

# Wirkstoff-Substrat- Charakterisierung und Protein-Lokalisierung mittels Raman-Streuung

Dissertation zur Erlangung

des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Bernd Küstner**

aus Rothenburg o. d. Tauber

Würzburg, Oktober 2009

Eingereicht am: .....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Theoretische Grundlagen</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1      | Raman-Spektroskopie . . . . .   | 4         |
| 2.1.1    | Raman-Streuung . . . . .  | 4         |
| 2.1.2    | Resonanz-Raman-Streuung . . . . .   | 7         |
| 2.1.3    | Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) . . . . .                     | 11        |
| 2.2      | Metallkolloide . . . . .  | 18        |
| 2.3      | Molekulare Erkennung . . . . .  | 28        |
| <b>3</b> | <b>Charakterisierung von Wirkstoffen und Wirkstoff-Substrat-Komplexen</b> | <b>33</b> |
| 3.1      | Kenntnisstand und Aufgabenstellung . . . . .                              | 33        |
| 3.2      | Material und Methoden . . . . .   | 36        |
| 3.2.1    | Probenpräparation . . . . .   | 36        |
| 3.2.2    | Spektroskopische Methoden . . . . .                                       | 36        |
| 3.2.3    | Datenauswertung . . . . .   | 37        |
| 3.2.4    | Quantenchemische Rechnungen . . . . .                                     | 38        |
| 3.3      | Ergebnisse und Diskussion . . . . .                                       | 39        |
| 3.3.1    | Charakterisierung des Rezeptors . . . . .                                 | 39        |
| 3.3.2    | Charakterisierung des Rezeptor-Substrat-Komplexes . . . . .               | 45        |
| 3.4      | Zusammenfassung und Ausblick . . . . .                                    | 51        |
| <b>4</b> | <b>Wirkstoff-Charakterisierung auf einzelnen Festphasen-Partikeln</b>     | <b>54</b> |
| 4.1      | Kenntnisstand und Aufgabenstellung . . . . .                              | 54        |
| 4.2      | Material und Methoden . . . . .   | 57        |
| 4.2.1    | Kolloidsynthesen . . . . .  | 57        |
| 4.2.2    | Probenpräparation . . . . .   | 57        |
| 4.2.3    | Raman-Mikrospektroskopie . . . . .  | 57        |
| 4.3      | Ergebnisse und Diskussion . . . . .                                       | 58        |
| 4.4      | Zusammenfassung und Ausblick . . . . .                                    | 64        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5 Protein-Lokalisierung mittels biofunktionalisierter Gold/Silber-Nanoschalen</b> | <b>66</b>  |
| 5.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung . . . . .                                     | 67         |
| 5.2 Material und Methoden . . . . .  | 73         |
| 5.2.1 Synthese der Immun-SERS-Marker . . . . .                                       | 73         |
| 5.2.2 SERS-Mikroskopie . . . . .   | 81         |
| 5.2.3 Elektronenmikroskopie . . . . .  | 81         |
| 5.2.4 Zeta-Potential-Messungen . . . . .   | 81         |
| 5.2.5 Mie-Rechnungen . . . . .   | 82         |
| 5.3 Ergebnisse und Diskussion . . . . .  | 83         |
| 5.3.1 Goldnanoschalen als SERS-Substrate . . . . .                                   | 83         |
| 5.3.2 SERS-Marker mit gemischter Monolage . . . . .                                  | 92         |
| 5.3.3 SERS-Marker mit Silicahülle . . . . .  | 96         |
| 5.3.4 Protein-Lokalisierung in Geweben mittels SERS-Mikroskopie .                    | 103        |
| 5.4 Zusammenfassung und Ausblick . . . . .   | 106        |
| <b>6 Zusammenfassung</b>   | <b>110</b> |
| <b>7 Summary</b>   | <b>115</b> |
| <b>8 Publikationen</b>   | <b>119</b> |
| <b>Literatur</b>   | <b>121</b> |

## 1 Einleitung

Mehr als 80 Jahre nach der Entdeckung des Raman-Effekts durch den indischen Physiker Chandrasekhara Venkata Raman<sup>(1)-(4)</sup> sind in der Forschung und in der Routineanalytik verschiedenste Raman-Techniken weit verbreitet.

Die Raman-Spektroskopie wird heute unter anderem in Chemie, Pharmazie, Biologie und Medizin, sowie in den Materialwissenschaften eingesetzt. Von enormem Vorteil ist, dass die Messungen berührungs- und zerstörungsfrei sind und in den meisten Fällen eine Probenpräparation nicht nötig ist.

Die Raman-Spektren zeigen in der Regel scharfe, gut aufgelöste Schwingungsbanden und besitzen einen hohen Informationsgehalt bezüglich der chemischen Identität und der Struktur der untersuchten Moleküle. Ebenso lassen sich Wechselwirkungen der Moleküle mit ihrer Umgebung Raman-spektroskopisch verfolgen. Es können zum Beispiel polymorphe Kristallstrukturen unterschieden werden, Aussagen über die Solvatation von Molekülen getroffen werden und die Interaktionen zwischen molekularen Bindungspartnern charakterisiert werden.

In der Raman-Spektroskopie werden meist Dauerstrichlaser (*continuous wave Laser*, cw-Laser) mit definierten Wellenlängen als Anregungslinien verwendet. Argon- und Kryptonionen-Laser waren in den letzten 30 Jahren die üblicherweise eingesetzten Lichtquellen, da sie mit ihren vielen verschiedenen Laserlinien den Spektralbereich vom Ultravioletten bis ins Nah-Infrarote abdecken. Das Spektrum an verfügbaren Laser-Anregungswellenlängen hat sich mit der Zeit noch erweitert und durch die fortwährende Weiterentwicklung neuer preisgünstiger Laser, rauscharmer CCD-Detektoren mit hohen Quantenausbeuten, Hochdurchsatz-Spektrometern und holographischen Filtern sind die einst kostenintensiven Ramanexperimente für nahezu alle Forschungsbereiche interessant geworden.

Ein entscheidender Fortschritt war die Entwicklung der Raman-Mikrospektroskopie, einer Kombination aus optischem Mikroskop und Raman-Spektrometer, da diese zum einen die Untersuchung kleinster Probenmengen erlaubt und zum anderen die orts aufgelöste Aufnahme von Raman-Spektren ermöglicht. Durch Abrastern einer Probe unter dem Raman-Mikroskop kann die räumliche Verteilung einzelner chemischer Bestandteile in Form von Falschfarnebildern visualisiert werden.

Die geringe Raman-Streuung von Wasser als wichtigstem Lösungsmittel bei Fragestellungen aus den Lebenswissenschaften erlaubt den Einsatz der Raman-Spektroskopie im nativen Umfeld der Proben. So können beispielsweise in der Biophysik Proteine und Zellen direkt in wässriger Umgebung ohne aufwändige Vorbehandlung untersucht werden.<sup>(5)</sup> Auch in der klinischen Forschung wird die Raman-Spektroskopie in den letzten Jahren zunehmend zur Untersuchung biomedizinischer Fragestellungen eingesetzt. Die frühe Detektion von Krebs, die Verfolgung von Änderungen der Haut während medikamentöser Therapie und die schnelle Identifizierung pathogener Mikroorganismen sind einige Beispiele.<sup>(6),(7)</sup>

Bei biologischen Fragestellungen erlaubt eine Laseranregung im roten bis nah-infraroten Spektralbereich die weitgehende Vermeidung der Eigenfluoreszenz der Proben, der so genannten Autofluoreszenz. Gleichzeitig werden durch die größeren Eindringtiefen des Laserlichts zum Beispiel in Geweben Untersuchungen bis in tiefer liegende Schichten möglich.

Auf Grund der geringen Effizienz der Raman-Streuung ist in vielen Anwendungsgebieten der Einsatz spezieller Verstärkungstechniken nötig, um ein messbares Raman-Signal zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Resonanz-Raman-Streuung und die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS) als zwei unterschiedliche Techniken zur Signal-Verstärkung angewendet.

Kapitel 3 behandelt die Raman-spektroskopische Untersuchung von Peptidrezeptoren in verdünnten wässrigen Lösungen. Mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie werden selektiv die Raman-Banden des bindungsrelevanten Teils der Rezeptormoleküle verstärkt, um in Bindungsstudien deren Komplexierung mit Substraten (Zielmolekülen, englisch: *targets*) zu verfolgen. Die spektralen Änderungen während der Komplexierung sollen Hinweise auf die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und dem Substrat liefern.

Die ultrasensitive und selektive Charakterisierung von festphasengebundenen Substanzen wird in Kapitel 4 behandelt. Festphasengebundene Substanzen finden

heutzutage vielfältigen Einsatz in der Chemie, um Nukleinsäuren, Peptide oder Kohlenhydrate zu synthetisieren. In der Regel wird dabei ein vernetztes Polystyrolharz mit einer Beladung von einigen 100 pmol Substanz pro Harzkügelchen verwendet. Mithilfe der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) wird gezeigt, wie der Nachweis von festphasengebundenen Substanzen auf einzelnen Harzkügelchen erreicht werden kann. Hierzu werden plasmonisch-aktive Silber-Nanopartikel zur Signalverstärkung auf der Oberfläche der Harzkügelchen eingesetzt.

In Kapitel 5 werden nanoskalige Markierungsreagenzien für biomedizinische Anwendungen vorgestellt. Die Detektion dieser neuen Marker basiert auf dem oberflächenverstärkten Raman-Effekt (SERS). Plasmonisch-aktive Edelmetall-Nanopartikel, die mit Raman-aktiven Molekülen bedeckt sind, geben bei Laserbestrahlung ein charakteristisches Streuspektrum ab. An diese SERS-Marker können Biomoleküle wie zum Beispiel Antikörper konjugiert werden und nach Laserbestrahlung eindeutig identifiziert werden.

Die Anwendung dieser biofunktionalisierten Nanopartikel wird abschließend am Beispiel der spezifischen Lokalisierung des prostataspezifischen Antigens (PSA) in Prostatageweben gezeigt.



## 2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der Raman-Spektroskopie und die in dieser Arbeit angewandten Techniken zur Verstärkung der Raman-Streuung vorgestellt. Anschließend werden kurz die Grundlagen zur Synthese und Stabilität von Nanopartikeln, zur molekularen Erkennung und zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen beschrieben.

### 2.1 Raman-Spektroskopie

#### 2.1.1 Raman-Streuung

Werden Moleküle mit monochromatischem Licht der Frequenz  $\nu_0$  - typischerweise einem Laser - bestrahlt, wird ein Teil des Lichts in alle Raumrichtungen gestreut. Die spektrale Analyse zeigt, dass die Hauptkomponente des Streulichts die gleiche Frequenz  $\nu_0$  des eingestrahnten Lichts besitzt, also elastisch gestreut wird.

Neben dieser elastischen Rayleigh-Streuung werden mit deutlich geringerer Intensität andere Komponenten mit diskreten, von  $\nu_0$  verschiedenen Frequenzen detektiert, welche charakteristisch für ein bestimmtes Molekül sind. Der indische Physiker Chandrasekhara Venkata Raman beobachtete 1928 als Erster das nach ihm benannte, inelastisch gestreute Licht.<sup>(2)-(4),(8)</sup> Der Raman-Effekt wurde einige Jahre vor seiner Entdeckung von Smekal (1923),<sup>(9)</sup> Kramers und Heisenberg (1925),<sup>(10)</sup> Schrödinger (1926)<sup>(11)</sup> und Dirac (1927)<sup>(12)</sup> im Zuge der Quantenmechanik vorhergesagt.

Im klassischen Bild kann der Raman-Effekt als Wechselwirkung eines Moleküls mit einer elektromagnetischen Welle erklärt werden. Trifft Licht mit der Frequenz  $\nu_0$  und der elektrischen Feldstärke  $E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$  auf ein Molekül, so wird im Molekül ein oszillierendes Dipolmoment induziert:

$$\mu = \bar{\alpha} \cdot E, \tag{1}$$

mit  $\bar{\alpha}$  der Polarisierbarkeit.

Die Intensität  $I$  der elektromagnetischen Strahlung, die von diesem Hertzschen Dipol abgestrahlt wird, ist proportional zur zweiten Ableitung des induzierten Dipols nach

der Zeit:

$$I \sim |\ddot{\mu}|^2. \quad (2)$$

Die richtungsabhängige Polarisierbarkeit  $\bar{\alpha}$  des Moleküls kann durch einen zweistufigen Tensor beschrieben werden:

$$\bar{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}. \quad (3)$$

Durch periodische Molekülschwingungen ergibt sich eine zeitliche Änderung der Polarisierbarkeit. Wenn die Frequenz  $\nu_0$  der einfallenden elektromagnetischen Welle weit außerhalb einer elektronischen Absorptionsbande des Moleküls liegt, ist die Auslenkung der Atome aus der Gleichgewichtslage bei Schwingungen klein. Die Polarisierbarkeit  $\alpha$  kann dann für eine Normalmode der Frequenz  $\nu_{vib}$  als Taylor-Reihe nach der Normalkoordinate  $Q_\alpha$  um die Gleichgewichtslage entwickelt werden:

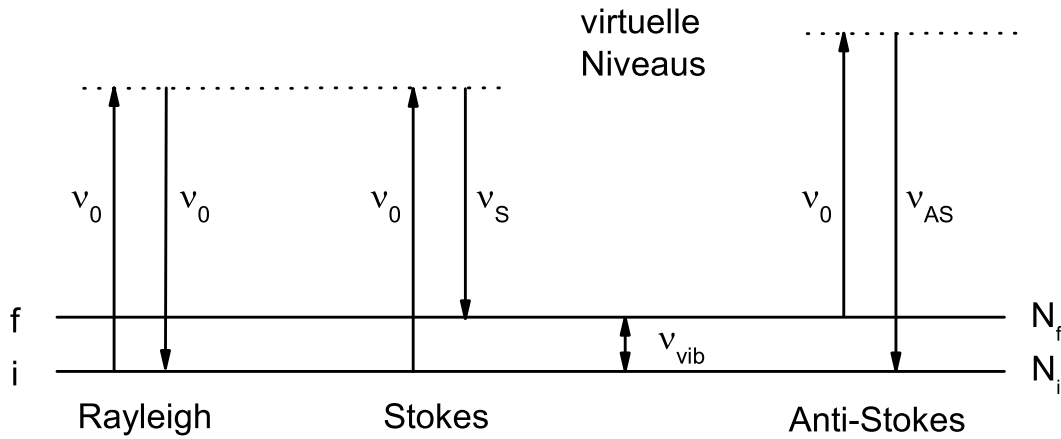
$$\bar{\alpha} = \bar{\alpha}_0 + \left( \frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_\alpha} \right)_0 A_{vib} \cos 2\pi \nu_{vib} t. \quad (4)$$

Einsetzen dieses Ausdrucks in Gl. 1 ergibt:

$$\begin{aligned} \mu &= \bar{\alpha}_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \\ &+ \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_\alpha} \right)_0 E_0 A_{vib} \cos 2\pi (\nu_0 - \nu_{vib}) t \\ &+ \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_\alpha} \right)_0 E_0 A_{vib} \cos 2\pi (\nu_0 + \nu_{vib}) t. \end{aligned}$$

Der erste Term beschreibt die Rayleigh Streuung, der zweite und dritte Term den Stokes- bzw. Anti-Stokes-Anteil der Raman-Streuung. In Abb. 1 ist zu sehen wie bei der Raman-Streuung das Molekül in einen anderen Schwingungszustand versetzt wird. Nach dem Stokes-Prozess befindet sich das Molekül in dem höheren Schwingungszustand  $f$  und die Stokes-Streuung besitzt eine niedrigere Frequenz bzw. größere Wellenlänge als das eingestrahlte Laserlicht. Für den Anti-Stokes-Prozess muss sich das Molekül bereits in einem angeregten Schwingungszustand (hier:  $f$ ) befinden, um Strahlung mit höherer Frequenz bzw. kürzerer Wellenlänge zu emittieren. Nach der Boltzmann-Verteilung kann das Verhältnis der Intensitäten von Anti-Stokes- und Stokes-Raman-Banden berechnet werden:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left( \frac{\nu_0 + \nu_{vib}}{\nu_0 - \nu_{vib}} \right)^4 \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{E_{vib}}{kT}}, \quad (5)$$



**Abb. 1:** Energieniveau-Darstellung der elastischen Rayleigh-Streuung, inelastischen Stokes- und Anti-Stokes-Raman-Streuung im elektronisch nicht-resonanten Fall.

mit  $g_1, g_0$  dem Entartungsgrad der Schwingungszustände.

Da die Besetzung vibronisch angeregter Zustände um den Faktor  $e^{-\frac{E_{\text{vib}}}{kT}}$  kleiner als im Grundzustand ist, sind die Intensitäten der entsprechenden Anti-Stokes-Linien im Spektrum erheblich geringer als die der Stokes-Linien, welche aus der Wechselwirkung des einfallenden Lichts mit Molekülen im Grundzustand herrühren.

### 2.1.2 Resonanz-Raman-Streuung

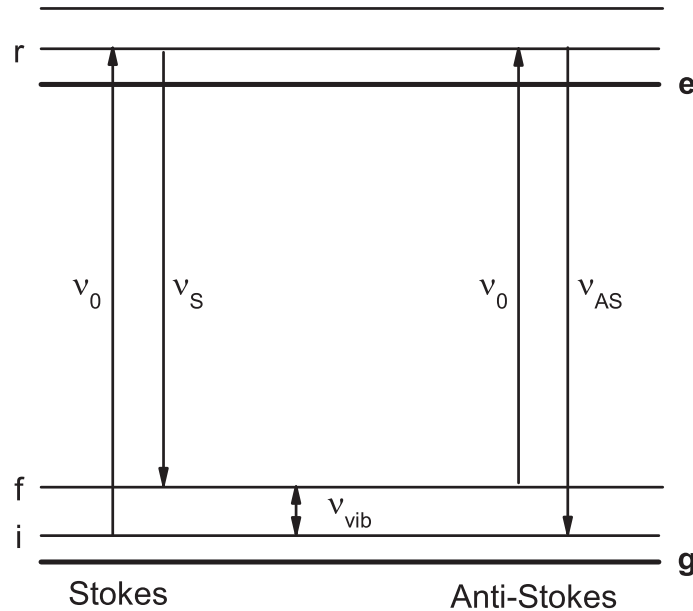
Die folgende Beschreibung der Resonanz-Raman-Streuung basiert auf in Monographien erschienenen Darstellungen von H. Hamaguchi<sup>(13)</sup> sowie R. H. Felton und N.-T. Yu.<sup>(14)</sup>

Während bei der Raman-Streuung nur eines von ungefähr  $10^6$  Photonen inelastisch gestreut wird, erlaubt der Resonanz-Raman-Effekt die selektive Verstärkung der Intensität einiger Raman-Banden um mehrere Größenordnungen. Hierzu muss die Anregungswellenlänge des Lasers auf einen elektronischen Übergang des Moleküls abgestimmt werden.

Die gesamte Raman-Intensität im Raumwinkel  $4\pi$  eines zufällig orientierten Moleküls ist im Rahmen des halbklassischen Ansatzes gegeben durch:

$$I_{fi} = CI_0\nu_{sc}^4 \sum_{\rho,\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{fi}|^2, \quad (6)$$

wobei  $I_0$  die eingestrahlte Intensität bei der Anregungsfrequenz  $\nu_0$  des Lasers,  $C$  eine vom verwendeten Einheitensystem abhängige Konstante und  $\nu_{sc} = \nu_0 \pm \nu_{fi}$  die Frequenz der verschobenen Stokes- bzw. Anti-Stokes-Streustrahlung bei einem Raman-Übergang vom Zustand  $i$  nach  $f$  sind.



**Abb. 2:** Energieniveau-Darstellung der Resonanz-Raman-Streuung. Die Frequenz  $\nu_0$  des anregenden Lasers ist in Resonanz mit einem elektronisch angeregten Zustand des Moleküls.

Ausgehend von der Kramers–Heissenberg–Dirac (KHD)–Dispersionsrelation:<sup>(14)</sup>

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \sum_r \left\{ \frac{\langle f|R_\rho|r\rangle\langle r|R_\sigma|i\rangle}{\hbar(\nu_r - \nu_i - \nu_0) - i\Gamma_r} + \frac{\langle f|R_\sigma|r\rangle\langle r|R_\rho|i\rangle}{\hbar(\nu_r - \nu_f + \nu_0) - i\Gamma_r} \right\} \quad (7)$$

werden mit

$$\begin{aligned} |i\rangle &= |g\rangle|v_i\rangle \\ |f\rangle &= |g\rangle|v_f\rangle \\ |r\rangle &= |e\rangle|v_e\rangle \end{aligned} \quad (8)$$

adiabatische Born-Oppenheimer-Näherungen für den Anfangszustand  $|i\rangle$ , den Endzustand  $|f\rangle$  und einen beliebigen angeregten Zustand  $|r\rangle$  eingeführt. Man erhält:<sup>(14)</sup>

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{gv_f,gv_i} = \sum_{e,v_e} \left\{ \frac{\langle gv_f|R_\rho|ev_e\rangle\langle ev_e|R_\sigma|gv_i\rangle}{\hbar(\nu_{ev_e} - \nu_{gv_i} - \nu_0) - i\Gamma_{ev_e}} + \frac{\langle gv_f|R_\sigma|ev_e\rangle\langle ev_e|R_\rho|gv_i\rangle}{\hbar(\nu_{ev_e} - \nu_{gv_f} + \nu_0) - i\Gamma_{ev_e}} \right\}. \quad (9)$$

Der Nenner des ersten Summanden wird sehr klein, wenn die Resonanzbedingung  $(\hbar\nu_{ev_e} - \hbar\nu_{gv_i}) \approx \nu_0$  erfüllt ist. Folglich wird bei der Betrachtung des Resonanz-Raman-Effekts der zweite Summand vernachlässigt.

Um die Abhängigkeit der elektronischen Wellenfunktionen von den Normalkoordinaten  $Q_\alpha$  zu beschreiben, werden analog zu Gl. 4 in Kap. 2.1 diese in einer Taylor-Reihe um die Gleichgewichtslage des elektronischen Grundzustands entwickelt (Herzberg-Teller-Erweiterung):<sup>(13)</sup>

$$\begin{aligned} |e\rangle &= |e_0\rangle + \sum_\alpha \sum_{e \neq s} \frac{\langle s_0|h_\alpha|e_0\rangle}{\hbar(\nu_{e0} - \nu_{s0})} Q_\alpha |s_0\rangle \\ |g\rangle &= |g_0\rangle + \sum_\alpha \sum_{g \neq t} \frac{\langle t_0|h_\alpha|g_0\rangle}{\hbar(\nu_{g0} - \nu_{t0})} Q_\alpha |t_0\rangle. \end{aligned} \quad (10)$$

Die Größe  $h_\alpha = \left( \frac{\partial H_{el,vib}}{\partial Q_\alpha} \right)_0$  ist der vibronische Kopplungsoperator.  $|e_0\rangle$ ,  $|g_0\rangle$ ,  $|s_0\rangle$  und  $|t_0\rangle$  sind die von den Normalkoordinaten  $Q$  unabhängigen elektronischen Wellenfunktionen. Durch Einsetzen von Gl. 10 in Gl. 9 erhält man die so genannten Albrecht-Terme. Der C-Term, der durch Einsetzen der Erweiterung von  $|g\rangle$  erhalten wird, ist im Folgenden vernachlässigt.<sup>(13)</sup>

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{gv_f,gv_i} = A_{\rho\sigma} + B_{\rho\sigma} \quad (11)$$

mit

$$A_{\rho\sigma} = \sum_{e \neq g} \sum_{v_e} \frac{M_{g_e}^\rho M_{e_g}^\sigma \langle gv_f | ev_e \rangle \langle ev_e | gv_i \rangle}{\hbar(\nu_{ev_e} - \nu_{gv_i} - \nu_0) - i\Gamma_{ev_e}} \quad (12)$$

und

$$B_{\rho\sigma} = \sum_{e \neq g} \sum_{s \neq e} \sum_{v_e} \sum_{\alpha} \frac{\langle s_0 | h_\alpha | e_0 \rangle}{(\hbar\nu_{e0} - \hbar\nu_{s0})(\hbar\nu_{ev_e} - \hbar\nu_{gv_i} - \hbar\nu_0 - i\Gamma_{ev_e})} \quad (13)$$

$$\times [M_{g_s}^\rho M_{e_g}^\sigma \langle gv_f | Q_\alpha | ev_e \rangle \langle ev_e | gv_i \rangle + M_{g_s}^\sigma M_{e_g}^\rho \langle gv_f | ev_e \rangle \langle ev_e | Q_\alpha | gv_i \rangle].$$

Die Größe  $M_{g_e}^\rho \equiv \langle g_0 | R_\rho | e_0 \rangle$  ist das rein elektronische Übergangsmoment;  $\langle gv_f | ev_e \rangle$  ist das Schwingungs-Überlapp-Integral zwischen dem elektronischen Grundzustand  $|g_0\rangle$  im  $\nu_f$ -ten Schwingungszustand und einem elektronisch angeregten Zustand  $|e_0\rangle$  im  $\nu_e$ -ten Schwingungszustand.

Der Zähler des A-Terms in Gl. 12 enthält zwei Franck-Condon (FC)-Integrale und  $|M_{g_e}^\rho|^2$ , das Quadrat des rein elektronischen Übergangsmoments. Die FC-Integrale  $\langle g_1 | e_0 \rangle$  oder  $\langle e_1 | g_0 \rangle$  sind nur bei totalsymmetrischen Schwingungen ungleich Null.<sup>(15)</sup> Eine weitere Bedingung für Resonanz-Raman-Streuung nach dem A-Term ist, dass die Gleichgewichtsgeometrie des angeregten Zustands entlang den symmetrischen Moden im Vergleich zur Gleichgewichtsgeometrie des Grundzustands verschoben sein muss. Auf Grund des quadratisch in Gl. 12 eingehenden Übergangsdipolmoments werden bei stark dipolerlaubten Übergängen die polarisierten Moden das Resonanz-Raman-Spektrum dominieren. Bei Anregung in schwach dipolerlaubte Absorptionsbanden, wie z. B. die Q-Bande in Metalloporphyrinen, erfahren totalsymmetrische  $a_{1g}$ -Moden nur eine schwache Resonanzverstärkung.<sup>(13)</sup>

Der Anteil des B-Terms am Resonanz-Raman-Effekt kommt von der so genannten „geborgten Intensität“ oder vom verbotenen Charakter des  $|e\rangle \leftarrow |g\rangle$ -Übergangs, dessen Verstärkung proportional zu  $\left| \frac{\langle g_0 | R_\rho | s_0 \rangle \langle s_0 | h_\alpha | e_0 \rangle}{\hbar(\nu_{e0} - \nu_{s0})} \right|^2$  ist. Deshalb benötigt die Raman-Streuung nach dem B-Term einen zweiten elektronisch anregbaren Zustand  $|s\rangle$ , dessen Übergang aus dem elektronischen Grundzustand dipolerlaubt ( $\langle g_0 | R_0 | s_0 \rangle \neq 0$ ) und die vibronische Kopplung mit  $|e\rangle$  signifikant gross sein muss ( $\frac{\langle s_0 | h_\alpha | e_0 \rangle}{\hbar(\nu_{e0} - \nu_{s0})} \neq 0$ ).

Der schwingungsrelevante Teil des B-Terms enthält die Integrale  $\langle v_i | Q_\alpha | v_e \rangle$  und  $\langle v_e | Q_\alpha | v_f \rangle$ ; dadurch kann es zu einem Übergang mit Änderung der Schwingungsquantenzahl um 1 kommen, auch wenn die Minima der Potentiale von  $|e\rangle$  und  $|g\rangle$  entlang einer Normalmode nicht verschoben sind.<sup>(14)</sup> Somit können Übergänge, die

## 2 Theoretische Grundlagen

---

mit nicht-totalsymmetrischen Schwingungen verbunden sind, an Intensität gewinnen. Im Gegensatz zum A-Term werden bei Streuung nach dem B-Term jedoch keine Obertöne ( $\Delta v > 1$ ) erwartet.<sup>(14)</sup>

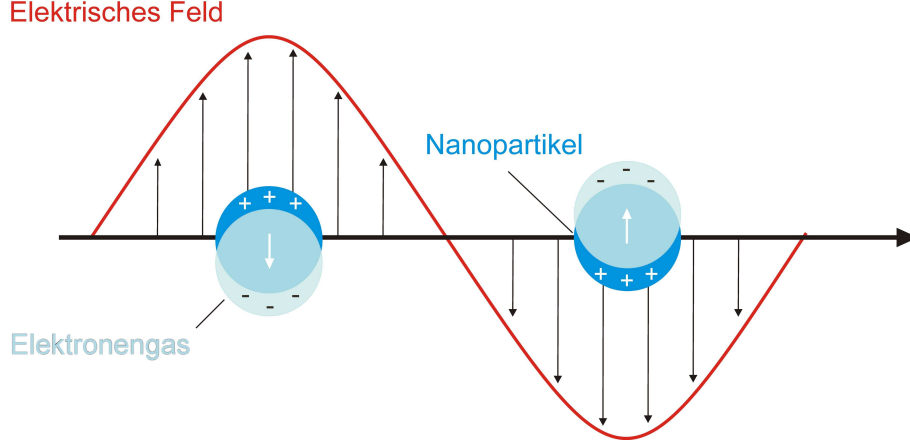
### 2.1.3 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS) ist eine ultrasensitive Variante der Raman-Streuung für Moleküle in der Nähe plasmonisch-aktiver Nanostrukturen. Die physikalischen Grundlagen dieses 1977 entdeckten Phänomens sind heute zwar weitgehend verstanden, doch extreme Verstärkungen des Raman-Signals bestimmter Moleküle sind immer noch nicht eindeutig geklärt.<sup>(16)</sup> Da die Intensität der Raman-Streuung proportional zum Quadrat des induzierten Dipolmoments  $\mu = \bar{\alpha} \cdot E$  ist (siehe Kapitel 2.1), kann eine Verstärkung sowohl über die Polarisierbarkeit  $\bar{\alpha}$ , als auch über die Erhöhung des elektrischen Feldes  $E$  erfolgen. Der wichtigste Beitrag ist unumstritten der Einfluss der elektromagnetischen Verstärkung: durch die optische Anregung von Oberflächenplasmonen wird ein erhöhtes elektromagnetisches Feld im Nahfeld nanostrukturierter Metalle erzeugt. Moleküle, die sich in diesem Nahfeld befinden, sind höheren elektrischen Feldern ausgesetzt, und die Intensität der Raman-Streuung wird verstärkt. Gold und Silber eignen sich besonders zur Herstellung von Substraten für die SERS-Spektroskopie, weil hier Plasmonen im sichtbaren Spektralbereich angeregt werden können, die zu einer Verstärkung des elektrischen Felds führen. Die am häufigsten eingesetzten SERS-Substrate sind Nanopartikel, aufgeraute Elektroden oder raue Filme aus Gold und Silber. Die besonderen optischen Eigenschaften von Silber- und Gold-Nanostrukturen hängen maßgeblich von den dielektrischen Funktionen der Metalle ab.

#### Partikelplasmon

Die optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln lassen sich weitgehend mit dem in Abb. 3 dargestellten Bild der Wechselwirkung mit einem elektromagnetischen Feld erklären.<sup>(17)</sup> Nach dem Drude-Modell liegen die Leitungsbandelektronen des Metalls als Elektronengas vor und erfahren durch die Wechselwirkung mit dem einfallenden elektromagnetischen Feld eine Auslenkung relativ zu den positionsfesten positiv geladenen Atomkernen. Die dabei entstehende Coulomb-Anziehung zwischen Leitungsbandelektronen und Atomrümpfen bewirkt eine Rückstellkraft. Das Elektronengas oszilliert als klassischer getriebener Oszillator mit der Frequenz des eingestrahlten Lichts. Die kollektive Anregung des Elektronengases zu Schwingun-





**Abb. 3:** Optische Anregung einer kollektiven Schwingung des Elektronengases in einem Edelmetall-Nanopartikel. Die Resonanzfrequenz hängt hauptsächlich von dem Material sowie Größe und Form des Nanopartikels ab.

gen wird als Plasmon bezeichnet. Durch die Beschleunigung von Ladungen kommt es zu einer Emission von elektromagnetischer Strahlung mit der Frequenz des anregenden Lichts.

Die Resonanzbedingungen für Plasmonen lassen sich unter Verwendung der komplexen dielektrischen Funktion der Metalle berechnen. Als einfaches Modell für Partikel, die viel kleiner sind als die Wellenlänge des Lichts, kann die sogenannte Rayleigh-Näherung verwendet werden. Diese Näherung ist für Metallpartikel mit einem Durchmesser kleiner 40 nm anwendbar, da hier die Amplitude und die Phase des elektrischen Feldes räumlich im Partikel als nahezu konstant angesehen werden können. Die wellenlängenabhängigen Streu- und Absorptionsquerschnitte für ein einzelnes Partikel ergeben sich zu:<sup>(18)</sup>

$$\sigma_{sca} = \frac{k^4}{6\pi} \left| \left( \frac{\alpha}{\epsilon_0} \right) \right|^2 = \frac{8\pi^3}{3\lambda^4} \left| \left( \frac{\alpha}{\epsilon_0} \right) \right|^2 \quad (14)$$

$$\sigma_{abs} = k \operatorname{Im} \left( \frac{\alpha}{\epsilon_0} \right) = \frac{2\pi}{\lambda} \operatorname{Im} \left( \frac{\alpha}{\epsilon_0} \right), \quad (15)$$

mit  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  und der Polarisierbarkeit  $\alpha$  aus der Clausius-Mossotti-Beziehung:

$$\alpha = 3V\epsilon_0 \left| \frac{\epsilon_{Metall} - \epsilon_{Matrix}}{(\epsilon_{Metall} + 2\epsilon_{Matrix})} \right|. \quad (16)$$

Gl. 16 beschreibt die Polarisierbarkeit  $\alpha$  eines sphärischen Partikels in Abhängigkeit von der (komplexen) dielektrischen Funktion des Metalls  $\epsilon_{Metall} = \epsilon'_{Metall} + i\epsilon''_{Metall}$ ,

des Mediums  $\epsilon_{Matrix}$  und dem Partikelvolumen  $V$ .

Es wird ersichtlich, dass der Streuquerschnitt quadratisch mit dem Volumen des Partikels ansteigt, während sich für den Querschnitt der Absorption eine lineare Abhängigkeit ergibt. Die Resonanzbedingung für Absorption und Streuung ist nach Gleichungen 14 und 15 erfüllt, wenn der Nenner in Gl. 16 minimal wird:

$$|\epsilon_{Metall} + 2\epsilon_{Matrix}| = \min \Rightarrow (\epsilon'_{Metall} + 2\epsilon_{Matrix})^2 + (\epsilon''_{Metall})^2 = \min. \quad (17)$$

Wenn der wellenlängenabhängige Imaginärteil der dielektrischen Funktion  $\epsilon''$  klein ist oder deren Ableitung nach der Wellenlänge gegen Null geht, erhält man:

$$\epsilon'_{Metall}(\omega_{res}) = -2\epsilon_{Matrix}. \quad (18)$$

Dementsprechend muss das Verhältnis des Realteils der dielektrischen Funktion des Metalls zum Medium gleich -2 sein, um die Resonanzbedingung zur Anregung eines Plasmons zu erfüllen.

Die Rayleigh-Näherung erlaubt für kleine Partikel eine gute Vorhersage der Resonanzfrequenz. Die exakte Berechnung der Streu- und Absorptionsquerschnitte von sphärischen Partikeln sind allerdings durch die Mie-Theorie gegeben. Die Streu-, Extinktions- und Absorptionsquerschnitte werden in der Mie-Theorie berechnet durch:<sup>(18)</sup>

$$\sigma_{sca} = \frac{W_{sca}}{I_{in}} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \cdot (|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (19)$$

$$\sigma_{ext} = \frac{W_{ext}}{I_{in}} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \cdot \text{Re}(a_L + b_L) \quad (20)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca}, \quad (21)$$

wobei  $I_{in}$  die Intensität des einfallenden Lichts und  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  den Wellenvektor der einfallenden Lichtwelle beschreibt. Mit den Mie-Koeffizienten  $a_L$  und  $b_L$  werden die Kugelflächenfunktionen außerhalb des Partikels nach den Multipolordnungen  $L$  entwickelt:

$$a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi'_L(x) - \psi_L(x)\psi'_L(mx)}{m\psi_L(mx)\xi'_L(x) - \xi_L(x)\psi'_L(mx)} \quad (22)$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi'_L(x) - m\psi_L(x)\psi'_L(mx)}{\psi_L(mx)\xi'_L(x) - m\xi_L(x)\psi'_L(mx)}. \quad (23)$$

Mit  $m = \frac{n_{Metall}}{n_{Matrix}}$  dem relativen Brechungsindex des Partikelmaterials zur Umgebung und den Riccati-Bessel-Funktionen  $L$ -ter Ordnung  $\psi_L$  und  $\xi_L$ . Der Größenparameter (Mie-Parameter)  $x = \frac{2\pi r}{\lambda}$  ist das Verhältnis vom Partikelradius  $r$  zur Wellenlänge. Durch eine Erweiterung der Mie-Theorie lassen sich auch Extinktionsspektren von sphärischen Nanopartikeln, die aus mehreren konzentrischen Lagen unterschiedlicher Materialien aufgebaut sind, berechnen.

### Elektromagnetische SERS-Verstärkung

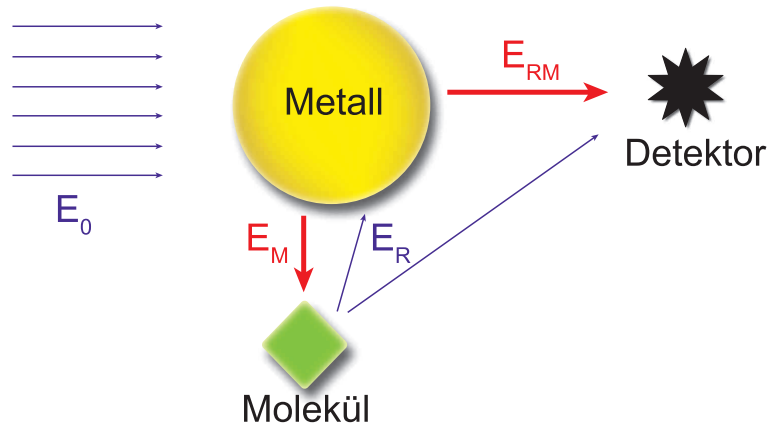
Die Verstärkung  $V$  der Raman-Streuung eines Moleküls in der Nähe eines Edelmetall-Nanopartikels hängt sowohl von dem lokalen elektrischen Feld der Partikel bei der Anregungsfrequenz  $\nu_0$  ab, als auch von der Stärke des Feldes der Stokesverschobenen Frequenz  $\nu_{sc} = \nu_0 - \nu_{fi}$ .<sup>(19)-(21)</sup>

$$V \propto |E(\nu_0)|^2 |E(\nu_{sc})|^2. \quad (24)$$

In Abb. 4 ist schematisch die Verstärkung der elektromagnetischen Felder aufgezeigt. Hierbei wirkt auf das Molekül das ursprüngliche Feld  $E_0$  und das in der Metallsphäre induzierte Feld  $E_M$ . Das elektromagnetische Feld an der Partikeloberfläche nimmt mit dem Abstand  $d$  von der Oberfläche um den Faktor  $1/d^3$  ab. Je näher sich das Molekül an der Partikeloberfläche befindet, umso größer ist der Beitrag von  $E_M$  und der Ramanprozess wird mit einer höheren lokalen Intensität angeregt.

In der zweiten Stufe der Verstärkung wird die Raman-Streuung des Moleküls durch das Metallpartikel verstärkt. Das Metallpartikel selbst emittiert keine Raman-Streuung. Die Emission des Partikels kann vielmehr als Antennen-Effekt verstanden werden, bei dem ausschließlich der im Molekül induzierte Dipol als mögliche Energiequelle zur Verfügung steht.

Die Emissionsverstärkung der Raman-Streuung erfolgt durch eine Änderung der lokalen Modendichte des elektromagnetischen Feldes durch den plasmonischen Resonator bei der Emissionsfrequenz  $\nu_{sc}$ . Die Dephasierung eines Plasmons in Gold- und Silber-Nanopartikeln kann 7 - 18 fs betragen.<sup>(22),(23)</sup> Wenn in diesem Zeitintervall ein Molekül wieder durch das erhöhte elektrische Feld bei  $\nu_0$  angeregt wird,



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der elektromagnetischen Verstärkung an einem einzelnen plasmonisch-aktiven Nanopartikel. Die einfallende elektromagnetische Welle  $E_0$  regt das Partikelplasmon an und  $E_M$  ist das durch Mie-Streuung elastisch gestreute Feld. Auf das Molekül wirken  $E_0$  und  $E_M$ . Der Detektor registriert die direkte Raman-Streuung des Moleküls  $E_R$  und die über das Plasmon verstärkte Raman-Streuung  $E_{RM}$ .

steigt entsprechend Fermis Goldener Regel die Wahrscheinlichkeit der Ramanstreuung.<sup>(24),(25)</sup> Rechnungen zeigen, dass die Effizienz der Emissionsverstärkung durch die Nanopartikel so gut wie identisch zur Verstärkung des anregenden Laserfeldes ist.<sup>(26)</sup> Die so verstärkte Raman-Streuung des Moleküls ist in Abb. 4 als  $E_{RM}$  eingezeichnet. Am Detektor werden die direkte Raman-Streuung des Moleküls und die über das Plasmon verstärkte Raman-Streuung registriert.

Unter Berücksichtigung der sich mit  $d^2$  vergrößernden Oberfläche einer Schale aus Molekülen, nimmt die SERS-Verstärkung mit  $\left(\frac{r+d}{r}\right)^{-10}$  für einen sphärischen Partikel mit Radius  $r$  mit dem Abstand  $d$  des Moleküls zur Oberfläche ab. Die Abstandsabhängigkeit der SERS-Verstärkung konnte experimentell bestätigt werden.<sup>(20)</sup>

Allgemein sind Nanopartikel mit niedrigem Absorptionsquerschnitt (geringe Dämpfung) und somit hohem Streuquerschnitt ideale SERS-Substrate, da sich diese Partikel bei Laserbestrahlung kaum erhitzen und an ihnen mit hoher Effizienz die Stokes-Photonen gestreut werden. Besonders hohe SERS-Verstärkungen können erreicht werden, wenn es zu einer Kopplung von Plasmonen, wie zum Beispiel in Aggregaten von Nanopartikeln kommt. An den Berührungspunkten zwischen einzelnen Nano-

partikeln treten enorm hohe elektrische Feldstärken auf, die als *hot spots* bezeichnet werden. In den letzten Jahren sind erfolgreich Methoden entwickelt worden, um periodische Nanostrukturen mit kontrollierbarer Plasmonenkopplung durch Nanolithographie herzustellen.<sup>(21)</sup>

In der Literatur wird von SERS-Verstärkungen in aggregierten Silberkolloiden bis  $10^{15}$  für *hot spots* berichtet und es konnte gezeigt werden, dass sich mit der SERS-Technik sogar einzelne Moleküle nachweisen lassen.<sup>(27), (28)</sup>

### Chemische Verstärkung

Weitere Verstärkungseffekte, die mit dem elektromagnetischen Ansatz nicht erklärt werden können, müssen nach Gl. 1 in einer veränderten Polarisierbarkeit des Raman-aktiven Moleküls gründen. Zusammenfassend werden sie *Chemischer Effekt* genannt. Sein Beitrag zur SERS-Verstärkung ist mit  $\sim 10^2$  eher gering. Mehrere Modelle für verschiedene Mechanismen wie Adsorbat-lokalisierte Resonanzeffekte oder Ladungstransfer-Resonanzen (englisch: *charge transfer*, CT) vom Metall zum Adsorbat werden diskutiert.<sup>(29)–(31)</sup>

### SERS-Auswahlregeln

Ist ein Molekül an ein SERS-Substrat adsorbiert, so erhält man in der Regel keine gleichmäßige Verstärkung der Raman-Banden im Spektrum des freien Moleküls. Auf Grund der Geometrie der Adsorption an der Metalloberfläche gelten für die oberflächenverstärkte Raman-Streuung andere Auswahlregeln und es werden im Vergleich zum Raman-Spektrum veränderte Intensitätsverhältnisse einzelner Banden im SERS-Spektrum beobachtet.

