist deutlich zu sehen, dass die Nanopartikel in das Innere der 3D-Modelle eindringen können, indem sie wahrscheinlich durch verschiedene Prozesse der Endo- und Exozytose von Zelle zu Zelle diffundieren.

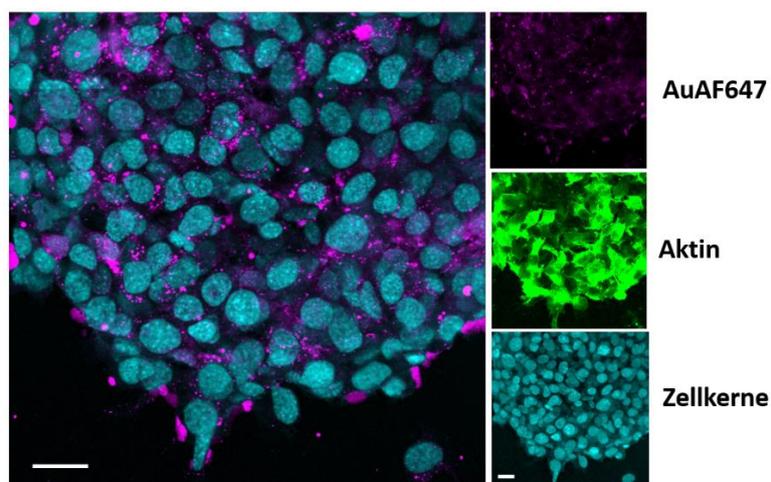


Abbildung 47: CLSM-Bilder in Nahaufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in Spheroide (1000 Zellen, 3 Tage) der gesunden MODE-K Zellen nach 24 h Inkubation (aufgenommen von *Dr. V. Sokolova*). Der Maßstab beträgt 10 μm . Das Aktin-Gerüst der Zellen in den Spheroiden wurde mit Alexa-Fluor 488 eingefärbt und die Zellkerne mit DAPI.

Nach Bestätigung, dass die ultrakleinen, fluoreszent funktionalisierten AuAF647 Nanopartikel bis in den Kern der 3D-Modelle von CT-26 und MODE-K eindringen können, wurden sie zudem an 3D-Modellen der menschlichen Darmwand getestet. Diese Modelle weisen eine Zysten-ähnliche Struktur auf, d. h. sie bestehen aus einer Wand aus dicht aneinander gepackten menschlichen Darmzellen, die als Ganzes einen hohlen Innenraum beherbergen (Abbildung 48). Dabei spiegelt die Innenseite dieser dicken äußeren Zellwand die menschliche Darmflora wider und ist dementsprechend auch mit einer dünnen Schleimschicht überzogen.^[145,146] Nach 24 h Inkubationszeit wurden CLSM-Bilder der Nanopartikel aufgenommen und bestätigten, dass diese in das Epithelgewebe eindringen konnten.

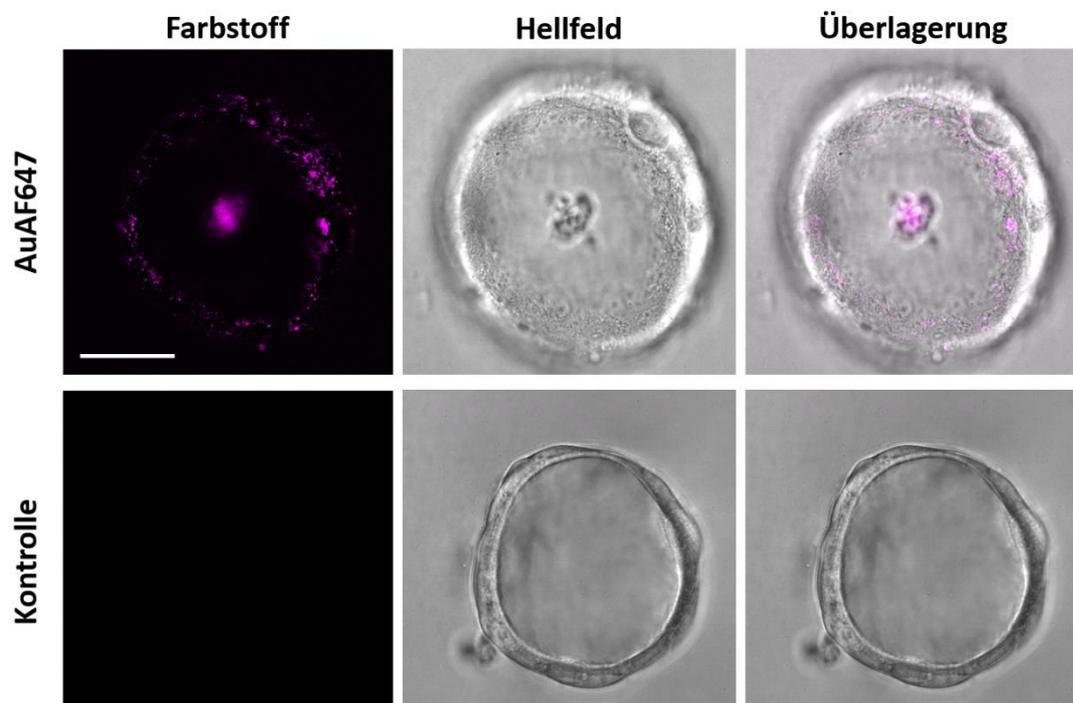


Abbildung 48: CLSM-Bilder für die Aufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in menschliche Darmorganoide nach einer Inkubationszeit von 24 h (aufgenommen von *Dr. V. Sokolova*). Der Maßstab beträgt 200 μm .

Abbildung 48 zeigt deutlich die hohle Kavität im Inneren der Organoide des menschlichen Darmgewebes. Nach 24 Stunden konnten die fluoreszierenden Nanopartikel innerhalb der Wand des Organoids detektiert werden. Einige Nanopartikel sind zudem in die Kavität gelangt und in dort liegende tote Zellen eingedrungen.^[144]

5.5. CuAAC mit AIE-Farbstoffen

Aggregationsinduzierte Emission (AIE) ist ein Phänomen, das erstmals 2001 von *Tang et al.* mit 1-Methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilol dokumentiert werden konnte. Dabei wurde festgestellt, dass ein Molekül als Feststoff im aggregierten Zustand eine starke Emission zeigte, allerdings nicht, wenn es in einem geeigneten Lösemittel aufgelöst wurde. Dieser AIE-Effekt taucht nicht nur bei Aggregation von bestimmten Molekülen auf, sondern teilweise auch einfach, wenn die Freiheitsgrade der Rotation und/oder Vibration innerhalb des Moleküls eingeschränkt wird. Diese Einschränkung der Beweglichkeit des Moleküls findet neben dem Fall einer potenziellen Aggregation teilweise auch statt, wenn das Molekül gebunden wird und so nicht mehr frei beweglich ist. Durch diese Einschränkung der intramolekularen Rotation bzw. Vibration des AIE-Moleküls wird eine strahlungsfreie Relaxation nach Anregung inhibiert, sodass der Energieverlust in Form von Strahlung erfolgen muss.^[147] Aus diesen Gründen sind Moleküle, die den AIE-Effekt zeigen, schon länger Objekt intensiver Forschung im Bereich der Biomedizin (Bindung an Biomoleküle mit resultierender Fluoreszenzemission) und Materialwissenschaften.^[148]

Bereits 2017 wurden ca. 100 nm große Nanopartikel auf Basis des Polymers Polystyrol-*block*-maleinsäureanhydrid (engl.: *poly(styrene-block-maleicanhydride)*, PSMA) und einem im *deep-red*-Bereich emittierenden AIE-Fluorophor synthetisiert. Als Fluorophor wurde ein Derivat des Tetraphenylethylens (*TPE-red*) verwendet, welches mit dem Polymer eingekapselt wurde. Durch diese Immobilisierung innerhalb der Mizellen-artigen Strukturen konnten die AIE-Effekte realisiert werden und der Farbstoff fluoreszierte im *deep-red*-Bereich bei ca. 1040 nm bei einer Anregung im nahen UV-Bereich. Dieser Effekt konnte auch in diversen Zellexperimenten an HeLa-Zellen nachverfolgt werden und zeigte, dass die Partikel auch bei Aufnahme in Zellen eine deutliche rote Fluoreszenz aufwiesen.^[149] 2016 berichteten zudem *Liu et al.* von kolloidalen Nanopartikelsystemen basierend auf einem amphiphilen Makromolekül, welche unter Einwirkung von Licht biomedizinische Wirkstoffe wie Doxorubicin im Zytosol von Krebszellen freigegeben konnten. Dazu wurde der AIE-Effekt der polymeren Nanopartikel für *Imaging*-Zwecke in diesen Zellen genutzt und mit verschiedenen Zellmarkern konnte der Zielort der Wirkstofffreigabe bestimmt werden.^[150]

Die CuAAC an Azid-terminierten ultrakleinen Nanopartikeln bietet demnach ein anderes Blickfeld auf die Thematik der biomedizinischen Anwendung von AIE-

Farbstoffen. Zu diesem Zweck wurde drei AIE-Luminophore aus der Arbeitsgruppe von Prof. J. Voskuhl ausgewählt (Abbildung 49). Sie basieren auf dem bekannten AIE-Motiv der aromatischen Thioester^[151] und wurden zwecks Anbindung an die Nanopartikel mit einer Alkin-Gruppe versehen.

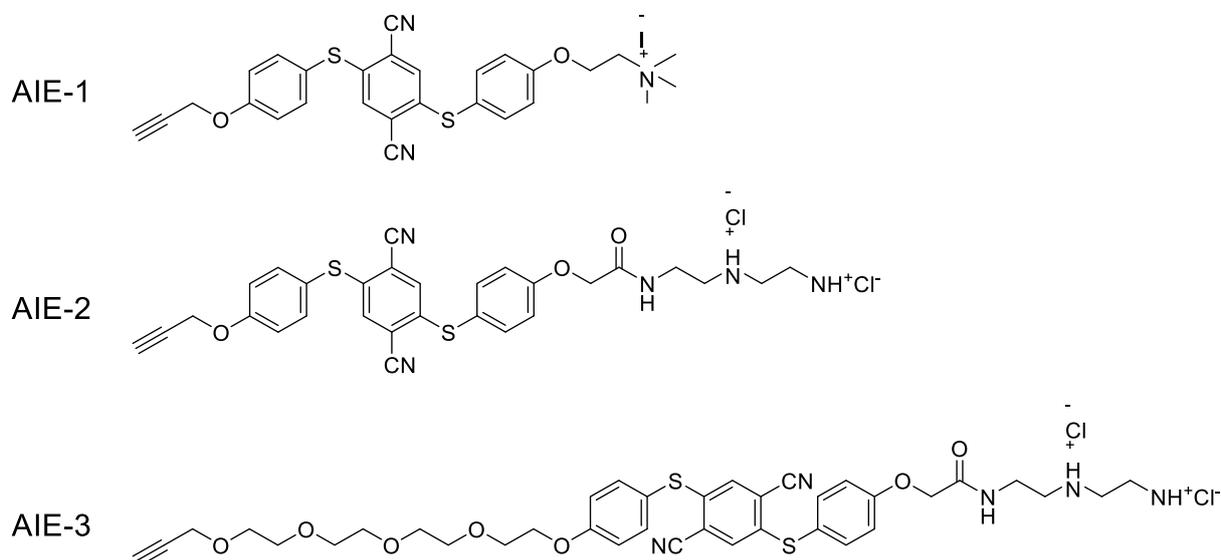


Abbildung 49: Strukturen der verwendeten AIE-Farbstoffe aus der Arbeitsgruppe von Prof. J. Voskuhl.

Die verwendeten Farbstoffe sind trotz der vielen ionischen Gruppen nur bedingt wasserlöslich und wurden daher vor der Addition zu der Nanopartikel-Suspension in etwas DMSO vorgelöst. Nach vollendeter Reaktionszeit wurden die Nanopartikel aufgereinigt und auf ihre Größe hin untersucht, welche hauptsächlich unverändert im Vergleich zu den AuN₃ Vorläuferpartikeln war. Lediglich die DCS-Kurve für Partikel mit dem Liganden AIE-3 zeigte eine leichte Vergrößerung des hydrodynamischen Radius (Abbildung 50). Das ist vermutlich darin begründet, dass dieser Ligand durch den relativ großen und wasserlöslichen PEG-Anteil im Vergleich zu den anderen Liganden von einer deutlich vergrößerten Hydrathülle umgeben ist. Durch die Bildung von diversen Wasserstoffbrückenbindungen zum umgebenden Lösemittel und daraus resultierender Diffusion der Wassermoleküle zwischen die Ketten der Liganden stehen diese Moleküle wahrscheinlich relativ gerade von der Partikeloberfläche in die Umgebung ab, wodurch der längere Linker für den hydrodynamischen Radius hier besonders ausschlaggebend ist.

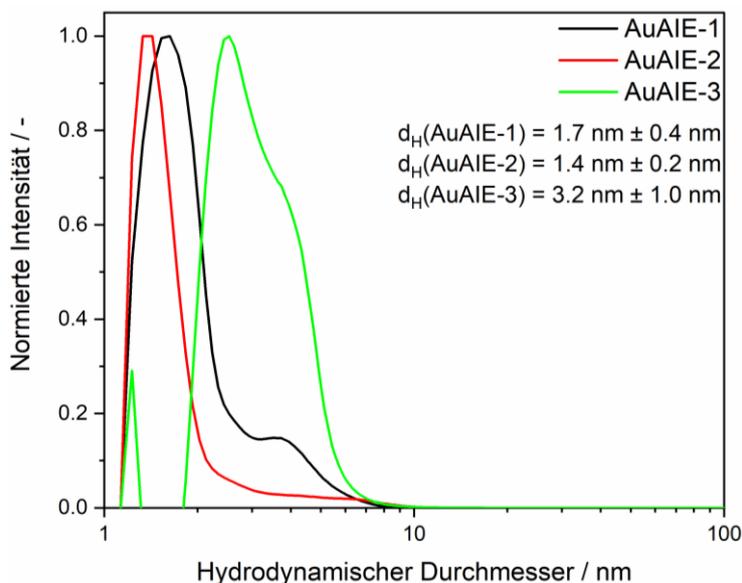


Abbildung 50: DCS-Kurven der mit AIE-Liganden funktionalisierten Goldnanopartikelsysteme.

Die Anzahl der auf den Nanopartikeln immobilisierten AIE-Liganden wurde über die UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Das entsprechende UV-Vis-Spektrum der Nanopartikel sowie die Kalibrationsgeraden der reinen AIE-Alkine sind in Abbildung 51 dargestellt. Um ein aussagekräftiges Integral für die funktionalisierten Nanopartikel zu erhalten, wurde der Peak der Luminophore mit einer geraden Basislinie versehen, die als Grundlinie für das Integral diente. Mit dem so erhaltenen Wert konnte der Untergrund der Nanopartikel näherungsweise ausgeschlossen werden, sodass für die Berechnung der Anzahl nur das Signal des Farbstoffes verwendet wurde.

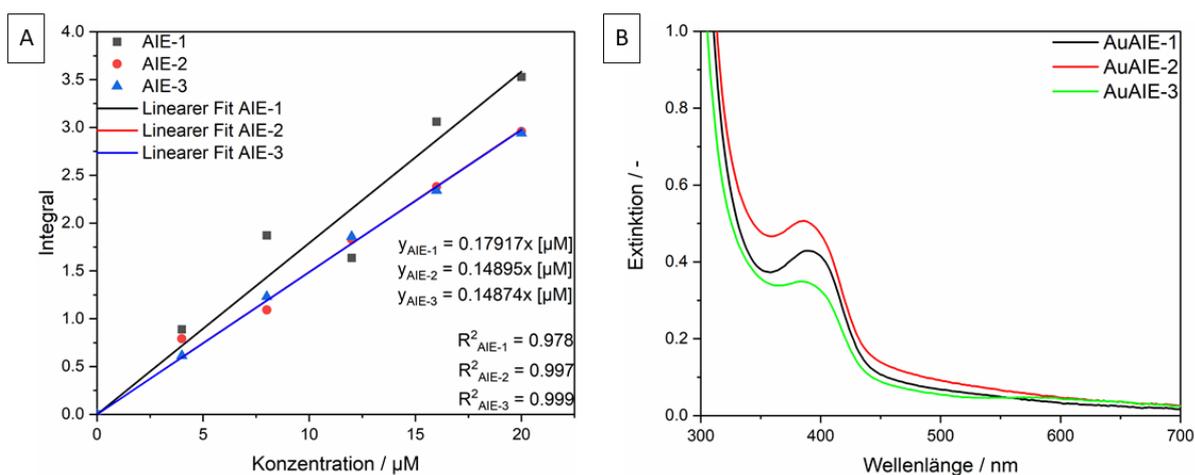


Abbildung 51: (A) Kalibrationsgeraden aus den UV-Vis-Messungen der freien AIE-Alkine (siehe Anhang). Gemessene Integrale: AIE-1: 338 nm – 448 nm; AIE-2: 336 nm – 438 nm; AIE-3: 340 nm – 444 nm. (B) UV-Vis-Spektrum der Nanopartikelsuspensionen mit einer auf Gold normierten Konzentration von 30 µg/mL (617 nM NP).

Die relevanten Werte, sowie die errechnete Anzahl gebundener Liganden ist in Tabelle 3 dargestellt. Für die Berechnungen wurde zu Vergleichszwecken mit anderen funktionalen Systemen ein Kerndurchmesser von 2 nm angenommen, der sich allerdings in sehr guter Näherung zum wahren Kerndurchmesser befindet. Wie erwartet wurde das PEGylierte AIE-3 Molekül in geringster Anzahl gebunden. Der lange, hydrophile PEG-Teil des Moleküls liegt nah an der Partikeloberfläche und wird durch Wassermoleküle, die unter Bildung von Wasserstoffbrückenbildung in diesen kernnahen Bereich hineindiffundieren, aufgequell. Dadurch benötigt dieses Molekül signifikant mehr Platz als die anderen beiden, deren hydrophobe AIE-Einheit ohne einen PEG-Spacer an den Nanoartikel gebunden ist.

Tabelle 3: Quantifizierte Daten der Nanopartikelsysteme mit AIE-Luminophoren. Die Klickeffizienz ist bezogen auf die zur CuAAC eingesetzten 0.8 Äquivalenten zu Azidogruppen.

Partikelsystem	NP Konzentration / μM	Integral des Luminophor- Signals	AIE Konzentration / μM	Anzahl gebundener Luminophore / NP^{-1}	Molekularer Fußabdruck / nm^2	Klickeffizienz / %
AuAIE-1	0.62	7.83	44	71	0.18	75
AuAIE-2	0.62	7.81	52	85	0.15	90
AuAIE-3	0.62	4.60	31	50	0.25	53

Als nächstes wurde untersucht, ob die Luminophore auch nach Anbringung an die Partikeloberfläche weiterhin ihre AIE-Eigenschaften aufwiesen. Dazu wurden zunächst Fluoreszenzspektren in Wasser aufgenommen. Wasser als schlechtes Lösemittel für die Liganden sorgt für die benötigte Einschränkung der Freiheitsgrade in Rotation und Vibration, sodass die Liganden nicht mehr dazu in der Lage sind, frei zu rotieren, um aufgenommene Energie durch strahlungsfreie Prozesse zu relaxieren (Abbildung 52). Die Anregungs- und Emissionswellenlängen lagen dabei im Vergleich zu den freien Liganden unverändert vor (siehe Anhang). Liegt der AIE Ligand am Nanopartikel immobilisiert vor, so sind drei mögliche Szenarien denkbar. Zum einen könnte der Luminophore mit der Alkin-tragenden Seite so an den Nanopartikel gebunden sein, dass der übrige Rest des Moleküls frei in die Lösung heraussteht und uneingeschränkt rotieren kann. Zum anderen könnte durch die sehr hohe Beladungsdichte an der Partikeloberfläche eine entropisch ungünstige Anordnung der Liganden entstehen, bei der die Bewegung durch intermolekulare Wechselwirkungen eingeschränkt wird, sodass die Moleküle bei Anregung sichtbares Licht emittieren.

Außerdem könnte der Ligand potenziell aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit und hohen Flexibilität auf die Partikeloberfläche zurückfallen, wodurch der Luminophor in einer fixierten Konformation vorliegen und bei Anregung stark emittieren würde. Aufgrund dessen, dass für die betrachteten Partikelsysteme eine Fluoreszenzemission beobachtet werden konnte, fällt die erste Möglichkeit der frei in der Lösung rotieren Liganden weg. Dadurch wird Szenarium zwei mit der Einschränkung der Bewegungsfreiheit durch die hohe Beladungsdichte wahrscheinlicher. Szenario drei mit der Rückfaltung auf die Partikeloberfläche bleibt durch die sehr hohe Beladungsdichte auf den Partikeln zweifelhaft.

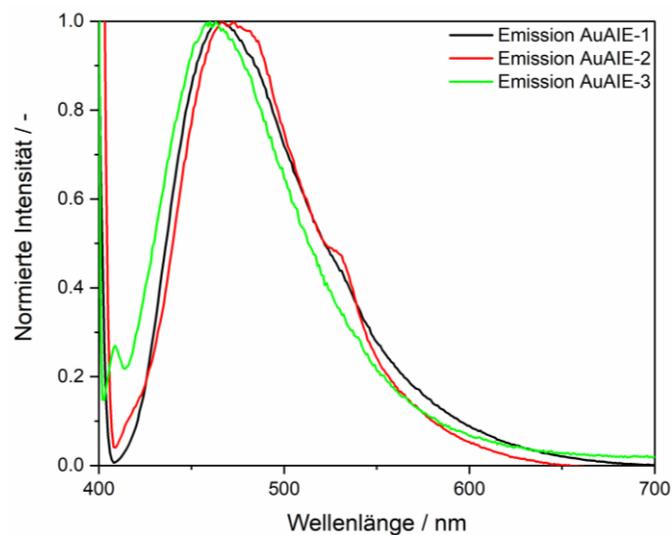


Abbildung 52: Fluoreszenzemissionsspektren von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit AIE-Luminophoren.

Es ist anzumerken, dass die Nanopartikel trotz der sehr hohen Beladungsdichte mit schlecht wasserlöslichen Molekülen weiterhin sehr gut in Wasser dispergierbar waren und auf diese Weise auch für Zellaufnahmestudien verwendet werden konnten. Durch das Anklicken an die Partikeloberfläche können also auch normalerweise ungeeignete Liganden für zellbiologische Experimente zur Verfügung stehen.

Die funktionalisierten Nanopartikel wurden im Gegensatz zu frei gelösten AIE-Alkinen gut in die Zellen aufgenommen. Abbildung 53 zeigt CLSM-Bilder der Aufnahme der Partikel in HeLa Kyoto (H2B-mCherry) Zellen. Die Bilder wurden von *Dr. S. Kollenda* auf einer Fokalebene innerhalb der Zelle aufgenommen, sodass keine Signale von auf der Oberfläche der Zellmembran aggregierten Partikel zu sehen waren. Alle Zellen konnten die hinzugegebenen Partikel aufnehmen, auch wenn unterschiedlich stark. AuAIE-1 wurde am effektivsten aufgenommen, zeigte jedoch auch eine starke

Aggregation an der Zellmembran, was wiederum negative Auswirkungen auf die Zellviabilität hatte (Abbildung 54). Diese Präzipitation auf der Zelloberfläche hängt vermutlich mit der sehr schlechten Wasserlöslichkeit des Liganden zusammen. Im Gegensatz zu AuAIE-2 und AuAIE-3 besitzen die AuAIE-1 Partikel nur eine geringe Anzahl geladener Gruppen, sodass Wasser als polares, protisches Lösemittel keine guten Lösemiteleigenschaften aufweist. Außerdem sind alkylierte Ammoniumionen generell schlechter löslich in Wasser als die in AuAIE-2 und AuAIE-3 vorkommenden sekundären und primären Ammoniumgruppen. AuAIE-2 und AuAIE-3 konnten durch ihre im Vergleich etwas verbesserte Löslichkeit ohne Aggregation auf der Membran in die Zellen eindringen. Die Verteilung der Partikel innerhalb der Zellen ähnelte allerdings eher einer vesikulären Einschließung als einer freien Verteilung im Zytoplasma, wie es bei AuFAM und AuAF647 der Fall war (vgl. Abbildung 42). Im Zellkern konnten keine Partikel gefunden werden.

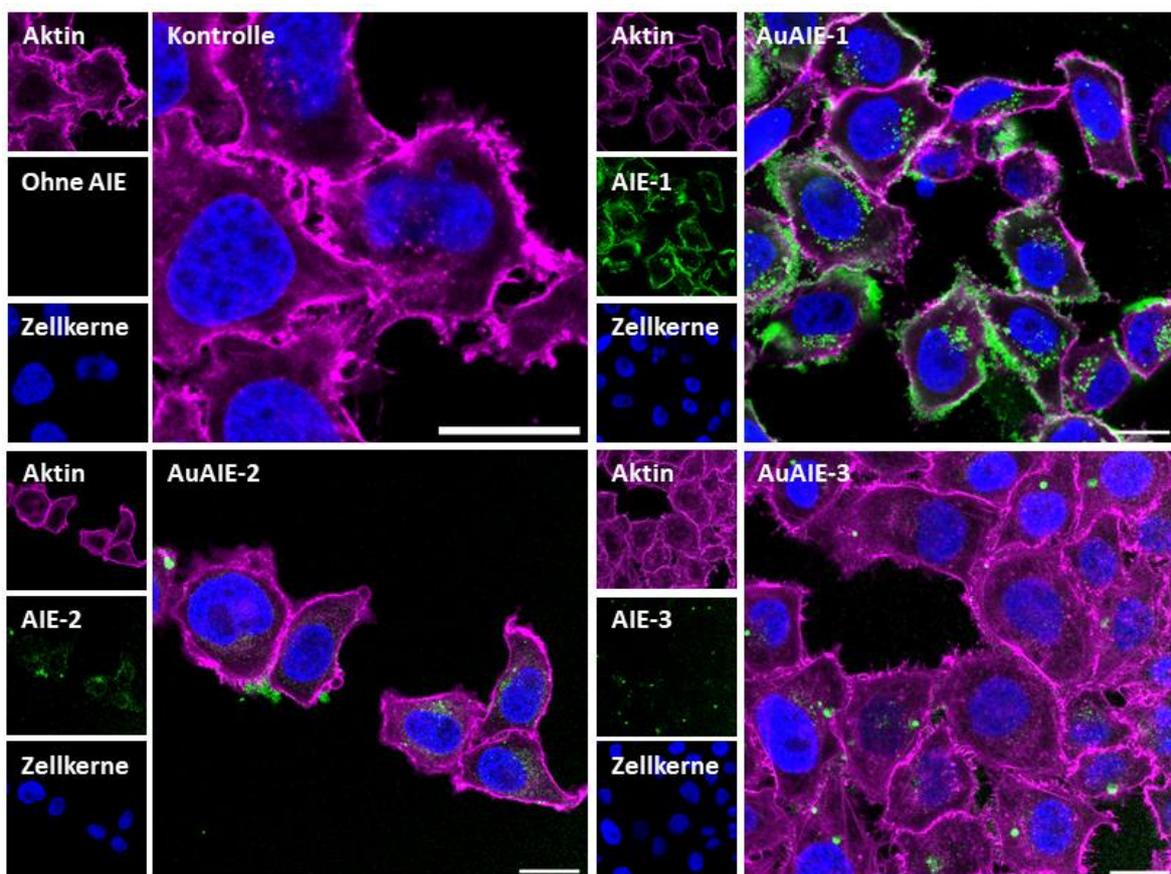


Abbildung 53: CLSM Bilder von HeLa Kyoto Zellen nach Inkubation mit AuAIE Nanopartikeln, dispergiert in DMEM (durchgeführt von *Dr. S. Kollenda*). Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, gewaschen, fixiert und eingefärbt. Die Maßstäbe sind 20 µm. Für die Kontrollgruppe wurden unbehandelte Zellen verwendet.

Ein MTT-Test zur Messung der Zytotoxizität zeigte, dass die Nanopartikel generell keine toxischen Eigenschaften aufweisen. Lediglich AuAIE-1 zeigte eine verminderte Zellviabilität., vermutlich durch Präzipitation und Aggregation auf der Zellmembran. In Anbetracht der Fehlerbalken und der Kontrolle aus einer reinen 5% DMSO in DMEM Lösung können die freien Farbstoffe als ungiftig eingestuft werden, wobei lediglich der DMSO-Anteil in einem gewissen Maß für Zelltod gesorgt hat.

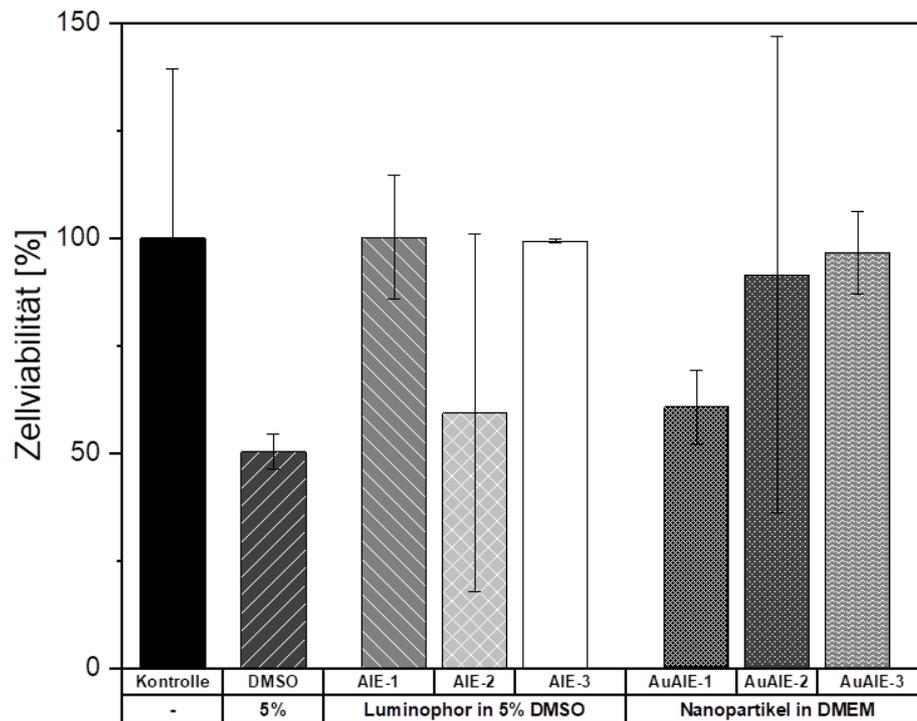


Abbildung 54: MTT-Test von HeLA Kyoto (H2B-mCherry) Zellen mit den AuAIE Nanopartikeln im Vergleich zu den freien Farbstoff-Alkinen (durchgeführt von *Dr. S. Kollenda*). Die freien Farbstoffe wurden in DMSO vorgelöst und mit DMEM auf ein Volumenanteil von 5% DMSO verdünnt. Die Nanopartikel wurden jeweils in 5 µg Einheiten in 200 µL DMEM hinzugegeben.

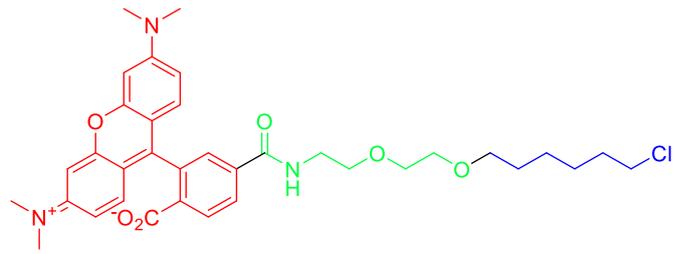
5.6. Goldnanopartikel mit HaloTag-targeting Liganden

Proteine spielen eine wichtige Rolle in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen. Allerdings stellt das Untersuchen in lebenden Zellen eine große Herausforderung dar, da selbst in den einfachsten Systemen eine selektive Veranschaulichung sehr schwierig ist. Um die Funktion verschiedener Proteine herauszufinden, müssen also sehr selektive molekulare Werkzeuge verwendet werden. Für die Differenzierung verschiedener Proteine müssen diese zunächst selektiv von allen anderen Substanzen innerhalb der Zellen abgetrennt und sichtbar

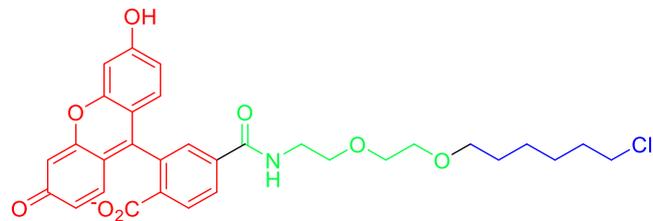
markiert werden. Ein oft verwendeter Ansatz für dieses Vorhaben ist das Einsetzen von sog. Fusions-Tags. Diese sind notwendig, wenn das Protein nicht schon von selbst fluoreszent markiert vorliegt (z. B. *green fluorescent protein*, GFP).^[152] Zu den bekannten Tags zählen FLAG, poly-His, GST oder MBP.^[153,154,155,156] Diese Fusions-Tags sind allerdings teilweise limitiert durch ihre Bindungsaffinität, Selektivität und Kinetik. Die Interaktionen dieser Tags mit ihren Proteinen sind reversibel, d. h. dass bei Waschprozessen durch Angleichung des Gleichgewichts zwischen gebundenen und gelösten Tags immer mehr Tags auch wieder in Lösung gehen, wodurch ein signifikanter Teil des untersuchten Proteins ohne jegliche Markierung im Organismus verbleibt und nicht untersucht werden kann.^[157] 2008 wurde von *Los et al.* eine neue Technologie der Protein-Tags entwickelt, die später als HaloTag bekannt wurde und sich durch eine schnelle, selektive und irreversible Bindung auszeichnet.^[158]

Die Idee hinter dem HaloTag besteht darin, dass ein Grundgerüst eines funktionalisierbaren Chloroalkan-Linkers ein weites Spektrum verschiedener Anwendungen ermöglicht, die alle über dieselbe chemische Grundstruktur des Tags an die Proteine binden können. Diese Grundstruktur des Tags zeichnet sich durch ein terminales 1-Chlorohexan aus, welches durch diverse funktionelle Gruppen an der 6-Position unterschiedlich funktionalisiert werden kann (Abbildung 55). Erste Tests bestanden darin, zwei verschiedene Farbstoffe (TMR und FAM) über einen Spacer-Baustein an die 6-Position zu binden, sodass die Proteine fluoreszent markiert werden und mittels mikroskopischer Methoden untersucht werden konnten. Die Proteine konnten außerdem gesammelt werden, indem das 1-Chlorohexan über einen PEG(4)-Linker an Agarose-Harz gekuppelt wurde. Die Proteine konnten dann aus dem Lysat der Zellen kovalent daran binden und durch Zentrifugation abgetrennt werden.^[158]

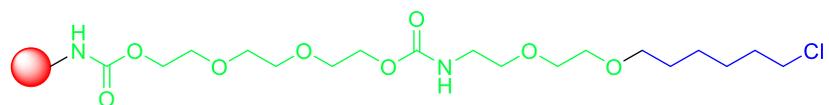
HaloTag-TMR



HaloTag-FAM



HaloTag-Agarose



Funktion

Linker

Tag

Abbildung 55: Darstellung der ersten verwendeten HaloTags. Die Funktion des Tags (rot) liegt entweder in der fluoreszenten Markierung der Proteine (TMR, FAM) oder in der Immobilisation an einer leicht zu reinigenden Phase (Agarose-Harz). Über einen entsprechenden Linker (grün) sind die bindenden Tags (blau) verbunden (adaptiert aus Literatur^[158]).

Diese verschiedenen Chloroalkane wurden nacheinander getestet, indem sie zu Haloalkan-Dehalogenase (DHaa) gegeben wurden, die mittels Glutathion-S-Transferase (GST) aus einem Lysat von *Rhodococcus Rhodocrous* Bakterien extrahiert wurde (Abbildung 56 (A)).^[159,160,161] Die Bindung der Chloroalkane an DHaa ist jedoch reversibel. Dabei erfolgt ein nukleophiler Angriff der Asparaginsäure¹⁰⁶ von DHaa an das α -Kohlenstoff des Chloroalkans, welches sich zuvor zwischen Asparagin⁴¹ und Tryptophan¹⁰⁷ über Wasserstoffbrücken angelagert hat. Der Prozess ist solange reversibel, wie das Histidin²⁷² in räumlicher Nähe zu diesem Prozess steht. Histidin²⁷² kann durch Polarisierung von Wassermolekülen einen nukleophilen Angriff von Wasser an den entstandenen Alkylester katalysieren, sodass die geformte kovalente Bindung unter Abspaltung des Enzyms hydrolysiert wird. Dabei dient Glutaminsäure¹³⁰ als stabilisierender Elektronendonator für die Histidin-Einheit. Durch Substitution des Histidins²⁷² durch eine unpolare Aminosäure wie Phenylalanin (Abbildung 56 (B)) ist diese zuvor beschriebene Aktivierung von Wassermolekülen für nukleophile Angriffe nicht mehr möglich, sodass das Protein-Alkan-Intermediat nach Entstehen der kovalenten Bindung inert und unreaktiv vorliegt. Die Länge des Linkers

des HaloTags spielt dabei eine wichtige Rolle, da für das gewählte Beispiel von DHaA die katalytischen Aminosäuren in einer etwa 15 Å tiefen Tasche des Enzyms liegen.^[162]

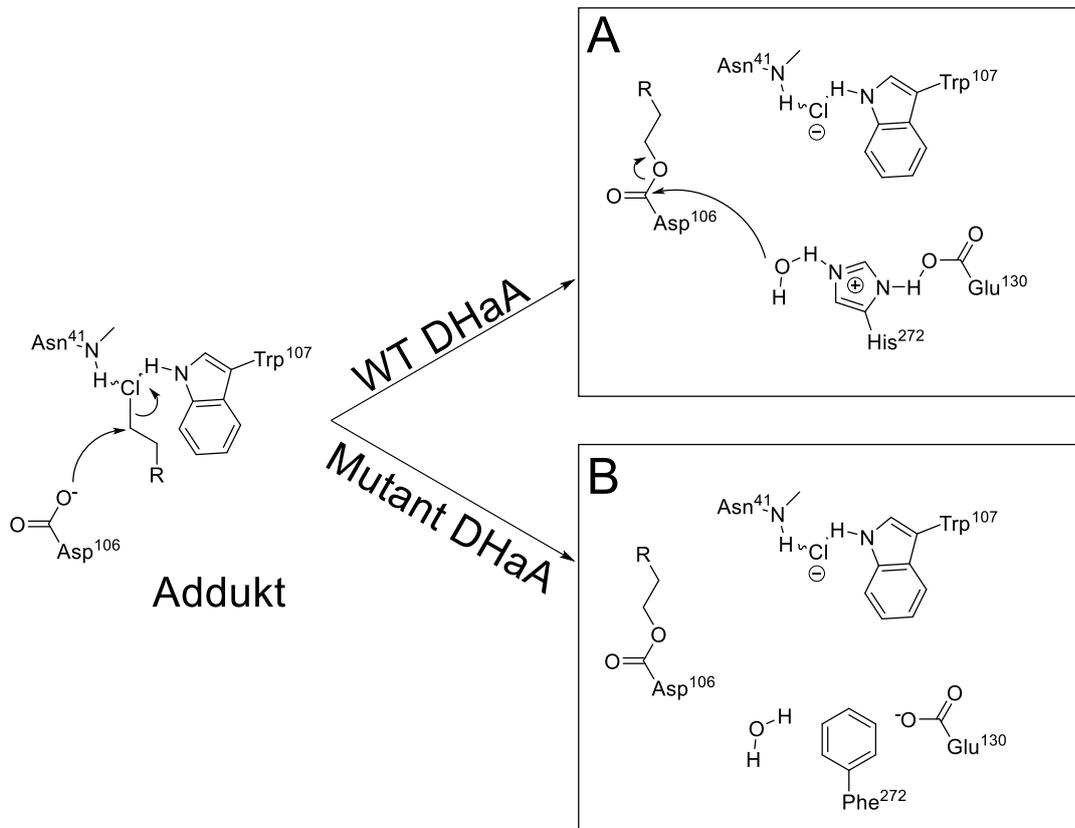


Abbildung 56: Schematischer Mechanismus der Hydrolyse des HaloTag-Addukts durch die benachbarte Histidin²⁷²-Seitenkette (A) und Verhinderung der Hydrolyse durch Einsetzen der hydrophoben Seitenkette Phenylalanin²⁷² (B) (adaptiert aus Literatur^[158]).

