

Magnetische Multischalenpartikel für den Transport von siRNA

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie,
Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Stefania Schamber

Mainz, Januar 2015



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dekan:

[REDACTED]

1. Berichterstatter:

[REDACTED]

2. Berichterstatter:

[REDACTED]

Termin der mündlichen Verteidigung: 20.02.2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2011 bis Januar 2015 unter der Betreuung von Herrn [REDACTED] am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 19.01.2015

Stefania Schamber

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines nichtviralen, effizienten Transfektionsmittels mit einer Kern-Schale-Struktur in der Größenordnung bis 100 nm. Dafür werden magnetische, negativ geladene Eisenoxid-Nanopartikel mittels Thermolyse mit einem Durchmesser von 17 nm synthetisiert und in Wasser überführt. Diese Nanopartikel bilden den Kern des Erbgut-Trägers und werden mittels *Layer-by-Layer* – Verfahren (*LbL*) mit geladenen Polymeren, den bioabbaubaren Makromolekülen Poly-L-Lysin und Heparin, beschichtet. Dafür wird zunächst eine geeignete Apparatur aufgebaut. Diese wird zur Herstellung von Kern-Schale-Strukturen mit fünf Polyelektrolytschichten verwendet und liefert Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 58 nm, die bei Abwesenheit von niedermolekularem Salz aggregatfrei sind. Das System wird gegen Salz stabilisiert, indem die letzte Poly-L-Lysin-Schicht mit Polyethylenglycol modifiziert wird. Die so entstandenen Multischalenpartikel zeigen weder im PBS-Puffer noch in humanem Serum Aggregation. Mittels winkelabhängiger dynamischer Lichtstreuung wird die Aggregatbildung kontrolliert, während ζ -Potential-Messungen die Kontrolle der Oberflächenladung erlauben.

Da siRNA auf Grund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrats ebenfalls ein Polyelektrolyt ist, wird sie aggregatfrei auf die positiv geladenen PLL-Nanopartikel aufgetragen. Die eingesetzte siRNA ist farbstoffmarkiert, um eine Detektion *in vitro* zu ermöglichen. Jedoch sind die entstandenen Komplexe mittels Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS) nicht nachweisbar. Auch die Fluoreszenzmarkierung der PEGylierten Außenschale mittels kupferfreier Click-Chemie ist in der FCS nicht sichtbar, sodass eine Fluoreszenzauslöschung der Farbstoffe in den Multischalenpartikeln vermutet wird.

Summary

The present work deals with the development of a non-viral, efficient transfection agent with a core-shell structure and a size below 100 nm. Magnetic, negatively charged iron oxide nanoparticles ($d = 17$ nm) are synthesized via thermal decomposition and transferred into water. They form the core of the gene carrier system and are coated with charged and biodegradable polymers like poly-*L*-lysine and heparin. First, a device is designed for this layer-by-layer assembly. This device is then used to synthesize core-shell structures with five polyelectrolyte layers, which have a hydrodynamic diameter around 58 nm and are aggregation-free in the absence of low-molecular salt. To stabilize the system, the last poly-*L*-lysine layer is modified with polyethylene glycol. The developed multilayer particles show no aggregation in PBS-buffer or human serum. Possible aggregation is monitored by angle-dependent dynamic light scattering, whereas the surface charge is controlled via ζ -potential measurement.

Because of the negatively charged phosphate backbone, siRNA is also a polyelectrolyte. Therefore it is coated onto positive charged PLL-nanoparticles without the occurrence of aggregation. For detection in vitro the siRNA is fluorochrome labeled. However, the resulting complexes cannot be detected via fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Next, the PEGylated outer layer of the synthesized particles is fluorescently labeled by copper-free click chemistry. The corresponding multilayer particles are also not detectable with FCS, therefore possible quenching effects can be assumed.

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
2.	Zielsetzung.....	3
3.	Grundlagen.....	5
3.1	Nanopartikel.....	5
3.2	Eisenoxid-Nanokristalle.....	6
3.2.1	Einleitung.....	6
3.2.2	Synthese von Nanopartikeln.....	6
3.2.3	Magnetismus.....	8
3.2.4	Stabilität kolloidaler Systeme.....	10
3.2.5	Zellaufnahme.....	11
3.2.6	Anwendungen superparamagnetischer Nanopartikel in der Biomedizin.....	13
3.2.7	Magnetofektion als Transfektionsmethode.....	14
3.3	Polyelektrolyte.....	16
3.4	<i>Layer-by-Layer</i> -Verfahren zur Synthese polymerer Mehrschichtpartikel.....	17
3.4.1	Einleitung.....	17
3.4.2	LbL an sphärischen Partikeln.....	17
3.4.3	Polyethylenglykol-Modifikation.....	20
4.	Methoden.....	21
4.1	Einleitung.....	21
4.2	Lichtstreuung.....	22
4.2.1	Statische Lichtstreuung (SLS).....	23
4.2.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	28
4.2.3	Lichtstreuung an Polyelektrolyten.....	31
4.2.4	Topologie.....	31
4.3	Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS) und ζ -Potential.....	32
4.4	Infrarot-Spektroskopie (IR).....	34
4.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	36
4.6	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	37
4.7	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	38
4.8	UV/VIS Spektroskopie.....	40
4.9	Fluoreszenzspektroskopie.....	40