Im lokalen kartesischen Koordinatensystem, mit der  $z$ -Achse parallel zur Normalen der Metalloberfläche, ergibt sich der effektive Raman-Tensor  $\alpha_{eff}$  für ein auf einem sphärischen Partikel adsorbiertes Molekül zu:<sup>(32)</sup>

$$\alpha_{\text{eff}} = \frac{9}{[\epsilon(\omega_L) + 2][\epsilon(\omega_S) + 2]} \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \epsilon(\omega_S)\alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \epsilon(\omega_S)\alpha_{yz} \\ \epsilon(\omega_L)\alpha_{zx} & \epsilon(\omega_L)\alpha_{zy} & \epsilon(\omega_L)\epsilon(\omega_S)\alpha_{zz} \end{pmatrix}. \quad (25)$$

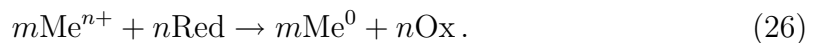
Es können daher nur Schwingungsmoden von „z-Anteilen“ des Tensors ungleich Null verstärkt werden. Somit werden Schwingungen entsprechend ihrer Orientierung, die sie durch die Adsorption des Moleküls relativ zur Oberfläche einnehmen, unterschiedlich stark an Raman-Intensität im SERS-Spektrum gewinnen.

## 2.2 Metallkolloide

Nanopartikel besitzen sehr interessante größenabhängige elektrische, optische, magnetische und chemische Eigenschaften. Für viele zukünftige technologische Anwendungen ist die Synthese monodisperser Nanopartikel die Grundvoraussetzung. Es existieren zwei Wege, um Nanopartikel zu synthetisieren: der vom Großen ins Kleine gerichtete Ansatz (im Englischen: *top-down*), bei dem physikalische Methoden zum Zerkleinern makroskopischer Ausgangsstoffe eingesetzt werden, und der kolloidchemische vom Kleinen ins Große gerichtete Ansatz (im Englischen: *bottom-up*) in Lösung. Die physikalischen Methoden erlauben die Produktion von Nanopartikeln in großen Mengen, wobei die Kontrolle der Größe und der Größenverteilung oft schwierig ist. Im Gegensatz dazu können über kolloidchemische Synthesen einheitliche Nanopartikel mit kontrollierbarer Größe hergestellt werden.<sup>(33),(34)</sup> Durch spezielle Reaktionsbedingungen kann auch die Form der Nanopartikel kontrolliert werden. Beispiele hierfür sind Nano-Stäbchen, Nano-Würfel und andere platonische Körper.<sup>(35),(36)</sup>

### Reduktionsmechanismus

Die Reduktion oxidiertes Metallverbindungen zu neutralen Atomen basiert auf Redox-Reaktionen, in denen Elektronen von einem Reduktionsmittel auf das Metall übertragen werden:<sup>(37)</sup>



Die treibende Kraft für diese Reaktion ist der Unterschied in den Redox-Potentialen  $\Delta E$ . Aus der Größe  $\Delta E$  kann die Gleichgewichtskonstante der Reaktion  $K_e$  berechnet werden:

$$\ln K_e = nF\Delta E/RT, \quad (27)$$

mit der Anzahl der im Redoxsystem auftretenden Elektronen  $n$ , der Faradaykonstante  $F$ , der allgemeinen Gaskonstante  $R$  und der absoluten Temperatur  $T$ . Die Reaktion ist nur dann thermodynamisch möglich, wenn das Redox-Potential  $\Delta E$  positiv ist. In der Praxis sollte der Wert für  $\Delta E$  größer als 0.4 V sein, um eine

Redox-Reaktion zu beobachten. Stark elektropositive Edelmetalle wie Gold und Silber ( $E_0 > 0.7$  V) reagieren bereits mit milden Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure bei Raumtemperatur.<sup>(37)</sup>

### Lösungsmittelleffekte

Die Reduktion oxidierter Metallverbindungen kann sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Da viele Metallsalze in Wasser löslich sind, ist die Herstellung von Metallpartikeln in wässrigen Lösungen relativ einfach. Die hohe Polarität des Wassers führt zu einer hohen elektrostatischen Stabilisierung der gebildeten Metallpartikel, die eine Partikelaggregation bei ausreichend geringer Partikelkonzentration verhindert. Zur Synthese von Metallpartikeln in Lösungsmitteln mit geringerer Polarität sind meist Polymere oder Tenside zur Stabilisierung nötig. Polyole können in der Synthese sogar eine dreifache Rolle übernehmen: als Lösungsmittel, Reduktionsmittel und Stabilisator.

### Mechanismus der Partikelbildung

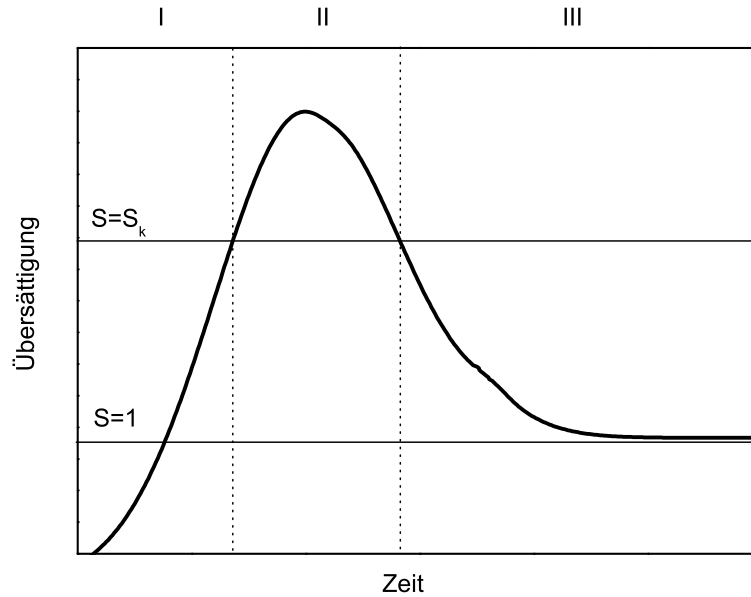
In Abb. 5 ist das Konzept von LaMer und Mitarbeitern<sup>(38)</sup> aus dem Jahr 1950 zum Mechanismus der Bildung monodisperser Nanopartikel in Lösung dargestellt. Die Konzentration der freien (monomeren) Metallatome in Lösung ist als Übersättigung  $S$  gegen die Reaktionskoordinate aufgetragen.<sup>a</sup> In der ersten Phase (I) steigt nach der Zugabe des Reduktionsmittels die Konzentration an Metallatomen in der Lösung bis in der zweiten Phase (II) Nukleationskeime gebildet werden. Da die Energiebarriere für die Keimbildung sehr hoch ist, beginnt dieser Prozess erst bei Metallatom-Konzentrationen weit über der Übersättigung ( $S=1$ ). Fällt durch die Bildung von Keimen die Monomerkonzentration unter  $S_k$  so geht das System in die Partikelwachstumsphase (Phase III) über und die Keimbildung geht gegen Null. Die Keime wachsen nun so lange wie die Lösung übersättigt mit Metallatomen ( $S>1$ ) ist.

Dieses Modell beschreibt anschaulich die Bildung monodisperser Nanopartikel mit nur zwei Prozessen: der Keimbildung und dem Partikelwachstum. Nach heutigem

---

<sup>a</sup>Die Metallatome werden während der Redoxreaktion aus den gelösten Metallionen gebildet. Eine Übersättigung von 1 bedeutet eine gesättigte Lösung an elementaren Metallatomen.





**Abb. 5:** Modell von LaMer: Zeitabhängige Änderung der Übersättigung während der Synthese monodisperser Nanopartikel.

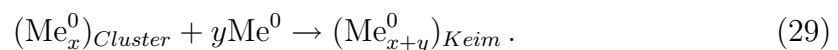
Wissensstand sind die Mechanismen der Partikelbildung in weitere mögliche Prozesse unterteilt.<sup>(37), (39)</sup>

Die nach dem Reduktionsprozess gebildeten Metallatome sind unlöslich in dem Lösungsmittel und aggregieren schrittweise zu Clustern:

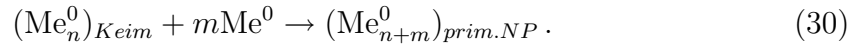


Diese Cluster sind dynamische Gebilde, die sich in einem ständigen Dissoziations-Kondensations-Prozess befinden.

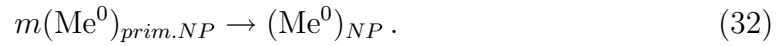
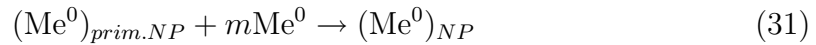
Wenn genügend Metallatome während des Redox-Prozesses erzeugt werden, erreichen die Cluster eine kritische Größe und feste Partikel, die so genannten Keime, werden aus der Lösung abgeschieden:



Die Anzahl und Größe der Keime hängt von vielen Parametern ab: der Metallkonzentration, dem Redox-Potential der Reaktion, der Temperatur, der Art und Konzentration des Stabilisators, der Viskosität und der Oberflächenspannung des Lösungsmittels. Steigt die Konzentration an Metallatomen weiter, wachsen die Keime zu primären Nanopartikeln:



Diese primären Nanopartikel besitzen eine hohe Oberflächenkrümmung mit einem hohen Verhältnis der Partikeloberfläche zum Partikelvolumen und stellen ein System großer freier Energie dar. Das Partikelwachstum kann über zwei Wege erfolgen: langsames Wachstum durch Diffusion weiterer Metallatome an die Partikeloberfläche (Gl. 31) und/oder schnelle Vergrößerung der Partikel durch Aggregation (Gl. 32)



Um stabile Suspensionen von Metall-Nanopartikeln herzustellen, muss der Aggregationsprozess bereits in einem frühen Stadium der Partikelbildung verhindert werden. Dies kann durch elektrostatische, sterische oder elektrosterische<sup>b</sup> Stabilisierung der Partikel erfolgen. In verdünnten Systemen kann die elektrostatische Stabilisierung sehr effizient sein. Eine hohe Konzentration und folglich eine hohe Ionenstärke führt zu einer Kompression der elektrischen Doppelschicht um die Partikel, die elektrostatische Abstoßung nimmt ab und die Partikel aggregieren (siehe unten). Deshalb werden solche Systeme durch Adsorption von Tensiden, Polymeren oder Polyelektrolytmolekülen auf der Partikeloberfläche sterisch oder elektrosterisch stabilisiert. Die sterische und elektrosterische Stabilisierung bewirken eine Abschirmung der attraktiven van der Waals-Kräfte zwischen den Partikeln.

### Das Zeta-Potential

Ein Maß für die Stabilität von kolloidalen Suspensionen ist das Zeta-Potential. Es gibt Aufschluss über die für die elektrostatische Abstoßung verantwortliche Ladung der suspendierten Partikel. Im Allgemeinen gilt: je größer der Betrag des Zeta-Potentials, desto geringer ist die Tendenz der Teilchen Aggregate oder Agglomerate zu bilden.

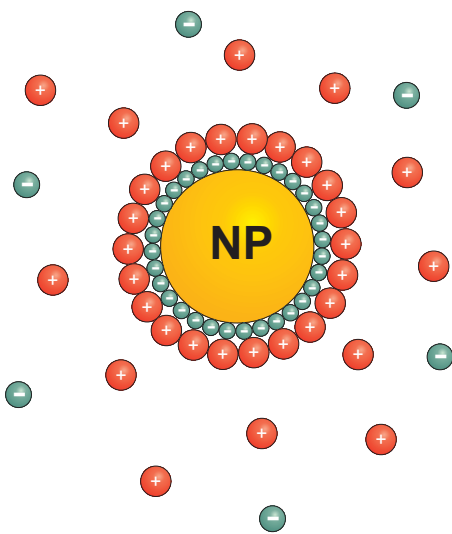
---

<sup>b</sup>Elektrosterische Stabilisierung bezeichnet die Kombination aus elektrostatischer und sterischer Stabilisierung. Ein typisches Beispiel sind partiell geladene Polymere, die Polyelektrolyte.

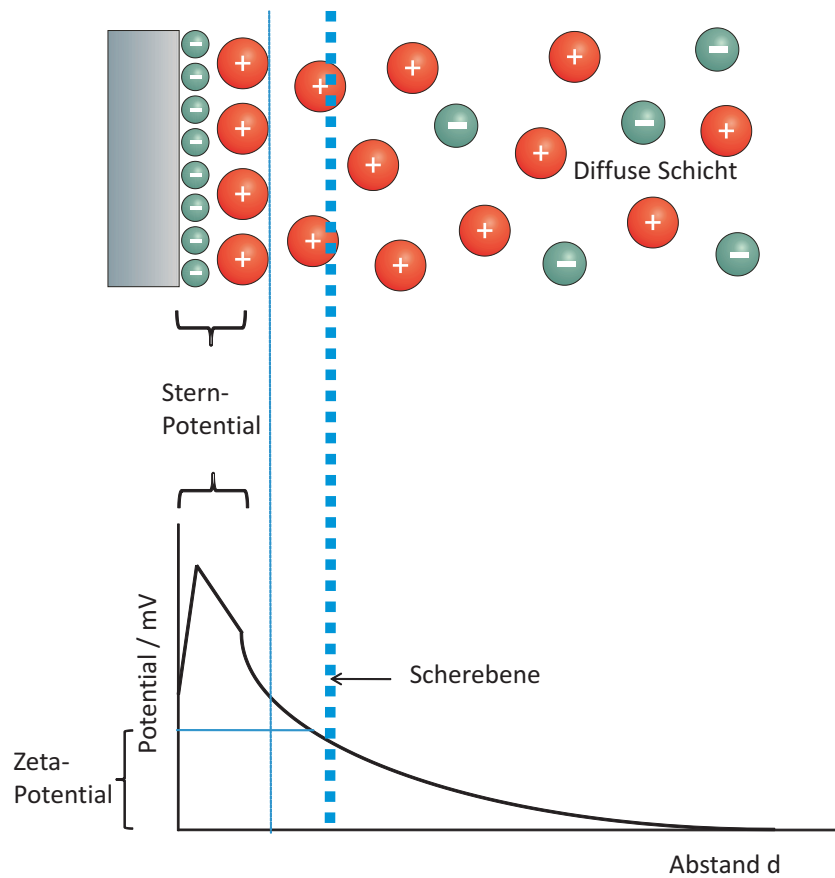
Das Zeta-Potential wird in mV angegeben und beschreibt die elektrische Potentialdifferenz an der Grenzfläche zwischen fester und flüssiger Phase. Beide Seiten dieser Grenzschicht sind mit Ladungen entgegengesetzter Vorzeichen geladen. Je nach Zusammensetzung der Partikel können die Ladungen durch Dissoziation von zum Beispiel Amino- oder Carboxyl-Gruppen auf der Partikeloberfläche oder durch spezifische Adsorption von Ionen entstehen.

In Abb. 6 ist gezeigt, wie die Anreicherung von fixierten Ladungen an der Partikeloberfläche (innere Helmholtz-Schicht) zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht mit Ionen entgegengesetzter Ladung (die so genannte äußere Helmholtz-Schicht) führt.<sup>(40)</sup>

Häufig besteht die innere Helmholtz-Schicht aus negativ geladenen und dehydratisierten Ionen wie zum Beispiel Chlorid. Die Ionen der äußeren Helmholtz-Schicht sind ebenfalls fixiert, liegen jedoch hydratisiert vor. Die Bindung erfolgt über elektrostatische Anziehung, sowie über van der Waals-Kräfte.<sup>(40)</sup> Auf Grund des größeren Abstands der zweiten Helmholtz-Schicht zur Partikeloberfläche sind die van der Waals-Wechselwirkungen weniger stark ausgeprägt. Innere und äußere Helmholtz-Schicht werden als Stern-Schicht oder Sternsche Doppelschicht bezeichnet (siehe Abb. 7). Wegen der Hydrathülle haben die positiven adsorbierten Ionen einen größeren Platzbedarf und die negative Ladung der ersten Helmholtz-Schicht kann somit nicht vollständig kompensiert werden. Die restliche negative Ladung des Partikels und die der inneren Helmholtz-Schicht wird durch eine diffuse Schicht an Gegenionen



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Ionenverteilung um einen Nanopartikel (NP). In der ersten Schicht (innere Helmholtz-Schicht) um den Partikel sind negative dehydratisierte Ionen fest auf der Oberfläche adsorbiert. Die zweite Schicht (äußere Helmholtz-Schicht) aus positiv geladenen hydratisierten Ionen ist ebenfalls fest adsorbiert. Die Konzentration an Gegenionen nimmt in der diffusen Schicht mit größer werdendem Abstand von der Partikeloberfläche schnell ab.



**Abb. 7:** Oben: Darstellung eines kleinen Ausschnitts der Partikeloberfläche unter Vernachlässigung der Oberflächenkrümmung. Auf dem Partikel (links) ist eine Schicht aus negativ geladenen dehydratisierten Ionen fest adsorbiert (innere Helmholtz-Schicht). Die zweite Schicht besteht aus hydratisierten positiv geladenen Ionen (äußere Helmholtz-Schicht) und ist ebenfalls fest adsorbiert. Die negative Ladung der inneren Helmholtz-Schicht wird durch frei bewegliche positiv geladene Ionen in der diffusen Schicht kompensiert. Unten: Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand  $d$  zur Partikeloberfläche.

kompensiert. In dieser diffusen Schicht sind die Gegenionen nicht an der Partikeloberfläche fixiert, sie sind beweglich. Wie in Abb. 7 gezeigt, ist in unmittelbarer Nähe zur Teilchenoberfläche die Konzentration an positiven Gegenionen sehr hoch, nimmt aber exponentiell mit zunehmendem Abstand von der Teilchenoberfläche ab, bis sich schließlich die entgegengesetzten Ladungen kompensiert haben und das Potential gegen Null abgefallen ist.

Die exponentiell abfallende Ionenverteilung im Gleichgewichtszustand wird durch

die Boltzmann-Verteilung beschrieben:<sup>(40),(41)</sup>

$$\frac{n^+(x)}{n} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{ve_0\Psi(x)}{kT}}, \quad (33)$$

mit  $n^+$  der Konzentration an Gegenionen im Abstand  $x$  von der Teilchenoberfläche,  $n$  der Konzentration an Gegenionen in unendlicher Entfernung von der Teilchenoberfläche,  $v$  der Wertigkeit des Ions,  $e_0$  der Elementarladung,  $\Psi$  dem Potential im Abstand  $x$  von der Oberfläche und  $k$  der Boltzmann-Konstante.<sup>c</sup>

Da Ionen in der Lösung beweglich sind, kommt es bei der Diffusionsbewegung der Teilchen zum Verlust eines Teils der Gegenionen der äußersten diffusen Schicht. Die von der Teilchengeschwindigkeit abhängige Lage der Grenzfläche der abgestreiften diffusen Schicht wird als Scherebene S bezeichnet. Wird nun eine Suspension von Teilchen einem elektrischen Feld ausgesetzt, erfahren die Teilchen eine Beschleunigung hin zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Bei ausreichend hoher Feldstärke und somit ausreichender Teilchengeschwindigkeit wird nahezu die ganze diffuse Schicht abgestreift.

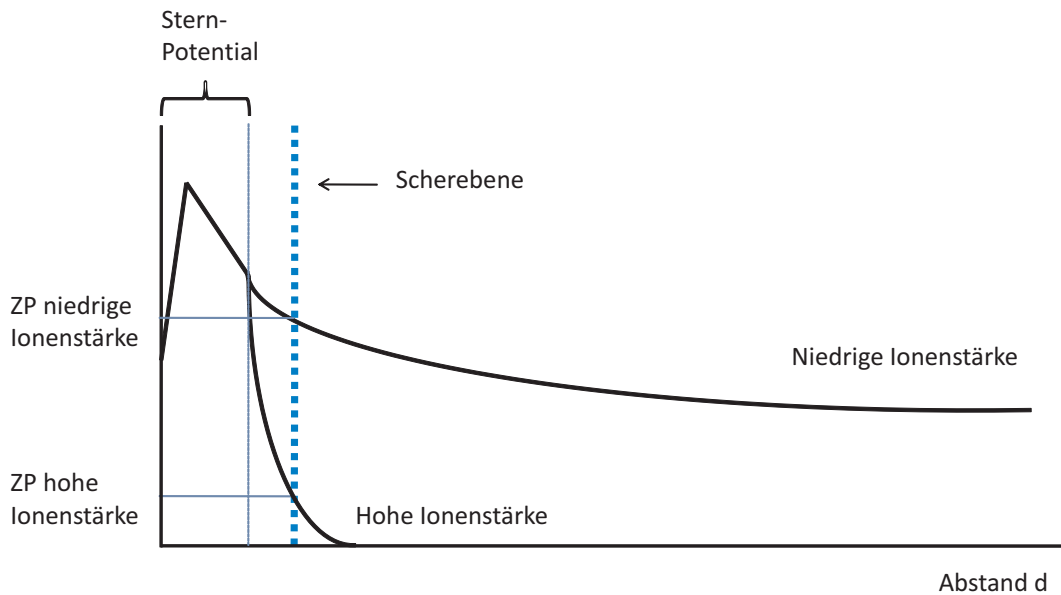
In der Praxis wird das Zeta-Potential bei hohen Feldstärken bestimmt und oft näherungsweise dem Stern-Potential gleichgesetzt. Diese Näherung gilt jedoch nur für Suspensionen mit extrem niedrigen Elektrolytkonzentrationen, weil bei höherer Ionenstärke eine Verringerung der Schichtdicke der diffusen Schicht erfolgt (siehe Abb. 8).

Die Dicke der diffusen Schicht ist definiert als der Abstand von der Partikeloberfläche, bei der das Stern-Potential auf  $1/e$  abgefallen ist. Diese Definition wurde eingeführt, weil sich das Stern-Potential exponentiell Null nähert und sich nur ein unendlicher Wert für die Schichtdicke ergeben würde. Der Abfall auf  $1/e$  entspricht ca. 37 % des Ausgangspotentials.

In hochverdünnten Lösungen ist die Konzentration an Gegenionen so gering, dass der Abfall des Stern-Potentials über eine große Distanz von der Partikeloberfläche erfolgt. So beträgt die Dicke der diffusen Schicht in wässrigen Suspensionen mit einer NaCl-Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l mehr als 100 nm. Eine Erhöhung der Gegenionen-Konzentration bewirkt eine Anreicherung der Gegenionen in der Nähe

---

<sup>c</sup>Anmerkung: Die Energiedifferenz  $\Delta E$  ergibt sich aus dem abstandsabhängigen elektrischen Potential  $\Psi(x)$  in Volt multipliziert mit der Elementarladung  $e$  in Coulomb (Umrechnung:  $C \cdot V = A \cdot s \cdot V = W \cdot s = J$ )



**Abb. 8:** Potentialabfall in der diffusen Schicht bei Nanopartikel-Suspensionen unterschiedlicher Ionenstärke. Eine hohe Konzentration an Ionen in der Lösung bewirkt ein schnelles Abfallen des Stern-Potentials mit zunehmendem Abstand von der Partikeloberfläche. Bei einer konstanten Lage der Scherebene hängt das Zeta-Potential (ZP) stark von der Ionenstärke der Lösung ab.

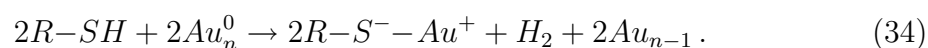
der Partikeloberfläche und führt so zu einem steileren Abfall des Stern-Potentials. Bei einer blutisotonischen NaCl-Konzentration von 0.154 mol/l ist die diffuse Schicht nur noch etwa 1 nm dick.<sup>(40)</sup> Unter diesen Bedingungen überwiegen die van der Waals-Kräfte gegenüber der elektrostatischen Abstoßung, woraus eine Aggregation oder Agglomeration der Partikel resultiert.

In Abb. 8 ist der Potentialabfall in der diffusen Schicht bei zwei Nanopartikel-Suspensionen unterschiedlicher Ionenstärke dargestellt. Bei einer hohen Ionenkonzentration fällt das Stern-Potential mit steigendem Abstand zur Partikeloberfläche deutlich schneller ab als bei niedrigen Ionenstärken. Wird eine konstante Lage der Scherebene während einer Zeta-Potential-Messung angenommen, ist der Wert des Zeta-Potentials der elektrolytärmeren Suspension deutlich höher.

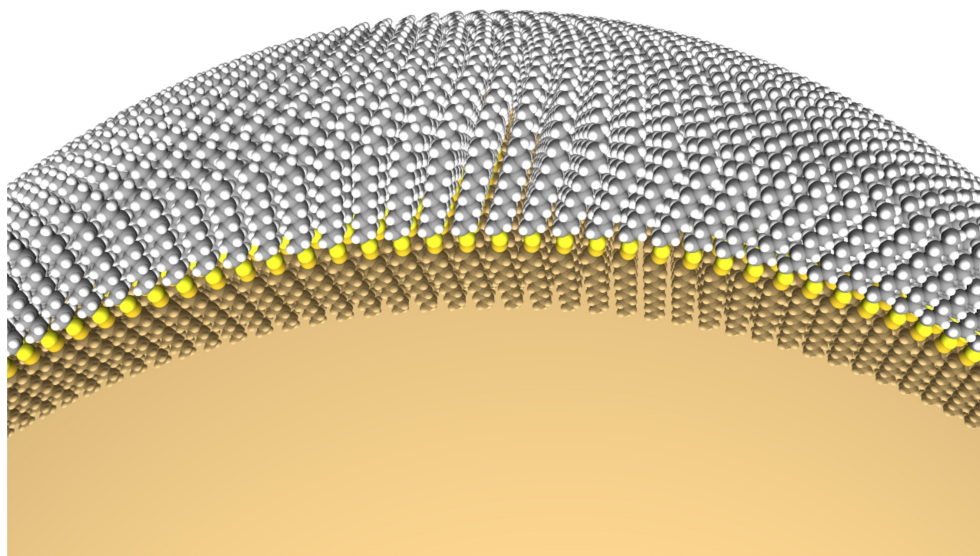
Die Bestimmung des Zeta-Potentials bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken gibt wertvolle Informationen über die optimalen chemischen Bedingungen zur Stabilisierung von Nanopartikel-Suspensionen.

### Selbstorganisierende Monolagen - SAM

Selbstorganisierende Monolagen (*self-assembled monolayer*, SAM) sind Oberflächen, die aus einer einzigen Lage von Molekülen auf einem Substrat bestehen. Die am besten untersuchten Systeme sind Monolagen aus thiol- oder disulfidfunktionalisierten Molekülen auf Gold (siehe Abb. 22). Durch die Ausbildung einer starken Gold-Schwefel-Bindung werden die Moleküle auf der Oberfläche chemisorbiert und verdrängen vorhandene, auf der Oberfläche physisorbierte Moleküle (auch eventuell vorhandene Verunreinigungen). In Reaktionsgleichung 34 ist der wahrscheinliche Mechanismus der Entstehung der Gold-Schwefel-Bindung im Hochvakuum dargestellt.<sup>(42)</sup>



In wässriger Umgebung besteht die Möglichkeit, dass der entstehende Wasserstoff



**Abb. 9:** Computersimulation einer perfekten SAM von Mercaptoundekan auf einer Goldoberfläche.

mit im Wasser gelöstem Sauerstoff zu Wasser reagiert. Alkanthiole  $HS(CH_2)_nCH_3$  mit Kettenlängen  $n > 8$  bilden durch van der Waals-Wechselwirkungen der Alkanketten stabile, geordnete SAMs. Es wurden Bindungsstärken für Alkanthiole auf Goldoberflächen von über 150 kJ/mol bestimmt.

Die Ausbildung eines SAMs ist in zwei Schritte unterteilt.<sup>(43)</sup> Innerhalb von Millisekunden bis einigen Minuten ist die Oberfläche bereits zu 80 % mit SAM-Molekülen bedeckt. In einem zweiten, langsameren Schritt folgt die Selbstorganisation der Moleküle auf der Oberfläche, bis die maximale Packungsdichte erreicht ist. Je nach SAM-Molekül und Konzentration werden hierfür Zeiten von Stunden bis Tagen benötigt. Eine ideale SAM ist als zweidimensionaler Kristall aufgebaut. Ein typischer Wert für die Oberflächenbedeckung beträgt  $5 \cdot 10^{14} \frac{\text{Moleküle}}{\text{cm}^2}$  und der laterale Schwefel-Schwefel-Abstand zwischen zwei Molekülen in der SAM liegt bei ca. 0.5 nm. Vor allem im ersten Schritt ist die Geschwindigkeit der SAM-Ausbildung stark von der Molekül-Konzentration in der Immersionslösung abhängig. Bei Konzentrationen unter 1  $\mu\text{M}$  ist eine optimale Selbstorganisation der Moleküle zu einer SAM nicht mehr möglich.<sup>(44)</sup>

Selbstanordnende Monolagen können auch in der Synthese Einsatz finden.<sup>(45)</sup> Neben Reaktion zwischen den einzelnen SAM-Molekülen oder photochemischen Umwandlungen können auf der SAM-Oberfläche chemische Reaktionen durchgeführt werden, wie z.B die Aktivierung von Carbonsäuren. Diese Variante wird häufig in der Biochemie zum Anbinden von Proteinen eingesetzt.<sup>(45), (46)</sup>



### 2.3 Molekulare Erkennung

Mehrere Arten von nichtkovalenten Bindungen tragen entscheidend zur Ausbildung der dreidimensionalen Struktur großer Moleküle, wie zum Beispiel Proteinen bei. Nichtkovalente Bindungen sind auch die Basis für viele dynamische biologische Prozesse, bei denen ein großes Molekül an ein anderes Molekül spezifisch, aber reversibel bindet. Bei der Ausbildung nichtkovalenter Bindungen werden Energien von nur 4–30 kJ/mol frei, also ein bis zwei Größenordnungen weniger als bei einer einfachen kovalenten Bindung. Deshalb werden diese nichtkovalenten Bindungen auch oft als Wechselwirkungen bezeichnet. Obwohl die nichtkovalenten Bindungen schwächer sind als kovalente Bindungen, werden durch das Zusammenspiel einer Vielzahl dieser Wechselwirkungen hoch stabile und spezifische Zusammenschlüsse zwischen verschiedenen Teilen eines großen Moleküls oder zwischen verschiedenen Makromolekülen gebildet. Man unterscheidet vereinfacht drei dieser Bindungstypen: die Wasserstoffbrückenbindung, die Ionenbindung und die van der Waals-Bindung.<sup>(47)</sup>

#### Wasserstoffbrückenbindung

Normalerweise bildet ein Wasserstoffatom nur eine kovalente Bindung mit einem anderen Atom aus. Wenn das Wasserstoffatom kovalent an ein Donoratom gebunden ist, kann eine zusätzliche schwache Assoziation mit einem Akzeptoratom ausgebildet werden, die Wasserstoffbrückenbindung. Eine Wasserstoffbrückenbindung wird möglich, wenn das Donoratom elektronegativer ist, so dass eine polare Donor-H-Bindung vorliegt. Auch das Akzeptoratom muss elektronegativer sein und mindestens ein freies Elektronenpaar besitzen, um mit der positiven Ladung des Wasserstoffatoms zu wechselwirken.

In biologischen Systemen sind die Donor- und Akzeptoratome meist Stickstoff und Sauerstoff, wie sie zum Beispiel in Amino-, Hydroxy- und Carboxy-Gruppen auftreten. Die meisten Wasserstoffbrückenbindungen haben eine Länge von 260 - 310 pm und sind somit zwei- bis dreimal länger als die kovalente O-H-Bindung in Wasser. Entsprechend ist die Bindungsenergie der Wasserstoffbrückenbindung in wässriger Lösung mit ungefähr 4–15 kJ/mol deutlich schwächer als die kovalente O-H-Bindung mit ca. 460 kJ/mol.<sup>(47)</sup> Eine wichtige Besonderheit der Wasserstoffbrückenbindung ist ihre Richtungsabhängigkeit. Die stärkste Bindung wird bei der linearen Anord-

nung Donor-H...Akzeptor erreicht. Nichtlineare Bindungen sind schwächer als lineare; multiple nichtlineare Wasserstoffbrücken helfen dennoch bei der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur vieler Proteine.

### Ionische Wechselwirkung

Entgegengesetzt geladene Moleküle oder Molekülgruppen ziehen sich gegenseitig an. Ionische Wechselwirkungen entstehen aus der elektrostatischen Anziehung zwischen positiv und negativ geladenen Ionen. Diese Coulomb-Wechselwirkung ist nicht gerichtet, da das elektrostatische Feld in alle Raumrichtungen homogen ist. Die Coulomb-Kraft der elektrostatischen Anziehung nimmt nach Gl. 35 quadratisch mit dem Abstand ab:

$$F_{Coulomb} = \frac{q^+ \cdot q^-}{4\pi\epsilon_r r^2}, \quad (35)$$

mit  $q^+$  und  $q^-$  den elektrischen Ladungen der beiden Ionen,  $r$  ihrem Abstand und  $\epsilon_r$  der relativen Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums. Aufgrund der hohen Dielektrizitätszahl von Wasser ( $\epsilon_r = 78.5$  bei 298 K) wird die elektrostatische Anziehung stark abgeschwächt, so dass die Bindungsenergien in Wasser zwischen 10 und 30 kJ/mol<sup>(47)</sup> liegen.

### Van der Waals-Kräfte

Wenn sich zwei Moleküle sehr nahe kommen, wirkt eine schwache, nicht-spezifische attraktive Kraft, die für die van der Waals (vdW)-Wechselwirkung verantwortlich ist. Diese Wechselwirkung entsteht durch temporäre Fluktuationen der Elektronendichteverteilung in Atomen oder Molekülen, was zu einem momentanen elektrischen Dipol  $\vec{\mu}_{mom}$  führt. Wenn sich zwei Moleküle nahe genug kommen, beeinflusst dieser Dipol die Elektronenwolke des Anderen und es wird ein Dipol induziert ( $\vec{\mu}_{ind}$ ). Als Folge dieser Dipol-Dipol-Wechselwirkung erfahren die Moleküle eine schwache Anziehungskraft. Die Stärke der van der Waals-Wechselwirkung fällt nach Gl. 36 schnell mit steigendem Abstand:

$$E_{vdW} \propto \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{r^6}, \quad (36)$$

mit  $\alpha_1, \alpha_2$  der Dipolpolarisierbarkeit der jeweiligen Moleküle. Die gemittelte Energie nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes  $r$  ab. Mit Energien von ungefähr 1–4 kJ/mol ist die van der Waals-Wechselwirkung noch schwächer als die Wasserstoffbrückenbindung und liegt damit in der Größenordnung der mittleren thermischen Energie bei Raumtemperatur ( $RT \approx 2.5$  kJ/mol bei 298 K).<sup>(47)</sup> Die Anziehung zwischen zwei Molekülen kann merklich zunehmen, wenn sie über eine komplementäre Struktur verfügen und sich so eine Vielzahl von van der Waals-Wechselwirkungen ausbilden können.

### Der hydrophobe Effekt

Die Kraft, die zu einer Aggregation hydrophober oder unpolarer Moleküle führt, wird hydrophober Effekt genannt. Ein unpolares Molekül kann keine Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen ausbilden, so dass diese Moleküle in wässrigen Lösungen von einem starren Käfig aus Wassermolekülen umgeben sind. Die Verringerung der Entropie durch die Ausbildung geordneter Strukturen hat zur Folge, dass energetisch eine Aggregation der hydrophoben Moleküle bevorzugt ist. Das Zusammenspiel von hydrophobem Effekt und der van der Waals-Wechselwirkung zwischen unpolaren Molekülen führt zu einer starken Tendenz der hydrophoben Moleküle mit sich selbst statt mit Wasser zu wechselwirken.

### Affinitätskonstante

Die Komplexbildung eines Rezeptors  $R$  durch ein Substrat  $S$  zu einem Rezeptor-Substrat-Komplex  $RS$  wird durch eine Gleichgewichtsreaktion beschrieben:<sup>(48)</sup>



wobei  $k_A$  und  $k_D$  die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten sind.

$$\frac{d[RS]}{dt} = k_A[R][S] - k_D[RS]. \quad (38)$$

Im dynamischen Gleichgewicht ist die makroskopisch beobachtbare zeitliche Änderung der Konzentration der beteiligten Spezies gleich Null und es gilt das Massenwirkungsgesetz:<sup>(49)</sup>

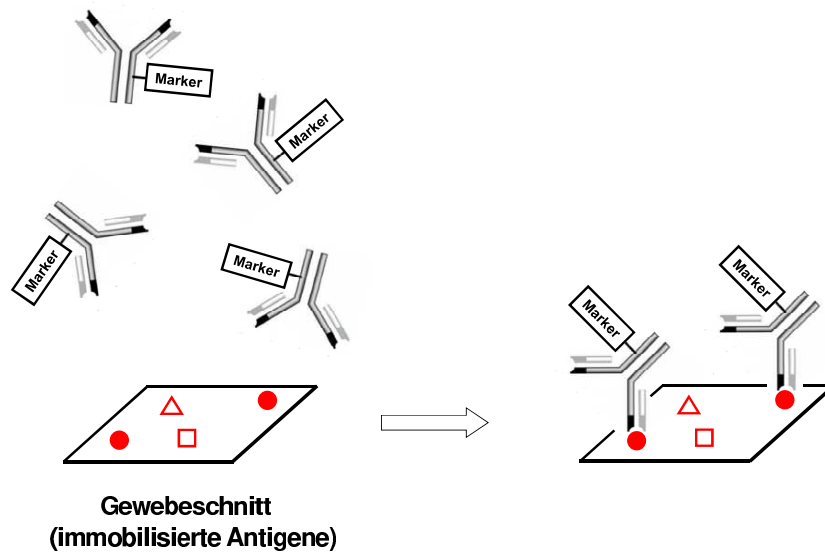
$$\frac{d[RS]}{dt} = 0 \Rightarrow K = \frac{k_A}{k_D} = \frac{[RS]}{[R][S]}. \quad (39)$$

Die Bindungs- oder Affinitätskonstante  $K$  beschreibt das Verhältnis der Assoziations- und Dissoziationskonstante im Gleichgewicht. Mit typischen Werten von  $10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  bis  $10^8 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  für die Assoziationskonstante  $k_A$  und  $10^4 \text{ s}^{-1}$  bis  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$  für die Dissoziationskonstante  $k_D$  ergeben sich Werte der Bindungskonstante von mehr als zehn Größenordnungen. Eine der stärksten bekannten, nicht-kovalenten Bindungen besitzt der Streptavidin-Biotin-Komplex mit einer Bindungskonstante von  $\approx 10^{15} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ , was eine festere Bindung darstellt als die besten bekannten Bindungsaffinitäten von Antikörpern zu ihren Antigenen.<sup>(49)</sup>

### Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen werden in der klinischen Pathologie routinemäßig bei der Diagnose von kranken Zellen und Geweben, wie zum Beispiel kanzerogenen Tumoren, eingesetzt. Abb. 10 zeigt, wie in der Immunhistochemie Proteine in Geweben mit Hilfe markierter Antikörper detektiert und lokalisiert werden können. Verschiedene im Gewebeschnitt immobilisierte Proteine sind als Kreise, Dreieck und Quadrat dargestellt. Zur Färbung eines bestimmten Zielproteins wird das Gewebe mit einem markierten Antikörper inkubiert, der spezifisch an das Zielprotein (roter Kreis) bindet. Nachdem überschüssige nicht gebundene Antikörper abgewaschen wurden, kann die räumliche Verteilung des Zielproteins über den markierten Antikörper bestimmt werden.

Die Visualisierung der Antikörper-Antigen-Bindung kann über verschiedene Markierungsstrategien erfolgen. Am häufigsten werden Enzyme an die Antikörper konjugiert, die katalytisch mit einem Substrat zu einer farberzeugenden Reaktion führen.<sup>(49)</sup> Eine Quantifizierung der gebundenen Antikörper ist über eine Messung der enzymatischen Aktivität möglich. Bei der Immunfluoreszenz werden Fluorophore zur Markierung der Antikörper eingesetzt. Nach erfolgter Antikörper-Antigen-Bindung kann das Antigen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop hochsensitiv detektiert und lokalisiert werden. Mit der Wahl verschiedener Fluorophore können typischerweise bis zu fünf unterschiedliche Antikörper markiert und somit fünf unterschiedliche Proteine simultan nachgewiesen werden. Die störenden Hintergrundsignale der



**Abb. 10:** Selektive immunhistochemische Färbung eines Gewebeschnitts. Links: Die im Gewebeschnitt immobilisierten Antigene sind als Kreise, Dreieck und Quadrat dargestellt. Zur Färbung eines bestimmten Antigens (Zielproteins) wird das Gewebe mit einem markierten Antigen-spezifischen Antikörper inkubiert. Rechts: Nach Ausbilden der Antigen-Antikörper-Bindung kann das Zielprotein zum Beispiel durch mikroskopische Techniken lokalisiert werden.

nativen Fluoreszenz der biologischen Probe und das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe während der Messung erlauben jedoch nur einen gewissen Grad an Quantifizierung der Proteinkonzentrationen.<sup>(49)</sup>

Eine neue Variante der Fluoreszenz-Markierung stellen fluoreszierende Halbleiterkristalle dar. Diese so genannten Quanten-Punkte (englisch: *Quantum Dots*, QD) besitzen einen Durchmesser von nur wenigen Nanometern.<sup>(50), (51)</sup> Die Vorteile der Quanten-Dots im Vergleich zu organischen Fluorophoren liegen in der über ihre Größe verschiebbare Lage der Emissionsbanden, in der geringen Breite der Emissionsbanden und in der hohen Photostabilität.