Mit der Mutante des DHaA mit Phenylalanin an der 272-Position (H272F) konnte über Massenspektrometrie eine 1:1-Stöchiometrie zum HaloTag-FAM Liganden bestimmt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Koordination des Liganden an dieser Proteinvariante irreversibel ist, indem der Tag auch bei denaturierenden Bedingungen bei 95 °C und in organischen Lösemitteln nicht vom H272F-GST Fusionsprotein getrennt werden konnte.^[163] Die Spezifität des Tags gegenüber H272F-GST wurde getestet, indem Lysate aus bakteriellen Zellen, die dieses Fusionsprotein exprimierten, mit dem HaloTag-TMR Liganden inkubiert wurden. Dabei konnte später in einer SDS-Page nur eine einzige fluoreszente Bande gefunden werden, die der molekularen Masse des Adduktes entsprach. Als Kontrolle wurden zudem Lysate mit dem Liganden inkubiert, die nur den unmodifizierten Wildtyp des DHaA sowie freie GST beinhalteten. Bei beiden Kontrollen konnte keine fluoreszente Bande identifiziert werden. Auch in

Zellen von Säugetieren konnten Addukte des HaloTag-TMR nur bei Lysaten von CHO-K1 Zellen gefunden werden, die das modifizierte H272F Protein exprimierten.^[164]

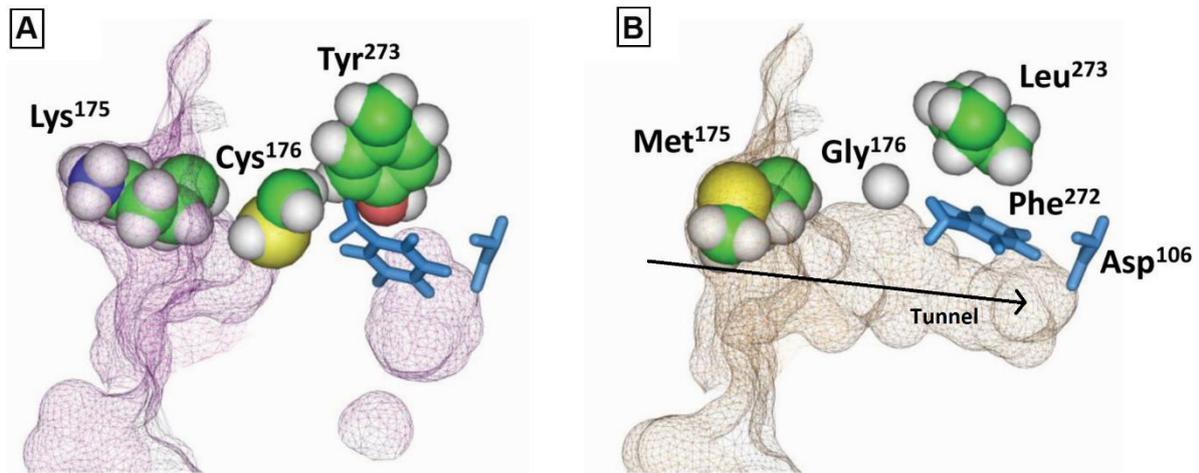


Abbildung 57: Strukturmodelle von H272F (A) und HT2 (B) ohne gebundenen Liganden. HT2 zeigt einen durchgehenden Tunnel von der Proteinoberfläche bis zur nukleophilen Asparaginsäure¹⁰⁶. Bei H272F ist dieser Tunnel durch sterisch anspruchsvolle Seitenketten teilweise blockiert (adaptiert aus Literatur^[164]).

Um die Ligand-Protein Interaktion zu optimieren, wurde nach kovalenter Anbindung von HaloTag-TMR an H272F die Struktur des Adduktes berechnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Lysin¹⁷⁵, Cystein¹⁷⁶ und Tyrosin²⁷³ wohl in direkter Nachbarschaft (<5 Å) zum gebundenen Liganden stehen. Die teilweise stark sterisch anspruchsvollen Seitenketten dieser Aminosäuren stehen dabei in den etwa 15 Å tiefen Tunnel, in den der Ligand für eine kovalente Anbindung an die Asparaginsäure¹⁰⁶ eindringen muss. Außerdem steht der aromatische Ring von Phenylalanin²⁷² ungünstig für ein Eindringen des Liganden, da dieser sich erst um ca. 45° drehen müsste um den Tunnel freizugeben. Um also eine bessere Bindungsaffinität zu erhalten, ist eine offensichtliche Lösung, diese Aminosäuren durch weniger sterisch anspruchsvolle Alternativen zu substituieren. Dazu wurde eine mutagene Variante (HT2) entwickelt, welche an diesen Positionen stattdessen durch Methionen¹⁷⁵, Glycin¹⁷⁶ und Leucin²⁷³ charakterisiert wird (Abbildung 57). Diese Substitution erlaubte zudem der Seitengruppe von Phenylalanin²⁷², sich um 45° zu drehen, sodass eine Konformationsänderung bei Eindringen des Liganden nicht mehr notwendig war und die Reaktionsgeschwindigkeit stark erhöht werden konnte. Mit diesen Änderungen konnte die Bindungsaffinität der HaloTag-Liganden bei HT2 im Vergleich zum bereits relativ guten H272F nochmal um das 10000-40000-fache gesteigert werden.^[164]

Im Folgenden soll die kovalente Anbringung des Modellfusionsproteins HT2 an die Oberfläche von funktionalisierten, ultrakleinen Goldnanopartikeln diskutiert werden.

Diese Arbeit fand im Rahmen eines Kooperationsprojektes des Sonderforschungsbereiches 1093 (SFB1093) mit der Arbeitsgruppe von *Prof. D. Hellerschmied* statt. Um die Anbringung des Proteinkomplexes an Nanopartikel zu untersuchen, mussten jedoch zunächst passende Liganden synthetisiert werden.

5.6.1. HaloTag-Ligand 1 (H1)

Für den ersten Liganden H1 wurde nach dem Vorbild von *Los et al.* zunächst das Grundgerüst des Liganden in Form eines funktionalisierbaren Chloroalkans synthetisiert.^[158] Dazu wurde 2-(2-Aminoethoxy)ethanol zusammen mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) in Ethanol zur Reaktion gebracht. Bei dem eingesetzten 1:1-Verhältnis läuft die Reaktion kinetisch gesteuert ab, d. h. dass die im Vergleich zur Alkoholgruppe deutlich nukleophilere Aminogruppe bevorzugt den nukleophilen Angriff an eines der α -Kohlenstoffe des Boc_2O eingeht.^[165] Als Produkt dieser Reaktion wird also selektiv mit guter Ausbeute die Aminogruppe mit der säurelabilen^[166] Boc-Schutzgruppe versehen. Nach Extraktion mit DCM aus der Ethanol-Phase war im ^1H -NMR-Spektrum des Produktes H1-1 noch etwas restliches DCM in der Probe bei etwa 5.3 ppm zu sehen. Das deutliche Singulett bei etwa 1.3 ppm weist auf eine erfolgreiche Anbringung der Schutzgruppe hin, die auch später mittels ESI-MS bestätigt werden konnte. Signale 3 und 5 sind jeweils als Triplett durch die direkte Nachbarschaft zu den CH_2 -Gruppen der 4-Position zu erkennen. Die Alkoholgruppe weist hingegen ein breites Singulett durch die direkte Nähe zum Sauerstoffatom auf.

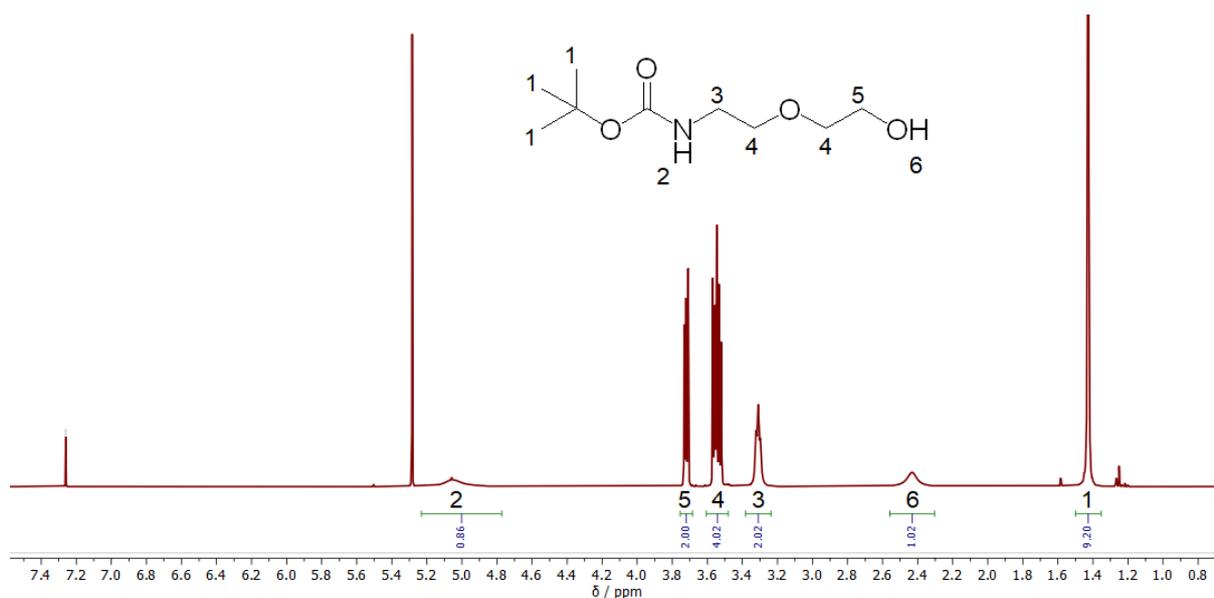


Abbildung 58: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von H1-1 in CDCl_3 .

Nach Schützung der Aminogruppe bietet H1-1 nur noch eine Stelle für die funktionelle Anbringung weiterer Gruppen. Mit Hilfe von Natriumhydrid wurde in einem Gemisch aus THF und DMF *in situ* die Alkoholgruppe deprotoniert, sodass diese einen nukleophilen Angriff auf 6-Chloro-1-iodohexan ausüben konnte. An dieser Stelle wird das Iodid als bessere Abgangsgruppe abgespalten.^[167] Nach Anbringung der Funktionalität des Chlorohexans wurde die Reaktion mit Ammoniumchlorid gequenchet, um die unreaktierten, deprotonierten Alkohole wieder zu protonieren und später einfach abtrennen zu können. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert und ergab nach Trocknung am Rotationsverdampfer ein leicht gelbes Öl. H1-2 wurde anschließend über eine Normalphasensäule aufgereinigt. Dazu wurde eine Mischung aus Ethylacetat und Cyclohexan mit einem Verhältnis von 2:1 gewählt. Der Retentionsfaktor des Produktes lag bei etwa $R_f = 0.39$ und konnte deutlich von dem polarerer Edukt aus H1-1 ($R_f = 0.53$) abgetrennt werden (Abbildung 59). Die Säulenchromatographie des Produktes wurde mittels Dünnschicht-chromatographie über Silicagel (NP-DC) verfolgt. Nach Auftragung auf die Säule wurden die ersten 500 mL Durchflussvolumen verworfen und als Referenz auf die NP-DC aufgetragen. Anschließend wurden Fraktionen mit jeweils 15 mL Volumen gesammelt und nummeriert. Bestimmte Fraktionen wurden ausgewählt und ebenfalls auf die NP-DC aufgetragen, um den Verlauf der säulenchromatographischen Aufreinigung zu verfolgen. Nachdem die NP-DC-Platten getrocknet waren, wurden sie in eine KMnO_4 -Lösung getaucht, welche je nach oxidativen oder reduktiven Eigenschaften der

Probensubstanz braun (MnO_2 , oxidativ) oder weiß (Mn^{2+} , reduktiv) einfärbt.^[168] Die Färbelösung wurde aus 0.5 g Kaliumpermanganat (KMnO_4) und 1.7 g Kaliumcarbonat (K_2CO_3) in 50 mL Wasser hergestellt.

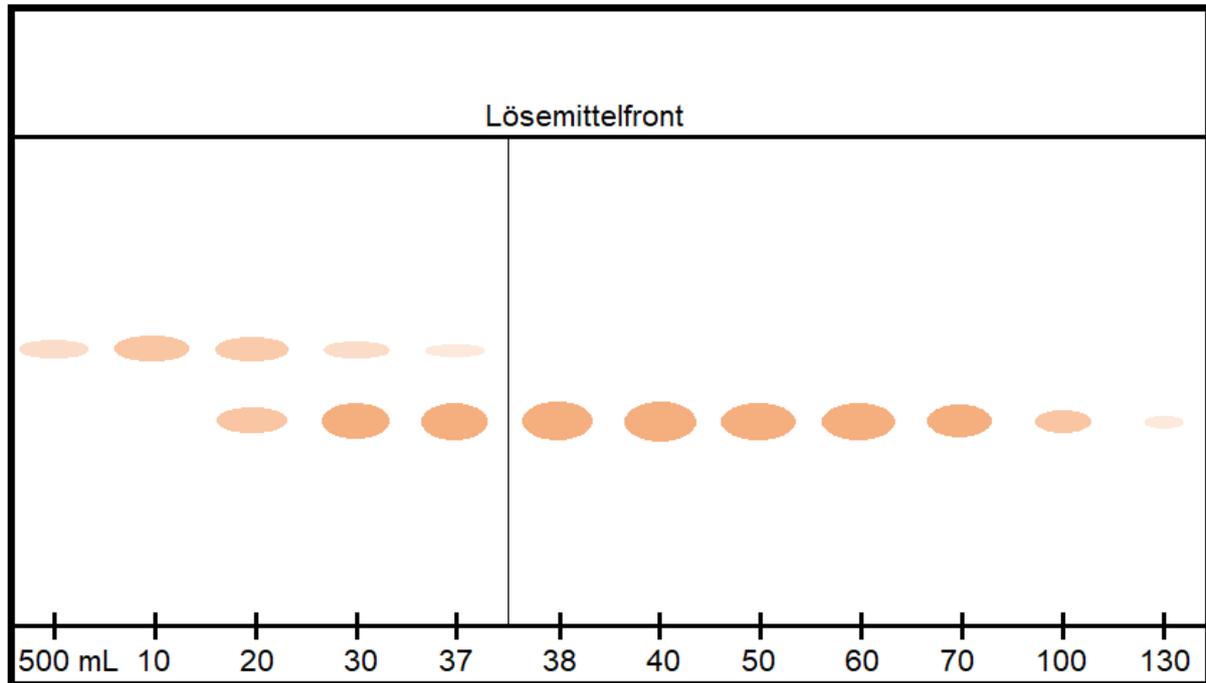


Abbildung 59: Schematische Darstellung der Ergebnisse der NP-DC von H1-2 während der Säulenchromatographie.

Die ersten 37 Fraktionen zeigten nach den 500 mL Startvolumen eine Verunreinigung in Form des polareren Edukts H1-1 mit einem höheren Retentionsfaktor als das Produkt. Ab Fraktion 38 konnte keine Verunreinigung mehr durch restliches Edukt festgestellt werden. Daher wurden die Fraktionen von diesem Punkt an vereint, bis bei Fraktion 130 kaum noch Produkt zu erkennen war. Nach Entfernen des Lösemittels wurde ein Teil des Produktes in deuteriertem Chloroform NMR-spektroskopisch untersucht (Abbildung 60).

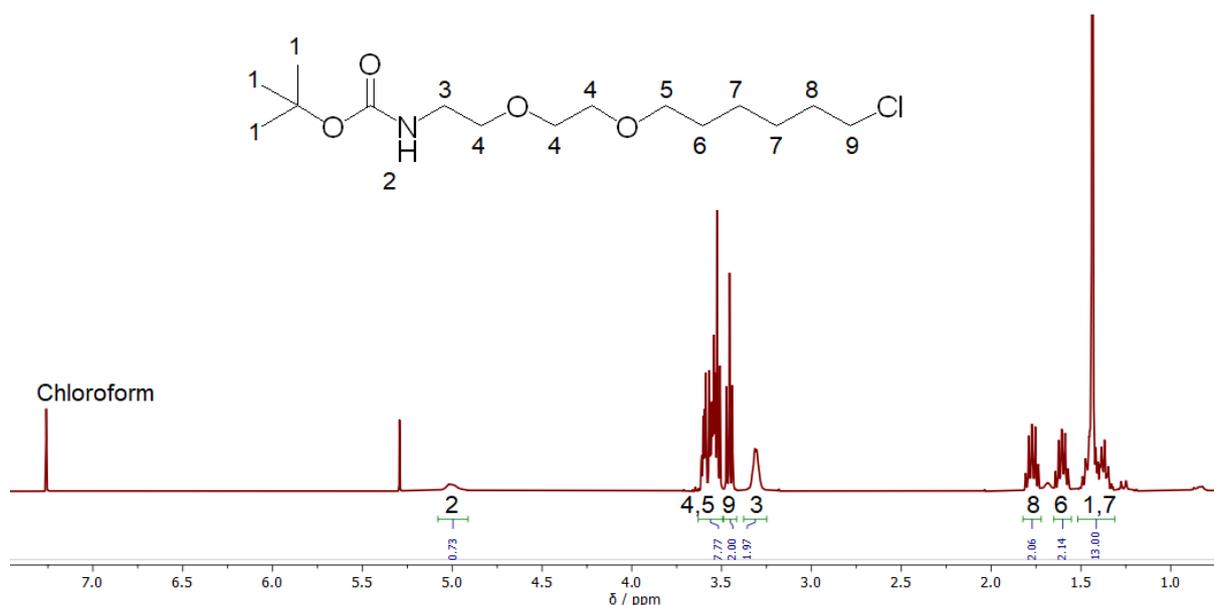


Abbildung 60: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von H1-2 in CDCl_3 nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Die Signale des Eduktes sind weiterhin vollständig erhalten, werden aber teilweise von neuen Signalen des Chloroalkans überlagert. Das große Singulett der Boc-Gruppe bei 1.3 ppm überlagert nun mit den beiden Methylengruppen der 7-Position und wurde daher mit einem Integral von 13 für dieses Spektrum normiert. Die Signale der Protonen der 4- und 5-Position fallen in einem großen Multiplett bei ca. 3.6 ppm zusammen und grenzen sich nur knapp von dem klaren Triplet der Protonen der 9-Position ab. Die Signale der Protonen der 6- und 8-Position weisen jeweils ein gut erkennbares Quintett auf, da sie jeweils mit zweimal zwei chemisch äquivalenten Protonen der 5- und 7-Position bzw. der 7- und 9-Position koppeln.

Als nächsten Schritt für die Synthese eines klickfähigen Chlorohexan-Liganden wurde die Boc-Schutzgruppe sauer mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten. Dazu wurde H1-2 in DCM angelöst und bei 0 °C mit TFA versetzt. Nach einiger Zeit wurde die Reaktion dann von der Rührplatte genommen und mit Toluol vermischt, um das TFA als Azeotrop über den Rotationsverdampfer verdampfen zu lassen.^[105] Für den Fall, dass danach noch restliches TFA in der Probe vorhanden war, wurde das resultierende Öl in etwas Methanol aufgenommen, mit trockenem Kaliumcarbonat vermischt und einige Zeit gerührt. Danach wurde die Lösung abfiltriert und erneut eingetrocknet. Das Produkt wurde NMR-spektroskopisch untersucht, wobei die Abwesenheit der Schutzgruppe bestätigt werden konnte (Abbildung 61). Danach wurde das freie Amin ohne weitere Aufreinigung direkt für den nächsten Schritt verwendet. Eine

Aufreinigung über Säulenchromatographie ist hier nicht zu empfehlen, da das Produkt H1-3 teilweise nicht wieder von der Normalphasensäule heruntergewaschen werden konnte.

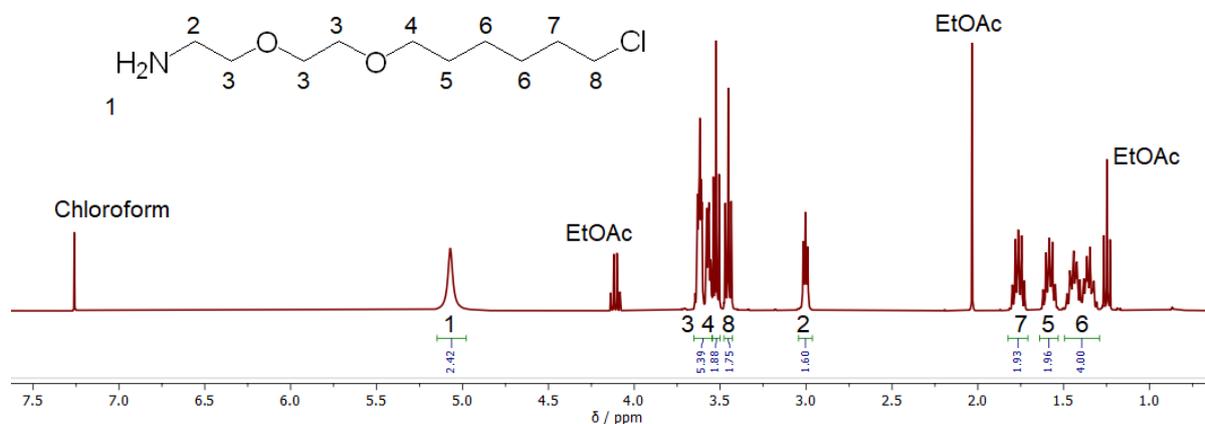


Abbildung 61: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von H1-3 in CDCl₃. Die Boc-Schutzgruppe wurde erfolgreich abgespalten.

Der letzte Schritt dieser Synthese bestand darin, die Aminogruppe des Liganden so zu funktionalisieren, dass sie sich für eine CuAAC mit Azid-funktionalisierten ultrakleinen Nanopartikeln (vgl. Kapitel 5.3) eignet. Dazu wurde Pentinsäure gewählt, welche mit der Carbonsäure über Aktivesterbildung an die freie Aminogruppe koppeln sollte.^[116] Die Pentinsäure wurde dazu zunächst mit PyBOP und DIPEA vorgelegt, damit sich der Aktivester nach Abbildung 62 bilden konnte. Anschließend wurde das freie Amin H1-3 zugeführt und für weitere Zeit gerührt, sodass es den Aktivester nukleophil angreifen und mit der ehemaligen Carbonsäure der Pentinsäure eine Amidbindung eingehen konnte.

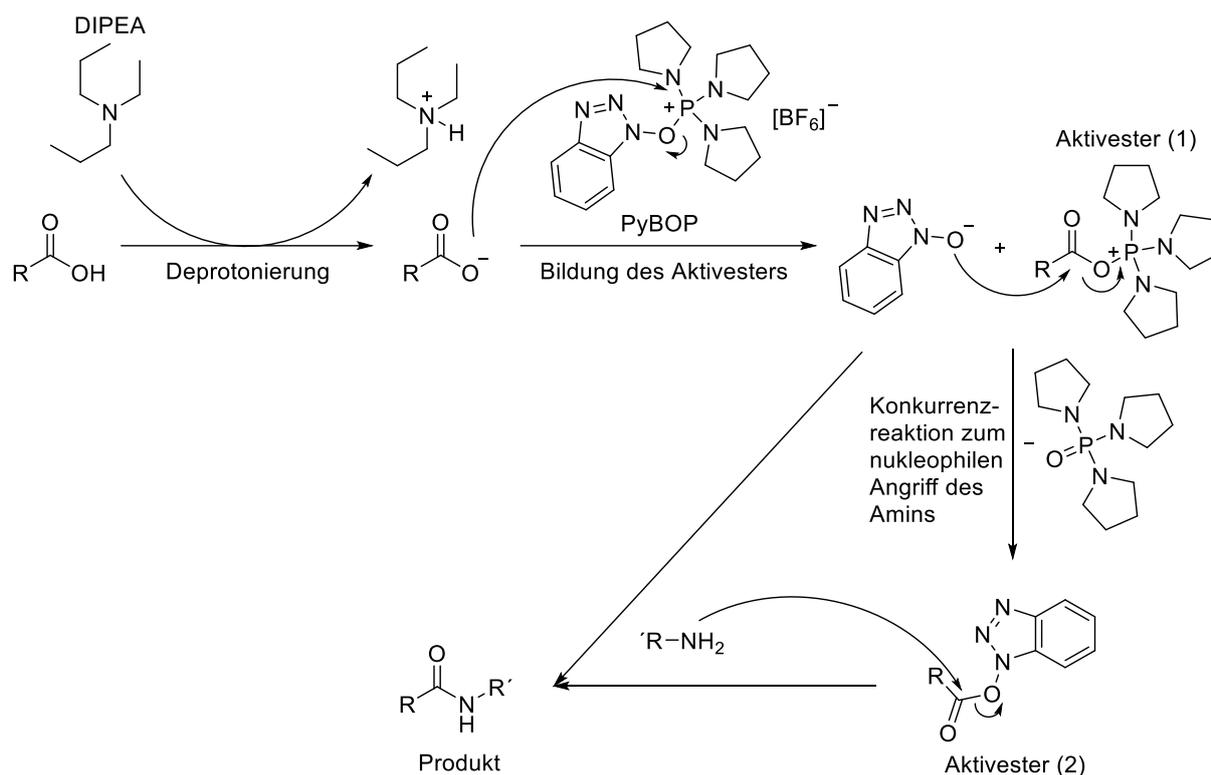


Abbildung 62: Schematischer Mechanismus für die Kupplung einer Amidbindung mit PyBOP (adaptiert aus Literatur^[169]).

Die Aufreinigung des gekuppelten, finalen Produktes erwies sich mit einer manuellen Säule als sehr schwierig, darum wurde die MPLC der Arbeitsgruppe von *Prof. J. Voskuhl* verwendet. Das gelbe Öl des Produktes wurde über einen Gradienten aus Acetonitril und Wasser (30:70 zu 70:30 in 3 h) fraktionsweise über eine Inversphasensäule mit RP18-Silicagel aufgereinigt. Die inverse Phase eignete sich deutlich besser als normalphasiges Silicagel und der eingebaute UV-Detektor vereinfachte die Detektion des Produktes, welches ansonsten auf den DCs nicht eingefärbt werden konnte. Es wurden NP-DCs und Dünnschichtchromatographien mit Inversphasen (RP-DC) durchgeführt und verschiedene Färbelösungen (Ninhydrin^[170], KMnO_4 ^[168] und CAM^[171]) verwendet, aber das Produkt konnte ohne den UV-Detektor nicht sichtbar eingefärbt werden. Das finale Produkt wurde nach vollständiger Aufreinigung an der MPLC noch einmal mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht.

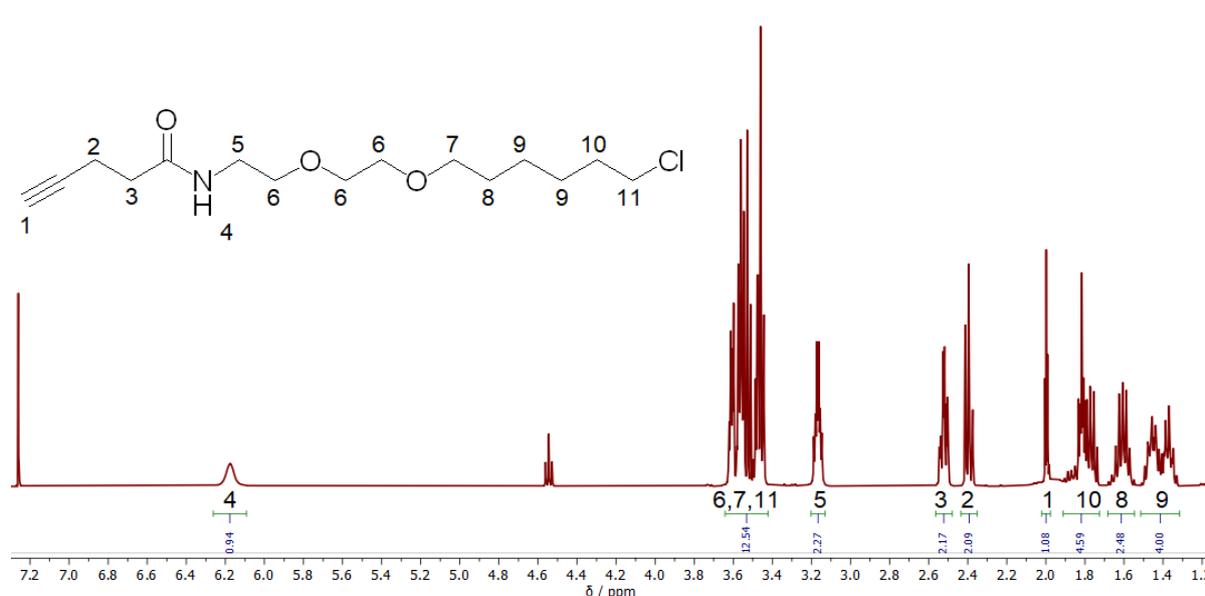


Abbildung 63: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des finalen H1-Liganden in CDCl_3 .

Das Proton der 1-Position von der Alkingruppe ist gut bei ca. 2 ppm als Singulett zu erkennen. Zudem sind die Protonen der vorherigen Schritte ausnahmslos erhalten geblieben, während neue Signale für die beiden CH_2 -Gruppen der Pentinsäure bei 2.4 ppm bzw. bei 2.53 ppm aufgetaucht sind. Zusätzlich zu den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie konnte außerdem die Masse des Liganden mittels ESI-MS genau ermittelt und detektiert werden.

5.6.2. H1 am Nanopartikel Au(H1)

Die Konjugation von H1 an den Nanopartikel wurde in 99% DMSO durchgeführt. H1 als wasserunlöslicher Ligand fiel bei einem Wasseranteil von >20% während der Reaktion aus, weshalb die Reaktionsbedingungen letztendlich so gewählt wurden. Nach Ablauf der Zeit für die CuAAC wurde die Suspension auf einen DMSO-Anteil von <5% verdünnt, damit die Partikel über die Spinfilter aufgereinigt werden konnten. Die fertigen Nanopartikel wurden umfassend analysiert.

Die DCS-Kurve zeigt auch nach der CuAAC noch weiterhin ultrakleine Nanopartikel (Abbildung 64). Bei ca. 6 nm ist eine kleine Erhebung zu erkennen, die auf mögliche Aggregate hindeutet, welche jedoch nur einen sehr kleinen Anteil der gesamten Probe ausmachen.

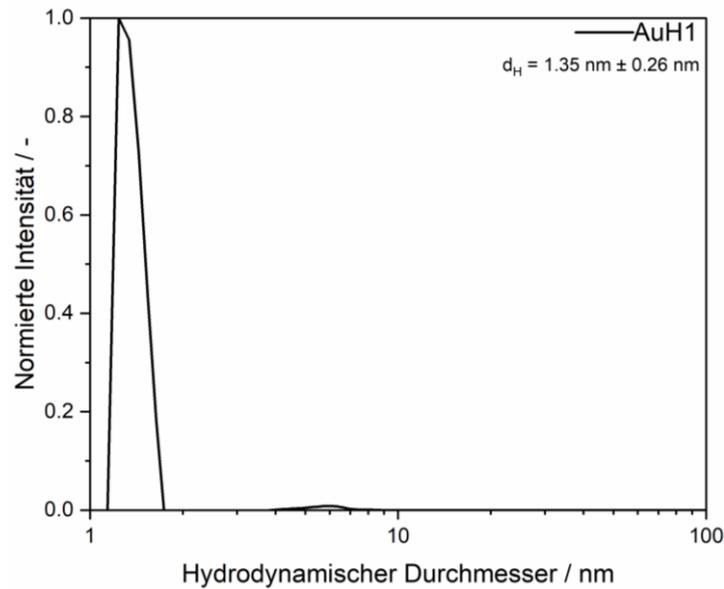


Abbildung 64: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit H1-Liganden.

Zusätzlich zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius der funktionalisierten Partikel über DCS konnte über das UV-Vis-Spektrum (Abbildung 65) ausgeschlossen werden, dass größere Partikel in der Probe vorhanden sind. Das Absorbanzsignal der DCS-Kurve bei 6 nm deutet demnach lediglich auf mögliche Agglomerate hin, die anhand intermolekularer Wechselwirkungen zwischen den Ligandenhüllen einzelner Nanopartikel entstehen. Diese Agglomerate lassen sich jedoch einfach wieder voneinander lösen (vgl. DLVO-Theorie, Kapitel 2.1) und tendieren somit nicht dazu, die repulsiven Effekte der Ligandenhülle zu durchbrechen und zu aggregieren.

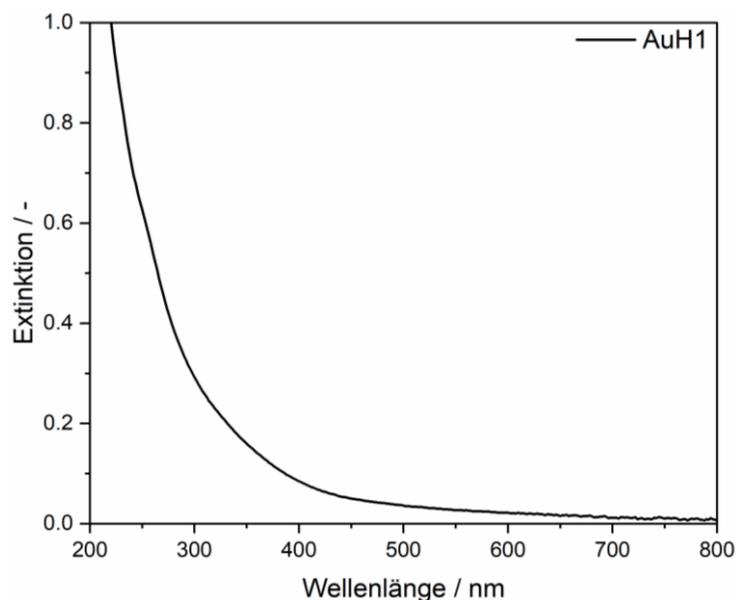


Abbildung 65: UV-Vis-Spektrum der AuH1-Partikel.

Eine Quantifizierung des Liganden wie bei z. B. AuFAM oder AuAF647 (vgl. Kapitel 5.4) ist für den H1-Liganden über UV-Vis-Spektroskopie nicht möglich, da er keine Absorbanz im beobachteten Bereich zeigt. Daher wurden die funktionalisierten Nanopartikel mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei sind die stark verbreiterten Signale des Liganden gut zu erkennen. Das Signal des Alkins bei ca 2 ppm von dem freien Liganden ist vollständig verschwunden, was neben der Verbreiterung der übrigen Signale für eine erfolgreiche Anbindung an den Nanopartikel spricht. Zusätzlich dazu ist das Signal der Protonen 1 und 6 des GSH-Liganden bei ca. 3.6 ppm stark vergrößert durch die zusätzlichen Protonen an den Positionen 10, 11 und 12. Die an den Liganden für die CuAAC gekoppelte Pentinsäure zeigt sich deutlich bei den Protonen der 4- und 5-Position bei ca. 2.7 ppm. Zudem können die Protonen des funktionellen Chloroalkyl-Restes deutlich bei 1.7 ppm - 1.3 ppm erkannt werden.

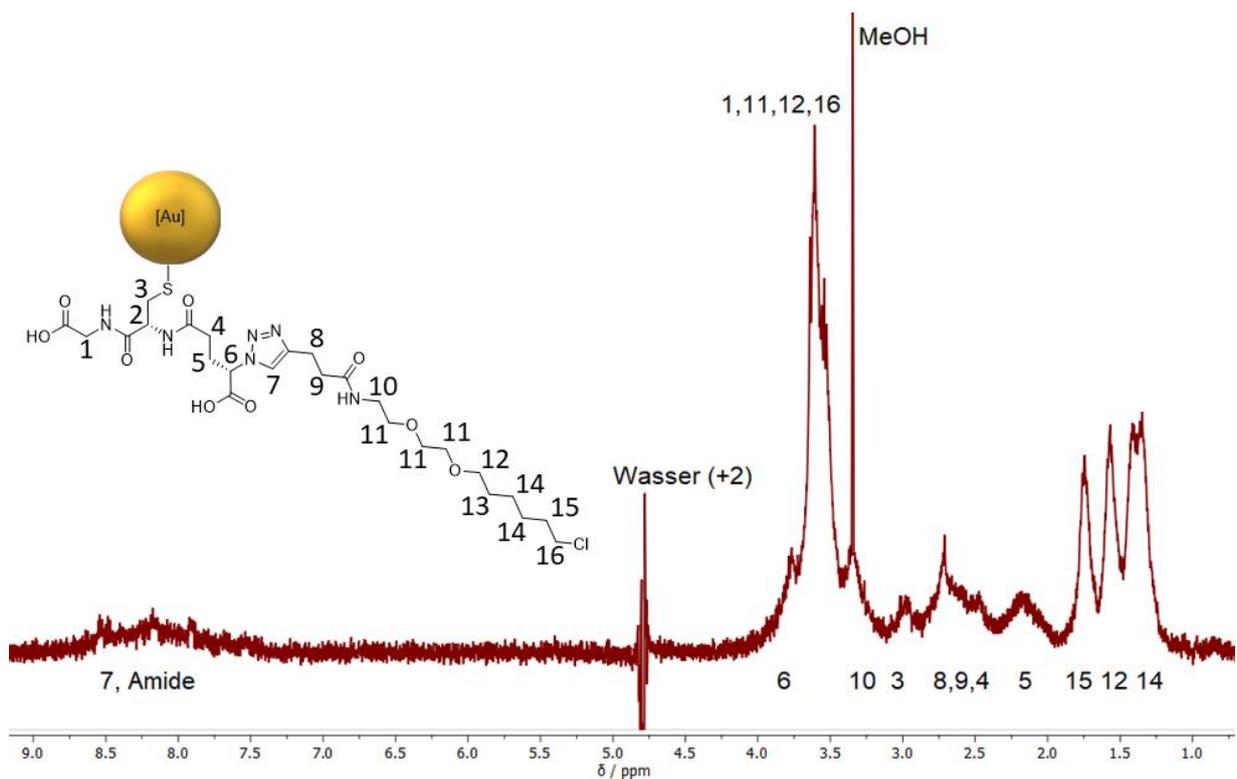


Abbildung 66: ¹H-NMR-Spektrum von AuH1 (400 MHz, 10% D₂O in H₂O, pH 10).

Nach Zuordnung aller Signale der Ligandenhülle der Nanopartikel ist es möglich, quantitative Einblicke auf den angeklickten H1-Liganden zu erhalten. Dazu wurde die Probe gefriergetrocknet und in 100% D₂O wieder aufgenommen, um eine Verfälschung der Signale durch Wasserunterdrückung zu vermeiden. Die eingesetzte Goldkonzentration betrug 2.93 g/L, was nach Gleichung 3 in eine Partikelkonzentration

von 60 μM umgerechnet werden kann. Als quantitativer Referenzpunkt zur eingesetzten Maleinsäure werden hier die Signale der Protonen an der 14-Position herangezogen, da sie von allen Signalen des Liganden am ehesten von den anderen abgeschieden werden können. Mit einem Integral von $\int 14 = 3.36$ (Abbildung 67) liegt der H1-Ligand im Unterschuss zur Maleinsäure vor (1:1 Verhältnis: $\int 14 = 4.0$). Analog zur Quantifizierung der GSH-Gruppen auf der Oberfläche der Goldnanopartikel (vgl. Kapitel 5.1) wurde die Konzentration des H1-Liganden in der Probe auf 1.68 mM bestimmt. Bezogen auf die Konzentration der Nanopartikel wurden demnach etwa 28 Liganden auf die Oberfläche der Nanopartikel geklickt, was bei 0.4 eingesetzten Äquivalenten zu 118 Azidogruppen einer Klickeffizienz von 59% entspricht.

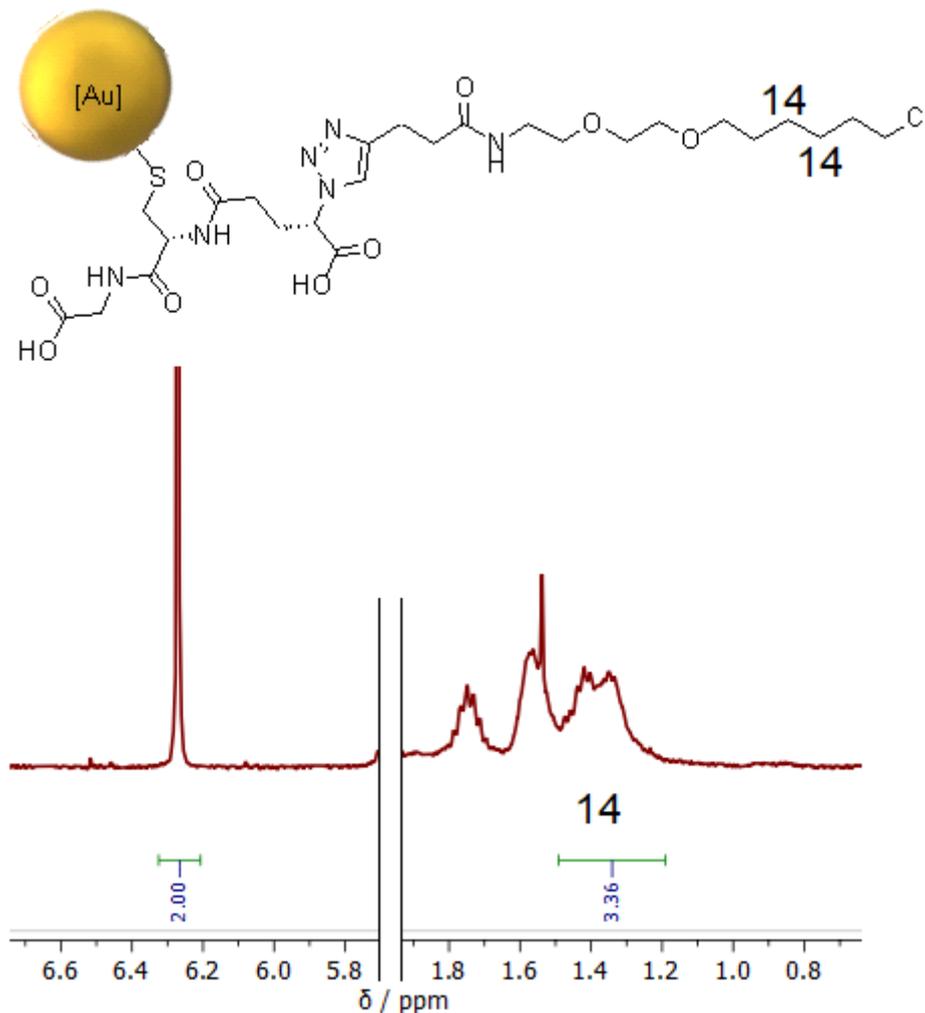


Abbildung 67: Quantitatives ^1H -NMR-Spektrum von AuH1 (400 MHz, 100% D_2O , pH 10) mit 2 mM Maleinsäure. Die Goldkonzentration betrug 2.93 g/L.