4.10	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	41
4.11	Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	42
4.12	Super Conducting Quantum Interference Device-Magnetometer (SQUID)	44
5.	Ergebnisse und Diskussion	47
5.1	Eisenoxid-Nanopartikel	47
5.1.1	Synthese	47
5.1.2	Charakterisierung	49
5.1.3	Zusammenfassung.....	52
5.2	Ligandentausch.....	54
5.2.1	1-Stufen-Ligandentausch	54
5.2.2	2-Stufen-Ligandentausch	56
5.2.3	Bestimmung des Eisengehalts.....	59
5.2.4	Salzstabilität	60
5.2.5	Zusammenfassung.....	61
5.3	<i>Layer-by-Layer</i> -Verfahren - ein Modellsystem.....	62
5.3.1	Verwendete Polyelektrolyte	62
5.3.2	Aufbau einer <i>Layer-by-Layer</i> -Apparatur	65
5.3.3	Synthese der Fe ₃ O ₄ -PLL-Komplexe in einer Küvette: Bestimmung der <i>LbL</i> - Parameter.....	67
5.3.4	Synthese von Fe ₃ O ₄ -PLL-Komplexen im großen Maßstab	70
5.3.5	Polyhexylsperminacrylamid als Polykation	73
5.3.6	Fünf-Schichten-Komplex Fe ₃ O ₄ -[PLL-Hep] ₂ -PLL	74
5.3.7	Zusammenfassung.....	77
5.4	Stabilisierung durch Vernetzen der Komplexhülle.....	79
5.4.1	Vernetzen mit Glutaraldehyd.....	79
5.4.2	Calciumchlorid zur Heparin-Stabilisierung.....	81
5.4.3	Einführung eines Catechol-Ankers	81
5.4.4	Zusammenfassung.....	83
5.5	Stabilisierung der polymeren Mehrschicht-partikel durch Polyethylenglykol.....	84
5.5.1	Stabilisierung mit <i>Block-co</i> -Polymeren	84
5.5.2	Synthese kammartiger PEG- <i>g</i> -PLL-Polymere	85
5.5.3	Salzstabilität der mit PEG- <i>g</i> -PLL beschichteten Nanopartikel	89
5.5.4	Zusammenfassung.....	92
5.6	Komplexierung von siRNA	93
5.6.1	Analyse der verwendeten siRNA-ATTO565.....	93

5.6.2	siRNA-Komplexierung durch Fe ₃ O ₄ -PLL-Partikeln	95
5.6.3	Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen an Fe ₃ O ₄ -PLL-siRNA.....	96
5.6.4	Zusammenfassung.....	98
5.7	Farbstoffmarkiertes N ₃ -PEG- <i>g</i> -PLL - Polymer	99
5.7.1	Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen an PEG _{3,2} - <i>g</i> _[26] - PLL ₂₇ x 4 DBCO-CR ₁₁₀ und den dazugehörigen Fe ₃ O ₄ -Komplexen.....	101
5.7.2	Mehrfache magnetinduzierte Aufreinigung von Fe ₃ O ₄ -[PEG _{3,2} - <i>g</i> _[26] - PLL ₂₇ x 4 DBCO-CR ₁₁₀]	104
5.7.3	Zusammenfassung.....	106
6.	Zusammenfassung und Ausblick	107
7.	Experimenteller Teil	111
7.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	111
7.2	Mess- und Analysemethoden.....	113
7.2.1	Lichtstreuung.....	113
7.2.2	LbL-Verfahren.....	114
7.2.3	AFM-Aufnahmen	114
7.2.4	GPC-Messungen	114
7.2.5	NMR-Messungen.....	115
7.2.6	FCS-Messungen	115
7.2.7	IR-Messungen.....	115
7.2.8	UV/VIS-Messungen	115
7.2.9	Zeta-Potential-Messung.....	116
7.3	Synthesevorschriften.....	117
7.3.1	Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart von Ölsäure (OL)	117
7.3.2	Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart von Ölsäure & Trioctylphosphinoxid.....	118
7.3.3	1-Stufen-Ligandentausch zur Partikel-Überführung in wässriger Lösung	119
7.3.4	2-Stufen-Ligandentausch zur Partikel-Überführung in wässriger Lösung	120
7.3.5	Eisenbestimmung mit 1,10-Phenanthrolin	121
7.3.6	<i>Layer-by-Layer</i> -Verfahren	123
7.3.7	Fe ₃ O ₄ -PLL-Komplexe mit Glutaraldehyd vernetzen	124
7.3.8	Titration der Fe ₃ O ₄ -PLL-Heparin-Komplexe mit Calciumchlorid zur Heparin-Stabilisierung.....	124
7.3.9	Poly-L-Lysin-Modifikation mit 3-(3,4-Dihydroxy-phenyl)propionsäure	125
7.3.10	PEG- <i>block</i> -PLL-Polymere	126
7.3.11	Polyethylenglykol- <i>g</i> -Poly-L-Lysin.....	127
7.3.12	Farbstoffmarkierung von N ₃ -PEG _{3,2} - <i>g</i> _[26] -PLL ₂₇ mit DBCO-PEG4-5/6- Carboxyrhodamin 110.....	128

7.3.13 Hybridisierung der siRNA	129
Literatur	131
Abkürzungsverzeichnis	136
Anhang	138

1. Einleitung

Ein großer Teil der biomedizinischen Forschung beschäftigt sich mit der Entwicklung von einfachen, schnellen und gut verträglichen Methoden für die Krebstherapie. Die häufigsten Krebsbehandlungen sind chirurgische Entfernung des Tumors, Bestrahlung und Chemotherapie. Eine Operation ist nur dann erfolgreich, wenn der Primär-Tumor keine Metastasen ausgebildet hat oder diese ebenfalls entfernt werden können. In der Chemotherapie werden Zytostatika verabreicht, die das Zellwachstum bzw. die Zellteilung hemmen. Diese Chemikalien töten jedoch nicht nur Tumorzellen, sondern auch Zellen mit einer hohen Teilungsrate wie zum Beispiel Haarfollikel. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Chemotherapeutika die Tumor-Stammzellen nicht töten und dass sogar eine Medikamenten-Resistenz aufgebaut wird¹. Bestrahlung wird in Kombination mit einer der anderen beiden Behandlungsmethoden eingesetzt. Sie setzt eine genaue Größen- und Lagebestimmung des Tumors voraus, um die Schäden in gesundem Gewebe gering zu halten. Alle drei Methoden der Krebsbehandlung haben starke Nebeneffekte wie Übelkeit, Haarverlust und viele mehr.

Deswegen müssen neue Strategien entwickelt werden, die beispielsweise die Medikamenten-Aufnahme in gesundes Gewebe reduzieren. Die sogenannten *drug-delivery*-Systeme bestehen aus synthetischen Polymeren oder partikulären Trägersystemen kombiniert mit einem therapeutischen Wirkstoff². Die Vorteile dieser Systeme sind vielfältig: Werden kleine Therapeutika an maßgeschneiderte Polymere bzw. synthetische Partikel konjugiert, so erhöht sich ihre Halbwertszeit *in vivo*. Die Nierenausschlussgrenze liegt bei 10 nm, d.h. größere Systeme werden nicht renal aus dem Blut gefiltert. Andererseits entfernt das Retikuloendotheliale System (RES) schnell Partikel in der Größenordnung über 100 nm³. Deswegen ist eine genaue Größeneinstellung des Wirkstoff-Konjugats nötig. Zudem kann durch die Anbringung von Biomolekülen wie Antikörpern ein zielgerichteter Transport ermöglicht werden, wodurch die Medikamentendosis drastisch gesenkt werden kann.