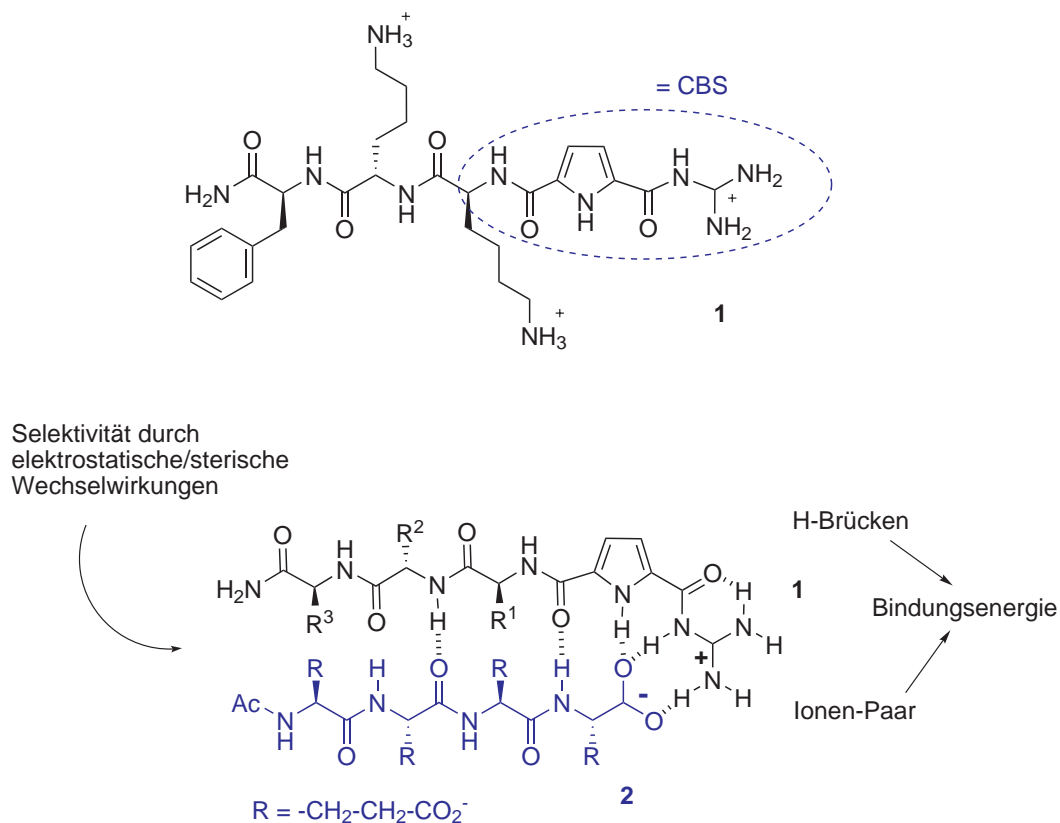
## 3 Charakterisierung von Wirkstoffen und Wirkstoff-Substrat-Komplexen

### 3.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Die Entwicklung künstlicher Rezeptoren zur molekularen Erkennung von Peptiden und deren genaue Charakterisierung ist sehr wichtig für das Verständnis der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Proteinen, zur Konzeption von neuen Biosensoren und zur Entwicklung verbesserter Wirkstoffe.<sup>(52)–(56)</sup> Bioorganische Chemiker bedienen sich oft der Konzepte der Natur auf der Suche nach neuen Leitstrukturen für effizient bindende Rezeptoren. Um kleine niedermolekulare Rezeptoren zu entwickeln müssen die häufig hochkomplex aufgebauten Strukturen der natürlichen makromolekularen Rezeptoren auf ihre jeweils bindungsrelevanten Gruppen reduziert werden.

Beispielsweise sind Guanidinium-Kationen in Biomolekülen weit verbreitete Bindungsstellen für Oxo-Anionen. Entsprechend wurden zahlreiche auf Guanidinium-Kationen basierende künstliche Rezeptoren zur Komplexierung von Oxo-Anionen entwickelt. Eine besondere Herausforderung bei der Synthese effizienter künstlicher Rezeptoren stellt hierbei die kompetitive Solvatation der Donor- und Akzeptor-Bindungsstellen in wässrigen Lösungsmitteln dar. In der Natur wird die Bindung zwischen Guanidinium-Kation und Oxoanion durch eine weitgehend hydrophobe Proteinumgebung und somit einer Abschirmung von der wässrigen Umgebung verstärkt. Um eine effiziente Komplexierung von Carboxylaten in wässrigen Medien zu ermöglichen, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Schmuck eine neue Klasse von einarmigen Guanidinium-basierten Rezeptoren entwickelt.<sup>(57)</sup> Durch eine Kombination aus ionischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen komplexieren diese Rezeptoren selektiv Tetrapeptide in polaren Lösungsmitteln und sogar in Wasser.<sup>(58), (59)</sup>

Der Aufbau der Rezeptoren ist in Abb. 11 oben gezeigt. Die Rezeptoren bestehen aus einer Carboxylat-Bindungsstelle (CBS, *carboxylate binding site*) und einer Peptid-Seitenkette. In der CBS liegt das Guanidinium-Kation acyliert an einem Pyrrol als Guanidiniocarbonylpyrrol vor.<sup>(57)</sup> Die Acylierung bewirkt eine Verschiebung des  $pK_s$ -Werts von  $\sim 13$  für freies Guanidinium in die Region von 6.5. Die gesteigerte



**Abb. 11:** Oben: Künstlicher Peptidrezeptor **1** bestehend aus der Carboxylat-Bindungsstelle CBS (blau eingekreist) und einem Tripeptid zur Steuerung der selektiven Komplexierung von Peptiden. Unten: Komplex von **1** mit Tetrapeptid **2**

Azidität ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-gebundenen Ionenpaaren unter physiologischen Bedingungen und erhöht so die Bindungsaffinität. Die elektrostatische Wechselwirkung ermöglicht eine stärkere Komplexierung verglichen mit neutralen Komplexen wie zum Beispiel zwischen Carbonsäuren und Aminopyridinen. Eine weitere Stabilisierung des Komplexes erfolgt über zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amid- bzw. Pyrrol-Wasserstoffen des Rezeptors und dem Carboxylat des Peptids (Abb. 11, unten). Zusätzliche Sekundärwechselwirkungen zwischen den Peptidseitenketten des Rezeptors und des Substrats erhöhen die Stabilität und erlauben eine Steuerung der Bindungsselektivität.

In Bindungsstudien mit dem Tetrapeptid N-Ac-Glu-Glu-Glu-Glu-OH (**2**, Abb. 11, unten) zeigte das Rezeptormolekül CBS-KKF-NH<sub>2</sub> (**1**, Abb. 11, oben) in gepufferter wässriger Lösung eine besonders hohe Bindungskonstante (23700 M<sup>-1</sup>).<sup>(60)</sup> Weiter-

hin konnte neben der Sequenzselektivität auch eine bemerkenswerte Stereoselektivität in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz verschiedener Substrate nachgewiesen werden. Hierzu wurden im Tetrapeptid D-Glu-D-Glu-D-Glu-D-Glu-OH einzelne Glutaminsäure-Einheiten gegen D- bzw. L-Alanin substituiert. Sowohl D-Glu-**D/L-Ala**-D-Glu-D-Glu-OH als auch D-Glu-D-Glu-**D/L-Ala**-D-Glu-OH zeigten bei quantitativen Festphasen-Fluoreszenz-Assays eine unerwartet starke Diastereoselektivität. In beiden Fällen besitzt das D-Diastereomer im Vergleich zum entsprechenden L-Diastereomer eine ca. zehnmal höhere Bindungskonstante gegenüber dem Rezeptor CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (**1**).<sup>(60)</sup> In dem von Schmuck und Mitarbeitern vorgeschlagenen Modell resultiert diese hohe Diastereoselektivität aus der starren Struktur des Rezeptor-Substrat-Komplexes wenn das jeweilige Alanin zwischen zwei stark gebundenen Glutaminsäuren in der Aminosäuresequenz vorliegt.

Die Bildung solcher supramolekularen Komplexe kann mit einer Vielzahl spektroskopischer Methoden verfolgt werden, wie zum Beispiel der elektronischen Absorptions- und der Fluoreszenz-Spektroskopie.<sup>(61)–(63)</sup> Bisherige Bindungsstudien wurden mit Fluorophor-markierten Substraten oder über elektronische Absorptionsspektroskopie durchgeführt. Diese Methoden liefern aber im Gegensatz zu schwingungsspektroskopischen Daten keine Informationen über die molekularen Änderungen der Struktur des Rezeptors bei der Komplexbildung. Die Raman- und speziell die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie wurden zum Beispiel erfolgreich zur Bestimmung der Struktur von Biomolekülen eingesetzt.<sup>(64)–(81)</sup> Aufgrund des geringen Streuquerschnitts von Wasser sind Raman-Studien sogar in wässrigen Lösungen möglich und durch gezieltes Ausnutzen des Resonanz-Raman-Effekts können selbst stark verdünnte Protein-Lösungen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methodik etabliert werden, die die Komplexbildung des künstlichen Peptidrezeptors CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> **1** mit dem Tetrapeptid N-Ac-Glu-Glu-Glu-Glu-OH **2** in wässriger Lösung Raman-spektroskopisch verfolgen zu können.



## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Probenpräparation

Der Peptidrezeptor CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (**1**), das Tetrapeptid N-Ac-Glu-Glu-Glu-Glu-OH (**2**) und das CBS-Amid wurden im Arbeitskreis von Prof. Schmuck synthetisiert. Die für die Raman-Experimente eingesetzten Substanzen wurden mittels MPLC (*medium pressure liquid chromatography*) gereinigt. Wässrige Rezeptorlösungen wurden mit hochreinem Wasser (spezifischer Widerstand 18 MΩcm) hergestellt und anschließend mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 6 eingestellt.

### 3.2.2 Spektroskopische Methoden

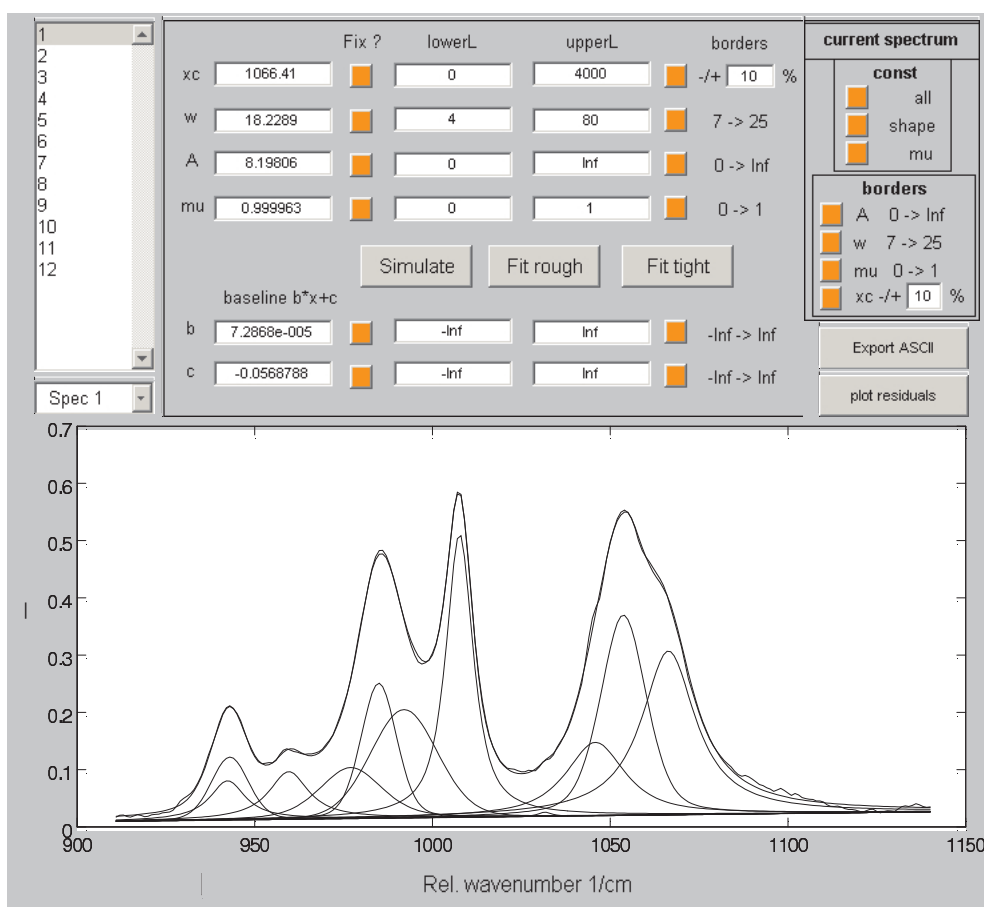
Für die Raman-Studien wurden die Laserlinien eines Argonionen-Lasers (Spectra Physics, Modell BeamLok 2085) im ultravioletten und im sichtbaren Spektralbereich verwendet. Je nach Anregungswellenlänge variierte die Laserintensität auf den Proben zwischen 80 mW (275 nm) und 800 mW (458 nm). Die Raman-Spektren wurden in einer 90°-Geometrie aufgenommen. Um eine photochemische Zersetzung der Proben zu verhindern, wurde die Drehküvetten-Technik eingesetzt.<sup>(82)</sup> Das Streulicht wurde auf den Eingangspalt eines Doppelmonochromators (Spex, Modell 1404 mit 2400 Strichen/mm holografischen Gittern) fokussiert und mit einer Stickstoff-gekühlten CCD-Kamera (Photometrics, Modell SDS 9000, extended UV) detektiert. Die Raman-Spektren wurden im Programm MAPS 2.0, unter Verwendung eines zweifachen spektralen Überlapps mit der *Scanning Multichannel*-Technik SMT,<sup>(83)</sup> aufgenommen. Die Integrationszeit für jedes einzelne spektrale Fenster betrug bei allen verwendeten Anregungswellenlängen ca. 4 Minuten. Als Standard wurden zusätzlich Cyclohexan-Spektren bei jeder Anregungswellenlänge aufgenommen, um eine zuverlässige Wellenzahl-Kalibrierung für alle Spektren zu gewährleisten.

Absorptionsspektren wurden mit einem Spektralphotometer (Perkin-Elmer, Modell Lambda 19 UV-VIS-NIR) mit einer Durchstimmgeschwindigkeit von 120 nm/min aufgenommen.

### 3.2.3 Datenauswertung

Um eine Spektrendekomposition der gemessenen Raman-Spektren in die Beiträge einzelner Raman-Banden durchzuführen wurde in MatLab (Version 7.0) eine Kurvenanpassungs-Routine programmiert, die über eine Benutzeroberfläche (GUI, *graphical user interface*) ausführbar ist. Diese Routine erlaubt es drei Spektren simultan mit Pseudo-Voigt-Profilen zu fiten. Bandenposition, Halbwertsbreite, sowie das Mischungsverhältnis von Gauß- und Lorentz-Anteilen wurde für die jeweilige Bande in den drei Spektren als identisch angenommen.

Zur Optimierung der freien Parameter wurde ein bereits implementierter nicht-



**Abb. 12:** Grafische Benutzeroberfläche in MatLab zur simultanen Kurvenanpassung mehrerer Spektren, die bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommen wurden.

linearer Algorithmus zur Minimierung verwendet (Optimization Toolbox, *Large Scale iminunc Algorithm; Trust-Region Method for Nonlinear Minimization*).

#### 3.2.4 Quantenchemische Rechnungen

Geometrieoptimierungen und Berechnungen von Schwingungsspektren wurden mit dem Programmpaket Gaussian 03 (Revision D.01) durchgeführt. Für alle Berechnungen wurde das Hybridfunktional B3LYP verwendet. Die Solvatation der Modellschubstanz CBS-Amid in Wasser wurde durch das Modell des polarisierten Kontinuums (PCM, *polarization continuum model*) berücksichtigt.

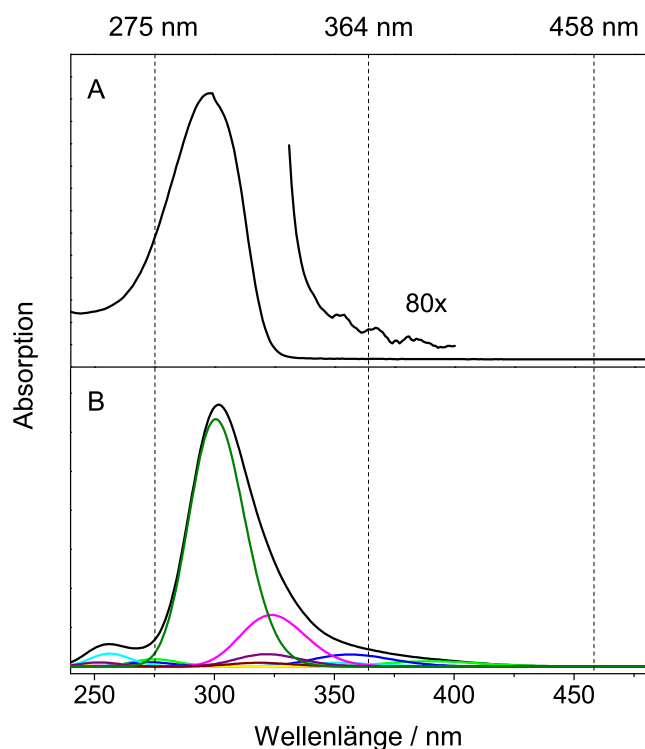
### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.1 Charakterisierung des Rezeptors

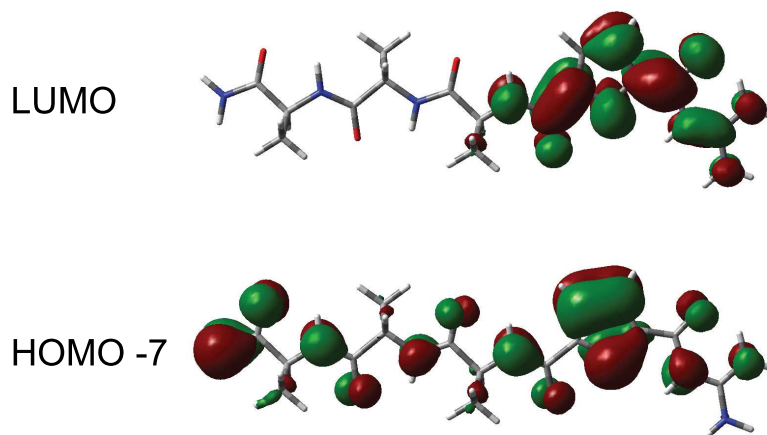
##### Elektronisches Absorptionsspektrum des Rezeptors

Das elektronische Absorptionsspektrum des Rezeptors CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (**1**) ist in Abb. 13A gezeigt. Die intensive Bande bei 298 nm resultiert aus einer starken elektronischen Absorption der CBS-Gruppe des Rezeptor-Moleküls. Um diese Zuordnung zu bestätigen wurde anhand des Modellsystems CBS-Ala-Ala-Ala-NH<sub>2</sub> mittels TD-DFT<sup>(84)</sup> (= *time dependent density functional theory*) das Absorptionsspektrum berechnet. Neben den theoretischen Absorptionsspektren ist es auch möglich, die an dem Übergang beteiligten molekularen Orbitale graphisch darzustellen.

Das berechnete Absorptionsspektrum von CBS-Ala-Ala-Ala-NH<sub>2</sub> ist in Abb. 13B gezeigt: ein starker elektronischer Übergang führt zu einer intensiven Bande um 300 nm; die beteiligten Orbitale in Abb. 14 zeigen, dass die elektronische Anregung aus dem besetzten Orbital (HOMO-7) in das LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) räumlich hauptsächlich auf das delokalisierte  $\pi$ -System der Guanidiniocarbonyl-



**Abb. 13:** (A) Experimentelles elektronisches Absorptionsspektrum des Rezeptors CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (**1**). In der 80-fachen Vergrößerung ist um 364 nm noch eine geringe Absorption zu erkennen. (B) mit TD-DFT berechnetes elektronisches Absorptionsspektrum des Rezeptor-Modellsystems CBS-Ala-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>. Die berechneten Einzelübergänge, die zum Gesamtspektrum beitragen, sind als farbige Kurven dargestellt. Die drei bei den Raman-Experimenten verwendeten Anregungswellenlängen - 275 nm, 364 nm und 458 nm - sind als vertikale Linien eingezeichnet.



**Abb. 14:** Am elektronischen Übergang bei 300 nm maßgeblich beteiligte Orbitale des Modellsystems CBS-Ala-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>.

Gruppe begrenzt ist und, wie erwartet, keine nennenswerten Beiträge aus dem Tripeptid-Teil aufweist.

In Abb. 13 sind die drei verschiedenen Anregungswellenlängen (275, 364, 458 nm) für die Raman-Messungen als vertikale Linien eingezeichnet. Bezüglich des Absorptionsmaximums des Peptidrezeptors entsprechen sie nicht-resonanter (458 nm), prä-resonanter (364 nm) und post-resonanter (275 nm) Anregung.

#### Raman- und UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie des Rezeptors

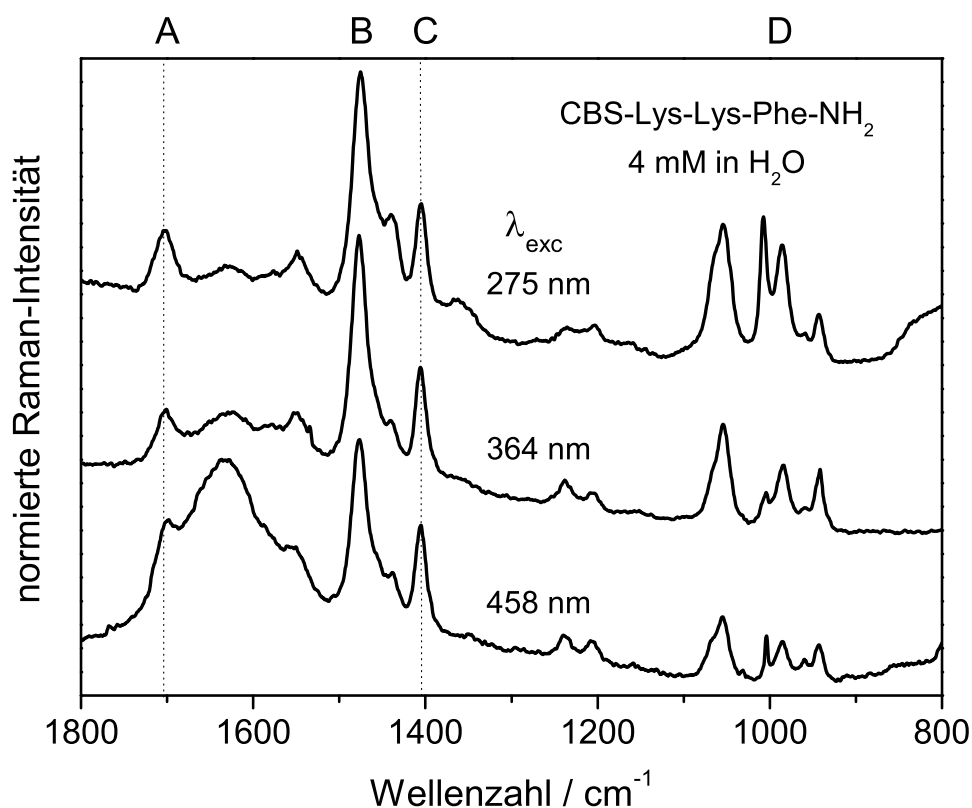
Die Resonanz-Raman-Spektroskopie erlaubt es bestimmte Schwingungsmoden eines Moleküls selektiv zu verstärken. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Schwingungen des elektronisch angeregten Chromophors. Weiterhin spielt für die Größe der Verstärkung die Symmetrie der jeweiligen Schwingungsmoden eine entscheidende Rolle. Die Verwendung von Laserlinien, deren Wellenlänge in der elektronischen Absorption der CBS-Gruppe des Rezeptor-Moleküls liegt, sollten deshalb deren selektive Untersuchung erlauben.

Es wurden Raman-Experimente an einer 4 mM Lösung des reinen Rezeptors bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich (275, 364 und 458 nm) durchgeführt. Bei post-resonanter Anregung mit 275 nm werden die Schwingungen der CBS-Einheit selektiv verstärkt und treten

mit deutlich höherer Intensität im Vergleich zu nicht-resonanter Anregung auf. Eine Laseranregung direkt in das Absorptionsmaximum sollte nach Gl. 9 eine effektive Resonanz-Verstärkung der Raman-Streuung hervorrufen. Bei Raman-Experimenten mit Laseranregung direkt in das Absorptionsmaximum der CBS-Einheit (mit 300.3, 302.4 und 305.5 nm) wurden die Raman-Signale von starker Fluoreszenz maskiert. Trotz der eingesetzten Dreh-Küvetten-Technik wurde ein Anstieg dieser Fluoreszenz bei anhaltender Laserbestrahlung beobachtet. Nachfolgende Messungen an den gleichen Proben außerhalb der elektronischen Resonanz mit 458 nm Anregung zeigten ebenfalls einen stark erhöhten Fluoreszenz-Untergrund. Es wird deshalb eine photochemische Veränderung der Probe und die Bildung von fluoreszierenden photochemischen Produkten angenommen. Folglich ist die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie mit 275 nm am besten zur selektiven Untersuchung der CBS-Gruppe des Rezeptors **1** in millimolaren bis submillimolaren wässrigen Lösungen geeignet. Aber auch Raman-Spektren, die mit 364 und 458 nm Anregung aufgenommen wurden, enthalten wertvolle zusätzliche Informationen bezüglich der spektral stark überlagerten Bereiche.

Die entsprechenden Raman-Spektren des Rezeptors sind in Abb. 15 gezeigt. Abhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge sind deutliche Unterschiede in den relativen Intensitäten einzelner Raman-Banden zu erkennen. Diese spektralen Änderungen resultieren aus den unterschiedlichen elektronischen Resonanzbedingungen. Bei Anregung mit 458 nm (Abb. 15 unten) verhindert die breite Raman-Bande der symmetrischen Biegeschwingung von Wasser (um  $1633\text{ cm}^{-1}$  zentriert) eine spektrale Analyse dieses Bereichs. Bei prä- und post-resonanter Anregung mit 364 nm (Abb. 15 Mitte) und 275 nm (Abb. 15 oben) ist der relative Beitrag dieser Wasserbande in den Raman-Spektren erheblich reduziert. Hier ist in beiden Fällen die Raman-Streuung des Rezeptors **1** im Vergleich zum Lösungsmittel Wasser deutlich verstärkt. So ergibt sich die Möglichkeit, den Bereich der Amid-I-Banden zu analysieren.

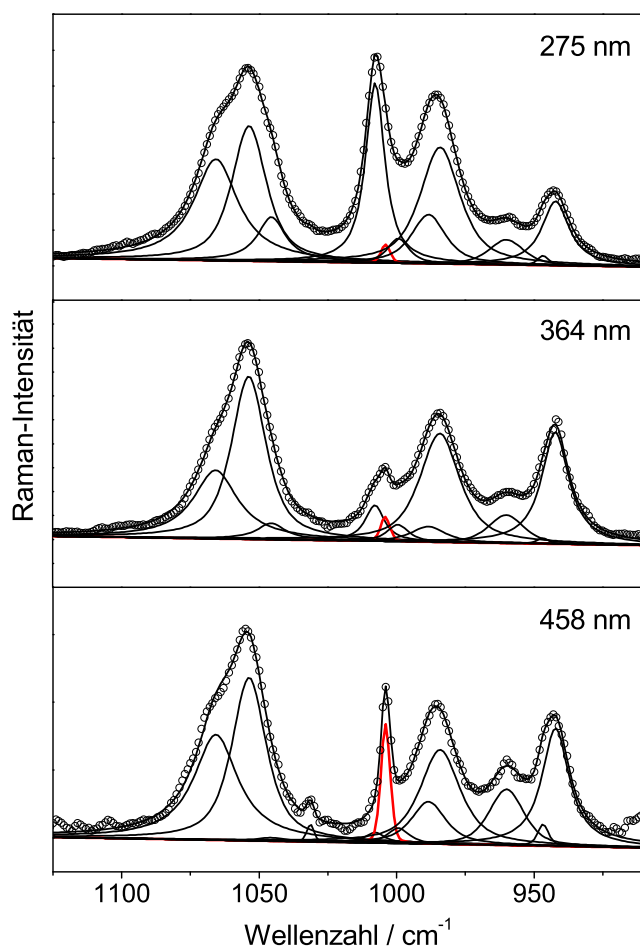
Die unterschiedlichen Resonanzbedingungen haben auch einen merklichen Einfluss auf die relativen Raman-Intensitäten der CBS-Gruppe im Vergleich zu denen des Tripeptid-Teils. Dies kann am Beispiel der Phenyl-Ring-Streckschwingung (rote Bande in Abb. 16) bei  $1003\text{ cm}^{-1}$  diskutiert werden. In Abb. 16 ist das Ergebnis einer simultanen Spektrendekomposition in die Beiträge einzelner Raman-Banden darge-



**Abb. 15:** Experimentelle Raman-Spektren des Rezeptors CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (1) im Wellenzahlbereich von 1800 - 800 cm<sup>-1</sup> (4 mM in Wasser). Anregungswellenlängen: 275 nm (oben), 364 nm (Mitte) und 458 nm (unten).

stellt. Bei nicht-resonanter Anregung mit 458 nm ist die schmale Bande des Phenylalanins bei 1003 cm<sup>-1</sup> klar zu erkennen, während bei prä-resonanter Anregung (364 nm) ihre relative Intensität bereits deutlich reduziert ist. Bei post-resonanter Anregung (275 nm) wird eine intensive Bande bei 1007 cm<sup>-1</sup> beobachtet, wohingegen die Beiträge der Phenylalanin-Bande vernachlässigbar sind. Das Raman-Signal bei 1007 cm<sup>-1</sup> wird einer Normalmode der CBS-Einheit zugeordnet, die bei 275 nm Anregung eine Resonanz-Verstärkung erfährt. Somit ist die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie eine sehr sensitive Methode, um selektiv die Wechselwirkung zwischen der CBS-Einheit des Rezeptors mit dem Carboxyterminus von Peptid-Substraten zu untersuchen.

Für eine Zuordnung der Banden in den experimentellen Spektren in Abb. 15 wurden quantenchemische Berechnungen an dem Modellsystem CBS-C(O)-NH<sub>2</sub> durchgeführt. Dieses Molekül besitzt sowohl das relevante Chromophor als auch das 2,5-

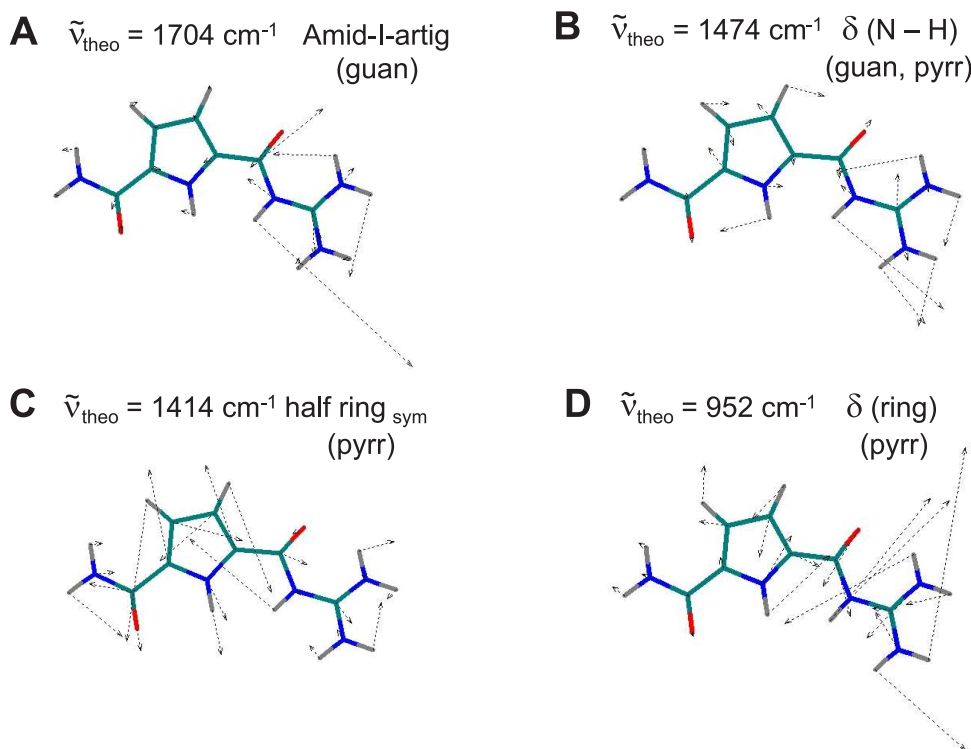


**Abb. 16:** Ergebnis einer simultanen Kurvenanpassung mit Pseudo-Voigt-Profilen für die bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen erhaltenen Rezeptorspektren im Bereich von  $1125\text{ cm}^{-1}$  bis  $910\text{ cm}^{-1}$ . Anregungswellenlängen: 275 nm (oben), 364 nm (Mitte) und 458 nm (unten). In rot ist jeweils die charakteristische Bande des Phenylalanins dargestellt. Ihre relative Intensität sinkt deutlich bei prä- und post-resonanter Anregung (364 nm bzw. 275 nm) und belegt somit die selektive Verstärkung der Raman-Banden der CBS-Einheit gegenüber den Banden des Peptidteils des Rezeptors.

Substitutionsmuster des Pyrrolrings, sodass die dominanten Banden in den experimentellen UV-Resonanz-Raman-Spektren beschrieben werden können.

In Abb. 17 sind vier ausgewählte Eigenvektoren der CBS-Einheit gezeigt, die aus einer DFT-Berechnung (B3LYP/6-311G++(d,p), PCM mit Wasser) an der Modellsubstanz erhalten wurden. Die Schwingungsmoden sind entsprechend den spektralen Bereichen A - D in Abb. 15 gekennzeichnet. Das Vektorbild in Abb. 17 A zeigt eine Amid-I-artige C=O-Streckschwingung an der Guanidiniocarbonyl-Gruppe der CBS bei  $1704\text{ cm}^{-1}$  in besonders guter Übereinstimmung mit der Bandenlage im experimentellen Spektrum ( $1702\text{ cm}^{-1}$ , Abb. 15). Im berechneten Gasphasenspektrum (ohne Anwendung des PCM-Modells für Wasser) ist die Mode zu einem deutlich höheren Wellenzahlwert ( $1719\text{ cm}^{-1}$ ) verschoben. Experimentell konnte diese Bande auch in anderen Verbindungen, die einen CBS-Baustein enthalten, Raman-spektroskopisch nachgewiesen werden.<sup>(85)</sup> Die Normalmode in Abb. 17





**Abb. 17:** Eigenvektoren für ausgesuchte Schwingungsmoden der Modellsubstanz CBS-C(O)-NH<sub>2</sub> aus einer DFT-Berechnung (B3LYP/6-311G++(d,p), PCM mit Wasser).

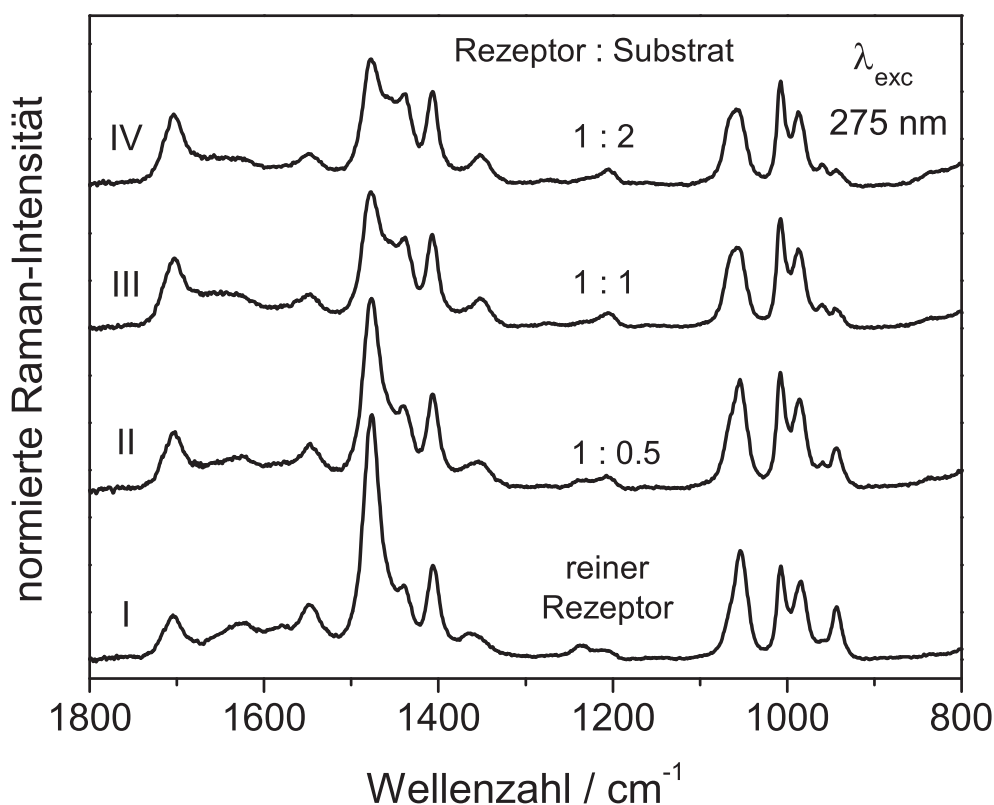
B bei  $1474 \text{ cm}^{-1}$  setzt sich aus N-H-Biegeschwingungen der Guanidinio-Einheit und des Pyrrolrings zusammen. Daher ist anzunehmen, dass diese Mode durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Komplexierung der CBS mit der Carboxylat-Gruppe eines Substrats eine Verschiebung im Spektrum erfährt. In Gegensatz dazu sollte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bzw. die Komplexierung eines Substratmoleküls durch das Rezeptormolekül bei der symmetrischen Pyrrol-Ringschwingung in Abb. 17 C keine nennenswerte Verschiebung im Raman-Spektrum verursachen. Aus diesem Grund wurde diese Bande zur Normierung der experimentellen Spektren im folgenden Abschnitt herangezogen (siehe Abb. 18 und 19). In Abb. 17 D ist das Eigenvektorbild einer Bande gezeigt, die sich neben einer Pyrrol-Deformationsschwingung hauptsächlich aus N-H-Deformationsschwingungen der Guanidiniocarbonyl-Gruppe zusammensetzt. Durch diese starke Beteiligung von N-H-Deformationsschwingungen an Moden dieses Wellenzahlbereichs werden für Banden in Region D in Abb.15 auch erhöhte

Sensitivitäten für Wasserstoffbrückenbindungen erwartet.

### 3.3.2 Charakterisierung des Rezeptor-Substrat-Komplexes

#### Verfolgung der Rezeptor-Komplexierung: qualitative Analyse

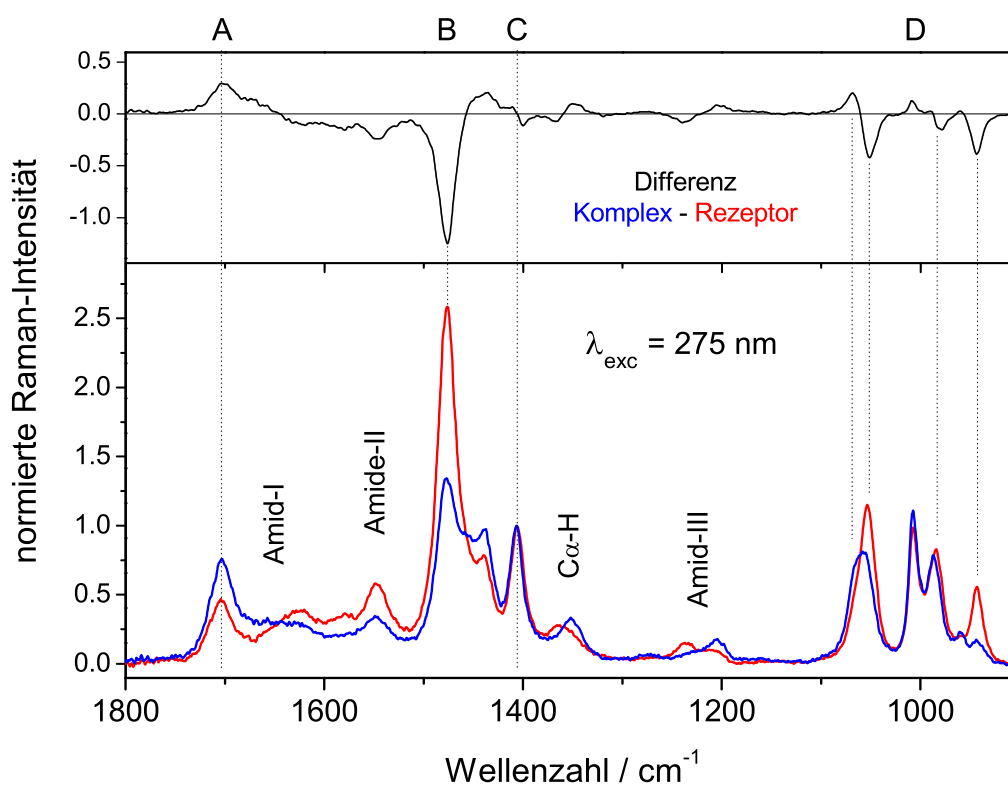
Abb. 18 zeigt die Raman-Spektren einer 0.5 mM wässrigen Lösung des reinen Rezeptors **1** (I) und mehreren Mischungen mit zunehmendem Anteil an Tetrapeptid **2** (II, III, IV) bei pH 6. Die Zugabe von nur einem halben Äquivalent Tetrapeptid **2** zur Rezeptor-Lösung führt bereits zu signifikanten Änderungen in den entsprechenden UV-Resonanz-Raman-Spektren (Abb. 18 I und II).



**Abb. 18:** UV-Resonanz-Raman-Spektren von 0.5 mM CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>-Lösung (I) und Mischungen mit verschiedenen Äquivalenten (0.25 mM (II), 0.5 mM (I) und 1 mM (IV)) des Tetrapeptides N-Ac-Glu-Glu-Glu-Glu-OH (**2**). Alle Spektren wurden in Wasser mit 275 nm Laseranregung aufgenommen und sind auf die Intensität der 1404  $\text{cm}^{-1}$  Raman-Bande normiert.

Ähnliche Unterschiede werden zwischen der 1:0.5 und 1:1 (Abb. 18 II und III) Rezeptor:Tetrapeptid-Stöchiometrie beobachtet. Die 1:1- und 1:2-Mischungen hingegen zeigen nur geringfügige Änderungen (Abb. 18 III und IV). Dieses Raman-Titrations-Experiment belegt hiermit die hohe Effizienz CBS-basierter Rezeptoren bei der molekularen Erkennung von Peptiden in Wasser. Um selbst feinste spektrale Änderungen zu analysieren, sind Differenz-Spektren eine gängige Veranschaulichungsmethode.

In Abb. 19 oben ist das Differenz-Spektrum der 1:2-Mischung und des reinen Rezeptors abgebildet. Die Raman-Bande (C) bei  $1404\text{ cm}^{-1}$  wurde zu Normierung herangezogen, da sich nach H/D-Austausch bei Messungen in schwerem Wasser nur kleine Wellenzahlverschiebungen ( $< 5\text{ cm}^{-1}$ ) zeigten und sie somit relativ unempfindlich gegenüber Wasserstoffbrückenbindungen zu sein scheint. Wie Berechnungen



**Abb. 19:** Unten: UV-Resonanz-Raman-Spektren einer  $0.5\text{ mM}$  CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>-Lösung (1) (rote Linie) und der 1:2-Mischung mit dem Tetrapeptid N-Ac-Glu-Glu-Glu-Glu-OH (2) (blaue Linie). Spektren sind auf die Intensität der Raman-Bande bei  $1404\text{ cm}^{-1}$  normiert. Oben: Differenz-Spektrum (1:2-Mischung – reiner Rezeptor).

zeigen, beinhaltet die dazugehörige Normalmode hauptsächlich symmetrische C-C-Streckschwingungen des Pyrrol-Rings. Da die Komplexierung des Substrats auf der Ausbildung eines Wasserstoffbrücken-unterstützten Ionenpaares zwischen der CBS und dem Carboxylat basiert, werden für diese Bande keine signifikanten Änderungen durch die Substrat-Bindung erwartet.