Nach Charakterisierung der funktionalisierten Nanopartikel wurden diese an die kooperierende Arbeitsgruppe von Prof. D. Hellerschmied gegeben, um verschiedene biologische Experimente durchzuführen. Ziel der Arbeit war es, mehrere HT2 Moleküle

an dem Nanopartikel als metallisches Zentrum zu immobilisieren. Dadurch wurde erwartet, dass die HT2 ihre übergeordnete Struktur verlieren, sodass sie in biologischen Systemen als Fremdkörper erkannt und entsprechend behandelt werden. Theoretisch könnte dann *in situ* verfolgt werden, was der Organismus oder speziell der Golgi-Apparat der Zellen^[172] mit diesen fehlgefalteten Proteinen macht, sodass neue Erkenntnisse über diese biologischen Mechanismen im Körper gewonnen werden können. Durch die erwartete kovalente Bindung des Chloroalkyl-Rests an der Oberfläche der Goldnanopartikel sollen die Proteine demnach an die Oberfläche binden und über verschiedene Verfahren der Größenausschlusschromatographie von dem Monomer unterschieden werden.

Dazu wurde zunächst ein Konkurrenz-Assay bezüglich der Anbindung des Systems an HT2 durchgeführt (Abbildung 67). Das System der AuH1 Nanopartikel wurde zusammen mit HT2 bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde dann zur Kontrolle der Anbindung der in Abbildung 55 gezeigte TMR-HaloTag Ligand zugegeben und das System wurde für weitere 60 min inkubiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Ansätze durchgeführt, bei denen die Konzentration der Nanopartikel graduell erhöht wurde. Angefangen wurde bei einer Partikelkonzentration von 0.2 µM, was mit 28 Liganden pro Nanopartikel eine Äquivalenz von etwa 2.8 im Verhältnis zum eingesetzten HT2 (2.0 µM) betrug. Dabei war bereits zu erkennen, dass der TMR-HaloTag als Kontrolle nach der einen Stunde Inkubationszeit nicht mehr an das HT2 binden konnte, was darauf hindeutet, dass alle Bindungstaschen der Proteine in der Probe besetzt sind. Demnach würden im Durchschnitt etwa zehn Proteine auf einem Nanopartikel immobilisiert sein, was einem molekularen Fußabdruck von ca. 1.2 nm² entsprechen würde. HT2 mit einem Molekulargewicht von rund 33 kDa^[173] müsste also extrem gestaucht auf der Oberfläche der Nanopartikel vorliegen.

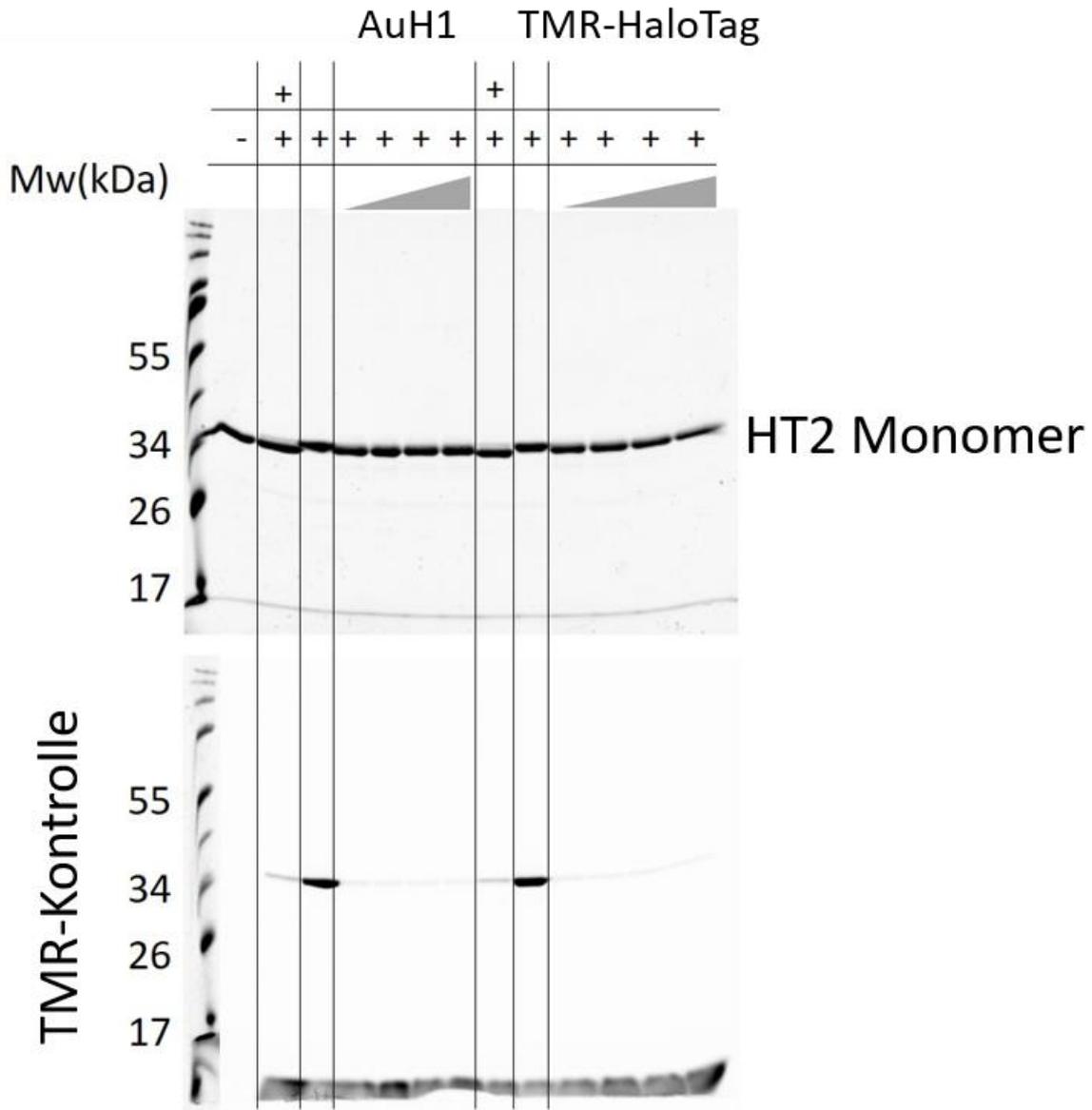


Abbildung 68: Konkurrenz-Assay der AuH1-Nanopartikel gegen einen TMR-HaloTag Liganden (durchgeführt von *Joel Brenner*). Die HT2-Konzentration betrug $2.0 \mu\text{M}$, die Goldnanopartikel wurden bezogen auf die Nanopartikel in Schritten von $0.2 \mu\text{M}$, $0.5 \mu\text{M}$, $1.0 \mu\text{M}$ und $2.0 \mu\text{M}$ erhöht. Die TMR-Kontrolle wurde nach 60 min mit einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die +-Zeichen oben im Bild geben die Zugabe der Reaktanden an. 6-Chlorohexanol (oben) wurde als Kontrolle für den Liganden zugegeben, Nanopartikel bzw. TMR-HaloTag (unten) wurden in jeder Probe verwendet.

Nach diesen ersten Ergebnissen wurden die Mischsysteme aus AuH1 und HT2 über eine zeitaufgelöste Säulenchromatographie auf ihre Größe hin untersucht (Abbildung 69). Dabei fiel auf, dass keine oligomeren Massen für das System detektiert werden konnten. Höhere Massen von potenziellen Oligomeren würden aufgrund einer kürzeren Wegstrecke in der Säule durch die kleinen Poren des

Säulenmaterials etwas schneller eluieren als die entsprechenden monomeren Äquivalenten von ungebundenem HT2.

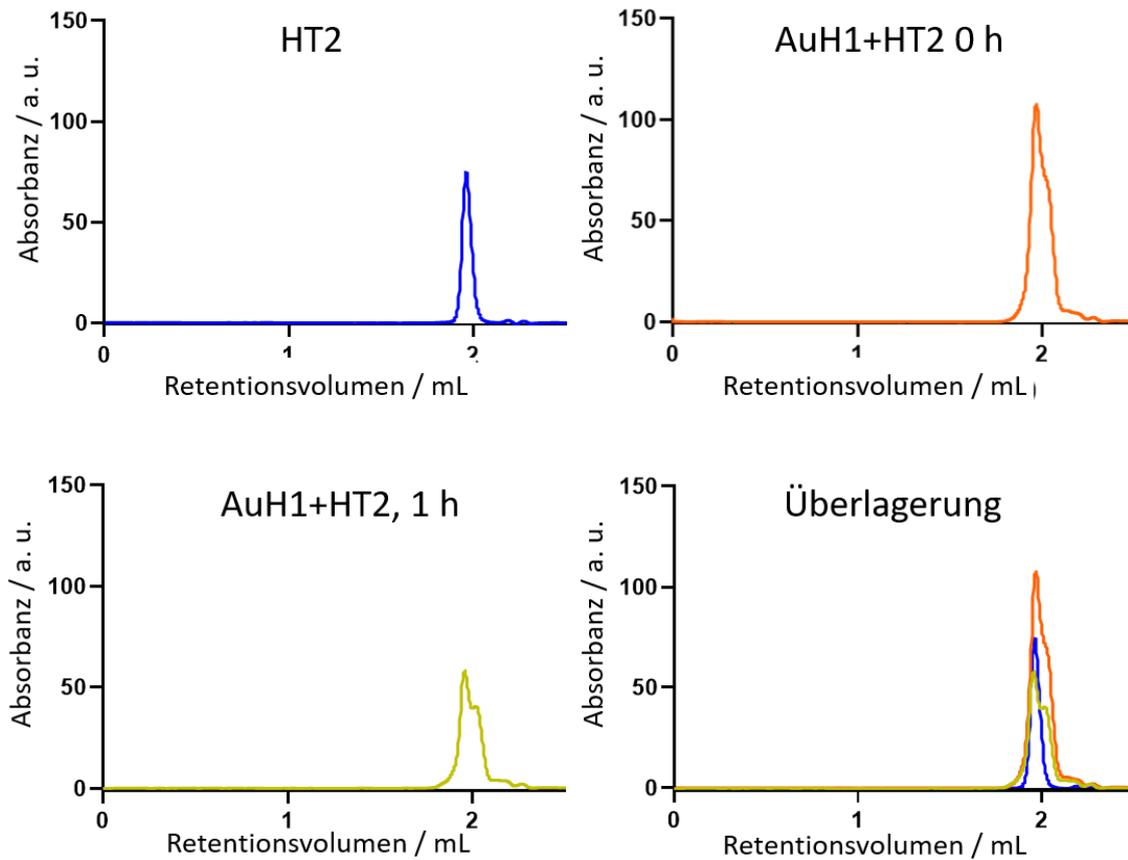


Abbildung 69: Größenausschlusschromatographie über eine Superose-6-(3.2/300)-Säule mit einem Gesamtvolumen von 2.4 mL (durchgeführt von *Joel Brenner*). Die Flussrate betrug 80 $\mu\text{L}/\text{min}$. HT2 wurde in einem Puffer aus 50 mM HEPES mit 150 mM NaCl (pH 7.5) mit einer Konzentration von 10 μM bei 37 $^{\circ}\text{C}$ eingesetzt. Die Konzentration der funktionalisierten Nanopartikel betrug 1 μM auf die Partikel bezogen.

Auch bei der Größenausschlusschromatographie wurde der Ligand auf der Partikeloberfläche in einem Verhältnis von 2.8:1 zu HT2 eingesetzt, sodass theoretisch alle Proteine an die Oberfläche der Partikel gebunden sein sollten. Mit den Ergebnissen aus Abbildung 68 müsste eine Masse von ca. 422 kDa (10 HT2 mit je 33 kDa und die Nanopartikel mit ca. 92 kDa) erwartet werden, die entsprechend deutlich früher als das HT2-Monomer eluieren sollte. Allerdings konnte dieses erwartete Ergebnis nicht beobachtet werden. Stattdessen ist auch nach Zugabe der Nanopartikel immer noch nur die monomere Masse des Proteins zu erkennen. Nach 1 h Inkubationszeit weist das eluierte Signal eine leichte Schulter auf, die jedoch immer

noch in demselben Bereich liegt wie für das Monomer. Eine Oligomerisierung konnte demnach nicht bestätigt werden. Dieses Phänomen kann unterschiedliche Gründe haben. Denkbar wäre, dass der verwendete Linker des H1-Liganden nicht lang genug ist, um in die Bindungstasche des Proteins einzudringen und die Proteine daher nur durch intermolekulare Wechselwirkungen an die Partikel angelagert haben. Bei Durchfluss durch die Säule wurden diese Proteine dann evtl. wieder abgewaschen, sodass sie als Monomer detektiert wurden. Die Nanopartikel selbst sind durch den metallischen Kern dichter als entsprechende Biomoleküle mit vergleichbarer Masse und laufen demnach deutlich schneller durch die Säule als für die hohe Masse erwartet werden würde, weswegen sie nicht zu sehen sind. Alternativ dazu ist es denkbar, dass die vielen HT2 nur sehr instabil an die Chlorhexyl-Reste der Ligandenhülle binden, da die sterische Hinderung durch die sehr dichte Oberflächenbeladung das Gesamtsystem destabilisiert.

Um diese Theorie weiter zu untersuchen wurde der längere H2-Ligand hergestellt, der durch vier PEG-Einheiten lang genug sein sollte, um vollständig in die Bindungstaschen von HT2 einzudringen.

5.6.3. HaloTag-Ligand 2 (H2)

Die Synthese von H2 startete mit einer Peptidkupplung von $\text{NH}_2\text{-PEG5-OH}$ an Boc-*L*-phenylalanin-*N*-hydroxysuccinimid. Boc-*L*-phenylalanin-*N*-hydroxysuccinimid übernimmt dabei die Rolle einer als Aktivester funktionalisierten Carbonsäure, die nukleophil von der freien Aminogruppe des PEG-Teils angegriffen werden kann. Um diese Reaktion noch weiter zu begünstigen, wurde zudem die nicht nukleophile Base DIPEA eingesetzt (vgl. Peptidkupplung, Kapitel 5.6.1). Nach 24 h Reaktionszeit konnte die Reaktion abgebrochen werden, indem das Lösemittel entfernt wurde und ein gelbliches Öl zurückblieb, welches über Säulenchromatographie aufgereinigt wurde. Dazu wurde eine Normalphasensäule gewählt, durch die das Produkt mit einem Lösemittelgemisch von 19:1 DCM zu Methanol mit einem Retentionsfaktor von $R_f = 0.21$ lief. Von dem durchgelaufenen Volumen wurden die ersten 500 mL verworfen und danach wurden Fraktionen mit jeweils 15 mL Volumen gesammelt. Das Produkt war ab Fraktion 6 bis einschließlich 21 zu erkennen, also wurden diese vereinigt und am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Das farblose Öl von H2-1 wurde anschließend analysiert.

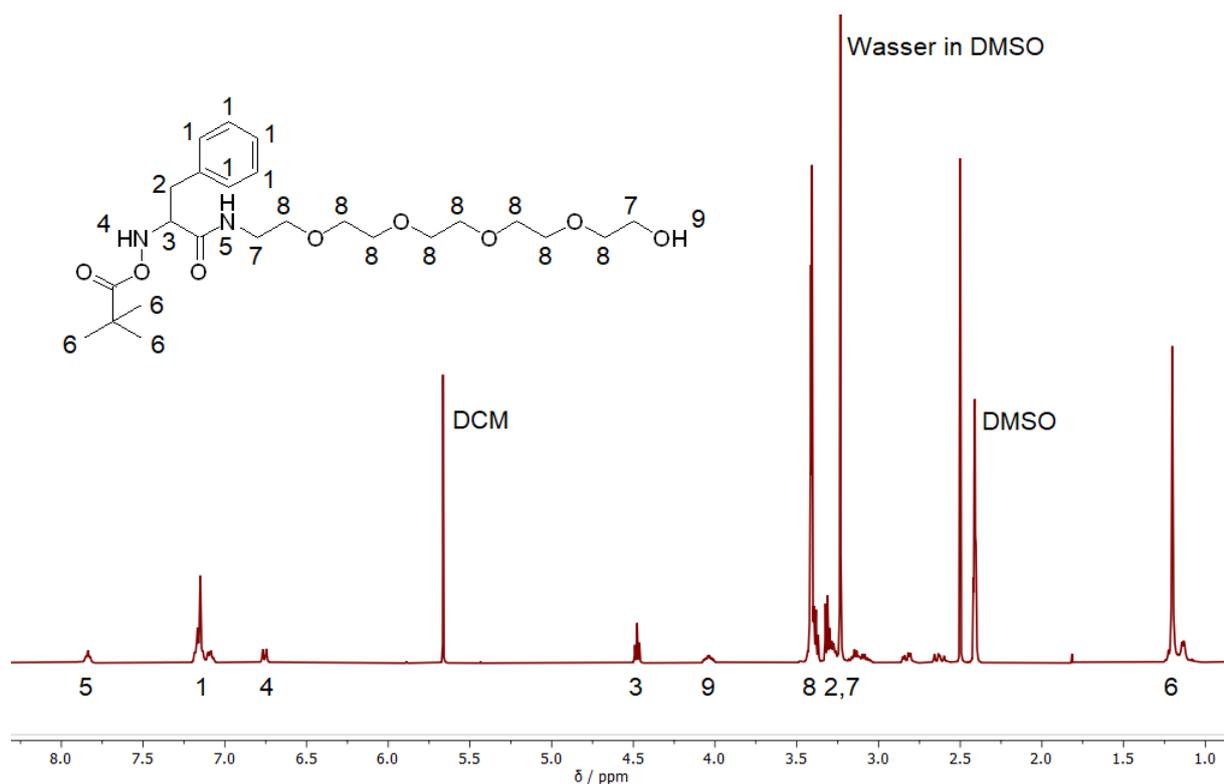


Abbildung 70: ^1H -NMR-Spektrum von H2-1 (400 MHz, DMSO-d_6) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Die Signale der 2-, 7- und 8-Position sind bei 3.4 ppm - 3.2 ppm zu erkennen. Aromatische Signale der Phenylalanin-Gruppe sind zudem im erwarteten Bereich um die 7 ppm und werden von den beiden unterschiedlichen N-H-Gruppen umgeben. Amid 5 ist weiter tieffeldverschoben als das Proton der 4-Position, da es durch das benachbarte doppeltgebundene Sauerstoffatom über negative mesomere Effekte abschirmende Elektronendichte verliert, wohingegen H-4 sogar durch die freien Elektronenpaare des Sauerstoffs der Boc-Gruppe etwas an Elektronendichte dazugewinnt. Die Protonen der Boc-Gruppe selbst sind als großes Singulett bei etwa 1.2 ppm zu erkennen und weit abgeschieden von dem Rest des Moleküls, der durch die Signale von Wasser (3.33 ppm) und DMSO (2.5 ppm) abgetrennt wird.

Im nächsten Reaktionsschritt galt es nun, den funktionellen Chloroalkyl-Rest an das Molekül zu koppeln. Dazu wurde dieselbe Methode gewählt wie auch schon für H1-2 (Kapitel 5.6.1). Nach vollständiger Aufreinigung durch die Normalphasensäule ($R_f = 0.54$, 14:1 DCM zu Methanol) konnte ein Produkt gewonnen werden, welches zwar nicht ganz sauber, aber zumindest frei von störenden Resten war. H2-2 als langkettiges PEG-Derivat ist ein sehr viskoses Öl und auch in dem verwendeten Lösemittelgemisch lief es nicht glatt durch die Säule. Stattdessen war zu erkennen,

dass das Produkt über einen breiten Bereich geschmiert hat, was auch mit anderen Lösemittelgemischen (z. B. Ethylacetat:Cyclohexan) oder auch mit anderen Verhältnissen der eingesetzten Lösemittel nicht behoben werden konnte. Dieses Schmieran an der Innenwand der Säule erklärt das noch restliche 6-Chloro-1-iodhexan in der Probe, welches jedoch aufgrund seiner niedrigeren Reaktivität die folgenden Syntheseschritte nicht negativ beeinflusst.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von H2-2 ähnelt stark dem von H2-1, was zu erwarten ist. Es sind noch Reste von DMF aus der Synthese, sowie restliches 6-Chloro-1-iodhexan zu erkennen. Ansonsten sind alle Signale noch unverändert vorhanden und werden nun noch durch die bereits von H1-2 bekannten Signale des gekoppelten Chloroalkyl-Restes bei 1.2 ppm - 1.5 ppm ergänzt.

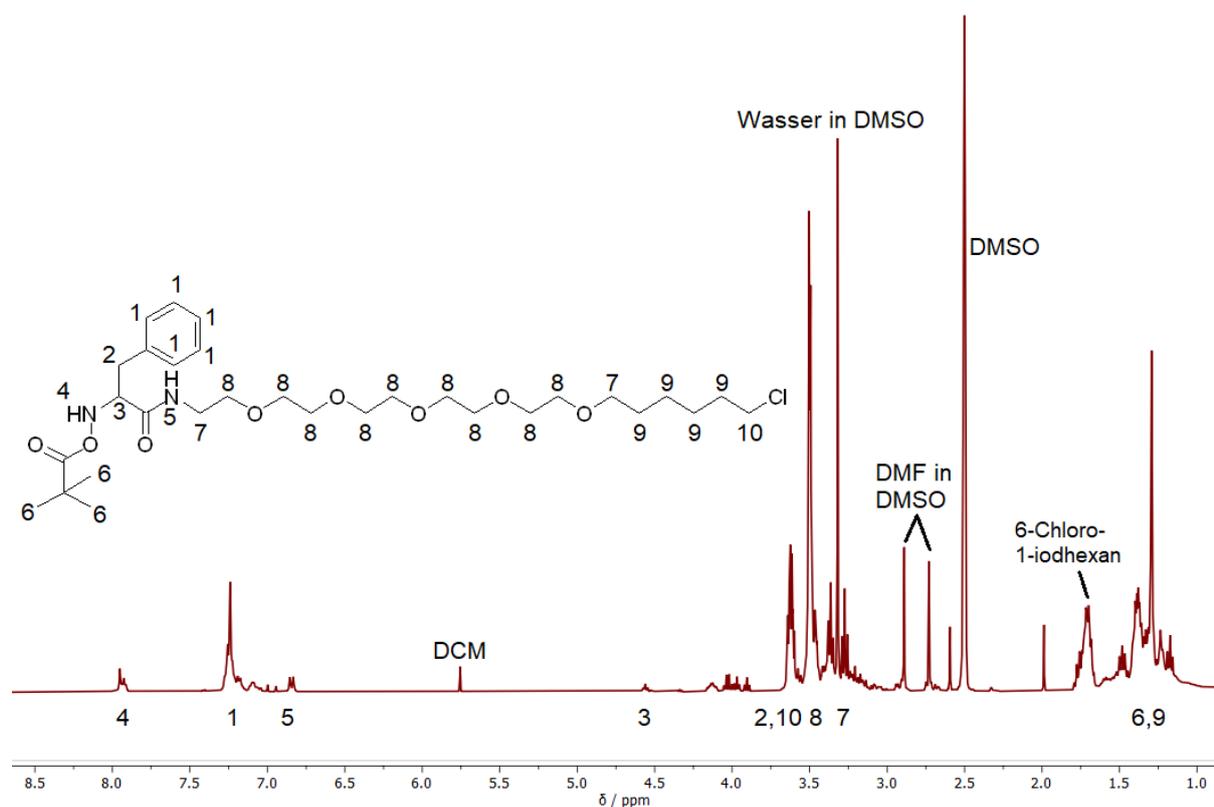


Abbildung 71: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von H2-2 (400 MHz, DMSO-d_6) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Die Entschützung der Boc-Gruppe verlief ebenfalls wie bereits für H1-3 beschrieben wurde. H2-2 wurde dazu in DCM angelöst, mit TFA versetzt und einige Minuten gerührt. Danach wurde das TFA als Azeotrop mit Toluol^[105] verdampft und evtl. verbleibende Reste in Methanol als Suspension von K_2CO_3 neutralisiert. Das verbleibende Öl wurde anhängenschließend nach Verdampfung des MeOH aus Wasser

mit Ethylacetat extrahiert und direkt ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Schritt verwendet. Zuvor wurde jedoch eine kleine Probe entnommen, um die Boc-Entschützung des Produktes zu untersuchen (Abbildung 72).

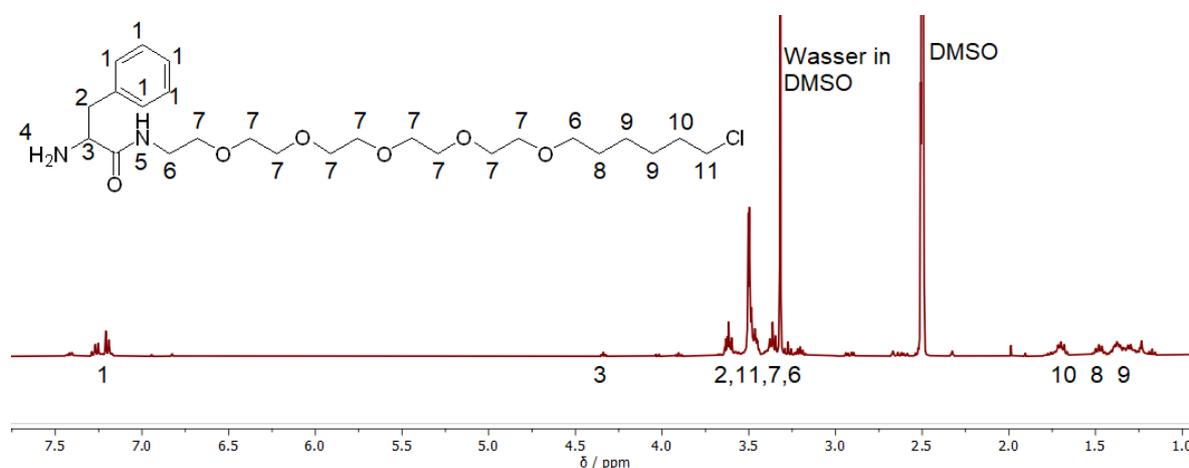


Abbildung 72: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von H2-3 (400 MHz, DMSO-d_6).

Die Signale von Amin (4) und Amid (5) in H2-3 sind nur noch sehr schwach zu erkennen und daher nicht markiert. Grund dafür ist, dass DMSO Protonen mit der Probe austauschen kann, sodass die azideren Protonen der Probe durch den sehr starken Überschuss an deuteriertem Lösemittel nahezu vollständig durch Deuterium ausgetauscht wurden. Die Schutzgruppe bei 1.2 ppm wurde vollständig entfernt. Da die Signale des Chloroalkyl-Rests nun nicht mehr von dem deutlich größeren Signal der Protonen der Boc-Gruppe überlagert werden ist zudem die von H1 bereits bekannte Aufspaltung der Signale für die 8-, 9- und 10-Position zu erkennen.

Für den nächsten Schritt wurde zunächst ein geeigneter Reaktionspartner für das H2-3 hergestellt. Dazu wurde *in situ* ein Aktivester der Pentinsäure über den EDC-NHS-Mechanismus^[174] hergestellt. Pentinsäure wurde in DCM gelöst und bei 0 °C mit *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl) versetzt. Nach 15 min wurde dann *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zugegeben. Weitere 15 min später wurde das frisch entschützte H2-3 zugegeben und für den entsprechenden Reaktionszeitraum gerührt. Ähnlich dem Mechanismus für die Bildung eines Aktivesters mit PyBOP entsteht dabei ein Aktivester der Pentinsäure, der im nächsten Schritt mit dem freien Amin von H2-3 zu einem Amid reagieren kann (Abbildung 73).

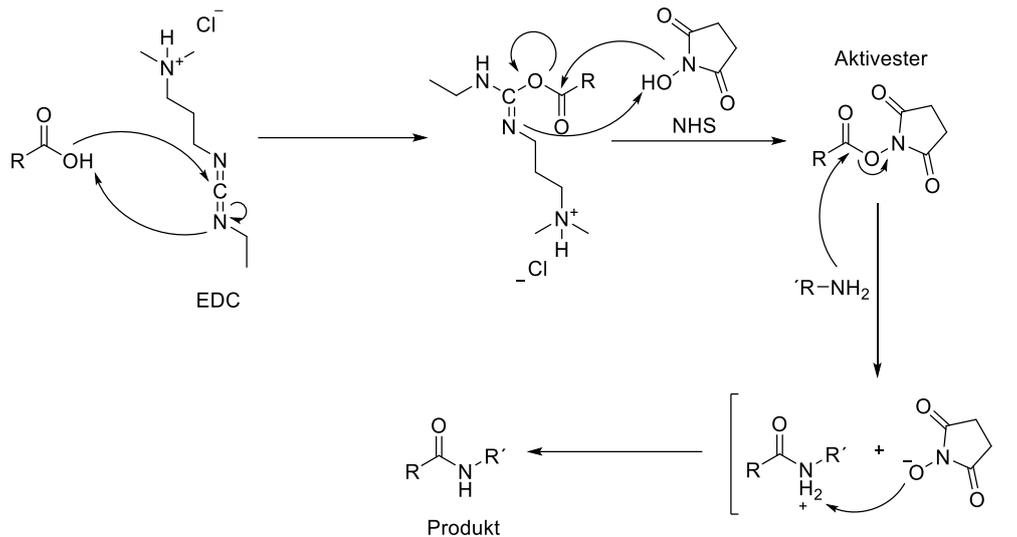


Abbildung 73: Schematischer Mechanismus für die Peptidkupplung mit EDC und NHS (adaptiert aus Literatur^[175]).

Das Produkt wurde nach Aufarbeitung und Extraktion mit Ethylacetat über eine Normalphasensäule mit einem Lösemittelverhältnis von 19:1 DCM zu Methanol ($R_f = 0.34$) aufgereinigt und mit KMnO_4 eingefärbt. Das finale Produkt wurde schließlich mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (Abbildung 74) und ESI-MS charakterisiert.

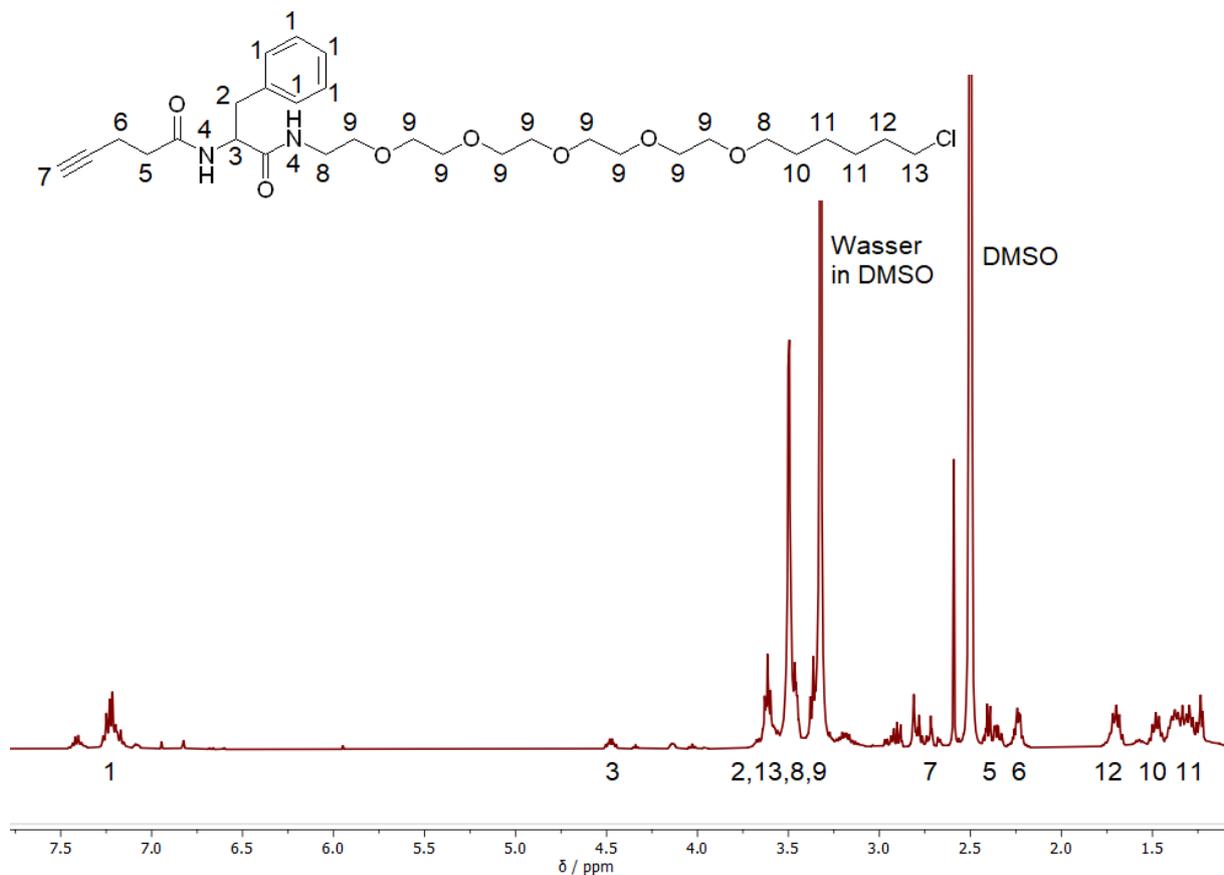


Abbildung 74: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von H₂ in DMSO-*d*₆.

Das Proton der 7-Position von der Alkylgruppe ist gut bei ca. 2.7 ppm als Singulett zu erkennen. Zudem sind die Protonen der vorherigen Schritte ausnahmslos erhalten geblieben, während neue Signale für die beiden CH₂-Gruppen der Pentinsäure bei 2.4 ppm bzw. bei 2.25 ppm aufgetaucht sind. Das Produkt konnte demnach also erfolgreich synthetisiert werden und eignet sich nun durch die vorhandene Alkylgruppe für die Funktionalisierung auf die Oberfläche der AuN₃ Nanopartikel (vgl. Kapitel 5.3).

5.6.4. H2 am Nanopartikel (AuH2)

Äquivalent zu der CuAAC mit H1 wurde die Konjugation von H2 an den Nanopartikel in fast reinem DMSO durchgeführt. H2 als wasserunlöslicher Ligand fiel bei einem Wasseranteil von >30% während der Reaktion aus, weshalb die Reaktionsbedingungen letztendlich so gewählt wurden. Nach Ablauf der Zeit für die CuAAC wurde die Suspension auf einen DMSO-Anteil von <5% verdünnt, damit die Partikel über Spinfiltration durch die Cellulosemembran der Filer aufgereinigt werden konnten. Die fertigen Nanopartikel wurden umfassend analysiert.

Die DCS-Kurve zeigt wie auch für AuH1 nach der CuAAC noch weiterhin ultrakleine Nanopartikel (Abbildung 75).

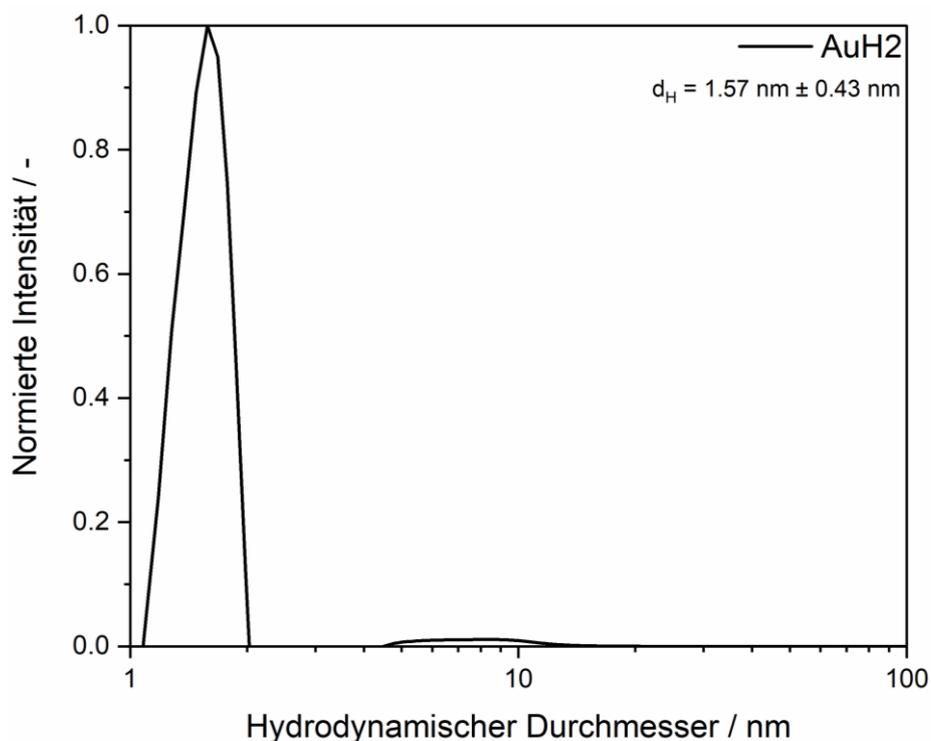


Abbildung 75: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit H2-Liganden.

Zwischen 5 nm und 10 nm ist auch hier eine kleine Erhebung zu erkennen, die auf mögliche Aggregate hindeutet, die jedoch durch das UV-Vis-Spektrum (Abbildung 76) ausgeschlossen werden können.

Das UV-Vis-Spektrum der AuH2 Partikel weist weiterhin wie erwartet keine Plasmonenbande auf, sodass die Anwesenheit größerer Partikel oder Aggregate widerlegt werden kann. Allerdings zeigte auch der H2-Ligand keine nutzbaren Signale für eine Quantifizierung über UV-Vis-Spektroskopie, sodass die Bestimmung der Anzahl gebundener Liganden äquivalent zu AuH1 über die ^1H -NMR-Spektroskopie erfolgen musste.

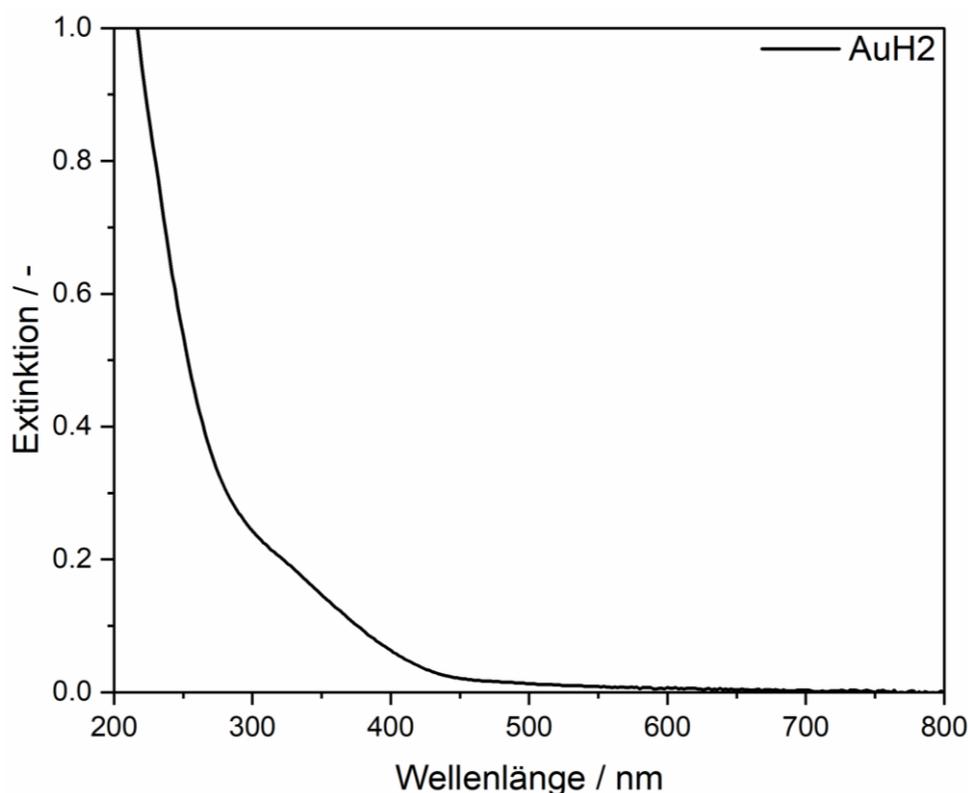


Abbildung 76: UV-Vis-Spektrum der AuH2 Partikel.