Nicht nur synthetische Therapeutika sind zur Krebstherapie geeignet. Auch das Verabreichen von Nukleinsäuren und damit das Eingreifen auf Erbgut-Ebene kann als Strategie eingesetzt werden. Die sogenannte Transfektion, der Nukleinsäure-Transport

in eukaryotische Zellen, kann in Form von viralen Vektoren mit hoher Effizienz aber auch erheblicher, potentieller Toxizität durchgeführt werden⁴. Neuere chemische Verfahren sind die Komplexbildung aus kationischen Polymeren und DNA⁵ sowie die Calciumphosphat-DNA-Fällung⁶. Diese weisen wiederum eine niedrige Effizienz sowie Spezifität auf. Deswegen werden analog zu den *drug-delivery*-Systemen maßgeschneiderte Transfektionsmittel für den *in vivo*-Einsatz gesucht. Sie sollen die Nukleinsäuren schützen, sie zielgerichtet transportieren und dabei biokompatibel sein, um möglichst geringe Nebenwirkungen zu verursachen. Zudem ist eine Genehmigung durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) nur dann möglich, wenn das System reproduzierbar und in Bezug auf Toxizität und Immunogenität umfangreich charakterisiert ist.

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung eines nichtviralen, effizienten Transfektionsmittels. Dieses soll biokompatibel und bioabbaubar sein sowie eine Größe im Bereich zwischen 10 nm und 100 nm aufweisen.

Dabei soll die Nukleinsäure nicht einfach nur mit einem Polymer komplexiert werden. Vielmehr wird in Anlehnung an Histone im humanen Genom die DNA oder RNA auf ein sphärisches Templat aufgetragen. Dazu soll die *Layer-by-Layer*–Methode (*LbL*) verwendet werden, mit der geladene Polymere auf ein entgegengesetzt geladenes Partikel aufgebracht werden können. Da Nukleinsäuren wegen ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrats ebenfalls Polyelektrolyte sind, können sie zwischen zwei kationische Schichten eingebettet werden. Das *LbL*-Verfahren ist vorteilhaft, da es in wässriger Lösung und ohne toxische Chemikalien durchgeführt werden kann.

Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel, die mittels Thermolyse uniform und reproduzierbar synthetisiert werden können, sollen die Kern-Template bilden. Als Polyelektrolyte werden unter anderem die bioabbaubaren Makromoleküle Poly-*L*-Lysin und Heparin verwendet.

Eine hohe Transfektionseffizienz beruht zum großen Teil auf dem Schutz der Nukleinsäuren gegen entsprechende Nukleasen (DNasen bzw. RNasen). Deswegen soll das Erbgut von mehreren Polyelektrolytschichten umgeben und so sterisch geschützt werden. Der Vorteil dieser Kern-Schale-Architektur ist, dass neben der Nukleinsäure-Therapie gleichzeitig die Verteilung der Partikel im Körper mittels Farbstoffmarkierung sowie magnetisch durch MRT detektiert werden kann. Ein weiterer Vorteil von magnetischen Partikeln ist, dass sie Magnet-induziert zu ihrem Zielort geleitet werden können.

Da die Größe der Multischalenpartikel ausschlaggebend für ihre Bioverteilung ist, muss diese nach jeder Elektrolytschicht mittels winkelabhängiger dynamischer Lichtstreuung analysiert werden, um unkontrollierte Aggregatbildung sicher ausschließen zu können. Darüber hinaus erlaubt eine Messung des ζ -Potentials mittels elektrophoretischer Lichtstreuung die Kontrolle der Oberflächenladung.

3. Grundlagen

3.1 Nanopartikel

Das Wort nano stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Zwerg“. Als Nanopartikel werden im Allgemeinen Materialien mit einer Größe von 1 nm bis 100 nm bezeichnet. Richard Feynman setzte 1959 mit seiner Rede "There's Plenty of Room at the Bottom" den Grundstein für die Nanotechnologie. Er schlug in seinem Vortrag auf der Jahreshauptversammlung der Amerikanischen Physikalischen Gesellschaft die „... Manipulation und Steuerung von Dingen im winzigen Maßstab“ vor⁷. Wegen dem großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis bekommen Oberflächeneigenschaften in der Größenordnung von $1 \cdot 10^{-9}$ bis $1 \cdot 10^{-7}$ m einen signifikanten Einfluss. Neben hoher Reaktivität zeigen Nanomaterialien größenabhängige optische und magnetische Eigenschaften und stellen den Übergang vom Makrokristall zu molekularen Strukturen dar. Zum Beispiel absorbieren Goldnanopartikel (quantum dots) je nach Größe unterschiedliche Wellenlängen des Lichts, da sie diskrete Energiezustände und größenabhängige Bandlücken zwischen LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) und HOMO (*highest occupied molecular orbital*) aufweisen. Eine andere Besonderheit zeigen magnetische Nanopartikel: Sind sie klein genug, so verhalten sie sich wie einzelne Magnete.

Nanopartikel sind von großem Interesse für biomedizinische Anwendungen, da ihre Größe so eingestellt werden kann, dass sie der von Viren (20-450nm) und Proteinen (5-50nm) entspricht. Jedoch ist nicht allein die Größe der Partikel ausschlaggebend für die Zellaufnahme, sondern vielmehr ihre Oberflächeneigenschaften. Um die Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität zu gewährleisten, benötigen besonders anorganische Partikel eine Stabilisierung, zum Beispiel durch die Komplexierung mit synthetischen Polymeren. Magnetische Eisenoxidnanopartikel gehören zu den umfangreich untersuchten Materialien, da sie eine Vielzahl wünschenswerter Eigenschaften aufweisen. Ihre Synthese durch wässrige Fällung ist einfach, schnell und relativ kostengünstig. Die Partikel zeigen ein superparamagnetisches Verhalten mit hoher magnetischer Sättigung und Biokompatibilität⁸, was sie zu idealen Kandidaten für

biomedizinische Anwendungen wie Hyperthermie und Molekültransport macht (siehe Abschnitt 3.2.6).

3.2 Eisenoxid-Nanokristalle

3.2.1 Einleitung

Eisenoxid existiert in sechzehn Modifikationen, die in Oxide, Oxid-Hydroxide oder Hydroxide unterteilt werden⁹. Drei der verbreitetsten eisenhaltigen Mineralien sind Hämatit (α - Fe_2O_3), Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit (γ - Fe_2O_3).