Die Spektren des reinen Rezeptors **1** und der 1:2-Mischung mit dem Substrat **2** zeigen einige ausgeprägte und spezifische spektrale Unterschiede. So weist zum Beispiel die isolierte Raman-Bande (A) bei  $1702\text{ cm}^{-1}$  Veränderungen sowohl in der Wellenzahl-Position als auch in der Intensität auf. Wie weiter oben beschrieben handelt es sich um eine Amid-I-artige C=O-Streckschwingung der CBS. Die größten spektralen Intensitätsänderungen in Abb. 19 werden um  $1480\text{ cm}^{-1}$  in der Region (B) beobachtet, in der N-H-Biegeschwingungen der Guanidinio-Einheit und des Pyrrol-Rings auftreten. Im Bereich (D) zwischen  $1100$  und  $900\text{ cm}^{-1}$  liegen verschiedene Pyrrol-Ring-Deformations-Schwingungen mit N-H-Deformationsschwingungen. Hier werden ebenfalls Änderungen in Wellenzahl-Positionen und/oder Raman-Intensitäten der darunter liegenden Banden beobachtet.

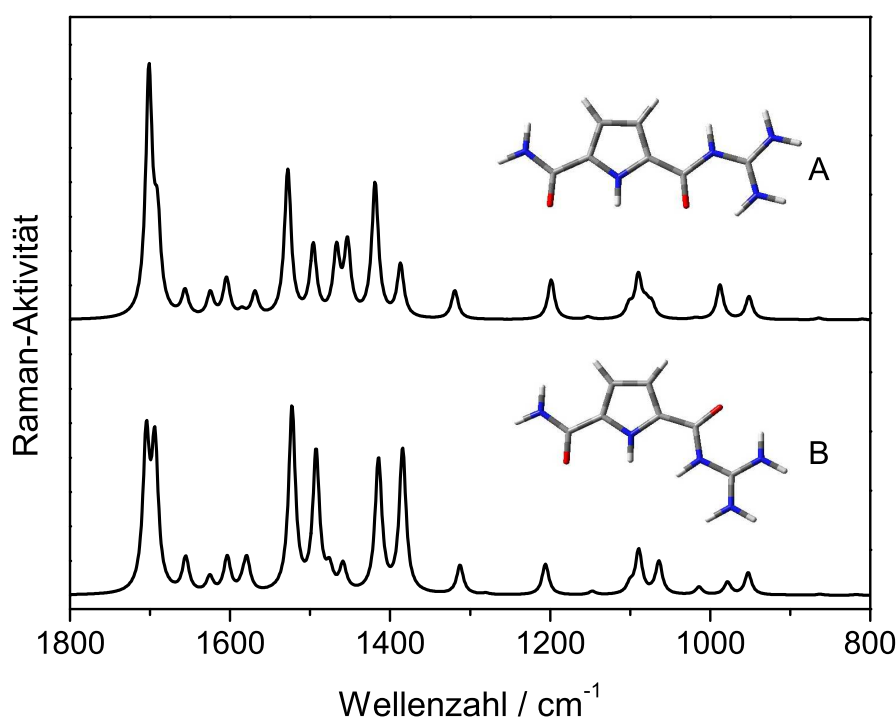
Folglich enthalten alle ausgeprägten spektralen Änderungen bei der Komplexierung des Rezeptors Informationen über die CBS-Einheit. Es konnte somit gezeigt werden, dass mittels UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie die Bindung des Carboxylat-Terminus eines Tetrapeptides an die CBS des Rezeptors selektiv verfolgt werden kann.

#### **Verfolgung der Komplexierung: Versuch einer quantitativen Analyse**

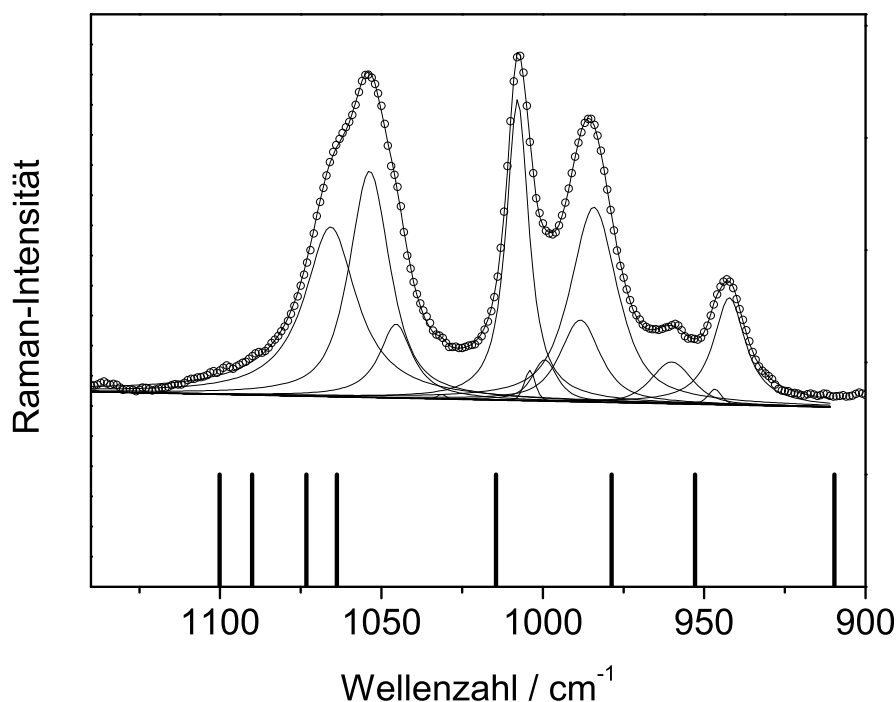
Eine quantitative Interpretation der Änderungen in den UV-Resonanz-Raman-Spektren des Rezeptors bei der Komplexierung (Abb. 18 und 19) kann durch Vergleich mit berechneten Spektren erfolgen. Es wurden quantenchemische Berechnungen unter Einbeziehung des Modells des polarisierten Kontinuums (PCM,<sup>(86),(87)</sup> *polarization continuum model*) mit Wasser durchgeführt, um die wässrige Umgebung im Experiment zu simulieren. Zuerst war eine Modenzuordnung der Raman-Banden im Spektrum des reinen Rezeptors (Abb. 15) nötig. Es wurde CBS-C(O)NH<sub>2</sub> als Modellsystem zur Simulation der Spektren ausgewählt, da angenommen wird, dass die spektralen Eigenschaften des experimentellen UV-Resonanz-Raman-Spektrums

ausreichend reflektiert werden. Das Modellsystem beinhaltet zum einen das resonant angeregte Chromophor des Rezeptors **1**, zum anderen das 2,5-Substitutionsmuster des Pyrrol-Rings der CBS. Wie oben gezeigt, werden mit 275 nm Anregung selektiv die Schwingungsmoden der CBS resonant verstärkt und die spektralen Beiträge des Tripeptid-Teils können vernachlässigt werden (siehe Abb. 16 auf Seite 43).

DFT-Rechnungen wurden an vier verschiedenen Konformeren des Modellsystems durchgeführt, da prinzipiell davon ausgegangen werden muss, dass nicht nur ein Konformer in Lösung vorliegt. Als Ergebnis der Berechnungen müssen die beiden Konformere **A** und **B** in Abb. 20 in Betracht gezogen werden. Das stabilste Konformer **A** liegt um 8.8 kJ/mol niedriger als Konformer **B**. Jedoch ist **B** die benötigte Konformation, um das Oxoanion zu binden. In Abb. 20 sind die theoretischen Raman-Spektren dieser beiden Konformere gezeigt. Die Unterschiede sowohl in den Bandenpositionen als auch in den Raman-Intensitäten belegen die Fähigkeit der Raman-Spektroskopie zwischen Konformeren zu unterscheiden.<sup>(88), (89)</sup> Deshalb sind die beobachteten spektralen Änderungen bei der Komplexbildung zu einem gewis-



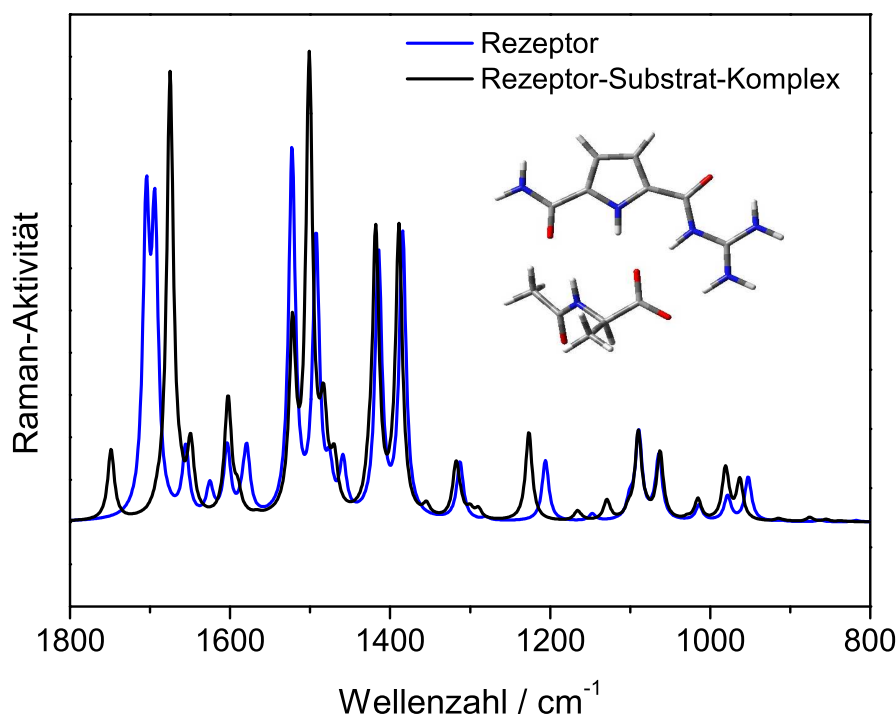
**Abb. 20:** Berechnete Raman-Spektren von Konformer A (oben) und Konformer B (unten) des Modellsystems CBS-C(O)NH<sub>2</sub>.



**Abb. 21:** Unten: Lage der acht Banden im berechneten Raman-Spektren des Rezeptor-Modellsystems CBS-C(O)NH<sub>2</sub> im Bereich von 1140 - 900 cm<sup>-1</sup>. Oben: Ergebnis der simultanen Kurvenanpassung für eine Anregungswellenlänge von 275 nm. Es werden mindestens zwölf Raman-Banden benötigt, um das gemessene Spektrum mit Pseudo-Voigt-Profilen anzupassen.

sen Teil auf eine Veränderung der Konformerenzusammensetzung zurückzuführen. Auch der Vergleich der mathematisch bearbeiteten experimentellen mit den berechneten Daten in Abb. 21 zeigt deutlich, dass mehr als eine Molekülspezies unter den experimentellen Bedingungen vorlagen. Die Diskrepanz zwischen acht berechneten Normalmoden zu mindestens zwölf Moden aus der simultanen Kurvenanpassung kann zum Beispiel durch das Vorliegen von unterschiedlichen Konformeren erklärt werden. Zusätzlich können spektrale Beiträge durch das Vorliegen des Rezeptors in einem Gleichgewicht zwischen seiner protonierten und deprotonierten Form auftreten.

Des Weiteren muss der Einfluss der Carboxylat-Bindung auf die Raman-Spektren berücksichtigt werden. Es wurde deshalb ein Komplex aus der Rezeptormodell-Substanz (Konformer **B** in Abb. 20) und N-acyliertem Alanin berechnet. In Abb. 22 ist die Struktur des Komplexes zusammen mit den berechneten Raman-Spektren des Rezeptors und des Rezeptor-Substrat-Komplexes gezeigt. Die Amid-I-artige Schwin-



**Abb. 22:** Berechnete Raman-Spektren des Rezeptor-Modellsystems CBS-C(O)NH<sub>2</sub> (blaue Kurve) und seiner Komplexierung mit dem vereinfachten Substrat N-Ac-Ala (schwarze Kurve).

gung um 1700 cm<sup>-1</sup> zeigt in den theoretischen Spektren eine Wellenzahlverschiebung von ca. -10 cm<sup>-1</sup> bei der Komplexierung. In den experimentellen UV-Resonanz-Raman-Spektren wird für diese Bande ebenfalls eine negative Verschiebung beobachtet, wenngleich der Betrag viel geringer ist. Die beobachteten spektralen Änderungen sind somit durch eine Kombination mehrerer Effekte verursacht: (i) der Änderung des Gleichgewichts zwischen Konformeren des Rezeptors, (ii) des pH-abhängigen Säure-Basen-Gleichgewichts des Rezeptors und (iii) einer Änderung der Geometrie des Rezeptor-Moleküls durch das Ausbilden eines Wasserstoffbrücken-unterstützten Ionenpaars durch die Carboxylat-Bindung an die CBS-Gruppe. Alle drei Effekte müssen für eine quantitative Analyse des Komplexierungsprozesses miteinbezogen werden.

### 3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass sich die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie optimal eignet, um die Bildung eines supramolekularen Komplexes zwischen einem künstlichen Rezeptor und einem Tetrapeptid als Substrat in wässriger Lösung zu verfolgen. Diese Herangehensweise bietet die nötige Sensitivität für Experimente in Wasser bei submillimolaren Konzentrationen und die Selektivität zur gezielten Untersuchung der Carboxylatbindungsstelle (CBS) des Rezeptors CBS-KKF-NH<sub>2</sub>.

Anhand des mit TD-DFT berechneten Absorptionsspektrums von CBS-Ala-Ala-Ala-NH<sub>2</sub> und den berechneten Molekülorbitalen, die bei der elektronischen Anregung beteiligt sind, wurde die selektive Verstärkung der Normalmoden der CBS-Einheit bei UV-Anregung theoretisch bestätigt. Dies konnte auch durch eine simultane Bandendekomposition für Raman-Spektren, die bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufgenommen wurden, über die relativen Intensitäten der Phenylalanin-Bande gezeigt werden. Somit können die wichtigsten spektralen Änderungen bei der Komplexierung auf eine Veränderung der CBS-Einheit zurückgeführt werden.

Erste berechnete Raman-Spektren an einem Rezeptor-Modellsystem und dessen Komplexierung unter Berücksichtigung der wässrigen Umgebung (DFT/PCM) sind vielversprechend, aber noch nicht ausreichend für eine detaillierte quantitative Analyse dieser spektralen Änderungen. Trotzdem zeigen diese Studien, dass die beobachteten spektralen Änderungen durch eine Kombination mehrerer Effekte verursacht werden. Neben der Komplexierung der CBS beeinflussen auch der pH-Wert und die Temperatur (Vorliegen verschiedener Konformere) das Raman-Spektrum.

Dieses komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren ist in Abb. 23 schematisch dargestellt; diese Übersicht soll die Vielzahl möglicher in Lösung vorliegender Spezies des Modellsystems CBS-Amid illustrieren. Alle vier möglichen Konformere (Abb. 23 links) können zudem auch noch in ihrer protonierten und deprotonierten Form vorliegen (Abb. 23 Mitte), so dass insgesamt acht verschiedene Spezies möglich sind. In weiterführenden Studien von Dr. Sunil Srivastava und Stephan Niebling<sup>(90)</sup> wurde die pH-Abhängigkeit der UV-Resonanz-Raman-Spektren von CBS-Amid und CBS-KKF-NH<sub>2</sub> in Wasser untersucht. Sowohl für das Modellsystem CBS-Amid als auch für den Rezeptor CBS-KKF-NH<sub>2</sub> wurde eine starke pH-Abhängigkeit der UV-Resonanz-Raman-Spektren beobachtet.



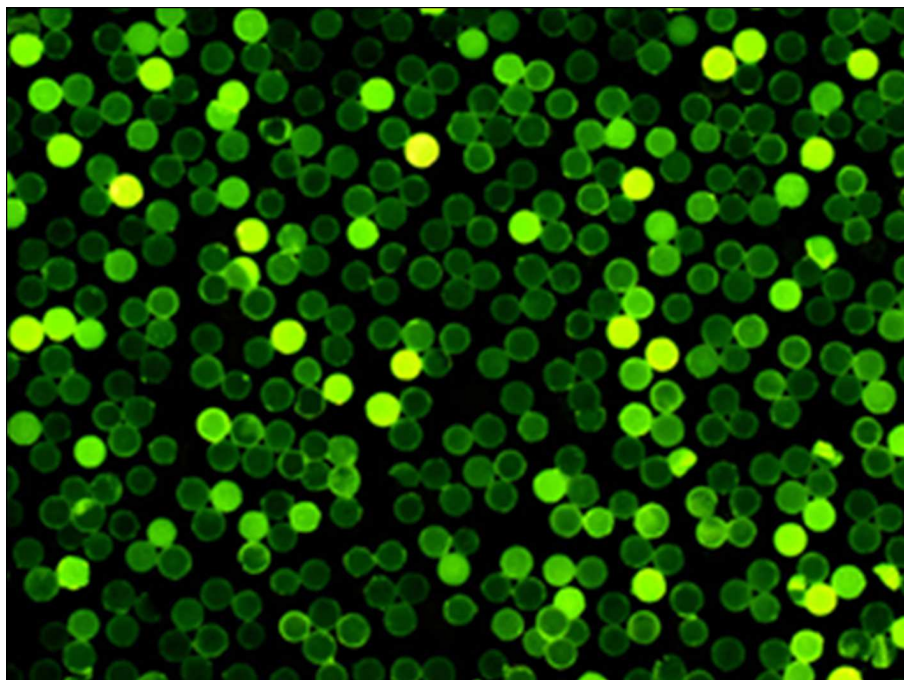


tenchemische Rechnungen durchführen zu können. Eine NMR-Strukturbestimmung des Komplexes in Lösung könnte zum Beispiel in DMSO und idealerweise in Wasser durchgeführt werden. In weiteren Studien können durch Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie mit noch kürzerwelligeren UV-Laserlinien selektiv die Peptidrückgrate von Rezeptor und Substrat resonant verstärkt werden.

## 4 Wirkstoff-Charakterisierung auf einzelnen Festphasen-Partikeln

### 4.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Festphasengebundene Substanzen finden heutzutage vielfältigen Einsatz in der Chemie: nicht nur bei der Synthese von Nukleinsäuren, Peptiden oder Kohlenhydraten, sondern auch für die weitere Untersuchung und direkte Anwendung in der supramolekularen Chemie<sup>(91)–(93)</sup> oder der medizinischen Chemie.<sup>(94)–(96)</sup> In der Regel wird dabei ein vernetztes Polystyrollharz mit einer Beladung von einigen 100 pmol Substanz pro Harzkügelchen verwendet. Wegen dieser sehr geringen Mengen ist es außerordentlich schwierig, die gebundenen Substanzen auf den Harzkügelchen direkt zu analysieren. Meistens werden daher die Eigenschaften der harzgebundenen Substanzen (z. B. ihre Fähigkeit zur Bindung eines spezifischen Substrats) in Screening-Experimenten mit fluorophor- oder chromophormarkierten Substraten untersucht (siehe Abb. 24).<sup>(97),(98)</sup>

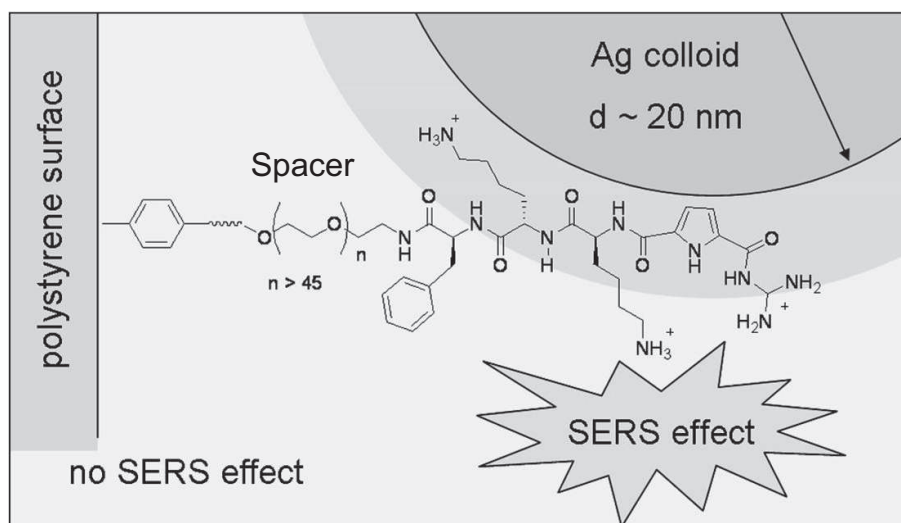


**Abb. 24:** Screening einer festphasenbasierten kombinatorischen Bibliothek von Rezeptoren mit fluorophor-markiertem Substrat.

Dabei ist es aber oft nicht möglich, direkt die Identität der auf dem Harz befindlichen Substanz oder gar die Struktur der gebildeten Komplexe zu bestimmen.<sup>(99)–(101)</sup> Für Bibliotheken aus chemisch sehr unterschiedlichen Substanzen gelingt manchmal eine direkte massenspektrometrische (MS) Analyse. Da die Substanzen hierfür aber vom Harz abgespalten werden müssen, ist eine solche Analyse unmittelbar während eines Screening-Experiments nicht möglich.<sup>(102)–(104)</sup> Eine Alternative besteht in der Einführung eines Markers (*chemical tagging*), was aber den Aufwand der Festphasensynthese erhöht, da zusätzlich zur Substanz auch noch der Marker auf dem Harz angebracht werden muss, der es später ermöglicht, die Identität der harzgebundenen Substanz zu bestimmen. Weil der Marker weder bei der Synthese der Substanz noch beim anschließenden Screening stören darf, stehen häufig nur wenige Marker zur Auswahl.<sup>(105)</sup>

Eine direkte und markierungsfreie Detektion einer festphasengebundenen Substanz ist daher eine interessante Alternative. Allerdings muss jede spektroskopische Charakterisierung einer festphasengebundenen Substanz zwei Herausforderungen meistern: die geringe Beladung mit dem nachzuweisenden Stoff und den großen Überschuss an Harzmaterial, welches meistens ebenfalls spektroskopisch erfasst wird. Bei einzelnen Harzkügelchen mit picomolarer Beladung scheiden dadurch, zumindest für die üblichen Harzmaterialien, Techniken wie die nicht ausreichend empfindliche Festkörper-NMR-Spektroskopie aus. Auch hoch empfindliche Techniken wie die UV-Absorptions- oder die Fluoreszenzspektroskopie sind nicht geeignet. Prinzipiell wären schwingungsspektroskopische Techniken wie die Raman<sup>(15)</sup>- oder die IR-Spektroskopie gut einsetzbar,<sup>(106)–(109)</sup> da sie nicht nur ausreichend empfindlich sind, sondern (im Unterschied zu UV-Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie) auch detaillierte Informationen über die chemische Zusammensetzung und Struktur der harzgebundenen Substanzen liefern können.<sup>(110)–(113)</sup> Normalerweise gelingt es mit schwingungsspektroskopischen Techniken aber nicht, die eigentliche Substanz von dem ebenfalls spektroskopisch aktiven Harzmaterial zu unterscheiden.

In diesem Zusammenhang sollte hier mittels oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS, *surface-enhanced Raman scattering*) direkt und markierungsfrei eine festphasengebundene Substanz auf einem einzelnen Harzkügelchen detektiert werden. SERS ist eine ultrasensitive Variante der Raman-Streuung für Moleküle auf und in der Nähe von metallischen Nanostrukturen und vereint dabei die Vorteile der



**Abb. 25:** Silbernanopartikel führen zu einer enormen SERS-Verstärkung des Raman-Signals für Moleküle, die sich nahe ihrer Oberfläche befinden. Das Raman-Signal von Rezeptor **1** erfährt eine Verstärkung, die weiter von der Silberoberfläche entfernte Polystyrolmatrix aber nicht.

Raman-Spektroskopie mit einer hoch empfindlichen Detektion von Substanzen in der Nähe der Oberfläche von Metall-Nanostrukturen.<sup>(16), (19), (29), (114)–(117)</sup> Häufig werden sphärische Nanopartikel aus Silber und Gold mit Durchmessern von typischerweise 20 bis 100 nm zur Verstärkung der Raman-Streuung eingesetzt. Dabei nutzt man die optische Anregung von Oberflächenplasmonen, also von den kollektiven Schwingungen des freien Elektronengases im Metall, aus. Die resultierende elektromagnetische Feldverstärkung im Nahfeld der Metalloberfläche verstärkt das Raman-Signal von Molekülen um bis zu 14 Größenordnungen, bis hin zur Detektion einzelner Moleküle. Die starke Abstandsabhängigkeit des SERS-Effekts ( $r^{-12}$ ) lässt sich nun nutzen, um eine festphasengebundene Substanz vom Harzmaterial zu unterscheiden (Abb. 25). Als Beispiel für die Anwendung von SERS zur direkten und markierungsfreien Detektion einer festphasengebundenen Substanz wurde der künstliche Peptidrezeptor CBS-Lys-Lys-Phe-NHR (**1**; siehe Kapitel 3) auf einem handelsüblichen TentaGel-NH<sub>2</sub>-Harz untersucht.<sup>(59), (60), (118)</sup>

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Kolloidsynthesen

Zur Synthese der Silbernanopartikel wurde ein Ansatz von Lee und Meisel<sup>(119)</sup> modifiziert. In allen Experimenten wurde frisch entgastes und mit Argon gesättigtes deionisiertes Wasser (spezifischer Widerstand: 18 M $\Omega$ cm) verwendet. Sämtliche Glasgeräte wurden sorgfältig mit Königswasser gereinigt und mit deionisiertem Wasser gespült. Die Umsetzung erfolgte unter Argon-Atmosphäre in einem 500 ml-Rundkolben mit Kühler. Zu einer siedenden Lösung von AgNO<sub>3</sub> (45 mg) in Wasser (250 ml) wurde unter heftigem Rühren eine 1-%ige Natriumcitrat-Lösung (5 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend weitere 90 min erhitzt.

### 4.2.2 Probenpräparation

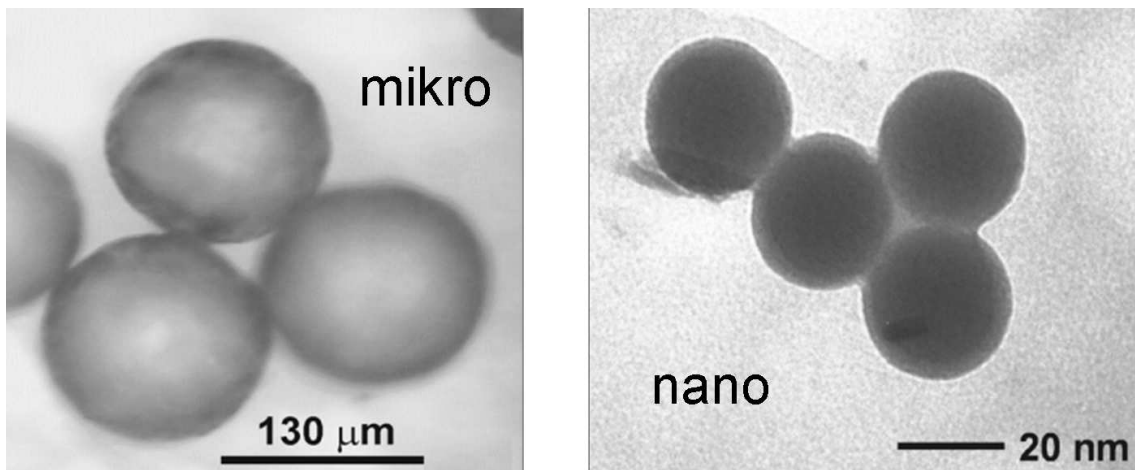
400  $\mu$ l der kolloidalen Silberlösung wurden mit gequollenen Harzkügelchen vermischt, die vorher mindestens 3 h mit einer 0.1 M KCl-Lösung versetzt worden waren. Die Aggregation der Nanopartikel wurde durch die Zugabe von 60  $\mu$ l einer 0.1 M KCl-Lösung eingeleitet. Nach der Aggregation der Nanopartikel wurde durch Zugabe von 30  $\mu$ l 0.1 M HCl der pH-Wert auf 2.5 eingestellt.

### 4.2.3 Raman-Mikrospektroskopie

Die SERS-Spektren wurden mit einem Raman-Mikrospektrometer (Horiba-Jobin-Yvon, Modell LabRam, holographisches Gitter mit 1800 Strichen pro Millimeter) aufgenommen. Die Strahlung eines HeNe-Lasers (632.8 nm) wurde mit einem 50fach vergrößernden Mikroskopobjektiv (Olympus, Model LMPlanFL) auf die Probe fokussiert und in Rückstreuengeometrie gesammelt. Die Laserleistung auf der Probe betrug bei diesen Messungen etwa 10 mW. Die Detektion des Raman-Spektrums erfolgte mit einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera. Die Autofluoreszenz der Verbindungen, wie sie bei konventionellen Raman-Spektren auftritt, wird in den SERS-Experimenten auf dem Harz effizient gelöscht.

### 4.3 Ergebnisse und Diskussion

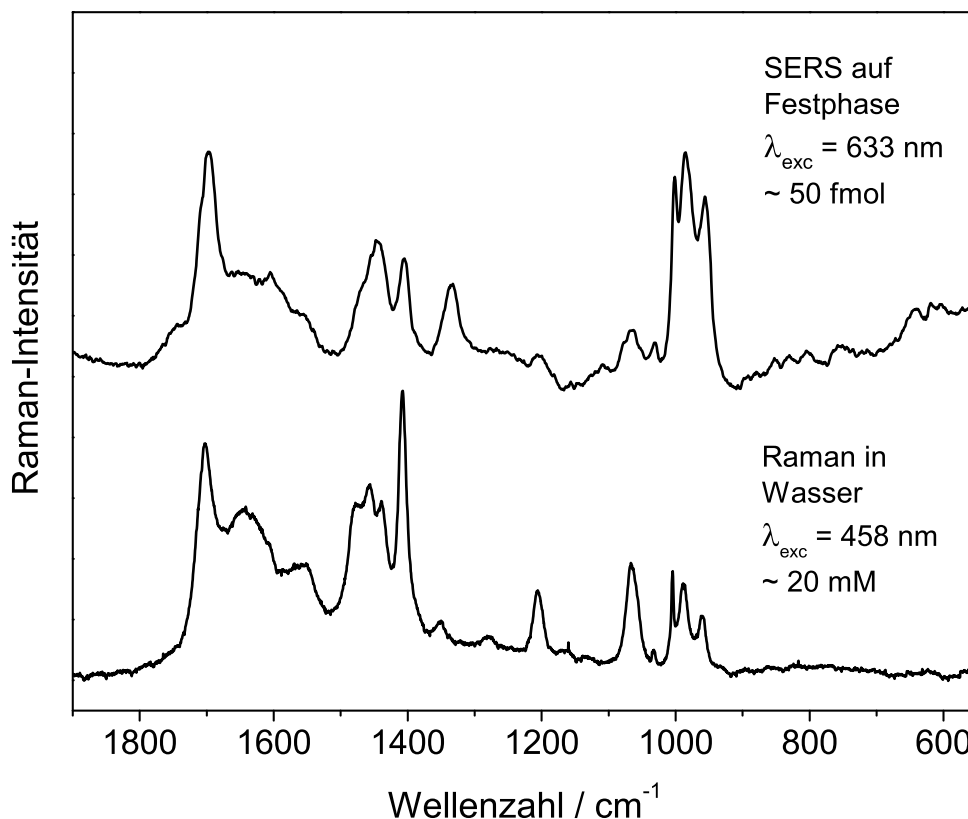
In fraktalen Strukturen aus aggregierten Edelmetallnanopartikeln ist eine Verstärkung des Raman-Signals von bis zu  $10^{15}$  erreichbar. In den Experimenten wurden Silber-Nanopartikel eingesetzt, die durch Reduktion einer Silbernitratlösung mit Natriumcitrat nasschemisch hergestellt wurden (Abb. 26 rechts). Das im Überschuss zugegebene Citrat erzeugt durch Adsorption auf der Oberfläche der gebildeten Nanopartikel ein negatives Oberflächenpotential. Diese negative Ladung bewirkt eine Abstoßung der einzelnen Nanopartikel voneinander und verhindert so die Aggregation und das Ausfallen der Partikel. Für ultrasensitive Anwendungen müssen die Nanopartikel dagegen aggregieren. Ist die Konzentration an Analytmolekülen hoch genug, um das stabilisierende Citrat von der Nanopartikeloberfläche zu verdrängen, kann eine Aggregation stattfinden. Um bei sehr geringen Analytkonzentrationen eine Aggregation zu initiieren, kann die Ionenstärke der Suspension zum Beispiel mit Natrium- oder Kaliumchlorid erhöht werden. Diese Ionen verringern die Stabilität der einzelnen Nanopartikel, indem sie auf der Partikeloberfläche adsorbiertes Citrat teilweise verdrängen können und gleichzeitig eine Verringerung des Zeta-Potentials bewirken (siehe Zeta-Potential in Kapitel 2.2). Bereits geringste Mengen an Analytmolekülen führen dann zur Aggregation des Kolloids.



**Abb. 26:** Links: Tenta-Gel-Harzkügelchen unter dem Lichtmikroskop. Rechts: Transmissions-Elektronen-Mikroskop-Bild von Silber-Nanopartikeln.

Für die Untersuchungen wurden 400  $\mu\text{l}$  der citratstabilisierten kolloidalen Lösung mit gequollenen Harzkügelchen vermischt, die vorher mindestens 3 h mit einer 0.1 M KCl-Lösung versetzt worden waren. Auf dem Harz (Abb. 26 links) war zuvor im Arbeitskreis von Prof. Schmuck durch Standard-Festphasenpeptidchemie mithilfe einer Fmoc-Schutzgruppenstrategie die Verbindung **1** synthetisiert worden.

Die Aggregation der Nanopartikel wurde durch die Zugabe von 60  $\mu\text{l}$  einer 0.1 M KCl-Lösung eingeleitet. Nach der Aggregation der Nanopartikel wurde durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  0.1 M HCl der pH-Wert auf 2.5 eingestellt, um eine vollständige Protonierung der zu untersuchenden Substanz sicher zu stellen. Die Aufnahme der SERS-Spektren erfolgte dann mit einem Raman-Mikrospektrometer (Anregungswellenlänge 633 nm). Da die Nanopartikel im vorliegenden Fall etwa um den Faktor  $10^4$  kleiner sind als die Harzkügelchen (Abb. 26), wechselwirken die Silber-Nanopartikel nur mit kleinen Ausschnitten der Oberfläche der Harzkügelchen. Auf den Nanopar-



**Abb. 27:** SERS-Spektrum von **1** auf einem einzelnen Harzkügelchen (oben). Als Referenz ist ein konventionelles Raman-Spektrum gezeigt, das in Lösung aufgenommen wurde (unten).

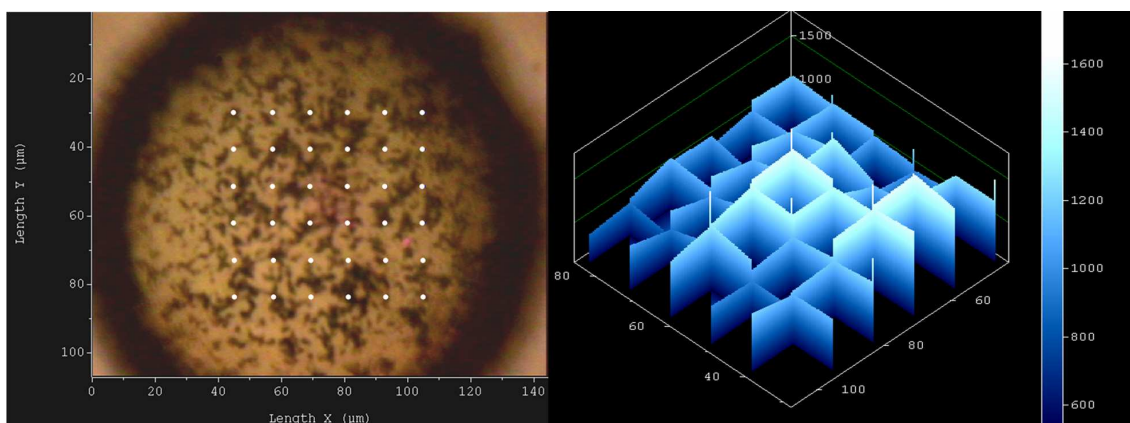


tikeln sind daher im Wesentlichen nur die Moleküle von Verbindung **1** adsorbiert, die über lange Polyethylenglycol-Ketten ( $M = 2000 \text{ g/mol}$ ,  $n > 45$ ) auf der Polystyrolmatrix angebracht sind.

Die Matrix ist dagegen zu weit entfernt, um noch eine signifikante SERS-Verstärkung zu erfahren. Unter diesen Bedingungen war es möglich, mit 50 fmol der Verbindung **1** auf einem Harzkügelchen innerhalb weniger Sekunden ein SERS-Spektrum zu erhalten (Abb. 27, oben).

Ein qualitativer Vergleich mit dem konventionellen Raman-Spektrum einer Lösung von **1** ( $R=H$ ), für das eine 20 mM wässrige Lösung und etwa 30 Minuten Messzeit benötigt wurden, bestätigt, dass im SERS-Spektrum keine Beiträge der Polystyrolmatrix zu beobachten sind (Abb. 27, unten). Diese Methode zur direkten Detektion auf dem Harz mit SERS ist etwa  $10^6$  bis  $10^7$ -mal empfindlicher als die Raman-Spektroskopie in Lösung und benötigt nur Sekunden gegenüber einer halben Stunde. So konnte gezeigt werden, dass eine direkte und markierungsfreie Detektion von festphasengebundenen Substanzen auch auf den üblicherweise bei Synthesen verwendeten Harzen mit entsprechend geringer Beladung möglich ist.

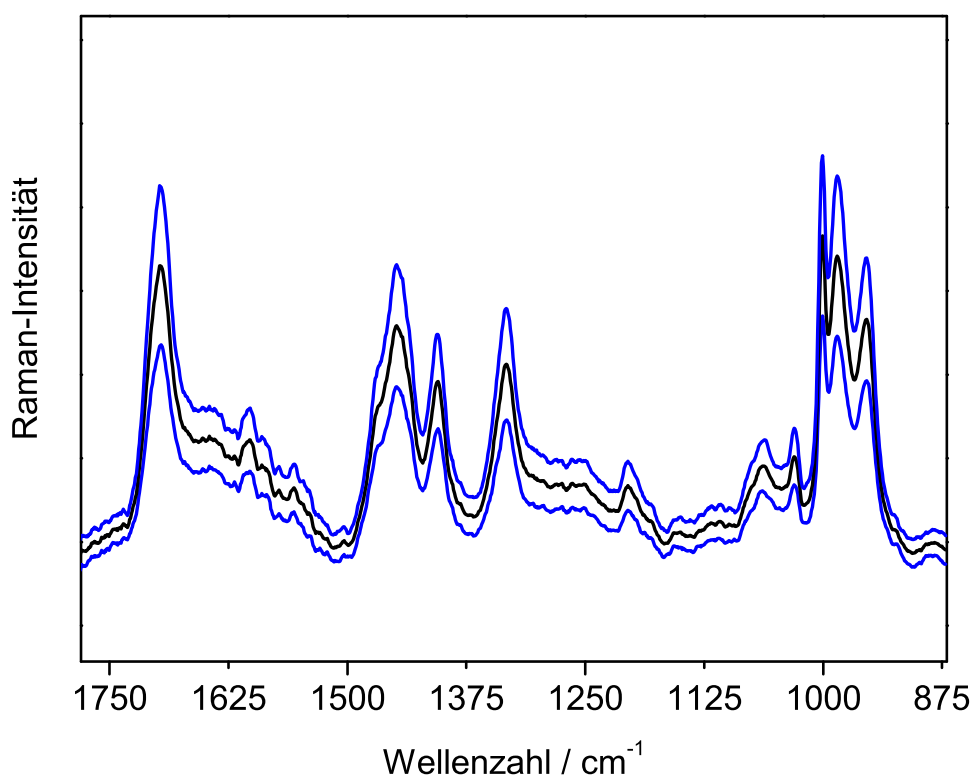
Zudem wurde die Reproduzierbarkeit dieses neuen schwingungsspektroskopischen Ansatzes zur direkten Detektion von festphasengebundenen Substanzen untersucht. Dazu wurden einerseits jeweils SERS-Spektren an unterschiedlichen Stellen der



**Abb. 28:** Mikroskopbild eines einzelnen TentGel-Harzkügelchens mit aggregierten Silber-Nanopartikeln auf der Oberfläche (links). An jedem weiß eingezeichneten Punkt wurde ein SERS-Spektrum von **1** aufgenommen (Messdauer 10 Sekunden). Die Reproduzierbarkeit dieser Spektren zeigt sich anhand der 3D-Darstellung der basislinienkorrigierten Raman-Intensitäten der Markerbande bei  $1700 \text{ cm}^{-1}$  (rechts).

Oberfläche eines Harzkügelchens aufgenommen, andererseits von den festphasengebundenen Substanzen auf verschiedenen Harzkügelchen. In allen Fällen wurde nahezu das gleiche SERS-Spektrum für **1** erhalten. Selbst die Intensitäten der einzelnen Banden variierten nur in geringem Maße.

Dies ist exemplarisch an einem Raman-Mappingexperiment in Abb. 28 gezeigt. An jedem weiß eingezeichneten Punkt wurde ein SERS-Spektrum von **1** aufgenommen (Messdauer 10 Sekunden). Die Reproduzierbarkeit dieser Spektren zeigt sich anhand der 3D-Darstellung der basislinienkorrigierten Raman-Intensitäten der Markerbande bei  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 28, rechts). In jedem Punkt konnte ein Spektrum von Verbindung **1** erhalten werden. Da der Laser auf den höchsten Punkt des sphärischen Harzkügelchens fokussiert wurde, werden durch die deutlich höhere Laserleistung in der Mitte des Kügelchens auch die intensivsten SERS-Signale gemessen.



**Abb. 29:** Reproduzierbarkeit der SERS-mikrospektroskopischen Detektion von festphasengebundenen Substanzen auf einem einzelnen Harzkügelchen. Schwarze Linie: Mittelwertspektrum ( $\mu$ ) basierend auf den 36 Spektren des Raman-Mappingexperiments in Abb. 28. Die blauen Linien beschreiben die Ober- und Untergrenze einer Standardabweichung ( $\mu \pm \sigma$ ).

Das Ergebnis der statistischen Auswertung des Raman-Spektrensatzes ( $6 \times 6 = 36$  Spektren) aus dem Mappingexperiment ist in Abb. 29 gezeigt. In schwarz ist das Mittelwertsspektrum der 36 Einzelspektren aufgetragen. Die blauen Spektren geben die Ober- und Untergrenze der berechneten Standardabweichung an.