Im ^1H -NMR-Spektrum der geklickten Nanopartikel sind die Signale der Glutathion-Hülle deutlich bei 2.2 ppm (5), 2.6 ppm (4) und 3.7 ppm (1 und 6) zu erkennen. Die Signale des H2-Liganden liegen zudem stark verbreitert vor, wodurch der Ligand als geklickt angenommen werden kann. Signale der Protonen der 16-, 17- und 18-Position an der Chlorohexyl-Gruppe weisen dasselbe Signalmuster auf wie bereits für AuH1, überschneiden sich allerdings etwas stärker. Für eine quantitative Bestimmung müssen daher alle drei Signale verwendet werden.

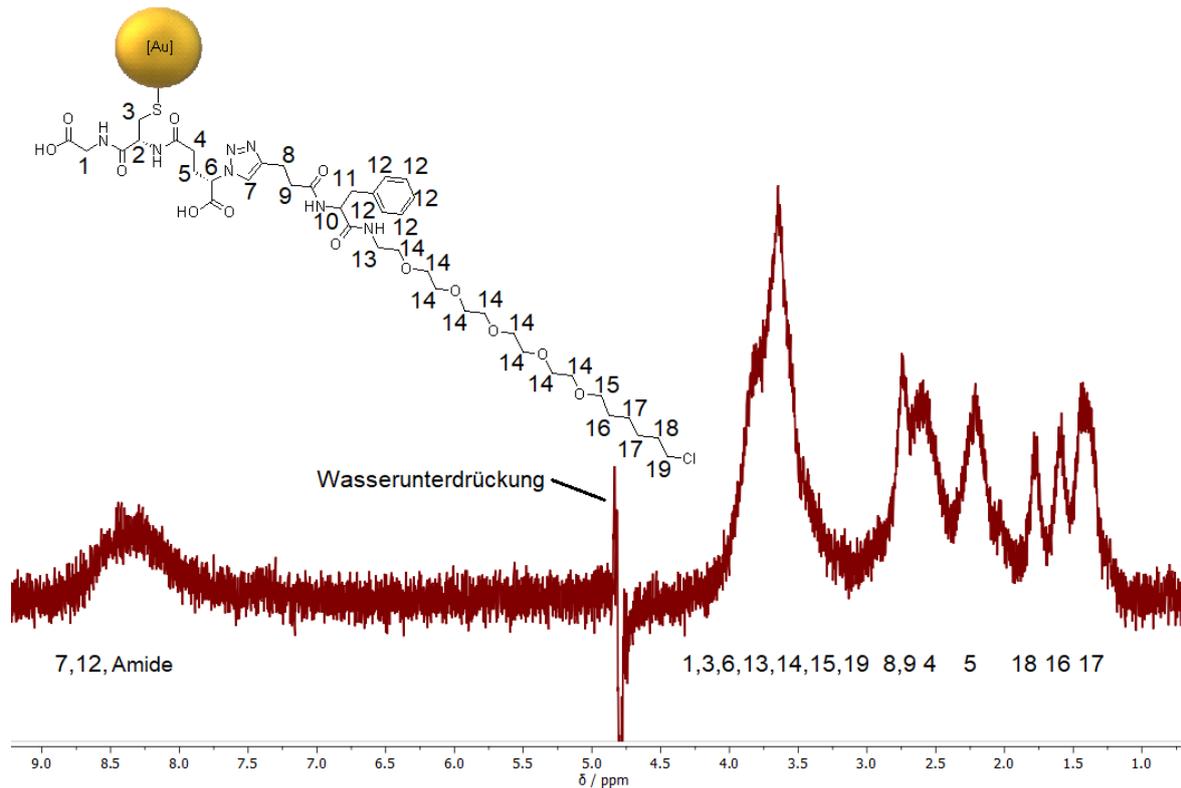


Abbildung 77: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von AuH_2 (400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).

Für die quantitative Bestimmung des Liganden auf der Oberfläche der Nanopartikel wurden diese zunächst gefriergetrocknet. Die getrockneten Partikel wurden vollständig in insgesamt 540 μL D_2O aufgenommen und zusätzlich mit 60 μL 20 mM Maleinsäure in D_2O versetzt, sodass die Gesamtkonzentration an Maleinsäure genau 2 mM betrug. Danach wurden die Nanopartikel mit dem internen Standard in der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie vermessen (Abbildung 78). Das große Singulett der beiden Protonen der Maleinsäure ist gut bei ca. 6.3 ppm zu erkennen. Das Integral dieses Signals wird wie in Kapitel 5.1 beschrieben auf zwei normiert, sodass über einen Dreisatz mit dem Integral $\int 18,16,17$ die Konzentration des funktionellen Liganden berechnet werden kann. Mit einem Betrag von $\int 18,16,17 = 1.06$ liegt der H_2 -Ligand im Verhältnis zur eingesetzten Maleinsäure im Unterschuss vor (1:1 Verhältnis: $\int 18,16,17 = 8$). Davon ausgehend kann nun die tatsächlich vorliegende Konzentration c_{H_2} bestimmt werden.

$$c_{\text{H}_2} = \frac{\int 18,16,17}{8} \cdot c_{\text{MA}} = \frac{1.06}{8} \cdot 2 \text{ mM} = 265.0 \mu\text{M}$$

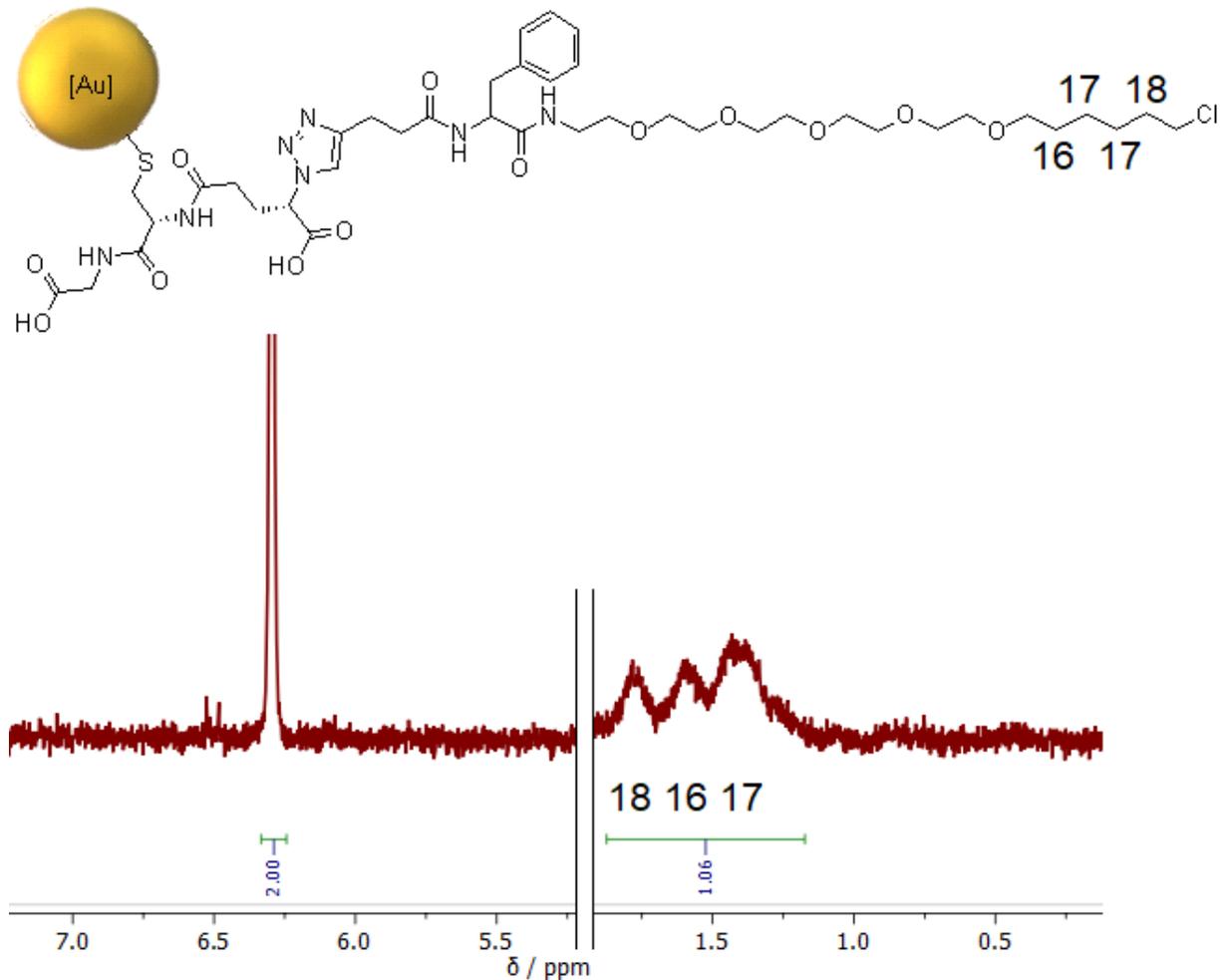


Abbildung 78: Quantitatives ^1H -NMR-Spektrum von AuH2 (400 MHz, 100% D_2O , pH 10) mit 2 mM Maleinsäure. Die Goldkonzentration betrug 3.285 g/L.

Die eingesetzte Goldkonzentration betrug $c_{\text{Au}} = 3.285 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Anhand von Gleichung 2 kann dieser Wert in die Konzentration der Nanopartikel umgerechnet werden und ergibt $c_{\text{NP}} = 67.52 \mu\text{M}$. Demnach wurden im Durchschnitt etwa vier Liganden pro Nanopartikel angeklickt, was bei 0.4 eingesetzten Äquivalenten zu den 118 Azidgruppen einer Klickeffizienz von 8.5% entspricht und somit deutlich mehr Platz für potenziell angebundene HT2 Proteine bieten sollte.

Nach Fertigstellung wurden die AuH2-Nanopartikel erneut an *Joel Brenner* für biologische Studien gegeben.

5.7. Goldnanopartikel mit molekularen Pinzetten

Vorangegangene Arbeiten zeigten bereits, dass ultrakleine Goldnanopartikel, die über CuAAC mit molekularen Pinzetten funktionalisiert wurden, dazu in der Lage sind,

gerade auch durch ihre geringe Größe^[10] an unterschiedlichen Stellen von Proteinen anbinden zu können.^[118] Die hier verwendete Pinzette CLR01 aus der Arbeitsgruppe von Prof. T. Schrader besteht aus insgesamt fünf Phenylringen (A), die über Norbonylbrücken (B) miteinander nach dem Schema ABABA verbunden sind. Der mittlere Phenylring ist zudem an jeder Seite mit einer Phosphorsäure funktionalisiert, von denen wiederum eine eine Butinylgruppe trägt, die für CuAAC Reaktionen verwendet werden kann. Durch die verbrückenden Norbonylgruppen ist die hydrophobe Matrix der Pinzette zudem so geformt, dass sie wie eine Pinzette (daher auch der Name) in ihrer Mitte eine Kavität aufweist, die durch die anliegenden Phosphorsäuregruppen negativ polarisiert ist (Abbildung 79). Diese negative Polarisierung des Konstrukts ermöglicht die Anbindung an kationische Aminosäuren wie Arginin (R) oder Lysin (K).^[176] Dabei würde die kationische Seitenkette der Aminosäure durch elektrostatische Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen an die Phosphorsäuren koordinieren und der Rest in Form von aliphatischen Ketten würde in die Kavität der Pinzette fallen und dort durch van-der-Waals-Kräfte gehalten werden.^[177,178,179]

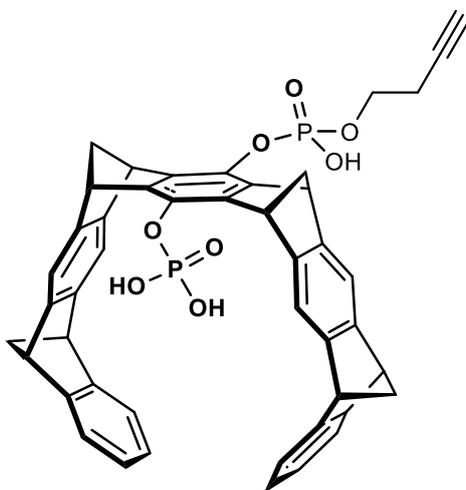


Abbildung 79: Struktur der molekularen Pinzette CLR01.^[176]

5.7.1. Nanopartikel mit molekularen Pinzetten (AuTweezer)

Die Anbringung an die Oberfläche der Nanopartikel erfolgte über eine CuAAC in mit Natronlauge basisch eingestelltem Wasser. Dazu wurden die zuvor beschriebenen AuN₃-Partikel verwendet (vgl. Kapitel 5.3). Nach Aufreinigung der geklickten Partikel über Spinfiltration wurden diese umfassend analysiert, damit sie für spätere biologische Experimente verwendet werden konnten.

Die Ergebnisse der Scheibenzentrifuge zeigen, dass die Nanopartikel durch die etwas vergrößerte Ligandenhülle keinen nennenswerten Unterschied in ihrem errechneten hydrodynamischen Radius aufweisen. Ein Grund dafür ist, dass der Zuwachs an Größe und Durchmesser der Ligandenhülle die mittlere Dichte des Gesamtsystems so herabsetzt, dass sie im Vergleich zu AuN₃ Partikeln (vgl. Kapitel 5.3) noch stärker unterschätzt werden. Diese beiden Effekte wirken einander entgegen, sodass die DCS hier als Maß dafür genommen werden kann, dass die Kerne während der Reaktion nicht aggregiert, sondern weiterhin ultraklein sind.

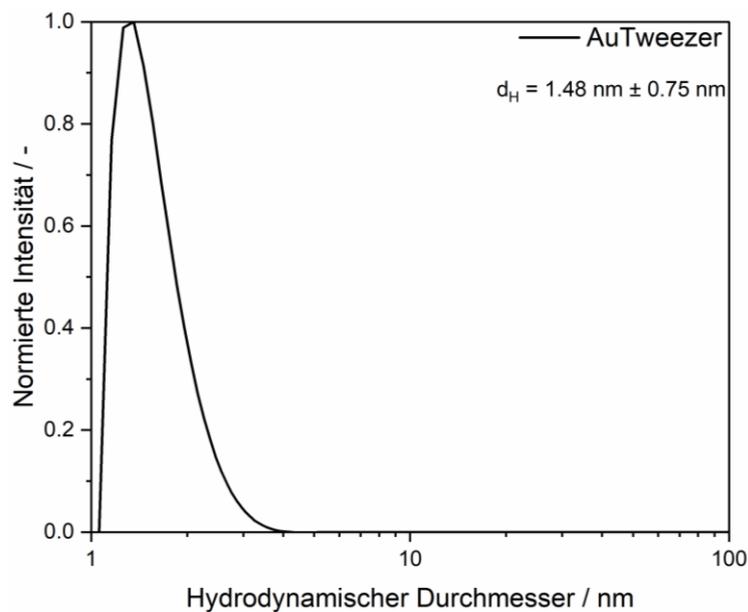


Abbildung 80: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit molekularen Pinzetten.

Das UV-Vis-Spektrum der geklickten Partikel (Abbildung 81) weist ein deutliches Absorptionssignal bei 222 nm auf. Eine Quantifizierung erweist sich dennoch als sehr ungenau, da eine Integration der Signale des reinen CLR01 (vgl. Anhang) nicht genau möglich ist, da die Absorptionsbanden keine klare Grundlinie aufweisen und auch jenseits von 200 nm noch im UV-Bereich absorbierende Eigenschaften zeigen. Die Extinktion des Absorptionssignals bei den funktionalisierten Partikeln ist ebenfalls nicht dafür geeignet, da dieser Wert stark von der Untergrundabsorption der Goldpartikel überlagert wird. Ein erster vager Einblick in die Anzahl der geklickten CLR01-Liganden kann jedoch getroffen werden, indem die Untergrundabsorption der Partikel durch eine angepasste Grundlinie gefittet wird (siehe Anhang). Bei den dort vermessenen 28 µg/mL (auf Au bezogen) Nanopartikeln liegt nach Gleichung 2 eine Nanopartikelkonzentration von $c_{NP} = 576nM$ vor. In dieser Probe lässt sich die

Konzentration der geklickten Pinzetten durch das Anlegen eines theoretischen Untergrundes und Einsetzen der Extinktion in die Geradengleichung der Kalibration auf $c_{CLR01} = 7.2 \text{ mM}$ abschätzen, was etwa zwölf geklickten Pinzetten pro Partikel entsprechen würde.

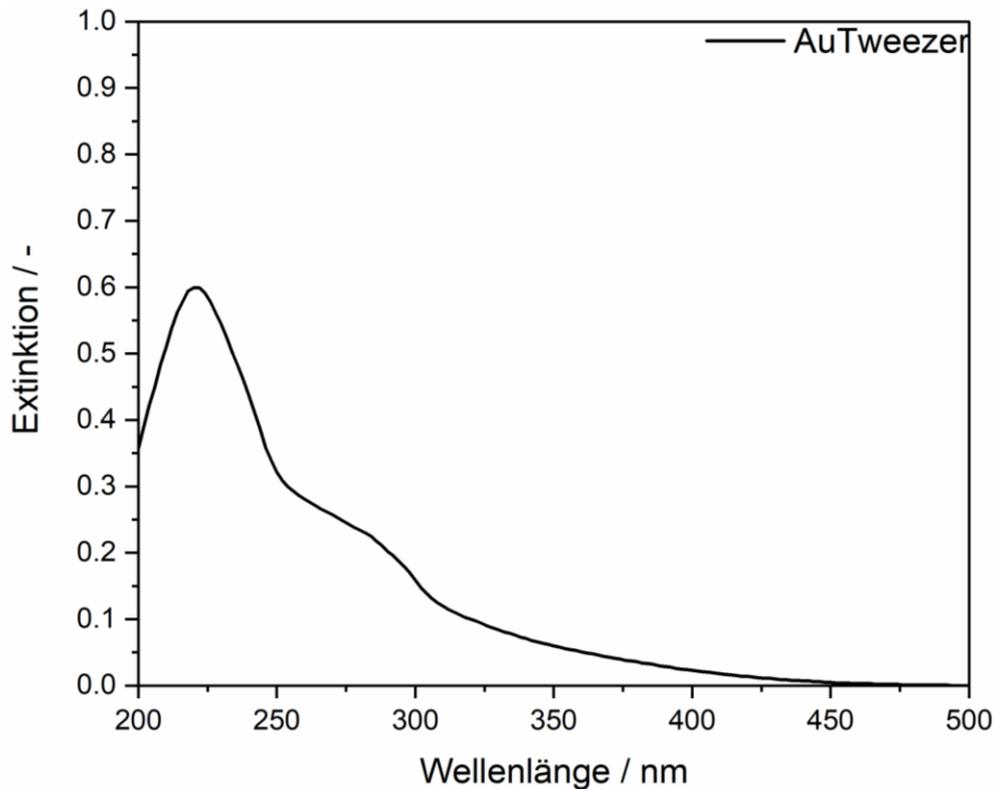


Abbildung 81: UV-Vis-Spektrum der mit CLR01 funktionalisierten Goldnanopartikel.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der mit Pinzetten funktionalisierten ultrakleinen Goldnanopartikel weist zusätzlich zu den bekannten Signalen der GSH-Matrix ein stark verbreitertes Signal im aromatischen Bereich bei 7.5 ppm - 6.9 ppm auf, welches den aromatischen Protonen der Phenylringe (10) zugeordnet werden kann. Zudem sind die CH-Gruppen (11) der Norbonyl-Linker zusammen mit den Signalen der 1- und 6-Position von GSH bei etwa 3.6 ppm zu finden. Die Protonen der 8- und 9-Position des Butinyl-Linkers zur Pinzette liegen zusammen mit den CH_2 -Brücken der Norbonyl- zwischen den Protonen der 4- und 5-Position von GSH.

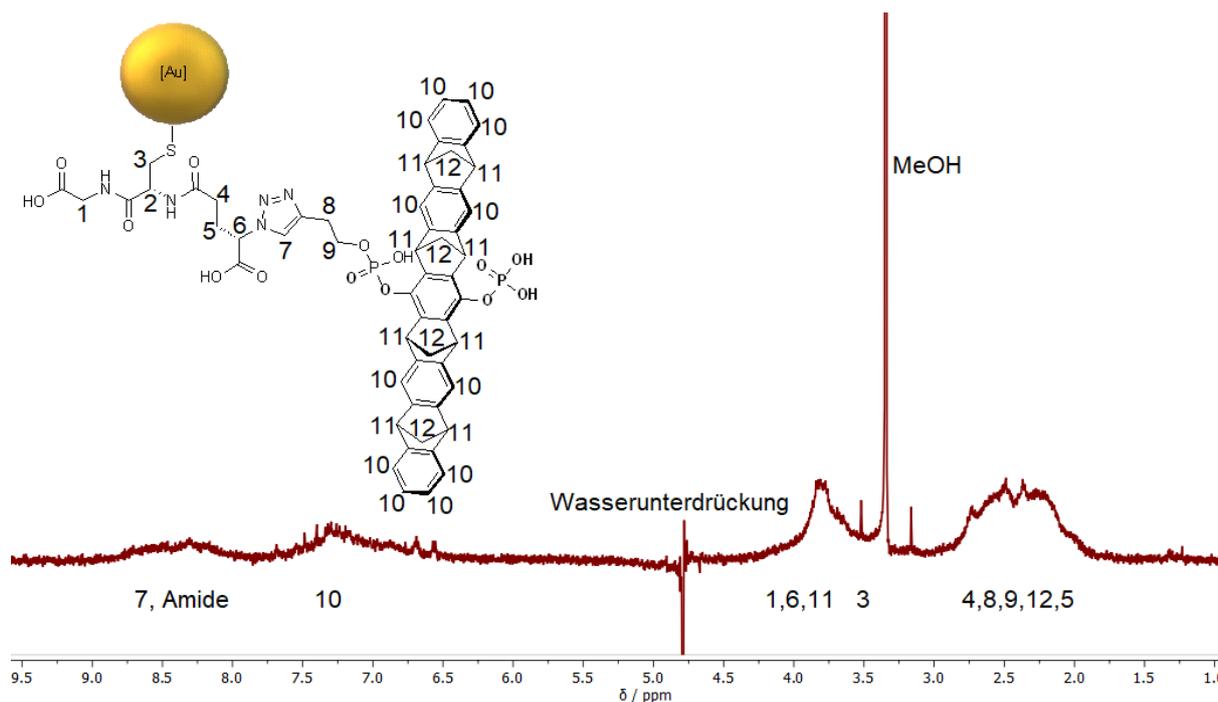


Abbildung 82: ^1H -NMR-Spektrum von AuTweezer (400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).

Eine quantitative Analyse über NMR-Spektroskopie ist nicht möglich, da die Signale der Pinzette zu stark mit denen von GSH überschneiden. Da eine genaue quantitative Bestimmung sowohl über UV-Vis- als auch über NMR-Spektroskopie nicht möglich war und ein Ergebnis nur abgeschätzt werden konnte, wurden die Proben extern für eine Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*engl.: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*, ICP-MS) an das mikroanalytische Labor Kolbe (Fraunhofer Institut Umsicht, Oberhausen) gegeben. Die Elemente Au, S und P wurden mit Hilfe einer ICP-OES der Firma Spectro Model Spectro Arcos nach einem Mikrowellenaufschluss bestimmt. Dabei wurden Gold mit einem Massenanteil von 3316 ppm und Phosphor mit 66 ppm detektiert. Über die molare Masse M der Elemente können dabei die molaren Konzentrationen c_{Au} und c_{P} berechnet werden.

$$c_{\text{Au}} = \frac{c_{\text{Au}}(m, \text{ICP})}{M_{\text{Au}}} = \frac{3316 \text{ ppm}}{196.967 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{3.316 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{196967 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 16.83 \mu\text{M} \quad (19)$$

$$c_{\text{P}} = \frac{c_{\text{P}}(m, \text{ICP})}{M_{\text{P}}} = \frac{66 \text{ ppm}}{30.974 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{0,066 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{30974 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 2.13 \mu\text{M}$$

Über Gleichung 2 kann c_{Au} in die Konzentration der Nanopartikel c_{NP} zu $c_{\text{NP}} = 68.14 \text{ nM}$ umgerechnet werden. Eine molekulare Pinzette trägt zwei Phosphorsäuren,

d. h. die Konzentration von Phosphoratomen muss durch zwei geteilt werden, um die Konzentration der Pinzetten zu ergeben. So enthielt die gemessene Suspension mit 68.14 nM Nanopartikeln also insgesamt 1065 nM Pinzetten und damit ca. 16 Pinzetten pro Nanopartikel. Verglichen mit der zuvor über die Extinktion der Partikel über einem theoretischen Boden im UV-Vis-Spektrum errechneten Menge von zwölf Pinzetten pro Nanopartikel erscheint dieser Wert also plausibel.

Zusätzlich zu Gold und Phosphor wurde über die ICP-MS als Kontrolle der Schwefel-Anteil gemessen, um die Anzahl der an der Oberfläche immobilisierten GSH-Moleküle zu bestimmen.

$$c_s = \frac{c_s(m, ICP)}{M_s} = \frac{31 \text{ ppm}}{32.066 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{0.031 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{32.066 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 0.97 \mu\text{M}$$

Normiert auf die Konzentration der Nanopartikel würde die für Schwefel bestimmte Menge eine Anzahl von 14 GSH-Molekülen auf der Oberfläche eines einzelnen Partikels bedeuten. Auf den ersten Blick erscheint dieser Wert im Vergleich zu den in Kapitel 5.1 bestimmten 125 GSH-Molekülen sehr gering. Bei der ICP-MS kann es jedoch zu einigen Problemen mit Schwefel kommen, die diese Diskrepanz erklären. Hauptsächlich dafür verantwortlich ist jedoch, dass Schwefel eine sehr hohe Ionisierungsenergie von rund 10.36 eV aufweist, weshalb das standardmäßig verwendete Plasma der ICP-MS nicht ausreicht, um die gesamte Probe zu ionisieren, sodass sie ein m/z-Verhältnis von eins aufweist und detektiert werden kann (vgl. Kapitel 3.8, ESI-MS). Stattdessen werden nur rund 10% des in der Probe befindlichen Schwefels in die erste Oxidationsstufe ionisiert, was den Faktor von etwa zehn zu dem mit NMR-Spektroskopie bestimmten Wert erklärt.^[180,181,182,183]

Nach Quantifizierung der geklickten Pinzetten auf der Oberfläche der Nanopartikel wurden diese an *Dr. A. Höing* in der Arbeitsgruppe von *Prof. S. Knauer* gegeben, um verschiedene biologische Experimente mit dem enzymatisch aktiven Protein Taspase1 durchzuführen.

5.7.2. Taspase1

Threoninaspartase1 (Taspase1) ist ein Enzym aus der Klasse der Threoninproteasen und gehört zu den Proteinen, die als ein geeignetes Ziel für verschiedene

Krebstherapien angesehen werden.^[184,185] Bei erwachsenen Menschen kommt es in der Regel kaum noch vor, da es hauptsächlich für die Aktivierung unterschiedlicher Gene in der Embryonalentwicklung relevant ist.^[185] Allerdings wird es bei vielen Krebserkrankungen im menschlichen Körper erneut exprimiert, da es für die Verbreitung der Zellen in Form von Metastasen relevant ist. Die menschliche Taspase1 (50 kDa) liegt dabei grundsätzlich als *cis*-Dimer vor, welches aus den beiden Untereinheiten α -Tasp1 (28 kDa) und β -Tasp1 (22 kDa) besteht.^[185,186] Dieses *cis*-Dimer ist jedoch nicht katalytisch aktiv. Damit Taspase1 aktiviert werden kann, muss es zunächst in die jeweiligen α - und β -Monomere aufgespalten werden und sich anschließend als *trans*-Dimer wieder zusammensetzen (Abbildung 83). Bei dem *trans*-Dimer liegt nun die zuvor in der Mitte des Moleküls versteckte Thr²³⁴-Gruppe frei, die dafür bekannt ist, über die Bildung von Succinimid-Hydrat-Übergangszuständen^[187,188] durch nukleophile Angriffe andere krebsrelevante Proteine wie z. B. das *Mixed-Lineage-Leukemia* Protein (MLL), welches nach Aktivierung durch Taspase1 zu Blutkrebs führen kann, zu aktivieren.^[185] Die katalytische Aktivität von Thr²³⁴ wurde belegt, indem *Bier et al.* durch Mutationen des Enzyms an dieser Stelle das Threonin durch ein Valin substituierten und die katalytische Aktivität von Taspase1-Val²³⁴ auch in der *trans*-Form unterdrückt werden konnte.^[189,190]

In dieser Arbeit sollen erste Schritte für eine mögliche Inhibition der Spaltung des *cis*-Dimers untersucht werden, indem der Eintritt von Taspase1 in die Zellkerne inhibiert wird. Taspase1 besitzt einen flexiblen Loop im Bereich der Aminosäuren 178-233 (insgesamt etwa 420^[185]), der aus zwei α -Helices besteht.^[192] An diesen Helices befindet sich ein sog. zweigeteiltes Kernerkennungssignal (*engl.: bipartite nuclear localization signal, NLS*), welches aus den Aminosäuren Arginin (R), Asparagin (N) und Lysin (K) zum einen nach dem Schema ¹⁹⁷KRNKRK²⁰² und zum anderen nach ²¹⁷KKRR²²⁰ zusammengesetzt ist.^[186,193] Diese beiden Aminosäuresequenzen erlauben es dem Transporterprotein Importin α , an das *cis*-Dimer von Taspase1 anzudocken und in die Zellkerne zu überführen.^[193,194]

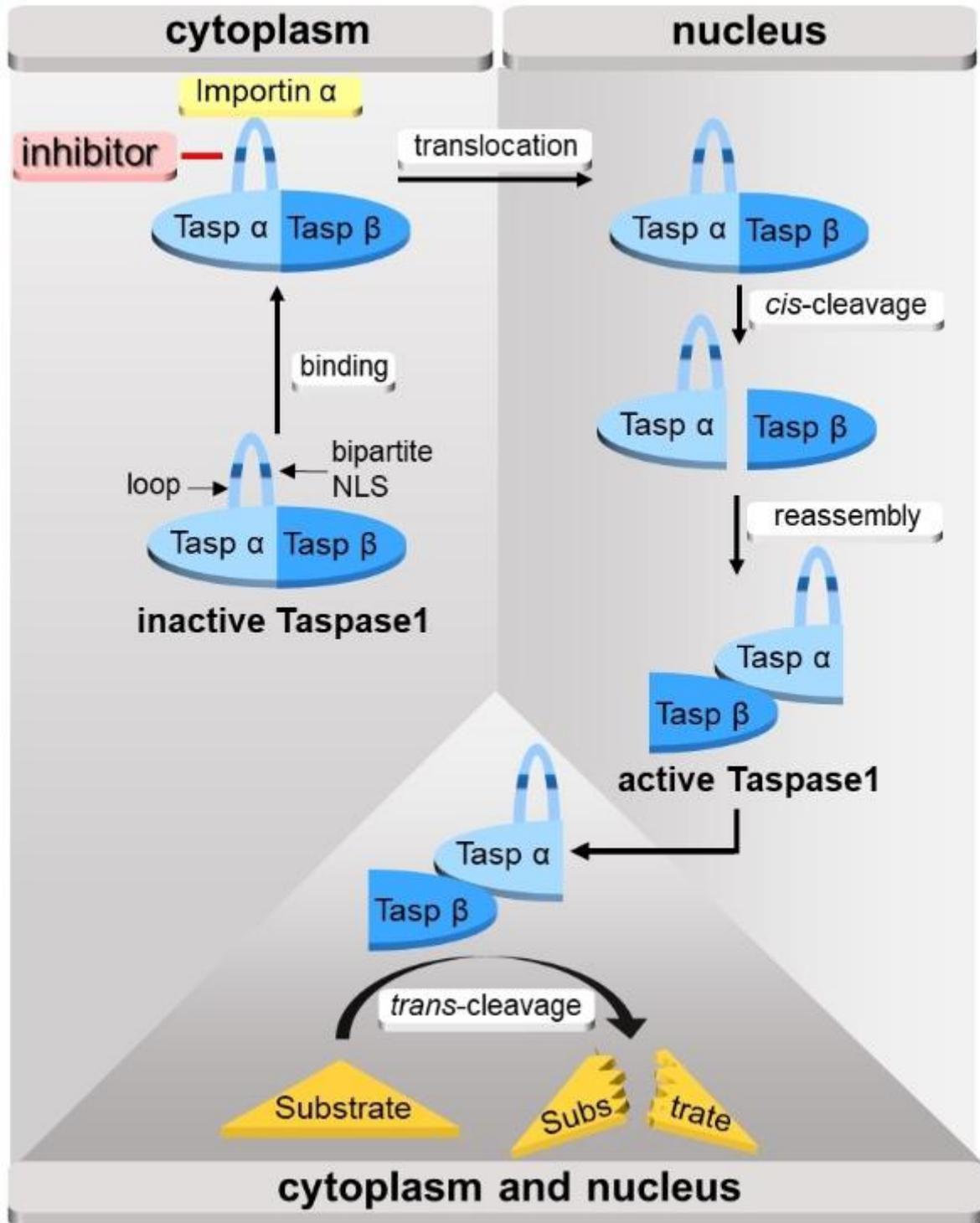


Abbildung 83: Mechanismus für den Import des *cis*-Dimers von Taspase1 in den Zellkern durch Andocken von Importin α an den Loop.^[191]

Da die beiden Erkennungssequenzen für Importin α durch die basischen Aminosäuren Asparagin und Lysin in der Regel positiv geladen sind, bilden sie einen guten Angriffspunkt für die molekularen Pinzetten nach Schrader *et al.*^[176] und sind das Ziel der mit Pinzetten funktionalisierten Nanopartikel (AuTweezer). Durch die Anbindung der Nanopartikel sollte der Loop demnach sterisch so stark blockiert werden, dass eine

Interaktion mit Importin α und somit ein Eintritt von Taspase1 in den Zellkern nicht mehr möglich ist. Taspase1 würde somit in seiner unreaktiven *cis*-Form verweilen und nicht in die α - und β -Monomere aufspalten können, die die reaktive, enzymatisch aktive *trans*-Form bilden.

5.7.3. Interaktion von AuTweezer mit Taspase1

Die Nanopartikel wurden über einen von *Dr. A. Höing* entwickelten *Pull-Down* Assay auf ihre Bindung zu Taspase1 untersucht. Dazu wurde das Fusionsprotein GST-Importin α , der Interaktionspartner zum Taspase1-Loop, auf einer Glutathiongekoppelten Sepharosesäule fixiert. Anschließend wurden die Nanopartikel mit einer bezüglich des Liganden genau bestimmten Konzentration, sowie ungebundenes His-Taspase1-Fusionsprotein zugegeben. Ungebundene His-Taspase1 wurde danach durch Waschen der Säule entfernt und über SDS-PAGE untersucht. Dabei ist anzumerken, dass bei einer höheren Konzentration an Nanopartikeln die Interaktion mit dem immobilisierten GST-Importin α offenbar gestört wird, es wird also mehr His-Taspase1 wieder aus der Säule herausgewaschen (Abbildung 84).^[191,195]

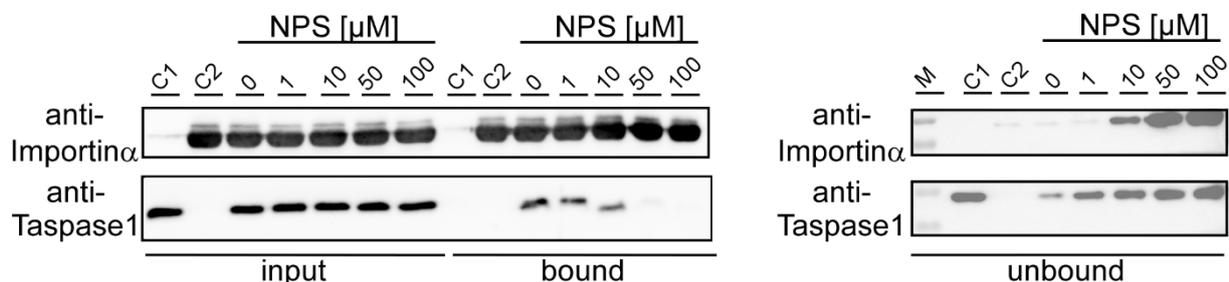


Abbildung 84: Ergebnisse der SDS-PAGE des *Pull-Down* Assays mit AuTweezer (gemessen von *Dr. A. Höing*). Die angegebenen Konzentrationen der Nanopartikel (NPS) beziehen sich auf die angebondenen CLR01-Liganden.

Kontrolle-1 (C1) enthielt nur His-Taspase1 und dient als Referenzpunkt dafür, dass Taspase1 ohne den Reaktionspartner nicht an die Säule binden kann. Kontrolle-2 (C2) enthielt nur GST-Importin α . In der *Input*-Fraktion ist eine Probe von allem, was auf die Säule gegeben wurde, daher ist die GST-Taspase1-Konzentration hier bei jeder Partikelmenge in etwa gleich. In der *Bound*-Fraktion ist zu erkennen, dass bei höherer Konzentration an Nanopartikeln und somit auch höherer CLR01-Konzentration weniger GST-Taspase1 auf der Säule verbleibt. Korrelierend dazu ist zudem in der *Unbound*-Fraktion die Menge an Protein zu sehen, die durch Waschen aus der Säule herausgespült wurde. Dadurch wird nochmal bestätigt, dass die Nanopartikel die

Interaktion von Importin α zum Taspase1-Loop stören. In der *Unbound*-Fraktion ist zudem zu erkennen, dass auch ein Teil des GST-Importin α von der Säule gewaschen wurde, was damit zu erklären ist, dass die Pinzetten auf den Nanopartikeln unspezifisch an kationische Aminosäuren binden und keine Protein-spezifische Erkennungssequenz aufweisen. Im Vergleich mit der *Bound*-Fraktion lässt sich jedoch feststellen, dass die herausgewaschene Menge an GST-Importin α nicht signifikant ist, da die Menge in der Säule nach dem Waschen nahezu unverändert im Vergleich zum Zustand vor dem Waschen ist. Eine quantitative Auswertung der *Bound*-Fraktion mit zugehörigen Signifikanzwerten ist in Abbildung 85 dargestellt.

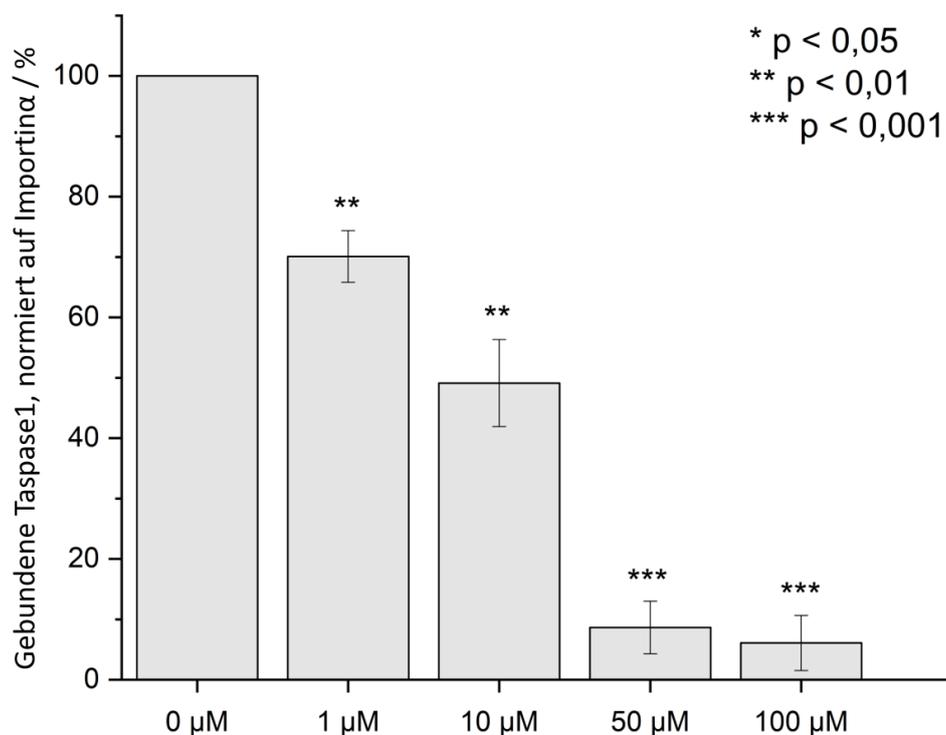


Abbildung 85: Quantitative Ausmessung (berechnet von *Dr. A. Höing*) der Ergebnisse des *Pull-Down* Assays (Abbildung 84) mit AuTweezer mit Signifikanzlevel (p).