Sie sind ferrimagnetisch und besitzen ein Kristallgitter, das aus einer dichtesten Packung der Sauerstoffionen besteht (fcc oder hcp), welches wiederum partiell mit Fe^{2+} oder Fe^{3+} gefüllt ist. Magnetit kristallisiert zum Beispiel als inverser (II,III)-Spinell. In einer kubisch-dichtesten Packung aus Sauerstoffatomen sind 1/8 der Tetraederlücken durch die Hälfte der Fe^{3+} -Kationen besetzt, während die restlichen Fe^{3+} - und Fe^{2+} -Kationen die Hälfte der vorhandenen Oktaederlücken einnehmen.

3.2.2 Synthese von Nanopartikeln

Eine einfache und kostengünstige Synthese von Fe_3O_4 -Nanopartikeln ist die erstmals von Massart 1981 veröffentlichte¹⁰ Fällung von FeCl_2 und FeCl_3 in wässriger Lösung unter basischen Bedingungen und in Abwesenheit von Sauerstoff. Die Größe, Form und Komposition der Nanokristalle ist abhängig von dem pH Wert, der Temperatur, dem Verhältnis Fe^{2+} zu Fe^{3+} sowie der Ionenstärke der Lösung. Unter geeigneten Bedingungen lassen sich so Größen von 4 nm bis 16 nm einstellen¹¹.

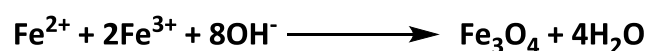


Abbildung 1

Reaktionsgleichung bei der Fällung von FeCl_2 und FeCl_3 in wässriger Lösung unter basischen Bedingungen

Bei Anwesenheit von Sauerstoff findet eine langsame Umwandlung in Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) statt. Deswegen ist eine Stabilisierung mit Polymeren wie Polyacrylsäure, PEG¹², oder Dextran^{13, 14} nötig. Diese Syntheseroute liefert in Wasser dispergierbare Nanopartikel. Diese sind jedoch polydispers und liegen in aller Regel als Agglomerate, bestehend aus einer Anzahl an Eisenoxidkernen, vor¹⁵.

Eine andere, kontrollierte Möglichkeit ist die Thermolyse von Organometallen in hochsiedenden Lösungsmitteln in Gegenwart verschiedener Stabilisatoren. Diese Methode trennt beim Kristallisationsprozess die Keimbildung von der Reifung und liefert so monodisperse Eisenoxidkristalle. Als Ausgangsstoffe können Eisencarbonyl¹⁶, Eisenacetylacetonate¹⁷ und Eisen-Fettsäuresalze^{18, 19} dienen. Ölsäure und andere Fettsäuren, sowie Oleylamin und andere aliphatische Amine werden als Tenside verwendet. Um die Produkteigenschaften zu kontrollieren, müssen das Verhältnis von Ausgangsstoff zu Tensid und zu Lösungsmittel, die Temperatur, die Dauer sowie die Heizrate genauestens eingestellt werden. Nicht nur kugelförmige Partikel sondern auch Nanoquader sind über die Thermolyse von z.B. Eisen(III)acetylacetonat in Gegenwart von 1,2-Hexadecandiol, Ölsäure und Oleylamin in Diphenylether zugänglich¹⁷.

Eine der ersten Thermolyse-Synthesen beginnt mit der Bildung von Eisenoleat-Komplexen aus Eisencarbonyl, die anschließend bei 300°C in Octylether erhitzt werden. Die monodispersen 4 bis 16 nm großen Nanokristalle können dann mit Trimethylaminoxid (TMAO) zu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oxidiert werden¹⁶. In 2004 schlugen dann Peng¹⁸, Hyeon¹⁹ und Colvin²⁰ unabhängig voneinander einfache und reproduzierbare Methoden vor, die zur Synthese monodisperser Fe_3O_4 -Nanopartikel ohne Verwendung toxischer Eisencarbonyle herangezogen werden können.

Ein Beispiel ist die Zweistufenreaktion nach Hyeon¹⁶. Sie beginnt mit der Umsetzung von Eisen(III)Chlorid und Natriumoleat zu Eisenoleat mit anschließender Zersetzung in einem hochsiedenden Lösungsmittel wie Octadecen in Gegenwart von Ölsäure. Indem das Verhältnis von Ölsäure zu Eisenoleat sowie die Zersetzungstemperatur variiert wird, kann die Größe der Partikel präzise zwischen 8 nm und 50 nm eingestellt werden. Zudem führt diese Synthese zu einer hohen Ausbeute.

3.2.3 Magnetismus

Magnetische Felder lassen sich in Vakuum durch die magnetische Flussdichte (Induktion) B , die Magnetfeldstärke H und die Permeabilität im Vakuum μ_0 beschreiben²¹:

$$B = \mu_0 H \quad (1)$$

Wird ein Körper in ein homogenes Magnetfeld gebracht, so resultiert im Inneren eine Induktion B_{innen} . Sie setzt sich aus der äußeren Flussdichte und der magnetischen Polarisation J zusammen, die wiederum die Aufnahmefähigkeit des Materials, die Suszeptibilität χ_V , beinhaltet:

$$B_{\text{innen}} = B_{\text{außen}} + J = B_{\text{außen}} + \chi_V B_{\text{außen}} \quad (2)$$

Üblicherweise wird das Verhalten magnetischer Materialien durch die Magnetisierung M beschrieben:

$$M = \chi_V H_{\text{außen}} = \frac{J}{\mu_0} \quad (3)$$

Die Magnetisierung M wiederum ist definiert als das magnetische Moment μ_{mag} pro Volumen:

$$M = \frac{\mu_{\text{mag}}}{V} \quad (4)$$

Für die Suszeptibilität χ_V gilt:

- Diamagnetische Stoffe $\chi_V < 0$
- Paramagnetische Stoffe $\chi_V > 0$
- Ferromagnetische Stoffe $\chi_V \gg 0$

Die atomaren magnetischen Momente diamagnetischer und paramagnetischer Materialien sind in Abwesenheit eines Magnetfelds zufällig verteilt, sodass die resultierende Magnetisierung null ist. Dagegen können in Ferro-, Ferri- oder Antiferromagneten geordnete Domänen beobachtet werden, die durch Domänenwände getrennt sind. Diese *Weisschen* Bereiche enthalten magnetische Momente, die in derselben Richtung gekoppelt sind.