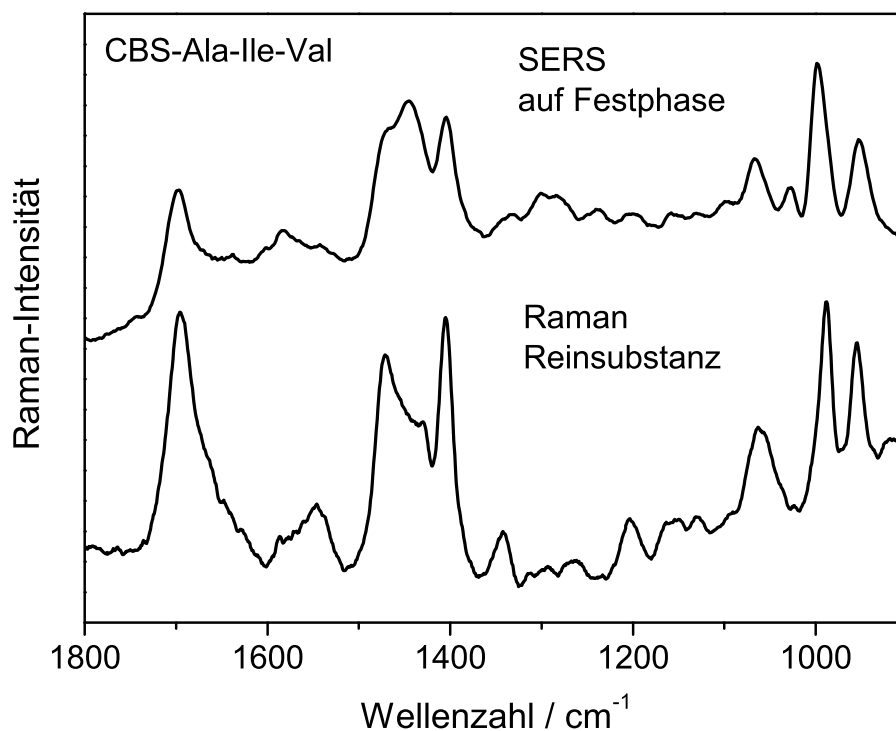
Zur Bestimmung der spektralen Reproduzierbarkeit wurden die 36 Einzelspektren auf die jeweils intensivste Bande normiert. In Tabelle 1 sind die für die sieben dominantesten Banden bestimmten relativen Standardabweichungen (*relative standard deviation*, RSD) aufgelistet. Die durchschnittliche RSD beträgt nur 9.7 %.

Diese Methode ist auch in der Lage, zwischen verschiedenen harzgebundenen Substanzen zu unterscheiden. Dazu wurde das SERS-Spektrum einer zu **1** strukturell ähnlichen Verbindung (CBS-Ala-Ile-Val-NHR) aufgenommen, die aber eine andere Aminosäuresequenz im Tripeptidteil enthält (siehe Abb. 30). Das SERS-Spektrum, das von dieser Substanz wiederum innerhalb weniger Sekunden direkt von einem einzelnen Harzkügelchen aufgenommen wurde, entspricht dem konventionellen Raman-Spektrum im Festkörper. Allerdings weist dieses SERS-Spektrum charakteristische Unterschiede zum Spektrum von **1** auf, sodass diese Methode zwischen verschiedenen harzgebundenen Substanzen unterscheiden kann.

Dadurch eröffnen sich zusätzliche Möglichkeiten, diese Methoden zur Strukturbestimmung und Identifizierung unbekannter Substanzen einzusetzen, oder anhand von Änderungen im Raman-Spektrum eine Komplexierung an der Harzoberfläche

**Tab. 1:** Relative Standardabweichung nach Basislinienkorrektur der 36 SERS-Spektren und Normierung jedes einzelnen Spektrums auf die jeweils intensivste Bande.

| Wellenzahl/cm <sup>-1</sup> | Relative Standardabweichung/% |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 1697                        | 8.7                           |
| 1448                        | 10.3                          |
| 1405                        | 12.5                          |
| 1333                        | 13.4                          |
| 1001                        | 4.4                           |
| 985                         | 8.6                           |
| 955                         | 9.8                           |
| Mittelwert (n=7)            | 9.7                           |



**Abb. 30:** SERS-Spektrum einer zweiten Verbindung (CBS-Ala-Ile-Val) auf einem einzelnen TentaGel-Harzkügelchen, die sich nur im Tripeptid-Teil von Verbindung **1** unterscheidet (oben). Als Referenz ist ein konventionelles Festkörper-Raman-Spektrum der Substanz gezeigt (unten). Im Vergleich mit Abb. 29 ist der Unterschied in den SERS-Spektren der beiden Substanzen deutlich zu erkennen.

zu verfolgen. Die Technik ist zudem nicht auf das TentaGel-Harz beschränkt - auch andere Harze wie PAM (=Phenylacetamidomethyl-Harz) können eingesetzt werden. Allerdings ist die Qualität dann etwas schlechter als bei TentaGel, was auf den stärkeren Untergrund für die Polystyrolmatrix in diesen Spektren zurückzuführen ist. Wegen kürzerer Abstandshalter ist der Abstand zu den Nanopartikeln geringer als bei TentaGel und es findet dadurch (SERS-Abstandsabhängigkeit) auch eine Verstärkung der spektralen Beiträge der Polystyrolmatrix statt.

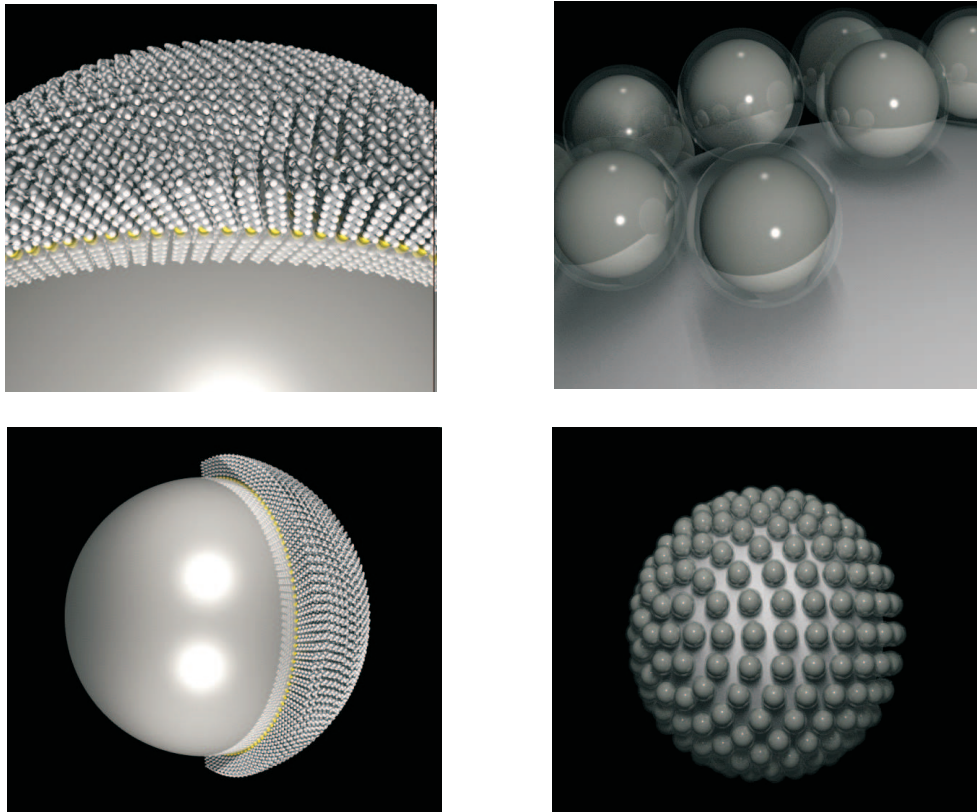
## 4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde eine festphasengebundene Substanz auf einzelnen Harzkügelchen unter Anwendung der SERS-Mikrospektroskopie direkt und markierungsfrei nachgewiesen. Da die Beladung solcher Harze nur ca. 100 pmol pro Kügelchen beträgt, musste das Raman-Signal der festphasengebundenen Substanz über aggregierte Silber-Nanopartikel selektiv an der Oberfläche der Harzkügelchen verstärkt werden. Der Vergleich der SERS-Spektren die auf einzelnen Harzkügelchen aufgenommen wurden mit einem konventionellen Raman-Spektrum der untersuchten Substanz in wässriger Lösung belegt die selektive Verstärkung durch die Silber-Nanopartikel. Die abstandsabhängige und daher selektive Verstärkung des Raman-Signals über den SERS-Effekt ist so groß, dass spektrale Beiträge des Harzes im Spektrum nicht mehr auftreten.

In einem bildgebenden SERS-Experiment an einem einzelnen Harzkügelchen konnte die hohe Reproduzierbarkeit dieser Methode gezeigt werden. Unseres Wissens ist dies der erste direkte und markierungsfreie Nachweis einer festphasengebundenen Substanz auf einem einzelnen Harzkügelchen mit SERS-Mikrospektroskopie. Die orts aufgelöste Detektion, d. h. die Aufnahme von Spektren auf verschiedenen Harzkügelchen durch eine Kombination mit der Raman-Mikrospektroskopie, sollte in Zukunft auch die Analyse von kombinatorischen Bibliotheken erlauben.

Bindungsstudien auf einzelnen Harzkügelchen sind derzeit noch nicht möglich, da die festphasengebundenen Rezeptormoleküle und das Substrat in Lösung über Amino- und Carboxyl-Gruppen mit der Oberfläche der Silber-Nanopartikel wechselwirken. Daher werden neue SERS-Substrate benötigt, die eine geschützte Oberfläche besitzen wodurch die Wechselwirkungen minimiert werden.

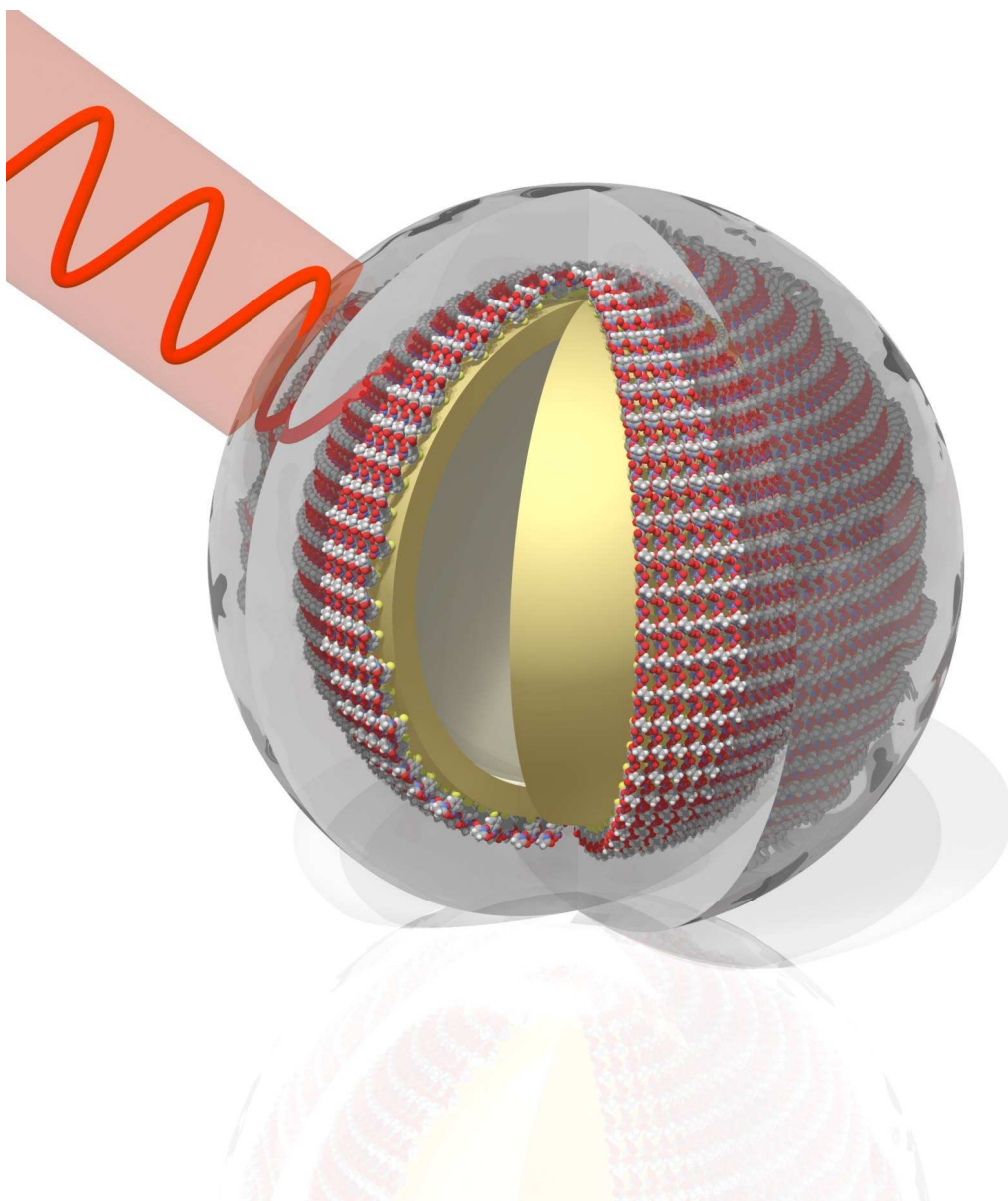
Im Moment werden in weiterführenden Arbeiten zwei Wege verfolgt, die Nanopartikel-Oberfläche unter Beibehaltung der SERS-Aktivität vor direkter Adsorption der Analytmoleküle auf der Metalloberfläche zu schützen. Im ersten Ansatz sollen die Silber-Nanopartikel mit selbstorganisierenden Monolagen (SAM) aus Alkanthiolen beschichtet werden, um eine Adsorption der Rezeptor- und Tetrapeptid-Moleküle zu verhindern (siehe Abb. 31 links). Die von der SAM nach außen zeigenden chemischen Endgruppen der Alkanthiole werden die Minimierung der Wechselwirkung entscheidend bestimmen.



**Abb. 31:** Links: SAM von Mercaptoundekan auf einem Silber-Nanopartikel. Rechts: Silica-verkapselte Silber-Nanopartikel auf einem Silica-Nanopartikel.

Im zweiten Ansatz soll, wie in Abb. 31 rechts gezeigt, durch die Herstellung kontrollierter Nanopartikel-Assemblate eine Plasmonen-Kopplung für enorme SERS-Verstärkung wie in aggregierten Nanopartikel realisiert werden. Zum Schutz vor Adsorption der zu detektierenden Moleküle auf den Nanopartikeln wird eine möglichst dünne Silicaverkapselung angestrebt.

## 5 Protein-Lokalisierung mittels biofunktionalisierter Gold/Silber-Nanoschalen



## 5.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

### Nanodiagnostik

Die Wechselwirkung zwischen funktionalisierten Nanostrukturen und Biomolekülen ist ein zentrales Gebiet der Nanobiotechnologie.<sup>(120),(121)</sup> Detektion, Markierung und Lokalisierung von Biomolekülen sind nur einige Beispiele.<sup>(122),(123)</sup> Der selektive Nachweis von Proteinen beispielsweise gelingt mit Hilfe markierter Antikörper. Hierfür wurde eine Vielzahl verschiedener Markierungs- und Auslese-Methoden entwickelt. Am weitesten verbreitet sind optische Methoden wie Fluoreszenz und elektronische Absorption.

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS), eine ultrasensitive Variante der Raman-Streuung, spielt eine immer wichtigere Rolle in diesem Forschungsgebiet.<sup>(124),(125)</sup> Im Vergleich zu etablierten Markierungsmethoden, wie zum Beispiel der Markierung über molekulare Fluorophore, bietet die SERS-basierte Detektion mehrere einzigartige Vorteile. Ein enorm wichtiger Vorteil ist die hohe Multiplexing-Kapazität: die parallele Detektion einer Vielzahl unterschiedlicher Zielmoleküle mit SERS-Markern durch den minimalen Überlapp schmaler Raman-Schwingungsbanden.<sup>(126),(127)</sup>

Zum Auslesen der charakteristischen Spektren von mehreren Raman- bzw. SERS-Markern wird nur eine einzige Laseranregungswellenlänge benötigt, weil nicht wie bei fluoreszenzbasierten Methoden die Anregungswellenlänge auf die elektronischen Übergänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs abgestimmt sein muss, sondern ausschließlich auf die Plasmonenbande des signalverstärkenden Nanopartikels.

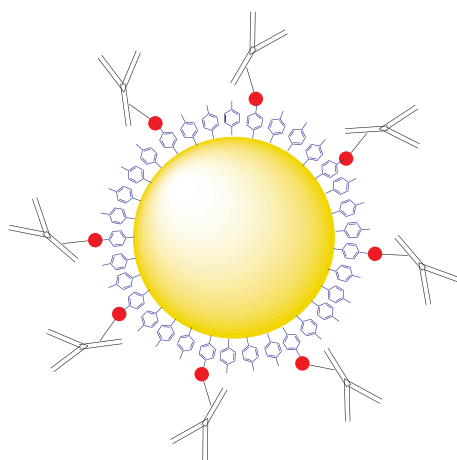
Weitere wichtige Aspekte sind die Quantifizierbarkeit von Zielmolekülkonzentrationen, die Photostabilität der Marker und die enorme Sensitivität der SERS-Technologie, im Besonderen der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Streuung (SERRS).

Zur SERS/SERRS-basierten Detektion von Proteinen und Nukleinsäuren existieren bereits einige Konzepte.<sup>(126),(128)–(136)</sup> Im Folgenden sind drei dieser Konzepte kurz vorgestellt.



**Bifunktionelle selbstorganisierende Monolage (SAM) auf Gold-Nanopartikeln**

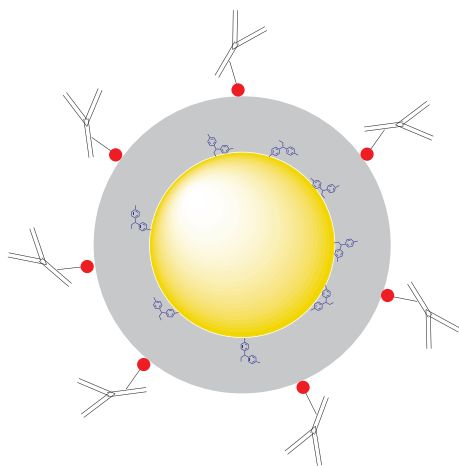
Das erste SERS-Marker-Konzept, bei dem Raman-Marker und Antikörper an ein Metall-Nanopartikel konjugiert sind, wurde im Jahr 1999 von Marc D. Porter und Mitarbeitern publiziert.<sup>(128)</sup> Abb. 32 zeigt eine Weiterentwicklung der SERS-Marker aus derselben Arbeitsgruppe.<sup>(129),(131)</sup> Sphärische Gold-Nanopartikel sind mit einer bifunktionellen selbstorganisierenden Monolage (*self-assembled monolayer*, SAM) aus Raman-Markern bedeckt, welche gleichzeitig über Aktivester-Gruppen verfügt, die kovalent Biomoleküle binden können. Die maximale Bedeckung der Nanopartikeloberfläche mit Raman-Markern durch die Ausbildung einer SAM erhöht die SERS-Intensität im Vergleich zu SERS-Markern mit unvollständig bedeckter Oberfläche. Gleichzeitig schützt die SAM die Nanopartikel auch vor einer ungewollten Koadsorption anderer SERS-aktiver Moleküle aus der zu untersuchenden Probe. Mit diesen SERS-Markern konnte in Sandwich-Immuno-Assays das prostataspezifische Antigen (PSA) in femtomolaren Konzentrationen nachgewiesen werden.<sup>(129)</sup> Diese Messungen wurden auf goldbeschichteten Glassubstraten durchgeführt, um durch eine Plasmonenkopplung mit der Goldbeschichtung die Nanopartikel resonant anzuregen. Die SERS-Marker mit einer Plasmonenbande um 530 nm in Lösung konnten so in den Assays mit einem HeNe-Laser (633 nm) ausgelesen werden, um die störende Autofluoreszenz der Biomoleküle im Assay zu minimieren. Das gleiche Konzept wurde auch zur schnellen und hochsensitiven Detektion von Viren eingesetzt.<sup>(130)</sup>



**Abb. 32:** SERS-Marker der Gruppe um Marc D. Porter: Gold-Nanokugeln mit signalgebender Monolage aus Raman-Markern. Die Moleküle in der selbstorganisierenden Monolage tragen reaktive Gruppen, um Biomoleküle, wie zum Beispiel Antikörper, kovalent zu binden.

### Silicaverkapselte SERS-aktive Gold-Nanopartikel

Das Marker-Konzept von Michael J. Natan und Mitarbeitern beinhaltet die Verkapselung SERS-aktiver Gold-Nanopartikel mit Silica (siehe Abb. 33).<sup>(136),(137)</sup> Die Silicaschale verleiht den Markern eine enorme chemische und mechanische Stabilität. Die Raman-Marker auf der Nanopartikel-Oberfläche sind durch die Silicaschicht von externen Einflüssen geschützt. Eine Koadsorption von Raman-aktiven Fremdmolekülen aus der zu untersuchenden Probe und somit ein Verdrängen der eigentlichen Raman-Marker ist nahezu ausgeschlossen. Diese verkapselten Marker zeigen auch eine deutlich erhöhte Stabilität in aggressiven Lösungsmitteln. So verlängert zum Beispiel eine 20 nm dicke Silicaschale das vollständige Auflösen nackter Gold-Nanopartikel in einer Suspension in Königswasser von weniger als 15 sec auf ca. 3 h. Ein weiterer Vorteil dieser verkapselten SERS-Marker liegt in der Funktionalisierungschemie. Die Silicaschale verhält sich chemisch wie ein reiner Silica-Nanopartikel und kann durch etablierte Protokolle biofunktionalisiert werden. Unabhängig davon welcher Raman-Marker auf die Nanopartikel aufgebracht wurde können nach der Silicaverkapselung die gleichen Protokolle zur Anbindung von Biomolekülen angewandt werden. Für eine kontrollierte Silicaverkapselung müssen die Gold-Nanopartikel allerdings durch Koadsorption von Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPTMS) neben den Raman-Markern vitreophilisiert werden (d.h. die Oberflächen für eine Silicaverkapselung vorbereiten). Typischerweise werden die Nanopartikel mit einem Verhältnis von einem Raman-Markermolekül zu zwanzig MPTMS-Molekülen belegt. Entsprechend können die Raman-Marker keine SAM auf der Gold-

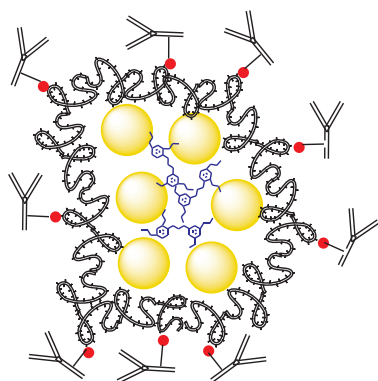


**Abb. 33:** Silicaverkapselter SERS-Marker bestehend aus einer Gold-Nanokugel, einer Submonolage aus Raman-Markern auf der Partikeloberfläche und einer Silicaschale, an die nach einer Amino- oder Thiol-Funktionalisierung über heterobifunktionale Abstandshalter Antikörper gekoppelt werden.

oberfläche ausbilden, was zu einer geringeren Anzahl von signalgebenden Molekülen auf den Nanopartikeln führt und so die Sensitivität der SERS-Marker verringert. Zusätzlich kann die uneinheitliche Orientierung der Raman-Marker auf den Goldpartikeln zur Folge haben, dass im Gegensatz zur SAM deutlich mehr Banden in den SERS-Spektren beobachtet werden (siehe SERS-Auswahlregeln in Kapitel 2.1.3), die eine Mehrfachdetektion vieler unterschiedlicher SERS-Marker stark einschränken.

### Protein-verkapselte SERS-Marker aus aggregierten Silber-Nanopartikeln

In Abb. 34 ist das SERS-Marker-Konzept der Intel Corp. schematisch dargestellt.<sup>(138)</sup> Der SERS-aktive Teil dieser Marker besteht aus jeweils  $\sim 20$  nm großen aggregierten Silber-Nanopartikeln, die durch die gezielte Herstellung von *hot spots* eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber SERS-Markern besitzen, die aus einzelnen Nanopartikeln bestehen. Die aggregierten Silberpartikel sind nur teilweise mit Raman-Markern bedeckt und durch eine äußere Proteinhülle geschützt. Hierzu wird nach der induzierten Aggregation Rinderserumalbumin (englisch: *Bovine Serum albumin*, BSA) auf der Oberfläche der Partikel adsorbiert, das anschließend mit Glutaraldehyd quervernetzt wird. Eine Anbindung von Biomolekülen an die SERS-Marker erfolgt direkt an die BSA-Hülle. PSA-Antikörper konnten direkt über etablierte Konjugationschemie kovalent an die BSA-Hülle gebunden werden und die Verteilung von PSA in Prostatagewebe mittels SERS-Mikroskopie bestimmt werden.<sup>(138)</sup> In neuesten Arbeiten wurden mit diesen Markern zwei verschiedene Epitope in einzelnen Zellen simultan nachgewiesen.<sup>(139)</sup>



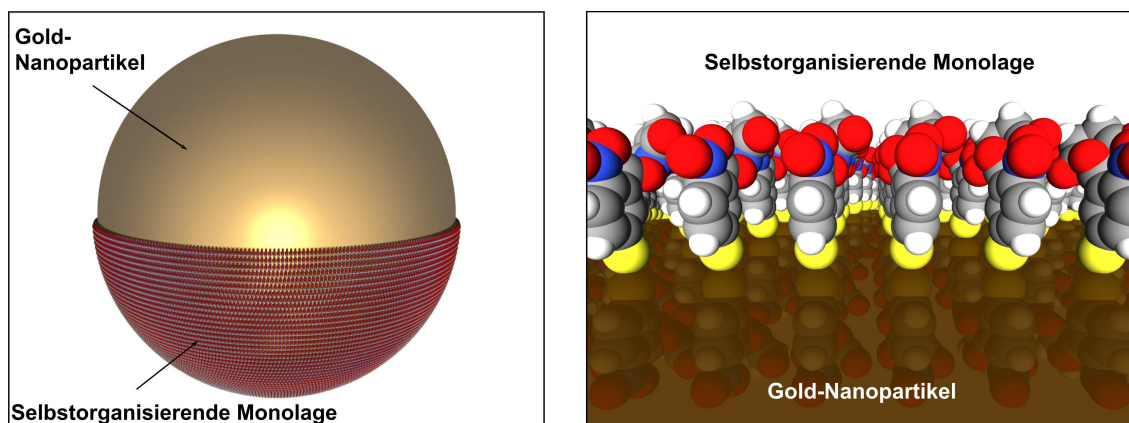
**Abb. 34:** Composite organic-inorganic nanoparticles (COINs) der Intel Corporation: SERS-aktive aggregierte Silber-Nanopartikel die teilweise mit Raman-Markern bedeckt sind. Die aggregierten Silber-Nanopartikel sind mit einer quervernetzten BSA-Hülle umgeben, an die Antikörper gebunden werden.

### Entwicklung neuer Konzepte

In dieser Arbeit sollten SERS-Marker auf der Basis von einzelnen, nicht aggregierten Nanopartikeln für den Einsatz in biomedizinischen Fragestellungen entwickelt werden. Zur Minimierung störender Fluoreszenzbeiträge sollten die SERS-Marker für eine Anregung mit rotem bis nah-infrarotem Laserlicht optimiert werden. Dies kann durch einen Austausch der sphärischen Gold-Nanopartikel durch andere Partikelgeometrien mit rotverschobenen Plasmonresonanzen erreicht werden. Außerdem sollten für eine reproduzierbar hohe SERS-Intensität die Raman-Marker auf den Nanopartikeln in einer SAM vorliegen.

Bei ersten Versuchen das Konzept der Porter-Gruppe (siehe Abb. 32) auf Gold-Nanoschalen zu reproduzieren, stellte sich heraus, dass eine effiziente Konjugation der Antikörper an die SERS-Marker praktisch nicht möglich ist. Eine Erklärung für diese Beobachtungen ist die sterisch stark gehinderte Zugänglichkeit des NHS-Aktivesters als Bindungsstelle für das Biomolekül in einer dicht gepackten SAM. Wie in Abb. 35 zu sehen, ist ein nukleophiler Rückseitenangriff der Amino-Gruppen eines Biomoleküls bei einer vollständig ausgebildeten SAM kaum möglich, so dass die Reaktivität dieser SERS-Marker für die Biokonjugation deutlich herabgesetzt ist.

Im Folgenden werden zwei verschiedene Ansätze beschrieben, um das Problem der sterischen Hinderung zu minimieren. Das Vorliegen einer Monolagenbedeckung aus



**Abb. 35:** Dicht gepackte SAM auf einem Gold-Nanopartikel. Ein nukleophiler Rückseitenangriff von Amino-Gruppen auf die reaktiven NHS-Aktivester-Gruppen in der SAM ist sterisch stark gehindert.

Raman-Markern auf Gold-Nanoschalen kennzeichnet beide neuen SERS-Markertypen. Eine SAM auf der Nanopartikeloberfläche bedeutet für die SERS-Marker gleich mehrere Vorteile. So wird zum Beispiel eine Koadsorption von anderen Molekülen als den Raman-Markern verhindert oder zumindest weitgehend minimiert. Dadurch werden ungewollte spektrale Störsignale wie zum Beispiel Fluoreszenz vermieden. Zusätzlich stellt eine SAM eine maximale Oberflächenbedeckung der Nanopartikel sicher, was zu einer konstant hohen SERS-Sensitivität führt. Durch die einheitliche Orientierung der Raman-Marker in der SAM (siehe Abb. 35) erfahren nach den SERS-Auswahlregeln (siehe Kap. 2.1.3) nur wenige Raman-Banden eine reproduzierbar hohe Signalverstärkung.<sup>(32)</sup> Diese Eigenschaften sind alle sehr wichtig in Bezug auf die Quantifizierung von Zielmolekülen und die Multiplexing-Kapazität. Zunächst wird in Kapitel 5.3.2 ein SERS-Marker-Konzept vorgestellt, bei dem ein Raman-Marker mit zwei unterschiedlichen hydrophilen Abstandshaltern eine duale Monolage ausbildet. Zur Minimierung der sterischen Hinderung sind die proteinbindenden reaktiven Gruppen über längere Abstandshalter an den Raman-Markermolekülen angebracht.

In Kapitel 5.3.3 werden zwei Methoden vorgestellt, wie eine SAM aus Raman-Markern durch eine Silicaverkapselung geschützt und biofunktionalisiert werden kann.

Abschließend wird die Anwendung der neu entwickelten SERS-Marker in der Immun-Histochemie zur SERS-mikroskopischen Bildgebung vorgestellt.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Synthese der Immun-SERS-Marker

#### Synthese von Gold/Silber-Nanoschalen

##### Silber-Nanopartikel aus Silbersalz in einem Polyol-Prozess

Der Polyol-Prozess eignet sich zur Synthese hochkonzentrierter Silber-Nanopartikel-Suspensionen. Bei der Herstellung sphärischer Silber-Nanopartikel wird eine breite Größenverteilung erhalten. Über die Reaktionsbedingungen kann der mittlere Partikeldurchmesser gesteuert werden.

Exemplarisch ist ein Ansatz zur Herstellung von sphärischen Silber-Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von ca. 60 nm beschrieben. Nanopartikel anderer Größe können über eine Änderung des PVP/Silbernitrat-Verhältnisses erhalten werden.<sup>(35)</sup>

In einem 50 ml Rundkolben wurde eine Lösung aus 13 ml Ethylenglykol und 2 g Polylvinylpyrrolidon K 30 (PVP, molekulare Masse des Polymers = 65000 g/mol) unter Rühren auf 160 °C erhitzt. Nach 30 min wurde eine Lösung aus 310 mg Silbernitrat in 2 ml Ethylenglykol tropfenweise zugegeben und weitere 90 min bei 160 °C gerührt. Nach wenigen Minuten zeigte die Reaktionsmischung eine klare Gelbfärbung, die auf die Entstehung erster kleiner Silberkeime zurückzuführen ist. Am Ende der Reaktion wurde eine trübe grün-graue Lösung erhalten. Anschließend wurden 10 ml des Silberkolloids mit Wasser auf 500 ml verdünnt. Eine Größenselektion und ein gleichzeitiges Entfernen von Ethylenglykol und PVP wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (60 min bei 4000 U/min) der Silber-Nanopartikel mit anschließender Resuspension in Wasser erreicht.

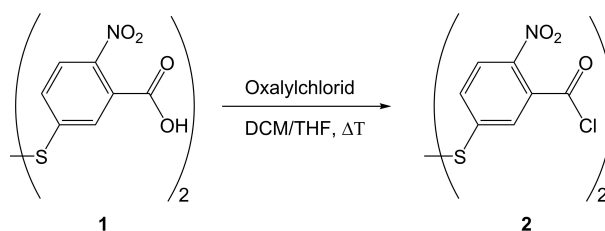
##### Gold/Silber-Nanoschalen aus Silber-Nanopartikeln

Die Synthese der Goldschalen aus Silber-Nanopartikeln erfolgte nach der Methode von Sun und Xia.<sup>(35)</sup> 300 ml einer stark verdünnten, relativ monodispersen ( $\lambda_{max} \sim 433$  nm, FWHM  $\sim 100$  nm) Silberkolloid-Lösung ( $c_{Ag} < 1$  mM) wurde zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit einer 10 mM wässrigen Tetrachlorgoldsäure-Lösung versetzt. Dabei erfolgte ein schrittweiser Farbumschlag von gelb über rot-braun zu

blau. Die Reaktion wurde mit Extinktions-Spektroskopie verfolgt und bei Erreichen der gewünschten Zentralposition der Plasmonenbande ( $\lambda_{max} = 630 \text{ nm}$ ) die Zugabe der Goldionen beendet. Um die Löslichkeit des bei der Reaktion entstehenden Silberchlorids zu gewährleisten, muss in sehr verdünnten Lösungen gearbeitet werden. Bei zu hohen Konzentrationen ( $c_{Ag} > 1 \text{ mM}$ ) wird das Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid in siedendem Wasser überschritten, ausfallendes Silberchlorid lagert sich auf den Metall-Nanopartikeln ab und führt zur Ausbildung uneinheitlicher Gold/Silber-Nanoschalen.

### Synthese von Raman-Markern mit hydrophilen Abstandshaltern

#### Synthese von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäurechlorid) (**2**) (DTNB-Säurechlorid)

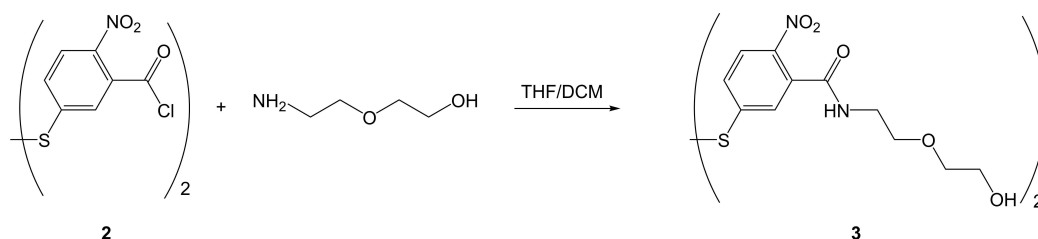


**Abb. 36:** Synthese der Raman-Marker-Zwischenstufe DTNB-Säurechlorid **2**.

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 198.2 mg (0.5 mmol) 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) **1** in 1 ml Tetrahydrofuran und 10 ml Dichlormethan gelöst und mit 260  $\mu\text{l}$  (3 mmol) Oxalylchlorid versetzt. Zum Aktivieren der Reaktion wurden 2 Tropfen Dimethylformamid zugegeben. Nach 1 h Reflux wurde das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum entfernt und ein hellgelber Rückstand erhalten.

#### Kopplung des DTNB-Säurechlorids (**2**) mit Aminoethoxyethanol zu DTNB-MEG-OH (**3**)

Zu dem in 2 ml Tetrahydrofuran aufgenommenen, hellgelben Säurechlorid-Rückstand **2** wurde eine Lösung von 200  $\mu\text{l}$  Aminoethoxyethanol in 5 ml Dichlormethan getropft. Es bildeten sich ein heller Niederschlag und saure Dämpfe. Nach 30 min

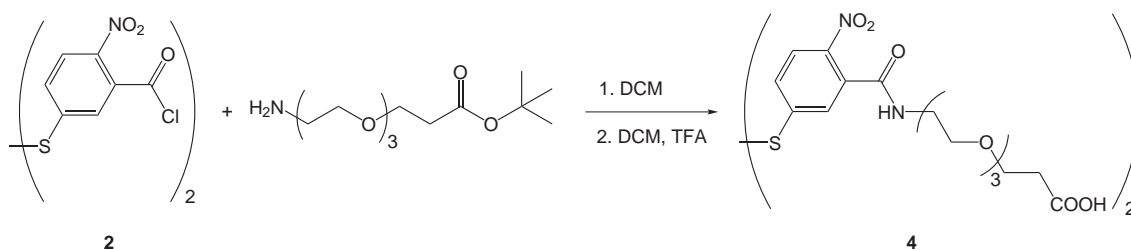


**Abb. 37:** Synthese des Raman-Markers mit kurzem hydrophilen Abstandshalter DTNB-MEG-OH **3**.

Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum abgezogen und in etwas Dichlormethan aufgenommen. Nach erneutem Trocknen wurde der ölige hellgelbe Rückstand chromatographisch über eine Kieselgelsäule mit Dichlormethan/ Methanol/ Trifluoressigsäure (100/10/1) getrennt. Von den drei Fraktionen erwies sich die erste als Edukt. Die mittlere Fraktion wurde weiter gereinigt (RP18 MPLC Wasser/Methanol/Trifluoressigsäure; Lösungsmittelgradient). Ausbeute: 20%

$^1\text{H}$  (250 MHz, Dimethylsulfoxid  $d_6$ ):  $\delta = 3.51$  (m, 20H,  $\text{H}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 7.78 (m, 2H, Ar-H), 8.13 (d, 1H, Ar-H), 8.76 (s, 1H, ArCONHCH $_2$ CH $_2$ OCH $_2$ CH $_2$ OH)  
 Das  $^1\text{H}$ -NMR zeigte Abweichungen hinsichtlich des Integrals bei  $\delta = 3.51$ . Das Integral zeigt das Vorhandensein von 20 H-Atomen des Glykolrestes, der aber nur neun H-Atome besitzt, auf. Vermutlich stammen die zusätzlichen Wasserstoffatome von Wasserstoffbrücken-gebundenem  $\text{H}_2\text{O}$ .<sup>(140)</sup>

#### Kopplung des DTNB-Säurechlorids **2** mit tert-Butyl 3-[2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy]propionat zu DTNB-TEG-COOH **4**



**Abb. 38:** Synthese des *langen* Raman-Markers DTNB-TEG-COOH.

Der gelbe Rückstand von Verbindung **2** wurde mit 2 ml Dichlormethan (DCM) auf-



genommen und mit 350 mg (1.3 mmol) tert-Butyl 3-[2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy]propionat und 120  $\mu$ l Triethylamin versetzt. Nach 12 h wurde die orange Lösung über Kieselgel (Eluens: Dichlormethan/Methanol) chromatographiert. Das Zwischenprodukt wurde in einer Lösung aus Dichlormethan und Trifluoressigsäure (TFA) 2 h gerührt, getrocknet und über eine RP18-Säule mittels MPLC chromatographisch getrennt (Eluens: Wasser/Methanol; Lösungsmittelgradient).

Ausbeute: 20%

$^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.42 (b, 2H,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.62 (m, 15H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 7.38 (s, 1H,  $\text{ArCONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{COOH}$ ), 7.62 (m, 2H, Ar-H), 8.2 (d, 1H, Ar-H).

### Synthese der Dual-SAM-SERS-Marker

Das Ausbilden einer Monolage aus Raman-Markern mit zwei unterschiedlich langen hydrophilen Abstandshaltern (Dual-SAM) auf den Gold/Silber-Nanoschalen wurde für verschiedene Verhältnisse an Raman-Markermolekülen **3** und **4** durchgeführt. Beispielhaft ist die Vorschrift für ein Verhältnis von 1:1000 angegeben. Für die Bildung der Dual-SAM (1:1000) wurden hierfür 5.7 mg Verbindung **3** in 10 ml 50% wässrigem Ethanol gelöst. Da die Komponente **4** in wesentlich geringerer Konzentration gebraucht wird, wurde nur eine 0.1 mM Lösung hergestellt. Hierfür wurden 0.8 mg der Substanz in 10 ml 50% wässrigem Ethanol gelöst. Der Rückstand von 2 ml zentrifugierten Gold/Silber-Nanoschalen wurde in 1 ml einer frisch hergestellten 1 mM Lösung von **3** und 10  $\mu$ l einer 0.1 mM Lösung von **4** aufgenommen und 4 h gerührt. Nach vollständigem Ausbilden der SAM wurde das Kolloid erst mit Wasser gewaschen und dann zur anschließenden Biofunktionalisierung in 1 ml einer 50 mM Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung mit pH 6.8 (PBS, englisch: (*phosphate buffered saline*)) aufgenommen.

### Biofunktionalisierung der Dual-SAM-SERS-Marker

Reinigung der Antikörper:

Die verwendeten Antikörper werden Azid-stabilisiert in einer Puffer-Lösung gelie-

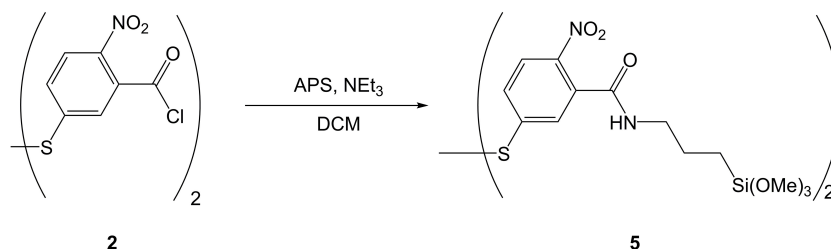
fert. Da das Azid als konkurrierendes Nukleophil die Biofunktionalisierung stört, wurden die Antikörper über NAP-5-Gelsäulen (GE Healthcare) nach Hersteller-Anleitung gereinigt und in PBS aufgenommen. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Absorptions-Spektroskopie auf das Vorhandensein von aromatischen Systemen, die als Indikator für den Antikörper (aromatische Aminosäuren) dienen, überprüft. Zur weiteren Umsetzung wurde die Fraktion mit dem intensivsten Signal bei einem Maximum von 280 nm verwendet.

Sulfo-NHS-Aktivierung und Biokonjugation:

Zum Rückstand von 2 ml des SERS-Marker-Kolloids wurden 500  $\mu$ l einer frisch hergestellten 2 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)-Lösung in PBS und 500  $\mu$ l einer 5 mM Lösung von N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (Sulfo-NHS) in PBS gegeben, 1 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 2 h gerührt. Um eine Aggregation der Partikel zu verhindern, wurde 1% TWEEN 20 vor der Carbonsäureaktivierung zugegeben und N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz vor Zugabe des N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimides vorgelegt. Nach Waschen mit PBS und 1% TWEEN 20 wurde der Rückstand mit 500  $\mu$ l gereinigter PSA-Antikörper-Lösung aufgenommen und 12 h leicht geschüttelt. Der Überschuss an Antikörpern wurde durch zweimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in PBS entfernt.