Pasch et al. und *Höing et al.* berichteten bereits von bindenden Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiven (GCP), die über eine multivalente Anbindung an anionische Aminosäuren in der Nähe des Taspase1-Loops eine Interaktion mit Importin α verhindern sollten.^[191,195] *Pasch et al.* erreichten mit einem multivalenten PEGylierten Liganden, der insgesamt drei bindende GCP-Einheiten trug, bereits bei einer zugegebenen Konzentration von 50 μ M eine Inhibition von ca. 50% der Taspase1-Importin α -Interaktion bei einem *Pull-Down* Assay.^[195] Ein Jahr später wurde von *Höing et al.* ein weiterer GCP-haltiger Ligand entwickelt, der ab einer Konzentration von 10 μ M erste Effekte zeigte und bei nur 34 μ M die halbmaximale

Wirkungsdosis (IC_{50}) erreichte.^[191] Bei den *Pull-Down* Assays mit Nanopartikeln ist bereits bei sehr kleinen Konzentrationen von 1 μ M - 10 μ M eine starke Störung der Interaktion zwischen Importin α und Taspase1 zu erkennen. Nach Abbildung 85 liegt die IC_{50} für das Nanopartikelsystem bei nur etwa 10 μ M und spricht somit für eine etwa dreimal stärkere Aktivität als bei den zuvor getesteten multivalenten GCP-Liganden.

Um die Inhibition der enzymatischen Aktivität von Taspase1 mit den Nanopartikeln zu untersuchen, wurden 200 nM Taspase1 mit Nanopartikeln unterschiedlicher Konzentrationen (auf den CLR01-Liganden bezogen) gemischt. Anschließend wurden 4 μ M einer rekombinanten Sonde^[196] für enzymatische Taspase1-Aktivität zugegeben. Bei dieser Sonde handelt es sich um ein rekombinantes Fusionsprotein, welches die von MLL bekannte Taspase1-Schnittstelle CS2 aufweist (siehe Anhang).^[185,196] Funktionsfähige Taspase1 ist in der Lage, diese Sonden durch Proteolyse zu spalten. Die entsprechenden Spaltprodukte können dann in einer SDS-PAGE untersucht werden. Nach einer 90 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Proteine aufgekocht und das Ergebnis über eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung^[197] sichtbar gemacht (Abbildung 86).

Bei der geringen Menge der eingesetzten Taspase1 von 200 nM ist diese durch die Coomassie-Färbung in der SDS-PAGE nicht sichtbar. Abbildung 86 zeigt demnach die Sonde (ca. 84 kDa) sowie beide Spaltprodukte bei ca. 50 kDa und 34 kDa. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Menge an gespaltener Sonde mit steigender Nanopartikelmenge abnimmt. Ab 0.5 μ M CLR01 auf der Oberfläche der Partikel ist die Bande im Gel kaum noch mit dem Auge zu erkennen. Die Farbintensität der Banden wurde quantifiziert, wobei mögliche Unterschiede in der Beladung des Gels ausgeglichen wurden, indem das Verhältnis von gespaltener zu ungespaltener Sonde aufgetragen wurde (Abbildung 87).

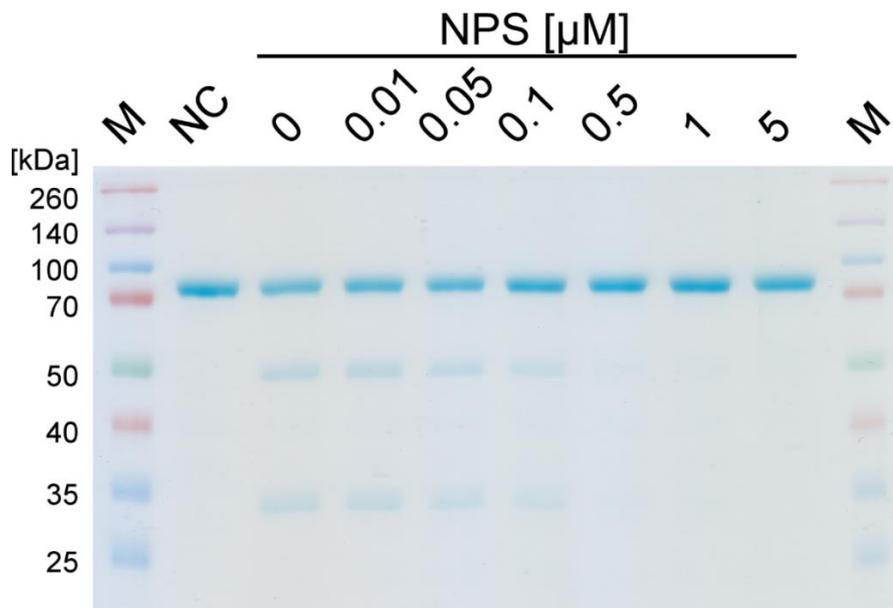


Abbildung 86: SDS-PAGE (durchgeführt von *Dr. A. Höing*) zur Veranschaulichung der Spaltprodukte der für die enzymatische Aktivität von Taspase1 eingesetzten Sonde. Als Sonde wurde ein rekombinantes Fusionsprotein mit der Taspase1-spezifischen CS2-Schnittstelle von MLL verwendet.^[185,196]

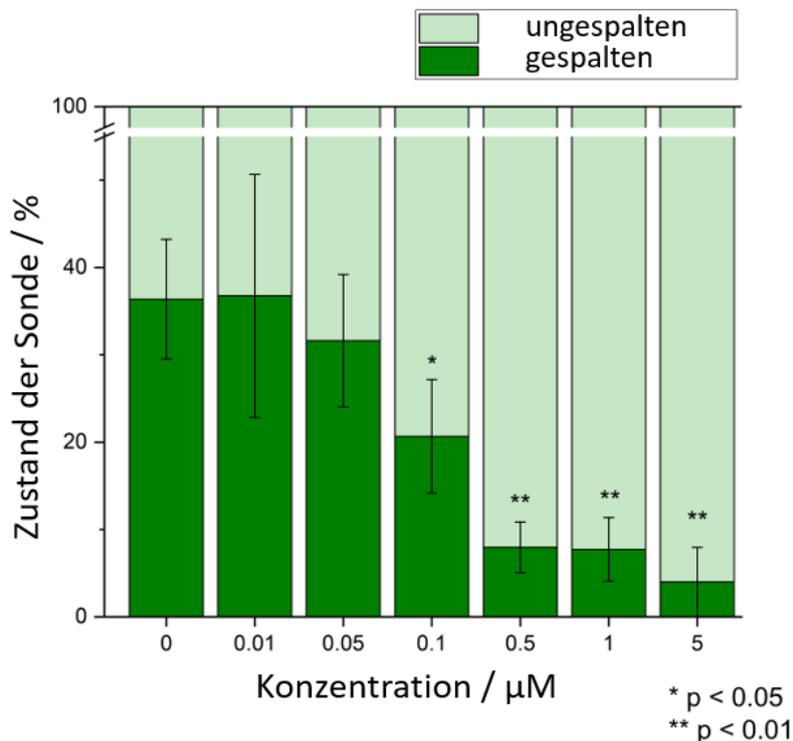


Abbildung 87: Auftragung der Farbintensitäten mit Signifikanzwerten aus der SDS-PAGE für die enzymatische Aktivität von Taspase1 in Gegenwart der AuTweezer Nanopartikel (durchgeführt von *Dr. A. Höing*). Aufgetragen ist das Verhältnis von ungespalteener (hellgrün) zu gespalteener Sonde (dunkelgrün). Als Sonde wurde ein rekombinantes Fusionsprotein mit der Taspase1-spezifischen CS2-Schnittstelle von MLL verwendet.^[185,196]

Die Nanopartikel zeigen einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Taspase1 bereits bei einer Konzentration von 50 nM (auf den funktionellen Liganden bezogen), was einer Äquivalenz von 25% zur Taspase1 entspricht. Die IC_{50} der Nanopartikel liegt bei etwa 100 nM oder einer Äquivalenz von etwa 50% (Abbildung 88).

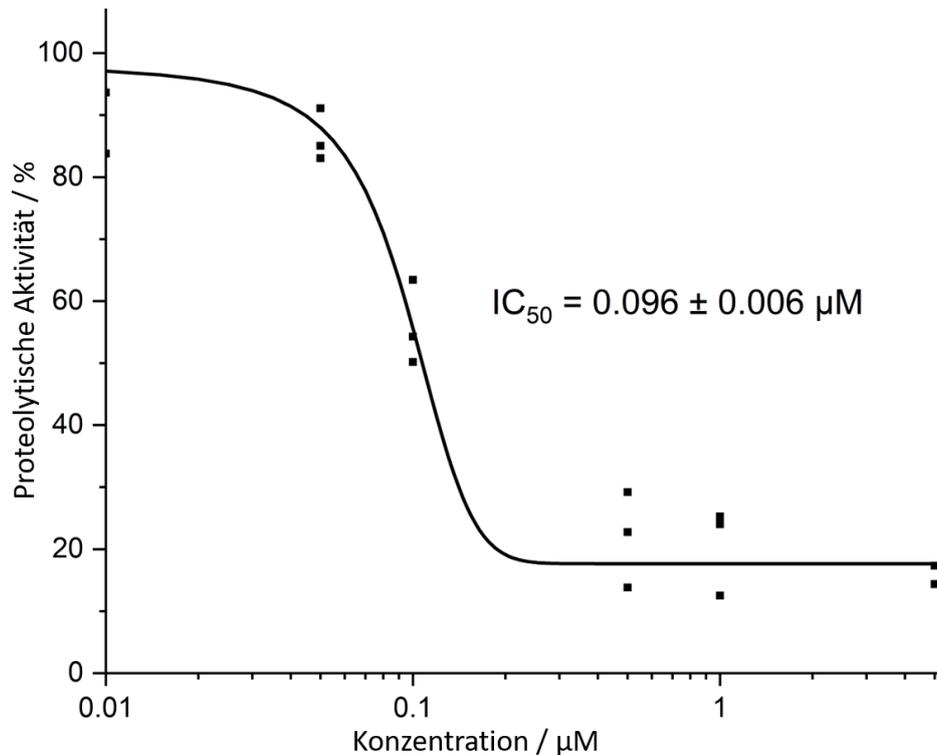


Abbildung 88: Angepasste Auswertung der quantitativen Analyse für die enzymatische Aktivität von Taspase1 in Gegenwart von AuTweezer Nanopartikeln. Die angegebene Konzentration bezieht sich auf die gebundenen Pinzetten.

Theoretisch wäre es auch denkbar, dass die unspezifischen molekularen Pinzetten nicht nur an die Taspase1, sondern auch an die verwendete Sonde binden und dieser Effekt die Spaltung verhindert. In Anbetracht der eingesetzten Konzentrationen ist es allerdings deutlich wahrscheinlicher, dass die 100 nM Ligand bei der IC_{50} die Aktivität von Taspase1, welche mit 200 nM in zweifachem Überschuss vorliegt, um etwa 50% reduzieren. Die Alternative dazu wäre, dass die Nanopartikel den ca. 40-fachen Überschuss der Sonde mit einer Masse von etwa 84 kDa über 90 min so von Taspase1 abschirmen, dass genau diese Stelle, an der die Sonde gespalten werden würde, vor dem Enzym geschützt wird. Anhand dieser beiden möglichen Effekte ist es also deutlich wahrscheinlicher, dass hier inhibierende Effekte durch die funktionalisierten Nanopartikel direkt am Loop der Taspase1 stattfanden. Außerdem ergänzen sich diese Ergebnisse sehr gut mit den Ergebnissen aus den *Pull-Down* Assays. Demnach binden die Nanopartikel die Taspase1 an dem Loop ab und verhindern dadurch

Interaktionen mit Importin α . Das aktive Zentrum des Enzyms liegt in direkter Nähe zu diesem Loop,^[185] eine Hemmung der enzymatischen Aktivität durch die Nähe zu Thr²³⁴ ist also sehr wahrscheinlich.

5.8. Goldnanopartikel mit sequenzdefinierten Makromolekülen

Die in dieser Arbeit verwendeten makromolekularen Liganden für die Nanopartikel wurden von *T. Seiler* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. L. Hartmann* nach dem Vorbild der Festphasenpeptidsynthese (*engl.: solid phase peptide synthesis, SPPS*) von Merrifield^[123] synthetisiert. Das besondere an den hier verwendeten Makromolekülen ist, dass sie eine durch die Synthese genau definierte Sequenz aufweisen. Durch die schrittweise Addition der einzelnen Bausteine und durch den gezielten Einsatz orthogonaler Schutzgruppen zueinander kann ein Oligomer hergestellt werden, dessen Sequenz genau definiert ist.^[198] Abbildung 89 zeigt das Makromolekül. Es besitzt eine Cystein-Einheit, welche über die Aurophilie des Schwefels (vgl. Kapitel 1) an die Oberfläche der Goldnanopartikel binden kann. Darauf folgt eine funktionelle Einheit in Form von Benzylaziddiaminsuccinamid (BADS), welche später über eine CuAAC mit entsprechenden Alkinen funktionalisiert werden kann. Bevor das nächste BADS eingebaut wird, folgt zunächst eine Spacereinheit aus Ethylenglykoldiaminsuccinamid (EDS), welche die funktionellen Einheiten räumlich voneinander trennt und zudem die Wasserlöslichkeit des gesamten Systems verbessert.^[199] Nach dem zweiten funktionellen BADS-Baustein folgt zuletzt noch eine fluoreszierende Einheit in Form von Fluorescein. Dieser Fluorophor ermöglicht später eine Detektion in biologischen Systemen sowie eine Quantifizierung des makromolekularen Liganden auf der Oberfläche von Goldnanopartikeln über UV-Vis-Spektroskopie.

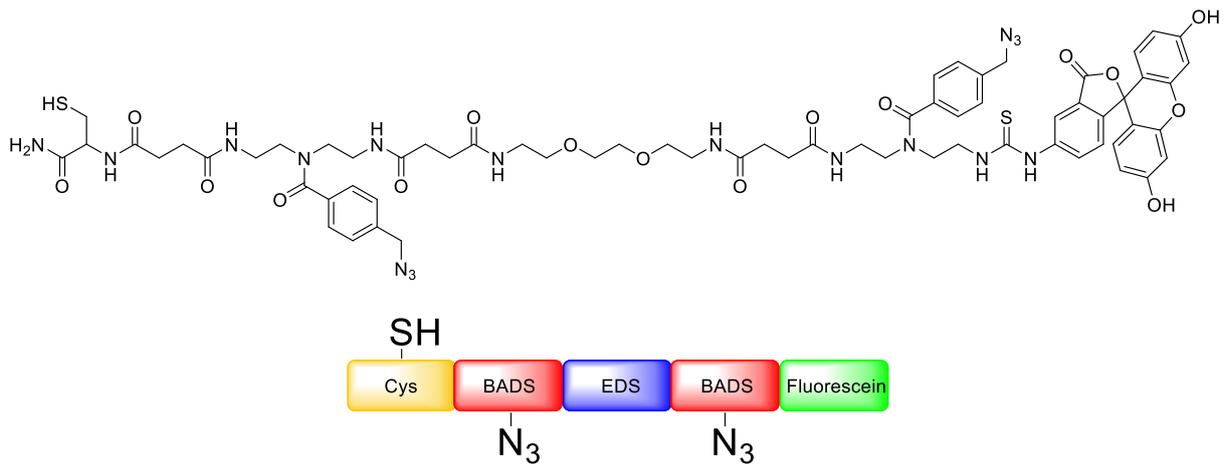


Abbildung 89: Darstellung des verwendeten sequenzdefinierten Oligomers.

Durch die Knüpfung von Amidgruppen zwischen den einzelnen Bausteinen, die keine Aminosäuren sind, ist bei dem finalen Makromolekül nicht die Rede von einem Peptid, sondern viel eher von einem peptidomimetischen Oligo(amidoamid).^[200] Während der Synthese tragen die Bausteine eine mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützte Aminogruppe, während die Säuregruppe frei steht. Eine feste Phase aus Polystyrolharz, welches mit Aminen auf der Oberfläche funktionalisiert ist, wird im ersten Schritt mit dem Fmoc-geschützten Cystein über eine Aktivester-gesteuerte Amidkupplung (vgl. Abbildung 58) weiter funktionalisiert. Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe des Cysteins durch Piperidin abgespalten, sodass das resultierende freie Amin für weitere Kupplungen zugänglich ist.^[201] Diese Prozedur wird iterativ für die einzelnen Bausteine wiederholt. Nach der Entschützung der zweiten BADS-Einheit wurde Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) eingesetzt, welches durch die endständige Aminogruppe nukleophil angegriffen werden kann.^[202] Das fertige Oligo(amidoamid) wurde schließlich orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppenchemie im Säuren von der festen Phase abgespalten und über HPLC aufgereinigt.

5.8.1. Nanopartikel mit makromolekularen Liganden (AuMakro-N₃)

Nun sollten ultrakleine Goldnanopartikel hergestellt werden, die dieses Makromolekül über die Cystein-Einheit als Ligand tragen. *Van der Meer et al.* synthetisierten bereits ultrakleine Goldnanopartikel, die makromolekulare Liganden trugen.^[202] Dazu verwendeten sie im Vergleich zu der Synthese von AuGSH Nanopartikeln eine deutlich geringere Äquivalenz des Liganden im Vergleich zu Gold. Nach diesem Beispiel wurde auch Cys-BADS-EDS-BADS-FITC (Makro-N₃) an die Nanopartikeloberfläche

gebracht. Auf 5 mg (25.39 μmol) Au in Form von HAuCl_4 wurden 1.2 Äquivalente des Makro- N_3 gegeben. Makro- N_3 wurde aufgrund der relativ schlechten Wasserlöslichkeit dazu zunächst in etwas Methanol vorgelöst. Im Gegensatz zur Synthese von AuGSH (vgl. Kapitel 5.1) war hier durch die intensive Färbung von Makro- N_3 kaum ein Farbumschlag zu erkennen. Nach ca. 30 min wurde dann NaBH_4 zugegeben, um das Gold final in die Oxidationsstufe 0 zu reduzieren. Dabei war dann auch der erwartete Farbumschlag in ein leichtes Braun zu erkennen. Nach weiteren 30 min Reaktionszeit wurden die Nanopartikel über Spinfiltration mit 0.1 M NaOH-Lösung aufgereinigt, bis eine dunkelbraune Suspension an Partikeln zurückblieb, die durch den angebrachten Farbstoff ein leicht grünliches Schimmern ähnlich zu AuFAM zeigten.

Die fertigen Nanopartikel wurden umfassend analysiert. Zunächst wurde ein UV-Vis-Spektrum (Abbildung 90) der mit Makro- N_3 funktionalisierten Partikel (AuMakro- N_3) aufgenommen. Dabei war eine deutliche Absorptionsbande des angebrachten Fluoresceins bei ca. 490 nm zu erkennen. Außerdem zeigten die Phenylringe der azidierten Seitengruppen der BADS-Einheiten eine schwache Absorptionsbande bei etwa 280 nm. Die Nanopartikel selbst wiesen das typische Absorptionsmuster für ultrakleine Goldpartikel auf, welches sich in der im UV ansteigenden Absorption widerspiegelte. Eine Plasmonenbande für größere Nanopartikel kann jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, da die Absorptionsbande des Farbstoffes im selben spektralen Bereich liegt, allerdings ist in dem Signal keine Schulter oder Ähnliches für eine potenzielle Oberflächenplasmonenresonanz von Partikeln >5 nm zu erkennen.

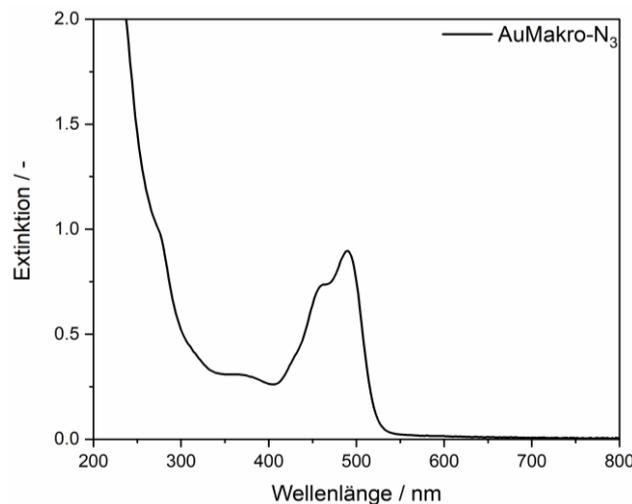


Abbildung 90: UV-Vis-Spektrum der AuMakro- N_3 -Nanopartikel. Die Konzentration der Partikel betrug auf Gold bezogen $c_{\text{Au}} = 77 \mu\text{M}$.

Über das Signal des Farbstoffes im UV-Vis-Spektrum ist zudem eine quantitative Analyse des auf der Oberfläche der Partikel immobilisierten Liganden möglich. Das Integral des Farbstoffsignals von 403 nm – 537 nm betrug $\int(\lambda_1 \text{ bis } \lambda_2)_{FITC} = 47.5$. Eingesetzt in die Geradengleichung für den Farbstoff (vgl. Kapitel 5.4, Abbildung 40) ergibt sich eine Farbstoff- und somit Makromolekülkonzentration von $c_{Makro-N_3} = 23.3 \mu M$.

$$\int(403 \text{ nm} - 537 \text{ nm})_{FITC} = 2.04 \cdot c_{FITC} [\mu M] \leftrightarrow c_{FITC} [\mu M] = \frac{\int(403 \text{ nm} - 537 \text{ nm})}{2.04}$$

$$c_{FITC} [\mu M] = c_{Makro-N_3} [\mu M] = \frac{47.5}{2.04} [\mu M] = 23.3 \mu M$$

Die eingesetzte Goldkonzentration von $c_{Au} = 77 \mu M$ kann nach Gleichung 2 in eine Partikelkonzentration von $c_{NP} = 0.312 \mu M$ umgerechnet werden. Durch das Verhältnis der Konzentration des Liganden zu der Konzentration der Nanopartikel kann eine angebundene Menge von ca. 75 Makro- N_3 pro Nanopartikel errechnet werden. Dies würde einer Menge von 150 Azidogruppen entsprechen, die in späteren CuAAC weiter umgesetzt werden können. Im Vergleich mit AuGSH (125 Liganden pro Nanopartikel) wurde das Makro- N_3 signifikant weniger an die Oberfläche des Partikels gebunden, was durch den erhöhten sterischen Anspruch zu erklären ist.

$$N_{Makro-N_3/NP} = \frac{c_{Makro-N_3}}{c_{NP}} = \frac{23.3 \mu M}{0.31 \mu M} = 74.6 \approx 75$$

Eine DCS-Messung des Partikelsystems (Abbildung 91) zeigte einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $d_H = 1.88 \text{ nm}$. Dabei ist zu beachten, dass der makromolekulare Ligand die mittlere Dichte des Systems sehr stark herabsetzt, was zu einer Vergrößerung des systematischen Fehlers der Methode führt (vgl. Kapitel 3.3). Die DCS liefert somit nur näherungsweise Ergebnis, weswegen noch weitere Methoden für eine Größenbestimmung des Systems herangezogen werden müssen.

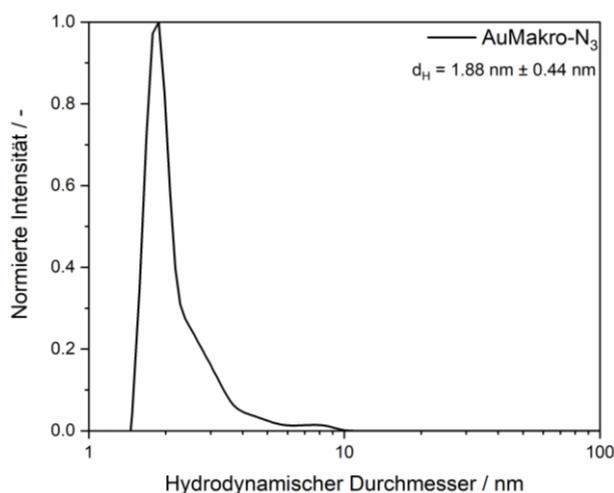


Abbildung 91: Normierte Anzahlverteilung der DCS-Messung von ultrakleinen Goldnanopartikeln mit Makro-N₃-Liganden.

Das DOSY der Nanopartikel (Abbildung 92) wurde in 10% D₂O in H₂O an einem 700 MHz NMR-Spektrometer von *Dr. C. Beuck* vermessen. Zusätzlich zu den Ergebnissen der Scheibenzentrifuge kann hier der hydrodynamische Durchmesser der NMR-aktiven Ligandenhülle der Nanopartikel berechnet werden. Dazu wird der translationale Diffusionskoeffizient $D_{\text{AuMakro-N}_3}$ der Nanopartikel über die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 9) in den hydrodynamischen Durchmesser umgerechnet.

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} = \frac{1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} \cdot 298 \text{ K}}{3\pi \cdot 8.95 \cdot 10^{-4} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}} \cdot 1.48226 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 3.29 \cdot 10^{-9} \text{ m} = 3.29 \text{ nm}$$

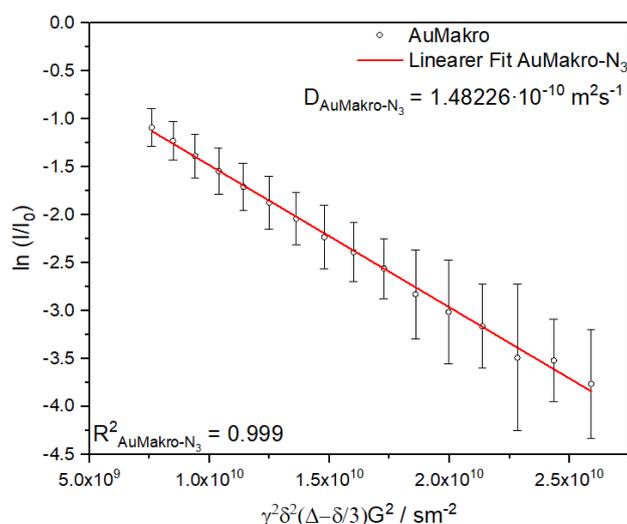


Abbildung 92: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuMakro-N₃ (gemessen von *Dr. C. Beuck*). Der Betrag der Steigung entspricht nach Gleichung 10 dem translationalen Diffusionskoeffizienten der Nanopartikel.

Mit einem hydrodynamischen Durchmesser von rund 3.29 nm sind die AuMakro-N₃ Nanopartikel in etwa genauso groß wie AuGSH (3.32 nm) und AuN₃ (3.36 nm). Zu erwarten wäre ein höherer Wert, da der makromolekulare Ligand deutlich größer ist als Glutathion. Allerdings ist Makro-N₃ auch nicht so dicht gepackt auf der Oberfläche der Nanopartikel. Wird nun noch die Krümmung der Nanopartikeloberfläche berücksichtigt, so ist es denkbar, dass Makro-N₃ im Bereich der Anbindung an Gold durch das Cystein zunächst gestreckt, dann aber bei größerem Abstand zur Oberfläche eher in einer Knäuel-artigen, entropisch günstigeren Konformation vorliegt.

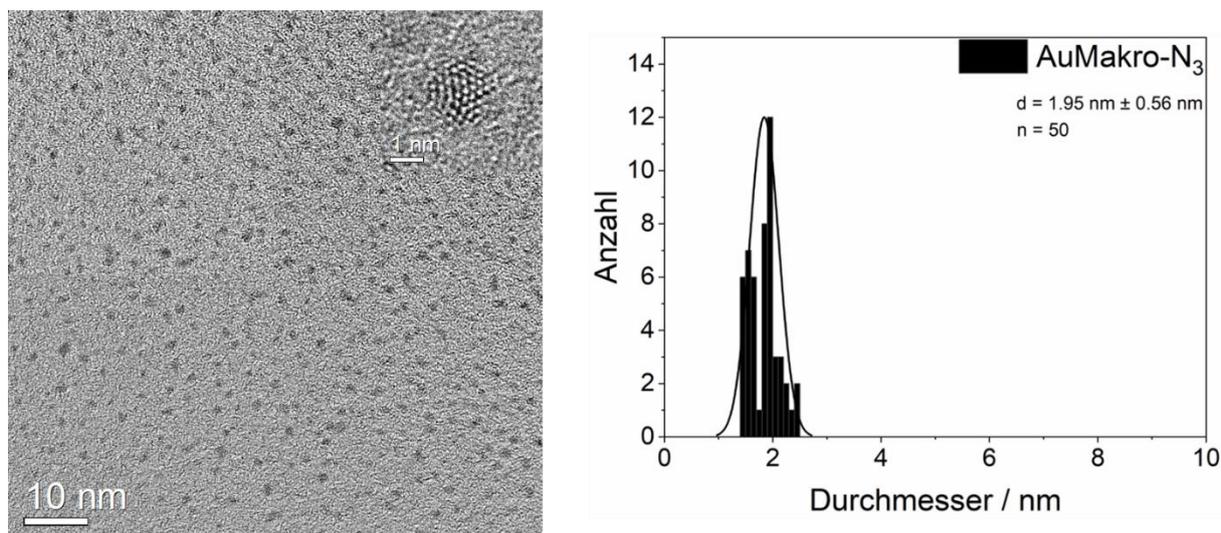


Abbildung 93: HRTEM-Aufnahme der mit Makro-N₃ funktionalisierten ultrakleinen Nanopartikel, erstellt von *Dr. K. Loza* im Forschungszentrum Jülich. Es wurden 50 Partikel ausgemessen. Der Maßstab beträgt 10 nm im großen Bild und 1 nm im kleinen Inset.

In der HRTEM-Aufnahme (Abbildung 93) der AuMakro-N₃ ist deutlich zu erkennen, dass Partikel im ultrakleinen Größenbereich synthetisiert worden sind. Die Partikel weisen eine kugelförmige Morphologie auf und haben einen mittleren Kerndurchmesser von $d = 1.95 \text{ nm} \pm 0.56 \text{ nm}$. In Kombination mit den Ergebnissen der DCS, UV-Vis-Spektroskopie und DOSY kann demnach bestätigt werden, dass bei der Synthese mit nur 1.2 Äquivalenten Ligand ultrakleine Nanopartikel hergestellt werden konnten, die für weitere Analysen wie z. B. NMR-Spektroskopie verwendet werden können.

Die fertigen Partikelsysteme wurden zudem noch durch IR-Spektroskopie (Abbildung 94) untersucht. Durch den Überschuss an NaBH₄ während der Synthese wäre es möglich, dass die vorhandenen Azidogruppen des Liganden in einer Staudinger-Reduktion zu Aminen reduziert werden.^[23,24] Die Azid-Streckschwingung

ist ähnlich zu den AuN₃-Nanopartikeln (vgl. Kapitel 5.3) deutlich bei einer Wellenzahl von $\tilde{\nu} = 2102 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Eine quantitative Analyse ist nicht möglich, jedoch bestätigt das IR-Spektrum, dass die Liganden auch nach Zugabe von NaBH₄ weiterhin Azidogruppen tragen, die später funktionalisiert werden können. Zusätzlich zu der Streckschwingung der Azidogruppe sind auch die beiden Amidbanden der C-O-Valenzschwingung bei $\tilde{\nu} = 1610 \text{ cm}^{-1}$ und der N-H-Deformationsschwingung bei $\tilde{\nu} = 1648 \text{ cm}^{-1}$ vollständig erhalten.^[112] Makro-N₃ wurde also erfolgreich an die Oberfläche der Nanopartikel geknüpft.

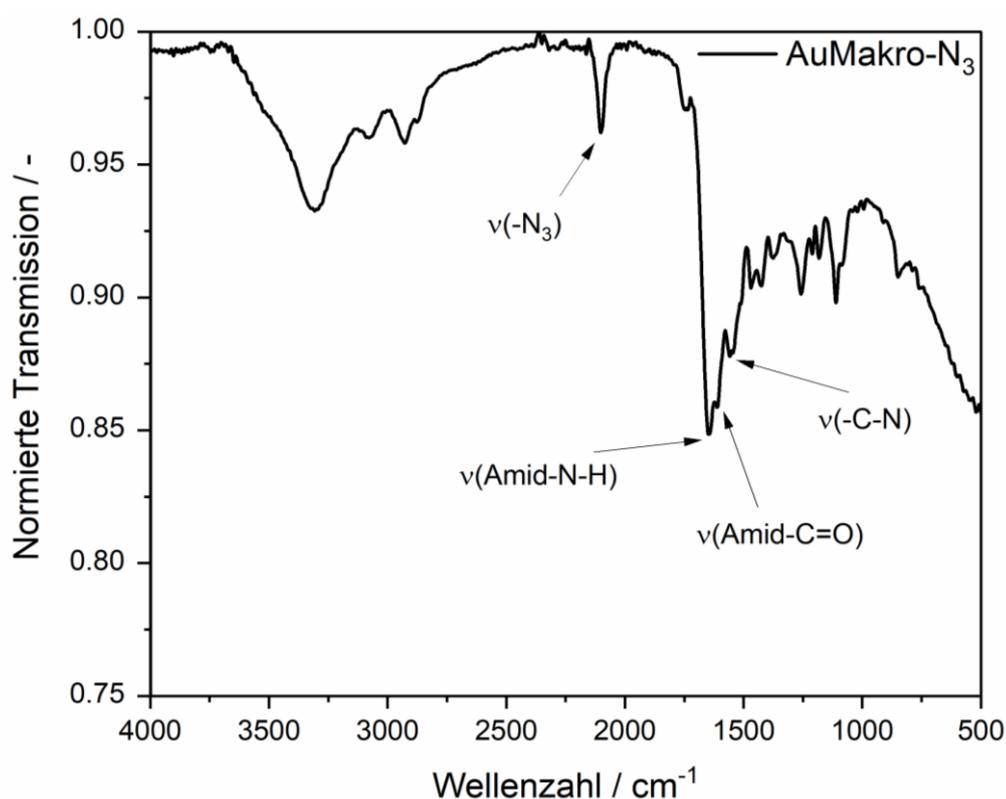


Abbildung 94: IR-Spektrum von AuMakro-N₃-Nanopartikeln.

Das ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 95) der funktionalisierten Partikel zeigt stark verbreiterte Signale sowie etwas übriges Methanol (3.34 ppm) aus der Synthese. Die Protonen der 2-Position fallen unter die Wasserunterdrückung und sind somit nicht zu erkennen. Die Protonen an den Positionen 8 und 11 sind aufgrund stark elektronenziehender Nachbargruppen am weitesten tieffeldverschoben bei etwa 8 ppm zu finden. Darauf folgt ein kleines verbreitertes Signal für das einzelne Proton an der 12-Position. Die Protonen der 9-Position, sowie das an Position 13 zeigen sich durch ein großes, verbreitertes Signal bei rund 7.36 ppm, dicht gefolgt von den beiden Protonen der 14-Position bei rund 7.15 ppm. Die beiden *ortho*-Protonen zu den

Hydroxygruppen des Farbstoffes sind durch den +M-Effekt des benachbarten Sauerstoffs von allen aromatischen Protonen bei 6.66 ppm am weitesten hochfeldverschoben. Die Signale der Protonen 5, 6 und 7, die den Großteil des Moleküls ausmachen, sind bei 3.86 ppm - 3.06 ppm zu finden und lassen sich durch die Verbreiterung der Signale nicht genau voneinander unterscheiden. Protonen 1 und 4 beziehen ebenfalls, wie 15 und 16, +M-Effekte durch die benachbarten Stickstoffe der Amide, sowie durch den Schwefel direkt an der Goldoberfläche. Zum Schluss sind noch die CH₂-Brücken der BADS-Bausteine zu Cystein bzw. EDS und zu den Azidogruppen bei rund 2.5 ppm als verbreitertes Signal zu finden.

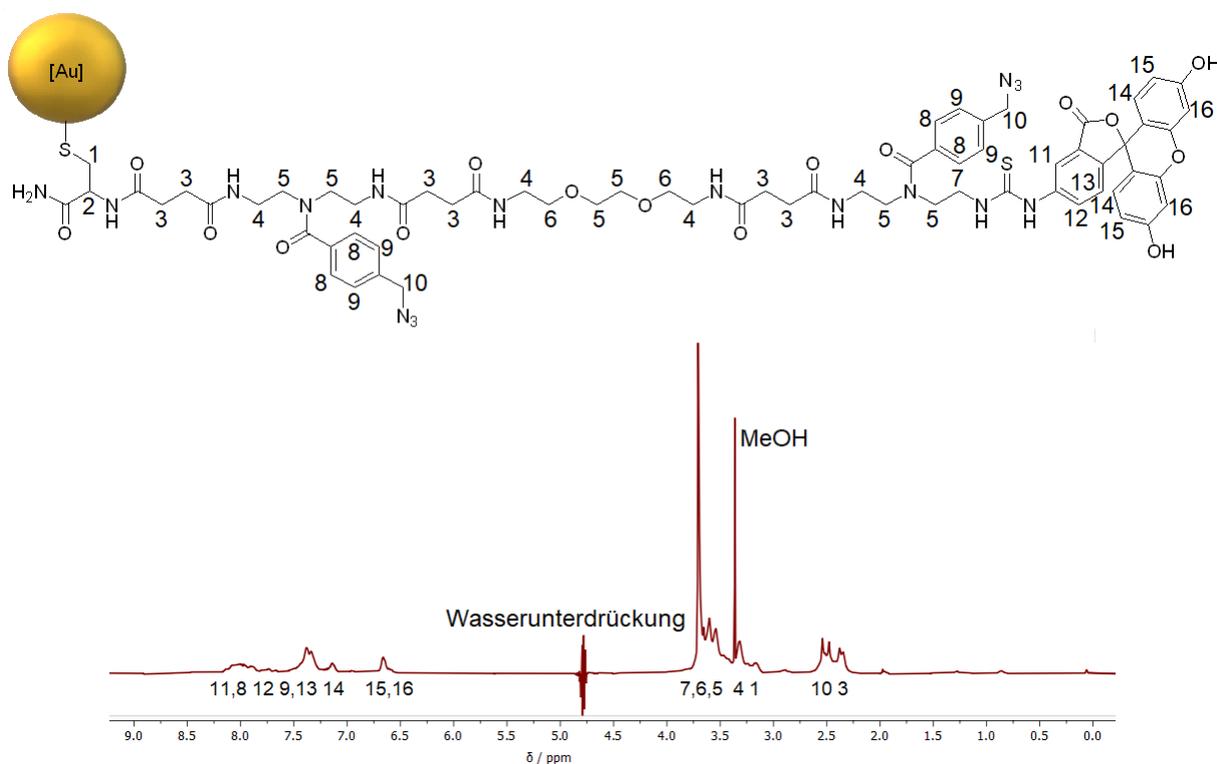


Abbildung 95: ¹H-NMR-Spektrum von AuMakro-N₃ (400 MHz, 10% D₂O in H₂O, pH 10). Ein vergrößertes Spektrum ist zudem im Anhang zu finden.

5.8.2. CuAAC von AuMakro-N₃ mit molekularen Pinzetten (AuMakro-Tweezer)

Im Folgenden sollen die bereits in Kapitel 5.7 beschriebenen molekularen Pinzetten an die hergestellten AuMakro-N₃ Nanopartikel angebracht werden. Dazu wurden die Nanopartikel zunächst in Wasser vorgelegt und um 0.4 Äquivalente der Pinzetten bezogen auf die 150 Azidogruppen sowie Kupfersulfat-Lösung und Natriumascorbat ergänzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Nanopartikel über Spinfiltration aufgereinigt und mit verschiedenen Methoden untersucht.

Die DCS (Abbildung 96) zeigt, dass die Nanopartikel auch nach der CuAAC mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa $d_H = 1.88 \text{ nm}$ weiterhin im ultrakleinen Bereich sind. Ein Vergleich mit den Vorläuferpartikeln zeigt zudem, dass die Größe sich nahezu nicht verändert hat. Der Zuwachs an hydrodynamischem Durchmesser wird durch die verlängerte Sedimentationszeit aufgrund einer Vergrößerung der Ligandenhülle ausgeglichen, sodass auch hier wieder andere Methoden zur Analyse des Partikeldurchmesser herangezogen werden müssen.