Die magnetostatische Energie steigt proportional mit steigendem Materialvolumen, die Energie der Domänenwände dagegen mit der Oberfläche der Bereiche. Damit kann eine kritische Partikelgröße formuliert werden, bei deren Unterschreitung die Domänenbildung energetisch ungünstig wird. Die Partikel bestehen dann nur noch aus

gleichförmig magnetisierten Domänen und verhalten sich wie kleine Permanentmagnete. Der kritische Radius r_c lässt sich wie folgt berechnen²²:

$$r_c \cong 9 \frac{(AK_u)^{1/2}}{\mu_0 M_S^2} \quad (5)$$

A : Wechselwirkungskonstante
 K_u : Anisotropiekonstante
 M_S : Sättigungs-Magnetisierung

Einzeldomänen-Ferromagnete werden als Superparamagnete bezeichnet, wenn ihr Magnetisierungsvektor frei fluktuiert. Dazu muss die thermische Energie hoch genug sein, um eine Fluktuation zu ermöglichen:

$$K_u V < k_B T \quad (6)$$

V : Volumen
 k_B : Boltzmann-Konstante

Ähnlich wie bei einem Paramagneten tritt bei Superparamagneten keine Magnetisierung in Abwesenheit eines Magnetfelds auf, jedoch erreichen sie im magnetischen Feld eine viel höhere Magnetisierung.

Die Temperatur, bei der die Anisotropie-Energie gleich der thermischen Energie ist, wird als *blocking*-Temperatur T_B bezeichnet. Wird sie unterschritten, so ist ferromagnetisches Verhalten zu beobachten.

Wird ein Ferromagnet einem Magnetfeld ausgesetzt, steigt seine Magnetisierung bis zur Sättigung M_S . Wird das Feld wieder entfernt, bleibt eine gewisse Magnetisierung, die Remanenz M_r , erhalten. Erst bei genügend hoher negativer Feldstärke (Koerzitivfeldstärke H_c) ist das System entmagnetisiert (Abbildung 2 links). Dieses Verhalten wird als Hysteresekurve bezeichnet und bedeutet, dass das Material irreversibel verändert wird. Im Gegensatz dazu wird für Superparamagneten keine Remanenz oder Koerzitivität beobachtet, somit kann die Probe reversibel magnetisiert werden (Abbildung 2 rechts).

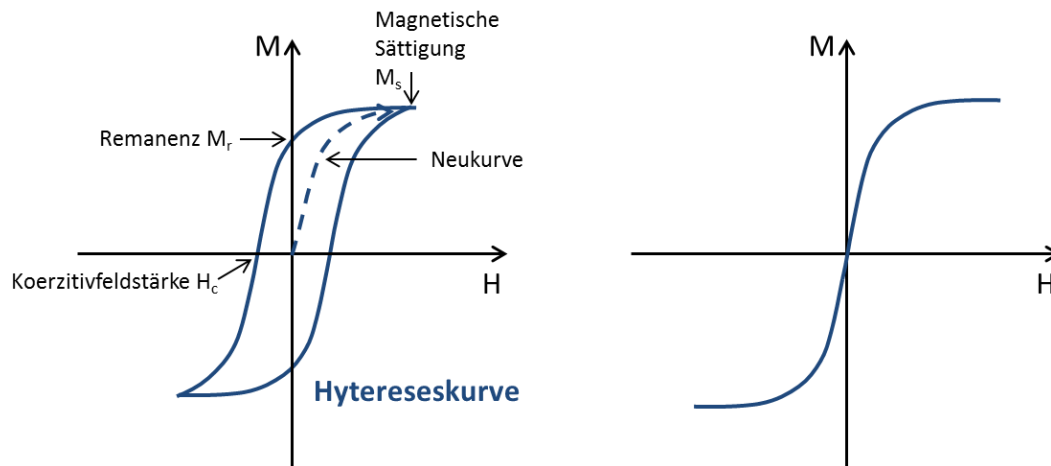
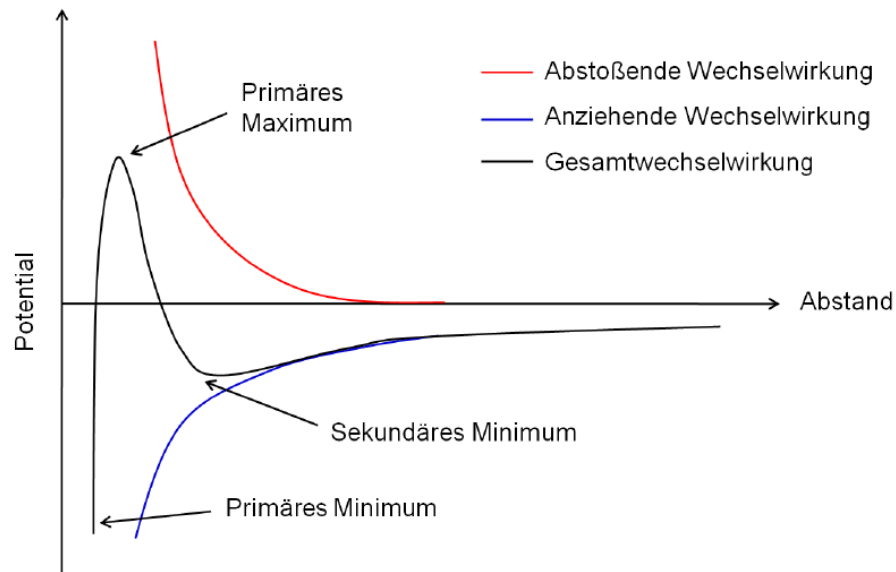


Abbildung 2

Verhalten eines ferromagnetischen (links) und eines superparamagnetischen Systems (rechts) im Magnetfeld.