### Synthese von silicaverkapselten SERS-Markern

Kopplung von DTNB-Säurechlorid (**2**) mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan zu DTNB-APTMS (**5**)



Das Säurechlorid **2** wurde in 2 ml Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit

0.180 ml 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) und 120  $\mu\text{l}$  Triethylamin ( $\text{NEt}_3$ ) als Hilfsbase versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht (14 h) gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Ölpumpenvakuum wurde eine gelb-orange kristalline Verbindung erhalten. Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde ebenfalls unter Schutzgas mit Kieselgel als stationärer Phase durchgeführt (Eluens: DCM/MeOH 95:5).  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 0.7\text{-}1.8$  (t, 4H, Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1.7-1.8 (tt, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 3.5 (dt, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO}$ ), 3.6 (s, 18H, Si( $\text{OMe}_3$ )), 6.3-6.4 (t, 2H, Amid- $H$ ), 7.5 (d, 2H, Ar- $H1$ ), 7.6 (dd, 2H, Ar- $H1$ ), 8.0 (d, 2H, Ar- $H1$ ).

### SAM-Ausbildung

2 mg von Verbindung **5** wurden unter Stickstoffatmosphäre in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und unter starkem Rühren zu 40 ml, in trockenem DMF suspendierten Gold/Silber-Nanoschalen getropft. Nach SAM-Ausbildung über Nacht wurde das oberflächenfunktionalisierte Goldkolloid durch zweimaliges Zentrifugieren (je 60 min, 4000 U/min) und Resuspendieren in DMF gereinigt. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Bodensatz in einer Mischung aus 4.2 ml hochreinem Wasser und 8 ml Isopropanol aufgenommen. Unter Rühren wurde eine Lösung von 2 ml  $\text{NH}_3$  (25%) in 42 ml Isopropanol gegeben und zur Hydrolyse der Methoxysilan-Gruppen noch 1 h gerührt. Innerhalb von 5 h wurden in 5 Portionen insgesamt 350  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Lösung von Tetraethylorthosilikat (TEOS) in Isopropanol zugegeben und über Nacht gerührt. Zum Abtrennen von eventuell entstandenen reinen Silica-Nanopartikel wurden die silicaverkapselten SERS-Marker einmal zentrifugiert und in Ethanol aufgenommen.

### Polyelektrolytbasierte Silicaverkapselung

80 ml einer Suspension von Gold/Silber-Nanoschalen wurde bei 4000 U/min für 60 min zentrifugiert und in 80 ml Ethanol resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren 20 mg (0.06 mmol) 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) **1** in 10 ml Ethanol gegeben. Nach 30 min, 60 min und 90 min wurde der Ansatz für je 30 s in ein Ultraschallbad gegeben und anschließend 12 h lang gerührt. Nach zweimaliger

Zentrifugation (4000 U/min, 60 min) und Resuspendieren in Ethanol wurde, nach nochmaligem Zentrifugieren, der Rückstand in 40 ml deionisiertem Wasser aufgenommen. Die kolloidale Lösung wurde unter heftigem Rühren langsam zu 40 ml einer Lösung aus 80 mg Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH) und 140 mg Natriumchlorid getropft. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde bei 4000 U/min für 60 min zentrifugiert und der Rückstand in deionisiertem Wasser aufgenommen. Das Kolloid wurde unter starkem Rühren langsam zu 40 ml einer wässrigen Lösung von 160 mg Polyvinylpyrrolidon (Molare Masse des Polymers: 10000 g/mol) getropft und 12 h lang gerührt. Nach dem Zentrifugieren (4000 U/min, 60 min) wurde der Rückstand in einer Lösung von 10.4 ml Wasser und 12 ml Isopropanol suspendiert. Hierzu wurden 16.5 ml einer 4 vol%igen  $\text{NH}_3$ /Isopropanol-Lösung gegeben. Über einen Zeitraum von 6 h wurden insgesamt 2.4 ml TEOS-Lösung (1 Vol% TEOS in Isopropanol) in 4 Einzelportionen zugegeben. Die Schichtdicke der Glashülle konnte durch die Menge an zugegebenem TEOS kontrolliert werden. Abschließend wurden die verkapselten SERS-Marker zentrifugiert (4000 U/min, 60 min) und in Ethanol resuspendiert.

### **Aminofunktionalisierung der silicaverkapselten SERS-Marker**

1.5 ml einer ethanolischen Suspension von silicaverkapselten SERS-Markern wurden unter starkem Rühren mit 3  $\mu\text{l}$  (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 1 h auf 50 °C erhitzt und dann 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden von überschüssigem APTMS durch mehrfaches Zentrifugieren und Resuspendieren in Ethanol befreit.

Der Nachweis auf Amino-Gruppen erfolgte neben der Zeta-Potential-Bestimmung auch Fluoreszenz-spektrometrisch über das Produkt der Reaktion der Amino-Gruppen mit Fluorescamin. Dabei wurden 0.2 ml der ethanolischen Nanopartikel-Lösung mit 1.8 ml trockenem Dimethylformamid und 1.0 ml Boratpuffer (750 mg/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  in Wasser, pH=9.2) gemischt und mit 0.2 ml Fluorescamin-Lösung (5 g/l Fluorescamin in Dimethylformamid) versetzt. Nach 6 min wurde ein Fluoreszenzspektrum mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 390$  nm und einem Messbereich von 400 bis 520 nm aufgenommen.

### Biokonjugation der aminofunktionalisierten, silicaverkapselten SERS-Marker

1 ml aminofunktionalisierter SERS-Marker in Ethanol wurde zentrifugiert und unter Stickstoffatmosphäre in 3 ml trockenem DMF resuspendiert. Unter Rühren wurden 150  $\mu\text{l}$  des heterobifunktionellen Vernetzungsreagenz Succinimidyl-[(N-Maleimidpropionamid)-(dodecaethylenglykol)]ester (10 g/l in trockenem DMF) gegeben. Nach 30 min wurden als Hilfsbase 100  $\mu\text{l}$  einer Triethylamin-Lösung (5  $\mu\text{l}$  in 250  $\mu\text{l}$  trockenem DMF) zugegeben und weitere 2 h gerührt. Die Suspension wurde zentrifugiert, um überschüssige, nicht am SERS-Marker gebundene Kreuzvernetzer abzutrennen und anschließend in 0.3 ml DMF aufgenommen. 100  $\mu\text{l}$  Antikörper-Lösung wurden über eine NAP-5 Säule gereinigt und anschließend mit immobilisiertem Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid, in Form eines kommerziell erhältlichen Disulfid-Reduktionsgel (TCEP disulfide reduction gel, Pierce) behandelt, um eine ausreichende Anzahl an freien Thiol-Gruppen für die Biokonjugation zu generieren. Die SERS-Marker-Suspension wurde mit 2.5 ml PBS (pH = 6.8) verdünnt, mit 200  $\mu\text{l}$  Antikörper-Lösung (in PBS, pH = 6.8) vereint und über Nacht geschüttelt. Nach Zentrifugation wurden die Immun-SERS-Marker in 1 ml PBS-DMF-Lösung (4.5 ml PBS, 0.5 ml DMF, 10  $\mu\text{l}$  Tween 20) aufgenommen.

### Immunhistochemie

Mit den synthetisierten SERS-Markern wurden Gewebeproben der malignen Prostata untersucht. Als Negativ-Kontrolle dienten Gewebeproben des Appendix, dem Wurmfortsatz des Blindarms, einem Gewebe, welches kein PSA aufweist. Die 5  $\mu\text{m}$  dicken, Formalin-fixierten und paraffinierten Gewebeproben wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Würzburg präpariert und zur Vorbereitung auf die immunhistochemischen Untersuchungen mit der Dampfkochtopf-Methode behandelt. Dabei werden die auf einem silanisierten Glasobjektträger befindlichen Proben im Anschluss an die Entfernung des Paraffins durch Xylol und Waschen in alkoholischen Lösungen abnehmender Konzentrationen 8 min bei 120 °C gekocht. Die abgekühlten Proben wurden in PBS-Puffer (pH = 6.0) aufgenommen. Nach der Antigendemaskierung (englisch: *antigen retrieval*) standen die Gewebeschnitte dem Antigennachweis zur Verfügung und wurden mit je 200  $\mu\text{l}$  der De-

tergenz (Tween 20)-stabilisierten Lösung von Immun-SERS-Markern in PBS inkubiert. Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern wurde die Inkubation in einer PBS-Atmosphäre durchgeführt. Die inkubierten Gewebeschnitte wurden vorsichtig mit 1 ml PBS-Puffer gespült und nach Trocknen an der Luft unter dem Raman-Mikroskop vermessen. Entsprechende negative Kontrollexperimente mit BSA gekoppelten SERS-Markern wurden jeweils parallel unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt.

### 5.2.2 SERS-Mikroskopie

Die SERS-Spektren wurden mit einem konfokalen Raman-Mikrospektrometer (Horiba-Jobin-Yvon, Modell LabRam, holographisches Gitter mit 1800 Strichen pro Millimeter) aufgenommen. Die Strahlung eines HeNe-Lasers (632.8 nm) wurde mit einem 50-fach vergrößernden Mikroskopobjektiv (Olympus, Model LMPlanFL) auf die Probe fokussiert und in Rückstreugeometrie gesammelt. Die Laserleistung auf der Probe betrug bei diesen Messungen etwa 10 mW. Die Detektion des Raman-Spektrums erfolgte mit einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera. Bei Experimenten zur SERS-Mikroskopie wurde die Probe mit einem x-y-Tisch automatisch unter dem Raman-Mikroskop verfahren, wobei an Punkten mit definiertem Abstand Spektren aufgenommen wurden. Zur Darstellung der räumlichen Verteilung der SERS-Marker wurden die Spektren basislinienkorrigiert und die Intensität von Markerbanden mit Hilfe der Instrumenten Software (LabSpec) als Falschfarbenbild dargestellt.

### 5.2.3 Elektronenmikroskopie

TEM-Bilder wurden an einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop der Firma Zeiss (Modell Zeiss EM 10) aufgenommen. Als Probenträger wurden kohlenstoffbeschichtete Kupfergitter der Firma Ted Pella verwendet.

### 5.2.4 Zeta-Potential-Messungen

Das Zeta-Potential kolloidaler Suspensionen wurde mit einem Zeta-Sizer 2000 (Malvern Instruments Ltd.) bestimmt. Die Eintauchelektrode für wässrige Proben mit einem Elektrodenabstand von 5 mm wurde in eine 1 cm Einwegküvette aus Polystyrol mit ca. 1 ml der zu untersuchenden Probe getaucht. Nach Erreichen einer

konstanten Temperatur (ca. 15 min.) wurde das Zeta-Potential als Durchschnitt von 15 Messzyklen bestimmt.

### 5.2.5 Mie-Rechnungen

Die Mie-theoretische Berechnung der wellenlängenabhängigen Absorption, Streuung und Extinktion von Edelmetall-Nanopartikeln wurde mit dem frei zugänglichen (Freeware) Fortran-Programm *sphere.f* (<http://www.wave-scattering.com>) durchgeführt. Es wurden experimentell bestimmte dielektrische Funktionen für dünne Silber- und Gold-Filme von Johnson und Christy verwendet.<sup>(141)</sup>

## 5.3 Ergebnisse und Diskussion

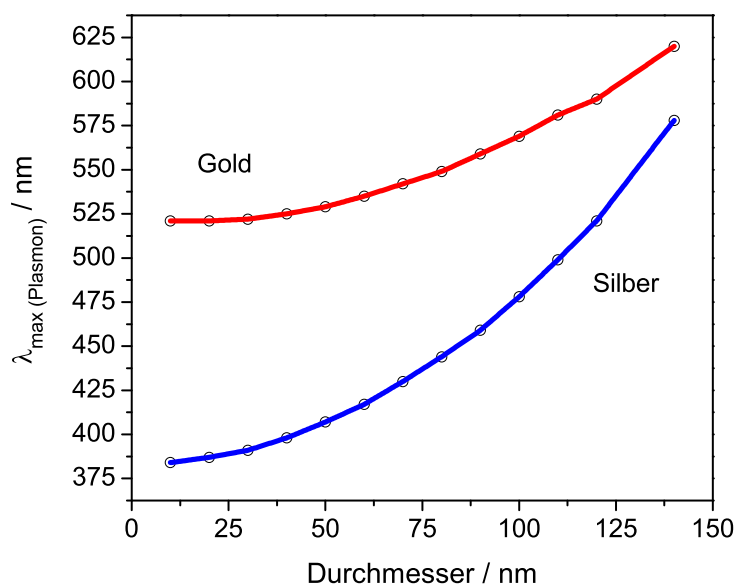
### 5.3.1 Goldnanoschalen als SERS-Substrate

Die Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln sind unter anderem abhängig von deren Form und Größe. Um mit SERS-Markern, die auf einzelnen (nicht aggregierten) plasmonisch-aktiven Nanopartikeln basieren, eine effiziente Signalverstärkung zu erzielen, müssen deren optische Eigenschaften auf die jeweilige Anwendung abgestimmt sein. Im Folgenden werden anhand von Mie-Rechnungen die Extinktionspektren von Silber- und Gold-Nanokugeln mit Gold-Nanoschalen verglichen und die experimentellen Ergebnisse der Templat-basierten Synthese von Gold-Nanoschalen vorgestellt.

#### Modellrechnung: Plasmonenresonanz von Edelmetall-Nanopartikeln

In Abb. 39 sind die mittels Mie-Theorie berechneten Resonanzpositionen von sphärischen Gold- und Silber-Partikeln gegen deren Radius aufgetragen. Die Simulationen wurden mit einem Brechungsindex von 1.33 für wässrige Suspensionen durchgeführt. Allgemein führt eine Vergrößerung des Radius zu einer Rotverschiebung des Maximums der Plasmonenbande, wobei die größenabhängige Änderung bei Silber stärker ausgeprägt ist als bei Gold.

Bei Silber-Nanopartikeln lässt sich die Lage der Plasmonenbande von 380 nm für



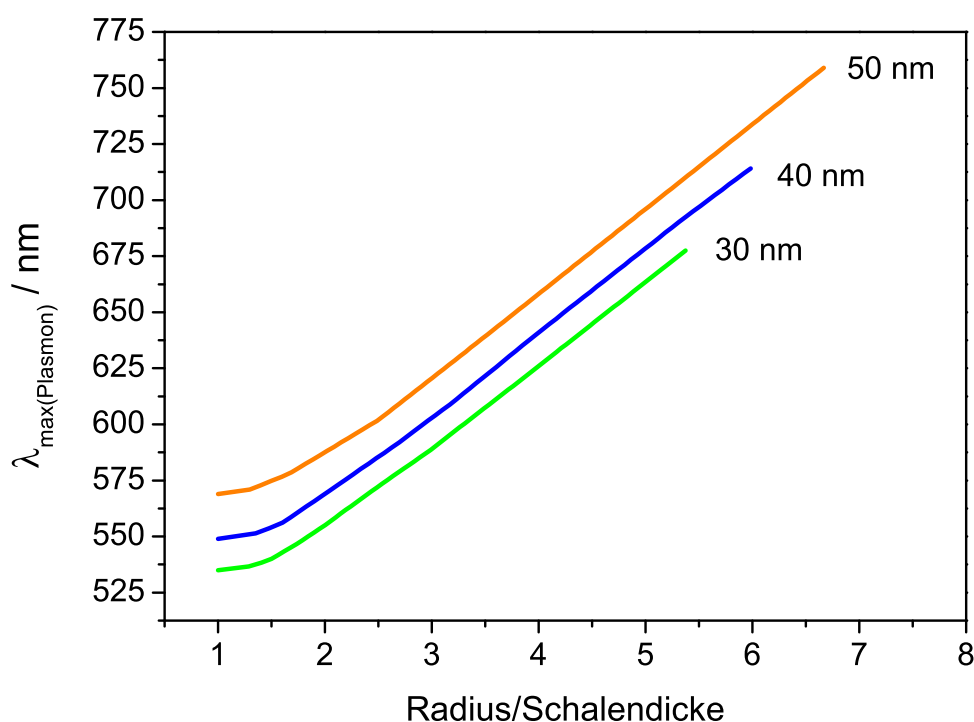
**Abb. 39:** Das Ergebnis von Mie-Rechnungen für einzelne Gold- und Silber-Nanopartikel in Wasser (Brechungsindex  $n = 1.33$ ) zeigt die Abhängigkeit des Extinktionsmaximums vom Teilchendurchmesser. Über die Änderung der Größe der Nanopartikel lässt sich die Plasmonenresonanz vom blauen bis in den roten Spektralbereich verschieben.



Partikel mit 10 nm Durchmesser bis 570 nm für Partikel mit 140 nm Durchmesser verschieben. Gold-Nanopartikel zeigen bei entsprechenden Größen Resonanzmaxima von 520 nm bis 620 nm.

Bei optischen Untersuchungen an biologischen Proben, wie beispielsweise Geweben, im blauen bis grünen Spektralbereich tritt häufig eine starke Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz) auf, welche bei Raman-Messungen zu einer spektralen Überlagerung führt und aufgrund des schlechteren Kontrasts eine quantitative Auswertung der Messdaten erschwert oder gar verhindert.

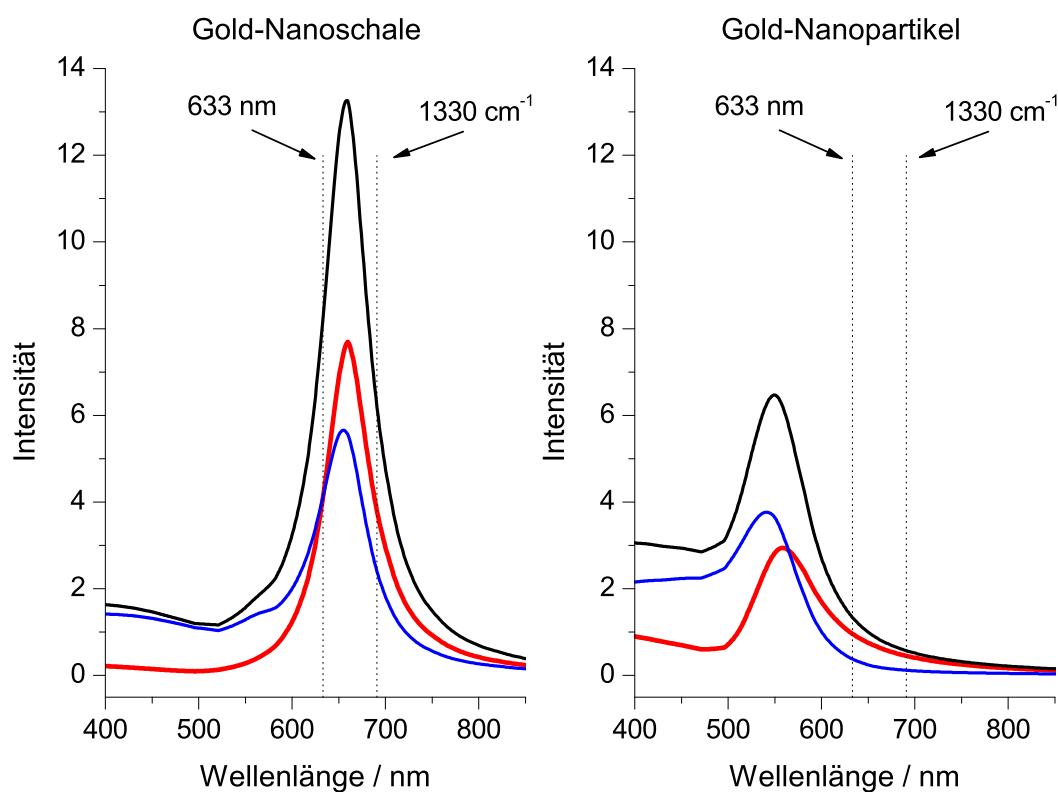
Der Einsatz von Gold-Nanoschalen als SERS-Substrat ermöglicht es, die SERS-Marker auf rote bis nah-infrarote Laseranregung abzustimmen. Dieser Spektralbereich wird auch als biologisches Fenster bezeichnet, da hier kaum störende Beiträge der Autofluoreszenz auftreten.



**Abb. 40:** Abhängigkeit des Resonanzmaximums der Gold-Nanoschalen in Wasser vom Verhältnis des Außenradius zur Schalendicke. Die Mie-Rechnungen wurden mit einem Brechungsindex von 1.33 für die Umgebung der Nanopartikel als auch für deren Innenraum durchgeführt. Die rote, blaue und grüne Linie (mit den Außenradien: 50 nm, 40 nm, 30 nm) zeigen eine näherungsweise lineare Rotverschiebung mit zunehmenden Radius zu Schalendicke-Verhältnis.

Die mittels Mie-Theorie berechneten Extinktionsmaxima von Gold-Nanoschalen unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit vom Verhältnis Außenradius zu Schalendicke sind in Abb. 40 dargestellt. Je größer die Werte des Verhältnisses Außenradius zu Schalendicke, desto dünner ist die Schale. Die näherungsweise lineare Rotverschiebung der Plasmonenbande mit dünner werdender Schale ist deutlich zu erkennen. Da die Schale nicht beliebig dünn hergestellt werden kann (im Allgemeinen sind Schalendicken größer ca. 4 nm möglich), müssen Gold-Nanoschalen mit einem Außendurchmesser von über 60 nm eingesetzt werden, um die Plasmonenbande bis in den nah-infraroten Bereich zu verschieben.

In Abb. 41 sind die berechneten optischen Eigenschaften einer Gold-Nanoschale und

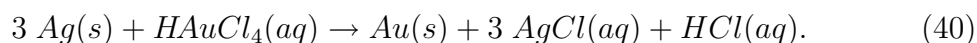


**Abb. 41:** Vergleich der optischen Eigenschaften einer Gold-Nanoschale (links) mit einer Gold-Nanokugel (rechts) mit einem Außenradius von 40 nm und einer Schalendicke von 9 nm. Es sind in schwarz die Extinktion, blau die Absorption und in rot die Streuung dargestellt. Die vertikalen Linien markieren den Bereich für ein Raman-Spektrum von  $0 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1330 \text{ cm}^{-1}$  bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Aufgrund der ca. 4-mal so hohen Streuintensität der Gold-Nanoschalen in diesem Bereich ist auch eine deutlich höhere SERS-Verstärkung zu erwarten.

einer Gold-Nanokugel mit jeweils 40 nm Durchmesser gegenübergestellt. Es sind in schwarz die Extinktion, blau die Absorption und in rot die Streuung dargestellt. Die Gold-Nanoschale zeigt eine zweimal so hohe Extinktion wie die Gold-Nanokugel. Um eine effiziente SERS-Verstärkung zu erzielen, müssen sowohl die Anregungswellenlänge des Lasers, als auch die Raman-Signale der Moleküle auf der Oberfläche der Nanopartikel durch das Plasmon verstärkt werden. Als Beispiel sind in beiden Graphen die 633 nm Linie eines HeNe-Lasers und die Lage einer Raman-Bande bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  (in relativen Wellenzahlen) eingezeichnet. Für die Intensität des SERS-Signals ist die Streueffizienz der Partikel von entscheidender Bedeutung. Nur bei einem ausreichend hohen Streuquerschnitt des SERS-Substrats können große SERS-Verstärkungen erzielt werden. Das Extinktionsspektrum sehr kleiner Gold-Nanokugeln von einigen wenigen Nanometern entsteht hauptsächlich durch Absorption, weshalb sie extrem uneffiziente SERS-Substrate sind. Die mindestens viermal so hohe Streuintensität der Gold-Nanoschalen im Wellenlängen- bzw. Wellenzahlbereich zwischen Laseranregung und Raman-Signal bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  sollte deutlich höhere SERS-Intensitäten erlauben als bei Gold-Nanokugeln gleicher Größe.

## Synthese und Charakterisierung von Gold/Silber-Nanoschalen

Die Synthese hohler Nanopartikel kann beispielsweise durch den Aufbau von Kern-Schale-Nanopartikeln erreicht werden. Häufig werden dazu Silica- oder Polystyrol-Nanopartikel einige Nanometer dick mit Gold beschichtet. Mit deutlich geringerem experimentellen Aufwand können hohle Gold-Nanostrukturen nach einer von Xia *et al.* entwickelten Synthese hergestellt werden.<sup>(35)</sup> Es werden Silber-Nanopartikel als Template eingesetzt, die als wässrige Suspension durch Tetrachlorgoldsäure bei 100 °C oxidiert werden (Gl. 40):

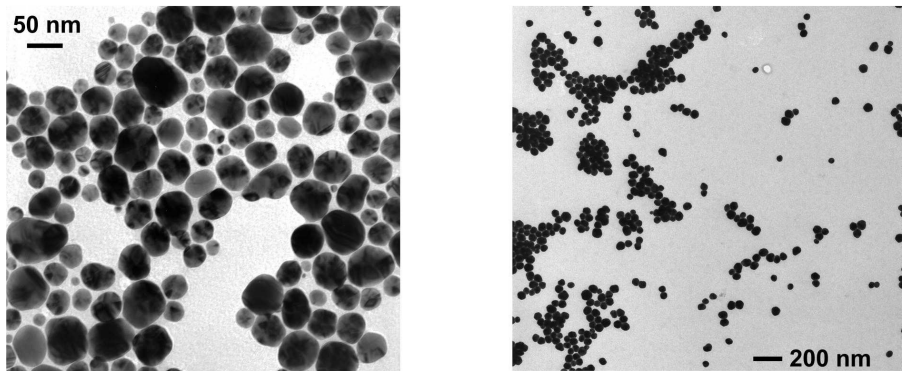


Im Gegensatz zur populären Lee-Meisel-Methode<sup>(119)</sup> zur Synthese von Silber- und Gold-Nanopartikeln, bei der die Metallsalze in wässrigen Lösungen mit Citrat reduziert werden, können in dem sogenannten Polyol-Prozess die Größe und Form der Silber-Nanopartikel in einem gewissen Bereich kontrolliert werden.<sup>(35)</sup> Im Polyol-Prozess wird Silbernitrat in Gegenwart von Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit Ethylenglykol reduziert. Ethylenglykol zeichnet sich durch eine temperaturabhängige Reduktionskraft und die Fähigkeit aus, aufgrund der relativ hohen dielektrischen Konstante, Silbernitrat und PVP in hohen Konzentrationen zu lösen.

Das Polymer PVP spielt eine wichtige Rolle bei der Reduktion und Stabilisierung der Nanopartikel. Die Sauerstoff- und Stickstoffatome komplexieren die freien Silberionen, was die Reduktion zu elementarem Silber beschleunigt. Eine anschließende Adsorption von PVP auf der Oberfläche der gebildeten Silberpartikel verhindert die Partikelaggregation. Des Weiteren kann über das PVP/AgNO<sub>3</sub>-Verhältnis die Partikelgröße kontrolliert werden. So führt ein steigendes PVP/AgNO<sub>3</sub>-Verhältnis zu einer sinkenden mittleren Partikelgröße.

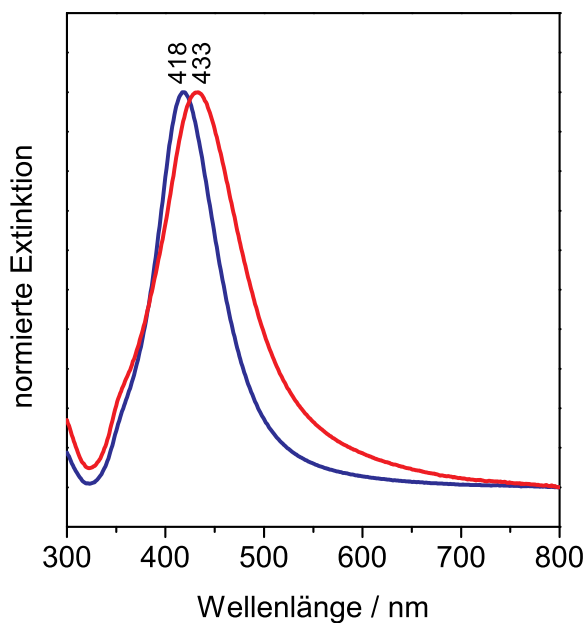
In Abb. 42 sind die Elektronenmikroskop-Bilder der über den Polyol-Prozess hergestellten Silber-Nanopartikel vor und nach der Größenselektion durch mehrfaches Zentrifugieren gezeigt. Im Rohprodukt der Silber-Nanopartikelsynthese besitzen die Teilchen eine Größenverteilung von 10 - 65 nm (Abb. 42 links). In Abb. 42 rechts, nach mehrmaligem Zentrifugieren, liegt eine deutlich einheitlichere Größenverteilung um 60 nm im Kolloid vor.

Die einzelnen Zentrifugationsschritte können einfach über Extinktionsspektro-



**Abb. 42:** Transmissions-Elektronen-Mikroskop-Aufnahmen von Silber-Nanopartikeln aus dem Polyol-Prozess. Links: die Silber-Nanopartikel haben eine breite Größenverteilung. Rechts: Größenselektiertes Silberkolloid durch zweimaliges Zentrifugieren in Wasser. Die Partikel haben einen Durchmesser von ca. 60 nm.

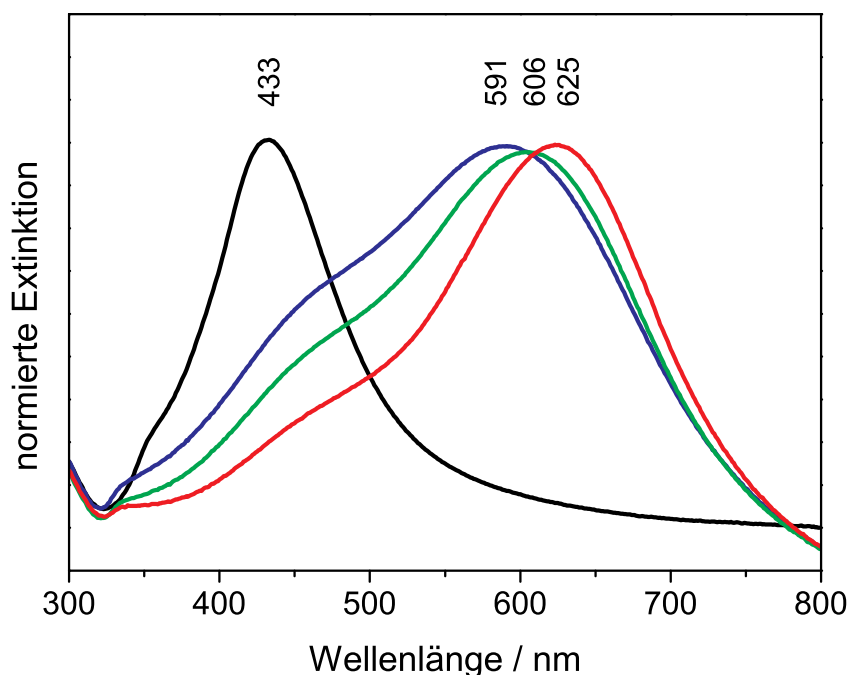
skopie verfolgt werden. In Abb. 43 sind die entsprechenden Spektren eines Polyol-Silber-Kolloids vor und nach zweimaligem Zentrifugieren dargestellt. Das Extinktionsmaximum der durchschnittlich 60 nm großen Silber-Nanopartikel ist um 15 nm rotverschoben.



**Abb. 43:** Normierte Extinktionsspektren von kolloidalen Silberlösungen. Blau: Spektrum eines direkt aus dem Polyol-Prozess erhaltenen und mit Wasser verdünntem Silberkolloid. Rot: Nach zweifachem Zentrifugieren sind kleine Silberpartikel abgetrennt. Das Extinktionsmaximum ist um 15 nm rotverschoben.

Bei der Umsetzung der Silber-Nanopartikel zu Gold/Silber-Nanoschalen entsteht nach Reaktionsgleichung 40 Silberchlorid ( $\text{AgCl}$ ). Um während der Reaktion ein Ausfallen des  $\text{AgCl}$  zu verhindern, muss in verdünnter wässriger Lösung unter Reflux gearbeitet werden. Die maximale Silberkonzentration von 1 mM sollte nicht überschritten werden, weil ausfallendes  $\text{AgCl}$  sich sonst auf der Nanopartikeloberfläche absetzen kann. Zu dem siedenden Silberkolloid wird langsam eine stark verdünnte Goldsalz-Lösung gegeben. Zur Reaktionskontrolle wurde die Umsetzung der Silber-Nanopartikel zu Gold/Silber-Nanoschalen mittels Extinktionsspektroskopie verfolgt (Abb. 44): die Ausbildung einer immer dünner werdenden Goldschale verschiebt die Resonanz der Plasmonenbande ins Rote.

In Abb. 45 ist schematisch der Mechanismus der Gold/Silber-Nanoschalen-Bildung dargestellt. Das dabei entstehende elementare Gold wächst anfänglich auf der Ober-

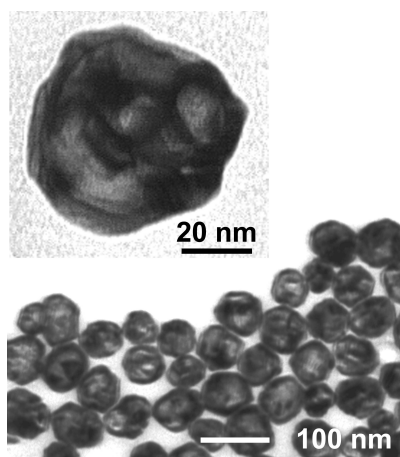


**Abb. 44:** Verfolgung der Goldschalenbildung mit Extinktionsspektroskopie. Schwarze Kurve: reines Silberkolloid. Die blaue, grüne und rote Kurve wurden von Kolloiden erhalten, die mit zunehmenden Goldsalz-Mengen umgesetzt wurden.



**Abb. 45:** Schematische Darstellung des Mechanismus der Gold/Silber-Nanoschalen-Bildung

fläche der Silbervorlage als dünne Hülle. Bei weiterer Zugabe von Goldlösung entstehen kleine Löcher in den goldbeschichteten Silber-Nanopartikeln. Durch diese können sowohl die Goldsalz-Lösung in das Innere gelangen, als auch entstehendes AgCl aus den Partikel heraus diffundieren. Da die Reaktion bei 100 °C stattfindet, ist die Diffusionsrate der Edelmetalle hoch genug, um durch Ostwald-Reifung die Wände wieder zu hochkristallinen Gold/Silber-Legierungen aufzubauen. Die Schulter um 450 nm in den Extinktionsspektren (Abb. 44) kann, wie in Abb. 45 Mitte gezeigt, mit Bereichen reinen Silbers im Inneren der Nanopartikel erklärt werden. Nach Abkühlen der Suspension auf Raumtemperatur und Abtrennen des ausgefallenen AgCl durch Dekantieren wurden Elektronen-Mikroskop-Bilder von den Gold/Silber-Nanoschalen aufgenommen. In Abb. 46 sind die erhaltenen, durchschnittlich 60 nm großen Gold/Silber-Nanoschalen gezeigt. Die Nanopartikel be-



**Abb. 46:** Transmissionselektronen-Mikroskop-Bilder von quasi-sphärischen Gold/Silber-Nanoschalen mit einem mittleren Durchmesser von 60 nm. Oben links ist in der Vergrößerung deutlich die hohle Struktur des Nano-Schale zu erkennen.

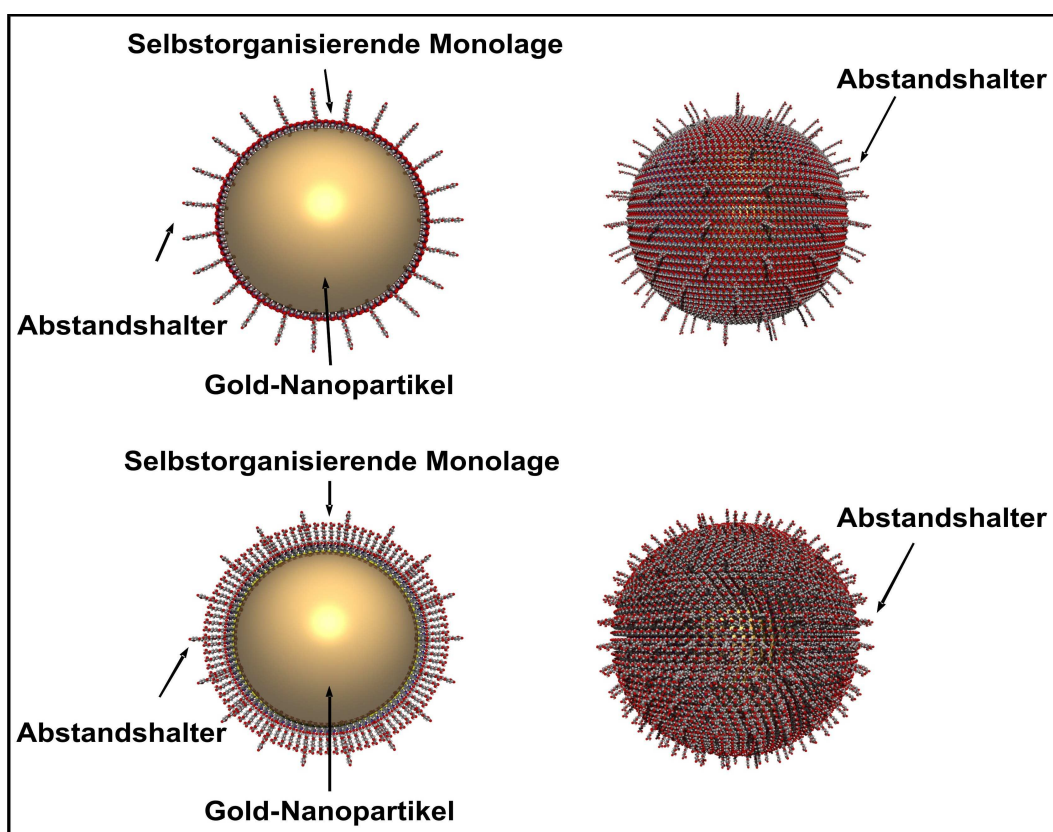
sitzen durch die vorherige Größenselektion der Silber-Template eine sehr homogene Größenverteilung und ihre hohle Struktur ist deutlich zu erkennen.



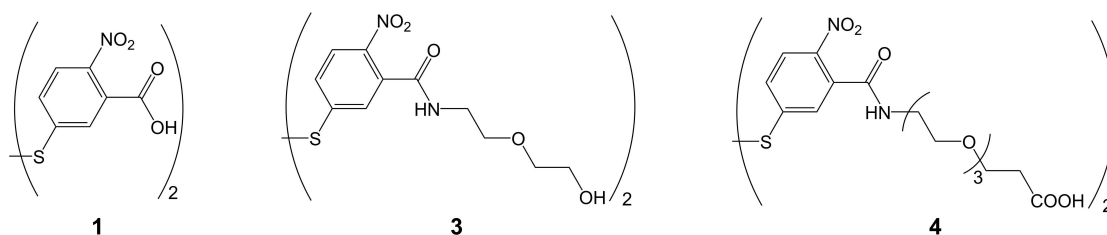
### 5.3.2 SERS-Marker mit gemischter Monolage

Wie im Kenntnisstand beschrieben existieren bereits einige SERS-Marker-Konzepte. Zur Steigerung der Effizienz der Biokonjugation der SERS-Marker mit Proteinen wurde, basierend auf dem Ansatz der Porter-Gruppe (Kapitel 5.1, Abb. 32), ein neuer Markertyp entwickelt.

Abb. 47 illustriert den Aufbau der SERS-Marker: durch die Einführung zusätzlicher Abstandshalter-Gruppen befinden sich die biomolekülbindenden Gruppen nicht mehr in der SAM, sondern ragen an längeren Abstandshaltern in die Lösung. So kann das Problem der sterisch gehinderten NHS-Ester umgangen werden. Als Abstandshalter wurde Triethylglykol mit einer terminalen Carbonsäurefunktion für die weitere Biofunktionalisierung gewählt und an den Raman-Marker **1** kovalent



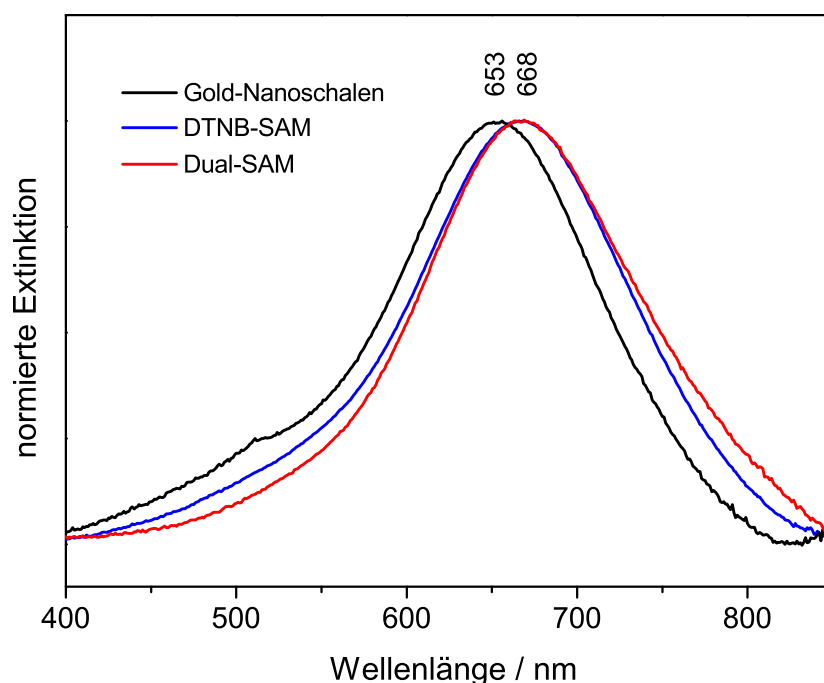
**Abb. 47:** Aufbau der neuen Dual-SAM-SERS-Marker. Oben: Die Reaktivität der SAM zum Binden von Biomolekülen wird durch die Einführung zusätzlicher terminaler Abstandshalter-Gruppen an einige Raman-Markermoleküle erreicht. Unten: Alternativ können Raman-Marker mit verschiedenen langen Abstandshalter-Gruppen zur SAM-Ausbildung eingesetzt werden.



**Abb. 48:** Moleküle, die zur Synthese des Dual-SAM-SERS-Markers verwendet wurden. DTNB (**1**), DTNB-MEG-OH (**3**) und DTNB-TEG-COOH (**4**).

gebunden (DTNB-TEG-COOH, **4** in Abb. 48).