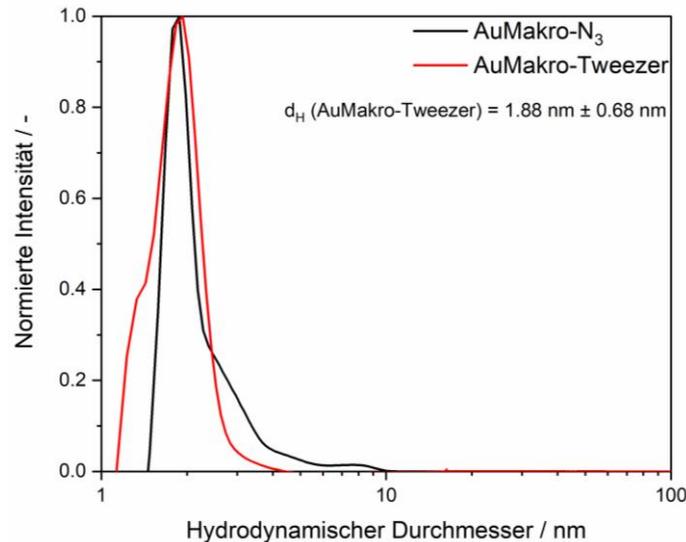


Abbildung 96: Normierte Anzahlverteilung der DCS von ultrakleinen, umfunktionalisierten AuMakro-Tweezer Partikeln (rot) im Vergleich zu den Vorläuferpartikeln AuMakro-N₃ (schwarz).

DOSY-Messungen für AuMakro-Tweezer ergaben einen Diffusionskoeffizienten von $D = 1.58 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Eingesetzt in die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 9) lässt sich ein hydrodynamischer Durchmesser für AuMakro-Tweezer von rund $d_H = 3.09 \text{ nm}$ errechnen. Damit wären die Nanopartikel nach Umfunktionalisierung rund 0.2 nm kleiner als die Vorgängerpartikel AuMakro-N₃ ($d_H = 3.29 \text{ nm}$), was jedoch als nicht signifikanter Unterschied zu werten ist.

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} = \frac{1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}} \cdot 298 \text{ K}}{3\pi \cdot 8.95 \cdot 10^{-4} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}} \cdot 1.57625 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}} = 3.09 \cdot 10^{-9} \text{ m} = 3.09 \text{ nm}$$

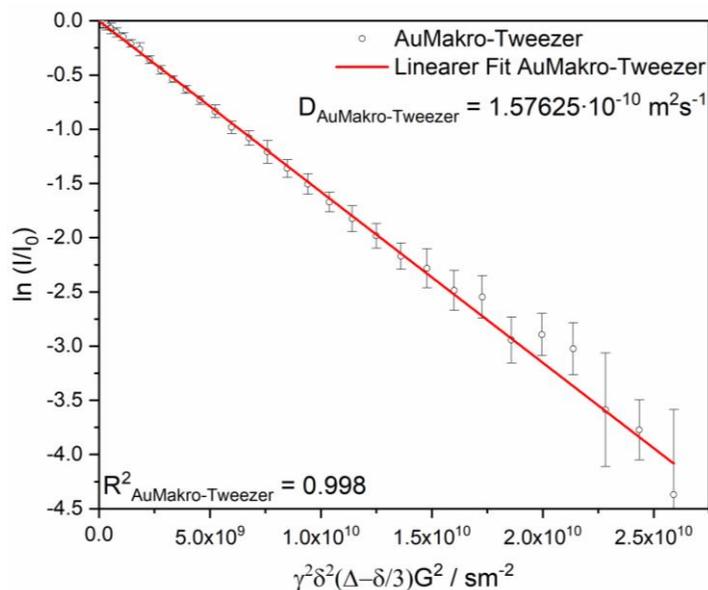


Abbildung 97: Stejskal-Tanner-Plot der DOSY-Experimente von AuMakro-Tweezer (gemessen von *Dr. C. Beuck*). Der Betrag der Steigung entspricht nach Gleichung 10 dem translationalen Diffusionskoeffizienten der Nanopartikel.

Die Bilder der HRTEM (Abbildung 98) bestätigen die durch DCS und DOSY bestimmte ultrakleine Größe der Nanopartikel nach Umfunktionalisierung. Es wurde nur eine sehr verdünnte Suspension der Nanopartikel gemessen, weshalb nur 13 Partikel auf dem Bild zu erkennen sind. Allerdings ist deutlich sichtbar, dass die gezeigten Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von $d = 1.67 \text{ nm} \pm 0.74 \text{ nm}$ im ultrakleinen Größenbereich liegen. Die Größe der ausgemessenen Nanopartikel weist durch die geringe Menge eine relativ hohe Standardabweichung von ca. $\pm 50\%$ auf. Jedoch zählt selbst der größte der gefundenen Partikel mit einem Durchmesser von rund 2.5 nm noch in den ultrakleinen Größenbereich (vgl. Kapitel 2.3).

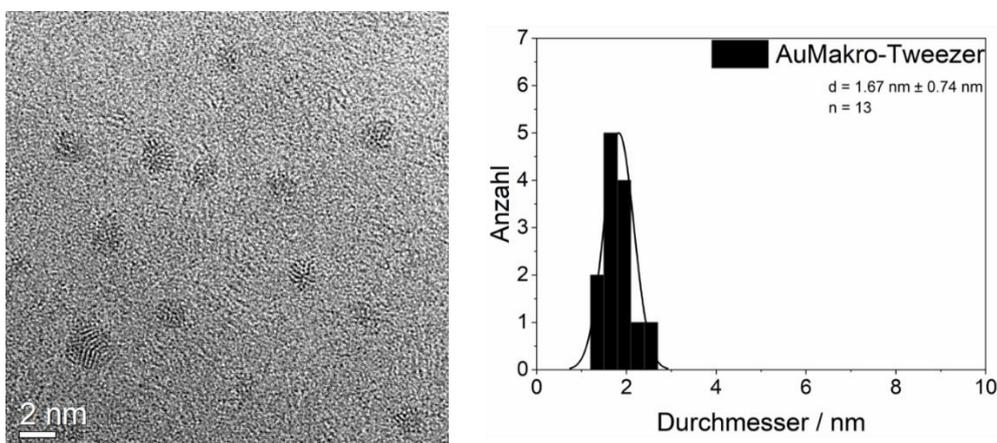


Abbildung 98: HRTEM-Aufnahme der ultrakleinen AuMakro-Tweezer Nanopartikel, erstellt von *Dr. K. Loza* im Forschungszentrum Jülich. Es wurden 13 Partikel ausgemessen. Der Maßstab beträgt 2 nm.

Ein UV-Vis-Spektrum (Abbildung 99) der Nanopartikel wurde aufgenommen, um die Anzahl der gebundenen Pinzetten auf der Oberfläche der Nanopartikel zu ermitteln. Die Pinzetten absorbieren bei etwa 222 nm (vgl. Kapitel 5.7.1). Bei den AuMakro-Tweezer Nanopartikeln ist an dieser Stelle auch eine leichte Schulter in der Absorption des Nanopartikelhintergrunds zu erkennen. Eine Quantifizierung ist dabei jedoch schwierig, da die Bande sowohl von den Nanopartikeln selbst als auch von der Phenylgruppe des Liganden (~ 280 nm) überdeckt wird. Die Pinzetten selbst weisen in diesem Bereich zudem keine Absorption auf, die bis auf die Grundlinie des Spektrums zurückgeht (siehe Anhang), sodass eine Quantifizierung über einfache Integration mit gerader Grundlinie hier nicht funktioniert.

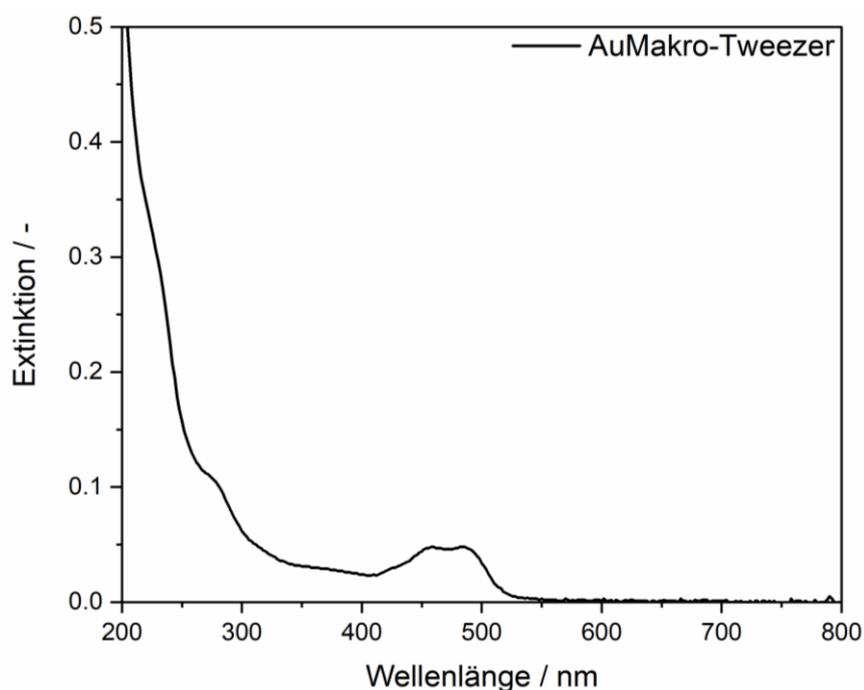


Abbildung 99: UV-Vis-Spektrum der AuMakro-Tweezer Nanopartikel.

Eine potenzielle Möglichkeit der Quantifizierung der gebundenen Pinzetten ist durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 100) gegeben. Allerdings liegen die Signale der einzelnen Protonen hier so dicht beieinander, dass genaue Integrale nicht berechnet werden können. Die Signale der aromatischen H-21 Protonen der molekularen Pinzetten überlagern mit denen der Phenylringe und des Farbstoffs (7.5 ppm - 7.0 ppm). Die Protonen an der 19-Position überlagern mit denen des Gerüsts des Makromoleküls (3.7 ppm – 3.0 ppm) und die Protonen der CH_2 -Brücke der Norbonyl-Einheiten überlagern mit den Protonen der 3- und 10-Position des

Makromoleküls. Ähnlich wie bei AuTweezer (vgl. Kapitel 5.7.1) gibt es hier also einige Probleme bei der Quantifizierung der gebundenen Pinzetten.

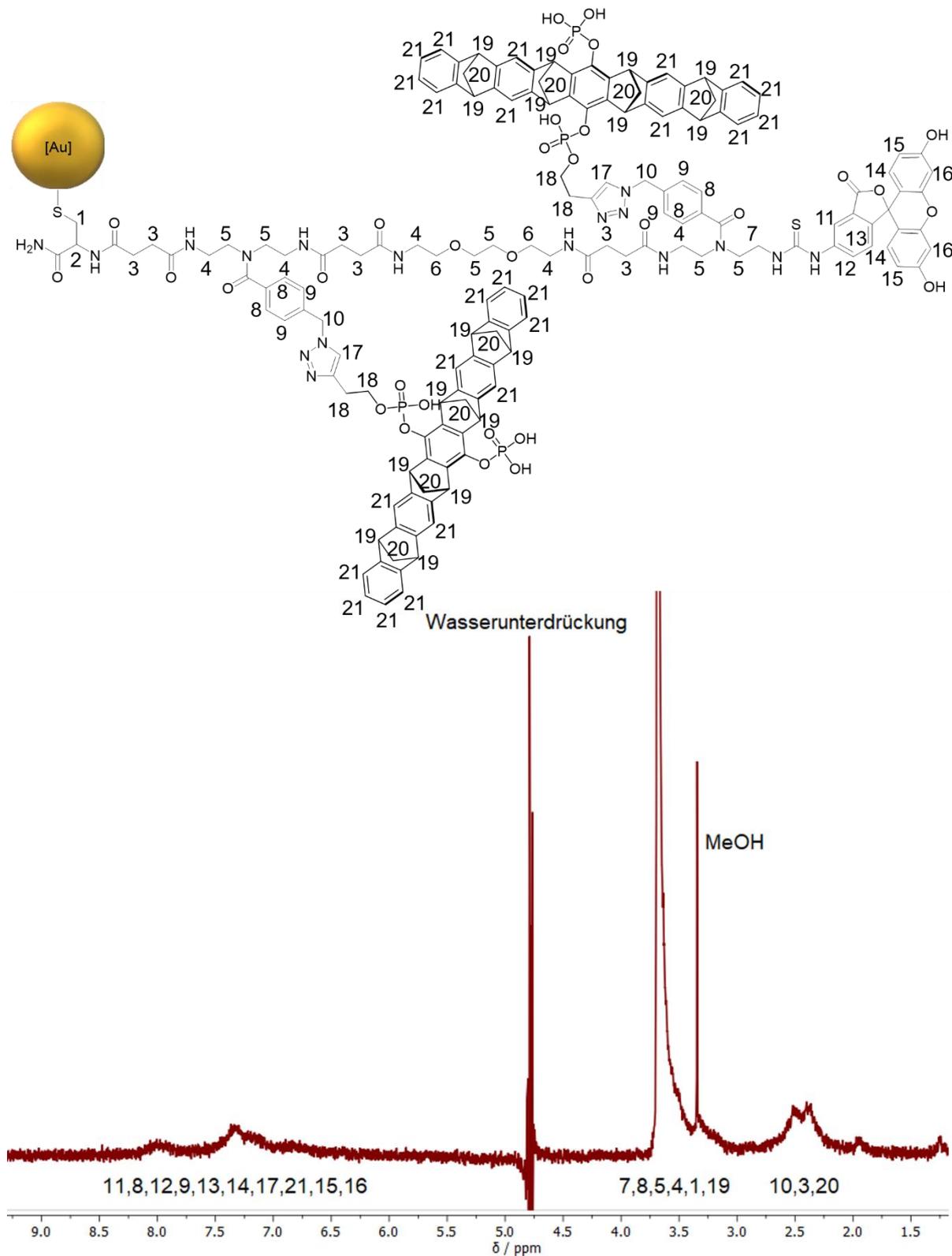


Abbildung 100: ¹H-NMR-Spektrum von AuMakro-Tweezer (400 MHz, 10% D₂O in H₂O, pH 10).

Wegen der Probleme bei der Quantifizierung der auf der Oberfläche der Partikel gebundenen molekularen Pinzetten, wurden die geklickten Nanopartikel ebenfalls extern im mikroanalytischen Labor Kolbe (Fraunhofer Institut Umsicht, Oberhausen) mit einer ICP-MS gemessen (vgl. Kapitel 5.7.1). Aus den erhaltenen Massenanteilen der Elemente Schwefel, Phosphor und Gold können nun die molaren Konzentrationen von Schwefel (c_S), Phosphor (c_P) und Gold (c_{Au}) in der Gesamtprobe berechnet werden.

$$c_S = \frac{c_S(m, ICP)}{M_S} = \frac{19 \text{ ppm}}{32.066 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{0.019 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{32.066 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 0.59 \mu\text{M}$$

$$c_P = \frac{c_P(m, ICP)}{M_P} = \frac{37 \text{ ppm}}{30.974 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{0,037 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{30974 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 1.19 \mu\text{M}$$

$$c_{Au} = \frac{c_{Au}(m, ICP)}{M_{Au}} = \frac{2803 \text{ ppm}}{196.967 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{2.803 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{196967 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 14.23 \mu\text{M}$$

Die Goldkonzentration wird nach Gleichung 2 in die Konzentration der Nanopartikel umgerechnet und ergibt $c_{NP} = 57.61 \text{ nM}$. Auf diesen Wert normiert, können über die Konzentration des Schwefels die auf der Oberfläche des Partikels immobilisierten, makromolekularen Liganden quantifiziert werden. Ein Makromolekül enthält insgesamt zwei Schwefelatome (Cystein und Isothiocyanat-Linker zum Farbstoff), weshalb hier noch ein Umrechnungsfaktor von 0.5 berücksichtigt werden muss. Demnach enthält ein Nanopartikel etwa 5.12 makromolekulare Liganden, was weit unter dem durch UV-Vis-Spektroskopie bestimmten Wert von 75 Liganden pro Nanopartikel liegt. Allerdings wird bei einer Standard ICP-MS ein Plasma verwendet, welches nicht in der Lage ist, alle Schwefelatome mit einer Ionisierungsenergie von 10.36 eV zu ionisieren. Das Standard-Plasma reicht meist lediglich dazu aus, etwa 10% des in der Probe enthaltenen Schwefels zu ionisieren, sodass es vom Detektor des Massenspektrum erkannt werden kann (vgl. Kapitel 3.8).^[180,181,182,183] Unter Berücksichtigung dessen deckt sich der durch ICP-MS erhaltene Wert für die Anzahl der Makromoleküle also im Rahmen der Messgenauigkeit ungefähr mit den 75 Liganden, die durch UV-Vis-Spektroskopie bestimmt werden konnten. Der erhaltene Wert für die Konzentration von Phosphor in der Probe ergibt bei Normierung eine Menge an Phosphor von 20.6 Atomen pro Nanopartikel. Da eine molekulare Pinzette allerdings zwei

Phosphorsäuregruppen trägt, muss auch dieser Wert mit einem Umrechnungsfaktor von 0.5 korrigiert werden, sodass etwa zehn Pinzetten pro Nanopartikel errechnet werden können. Bei 0.4 eingesetzten Äquivalenten zu 150 ansteuerbaren Azidogruppen im Molekül ergibt sich demnach eine Klickeffizienz von rund 17%. Im Durchschnitt trägt also jedes Makromolekül etwa 0.13 CLR01-Liganden.

Nach vollständiger Synthese und Charakterisierung sollten die AuMakro-Tweezer Nanopartikel an dem für die Apoptose von Krebszellen relevanten Protein Survivin getestet werden

5.8.3. Survivin

Survivin ist mit einer Masse von ca. 16.5 kDa, bestehend aus 142 Aminosäuren, das kleinste Mitglied in der Familie der Apoptose-hemmenden Proteine. Ähnlich wie bei Taspase1 (vgl. Kapitel 5.6.2) übernimmt es eine wichtige Rolle im embryonalen Wachstum beim Menschen und wird später bei gesunden Erwachsenen nur noch in sehr geringen Mengen exprimiert. Bei einigen Krebserkrankungen kommt es jedoch zu einer erneuten Ausbildung von Survivin in den kranken Zellen.^[203,204]

Das üblicherweise im Zellkern vorzufindende Protein Survivin kann durch Interaktionen mit Crm1 (engl.: *chromosomal maintenance 1*), welches auch als Exportin1 bekannt ist, den Zellkern verlassen und so in das Zytoplasma der Zellen gelangen (Abbildung 101). Dabei bindet Crm1 an das Kernexportsignal (engl.: *nuclear export signal*, NES) des Proteins. Das NES ist durch eine Sequenz aus Valin (V), Lysin (K), Glutamin (Q), Phenylalanin (F), Glutaminsäure (E), Leucin (L) und Threonin (T) zwischen den Positionen 89 und 98 (⁸⁹VKKQFEELTL⁹⁸) definiert. Im Zytoplasma kann Survivin durch Interaktionen mit den Mitochondrien in der Zelle die Apoptose, also den gesteuerten Zelltod, hinauszögern. Ein wichtiger pharmakologischer Ansatz für die Bekämpfung von Krebszellen durch eine Aufhebung dieser antiapoptischen Wirkung besteht darin, die Interaktion von Survivin und Crm1 so zu stören, dass ein Export aus dem Zellkern nicht mehr möglich ist.^[205]

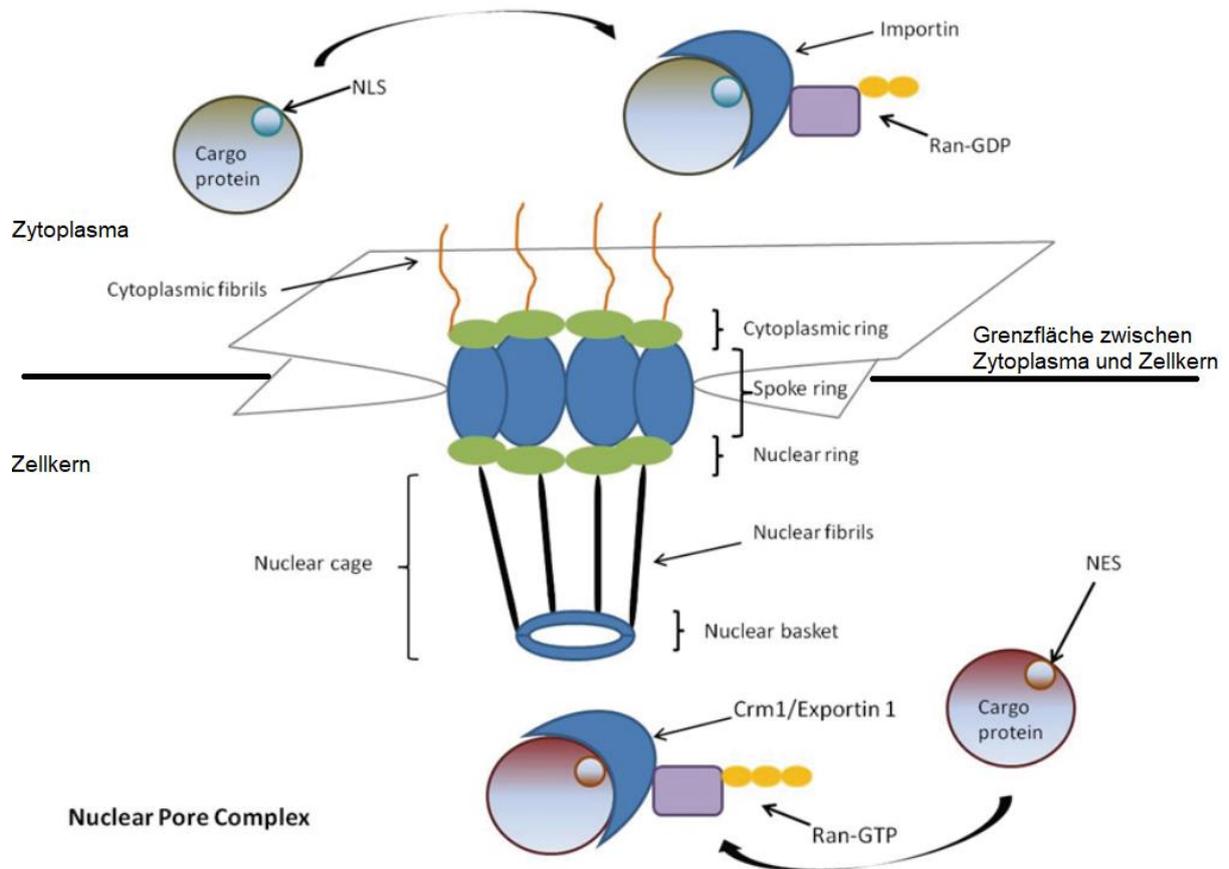


Abbildung 101: Prozess für den Eintritt von Proteinen in den Zellkern durch verschiedene Importine (vgl. Kapitel 5.7.2) und den Austritt aus dem Zellkern in das Zytoplasma (adaptiert aus Literatur^[205]).

Survivin weist ähnlich zu Taspase1 einige basische Aminosäuren in der Nähe des NES und im NES selbst auf. Die beiden Lysine an den Stellen 91 und 103 im Protein könnten demnach durch die molekularen Pinzetten (vgl. Kapitel 5.7) angesteuert werden, sodass durch die hohe Sterik von funktionalisierten Nanopartikeln die Interaktion zu Crm1 und somit der Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma inhibiert wird.^[206] Das NES von natürlich vorkommendem Survivin ist in der Regel nur schwer zu erreichen. Survivin liegt normalerweise als Dimer vor, bei dem die NES-Regionen zweier Monomere über die Aminosäuresequenz ⁹⁵ELTL⁹⁸ aneinander binden.^[207] Demnach ist den molekularen Pinzetten in direkter Nähe zum NES nicht mehr viel Möglichkeit geboten, an das Protein zu binden. *Meiners et al.* versuchten, mit Pinzetten, die an einem Phosphorsäurerest mit einer Aminosäuresequenz, die spezifisch an die direkt zu Lys⁹⁰ und Lys⁹¹ benachbarten Sequenzen bindet, eine Anbindung an Survivin zu erzielen. Dabei war das Ziel, eine möglichst geringe

Dissoziationskonstante K_D zu erreichen und auf diese Weise eine stärkere Anbindung an das Protein zu gewährleisten.^[207]

5.8.4. Biologische Anwendung von AuMakro-Tweezer

Ein vielversprechender Ansatz für die Adressierung der freien Lysine um die Dimerisation der NES herum besteht in der Anwendung sequenzdefinierter, makromolekularer Liganden. Da der Abstand zwischen den Lysinen genau definiert ist bieten sich diese Liganden durch die genau bestimmbaren Positionen der molekularen Pinzetten besonders an. Allerdings haben Makromoleküle häufig das Problem, dass Prozesse der Endozytose nur sehr gehemmt ablaufen.^[208] An Nanopartikeln können jedoch selbst hydrophobe Liganden in wässriger Lösung in Zellen eingeschleust werden (vgl. Kapitel 5.4 und 5.5), weshalb die makromolekularen Liganden über die Cystein-Einheit als Liganden verwendet wurden.

Um die Zellgängigkeit der AuMakro- und AuMakro-Tweezer-Nanopartikel zu überprüfen wurden von *Dr. S. Kollenda* Zellaufnahmestudien durchgeführt (Abbildung 102). Die Nanopartikel zeigten eine diffuse Verteilung im gesamten Zytoplasma der Zelle mit einer erhöhten Konzentration in den Lysosomen. Es konnte kein Unterschied zwischen mit CLR01 funktionalisierten AuMakro-Tweezer-Partikeln und den Vorgängerpartikeln (AuMakro-N₃) ermittelt werden. Beide Partikelsorten scheinen in der Lage zu sein, das Makromolekül auch mit angeklickten Pinzetten durch die Zellmembran in das Zytoplasma zu transportieren. Ungebundenes Makromolekül hingegen konnte nicht in die Zellen eindringen, stattdessen ist lediglich ein breiter Spot zu erkennen, der vermutlich aus der schlechten Wasserlöslichkeit und daraus resultierender Präzipitation des Moleküls folgt.

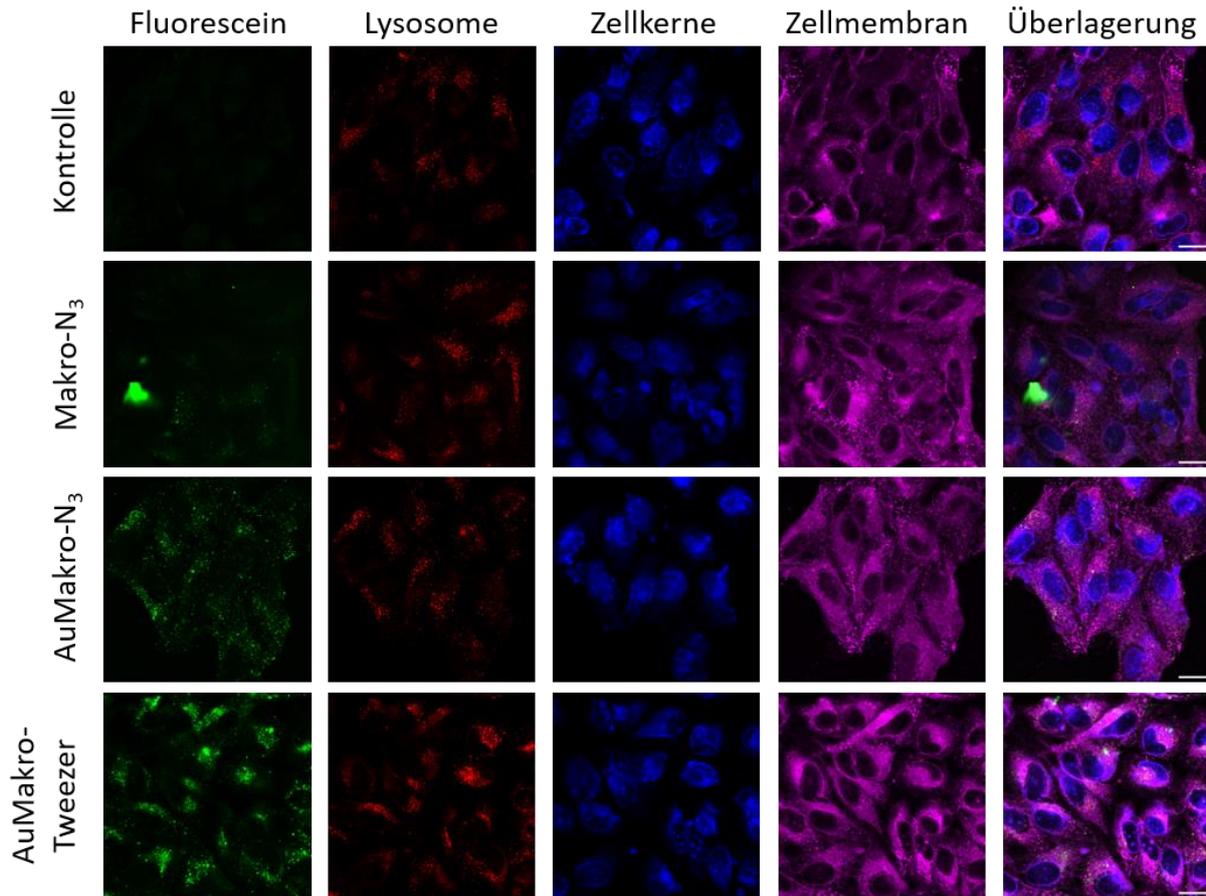


Abbildung 102: CLSM-Bilder von AuMakro-N₃, AuMakro-Tweezer und ungebundenen Makro-N₃ als Kontrolle mit HeLa-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h (aufgenommen von *Dr. S. Kollenda*). Der Maßstab beträgt 20 µm. Die Lysosome wurden mit *LysoTracker Red*, die Zellkerne mit Hoechst und die Zellmembranen mit *CellMask Deep Red* eingefärbt.

Als nächstes wurden die Nanopartikel an *T. Seiler* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. L. Hartmann* übergeben, um verschiedene Bindungsstudien mit Survivin durchzuführen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten eine Reihe ultrakleiner Goldnanopartikel hergestellt werden. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Charakterisierungsdaten ist in Tabelle 4 zu finden. Glutathion-terminierte Goldnanopartikel (AuGSH) konnten dabei durch eine einfache Synthese in großem Maßstab (~50 mg) synthetisiert werden und dienten als Grundlage für ein neu etabliertes System zur kovalenten Oberflächenfunktionalisierung.

Tabelle 4: Zusammenfassung der wichtigsten Daten für die hergestellten Nanopartikelsysteme.

Partikel	Hydrodynamischer Durchmesser (DCS) / nm	Kerndurchmesser (HRTEM) / nm	Ausbeute basierend auf Au / %	Anzahl pro NP / -	Molekularer Fußabdruck pro Ligand / nm ²	Reaktionseffizienz / %
AuGSH	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.9	71	125	0.10	-
AuN ₃	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.4	86	118	0.11	94 (Azidierung)
AuFAM	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.5	84	6	2.10	13 (CuAAC)
AuAF647	1.4 ± 0.2	2.5 ± 1.1	81	12	1.05	25 (CuAAC)
AuAIE-1	1.7 ± 0.4	-	87	71	0.18	75 (CuAAC)
AuAIE-2	1.4 ± 0.2	-	82	85	0.15	90 (CuAAC)
AuAIE-3	3.2 ± 1.0	-	89	50	0.25	53 (CuAAC)
AuH1	1.4 ± 0.3	-	76	28	0.45	59 (CuAAC)
AuH2	1.6 ± 0.4	-	83	4	3.13	8 (CuAAC)
AuTweezer	1.5 ± 0.8	-	82	16	0.78	34 (CuAAC)
AuMakro-N ₃	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.6	73	75	0.17	-
AuMakro-Tweezer	1.9 ± 0.7	1.7 ± 0.7	93	10	1.25	17 (CuAAC)

Nach Fertigstellung und Charakterisierung der AuGSH Nanopartikel als Grundlage, wurden diese über einen Diazotransfer an der frei liegenden Aminogruppe umfunktionalisiert, um mit der resultierenden Azidogruppe ein breites Spektrum von kupferkatalysierten Azid-Alkin Cycloadditionsreaktion (CuAAC) zu öffnen. Dass die CuAAC an der Oberfläche von ultrakleinen Nanopartikeln funktioniert, konnte bereits in vorherigen Arbeiten nachgewiesen werden, jedoch bietet dieser neue Reaktionsweg einen deutlich kostengünstigeren und chemisch genau definierten Ansatz der Oberflächenfunktionalisierung.

Nach dem Diazotransfer auf AuGSH-Nanopartikel konnte mittels IR-Spektroskopie eindeutig die neu entstandene Bande für die N₃-Streckschwingung charakterisiert

werden. Außerdem war im ^1H -NMR-Spektrum die diastereomere Aufspaltung der zur Azidogruppe benachbarten Protonen zu erkennen. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte zudem eine deutliche Tieffeldverschiebung für das stereomere Kohlenstoffatom in direkter Nachbarschaft zur Azidogruppe. Über ein zweidimensionales ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum konnte ein Umsatz von NH_2 zu N_3 von rund 95% ermittelt werden, womit ein Nanopartikel nach Umfunktionalisierung etwa 118 Azidogruppen auf seiner Oberfläche trägt.

Die azidierten Nanopartikel AuN_3 konnten mit verschiedenen Farbstoffen geklickt werden und waren dann im Gegensatz zu den freien Farbstoffmolekülen in der Lage, durch die Membranen von HeLa, CT-26 und MODE-K Zellen zu dringen. Außerdem konnten sie durch ihre ultrakleine Größe auch durch die dünnen Proteinkanäle in den Zellwänden von E. coli Bakterien in das Innere der Zellen eindringen. Dabei liegen diesem Prozess wahrscheinlich eine Kombination aus aktiven Aufnahmemechanismen der Zellen und passiver Diffusion zu Grunde. 3D-Modelle des menschlichen Darms konnten durch die anliegende Schleimschicht die Nanopartikel in einem Maße aufnehmen, wie es für Färbemittel der biologischen Bilddarstellung nicht möglich war. Dabei sind die Nanopartikel durch die dicht gepackte Oberfläche der Zellen gedrungen und auch dahinter durch unterschiedliche Prozesse von Zelle zu Zelle gewandert.

CuAAC mit wasserunlöslichen AIE-Farbstoffen zeigte zudem, dass die Nanopartikel mit der sehr gut wasserlöslichen GSH-Matrix nach hochgradiger Funktionalisierung mit hydrophoben Liganden trotzdem sehr gut in Wasser dispergierbar waren. Sie waren dazu in der Lage, diese Liganden trotz der schlechten Wasserlöslichkeit durch Zellmembranen zu transportieren.

Chlorohexyl-tragende Liganden konnten über organisch-chemische Methoden erfolgreich synthetisiert und analysiert werden. Sie konnten zudem ähnlich wie die AIE-Farbstoffe trotz sehr schlechter Wasserlöslichkeit auf die Oberfläche der AuN_3 -Nanopartikel geklickt werden. Versuche mit dem Modellprotein HT2 zeigten, dass die Nanopartikel erfolgreich dabei waren, die für den Chlorohexyl-Rest vorgesehenen Bindungstaschen des Proteins zu binden, allerdings konnten keine Oligomere mit metallischem Zentrum durch Größenausschlusschromatographie ermittelt werden. Potenziell waren die verwendeten Linker nicht lang genug, sodass nicht so viele Proteine gleichzeitig wirklich kovalent auf der Oberfläche der Nanopartikel

immobilisiert werden konnten. Daher wurde ein zweiter, längerer Linker für den Chlorohexyl-Rest synthetisiert, der erfolgreich an die Oberfläche der Nanopartikel in geringerer Zahl angeklickt werden konnte. Dadurch sollte den Proteinen insgesamt deutlich mehr Platz zur Verfügung stehen, sodass sie irreversibel an die Nanopartikel binden.

Die Nanopartikel wurden ebenfalls mit den bereits etablierten molekularen Pinzetten funktionalisiert. Dabei sollten sie durch Anbindung an basische Aminosäuren in der Nähe der Anbindungsstelle von Importin α an Taspase1 binden. Durch diese Anbindung sollte die Importin α -Taspase1-Interaktion so gestört werden, dass Taspase1 nicht mehr in den Zellkern gelangt, wo es dann von der *cis*- in die *trans*-Form umgewandelt wird und katalytisch aktiv andere Proteine spalten kann. Da Taspase1 die Spaltung krebisrelevanter Proteine und somit die Entstehung von Krebs katalysieren kann, bietet die Störung dieser Interaktion einen vielversprechenden Ansatz in der Krebsforschung, insbesondere für Leukämie. Über einen *Pull-Down* Assay sowie anschließender SDS-PAGE konnte damit ein IC_{50} von ca. 10 μ M für das AuTweezer Partikelsystem bestimmt werden. Somit bieten die Nanopartikel eine bis zu dreimal höhere inhibitorische Aktivität als zuvor verwendete GCP-Liganden. Zusätzlich zur Störung der Importin α -Taspase1-Interaktion hatten die Nanopartikel noch den Effekt, dass sie die katalytische Aktivität von Taspase1 generell stark reduzierten. Dabei lag der IC_{50} der Nanopartikel bei 200 nM eingesetzter Taspase1 bei nur 100 nM.

Zuletzt wurden noch ultrakleine Goldnanopartikel mit einem makromolekularen Liganden synthetisiert, der über zwei Azidgruppen später noch in einer CuAAC mit den molekularen Pinzetten geklickt wurde. Über UV-Vis-Spektroskopie konnten 75 Liganden auf der Oberfläche der Nanopartikel berechnet werden, die 150 Azidgruppen entsprechen würden. Nach Funktionalisierung mit den Pinzetten erwies es sich als schwierig, die genaue Anzahl der Pinzetten auf der Oberfläche der Nanopartikel zu bestimmen. Daher wurden die Proben mittels ICP-MS vermessen, wobei etwa zehn Pinzetten pro Nanopartikel bestimmt werden konnten. Trotz der sehr großen Liganden waren die Nanopartikel weiterhin in der Lage, die Zellmembranen zu durchdringen, was ein vielversprechender erster Schritt im Hinblick auf die Inhibition der Survivin-Crm1-Interaktion ist.

7. Conclusion

During the course of this work, various nanoparticle systems were successfully synthesized. A summary of the most important data can be found in Table 4. Glutathione-bearing nanoparticles (AuGSH) could be synthesized on a high scale (~50 mg) according to a new synthetic pathway and were then used to establish a new convenient system for covalent surface functionalization.

Table 4: Summary of the most important data for all synthesized nanoparticle systems.

Particle	Hydrodynamic Diameter (DCS) / nm	Core Diameter (HRTEM) / nm	Yield based on Au / %	Number per NP / -	Molecular Footprint of the Ligand / nm ²	Reaction Efficiency / %
AuGSH	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.9	71	125	0.10	-
AuN₃	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.4	86	118	0.11	94 (Azidation)
AuFAM	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.5	84	6	2.10	13 (CuAAC)
AuAF647	1.4 ± 0.2	2.5 ± 1.1	81	12	1.05	25 (CuAAC)
AuAIE-1	1.7 ± 0.4	-	87	71	0.18	75 (CuAAC)
AuAIE-2	1.4 ± 0.2	-	82	85	0.15	90 (CuAAC)
AuAIE-3	3.2 ± 1.0	-	89	50	0.25	53 (CuAAC)
AuH1	1.4 ± 0.3	-	76	28	0.45	59 (CuAAC)
AuH2	1.6 ± 0.4	-	83	4	3.13	8 (CuAAC)
AuTweezer	1.5 ± 0.8	-	82	16	0.78	34 (CuAAC)
AuMakro-N₃	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.6	73	75	0.17	-
AuMakro-Tweezer	1.9 ± 0.7	1.7 ± 0.7	93	10	1.25	17 (CuAAC)

After the successful synthesis and characterization of AuGSH, they were functionalized via diazo transfer reactions to the superficial amine groups of the ligand. The resulting azido group could then be utilized for various copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition reactions (CuAAC). CuAAC on the surface of ultrasmall metallic nanoparticles has already been tested in previous studies. However, this new synthetic pathway opens up an advantageous approach with the possibility of a well-defined azide structure on the nanoparticles surface.

After the diazo transfer reactions on AuGSH nanoparticles, there was a prominent azide stretching vibration visible in the corresponding IR spectra. On top of that, the ¹H-NMR-spectrum revealed diastereomeric separation for the protons in close proximity to the newly formed azide. Additionally, the ¹³C-NMR-spectrum revealed a strong downfield shift for the carbon atom in direct proximity to the azide. A two-

dimensional ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-spectrum could be used to quantify the yield of the azidation at around 95%, which is equivalent to about 118 azido groups on the surface of each particle.