3.2.4 Stabilität kolloidaler Systeme

Bei Alterung beginnt sich die feste Phase kolloidaler Systeme von der flüssigen Phase zu trennen. Die Triebkraft dahinter ist den thermodynamisch stabilsten Zustand einzunehmen. Mit Hilfe der DLVO-Theorie (Theorie von Derjagin, Landau, Verwey und Overbeek) kann die Stabilität von kolloidal-dispersen Systemen beschrieben werden. Dabei werden die Wechselwirkungen zwischen attraktiven (van-der-Waals) und repulsiven (elektrostatischen) Kräften und das daraus entstehende Gesamtpotential betrachtet (Abbildung 3). Das primäre Maximum stellt eine Energiebarriere dar, die überwunden werden muss, um das System aggregieren zu lassen. Damit ist die Dispersion umso stabiler, je größer das Potential am primären Maximum ist. Sowohl am primären als auch am sekundären Minimum liegen die Partikel koaguliert vor. In dem sekundären Minimum ist die Agglomeration reversibel, im primären Minimum ist sie dagegen auf Grund einer vorliegenden Rekristallisation des Partikelsystems irreversibel.

**Abbildung 3**

Verlauf des Potentials in einem kolloidalen Systems bei Änderung des Abstandes²³

Kolloidstabilisierung kann durch Elektrostatik oder durch sterische Repulsion und Depletion erfolgen. Bei rein elektrostatisch dispergierten Partikeln führt jedoch eine Elektrolytzugabe zur Agglomeration, da die freien Ladungsträger der Stabilisierung durch repulsive Wechselwirkungen entgegen wirken. Zur Einführung einer sterischen Repulsion werden geeignete Liganden oder Polymere an der Oberfläche des Kolloids adsorbiert oder chemisorbiert. Kommt es nun zu einer Annäherung zweier Partikel, so wirken die Polymere wie eine Schutzschicht und verhindern, dass die attraktiven Wechselwirkungen zu einer Zusammenlagerung der Partikel führen. Die kondensierten Polymerketten würden bei Aggregation eine verminderte Mobilität erfahren, was wiederum eine unerwünschte Verringerung der Entropie nach sich ziehen würde.

3.2.5 Zellaufnahme

Proteine und Bakterien sowie synthetische Nanopartikel können nicht durch die Zellmembran diffundieren. Sie werden mit Hilfe eines Vesikelsystems transportiert. Diese Zellaufnahme wird als Endozytose bezeichnet und ist unterteilt in vier Hauptmechanismen: Phagozytose, Clathrin- bzw. Caveolae-vermittelte Zellaufnahme

sowie Makropinozytose. Der allgemeine Vorgang beginnt mit der Interaktion des Partikels mit der Zellmembran. Diese stülpt sich zu einem Vesikel ein, das anschließend abgeschnürt wird. Der weitere Weg und die Modifikation der so entstandenen Endosome sind vom jeweiligen Aufnahmemechanismus abhängig.

In der Humanmedizin bezieht sich der Begriff Phagozytose auf die Aufnahme größerer Partikel durch Phagozyten, den Zellen der Immunabwehr (z.B. Makrophagen). Die phagozytierten Mikroorganismen werden in Vesikeln eingeschlossen, die dann mit den Lysosomen verschmelzen. Der pH-Wert in diesen Phagosom lysosomen wird durch Protonenaufnahme abgesenkt, um die Fremdkörper zu zerstören (Abbildung 4 oben).

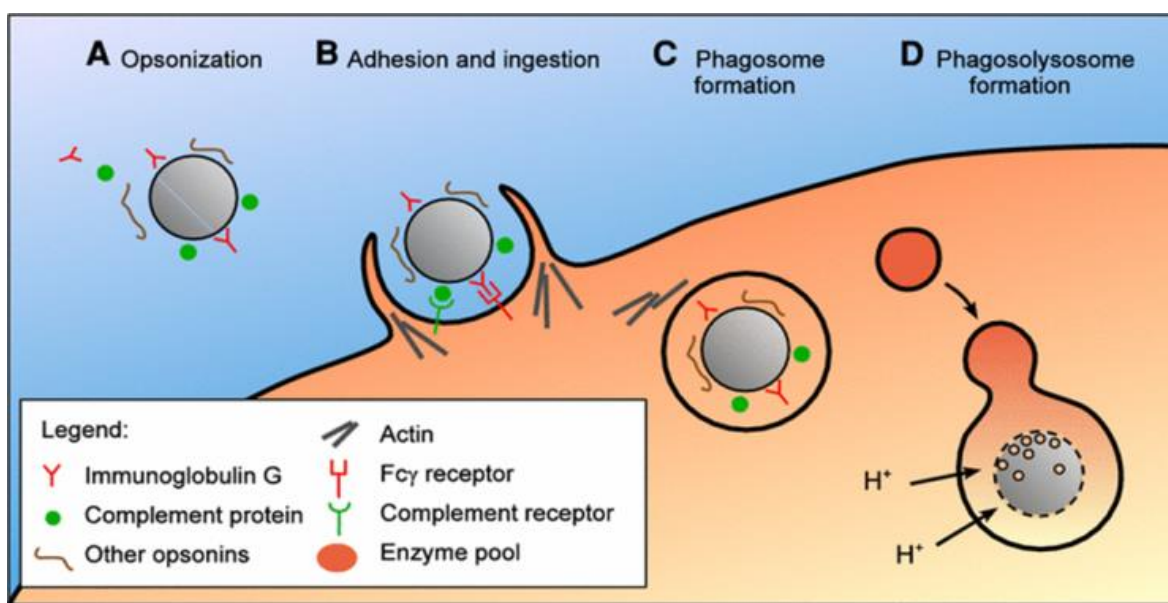


Abbildung 4

Mechanismus der Phagozytose von der Membraneinstülpung bis zur Lysosombildung²⁴

Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose unterscheidet man zwischen der Clathrin- und der Caveolae-vermittelten Aufnahme sowie den Clathrin/Caveolae-unabhängigen Wegen. Erstere kann Partikel mit einer Größe von bis zu 150 nm einschließen, das zweite erlaubt die Endozytose von kleineren (50-80 nm) Partikeln, z.B. LDL.

Als Pino- oder Makropinozytose („Zelltrinken“) wird die Aufnahme von Flüssigkeitsmengen und darin gelösten Substanzen aus dem Umgebungsmedium einer Zelle in ihr Inneres bezeichnet. Der Prozess ist Actin-basiert und nicht selektiv²⁴.