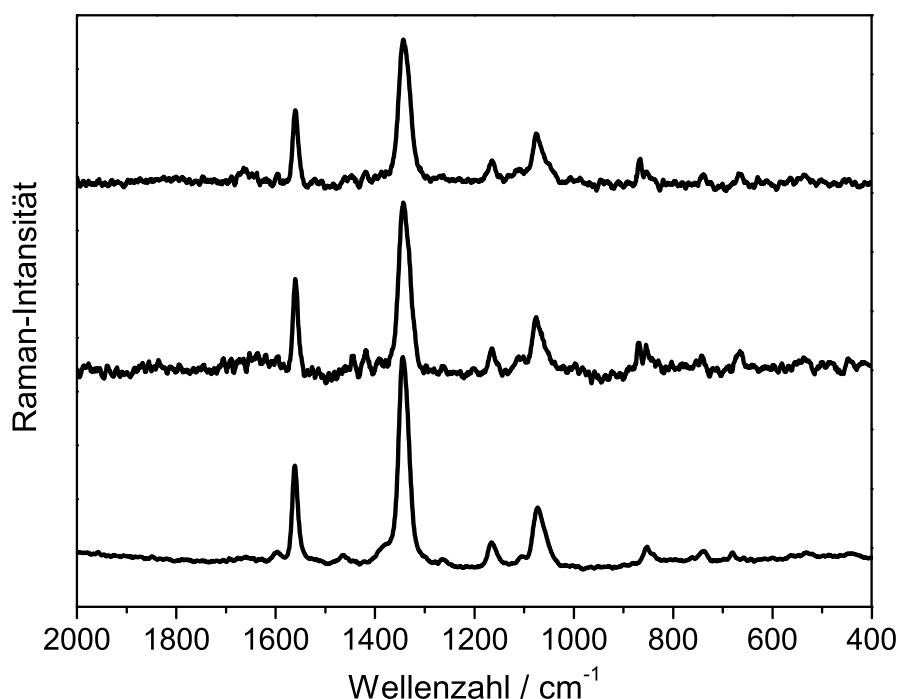
Zur zusätzlichen Stabilisierung der SAM und Hydrophilisierung des SERS-Markers wurde ein Raman-Marker mit einem kürzeren Monoethylglykol-Abstandshalter (DTNB-MEG-OH, **3** in Abb. 48) koadsorbiert. Der kurze Abstandshalter wird bei der Dual-SAM-Ausbildung im Überschuss zugegeben, um eine dicht gepackte, stabile SAM auszubilden. Der kurze Abstandshalter trägt eine bei der verwendeten Koppelschemie unreaktive terminale Alkohol-Gruppe und dient zur weiteren Erhöhung der Wasserlöslichkeit.



**Abb. 49:** Resonanzverschiebung der Extinktionsmaxima von reinem DTNB-SAM und Dual-SAM auf Gold/Silber-Nanoschalen im Vergleich zu unfunktionalisierten Nanopartikeln.

Weiterhin sollte durch die Koadsorption der chemisch sehr ähnlichen verlängerten Raman-Marker eine zusätzliche Stabilisierung der SAM erreicht werden. Als Abstandhalter wurden Polyethylenglykol-Derivate gewählt, da sie sowohl wasserlöslich als auch flexibel sind und ein unspezifisches Binden der SERS-Marker minimieren. Die Lage der Resonanzfrequenz von Plasmonen wird vom lokalen Brechungsindex der Umgebung beeinflusst. So resultiert aus einer Erhöhung des Brechungsindex, zum Beispiel durch Austausch des Lösungsmittels oder die Adsorption von Molekülen auf der Oberfläche der Nanopartikel, im Allgemeinen eine Rotverschiebung im Extinktionsspektrum.

In Abb. 49 sind die Extinktionsspektren vor und nach der SAM-Ausbildung auf Gold/Silber-Nanoschalen gezeigt. Das Extinktionsmaximum reiner Gold/Silber-Nanoschalen (Abb. 49, schwarze Kurve) liegt bei 653 nm. Durch die Ausbildung einer dualen SAM (Abb. 49, rote Kurve) wird, genauso wie für die Referenz-SAM aus DTBN-Molekülen, eine Rotverschiebung der Plasmonenresonanz um 15 nm beobachtet. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Dual-SAM (hier in einem



**Abb. 50:** Dual-SAM-SERS-Marker-Spektren von reinem SERS-Marker (unten), NHS-funktionalisiertem SERS-Marker (Mitte) und mit Antikörpern funktionalisiertem SERS-Marker (oben).

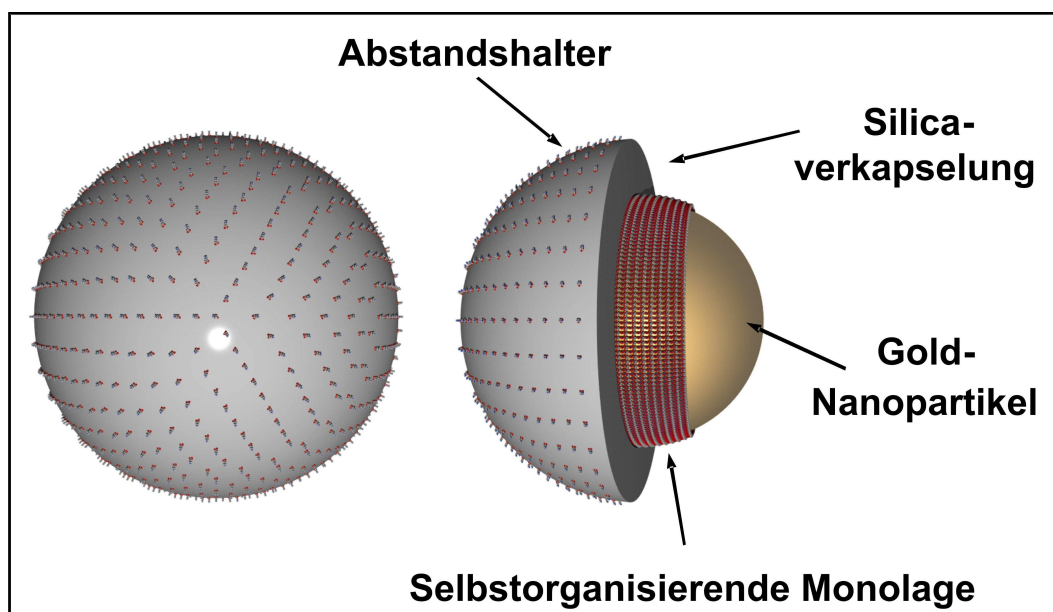
DTNB-MEG-OH- zu DTNB-TEG-COOH-Verhältnis von 1000:1) ähnlich dicht gepackt ist wie eine reine DTNB-SAM.

In Abb. 50 ist die SERS-spektroskopische Verfolgung der Intaktheit der SAM gezeigt. Die SERS-Spektren der Dual-SAM (unten), der NHS-aktivierten Dual-SAM und der antikörperfunktionalisierten Dual-SAM besitzen die gleiche Signatur. Aufgrund der starken Abstandsabhängigkeit der SERS-Verstärkung sind nur die Banden der direkt auf der Oberfläche adsorbierten DTNB-Moleküle in den Spektren zu sehen. Da keine spektralen Beiträge von koadsorbiertem NHS oder Antikörper beobachtet werden, kann auf die Intaktheit der Dual-SAM geschlossen werden.

### 5.3.3 SERS-Marker mit Silicahülle

Eine weitere Möglichkeit zum Aufbau eines SERS-Markers, der sich effizient an Biomoleküle koppeln lässt, wird im Folgenden aufgezeigt. Der Ansatz stellt eine Synthese aus den im Kenntnisstand vorgestellten SERS-Markern in Kapitel 5.1 (Abb. 32 und Abb. 33) dar. Der hauptsächliche Unterschied zwischen den beiden Ansätzen ist, dass entweder eine unverkapselte selbstorganisierende Monolage von Raman-Markern auf der Nanopartikeloberfläche vorliegt oder eine silicaverkapselte Submonolage. Die Kombination aus Raman-aktiver SAM und deren Verkapselung wird hier erstmals vorgestellt.

Weil die signalgebende SAM und das Lösungsmittel miteinander in direktem Kontakt stehen, stellen die Desorption der Raman-Marker von der Partikeloberfläche und die Aggregation der Partikel Nachteile dar. Eine Verkapselung der SERS-Marker verhindert oder minimiert Desorption und Aggregation und bietet so einen mechanischen als auch chemischen Schutz. Mit anderen Worten: das SERS-Signal wird durch eine schützende Hülle von äußeren Einflüssen abgeschirmt. Von besonderem



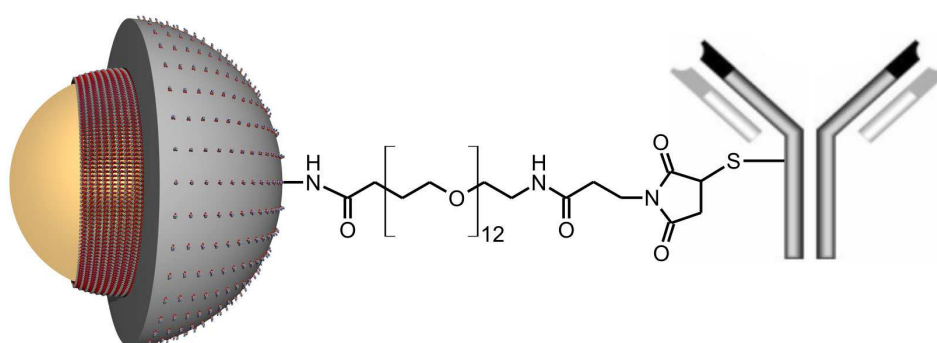
**Abb. 51:** Schematischer Aufbau eines oberflächenfunktionalisierten und silicaverkapselten SERS-Markers. Rechts: Gold-Nanopartikel mit einer selbstorganisierenden Monolage (SAM) aus Raman-Markermolekülen (rot) und einer schützenden Silicahülle (grau). Die Silicaoberfläche ist mit Abstandshaltern funktionalisiert.

Interesse hinsichtlich der Stabilität und Biokompatibilität ist Silica als Hüllenmaterial. Da sich die silicaverkapselten SERS-Marker nach außen wie reine Silicapartikel verhalten, können sie unabhängig von den verwendeten Raman-Markern mit derselben Kopplungschemie biofunktionalisiert werden.

Der Ansatz zu den neuen SERS-Markern ist in Abb. 51 schematisch gezeigt. Die Gold-Nanoschale ist komplett mit einer selbstorganisierenden Monolage (SAM) aus Raman-Markern bedeckt.

Eine die SAM komplett umschließende Silicaschale dient nicht ausschließlich zum Schutz des SERS-aktiven Nanopartikels, sie erlaubt auch eine effiziente biokompatible Oberflächenfunktionalisierung. Im Fall von Protein-Detektion und -Lokalisierung mit SERS-Markern wird, wie in Abb. 52 rechts gezeigt, die nötige Selektivität durch einen monoklonalen Antikörper erreicht.

Zwei unterschiedliche Syntheserouten für silicaverkapselte SERS-Marker mit einer selbstorganisierenden Monolage aus Raman-Markern wurden entwickelt. Die erste Methode basiert auf einer Polyelektrolyt-Beschichtung (*layer-by-layer deposition*) der SAM, gefolgt von einer modifizierten<sup>(142)</sup> Stöber-Methode<sup>(143)</sup> zum Aufwachsen der Silicaschale. Bei dieser Polyelektrolyt-Methode wird die nach außen hin negativ geladene SAM erst mit positiv geladenen Poly(allylaminhydrochlorid) bedeckt und anschließend eine Lage des vitreophilen Polyvinylpyrrolidons (PVP) aufgebracht.

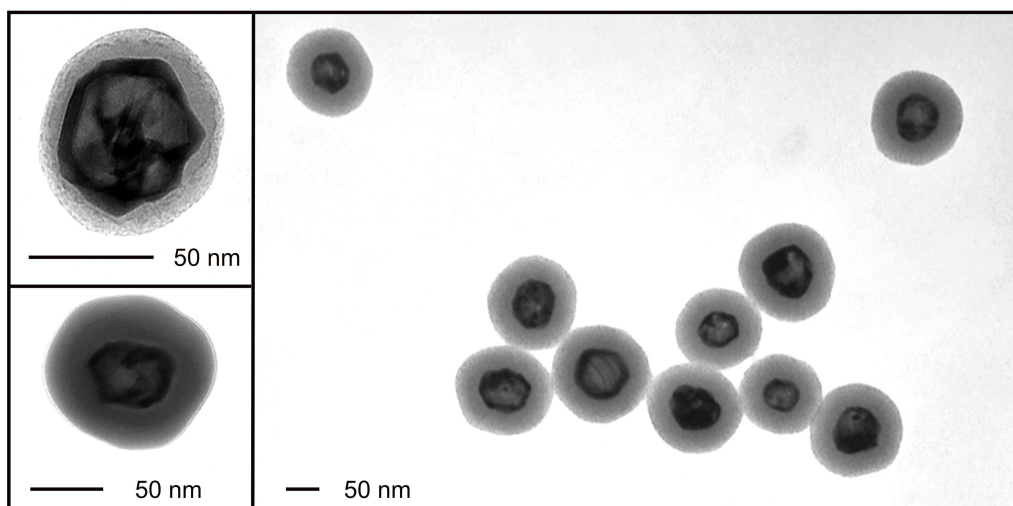


**Abb. 52:** Aufbau eines biofunktionalisierten und silicaverkapselten SERS-Markers. Links: silicaverkapselter SERS-Marker mit einer SAM aus Raman-Markern auf der Goldoberfläche. Mitte: heterobifunktionelles Polyethylenglykol-Verknüpfungsreagenz. Rechts: monoklonaler Antikörper zum selektiven Binden von Antigenen.

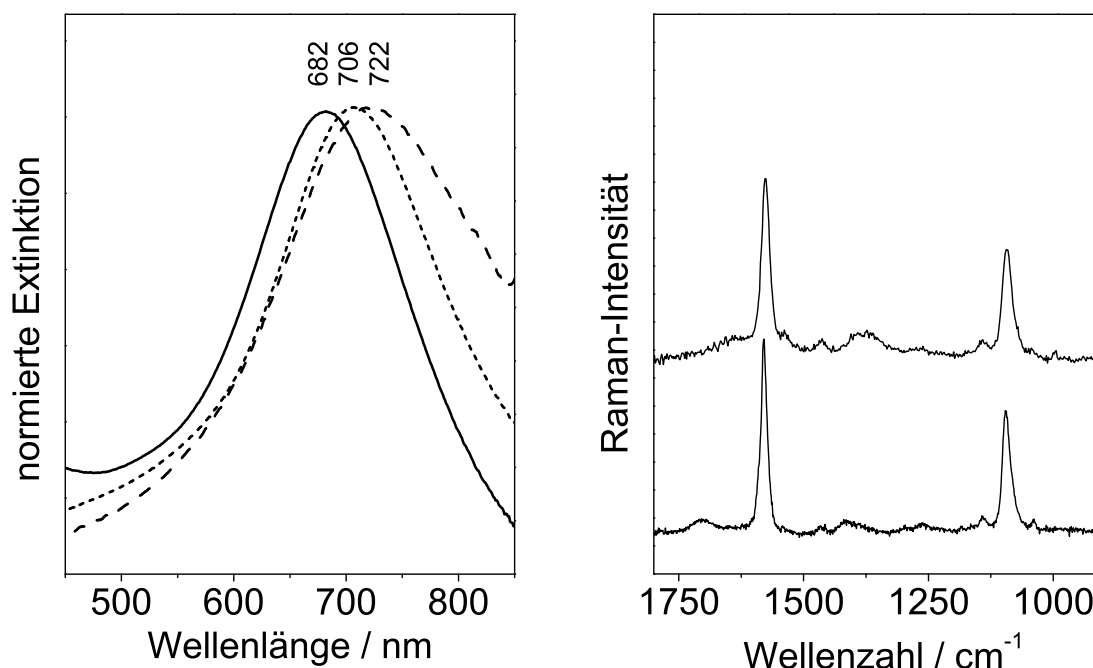
Das Wachstum der Silicaschale wird durch eine veränderte Stöber-Synthese in einer Ammoniak/Isopropanol-Lösung und Tetraethoxyorthosilikat erreicht. Die TEM-Bilder der silicaverkapselten Gold/Silber-Nanoschalen in Abb. 53 belegen die hohe Reproduzierbarkeit dieser Polyelektrolyt/Stöber-Methode. In Abb. 53 (oben links und rechts) sind die Gold/Silber-Nanoschalen mit einer 10 nm dicken Silicaschicht bedeckt. Durch die Zugabe größerer Mengen an TEOS können dickere Silicaschalen ( $\sim 25$  nm) erhalten werden (Abb. 53 links unten).

Im zweiten Ansatz zur Silicaverkapselung von SERS-Markern wird im Gegensatz zur Polyelektrolyt-Methode eine SAM aus Raman-Markern auf die Gold/Silber-Nanoschalen aufgebracht, der bereits  $\text{SiO}_2$ -Vorläufermoleküle enthält. Hierzu wurde an die Raman-Marker 3-Aminopropyltrimethoxysilan kovalent gebunden, um eine terminale  $\text{Si}(\text{OMe})_3$ -Funktionalität in der SAM zu erhalten. Wird nun eine SAM auf den Gold/Silber-Nanoschalen in wasserfreiem DMF ausgebildet, ragen die  $\text{Si}(\text{OMe})_3$ -Anker nach außen. Im nächsten Schritt folgt die Hydrolyse der Anker-Gruppen und eine Silicaschale kann mit der modifizierten Stöber-Methode auf den SERS-Markern wachsen.

Die Synthese der SERS-Marker wurde anhand von Extinktionsspektren verfolgt (siehe Abb. 54 links). Das Maximum der Plasmonenbande für reine Gold/Silber-



**Abb. 53:** Transmissions-Elektronen-Mikroskop-Bilder der silicaverkapselten SERS-Marker. Rechts und oben links: SERS-Marker mit einer 10 nm dicken Silicaschale. Unten links: SERS-Marker mit einer 25 nm dicken Silicaschale. Der Durchmesser der Gold-Nanoschalen beträgt 55 nm.



**Abb. 54:** Links: Extinktionsspektren einer wässrigen Suspension der Gold/Silber-Nanoschalen (durchgezogene Linie), der Nanoschalen mit einer 4-Thio-2-brombenzoesäure-SAM (aus 4,4'-Dithiobis(2-brombenzoesäure)) in Ethanol (gepunktete Linie) und die silicaverkapselten SERS-Marker (gestrichelte Linie). Rechts: SERS-Spektren der Gold/Silber-Nanoschalen mit SAM vor (unten) und nach (oben) der Verkapselung.

Nanoschalen liegt in diesem Fall bei 683 nm. Nach der Ausbildung eines kompletten SAMs wird durch die Änderung der dielektrischen Umgebung eine Rotverschiebung zu 706 nm beobachtet. Die Silicaverkapselung führt zu einer weiteren Rotverschiebung zu 722 nm.

Zur SAM-Ausbildung wurde 4,4'-Dithiobis(2-Bromo-Benzoesäure) als Raman-Marker verwendet. Die entsprechenden SERS-Spektren der SAM-funktionalisierten Gold/Silber-Nanoschalen vor und nach der Silicaverkapselung sind in Abb. 54 rechts dargestellt. Aufgrund der geringen Größe der Moleküle ( $3n-6$  Normalmoden) und deren einheitlichen Orientierung in der SAM (SERS-Auswahlregeln) treten in den SERS-Spektren nur zwei dominante Raman-Banden auf.

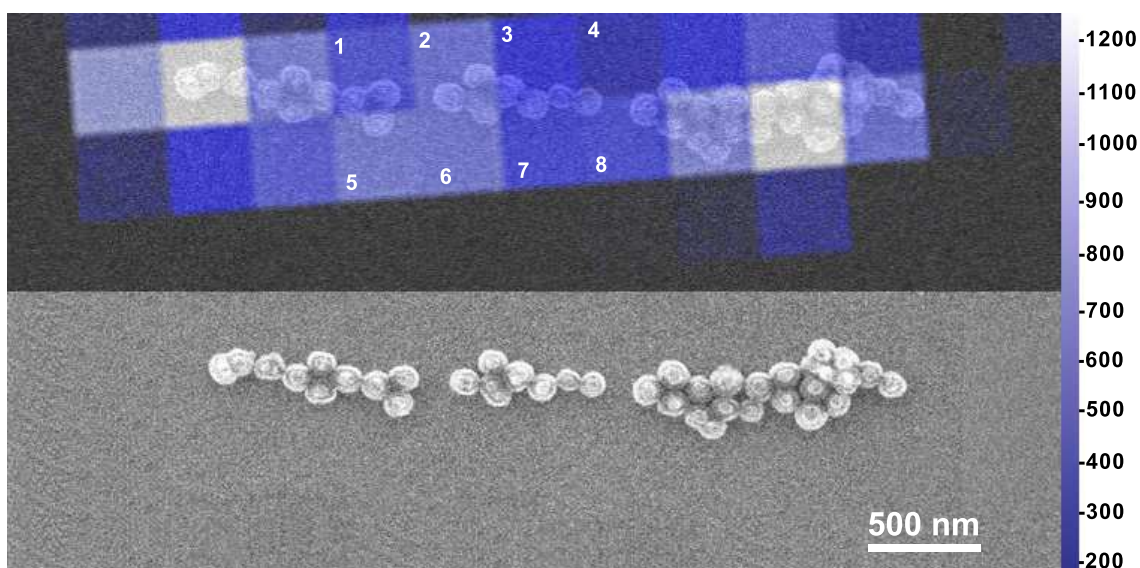
Zur detaillierten Charakterisierung der silicaverkapselten SERS-Marker wurden diese



auf einen Silizium-Wafer aufgebracht und ein kombiniertes REM/SERS-Experiment durchgeführt. Das Raster-Elektronen-Mikroskop-Bild in Abb. 55 unten zeigt die homogen ausgebildeten Silicaschalen und die einheitliche Größenverteilung der getrockneten SERS-Marker. Die meisten Partikel sind Monomere und 15-16 % der Partikel sind verkapselte Dimere. Im Bild darüber ist das aus der integrierten SERS-Intensität der Marker generierte Falschfarbenbild eines Raster-Experiments dem REM-Bild überlagert. Helle Pixel stehen für hohe Intensitäten. Wie im REM-Bild zu erkennen rühren die weißen Pixel, d.h. die intensivsten SERS-Signale, von einzelnen verkapselten Nanopartikel-Dimeren her. In dem mit 1 - 8 markierten Bereich befinden sich nur monomere SERS-Marker, von denen reproduzierbare SERS-Signale erhalten werden.

Um die silicaverkapselten SERS-Marker zur zuverlässigen Quantifizierung von Zielmolekülen einzusetzen, müssen noch Methoden entwickelt werden, die Aggregatbildung während der Synthese zu vermeiden oder bereits gebildete Aggregate von den einzelnen SERS-Markern abzutrennen.

Für biomedizinische Anwendungen müssen die nun silicaverkapselten SERS-Marker an der Glasoberfläche weiter funktionalisiert werden. Zuerst wurde die Oberfläche



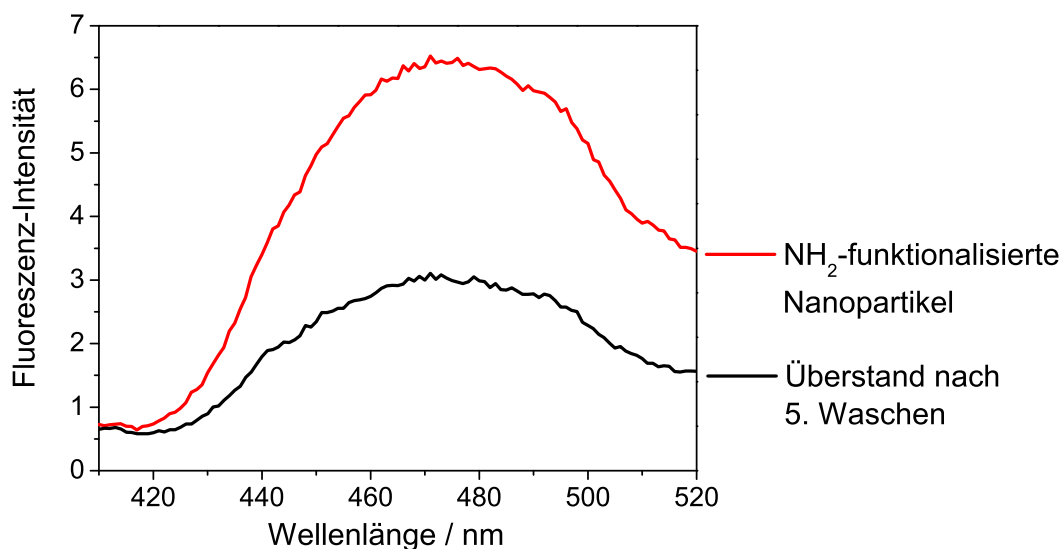
**Abb. 55:** Unten: Rasterelektronen-Mikroskop-Bild (REM) der silicaverkapselten SERS-Marker auf einem Silizium-Wafer. Oben: Überlagerung des REM-Bildes mit dem SERS-mikroskopischen Falschfarben-Bild.

der Silicaschale durch Zugabe von 3-Aminopropyltrimethoxysilan in Ethanol mit Amino-Gruppen funktionalisiert. Die erfolgreiche Aminofunktionalisierung konnte sowohl mit einem Fluorescamin-Test als auch über die Oberflächenladung durch die Bestimmung des Zeta-Potentials der SERS-Marker nachgewiesen werden.

Fluorescamin reagiert mit Amino-Gruppen zu einem fluoreszierenden Produkt, das bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm eine starke Fluoreszenzemission bei 480 nm zeigt. Die Fluoreszenzspektren in Abb. 56 belegen die erfolgreiche Aminofunktionalisierung der SERS-Marker. Das bei der Reinigung der SERS-Marker erhaltene letzte Zentrifugat zeigt eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität als die SERS-Marker selbst.

Experimente zur Bestimmung des Zeta-Potentials lieferten eine negative Oberflächenladung der unfunktionalisierten Silica-SERS-Marker mit einem Wert von - 30 mV in deionisiertem Wasser. Nach der Aminofunktionalisierung der SERS-Marker konnte mit einem Zeta-Potential von + 32 mV eine Umkehrung der Oberflächenladung durch die positiv geladenen Amino-Gruppen bewiesen werden.

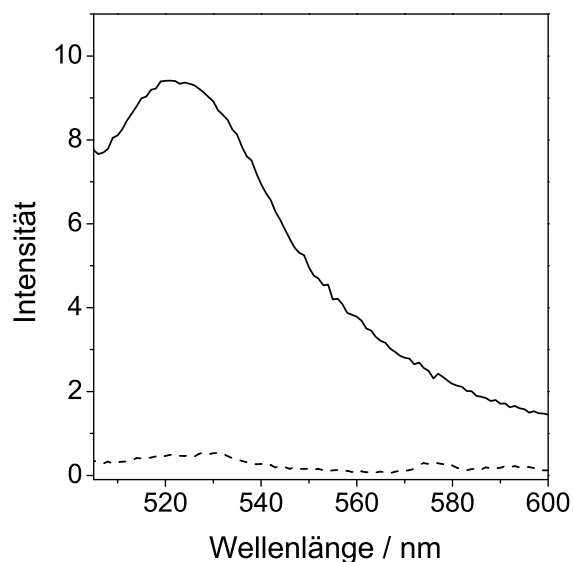
Zur anschließenden Biofunktionalisierung der SERS-Marker mit Antikörpern wurde ein heterobifunktionelles Verknüpfungsreagenz eingesetzt. Dieses Verknüpfungsrea-



**Abb. 56:** Nachweis der Aminofunktionalisierung mittels Fluorescamin-Test. Oben: Fluoreszenz-Spektrum der silicaverkapselten SERS-Marker. Unten: Fluoreszenz-Spektrum des fünften Überstands beim Waschen der aminofunktionalisierten SERS-Marker durch Zentrifugation.

genz verfügt über funktionelle Gruppen um Biomoleküle an den SERS-Marker zu binden und die sterische Zugänglichkeit des SERS-Markers zu erhöhen.

Das hier eingesetzte heterobifunktionale Verknüpfungsreagenz trägt einen NHS-Ester, um an die Amino-Gruppen des silicaverkapselten SERS-Markers zu binden und eine Maleimid-Einheit zur Konjugation mit den freien Thiol-Gruppen des Antikörpers. Zur Überprüfung der erfolgreichen Konjugation der Antikörper an die SERS-Marker wurde ein Fluorophor-markiertes Immunglobulin G (IgG) zur Biofunktionalisierung eingesetzt. Die deutliche erhöhte Fluoreszenz der Nano-Suspension in Abb. 57 belegt im Vergleich zum Waschrückstand eindeutig die erfolgreiche Synthese eines Immuno-SERS-Markers.



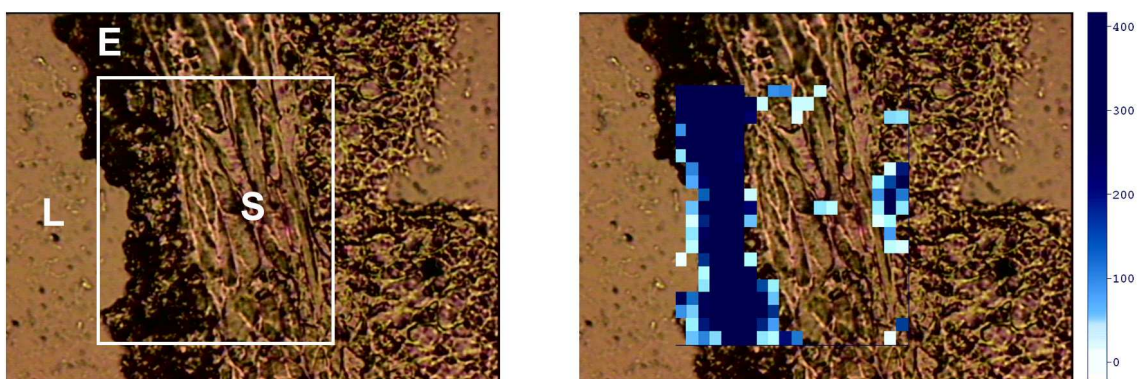
**Abb. 57:** Fluoreszenztest auf erfolgreiche Konjugation von Antikörpern mit silicaverkapselten SERS-Markern. Durchgezogene Linie: Fluoreszenz-Spektrum des biofunktionalisierten silicaverkapselten SERS-Markers. Gestrichelte Linie: Fluoreszenz-Intensität des letzten Überstands bei der Abtrennung nicht gebundener Antikörper durch Zentrifugation.

### 5.3.4 Protein-Lokalisierung in Geweben mittels SERS-Mikroskopie

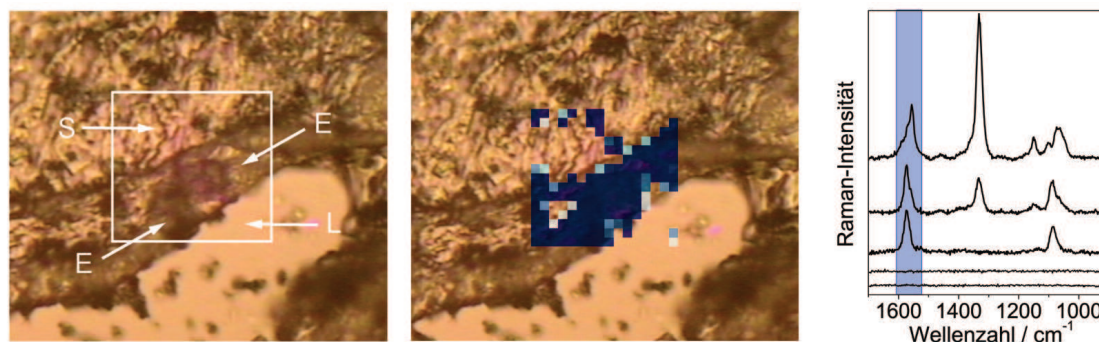
Das prostata-spezifische Antigen (PSA) ist ein Tumormarker für Prostatakrebs. Als Test für die SERS-Mikroskopie mit SERS-markierten PSA-Antikörpern dient die Lokalisierung von PSA im Epithel der Prostata. Zum einen eignet sich PSA als Testsystem, weil es im Epithel der Prostata hoch exprimiert ist. Ein anderer Aspekt ist das charakteristische histologische Vorkommen von PSA in Prostatageweben. Im Epithelgewebe der Prostata ist PSA exprimiert, während in Stroma und Lumen kein PSA vorhanden ist. Diese drei Gewebeklassen lassen sich im Lichtmikroskop eindeutig unterscheiden.

Mit diesem *A priori*-Wissen kann die Qualität der erhaltenen SERS-Bilder bestimmt werden: spektrale Signaturen eines SERS-markierten PSA-Antikörpers werden nur im Epithel erwartet, wohingegen SERS-Signale im Stroma unspezifisches Binden bedeuten.

Abb. 58 und Abb. 59 links zeigen Lichtmikroskop-Aufnahmen von Prostatagewebeschnitten. Das weiße Rechteck markiert jeweils den Bereich des SERS-mikroskopischen Raster-Experiments (mit 17 x 17 Spektren bzw. mit 15 x 15 Spektren). An jedem der 289 bzw. 225 Punkte wurde ein Raman-Spektrum mit einer Integrationszeit von 2 Sekunden aufgenommen. Die verschiedenen histologischen Klassen - Epithel, Stroma und Lumen - können bereits im Mikroskopbild unter-



**Abb. 58:** SERS-mikroskopisches Abrastern eines Prostatagewebeschnitts mit den antikörperfunktionalisierten Dual-SAM-SERS-Markern. Links: Mikroskopbild des untersuchten Prostatagewebeschnitts. Die Gewebeklassen Epithel, Stroma und Lumen sind mit den entsprechenden Buchstaben E, S und L markiert. Rechts: Das aus einem Raster-Experiment generierte Falschfarbenbild zeigt die Verteilung von PSA im untersuchten Gebiet.



**Abb. 59:** SERS-mikroskopisches Abrastern von Prostata mit einer 1:1-Mischung aus zwei verschiedenen silicaverkapselten SERS-Markern. Links: Die Gewebeklassen Epithel, Stroma und Lumen sind mit den entsprechenden Buchstaben E, S und L markiert. Mitte: das aus einem Raster-Experiment generierte Falschfarbenbild zeigt die Verteilung von PSA im untersuchten Gebiet des Gewebeschnitts. Rechts: Ausgewählte Spektren aufgenommen an verschiedenen Positionen der Probe. Erläuterungen siehe Text.

schieden werden.

Der Gewebeschnitt in Abb. 58 links wurde mit PSA-Antikörper-funktionalisierten Dual-SAM-SERS-Marker inkubiert. Rechts ist das aus der integrierten Intensität der Markerbande bei  $1330\text{ cm}^{-1}$  erhaltene Falschfarbenbild der PSA-Verteilung im Epithel dargestellt. Die Immuno-Dual-SAM-SERS-Marker binden spezifisch PSA im Epithel.

Der Gewebeschnitt in Abb. 59 wurde mit einer Mischung aus zwei verschiedenen silicaverkapselten Immun-SERS-Markern inkubiert, wobei jeweils PSA-Antikörper an 4-Thio-2-brombenzoesäure-SERS-Marker und an 5-Thio-2-nitrobenzoesäure-SERS-Marker konjugiert waren.

SERS-Spektren von verschiedenen Stellen im Gewebe sind in Abb. 59 rechts exemplarisch gezeigt. Die unteren beiden Spektren wurden in Stroma und Lumen aufgenommen und es konnten keine Signale der SERS-Marker detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die oberen drei im Epithel aufgenommenen Spektren die charakteristischen Banden der SERS-Marker. Das oberste Spektrum besteht hauptsächlich aus Beiträgen des DTNB-Markers, während das dritte Spektrum von oben für den Bromo-Marker charakteristisch ist. Hauptsächlich werden im Epithel Mischungen aus Bromo- und DTNB-Signalen, wie im zweiten Spektrum von oben, gemessen. Anhand der integrierten Raman-Intensität der Markerbanden um  $1570$

$\text{cm}^{-1}$  kann ein Falschfarbenbild der PSA-Verteilung erstellt werden (siehe Abb. 59 Mitte). Während die dunkelblauen Pixel auf eine hohe PSA-Konzentration hinweisen, bedeuten transparente Pixel, dass kein PSA vorliegt. Das Falschfarbenbild belegt eindeutig das spezifische Binden der SERS-markierten PSA-Antikörper im Epithel.

## 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die ultrasensitive Detektion von Biomolekülen über SERS-Marker ist eine viel versprechende neue Technik, die sich in der Nanodiagnostik bereits etabliert hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Konzepte für optimierte SERS-Marker entwickelt und umgesetzt.

Beide Konzepte basieren auf Gold/Silber-Nanoschalen als SERS-Substrat, die über Silber-Nanopartikel als Template in einem Redox-Prozess mit Goldsäure erhalten werden. Die Plasmonenbande der Gold/Silber-Nanoschalen kann kontrolliert für die Laseranregung in einem Bereich von 600 - 800 nm abgestimmt werden, um so eine maximale SERS-Verstärkung zu erzielen. Die hier vorgestellten Nanopartikel wurden auf die 633 nm-Linie eines HeNe-Lasers optimiert, um den störenden Untergrund der Autofluoreszenz biologischer Proben in diagnostischen Anwendungen zu minimieren. Anhand von Mie-Rechnungen konnte die höhere Streuintensität der Gold/Silber-Nanoschalen im Vergleich zu Gold-Vollkugeln belegt werden.

In beiden SERS-Marker-Konzepten wurde die Oberfläche der Gold/Silber-Nanoschalen über eine starke Au-S-Bindung mit einer selbstorganisierenden Monolage (SAM) aus signalgebenden Raman-Markern beschichtet. Eine SAM stellt die maximal mögliche Bedeckung der Oberfläche mit Raman-Markern sicher, was für das gegebene SERS-Substrat eine maximale Sensitivität mit hoher Reproduzierbarkeit und Signalstabilität bedeutet. Die uniforme Ausrichtung der Raman-Marker in der SAM führt zu reproduzierbaren SERS-Spektren mit nur wenigen Raman-Banden. Der Schutz der Nanopartikeloberfläche vor Fremdadorption und die Beseitigung eventuell vorhandener Verunreinigungen auf der Oberfläche sind weitere Vorteile der SAM.

Ein literaturbekannter Ansatz Biomoleküle direkt über NHS-Aktivester in der SAM an die SERS-Marker zu koppeln<sup>(129)</sup> konnte nicht zufriedenstellend reproduziert werden. Auf Grund der hohen Packungsdichte der Raman-Markermoleküle in der SAM scheint eine Biokonjugation über die Aktivester sterisch stark gehindert zu sein. Zur Umgehung dieses Problems wurden zwei neue SERS-Marker-Strategien entwickelt. Zum einen wurde die Reaktivität der Bindungsstellen des SERS-Markers durch eine duale SAM mit verschiedenen langen Abstandshaltern erhöht und zum anderen wurde die SAM mit einer biofunktionalisierbaren Silicaschale verkapselt.

Der Dual-SAM-SERS-Marker besteht aus Raman-Markern mit zwei unterschiedlich langen Abstandshalter-Gruppen, die auf Gold/Silber-Nanoschalen eine stabile SAM ausbilden. Aufgrund der großen Abstandsabhängigkeit des SERS-Effekts zeigt eine SAM aus Raman-Markern mit kurzem und langem Abstandshalter auf den Nanopartikeln das gleiche charakteristische SERS-Spektrum wie eine SAM aus dem Raman-Marker DTNB. Da die Raman-aktive Gruppe der beiden Moleküle gleich ist (DTNB) und die Abstandshalter-Gruppen zu weit von der Partikeloberfläche entfernt sind werden keine zusätzlichen SERS-Beiträge detektiert. Die unterschiedliche Länge der Moleküle wird über eine Amidbindung mit Monoethylenglykol (MEG)- bzw. Triethylenglykol (TEG)-Einheiten erreicht. Die längeren Marker (DTNB-TEG-COOH) besitzen endständige Säure-Gruppen, an denen über eine Aktivierung mit N-Hydroxysulfosuccinimid Antikörper kovalent gebunden wurden. Die kürzeren Marker (DTNB-MEG-OH) besitzen endständige Alkoholfunktionen, die dem SERS-Marker einen zusätzlichen Schutz und gleichzeitig eine hohe Wasserlöslichkeit verleihen. Über die Stöchiometrie der beiden unterschiedlich langen Marker kann die sterische Hinderung bei der Koppelung mit den Antikörpern minimiert werden und somit die Biokonjugation kontrolliert werden. Zudem können die Polyethylenglykol-Einheiten ein unspezifisches Binden der SERS-Marker in biologischen Proben reduzieren.

Die zweite Strategie basiert auf der Verkapselung einer SAM aus Raman-Markern auf der Nanopartikeloberfläche mit Silica. Hierzu wurden zwei Synthesewege entwickelt, durch die Monolagen aus Raman-Markern auf Gold-Nanopartikeln reproduzierbar mit Silica verkapselt werden können.

In der ersten Syntheseroute wurde ein Raman-Marker mit terminaler  $\text{SiO}_2$ -Vorläufer-Einheit synthetisiert, der eine Trialkoxysilan-Gruppe trägt. Nach Ausbildung einer SAM auf der Nanopartikeloberfläche kann auf den terminalen Alkoxysilan-Gruppen eine Silicaschicht aufgebracht werden.

Die zweite Möglichkeit zur Verkapselung von SAM-funktionalisierten Nanopartikeln mit Silica wurde durch eine Beschichtung mit Polyelektrolyten erreicht. Durch eine SAM-Ausbildung mit zum Beispiel 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) als Raman-Marker auf den Nanopartikeln besitzen diese wegen der Carbonsäure-



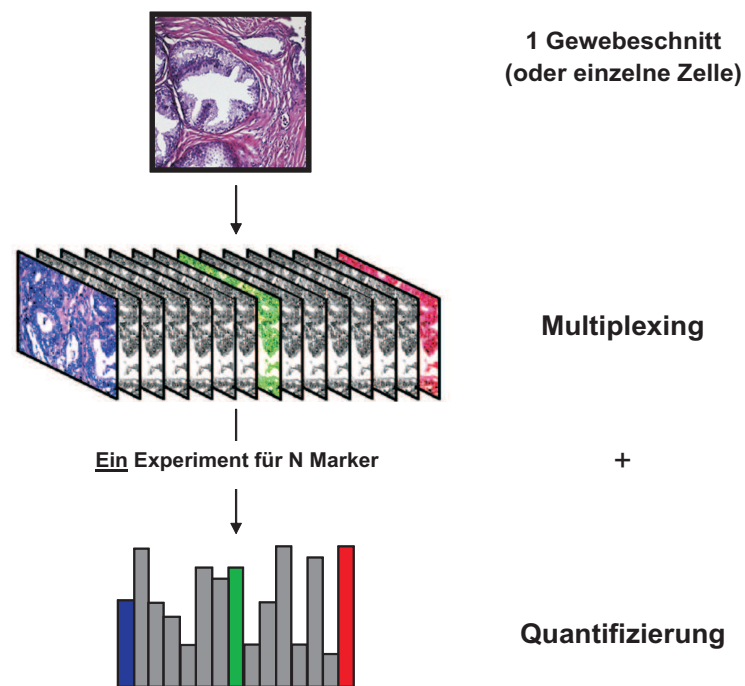
Gruppen eine negativ geladene Oberfläche. Nach Beschichtung der SAM mit einer positiv geladenen Polymerschicht (Poly(allylaminhydrochlorid)) wurde anschließend das vitreophile Polyvinylpyrrolidon (PVP) adsorbiert und über eine modifizierte Stöber-Methode mit einer Silicaschicht verkapselt. Der Vorteil der Polyelektrolyt-basierten Silicaverkapselung liegt in der relativ einfachen Herstellung einer Vielzahl verschiedener SERS-Marker, da die jeweiligen Raman-Markermoleküle neben der Thiol- oder Disulfid-Gruppe zum Binden an der Nanopartikel-Oberfläche nur eine weitere geladene Gruppe tragen müssen; viele Arylthiole mit zusätzlichen Carboxy- oder Amino-Gruppen sind kommerziell erhältlich. Nach Aminofunktionalisierung der silicaverkapselten SERS-Marker wurden Antikörper über heterobifunktionelle Verknüpfungsreagenz an die SERS-Marker gebunden.