The azidated nanoparticles (AuN_3) could be clicked to various fluorescent dyes and were able to carry them through the cell membrane of HeLA, CT-26 and MODE-K cells. In comparison, the pure dyes were not able to enter the cells. Additionally, the nanoparticles were able to penetrate *E. coli* bacteria through their thin protein channel in the cell walls. This process is probably mostly comprised of active intake mechanisms by the cells themselves together with passive diffusion of the nanoparticles. 3D human gut cell models were able to take in the nanoparticles even through the thin mucus layer on their surface. The used fluorescent cell markers however were only able to dye the cell on the surface of the 3D models and could not penetrate the tight junction between individual cells. Nanoparticles on the other hand were localized throughout the whole organoid.

CuAAC with insoluble AIE-dyes revealed that the nanoparticles foundation of AuN_3 is capable to be dispersed even while carrying a high number of insoluble molecules. AuAIE nanoparticles were able to transport the insoluble dye through cell membranes of HeLa cells.

Chlorohexyl-containing ligands were successfully synthesized and characterized by different organic chemical methods. Similar to AuAIE, they were able to be linked to the badly soluble H1 and H2 ligands. Experiments on the model protein HT2 revealed the nanoparticles to be able to bind every single binding pocket of the proteins, although no oligomers with a metallic center could be found by size-exclusion chromatography. One possible reason for this may be that the linkers to the functional chlorohexyl group were too short, resulting in incomplete binding of the proteins due to steric hinderance. For this reason, a second, longer linker was developed (H2) and clicked to the surface of the nanoparticles even in lower number to give more room to the proteins.

Another project included the nanoparticles and the already well-established molecular tweezers. Attachment of the tweezer to the nanoparticles surface should give an opportunity to bind basic amino acids on the protein Taspase1 which would otherwise be open for the attachment of Importin α . This binding to a specific location on the protein should interfere with the Importin α -Taspase1-interaction in a way that prevents

Taspas1 from entering the nucleus where it is transformed into its catalytically active *trans* form. The *trans* form is able to disrupt cancer relevant proteins, which is a process that may result in different types of cancer, but mostly leukemia. A *Pull-Down Assay* followed by an SDS-PAGE revealed an IC_{50} for AuTweezer of around 10 μ M, which is translated to a binding to Taspase1, which is about three times stronger than previously tested GCP ligand. Additionally, the nanoparticles were able to interfere with the proteolytic activity of Taspase1. The IC_{50} for the inhibitory effect to the catalytic properties of the protein were around 100 nM at 200 nM protein concentration.

Nanoparticles were functionalized with macromolecular ligands, which were comprised of two azido groups each. UV-Vis-spectroscopy revealed a total number of immobilized macromolecules of 75, which is equivalent to 150 azido groups. After functionalization of the azido groups with molecular tweezers, the total number of attached tweezers was difficult to quantify with UV-Vis-spectroscopy and NMR-spectroscopy. ICP-MS measurements revealed around ten tweezer per nanoparticle. Despite carrying large ligands, the nanoparticles were able to penetrate the cell membrane of cancer cells, which makes up a great first step towards inhibition of Survivin-Crm1 interaction.

8. Literatur

- [1] M. Xiu, Q. B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, P. J. J. Alvarez, *Nano Lett.*, **2012**, 12, 4271.
- [2] Z; S. Chernousova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1636-1653.
- [3] L. Dykman, N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2256-2282.
- [4] W. A. Banks, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2016**, 15, 275.
- [5] V. Sokolova, G. Nzou, S. B. van der Meer, T. Ruks, M. Heggen, K. Loza, N. Hagemann, F. Murke, B. Giebel, D. M. Hermann, A. J. Atala, M. Epple, *Acta Biomater.*, **2020**, 111, 349-362.
- [6] V. Sokolova, G. Mekky, S. B. van der Meer, A. J. Atala, M. Seeds, M. Epple, *Sci. Rep.*, **2020**, 10, 18033.
- [7] M. Shilo, A. Sharon, K. Baranes, M. Motiei, J.-P. M. Lellouche, R. Popovtzer, *J. Nanobiotechnology*, **2015**, 13, 19.
- [8] C. L. Masters, R. Cappai, K. J. Barnham, V. L. Villemagne, *J. Neurochem.*, **2006**, 97, 1700-1725.
- [9] M. S. Fiandaca, D. Kapogiannis, M. Mapstone, A. Boxer, E. Eitan, J. B. Scharz, E. L. Abner, R. C. Petersen, H. J. Federoff, B. L. Miller, E. J. Gotzl, *Alzheimers. Dement.*, **2015**, 11, 600-607.
- [10] M. Kopp, S. Kollenda, M. Epple, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50, 1383-1390.
- [11] A. L. Lira, R. S. Ferreira, R. J. S. Torquato, H. Zhao, M. L. V. Oliva, S. A. Hassan, P. Schuck, A. A. Sousa, *Nanoscale*, **2018**, 10, 3235.
- [12] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2754-2794.
- [13] P. I. Kitov, D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16271-16284.
- [14] S. Hong, P. R. Luroueil, I. J. Majoros, B. G. Orr, J. R. Baker, M. M. Banaszak Holl, *Chem. Biol.*, **2007**, 14, 107-115.
- [15] T. G. Schaaff, G. Knight, M. N. Shafiqullin, R. F. Borkman, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 10643-10646.
- [16] H. Huang, H. d. Troit, M. O. Besenhard, S. Ben-Jaber, P. Dobson, I. Parkin, A. Gavriilidis, *Chem. Eng. Sci.*, **2018**, 189, 422-430.
- [17] T. Ruks, C. Beuck, T. Schaller, F. Niemeyer, M. Zähres, K. Loza, M. Heggen, U. Hagemann, C. Mayer, P. Bayer, M. Epple, *Langmuir*, **2019**, 35, 767-778.
- [18] T. F. Tadros, *Nanodispersions*, De Gruyter, **2015**.
- [19] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1103-1170.
- [20] M. S. Inkpen, Z.-F. Liu, H. Li, L. M. Campos, J. B. Neaton, L. Venkataraman, *Nat. Chem.*, **2019**, 11, 351-358.
- [21] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533-3539.

- [22] S. B. van der Meer, K. Loza, K. Wey, M. Heggen, C. Beuck, P. Bayer, M. Eppele, *Langmuir*, **2019**, 22, 7191-7204.
- [23] W. Q. Tian, Y. A. Wang, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 4299.
- [24] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. v. Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2686.
- [25] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Technology: IUPAC, Recommendations*, 2nd ed., Blackwell Science, Oxford, **1997**.
- [26] D. H. Everett, *Pure Appl. Chem.*, **1972**, 31, 577.
- [27] G. J. Lauth, J. Kowalczyk, *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2016**.
- [28] S. Daumann, Synthese und Charakterisierung von Nanopartikeln: Anisotrope Edelmetall-Nanopartikel und Zinkoxid-Nanopartikel, *Dissertation*, **2016**.
- [29] G. Wedler, H.-J. Freund, *Lehr- und Arbeitsbuch Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2016**.
- [30] B. Derjaguin, L. Landau, *Acta Physicochim. U.R.S.S.*, **1941**, 14, 30–59.
- [31] E. J. W. Verwey, J. Th. G. Overbeek, *Elsevier*, New York, **1948**.
- [32] T. Hofmann, *Chemie unserer Zeit*, **2004**, 38, 24.
- [33] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme. Physik und Chemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2002**.
- [34] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, De Gruyter, **2015**.
- [35] M. Runowski, *Chemik*, **2014**, 68, 766.
- [36] V. K. LaMer, R. H. Dinagar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 4847-4854.
- [37] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S. E. Skrabalak, *Angew. Chem.*, **2009**, 121, 62-108.
- [38] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Langmuir*, **2001**, 17, 6782-6786.
- [39] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hiller, *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55-75.
- [40] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *Chem. Comm.*, **1994**, 801-802.
- [41] B. Schütze, C. Mayer, K. Loza, M. Gocyla, M. Heggen, M. Eppele, *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4, 2179-2189.
- [42] Y. Negishi, K. Nobusada, T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5261.
- [43] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293-346.
- [44] J. L. West, N. J. Halas, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, 11, 215-217.
- [45] D. Thompson, *Gold Bull.*, **2007**, 40, 267-269.
- [46] O. V. Kharissova, B. I. Kharisov, V. M. Jiménez-Pérez, B. Muñoz Flores, U. Ortiz Méndez, *RSC Adv.*, **2013**, 3, 22648-22682.

- [47] C. Nützenadel, A. Züttel, D. Chartouni, G. Schmid, L. Schlapbach, *Eur. Phys. J. D*, **2000**, 8, 245-250.
- [48] D. M. P. Mingos, *Gold Clusters, Colloids and Nanoparticles I*, Springer International Publishing, **2014**.
- [49] K. Klein, M. Hayduk, S. Kollenda, M. Schmiedtchen, J. Voskuhl, M. Epple, *Molecules*, **2022**, 27, 1788.
- [50] Y. Huang, L. Fuksman, J. Zheng, *Dalton trans.*, **2018**, 47, 6267.
- [51] R. E. Benfield, A. P. Maydwell, J. M. Rultenbeek, D. A. Leeuwen, *Z. Phys. D Atoms, Molecules and Clusters*, **1993**, 26, 4.
- [52] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2740.
- [53] E. C. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 122, 3352.
- [54] J. Zheng, C. Zhang, R. M. Dickson, *Phys. Rev. Lett.*, **2004**, 93, 077492.
- [55] Z. Wu, R. Jin, *Nano Lett.*, **2010**, 10, 2568-2573.
- [56] C. Zhou, J. Yu, Y. Qin, J. Zheng, *Nanoscale*, **2012**, 4, 4228-4233.
- [57] K. Loza, M. Heggen, M. Epple, *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, 30, 1909260.
- [58] Y. Negishi, Y. Takasugi, S. Sato, H. Yao, K. Kimura, T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 21, 6518–6519.
- [59] J. Liu, P. N. Duchesne, M. Yu, X. Jiang, X. Ning, R. D. Vinluan 3rd, P. Zhang, J. Zheng, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 8894-8898.
- [60] Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D. T. Leong, J. Y. Lee, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 16662-16670.
- [61] K. Pyo, V. D. Thanthirige, K. Kwak, P. Pandurangan, G. Ramakrishna, D. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 8244-8250.
- [62] C. K. Hartmuth, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2011.
- [63] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, 2, 565.
- [64] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 1, 644-648.
- [65] M. Arthur, *J. Prakt. Chem.*, **1893**, 48, 94-95.
- [66] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.
- [67] W.-Q. Fan, A. R. Katritzky, *Elsevier*, **1996**, 4, 1-126.
- [68] L. Zhu, C. J. Brassard, X. Zhang, P. M. Guha, R. J. Clark, *Chem. Rec.*, **2016**, 16, 1502-1517.
- [69] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. D. Di'az, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 12705-12712.
- [70] R. Berg, B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2013**, 9, 2715-2750.

- [71] J. R. Johansson, T. Beke-Somfai, A. S. Stålsmeden, N. Kann, *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 23, 14726-14768.
- [72] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, 4th ed., Springer, Berlin, Heidelberg, **2021**.
- [73] H. Friebolin, *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, **2019**.
- [74] S. Bienz, L. Bigler, T. Fox, H. Meier, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, **2016**.
- [75] M. Findeisen, H. U. Siehl, S. Berger, *COSY- und HSQC-NMR-Spektroskopie*, *Chemie in unserer Zeit*, 51, 264-271, **2017**.
- [76] L. E. Marbella, J. E. Millstone, *Chem. Mater.* **2015**, 27, 2721-2739.
- [77] M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C.-J. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, G. L. Glish, M. D. Porter, N. D. Evans, R. W. Murray, *Langmuir*, **1998**, 14, 17-30.
- [78] D. Sinnaeve, *Concepts Magn. Reson. A*, **2012**, 40A, 39-65.
- [79] W. S. Price, *Concepts Magn. Reson.*, **1997**, 9, 299-336.
- [80] R. A. De Graaf, *In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, **2019**.
- [81] Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 520-554.
- [82] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, **1965**, 42, 288-292.
- [83] E. Abbe, *Arch. Mikr. Anat.*, **1873**, 9, 418-440.
- [84] B. Fultz, *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*, 3rd ed., Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [85] P. Goodhew, *General Introduction to Transmission Electron Microscopy (TEM)*, **2011**.
- [86] D. Scott, S. E. Harding, A. Rowe, I. Laidlaw, M. Steinmetz, *Analytical ultracentrifugation: Techniques and methods*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2005**.
- [87] C. Instruments, *Handbuch CPS-Scheibenzentrifuge*.
- [88] H. H. Perkampus, *UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen*, Springer, **2013**.
- [89] B. Welz, *Atomic absorption spectroscopy*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [90] G. Schwedt, T. C. Schmidt, O.J. Schmitz, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley, **2016**.
- [91] P. W. Atkins, C. A. Trapp, J. De Paula, C. Giunta, *Physikalische Chemie*, 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [92] H. Budzikiewicz, *Massenspektrometrie- Eine Einführung*, 6th ed., Wiley-VCH, **2012**.

- [93] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Mass Spectrometry, Appl. Spectrosc. Rev.*, **2009**, 44, 210-230.
- [94] R. T. Borlinghaus, *Konfokale Mikroskopie in Weiß: Optische Schnitte in allen Farben*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2016**.
- [95] J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, A. Blázquez-Castro, *Acta Histochem.*, **2018**, 120, 159-167.
- [96] M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang, *Biochem. J.*, **1996**.
- [97] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **1993**, 65, 55-63.
- [98] N. Feiner-Gracia, S. Pujals, P. Delcanale, L. Albertazzi, *Smart Nanoparticles for Biomedicine*, G. Ciofani (Ed.), Elsevier **2018**, 219-236.
- [99] L. A. Trinh, S. E. Fraser, *Curr. Top. Dev. Biol.*, Y. Chai (Ed.), Academic Press **2015**, 599-629.
- [100] R. Henriques, M. M. Mhlanga, *Biotechnol. J.*, **2009**, 4, 846.
- [101] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 9, 2514-2514.
- [102] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 19, 3797-3800.
- [103] N. Fischer, E. D. Goddard-Borger, R. Greiner, T. M. Klapötke, B. W. Skelton, J. Stierstorfer, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 4, 1760-1764.
- [104] G. T. Potter, G. C. Jayson, G. J. Miller, J. M. Gardiner, *J. Org. Chem.*, **2016**, 81, 8, 3443-3446.
- [105] D. Iannazzo, A. Pistone, M. Salamò, S. Galvagno, R. Romeo, S. V. Giofrè, C. Branca, G. Visalli, A. Di Pietro, *In. J. Pharm.*, **2017**, 518, 1-2, 185-192.
- [106] R. Dulbecco, G. Freeman, *Virology*, **1959**, 8, 396-397.
- [107] R. Dulbecco, M. Vogt, *J. Exp. Med.*, **1954**, 99, 167-182.
- [108] A. C. Templeton, D. E. Cliffel, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 7081-7089.
- [109] E. C. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 122, 3352.
- [110] D. Scott, S. E. Harding, A. Rowe, I. Laidlaw, M. Steinmetz, *R. Soc. Chem.*, **2005**.
- [111] R. A. Nyquist, W. J. Potts, *Spectrochim. Acta*, **1950**, 7, 514-538.
- [112] M. N. Slipchenko, B. G. Sartakov, A. F. Vilesov, *J. Phys. Chem. A*, **2007**, 111, 7460-7471.
- [113] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics*, **2010**, 29, 2176-2179.
- [114] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie der Elemente. 1. Auflage*, VCH, Weinheim, **1988**, 1509.
- [115] S. Berger, S. Braun, H. O. Kalinowski, *200 and more NMR experiments: a practical course*, Wiley-Vch Weinheim, **2004**.

- [116] L. Hartmann, E. Krause, M. Antonietti, H. G. Börner, *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 4, 1239–1244.
- [117] P. S. R. Anjaneyulu, J. V. Staros, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1987**, 30, 117-124.
- [118] S. B. van der Meer, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2021**.
- [119] A. K. Pandiakumar, S. P. Sarma, Ag. G. Samuelson, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 2917-2920.
- [120] M. Y. Stevens, R. T. Sawant, L. R. Odell, *J. Org. Chem.*, **2014**, 4826-4831.
- [121] P. T. Nyffeler, C. H. Liang, K. M. Koeller, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10773-10778.
- [122] M. Lim, P. Hamm, R. M. Hochstrasser, *Biophys. Comp. Biol.*, **1998**, 95, 15315-15320.
- [123] R. B. Merrifield, *Hypotensive Peptides*, Springer Verlag New York Inc., **1966**.
- [124] F.-X. Coudert, R. Vuilleumier, A. Boutin, *ChemPhysChem*, **2006**, 7, 2464-2467.
- [125] K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Epple, *ChemNanoMat*, **2021**, 7, 1330-1339.
- [126] J. Langer, S. M. Novikov, L. M. Liz-Marzán, *Nanotechnology*, **2015**, 26, 322001.
- [127] R. Yu, L. M. Liz-Marzán,; F. J. García de Abajo, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 6710-6724.
- [128] R. R. Arzivo, O. R. Miranda, M. A. Thompson, C. M. Pabelick, R. Bhattacharya, J. D. Robertson, V. M. Rotello, Y. S. Prakash, P. Mukherjee, *Nano Lett.*, **2010**, 10, 2543-2548.
- [129] V. Sokolova, J.-F. Ebel, S. Kollenda, K. Klein, B. Kruse, C. Veltkamp, C. M. Lange, A. M. Westendorf, M. Epple, *Small*, **2022**, 2201167.
- [130] K. P. Miller, L. Wang, B. C. Benicewicz, A. W. Decho, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 18, 164-176.
- [131] K. S. Butler, D. J. Peeler, B. J. Casey, B. J. Dair, R. K. Elespuru, *Mutagenesis*, **2015**, 30, 577-591.
- [132] J. A. Kloepfer, R. E. Mielke, J. L. Nadeau, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71, 2548-2557.
- [133] P. Demchick, A. L. Koch, *J. Bacteriol.*, **1996**, 178, 768-773.
- [134] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman, *Nanotechnology*, **2005**, 16, 2346-2353.
- [135] M. Kumar, W. Tegge, N. Wangoo, R. Jain, R. K. Sarma, *Biophys. Chem.*, **2018**, 237, 38-46.
- [136] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, D. P. Clark, *Brock Mikrobiologie*, 13. Auflage, Pearson, München, **2013**.
- [137] S. Štumpf, G. Hostnik, M. Primožič, M. Leitgeb, U. Bren, *Plants (Basel)*, **2020**, 9, 1680.
- [138] N. Białas, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2021**, 132.

- [139] X. Lai, M. L. Han, Y. Ding, S. H. Chow, A. P. Le Brun, C. M. Wu, P. J. Bergen, J. H. Jiang, H. Y. Hsu, B. W. Muir, J. White, J. Song, J. Li, H. H. Shen, *Nat. Commun.*, **2022**, 13, 343.
- [140] P. V. Baptista, M. P. McCusker, A. Carvalho, D. A. Ferreira, N. M. Mohan, M. Martins, A. R. Fernandes, *Front. Microbiol.*, **2018**, 9, 1441.
- [141] K. Sultan, A. Mone, L. Durbin, S. Khuwaja, A. Swaminath, Wordl J. Gastroenterol. 2020,26,5534.; E. Pastille, A. Frede, H. J. McSorley, J. Gräb, A. Adamczyk, S. Kollenda, W. Hansen, M. Epple, J. Buer, R. M. Maizels, R. Klopffleisch, A. M. Westendorf, *PLoS Pathog.*, **2017**, 13, e1006649.
- [142] A. D. Rowan-Nash, B. J. Korry, E. Mylonakis, P. Belenky, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2019**, 83, e00044.
- [143] H. Laroui, D. S. Wilson, G. Dalmasso, K. Salaita, N. Murthy, S. V. Sitaraman, D. Merlin, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2011**, 300, G371.
- [144] V. Sokolova, J.-F. Ebel, S. Kollenda, K. Klein, B. Kruse, C. Veltkamp, C. M. Lange, A. M. Westendorf, M. Epple, *Small*, **2022**, 2201167.
- [145] T. Sato, R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters, H. Clevers, *Nature*, **2009**, 459, 262.
- [146] Y. S. Son, S. J. Ki, R. Thanavel, J. J. Kim, M. O. Lee, J. Kim, C. R. Jung, T. S. Han, H. S. Cho, C. M. Ryu, S. H. Kim, D. S. Park, M. Y. Son, *FASEB J.*, **2020**, 34, 9899.
- [147] J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Lie, D. Zhu, *Chem. Commun.*, **2001**, 1740-1741.XXX
- [148] F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 14192-14196.
- [149] N. Alifu, X. Dong, D. Li, X. Sun, A. Zebibula, D. Zhang, G. Zhang, J. Qian, *Mater. Chem. Front.*, **2017**, 1, 1746-1753.
- [150] Y. Yuan, S. Xu, C. J. Zhang, B. Liu, *Polym. Chem.*, **2016**, 7, 3530-3539.
- [151] S. Riebe, C. Vallet, F. van der Vight, D. Gonzalez-Abradelo, C. Wölper, C. A. Strassert, G. Jansen, S. Knauer, J. Voskuhl, *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23, 13660-13668.
- [152] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 509-544.
- [153] M. Hammarstrom, N. Hellgren, S. van Den Berg, H. Berglund, T. Hard, *Protein Sci.*, **2002**, 11, 313-321.
- [154] J. W. Jarvik, C. A. Telmer, Epitope tagging, *Annu. Rev. Genet.*, **1998**, 32, 601-618.
- [155] J. Huang, S. S. Nagy, A. Koide, R. S. Rock, S. Koide, *Biochemistry*, **2009**, 48, 11834-11836.
- [156] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 60, 523-533.
- [157] A. N. Kulakova, T. M. Stafford, M. J. Larkin, L. A. Kulakov, *Plasmid*, **1995**, 33, 208-217.
- [158] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. Friedmann Ohana, M. Urh, D. Simpson, J.

- Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Dazins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 4, 373-382.
- [159] J. F. Schindler, P. A. Naranjo, D. A. Honaberger, *Biochemistry*, **1999**, 38, 5772-5778.
- [160] T. Yokota, T. Omori, T. Kodama, *J. Bacteriol.*, **1987**, 169, 4049-4054.
- [161] T. Bosma, E. Kruizinga, E. J. de Bruin, G. J. Poelarends, D. B. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 65, 4575-4581.
- [162] J. Newman, T. S. Peat, R. Richard, L. Kann, P. E. Swanson, J. A. Affholter, I. H. Holmes, J. F. Schindler, C. J. Unkefer, T. C. Terwilliger, *Biochemistry*, **1999**, 38, 16105-16114.
- [163] T. R. Covey, R. F. Bonner, B. I. Shushan, J. Henion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 249-256.
- [164] L. P. Encell, R. Friedmann Ohana, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, M. O. Wood, G. V. Los, M. G. McDougall, C. Zimprich, N. Karassina, R. D. Learish, R. Hurst, J. Hartnett, S. Wheeler, P. Stecha, J. English, K. Zhao, J. Mendez, H. A. Benink, N. Murphy, D. L. Daniels, M. R. Slater, M. Urh, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *Curr. Chem. Genom.*, **2012**, 6, 55-71.
- [165] W. P. Jencks, J. Carriuolo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 1778-1786.
- [166] J. Goodacre, R. J. Ponsford, I. Sterling, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 3609; Muraki, M.; T. Mizoguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1971**, 19, 1708.
- [167] P. Španěl, M. Tichý, D. Smith, *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 8660.
- [168] J. S. Sutton, *J. Ultrastruct. Res.*, **1967**, 21, 424-442.
- [169] E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 259-270.
- [170] A. Yasuma, T. Ichikawa, *Transl. Res.*, **1953**, 41, 2, 296-299.
- [171] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 14, 2923-2925.
- [172] Y. V. Serebrenik, D. Hellerschmied, M. Toure, F. López-Giráldez, D. Brookner, C. M. Crews, *Mol. Biol. Cell*, **2018**, 29, 1284-1298.
- [173] S. Röth, L. J. Fulcher, G. P. Sapkota, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2019**, 76, 2761-2777.
- [174] M. J. E. Fischer, *Surface Plasmon Resonance*, **2010**, 55-73.
- [175] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 123.
- [176] T. Schrader, G. Bitan, F.-G. Klärner, *Chem. Comm.*, **2016**, 52, 11318-11334.
- [177] M. Fokkens, T. Schrader, F.-G. Klärner, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 14415-14444.
- [178] D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Anguaita, S. Dutt, C. Wilch, F.-G. Klärner, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader, C. Ottmann, *Nature Chem.*, **2013**, 5, 234.
- [179] S. B. van der Meer, I. Hadrovic, A. Meiners, K. Loza, M. Heggen, S. K. Knauer, P. Bayer, T. Schrader, C. Beuck, M. Eppler, *J. Phys. Chem. B*, **2021**, 125, 115-127.

- [180] P. J. Turner, T. Merren, J. Speakman, C. Haines, *R. Soc. Chem.*, **1997**, 28-34.
- [181] N. Yamada, J. Takahashi, K. Sakata, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2002**, 17, 1213-1222.
- [182] E. McCurdy, G. Woods, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2004**, 19, 607-615.
- [183] D. Pröfrock, P. Leonhard, A. Prange, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 377, 132-139.
- [184] C. López-Otín, L. M. Matrisian, *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7, 800-808.
- [185] J. J.-D. Hsieh, E. H.-Y. Cheng, S. J. Korsmeyer, *Cell*, **2003**, 115, 293-303.
- [186] C. Bier, S. K. Knauer, D. Docter, G. Schneider, O. H. Kramer, R. H. Stauber, *Traffic*, **2011**, 12, 703-714.
- [187] J. T. Lee, D. Y. Chen, Z. Yang, A. D. Ramos, J. J.-D. Hsieh, M. Bogyo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5086-5090.
- [188] J. van den Boom, M. Mamic, D. Baccelliere, S. Zweerink, F. Kaschani, S. Knauer, *Chembiochem.*, **2014**, 15, 2233-2237.
- [189] C. Bier, R. Hecht, L. Kunst, S. Scheiding, D. Wünsch, D. Goesswein, G. Schneider, O. H. Krämer, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *PLoS ONE*, **2012**, 7, e34142.
- [190] C. Bier, S. K. Knauer, D. Wünsch, L. Kunst, S. Scheiding, M. Kaiser, C. Ottmann, O. H. Krämer, R. H. Stauber, *FASEB J.*, **2012**, 26, 3421-3429.
- [191] A. Höing, A. Zimmermann, L. Moews, M. Killa, M. Heimann, A. Hensel, J. Voskuhl, S. K. Knauer, *ChemMedChem*, **2022**, 17, e202100640.
- [192] J. van den Boom, F. Trusch, L. Hoppstock, C. Beuck, P. Bayer, *PLoS ONE*, **2016**, 11, e0151431, 1-13.
- [193] A. Lange, R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, A. H. Corbett, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 5101-5105.
- [194] Y. Miyamoto, K. Yamada, Y. Yoneda, *J. Biochem.*, **2016**, 160, 69-75.
- [195] P. Pasch, A. Höing, S. Ueclue, M. Killa, J. Voskuhl, S. K. Knauer, L. Hartmann, *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 3091-3094.
- [196] A. Höing, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2022**.
- [197] R. W. Congdon, G. W. Muth, A. G. Splittgerber, *Anal. Biochem.*, **1993**, 213, 407-413.
- [198] S. A. Hill, C. Gerke, L. Hartmann, *Chem. Asian J.*, **2018**, 13, 3611-3622.
- [199] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervedde, L. Hartmann, *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 1845-1852.
- [200] K.-W. Wan, B. Malgesini, I. Verpilio, P. Ferruti, P. C. Griffiths, A. Paul, A. C. Hann, R. Duncan, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1102-1109.
- [201] B. D. Larsen, A. Holm, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1994**, 43, 1-9.
- [202] S. B. van der Meer, T. Seiler, C. Buchmann, G. Partalidou, S. Boden, K. Loza, M. Heggen, J. Linders, O. Prymak, C. L. P. Oliveira, L. Hartmann, M. Eppe, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 1451-1464.

- [203] D. C. Altieri, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 46-54.
- [204] M. A. Verdecia, H.-K. Huang, E. Dutil, D. A. Kaiser, T. Hunter, J. P. Noel, *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 7, 602-608.
- [205] K. T. Nguyen, M. P. Holloway, R. A. Altura, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, **2012**, 3, 137-151.
- [206] S. K. Knauer, U. R. Heinrich, C. Bier, N. Habtemichael, D. Docter, K. Helling, W. J. Mann, R. H. Stauber, *Cell Death Dis.*, **2010**, 1, 51.
- [207] A. Meiners, S. Bäcker, I. Hadrović, C. Heid, C. Beuck, Y. B. Ruiz-Blanco, J. Mieres-Perez, M. Pörschke, J.-N. Grad, C. Vallet, D. Hoffmann, P. Bayer, E. Sánchez-García, T. Schrader, S. K. Knauer, *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 1505.
- [208] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach., 2nd edition.*, Sunderland (MA): Sinauer Associates, **2000**.

9. Anhang

9.1. Abbildungen

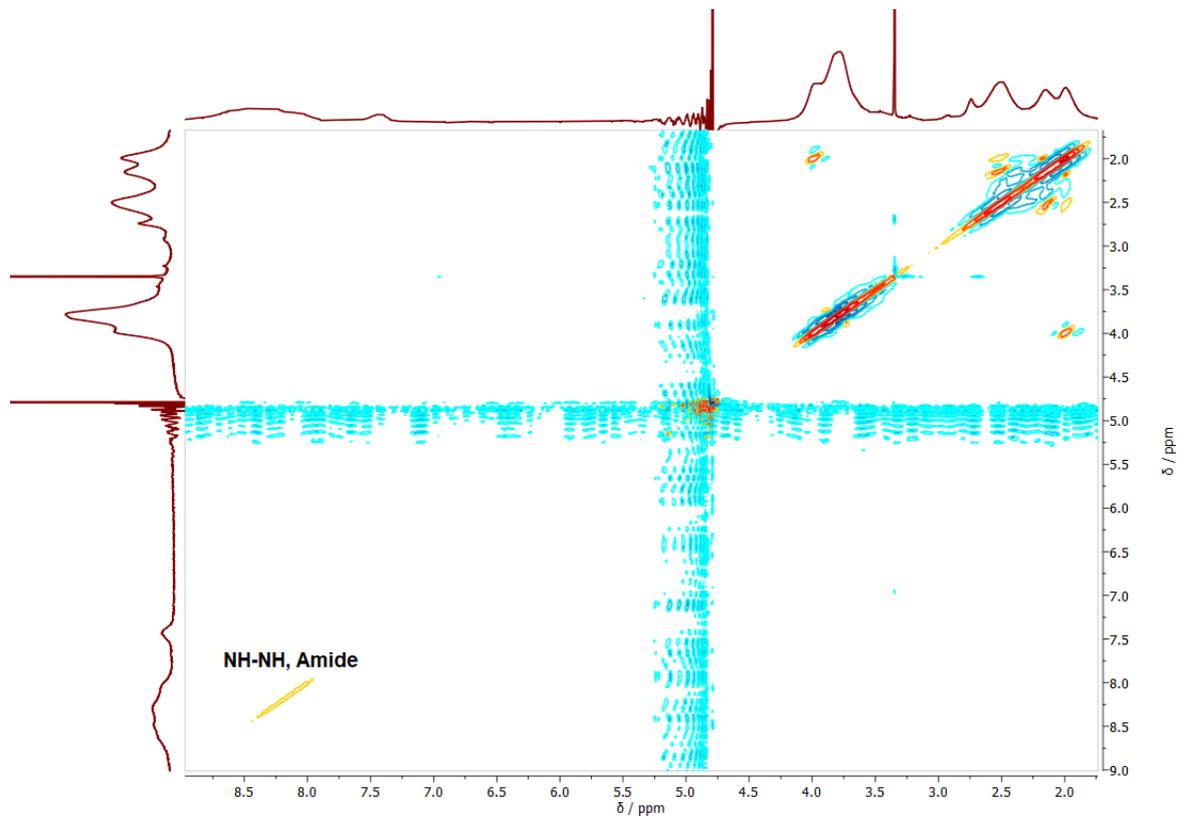


Abbildung 103: Großaufnahme des ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von AuN_3 Nanopartikeln.

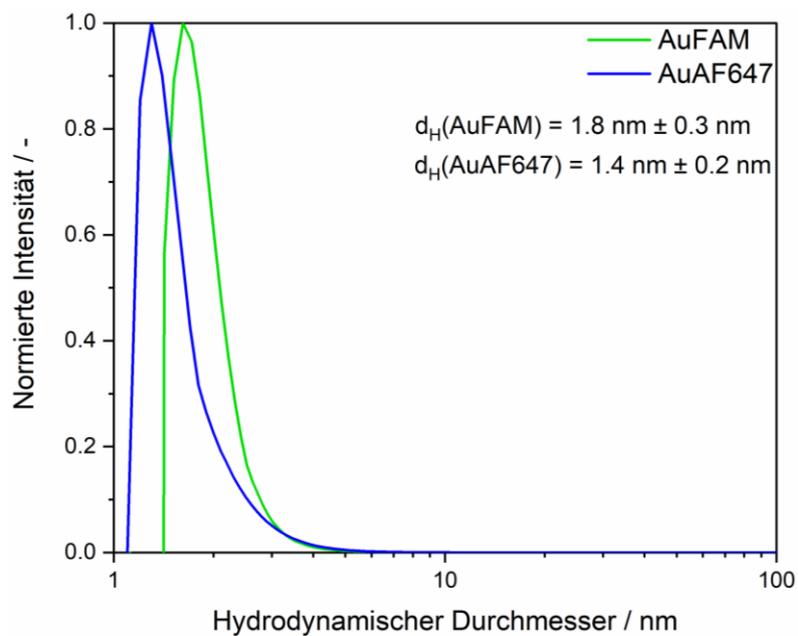


Abbildung 104: DCS-Daten der mit FAM-Alkin (grün) und AF647 (blau) fluoreszent markierten Nanopartikel.

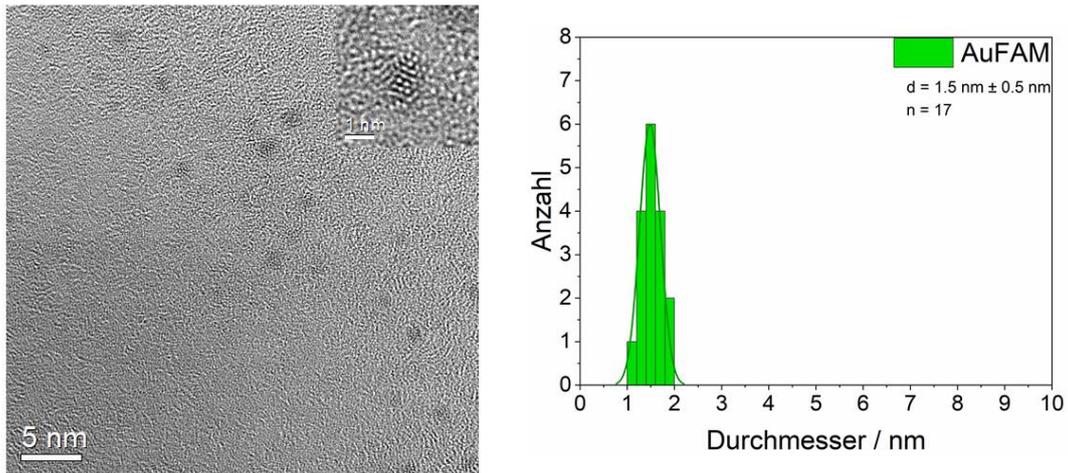


Abbildung 105: HRTEM-Aufnahme der mit FAM markierten ultrakleinen Nanopartikel nach erfolgreicher Umfunktionalisierung, erstellt von *Dr. K. Loza* im Forschungszentrum Jülich. Der Maßstab beträgt im großen Bild 5 nm, im kleinen Inset 1 nm. Es wurden 17 Partikel ausgemessen.

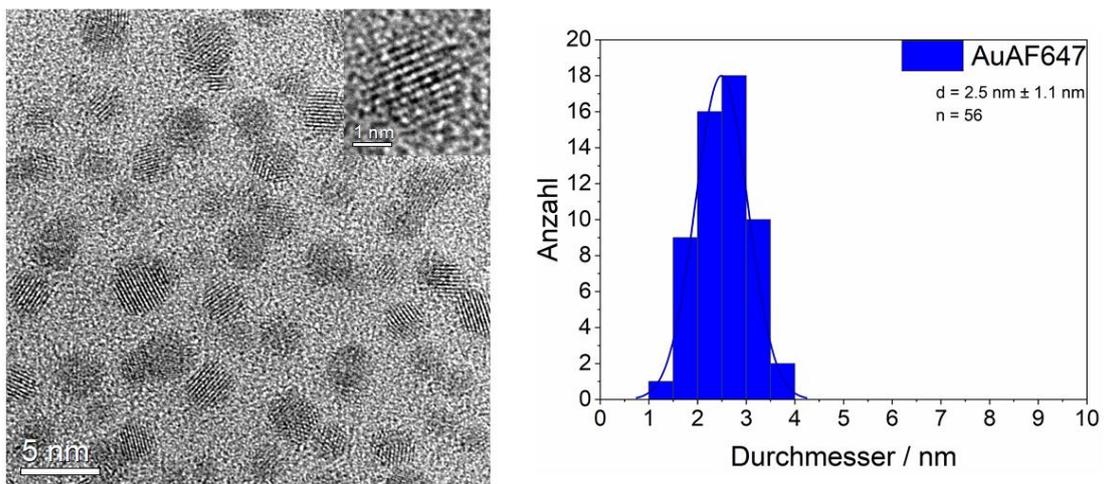


Abbildung 106: HRTEM-Aufnahme der mit AF647 markierten ultrakleinen Nanopartikel nach erfolgreicher Umfunktionalisierung, erstellt von *Dr. K. Loza* im Forschungszentrum Jülich. Der Maßstab beträgt im großen Bild 5 nm, im kleinen Inset 1 nm. Es wurden 56 Partikel ausgemessen.

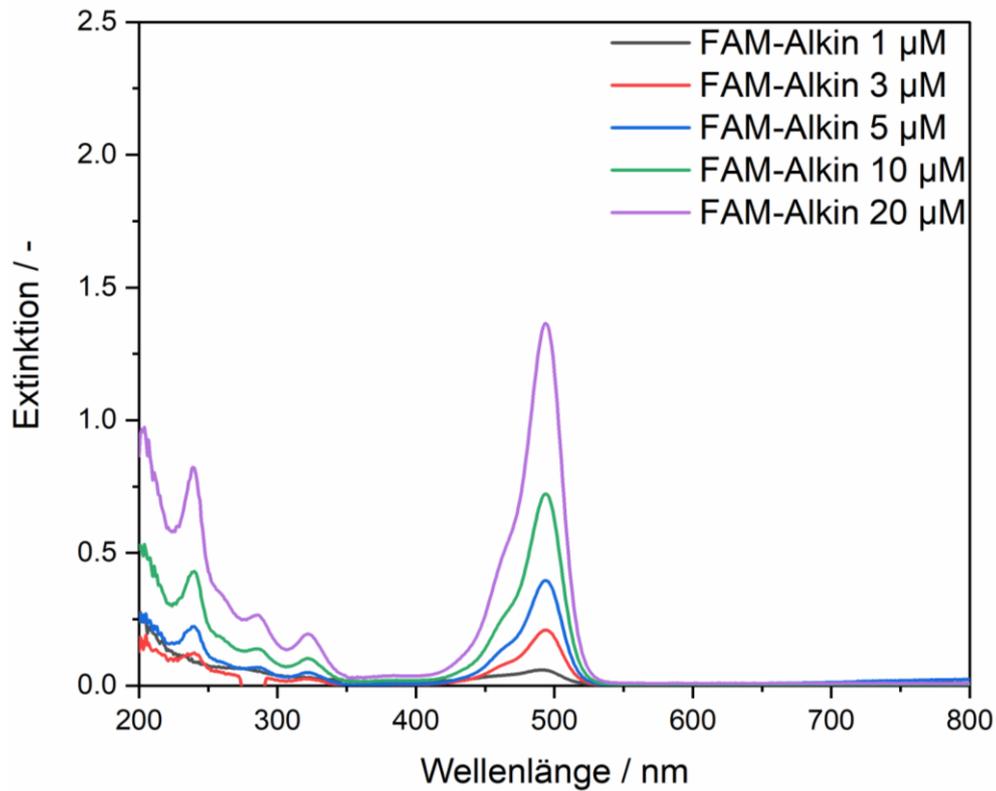


Abbildung 107: UV-Vis-Messungen verschiedener Konzentrationen von FAM-Alkin zwecks Kalibration für eine Quantifizierung des am Partikel gebundenen Farbstoffes.