Gelangen die Nanopartikel unspezifisch oder rezeptorvermittelt in die Zelle, so befinden sie sich in einem Vesikel, aus dem sie zerstörungsfrei entkommen müssen. Für Polyelektrolyte wie Polyethylenimin (PEI) wird als „Flucht“-Mechanismus der *proton-sponge*-Effekt vorgeschlagen²⁵. Dieser Effekt wird durch die hohe Pufferkapazität des PEIs erklärt. Die Stickstoff-Atome des Polyelektrolyts liegen bei pH = 7 nicht vollständig protoniert vor. Beim Übergang vom Endosom ins Lysosom werden Protonen in das Vesikel gepumpt, um den pH zu senken. Diese werden jedoch vom PEI absorbiert, woraufhin mehr Protonen nachgepumpt werden müssen, denen weitere Chlorid-Ionen und schließlich H₂O-Moleküle folgen. Damit steigt der osmotische Druck im Lysosom, bis das Vesikel zerstört wird und damit die Partikel frei gesetzt werden. Diese Theorie ist jedoch umstritten - Benjaminsen et al.²⁶ konnte zum Beispiel zeigen, dass PEI keinen Einfluss auf den pH-Wert im Inneren eines Lysosoms hat.

3.2.6 Anwendungen superparamagnetischer Nanopartikel in der Biomedizin

Der große Vorteil von Superparamagneten ist, dass sie sich im externen Magnetfeld orientieren. Nach Entfernung des Magneten bleibt jedoch keine unerwünschte Remanenz zurück. Werden superparamagnetische Partikel intravenös verabreicht und magnetisiert, so kommt es zu einer magnetinduzierten Aggregation. Diese ist reversibel und führt nicht zur Blockierung der Blutgefäße. Zudem haben sich oberflächenmodifizierte Eisenoxid-Nanopartikel als biokompatibel mit einer nur geringen Toxizität erwiesen²⁷. Damit können superparamagnetische Nanopartikel als MRT-Kontrastmittel, bei der Hyperthermie sowie als Gen- bzw. Medikament-Transportmittel verwendet werden. Eisenoxid ist seit 1966 in Amerika unter der Bezeichnung *Feridex I.V.* zur Detektion von Leberschäden zugelassen. Außerdem findet Eisen als *Feraheme* (Ferumoxytol) bei der Behandlung von Eisenmangel-Anämie in Folge chronischer Nierenerkrankungen Verwendung.

3.2.7 Magnetofektion als Transfektionsmethode²⁸

Nukleinsäuren sind die Träger des Erbguts und haben einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Koordination bzw. Regulierung der Zellprozesse. Durch das Einbringen von therapeutischen Nukleinsäuren in lebende Zellen lassen sich diese gezielt beeinflussen. In den letzten vierzig Jahren sind Protokolle zu verschiedenen Zielsetzungen entstanden, zum Beispiel zur Überexpression oder Herunterregulierung eines bestimmten Gens sowie zur tatsächlichen Korrektur eines Gendeffekts.

Die Herausforderungen des Nukleinsäure-Transports in eukaryotischen Zellen, der Transfektion, werden in der Natur in Form von Viren gelöst. In Anlehnung daran bilden modifizierte virale Vektoren Transfektionsmittel mit hoher Effizienz⁴. Da sie aber Nachteile wie hohe Herstellungskosten sowie potentielle Toxizität besitzen, scheinen alternative synthetische Nukleinsäure-Träger für *in vivo* Anwendungen sinnvoll. Chemische Verfahren wie Komplexe aus kationischen Polymeren und DNA⁵, die Calciumphosphat-DNA-Fällung⁶ sowie die liposomale Transfektion (Lipofectamine®)²⁹ weisen wiederum eine niedrige Effizienz und Spezifität auf.

Transfektion ist zunächst ein reiner Diffusionsprozess und damit stark limitiert. Besonders *in vivo* können das Immunsystem und Nukleasen die Aufnahme des Genmaterials in das Zielgewebe verhindern. Somit können zwei wichtige Anforderungen an ein Transfektionsmittel formuliert werden: Schutz der Nukleinsäuren sowie zielgerichteter Transport.

Um die zweite Anforderung zu verwirklichen, bietet es sich an, das Erbgut an magnetische Partikel zu binden. Diese lassen sich anschließend magnetgesteuert an den Zielort führen. Mah et al.³⁰ demonstrierte 2002 zum ersten Mal Magnetofektion *in vitro* und *in vivo*, indem sie virale Vektoren mit magnetische Nanopartikel kombinierten. Schillinger et al. mischte PEI-Nanopartikel in verschiedenen Größen (50, 100 und 200 nm) mit Nukleinsäuren und inkubierten Zellen mit diesen Komplexen auf einer magnetischen Platte. Dabei registrierten sie eine stark erhöhte und beschleunigte Transfektion^{28 19}. Plank et al. wendeten Magnetofektion bei der Therapie von Feline Fibrosarkom (Hautkrebsform bei Katzen) an. Diese Krebsform taucht in der Regel 1 Jahr

nach Tumorentfernung wieder auf, aber nach Behandlung mit *Magnetovax* und einem Magneten stieg die Zahl rückfallfreier Tiere drastisch an³¹. Es konnte somit gezeigt werden, dass Magnetofektion eine wirksame und effiziente Transfektionsmethode ist.

3.3 Polyelektrolyte

Polyelektrolyte (PEL) unterscheiden sich durch ihre kovalent gebundenen ionischen Gruppen fundamental von ungeladenen Polymeren. Werden sie in Lösung gebracht, so dissoziiert je nach Polyelektrolytstärke ein Teil der Gruppen. Die entstandenen Ladungen werden durch Kondensation niedermolekularer Gegenionen kompensiert. Man unterscheidet je nach Ladung zwischen Polykationen und – anionen. Typische funktionelle Gruppen sind hierbei beispielsweise Carbonate ($-\text{COO}^-$), Xanthogenate ($-\text{O}-\text{CSS}^-$), Sulfonate (SO_3^-), Phosphate ($-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$) oder Ammoniumsalze ($-\text{NH}_3^+$).

In der Natur kommen Polyelektrolyte in Form von Proteinen, Polysacchariden sowie Nucleinsäuren wie DNA und RNA vor. Industriell hergestellte Polyelektrolyte finden vielfältige Anwendungen - unter anderem in Reinigungsmitteln, Kosmetikprodukten oder als Ionentauscher.

Weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den gebundenen ionischen Gruppen und den umgebenden Elektrolyten verursachen ein spezifisches Verhalten der Polyelektrolyte. Ihre Eigenschaften hängen somit stark von der zugesetzten Salzkonzentration ab: Mit abnehmender Salzkonzentration nehmen die Polymere eine zunehmend gestreckte Form ein, um die elektrostatische Abstoßung zu minimieren. Durch Zugabe niedermolekularer Elektrolyte werden diese Wechselwirkungen wiederum unterdrückt, sodass PEL wie ungeladene Polymere eine statistische Konformation annehmen. Andererseits können größere Mengen Salz zum „Aussalzen“ führen, d.h. durch eine zu hohe Ladungsabschirmung wird das Polyelektrolyt wasserunlöslich und fällt aus.