Um die neuen SERS-Marker *in situ* zu testen wurde der PSA-Antikörper gewählt, weil er eine hohe Affinität zu seinem Antigen hat und in hohen Konzentrationen im Epithel maligner Prostatazellen exprimiert ist. Er eignet sich daher gut als Testsystem. Erste Versuche zur SERS-Mikroskopie an Gewebeschnitten, die mit den neuen SERS-markierten Antikörpern inkubiert waren, zeigten, dass sowohl die Dual-SAM-SERS-Marker als auch die silicaverkapselten SERS-Marker für biomedizinische Anwendungen eingesetzt werden können.

Im Gegensatz zu den spektral breiten Emissions-Banden molekularer Fluorophore ermöglicht die geringe Linienbreite von Raman-Banden eine simultane Detektion einer Vielzahl von Proteinen mit Immun-SERS-Markern. So ist mit den SERS-Markern in Zukunft eine simultane Detektion von theoretisch bis zu 100 Analyten mit nur einer Laser-Anregungswellenlänge denkbar. Wie in Abb. 60 gezeigt, sollen dann mit einer einzigen Messung die Verteilungen verschiedener Proteine in Gewebeschnitten über Falschfarbenbildern visualisiert werden. Eine Quantifizierung der Proteinkonzentration sollte über die SERS-Intensität ebenfalls möglich sein.

Ein erster Schritt in Richtung Multiplexing erfolgt im Moment durch den Einsatz weiterer Antikörper. Experimente mit Cytokeratin CK 5/6 werden in der Arbeitsgruppe durchgeführt und sollen bald in 2-plex-Experimenten eine Unterscheidung von gesundem und malignem Gewebe erlauben.

Die Nanoanalytik mit SERS-Markern hat eine hervorragende Perspektive sich im



**Abb. 60:** Gleichzeitige Lokalisierung und Quantifizierung vieler verschiedener Proteine mit SERS-markierten Antikörpern in einem einzigen SERS-mikroskopischen Raster-Experiment.

Laufe der nächsten Jahre als alternative Methode zu der gängigen Fluoreszenz-Markierung zu etablieren.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie verschiedene Techniken zur Verstärkung der Raman-Streuung eingesetzt werden können, um selektiv und sensitiv Wirkstoffe zu charakterisieren und Proteine zu lokalisieren.

In Kapitel 3 wurde die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie zur selektiven Verfolgung der Wirkstoff-Substrat-Wechselwirkung zwischen einem Peptidrezeptor und einem Tetrapeptid eingesetzt. Guanidinocarbonyl-basierte Peptidrezeptoren komplexieren äußerst effizient Peptide in polaren Lösungsmitteln. Die Rezeptoren besitzen zwei funktionelle Einheiten: eine Carboxylatbindungsstelle, die CBS (*carboxylate binding site*) zur effizienten Komplexierung von Carboxylaten in wässrigen Lösungen, und einen Tripeptidteil zur Steuerung der Substratselektivität über dessen Aminosäuresequenz. Die Komplexierung von Substraten in Wasser erfolgt dabei über eine Kombination aus Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen.

Der Rezeptor besitzt eine starke elektronische Absorption um 300 nm. Quantenchemische Rechnungen zeigen, dass bei der elektronischen Anregung hauptsächlich Orbitale der CBS-Gruppe beteiligt sind. Es wurden Raman-Spektren einer wässrigen Rezeptorlösung bei unterschiedlichen Laser-Anregungswellenlängen (275 nm, 364 nm und 458 nm) aufgenommen. Bei elektronisch nicht-resonanter Anregung mit 458 nm wird ein Teil des Spektrums von Wasserbeiträgen dominiert. Bei prä-resonanter Anregung mit 364 nm tritt bereits eine selektive Verstärkung des CBS-Chromophors auf. Die Wasserbande trägt deshalb mit deutlich geringerer Intensität zum Gesamtspektrum bei. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Anregungswellenlänge von 275 nm (post-resonant) erhalten. Die selektive Verstärkung ist bei dieser Wellenlänge so stark, dass die Wasserbande im Spektrum nicht mehr zu erkennen ist. So konnte unter Verwendung der 275 nm UV-Linie eines Argonionen-Lasers selektiv der Peptidrezeptor CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> bis zu submillimolaren Konzentrationen Raman-spektroskopisch charakterisiert werden. Die selektive Verstärkung der Schwingungsbanden der CBS-Einheit durch eine UV-Anregung mit 275 nm konnte mit Hilfe einer detaillierten Auswertung der experimentellen Daten bestätigt werden. Anhand einer simultanen Kurvenanpassung

der drei Spektren, die bei nicht-resonanter, prä-resonanter und post-resonanter Anregung aufgenommen wurden, konnte die Verstärkung der CBS im Vergleich zu Phenylalanin im Tripeptid-Teil des Rezeptors gezeigt werden.

In einer Bindungsstudie wurden die spektralen Änderungen des Rezeptors bei der Komplexbildung mit einem Tetrapeptid verfolgt. Die Änderungen zwischen dem Spektrum des reinen Rezeptors und den verschiedenen Mischungen sind beträchtlich. Beim Übergang von einer 1:1- zu einer 1:2-Mischung aus Rezeptor und Substrat traten nur noch geringe spektrale Unterschiede auf. Dies legt nahe, dass der Rezeptor schon in der 1:1-Mischung annähernd komplett das Substrat gebunden hat.

Quantenchemisch berechnete Raman-Spektren der Modellsubstanz CBS-Amid zeigten, dass für eine quantitative Analyse der Resonanz-Raman-Daten Experimente und Berechnungen an weiteren Modellsystemen durchgeführt werden müssen.

In Kapitel 4 wurde gezeigt, wie sich die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) zur ultrasensitiven Detektion von festphasengebundenen Substanzen einsetzen lässt. Typische Anwendungen der Festphasenchemie sind zum Beispiel die Synthese von Nukleinsäuren, Peptiden oder Kohlenhydraten. Sie wird aber auch in der supramolekularen Chemie und in der klinischen Chemie eingesetzt. In der Regel wird dazu ein Harzkügelchen aus quervernetztem Polystyrol verwendet. Eine direkte Analyse der festphasengebundenen Substanzen ist wegen der geringen Beladung und dem großen Überschuss an Harzmaterial meist nicht möglich.

In dieser Arbeit konnte mit der SERS-Mikrospektroskopie auf einem einzelnen Standard-Harzkügelchen mit einer Beladung von ca. 100 pm direkt und markierungsfrei die darauf gebundene Substanz innerhalb weniger Sekunden nachgewiesen werden. Die selektive Verstärkung der auf dem Harz gebundenen Substanz wurde durch aggregierte Silber-Nanopartikel auf der Oberfläche der Harzkügelchen ermöglicht. So konnte auf einem einzigen Harzkügelchen mit einem Durchmesser von 130  $\mu\text{m}$  in wenigen Sekunden das SERS-Spektrum einer Substanzmenge von nur 50 fmol aufgenommen werden.

Ein Vergleich des SERS-Spektrums mit einem konventionellen Raman-Spektrum der untersuchten Substanz in wässriger Lösung belegt die selektive Verstärkung durch die Silber-Nanopartikel. Diese Selektivität resultiert aus der enormen

Abstandsabhängigkeit des SERS-Effekts. Die Polymer-Matrix des Harzes ist zu weit von der Oberfläche der Nanopartikel entfernt, um auch eine Verstärkung zu erfahren.

In einem SERS-mikroskopischen Raster-Experiment an der Oberfläche eines einzelnen Harzpartikels konnte die hohe Reproduzierbarkeit dieser Technik demonstriert werden. Die statistische Auswertung der 36 Einzelspektren ergab eine durchschnittliche relative Standardabweichung von  $< 10\%$ . Dieses Ergebnis ist die Grundlage für den Einsatz der SERS-Technik in der kombinatorischen Chemie, bei der große Bibliotheken festphasengebundener Substanzen charakterisiert werden müssen. Hier könnte die ultrasensitive SERS-Detektion in Zukunft zum Screening ganzer kombinatorischer Bibliotheken eingesetzt werden.

Abschließend wurden in Kapitel 5 SERS-Marker als neues Markierungsreagenz zur Detektion von Biomolekülen vorgestellt. SERS-Marker bieten im Vergleich zu bereits bestehenden Markierungsstrategien, wie zum Beispiel der Fluoreszenz, einige entscheidende Vorteile. Ein besonders wichtiger Vorteil ist die einzigartige Multiplexing-Kapazität, die simultane Detektion einer Vielzahl von Biomolekülen in einer einzigen Messung. Die Linienbreite von Raman-Banden ist im Allgemeinen zwei Größenordnungen kleiner als die breiten Emissionsbanden molekularer Fluorophore. Entsprechend kann eine größere Anzahl von unterschiedlichen Markern in einer einzigen Messung erfasst werden. Weiterhin bleiben die SERS-Marker im Gegensatz zu Fluorophoren bei Laserbestrahlung nicht aus, was eine deutlich bessere quantitative Auswertung ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden zwei neue SERS-Marker speziell für die rote bis nah-infrarote Laseranregung entwickelt. Bei beiden Marker-Typen werden die Raman-Signale von selbstorganisierenden Monolagen aus Raman-Markern durch Gold/Silber-Nanoschalen als SERS-Substrat verstärkt.

Die Ausbildung einer selbstorganisierenden Monolage (SAM) hat mehrere Vorteile für die Qualität der SERS-Marker. Eine SAM aus Raman-aktiven Molekülen auf der Oberfläche der Gold/Silber-Nanoschalen bedeutet deren maximal mögliche Bedeckung, was zu einer reproduzierbar hohen Sensitivität führt. Weiterhin verringert sich durch die einheitliche Orientierung der Moleküle in einer SAM die Anzahl der SERS-Banden, da entsprechend der speziellen Auswahlregeln nur einige wenige

Raman-Banden über das Nanopartikel verstärkt werden.

Die Gold/Silber-Nanoschalen wurden in einer Redox-Reaktion von Silber-Nanokugeln als Template mit Goldsäure synthetisiert. Um spektrale Beiträge von störender Autofluoreszenz der Proben bei biomedizinischen Anwendungen zu minimieren, wurde das SERS-Substrat durch gezielte Synthese für eine Anregung mit der roten 633 nm-Linie von HeNe-Lasern optimiert.

Auf Grund der hohen Packungsdichte der Raman-Markermoleküle in einer SAM kann es bei der direkten Konjugation der SERS-Marker an Biomoleküle zu einer sterischen Hinderung kommen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden zwei neue Strategien zur einfacheren Biokonjugation von SERS-Markern entwickelt:

Der erste neue SERS-Marker-Typ wurde mit einer SAM aus Raman-Markern mit zwei unterschiedlich langen Abstandshalter-Gruppen synthetisiert. Aufgrund der großen Abstandsabhängigkeit des SERS-Effekts zeigt eine SAM aus Raman-Markern mit kurzem und langem Abstandshalter auf den Nanopartikeln das gleiche charakteristische SERS-Spektrum. Die unterschiedliche Länge der Moleküle wird über eine Amidbindung mit Monoethylenglykol (MEG)- bzw. Triethylenglykol (TEG)-Einheiten erreicht. Über das Verhältnis von kurzem zu langem Abstandshalter kann die sterische Hinderung der Bindungsstellen in der SAM minimiert werden. Der längere Marker (DTNB-TEG-COOH) besitzt eine endständige Säure-Gruppe, an der über eine Aktivierung mit N-Hydroxysulfosuccinimid ein Antikörper gebunden werden kann. Der kürzere Marker (DTNB-MEG-OH) kann keine Biomoleküle binden, erhöht aber durch die Hydroxy-Gruppe die Wasserlöslichkeit der SERS-Marker.

Der zweite SERS-Marker-Typ beruht auf der Silicaverkapselung einer SAM auf den Gold/Silber-Nanoschalen. Die Verkapselung gelang auf zwei unterschiedlichen Wegen.

In der ersten Syntheseroute wurde ein Raman-Marker mit terminaler Trialkoxysilangruppierung als SiO<sub>2</sub>-Vorläufer-Einheit synthetisiert. Nach der Ausbildung einer SAM dieser Raman-Marker auf der Nanopartikeloberfläche und anschließender Hydrolyse der Alkoxysilangruppierungen zu Silanol-Gruppen ist das Nanopartikel vitreophil und kann mit einer nur wenige Nanometer dicken Schicht aus Silica verkapselt werden.

Die zweite Möglichkeit zur Silicaverkapselung SAM-funktionalisierter Nanopartikel erfolgte über eine Polyelektrolytbeschichtung der SERS-Marker. Nach der SAM-Ausbildung mit Raman-Markermolekülen auf den Nanopartikeln besitzen diese wegen der im Raman-Marker enthaltenen Carbonsäure-Gruppe eine negativ geladene Oberfläche. Nach Beschichtung der SAM mit einer positiv geladenen Polymerschicht wurde anschließend das vitreophile Polymer Polyvinylpyrrolidon auf der Oberfläche adsorbiert und mit einer Silicaschicht verkapselt.

Die silicaverkapselten SERS-Marker konnten nach der Oberflächenfunktionalisierung mit Amino-Gruppen über heterobifunktionelle Verknüpfungsreagenzien an Antikörper gekoppelt werden.

Beide SERS-Marker (Dual-SAM-SERS-Marker und silicaverkapselte SERS-Marker) wurden zur immunhistochemischen Lokalisierung des prostataspezifischen Antigens in Prostatagewebeschnitten eingesetzt. Die ersten Versuche zur SERS-Mikroskopie an Gewebeschnitten, die mit den neuen SERS-markierten Antikörpern angefärbt waren, zeigten, dass sowohl die Dual-SAM-SERS-Marker als auch die silicaverkapselten SERS-Marker für biomedizinische Anwendungen eingesetzt werden können.

## 7 Summary

Different techniques have been employed for the selective and sensitive characterization of drug-substrate interactions and for the selective localization of proteins. Resonance Raman spectroscopy was used in chapter 3 to monitor selectively the drug-target interaction between a peptide receptor and its substrate. This class of guanidinio-based peptide receptors form complexes with peptides in polar solvents with high efficiency. The receptors consist of two subunits: a carboxylate-binding site (CBS) for an efficient complexation of carboxylates in aqueous media and a tripeptide part allowing the control of the substrate selectivity by the sequence of its amino acids. The complexation of substrates in water is driven by a combination of hydrogen bonds and electrostatic interactions.

The receptor shows a strong absorbance at 300 nm. According to quantum chemical calculations, the electronic absorption at this wavelength involves mainly orbitals of the CBS moiety. Raman spectra of an aqueous solution of the receptor were recorded at different excitation wavelengths (275 nm, 364 nm and 458 nm). At non-resonant excitation with 458 nm, a part of the spectrum is dominated by contributions of water. At pre-resonant excitation (364 nm) a selective enhancement of the CBS-chromophore modes can be observed. Best results were obtained with an excitation wavelength of 275 nm (post-resonant). The selective enhancement at this particular laser wavelength is so strong that water contributions to the receptor spectrum are negligible. Due to the enormous resonance enhancement at 275 nm the receptor could be characterized at a submillimolar concentration in water.

The selective enhancement of the vibrational modes of the CBS subunit with the 275 nm UV line of the argon-ion laser was also confirmed by a detailed analysis of the experimental data. A simultaneous curve-fitting procedure of the three spectra obtained at non-resonant, pre-resonant, and post-resonant excitation demonstrated the enhancement of the CBS-moiety with respect to phenylalanine from the tripeptide part of the receptor.

The spectral changes of the receptor upon complexation with a tetrapeptide were monitored in a binding study. Substantial changes between the spectrum of the neat receptor solution and the mixtures with substrate were observed. Since only minor spectral differences occur between the 1:1 and the 1:2 mixture, an almost



quantitative binding of the substrate in the equimolar mixture is plausible.

First quantum chemical calculations on the model compound CBS-amide demonstrate that further experiments and calculations for different model compounds are required for a quantitative analysis of the experimental resonance Raman data.

In chapter 4, surface-enhanced Raman scattering (SERS) was employed for the ultra-sensitive detection of solid-phase bound substances. Typical applications of the solid-phase chemistry are for example the synthesis of nucleic acids, peptides, or carbohydrates. This technique is also used in supramolecular chemistry and clinical chemistry. Resin beads from cross-linked polystyrene are usually the matrix. Due to the low picomolar loading and the excess of resin material a direct analysis of the solid-phase bound substances is often not possible.

In this thesis the bound substance on a single standard resin bead with a diameter of 130  $\mu\text{m}$  and a loading of approx. 100 pmol was detected within a few seconds by SERS microspectroscopy. The selective enhancement of the solid-phase bound substance was realized with help of aggregated silver nanoparticles on the surface of the resin. It was possible to detect a total amount of only approx. 50 fmole of the substance on a single resin bead with a diameter of 130  $\mu\text{m}$ .

A comparison of the SERS spectrum with a conventional Raman spectrum of the same substance in aqueous solution confirms the selective enhancement on silver nanoparticles. The selectivity is a result of the enormous distance dependence of the SERS effect. The polymer matrix of the resin is too far from the nanoparticle surface to experience a considerable enhancement.

The high reproducibility of this technique was demonstrated in a SERS mapping experiment. The statistical evaluation of the 36 single spectra resulted in a mean relative standard deviation of  $< 10\%$ . This result is the basis for applications of the SERS technique in combinatorial chemistry where large libraries of solid-phase bound substances have to be characterized. Here the SERS detection could be used for the screening of entire libraries in the future.

In chapter 5 new SERS labels were presented as labeling agents for the detection of biomolecules. In comparison with existing labeling strategies, such as fluorescence, SERS labels offer some distinct advantages. A very important advantage is the

unique multiplexing capacity, i.e. the simultaneous detection of various biomolecules in a single measurement. The line width of Raman bands is generally two orders of magnitude smaller than the broad emission bands from molecular fluorophores. Accordingly, it is possible to distinguish between a higher number of different labels in a single measurement. In contrast to fluorophores, SERS labels do not bleach during the exposure to laser radiation, allowing a better quantitative analysis.

In this work two approaches to new SERS labels for red to near infrared laser excitation were developed. In both types of labels the signal is generated from self-assembled monolayers (SAM) of Raman labels on gold/silver nanoshells as the SERS substrate.

The formation of a SAM has several advantages concerning the quality of the SERS labels. A SAM of Raman-active molecules on the surface of the gold/silver nanoshell is equivalent to the maximum possible coverage with a constantly high and reproducible sensitivity. Furthermore, the uniform orientation of the molecules within the SAM and the SERS selection rules lead to a reduced number of bands in the corresponding SERS spectra, since only few Raman bands are selectively enhanced.

Gold/silver nanoshells were synthesized in a template engaged redox reaction of silver nanospheres with gold acid. The synthesis of this SERS substrate was optimized for an excitation with the 633 nm line of a He-Ne laser to minimize spectral contributions from unwanted autofluorescence of the samples in biomedical applications.

Due to the high density of molecules in the SAM, a direct conjugation of the SERS labels to biomolecules may be hindered sterically. To circumvent this problem two new strategies for SERS labels have been developed:

The first new type of SERS labels was synthesized with a SAM of Raman labels containing hydrophilic spacer groups with different lengths. Due to the strong distance dependence of the SERS effect, a SAM shows the same characteristic SERS spectrum, independently of the length of the spacer groups in the Raman labels. The different lengths were realized through a coupling of monoethylene glycole (MEG) or triethylene glycole (TEG) units via amide bonds to the same Raman

label molecules (DTNB). The stoichiometric ratio between the short and the long spacer allows a minimization of the sterical hinderance of the reactive groups in the SAM. The terminal acid group of the longer SAM compound (DTBN-TEG-COOH) can be activated with N-hydroxysulfosuccinimide for a covalent binding to an antibody. The hydroxy group of the shorter SAM compound (DTNB-MEG-OH) does not bind to biomolecules, but enhances the water solubility of these dual-SAM SERS labels.

The second type of SERS labels includes the silica-encapsulation of a SAM on gold/silver nanoshells. The encapsulation was achieved in two different approaches. For the first approach a Raman label with a terminal trialkoxysilane moiety was synthesized. The formation of a SAM comprising these Raman labels renders the nanoshell vitreophilic and a subsequent encapsulation with only a few nanometers of silica is possible.

The second approach for SAM-functionalized and silica-encapsulated nanoparticles involves a polyelectrolyte coating with subsequent growth of silica on the outer surface. After the formation of a SAM with Raman labels with carboxylic acid groups the nanoshells have a negative surface charge. Then a positive charged polymer coating was adsorbed on the SAM followed by the adsorption of the vitreophilic polymer polyvinylpyrrolidone, that was encapsulated with a layer of silica.

The surface of the silica-encapsulated SERS labels were aminofunctionalized and conjugated to antibodies via heterobifunctional crosslinkers.

With both SERS labels (dual-SAM and silica-encapsulated SERS labels) the prostate-specific antigen as a target protein was localized in prostate tissue sections. The first SERS microscopy experiments with these new SERS-labeled antibodies showed that both the dual-SAM and the silica-encapsulated SERS labels are promising labeling techniques for biomedical applications.

## 8 Publikationen

- In die Dissertation eingegangene Zeitschriftenartikel

B. Küstner, M. Gellner, M. Schütz, F. Schöppler, A. Marx, P. Ströbel, P. Adam, C. Schmuck, S. Schlücker, *SERS labels for red laser excitation: silica-encapsulated SAM on tunable gold/silver nanoshells*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 1950 (2009).

M. Gellner, B. Küstner, S. Schlücker, *Optical properties and SERS efficiency of tunable gold/silver nanoshells*, *Vib. Spectrosc.* **50**, 43 (2009).

C. Jehn, B. Küstner, P. Adam, A. Marx, P. Ströbel, C. Schmuck, S. Schlücker, *Water soluble SERS labels comprising a SAM with dual spacers for controlled bioconjugation*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 7499 (2009).

S. K. Srivastava, S. Niebling, B. Küstner, P. Wich, C. Schmuck, S. Schlücker, *Characterization of guanidioniocarbonyl pyrroles by UV Raman spectroscopy and component analysis*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10**, 6770 (2008).

B. Küstner, C. Schmuck, P. Wich, C. Jehn, S. Srivastava, S. Schlücker, *UV resonance Raman spectroscopic monitoring of supramolecular complex formation: peptide recognition in aqueous solution*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 4598 (2007).

C. Schmuck, P. Wich, B. Küstner, W. Kiefer, S. Schlücker, *Direct and label-free detection of solid-phase bound compounds by using surface enhanced Raman scattering (SERS) microspectroscopy*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4786 (2007).

S. Schlücker, B. Küstner, A. Punge, R. Bonfig, A. Marx, P. Ströbel, *Immuno-Raman Microspectroscopy: In-situ Detection of Antigens in Tissue Specimen by Surface-enhanced Raman Scattering*, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 719 (2006).

- **Patente**

Europäische Patentanmeldung, Amtliches Kennzeichen: EP 07 01 8757.0, Anmeldetag: 24. September 2007, Titel: *Compounds and markers for surface-enhanced Raman scattering*; Anmelderin: Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Deutsche Patentanmeldung, Amtliches Kennzeichen: DE 10 2006 000 775.1, Anmeldetag: 4. Januar 2006, Titel: *Bildgebendes Diagnoseverfahren*; Anmelderin: Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

- **Weitere Zeitschriftenartikel**

V. A. Lisinetskii, A. S. Grabtchikov, P. A. Apanasevich, M. Schmitt, B. Küstner, S. Schlücker, V. A. Orlovich, *Continuous-wave solid-state Raman laser for spectroscopic applications*, J. Raman Spectrosc. **37**, 421 (2006).

S. Cîntâ Pînzaru, N. Peica, B. Küstner, S. Schlücker, M. Schmitt, T. Frosch, J. Popp, *FT-Raman and NIR-SERS characterization of the antimalarial drugs chloroquine and mefloquine and their interaction with hematin*, J. Raman Spectrosc. **37**, 326 (2006).

T. Frosch, B. Küstner, S. Schlücker, A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, *In vitro polarization-resolved resonance Raman studies of the interaction of hematin with the antimalarial drug chloroquine*, J. Raman Spectrosc. **35**, 819 (2004).

## Literatur

1. C. V. Raman und K. S. Krishnan, *Nature* **121**, 501 (1928).
2. C. V. Raman und K. S. Krishnan, *Nature* **121**, 711 (1928).
3. C. V. Raman und K. S. Krishnan, *Nature* **122**, 169 (1928).
4. C. V. Raman und K. S. Krishnan, *Nature* **122**, 619 (1928).
5. R. Manoharan, Y. Wang und M. Feld, *Spectrochim. Acta Part A* **52**, 215 (1996).
6. L.-P. Choo-Smith et al., *Biopolymers* **67**, 1 (2002).
7. P. C. A. M. Buijtsels et al., *J. Clin. Microbiol.* **46**, 961 (2008).
8. K. S. K. C. V. Raman, *Nature* **122**, 169 (1928).
9. A. G. Smekal, *Naturwissenschaften* **11**, 873 (1923).
10. H. A. Kramers und W. Heisenberg, *Zeitschrift für Physik* **31**, 681 (1925).
11. E. Schrödinger, *Ann. d. Physik* **81**, 109 (1926).
12. P. A. M. Dirac, *Proc. Roy. Soc. A* **114**, 710 (1927).
13. H. Hamaguchi, *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, Vol. 12*, Kapitel 6. The Resonance Raman Effekt and Depolarization in Vibrational Raman Scattering, Seiten 273–310, Wiley Heyden Ltd., 1985.
14. R. H. Felton, N.-T. Yu, *The Porphyrins, Vol. 3, Physical Chemistry, Part A*, Kapitel 8. Resonance Raman Scattering from Metalloporphyrins and Hemoproteins, Seiten 347–393, Academic Press, New York, 1978.
15. B. Schrader, Herausgeber, *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH, Weinheim, 1995.
16. L. F. Cohen, R. Brown, M. J. T. Milton und W. E. Smith, Herausgeber, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006 (Faraday Discuss. **132**, (2006)).

17. K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao und G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **107**, 668 (2003).
18. C. F. Bohren und D. Huffman, Herausgeber, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, John Wiley, New York, 1983.
19. M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783 (1985).
20. B. J. Kennedy, S. Spaeth, M. Dickey, K. T. Carron, *J. Phys. Chem. B* **103**, 3640 (1999).
21. P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah und R. P. van Duyne, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 601 (2008).
22. B. Lamprecht, A. Leitner und F. R. Aussenegg, *Appl. Phys. B* **68**, 419 (1999).
23. C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, O. Wilson und P. Mulvaney, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 077402 (2002).
24. M. Kerker, *Pure & Appl. Chem.* **56**, 1429 (1984).
25. Xu, Aizpurua, Kall und Apell, *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* **62**, 4318 (2000).
26. H. Xu, *Surface Plasmon Photonics*, VDM Verlag Dr. Müller, Saarbrücken, Germany, 2002.
27. S. M. Nie und S. R. Emery, *Science* **275**, 1102 (1997).
28. K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari und M. Feld, *Phys. Rev. Letters* **78**, 1667 (1997).
29. R. Aroca, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, Wiley, New York, 2006.
30. K. Kneipp, H. Kneipp und M. Moskovits, Herausgeber, *Surface-Enhanced Raman Scattering*, Springer, Heidelberg, 2006.
31. A. Otto, *J. Raman. Spectrosc.* **36**, 497 (2005).
32. J. Creighton, *Surf. Sci.* **124**, 209 (1983).

33. V. Privman, D. V. Goia, J. Park und E. Matijevic, *J. Colloid Interface Sci.* **213**, 36 (1999).
34. D. V. Goia und E. Matijevic, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **146**, 139 (1999).
35. B. Wiley, Y. Sun, B. Mayers und Y. Xia, *Chemistry* **11**, 454 (2005).
36. V. Biju, T. Itoh, A. Anas, A. Sujith und M. Ishikawa, *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2469 (2008).
37. D. V. Goia und E. Matijevic, *New J. Chem.* , 1203 (1998).
38. V. LaMer und R. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847 (1950).
39. J. Park, J. Joo, S. G. Kwon, Y. Jang und T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4630 (2007).
40. R. H. Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996.
41. L. Yezek, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Volume 4*, Kapitel Surfactant Adsorption on Colloids: Studies Using the Electrophoretic Fingerprinting Approach, Seite 6048, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002.
42. V. Kriegisch und C. Lambert, *Top Curr. Chem.* **258**, 257 (2005).
43. F. Schreiber, *Progress in Surf. Sci.* **65**, 151 (2000).
44. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **105**, 1103 (2005).
45. V. Chechlik, R. M. Crooks und J. M. Stirling, *Adv. Mater.* **12**, 1161 (2000).
46. T. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult und W. P. van Bennekom, *Analyst* **122**, 43R (1997).
47. H. Lodish, A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore und J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 1990.



48. C. J. Van Oss, *J. Molec. Recognition* **10**, 203 (1997).
49. E. Liddell und I. Weeks, *Antikörper-Techniken*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
50. W. Chan, D. Maxwell, X. Gao, R. Bailey, M. Han und S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 40 (2002).
51. I. Medintz, H. Uyeda, E. Goldman und H. Mattoussi, *Nature Materials* **4**, 435 (2005).
52. H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **105**, 890 (1993).
53. H.-J. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **32**, 848 (1993).
54. M. W. Pecuh, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **100**, 2479 (2000).
55. H.-J. Böhm und G. Schneider, Herausgeber, *Protein-Ligand Interactions*, WILEY-VCH, Weinheim, 2003.
56. T. Schrader und A. D. Hamilton, Herausgeber, *Functional Synthetic Receptors*, WILEY-VCH, Weinheim, 2005.
57. C. Schmuck, *Coord. Chem. Rev.* **205**, 3053 (2006).
58. C. Schmuck, P. Wich, *Angew. Chem.* **118**, 7383 (2006).
59. C. Schmuck und M. Heil, *Chemistry* **12**, 1339 (2006).
60. C. Schmuck und P. Wich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 4277 (2006).
61. C. S. Wilcox, *Frontiers in Supramolecular Chemistry and Photochemistry*, Seiten 123–144, VCH, Weinheim, 1990.
62. K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macromol.* **39**, 193 (2001).
63. L. Fielding, *Tetrahedron* **56**, 6151 (2000).
64. N. Parthasarathi, C. Hansen, S. Yamaguchi, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3865 (1987).

65. S. Choi, T. G. Spiro, K. C. Langry, K. M. Smith, D. L. Budd, G. N. la Mar, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4345 (1982).
66. S. Choi, T. G. Spiro, K. C. Langry, K. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4337 (1982).
67. S. Choi, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3683 (1983).
68. S. Hu, K. M. Smith, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12638 (1996).
69. T. G. Spiro, *Advances in Protein Chemistry, Vol. 37*, Kapitel Resonance Raman Spectroscopy as a Probe of Heme Protein Structure and Dynamics, Seiten 111–159, Accademic Press, 1985.
70. T. G. Spiro, *Iron Porphyrins, Part II*, Kapitel 3. The Resonance Raman Spectroscopy of Metalloporphyrins and Heme Proteins, Seiten 89–159, Addison-Wesley Publishing Company, 1983.
71. T. G. Spiro, J. D. Stong, P. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 2648 (1979).
72. T. G. Spiro, X.-Y. Li, *Biological Applications of Raman Spectroscopy, Vol. 3, Resonance Raman Spectra of Hemes and Metalloporphyrins*, Kapitel 1. Resonance Raman Spectroscopy of Metalloporphyrins, Seiten 1–37, Wiley, New York, 1988.
73. T. G. Spiro, *Acc. Chem. Res.* **7**, 339 (1974).
74. X.-Y. Li, R. S. Czernuszewicz, J. R. Kincaid, P. Stein, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem.* **94**, 47 (1990).
75. X.-Y. Li, R. S. Czernuszewicz, J. R. Kincaid, Y. O. Su, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem.* **94**, 31 (1990).
76. T. G. Spiro, Herausgeber, *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, Wiley, New York, 1987.
77. S. Song, S. A. Asher, *Biochem.* **30**, 1199 (1991).
78. R. Schweitzer-Stenner, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **5**, 198 (2001).

79. A. V. Mikhonin, S. V. Bykov, N. S. Myshakina und S. A. Asher, *J. Phys. Chem. B.* **110**, 1928 (2006).
80. C.-Y. Huang, G. Balakrishnan und T. G. Spiro, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 277 (2006).
81. G. Balakrishnan, Y. Hu, M. A. Case und T. G. Spiro, *J. Phys. Chem. B* **110**, 19877 (2006).
82. W. Kiefer und H. Bernstein, *Appl. Spectrosc.* **25**, 500 (1971).
83. V. Deckert und W. Kiefer, *Appl. Spectrosc.* **46**, 322 (1992).
84. S. J. A. van Gisbergen, J. G. Snijders und E. J. Baerends, *Chem. Phys. Lett.* **259**, 599 (1996).
85. C. Schmuck, P. Wich, B. Küstner, W. Kiefer und S. Schlücker, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 4786 (2007).
86. J. Tomasi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Cappelli und S. Corni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4**, 5697 (2002).
87. J. Tomasi, B. Mennucci und R. Cammi, *Chem. Rev.* **105**, 2999 (2005).
88. S. Schlücker, A. Szeghalmi, M. Schmitt, J. Popp und W. Kiefer, *J. Raman Spectrosc.* **34**, 413 (2003).
89. S. Schlücker, C. Liang, K. R. Strehle, J. J. DiGiovanna, K. H. Kraemer und I. W. Levin, *Biopolymers* **82**, 615 (2006).
90. S. Niebling, Raman- und NMR-spektroskopische Charakterisierung von Guanidiniocarbonylpyrrolen in Lösung, Diplomarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg, 2008.
91. N. Srinivasan und J. D. Kilburn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 305 (2004).
92. B. Linton und A. D. Hamilton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 307 (1999).
93. Y. R. de Miguel und J. K. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 417 (1998).

## Literatur

---

94. J. Buchardt, C. B. Schirrdt, C. Krog-Jensen, J. M. Delaissé, N. T. Foged und M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2**, 624 (2000).
95. H. Smith und M. Bradley, *J. Comb. Chem.* **1**, 326 (1999).
96. S. Leon, R. Quarrell und G. Lowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2997 (1998).
97. W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **29**, 155 (1996).
98. H. Wennemers und W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **35**, 6413 (1994).
99. R. L. Affleck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 257 (2001).
100. C. Barnes und S. Balasubramanian, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 346 (2000).
101. A. W. Czarnik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 60 (1997).
102. X. Cheng und J. Hochlowski, *Anal. Chem.* **74**, 2679 (2002).
103. D. B. Kassel, *Chem. Rev.* **101**, 255 (2001).
104. C. Enjalbal, J. Martinez und J. L. Aubagnac, *Mass. Spectrom. Rev.* **19**, 139 (2000).
105. J. Shepherd, T. Gale, K. B. Jensen und J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **12**, 713 (2006).
106. B. D. Larsen, D. H. Christensen, A. Holm, R. Zillmer und O. F. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6247 (1993).
107. J. Hochlowski, D. Whittern, J. Pan und R. Swenson, *Drugs Future* **24**, 539 (1999).
108. B. Yan, H.-U. Gremlich, S. Moss, G. M. Coppola, Q. Sun und L. Liu, *J. Comb. Chem.* **1**, 46 (1999).
109. M. P. Houlne, C. M. Sjostrom, R. H. Uibel, J. A. Kleimeyer und J. M. Harris, *Anal. Chem.* **74**, 4311 (2002).
110. D. E. Pivonka, *J. Comb. Chem.* **2**, 33 (2000).

111. G. S. Mandair, A. E. Russell, G. Aston und M. Bradley, *Mol. Divers.* **8**, 135 (2004).
112. G. S. Mandair, Z. Yu, N. Galaffu, M. Bradley und A. E. Russell, *Appl. Spectrosc.* **58**, 1282 (2004).
113. H. U. Gremlich, *Biotechnol. Bioeng.* **61**, 179 (1998).
114. A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn und W. Akemann, *J. Phys.: Condens. Matter.* **4**, 1143 (1992).
115. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari und M. S. Feld, *Chem. Rev.* **99**, 2957 (1999).
116. Z.-Q. Tian, *J. Raman Spectrosc.* **36**, 466 (2005).
117. K. Kneipp, H. Kneipp und J. Kneipp, *Acc. Chem. Res.* **39**, 443 (2006).
118. C. Schmuck und M. Heil, *Chembiochem* **4**, 1232 (2003).
119. P. C. Lee und D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **86**, 3991 (1982).
120. C. M. Niemeyer und C. A. Mirkin, Herausgeber, *Nanobiotechnology*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
121. C. A. Mirkin und C. M. Niemeyer, Herausgeber, *Nanobiotechnology II*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
122. X.-H. N. Xu, Herausgeber, *New Frontiers in Ultrasensitive Bioanalysis*, Chemical Analysis, Vol. 172, John Wiley & Sons, Hoboken, 2007.
123. C. Kumar, Herausgeber, *Nanomaterials for Medical Diagnosis and Therapy*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
124. K. A. Willets und R. P. V. Duyne, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267 (2007).
125. D. A. Stuart, A. J. Haes, C. R. Yonzon, E. M. Hicks und R. P. V. Duyne, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **152**, 13 (2005).
126. Y. C. Cao, R. Jin und C. A. Mirkin, *Science* **297**, 1536 (2002).

## Literatur

---

127. D. Graham, B. J. Mallinder, D. Whitcombe, N. D. Watson und W. E. Smith, *Anal. Chem.* **74**, 1069 (2002).
128. J. Ni, R. J. Lipert, G. B. Dawson und M. D. Porter, *Anal. Chem.* **69**, 4903 (1999).
129. D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell und M. D. Porter, *Anal. Chem.* **75**, 5936 (2003).
130. J. D. Driskell, K. M. Kwarta, R. J. Lipert, M. D. Porter, J. D. Neill und J. F. Ridpath, *Anal. Chem.* **77**, 6147 (2005).
131. M. D. Porter, R. J. Lipert, L. M. Siperko, G. Wang und R. Narayanan, *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1001 (2008).
132. Y. C. Cao, R. Jin, J.-M. Nam, C. S. Thaxton und C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14676 (2003).
133. W. E. Doering und S. Nie, *Anal. Chem.* **75**, 6171 (2003).
134. B.-H. Jun et al., *J. Comb. Chem.* **9**, 237 (2007).
135. J.-H. Kim et al., *Anal. Chem.* **78**, 6967 (2006).
136. S. Mulvaney, M. Musick, C. Keating und M. Natan, *Langmuir* **19**, 4784 (2003).
137. W. E. Doering, M. E. Piotti, M. J. Natan und R. G. Freeman, *Adv. Materials* **19**, 3100 (2007).
138. X. Su, J. Zhang, L. Sun, T. Koo, S. Chan, N. Sundararajan, M. Yamakawa und A. Berlin, *Nano Lett.* **5**, 49 (2005).
139. C. M. Shachaf et al., *PLoS ONE* **4**, e5206 (2009).
140. C. Jehn, Biofunktionalisierte organische Monolagen auf Gold-Nanoschalen für die Oberflächenverstärkte Raman-Streuung, Diplomarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg, 2008.
141. P. B. Johnson und R. W. Christy, *Phys. Rev. B* **6**, 4370 (1972).

## Literatur

---

142. I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste und L. M. Liz-Marzan, Chem. Mater. **18**, 2465 (2006).
143. W. Stöber, A. Fink und E. Bohn, J. Colloid Interface Sci. **26**, 62 (1968).

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran sind hier Professor Dr. Sebastian Schlücker und Professor Dr. Dr. h.c. Wolfgang Kiefer zu nennen, die mir die Möglichkeit gaben diese Arbeit anzufertigen und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützten. Professor Schlücker danke ich für die überaus faszinierende interdisziplinäre Aufgabenstellungen und die inspirierende wissenschaftliche Arbeitsbedingung. Professor Kiefer sei Dank für die einzigartige Ausstattung der Labore, die alle Freiheiten bei unterschiedlichsten Versuchsaufbauten erlaubte.

Professor Carsten Schmuck und seinen Mitarbeitern, im Besonderen Martin Heil und Peter Wich, danke ich für die Bereitstellung der Rezeptormoleküle, den intensiven Diskussionen und den leckeren Kaffee. Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Bringmann dem Leiter des SFB 630 „Erkennung, Gewinnung und funktionelle Analyse von Infektionskrankheiten“ und allen Beteiligten der einzelnen Forschungsgruppen danke ich für die herzliche Aufnahme in dieses interdisziplinäre Projekt.

Der Würzburger Pathologie danke ich für die Herstellung von Gewebeschnitten, sowie der Interpretation der SERS-mikroskopischen Ergebnisse.

Bei speziellen Fragestellungen fand ich stets offene Büro- und Labortüren in den Arbeitsgruppen von Professor Jürgen Popp in Jena. PD Dr. Michael Schmitt, Katrin Ackermann, Torsten Frosch, Ute Neugebauer und Ute Uhlemann danke ich für die kurzfristig ermöglichten Messungen und Übernachtungsmöglichkeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Postdoktoranden, Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten im gesamten Arbeitskreis für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Besonders möchte ich mich bei den Bio-Nanotech-Spezialisten Carina, Max, Magdalena, Friedrich, Sandra, Jutta, Kristin, Tim, Jessica, Florian, Florian, Annedore und Timo für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Der UV-Raman-Gruppe Sunil, Stephan und Stefanie danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Arbeiten an den Peptidrezeptoren und für die Fortführung dieses Projekts.

Peter, Belinda, Stefanie und Sabine sei Dank für die Lösung der vielen kleinen und



großen Probleme und die harmonische Zusammenarbeit.

Der Elektronik- und Feinmechanik-Werkstatt sowie allen Angestellten am Institut für Physikalische Chemie danke ich für die stets kompetente und freundliche Hilfe. Ein großes Dankeschön geht an Herr Dr. Böhm and Frau Fajarda-Moser von Innovations- und Gründerzentrum Würzburg. Zusammen mit Dr. Andersen vom Servicezentrum Forschung und Innovation der Universität Würzburg standen sie mit Coachings, Diskussionen und Ratschlägen stets zur Seite. Frau Dr. Zwirner-Baier von der Patentabteilung der Universität Würzburg und der Anwaltskanzlei Vossius und Partner danke ich für ihre Beratung und Unterstützung bei den beiden Patentanmeldungen.

Der bei weitem größte Dank gebührt meiner Frau Sandra, auf deren Unterstützung ich jederzeit zählen kann.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

### **Wirkstoff-Substrat-Charakterisierung und Protein-Lokalisierung mittels Raman-Streuung**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

.....

(Bernd Küstner)