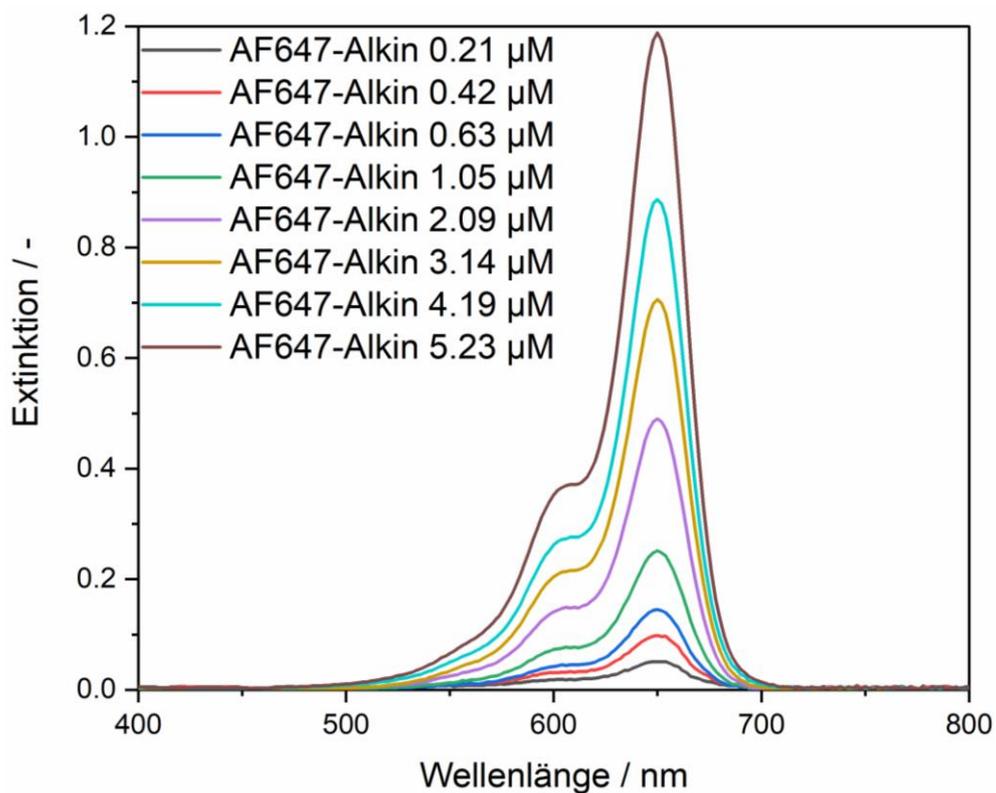


Abbildung 108: UV-Vis-Messungen verschiedener Konzentrationen von AF647-Alkin zwecks Kalibration für eine Quantifizierung des am Partikel gebundenen Farbstoffes.

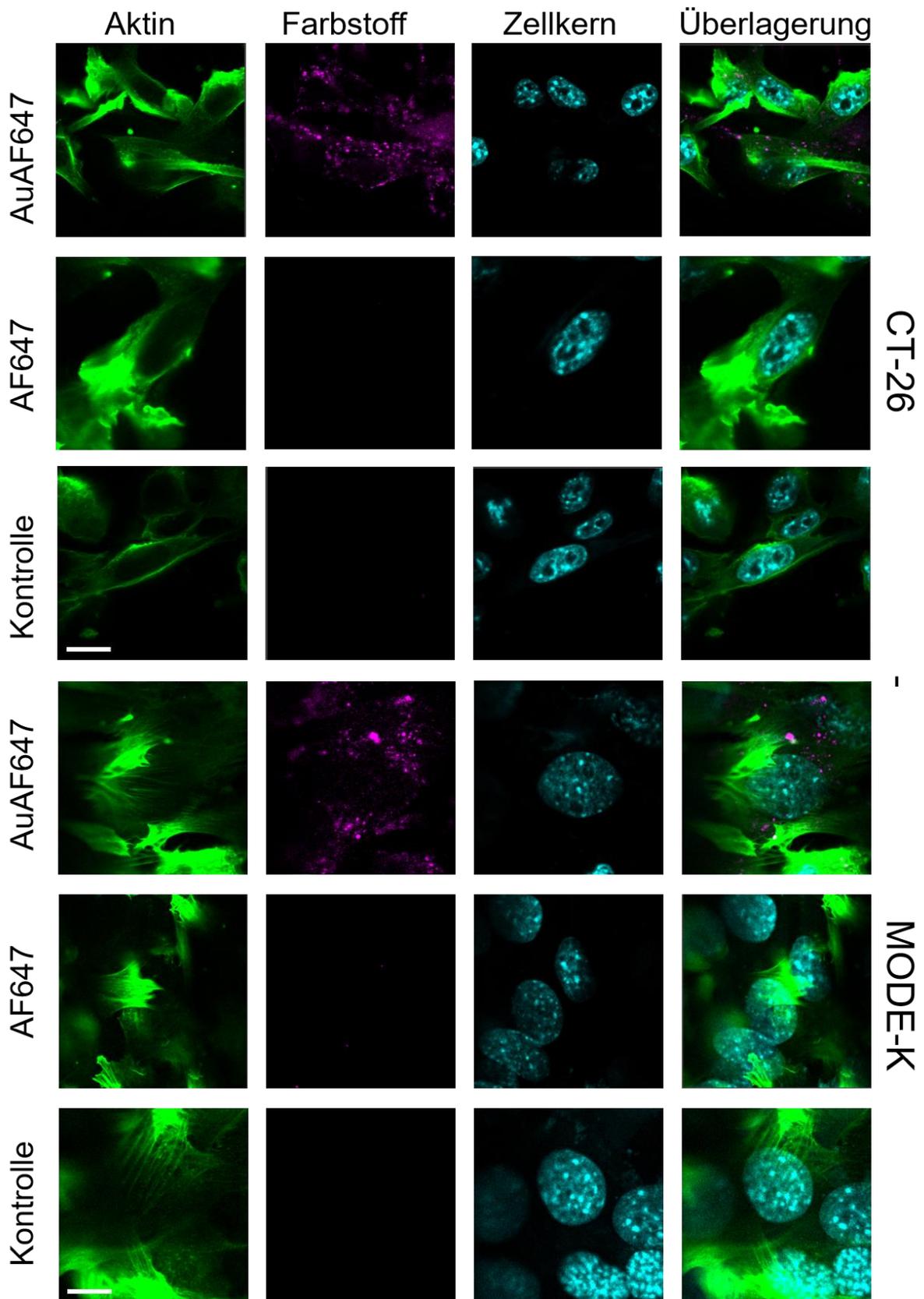


Abbildung 109: 2D-Zellaufnahme von AuAF647 mit CT-26 und MODE-K Zellen nach 2 h Inkubation (aufgenommen von *Dr. V. Sokolova*). Der Maßstab beträgt 10 μ M.

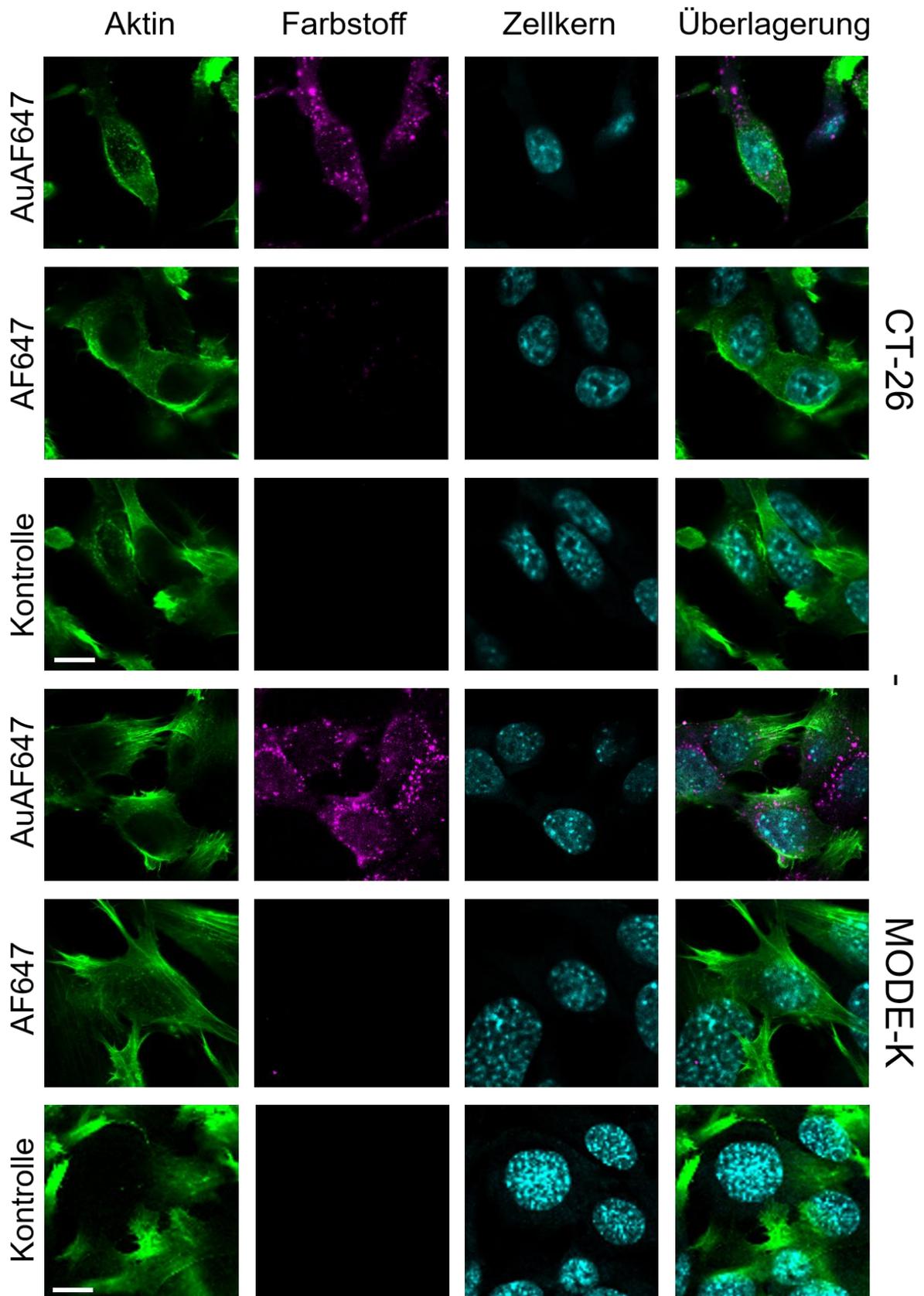


Abbildung 110: 2D-Zellaufnahme von AuAF647 mit CT-26 und MODE-K Zellen nach 24 h Inkubation (aufgenommen von *Dr. V. Sokolova*). Der Maßstab beträgt 10 μ M.

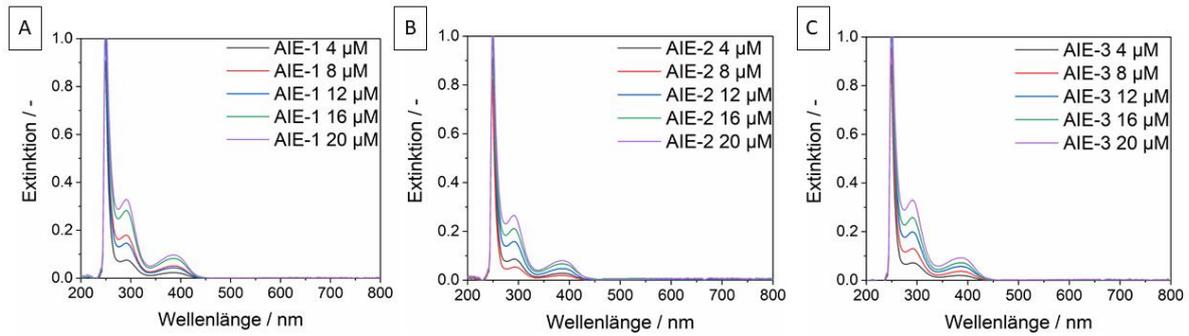


Abbildung 111: UV-Vis-Kalibrationsmessungen der freien AIE-Alkine. (A) AIE-1; (B) AIE-2; (C) AIE-3.

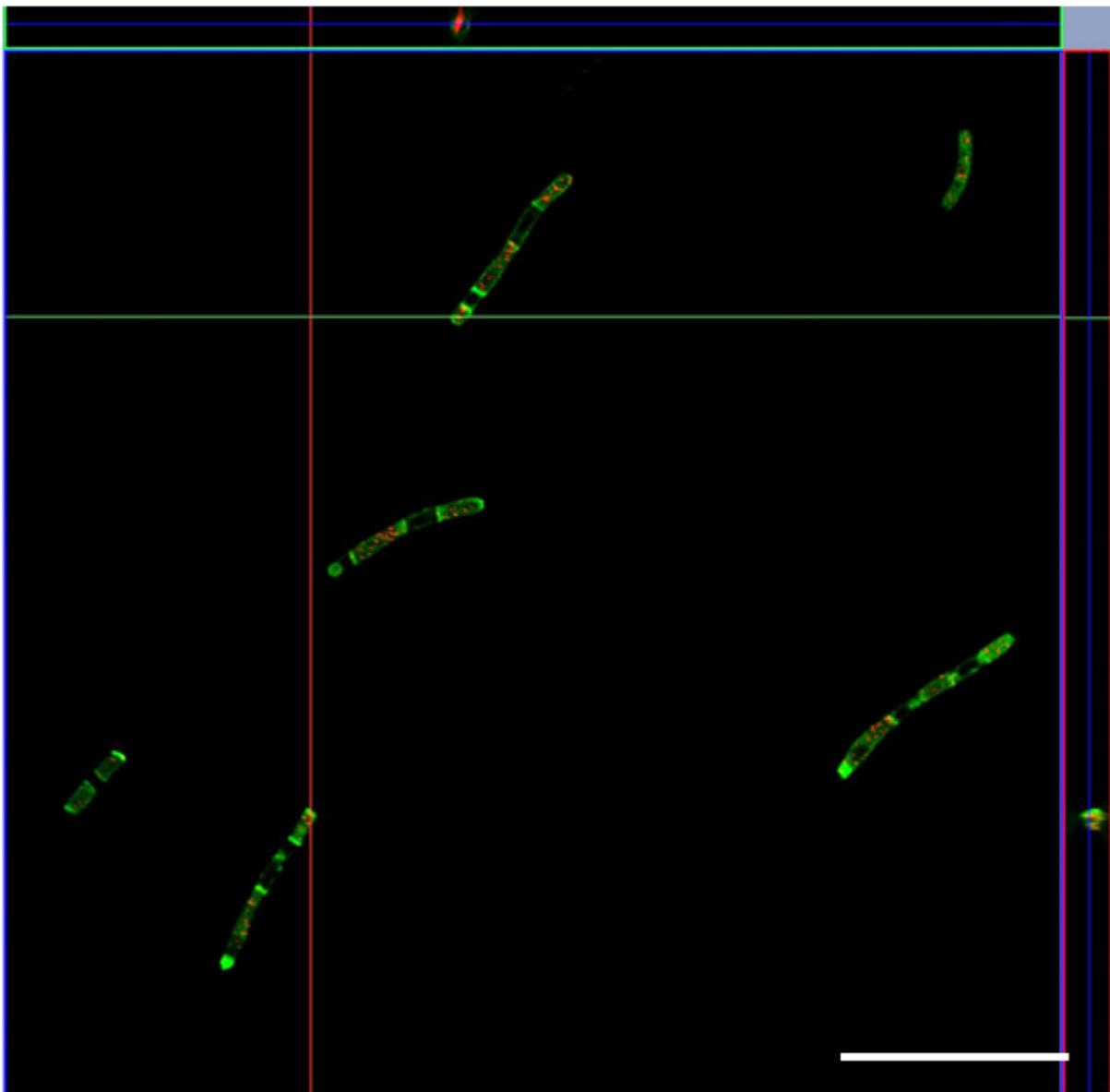


Abbildung 112: Ortho-Ansicht der Aufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in *E. coli* Bakterien. Die Bilder wurden nach 1 h Inkubationszeit von *Dr. N. Bialas* aufgenommen. Der Maßstab beträgt 5 μm .

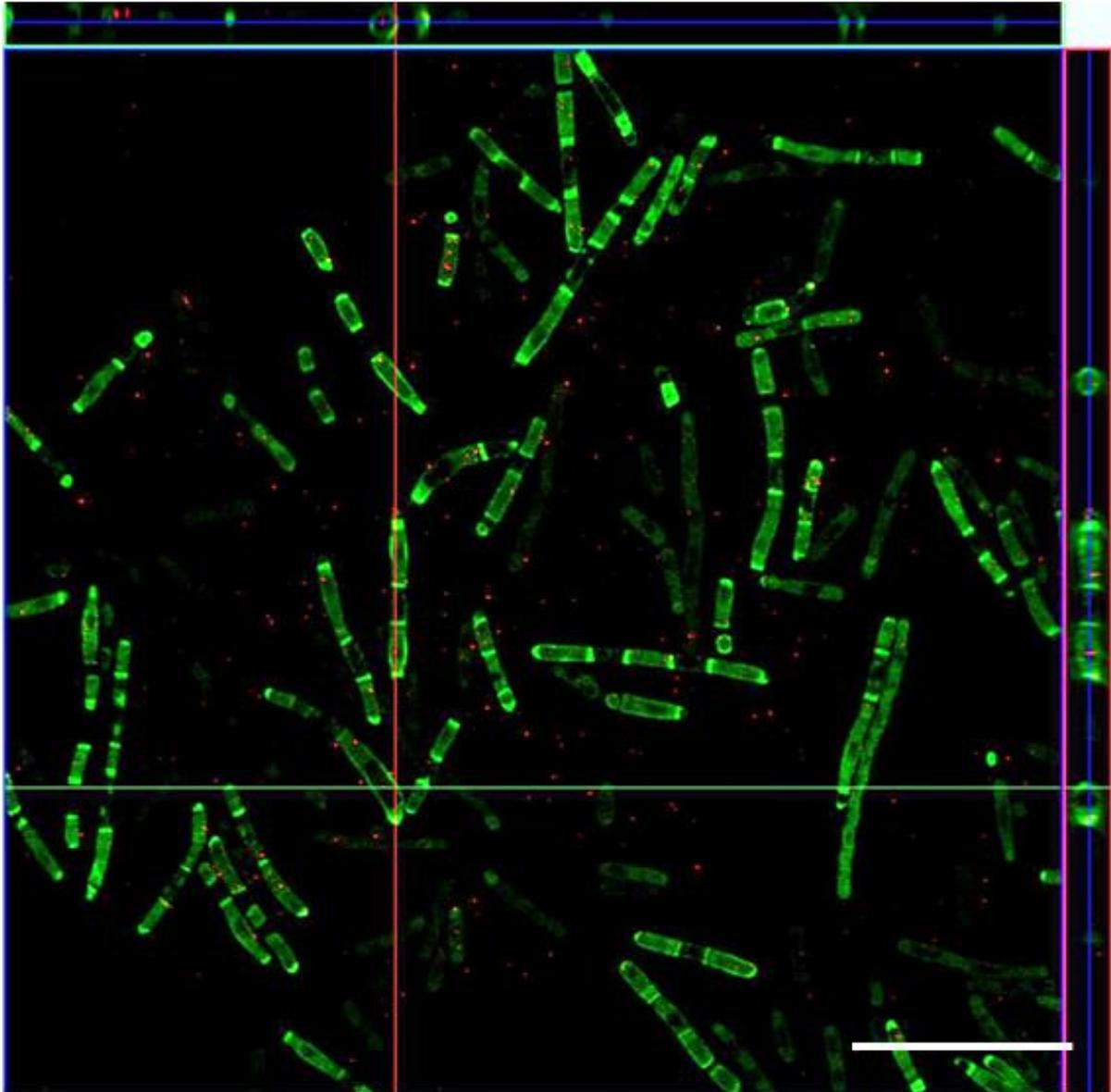


Abbildung 113: Ortho-Ansicht der Aufnahme von AuAF647 Nanopartikeln in *E. coli* Bakterien. Die Bilder wurden nach 3 h Inkubationszeit von *Dr. N. Bialas* aufgenommen. Der Maßstab beträgt 5 μm .

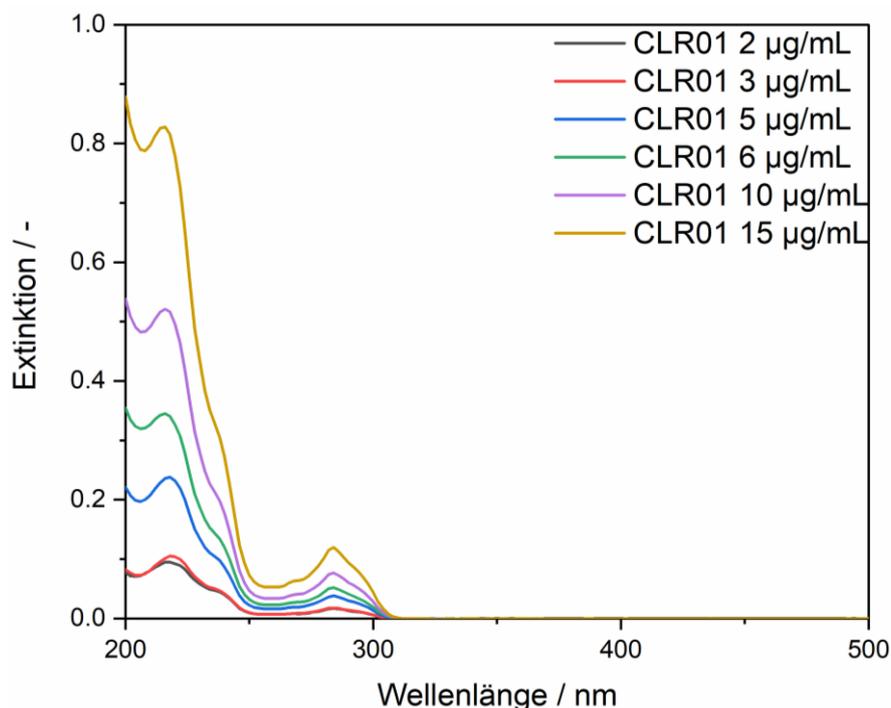


Abbildung 114: UV-Vis-Messungen verschiedener Konzentrationen von CLR01 zwecks Kalibration für eine Quantifizierung am Partikel. Mit einer molaren Masse von $778 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ betragen die gemessenen Konzentrationen $2.57 \mu\text{M}$, $3.86 \mu\text{M}$, $6.43 \mu\text{M}$, $7.71 \mu\text{M}$, $12.85 \mu\text{M}$ und $19.28 \mu\text{M}$.

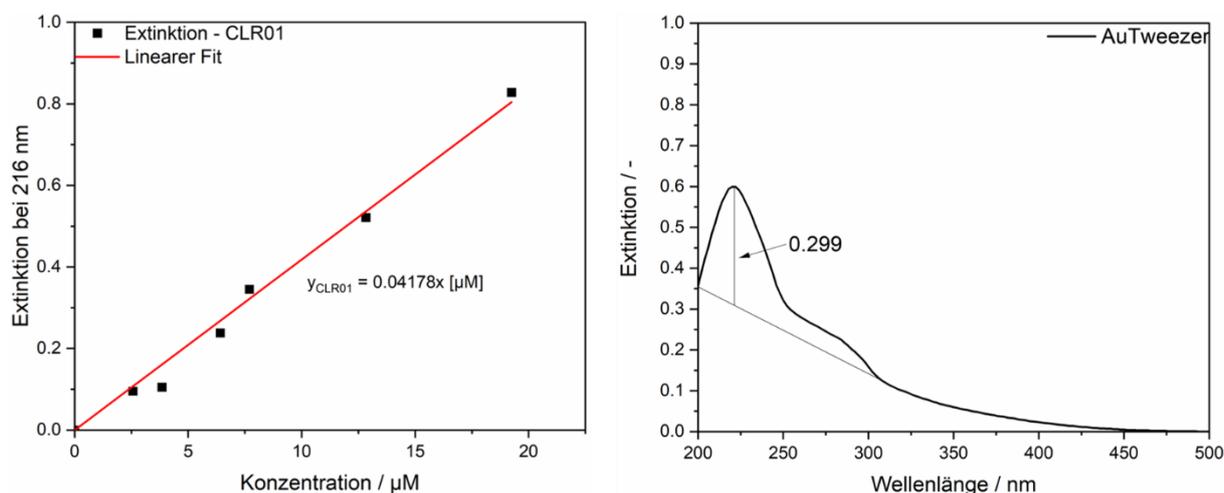


Abbildung 115: Mögliche Quantifizierung der auf die Oberfläche der ultrakleinen Goldnanopartikel geklickten molekularen Pinzetten. Ein eindeutiges Integral zu ziehen und anhand dessen zu quantifizieren wäre stark fehlerbehaftet, da die UV-Absorptionsbanden der Pinzetten (vgl. Anhang) selbst keine eindeutige Grundlinie aufweisen, sowie der Untergrund der absorbierenden Goldpartikel stark stört. Daher wurde ein theoretischer Boden gelegt, der näherungsweise den Untergrund der Partikel herausrechnet. Die Quantifizierung kann dann über die Extinktion der Pinzetten erfolgen. Die Konzentration der Nanopartikel betrug auf Gold bezogen $28 \mu\text{g/mL}$.

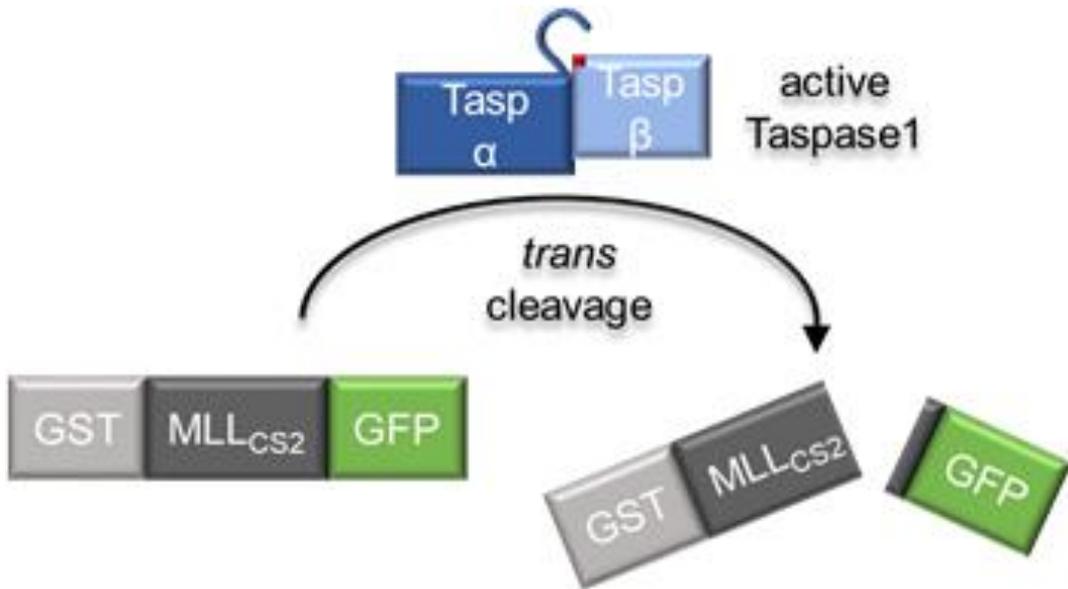


Abbildung 116: Schematische Darstellung des Spaltung des rekombinanten Fusionsproteins für enzymatische Taspase1-Aktivität.[185,196]

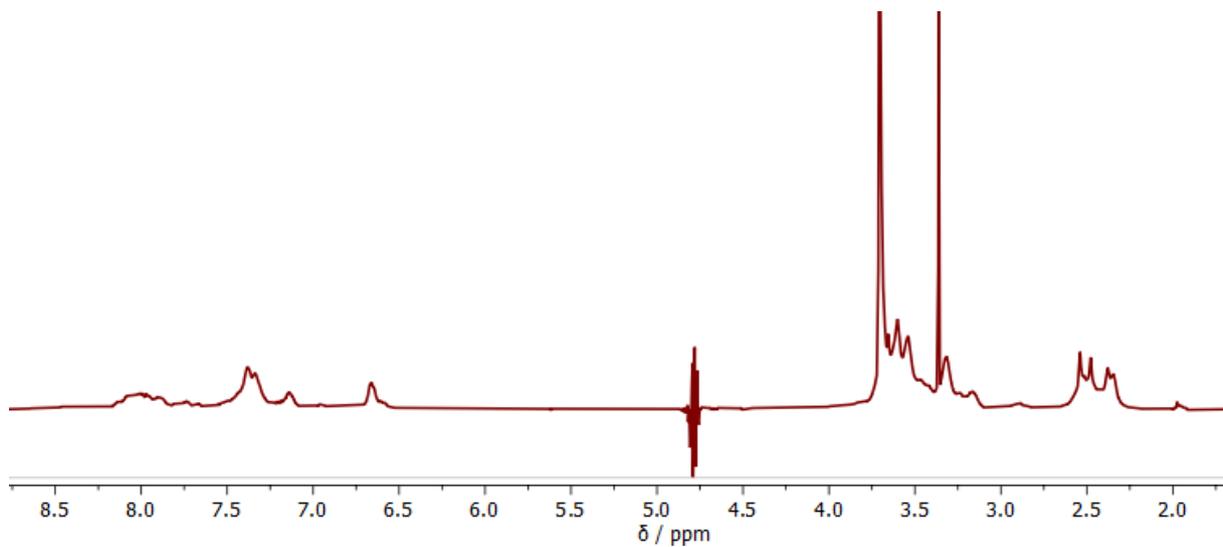


Abbildung 117: Vergrößerte Ansicht des ¹H-NMR-Spektrum von AuMakro-N₃ (400 MHz, 10% D₂O in H₂O, pH 10).

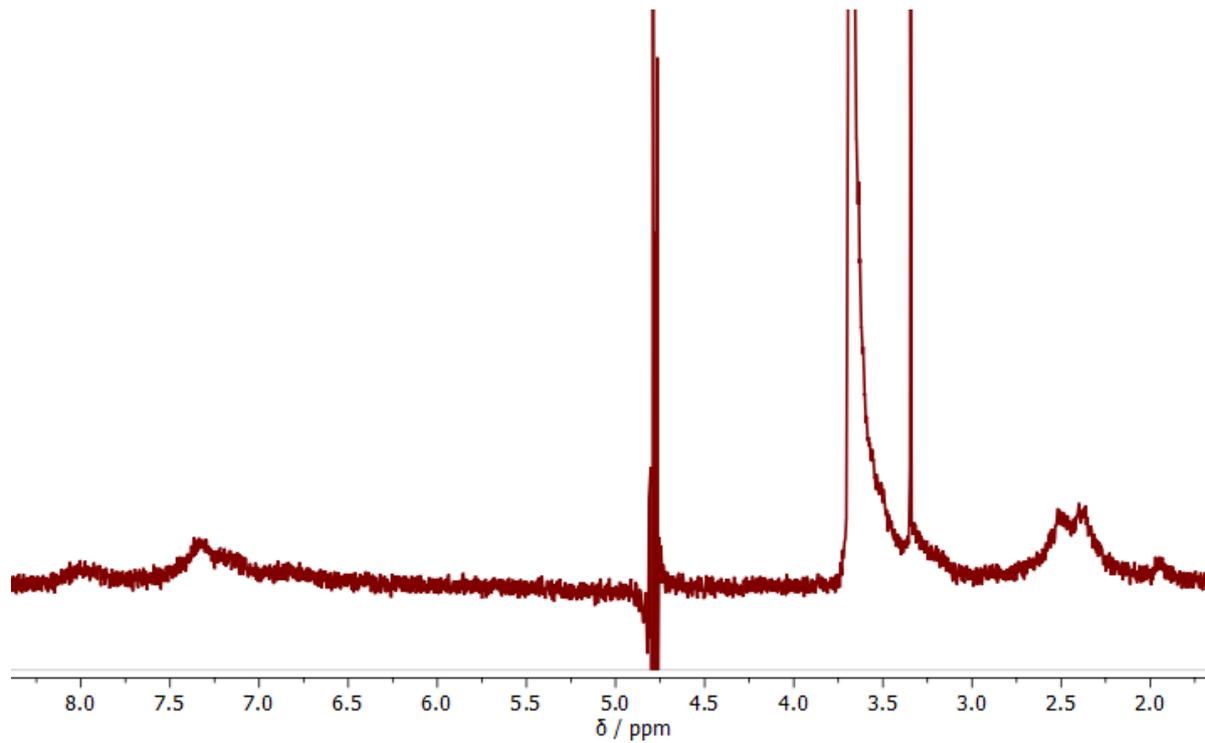


Abbildung 118: Vergrößerte Ansicht des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von AuMakro-Tweezer (400 MHz, 10% D_2O in H_2O , pH 10).

9.2. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Sonstiges
Acetonitril	Fischer Chemicals	99.8%
Alexa-Fluorophor 647 Alkin	Jena Bioscience	>95%
2-(2-Aminoethoxy)ethanol	Sigma Aldrich	98%
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich	99.99%
Benzotriazol-1-yl- oxytripyrrolidinophosphonium- hexafluorophosphat	Sigma Aldrich	>99%
Boc-L-phenylalanin-N- hydroxysuccinimid	Sigma Aldrich	>99%
Chloroform-d	Deutero	99.8%
6-Chloro-1-iodohexan	Sigma Aldrich	96%
Cyclohexan	Fischer Chemicals	99.8%
Deuteriumoxid	Deutero	99.9%
Dichlormethan	Fischer Chemicals	99.8%
Diisopropylethylamin	Sigma Aldrich	99.5%
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimid Hydrochlorid	Sigma Aldrich	99%
Dimethylformamid	AppliChem	99%
Dimethylsulfoxid	Applichem	99%
Dimethylsulfoxid-d ₆	Deutero	99.8%
Di-tert-butyldicarbonat	Sigma Aldrich	98%
Dodecan	CPS Instruments	
Ethanol	Fischer Chemicals	99.8%
Ethylacetat	Fischer Chemicals	99.8%
FAM-Alkin	Lumiprobe	97%, 5-Isomer
Glutathion	Sigma Aldrich	98%
Gold	Sparkasse	99.99%
N-Hydroxysuccinimid	Sigma Aldrich	98%
Imidazol	AppliChem	>99%
Iod	Sigma Aldrich	99.99%
Kaliumcarbonat	Sigma Aldrich	99.8%

Kupfersulfat-Pentahydrat	VWR	99%
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich	99.5%
Maleinsäure	Sigma Aldrich	>99%
Natriumascorbat	Sigma Aldrich	>98%
Natriumazid	Sigma Aldrich	>99.5%
Natriumborhydrid	Sigma Aldrich	99.99%
Natriumhydrid	Sigma Aldrich	60% in Mineralöl
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich	99.5%
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich	>97%
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich	99%
NH ₂ -PEG5-OH	MedChemExpress	94%
Pentinsäure	Sigma Aldrich	95%
Polyvinylchlorid-Suspension	CPS Instruments	d _H = 482.84 nm
Saccharose	AppliChem	Pharma grade
Salpetersäure	Acros Organics	65%
Salzsäure	VWR	37%
Schwefelsäure	Sigma Aldrich	95-98%
Sulfurylchlorid	Sigma Aldrich	97%
Tetrahydrofuran	Fischer Chemicals	99.8%
Toluol	Fischer Chemicals	99.9%
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich	99%
Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin	Jena Bioscience	>95%

9.3. Publikationsliste

- [1] T.-L. Nghiem, R. Chakroun, N. Janoszka, C. Chen, K. Klein, C. K. Wong, A. H. Gröschel, “pH-Controlled Hierarchical Assembly/Disassembly of Multicompartment Micelles in Water”, *Macromolecular Rapid Communications*, **2020**
- [2] K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Epple, “An Efficient Method for Covalent Surface Functionalization of Ultrasmall Metallic Nanoparticles by Surface Azidation Followed by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (Click Chemistry)”, *ChemNanoMat*, **2021**
- [3] K. Klein, M. Hayduk, S. Kollenda, M. Schmiedtchen, J. Voskuhl, M. Epple, “Covalent Attachment of Aggregation-Induced Emission Molecules to the Surface of Ultrasmall Gold Nanoparticles to Enhance Cell Penetration”, *Molecules*, **2022**
- [4] V. Sokolova, J.-F. Ebel, S. Kollenda, K. Klein, B. Kruse, C. Veltkamp, C. M. Lange, A. M. Westendorf, M. Epple, “Uptake of Functional Ultrasmall Gold Nanoparticles in 3D Gut Cell Models”, *Small*, **2022**
- [5] N. Białas, V. Sokolova, S. B. van der Meer, T. Knuschke, T. Ruks, K. Klein, A. M. Westendorf, M. Epple, “Bacteria (*E. coli*) take up ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) as shown by different optical microscopic techniques (CLSM, SIM, STORM)”, *NanoSelect*, **2022**
- [6] N. Wolff, S. Kollenda, K. Klein, K. Loza, M. Heggen, L. Brochhagen, O. Witzke, A. Krawczyk, I. Hilger, M. Epple, “Ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) conjugated with small-interfering RNA for gene silencing”, *Nanoscale Adv.*, **2022**, DOI: 10.1039/d2na00250g

9.4. Konferenzteilnahmen

9.4.1. Poster

- 1 CRC1093 International Symposium 2019, "*Functionalization of ultrasmall Au-Nanoparticles by utilizing the particle as solid support*", K. Klein, M. Epple.
- 2 CRC1093 International Symposium 2021, "*Functionalization of Ultrasmall Gold Nanoparticles for Protein Targeting*", K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Epple.
- 3 DGK 2022, "*Ultrasmall covalently functionalized gold nanoparticles for protein addressation*", K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Epple.
- 4 DGBM 2022, "*Ultrasmall gold nanoparticles as cell-permeable carriers*", K. Klein, S. Kollenda, M. Epple.

9.4.2. Vorträge

- 1 4th Graduate Student Symposium (CRC1093), "*Covalent Surface Functionalization of Ultrasmall Gold Nanoparticles*", K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Epple.
- 2 Nanotechnology NN22, "*Covalent surface functionalization of ultrasmall gold nanoparticles via copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC)*", K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Epple.

9.5. Eidesstattliche Erklärung

Ich bestätige hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Kovalente Oberflächenfunktionalisierung von ultrakleinen metallischen Nanopartikeln“ selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht.

Essen, den 14.09.2022

(Kai Klein)

9.6. Lebenslauf / Curriculum Vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht enthalten

9.7. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Matthias Epple dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe an diesen spannenden Themen arbeiten durfte. Außerdem danke ich für die kontinuierliche, professionelle Betreuung während der Arbeitszeit sowie für den Freiraum, verschiedene experimentelle Versuche ausprobieren zu können.

Frau Prof. Laura Hartmann danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie für einige spannende Kooperationen, die im Laufe dieser Arbeit zustande gekommen sind.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser anstrengenden Zeit stets motiviert haben weiterzumachen sowie mir immer mit hilfreichen Ratschlägen und tollen Ablenkungen von der stressigen Zeit unterstützend zur Seite standen.

Ich danke auch den anderen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Epple, die immer für einen Spaß zu haben waren und während dieser Zeit zu teils wirklich guten Freunden wurden. Insbesondere gemeint sind Dr. Sebastian Kollenda, Benedikt (Benjamin) Kruse, Jana Storsberg, Dr. Kateryna (Katja) Loza, Kathrin Kostka, Natalie Wolff, Katerina Karatzia und Nina Gumbiowski. Dank euch war die Zeit hier trotz einiger Tiefen für mich gerade zum Ende der Arbeit sehr lohnenswert, ich werde viel an diese Zeit zurückdenken.

Im Zuge dessen möchte ich auch den von mir betreuten Studierenden B. Sc. Maxim-Aleksa Wiethoff, M. Sc. Tim David Scherz, M. Sc. Lisa-Sofie Wagner und M. Sc. Jonas Sager für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Außerdem danke ich Herrn Robin Meya für die Durchführung der quantitativen Metall-Analysen an der AAS sowie für einige interessante Gespräche.

Zusätzlich danke ich meinen Kooperationspartnern Theresa Seiler und Alisa Kayser aus Düsseldorf, sowie Antonio Figueroa Bietti (AG Schrader, Uni Essen) für die Mitnahme und Übergabe von Proben, Dr. Matthias Hayduk (AG Voskuhl, Uni Essen), Joel Brenner (AG Hellerschmied, Uni Essen), Philipp Rebmann (AG Schrader, Uni Essen) für die Synthese und Bereitstellung der molekularen Pinzetten und Dr. Alexander Höing für die tolle Beratung bezüglich Taspase1 und die Bereitstellung einiger spannender Ergebnisse.

Dr. Sebastian Kollenda, Dr. Viktoriya Sokolova und Dr. Nataniel Białas danke ich nochmal gesondert für viele biologische Experimente bezüglich der Aufnahme von fluoreszierenden Nanopartikeln sowie für die umfassende Beratung zu diesem biologischen Thema.

Sabine Kiefer und Carola Fischer möchte ich zudem für die vielen organisatorischen und technischen Hilfestellungen danken.

Zuletzt sei noch erwähnt, dass ich dem SFB1093 für die Möglichkeit vieler spannender Kooperationen danke.