3.4 *Layer-by-Layer-Verfahren* zur **Synthese polymerer Mehrschichtpartikel**

3.4.1 **Einleitung**

Polymere Mehrschichtpartikel werden mit der *Layer-by-Layer-Methode (LbL)* synthetisiert, die in den 90er Jahre von Decher an planaren Oberflächen entwickelt wurde^{32, 33}. Das Verfahren basiert auf der alternierenden Adsorption von Polyanionen und – kationen unter rein wässrigen Bedingungen auf ein Templat. Nach jedem Schritt wird die Oberfläche gewaschen, um sie von überschüssigen geladenen Spezies zu befreien. Die dabei entstehenden polyionischen Filme sind preiswert in der Herstellung, flexibel und können eine nahezu unbegrenzte Anzahl an funktionellen Gruppen tragen. Diese Methode beruht einzig auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Polyelektrolyten, sodass es keine Grenzen in Bezug auf Größe und Topologie der Komponenten gibt.

3.4.2 **LbL an sphärischen Partikeln**

Nicht nur planare Oberflächen lassen sich mit Polyelektrolyten beschichten, sondern auch sphärische Templatpartikel, deren Auflösung zur Ausbildung von Mikrokapseln führt. Da die Polymere flexibel sind, kommt es zu einem Durchdringen der gegensätzlich geladenen Ketten und nicht zu einer starren Schichttrennung (Abbildung 5).

Als Polyelektrolyte werden zum Beispiel Polystyrolsulfonat (PSS)³⁴, Polyallylamin (PAH)³⁵, Polyethylenimin (PEI), Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) und Polyacrylsäure (PAA) verwendet. Um bioabbaubare Komplexe herzustellen, werden vermehrt Polyaminosäuren wie Poly-L-Lysin (PLL) und Poly-L-Arginin (PLA) sowie Polysaccharide wie Dextran verwendet. Nukleinsäuren zählen durch ihr negatives Phosphat-Rückgrat ebenfalls zu Polyanionen. Somit können auch DNA und RNA auf der Oberfläche positiv geladener Mehrschichtpartikel komplexiert werden.

Melaminformaldehyd-, Polystyrol-, Latex- und Siliziumdioxid-Partikel in der Größenordnung 0,1 – 5 μm sowie anorganische Nanopartikel aus Calcium-, Mangancarbonat und Eisenoxid finden als Template Verwendung.

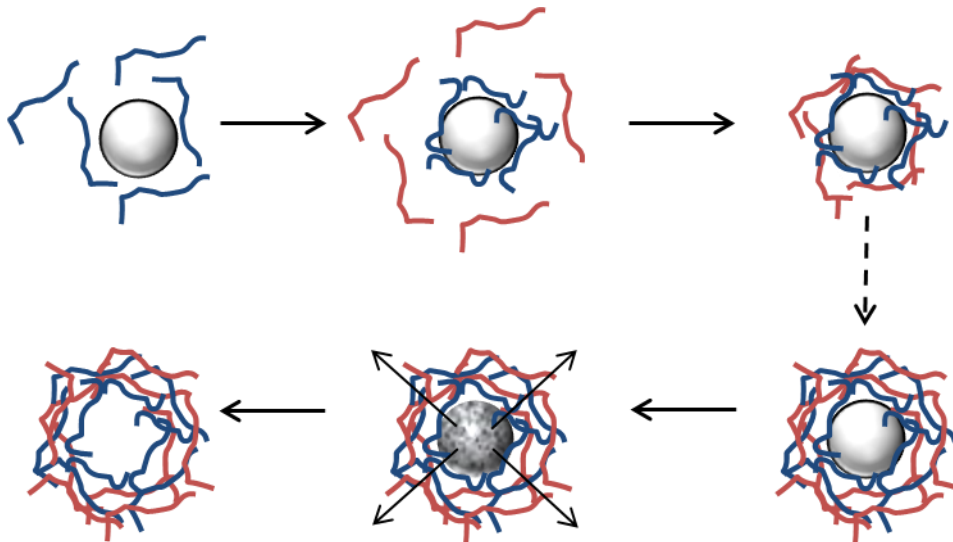


Abbildung 5

LbL-Methode an sphärischen Templatepartikeln zur Synthese von polymeren Mehrschichtpartikeln und hohlen Polyelektrolytkapseln durch alternierenden Zusatz entgegengesetzt geladener Polyionen

Die Eingabe von „Layer-by-Layer AND Polyelectrolyte“ bei Web of Science™ liefert ca. 3.300 Einträge, wobei alleine im Jahr 2014 228 Artikel und 15 Reviews erschienen sind. Dies zeigt, wie aktuell die Forschung an Polyelektrolyt-Multischicht-Komplexen ist. Die nachfolgende Aufzählung zeigt einen kleinen Ausschnitt der Veröffentlichungen, die sich mit *LbL* und Nukleinsäuren beschäftigen:

- Dorris et al. komplexierte abwechselnd DNA und PLL auf 100 nm große Silica-Nanopartikel in bis zu acht Schichten³⁶ (2008).
- Die Gruppe von Reibetanz wendete das LbL-Verfahren auf CaCO_3 -Partikeln ($d = 3 \mu\text{m}$) an, um Plasmide zwischen Dextransulfat- und Protamin-Schichten für den Transport in Zellen zu komplexieren³⁷ (2010).
- Deng et. al publizierten 2013 LbL-Partikel für den Co-Transport von siRNA und Doxorubicin. Dafür verwendeten sie Liposome mit einem Durchmesser von 120 nm, die abwechselnd mit PLA, siRNA und Hyaluronsäure beschichtet wurden.

- Die Gruppe von Frank Caruso beschäftigt sich ausführlich mit der Bildung von LbL-Komplexen und Polyelektrolytkapseln³⁸⁻⁴⁰. 2013 publizierten sie eine elektroforetische Version des *LbL*-Verfahrens. Mit dieser Technik war es ihnen möglich, SiO₂-Partikel mit einem Durchmesser von 35 nm mit PAH/PSS zu beschichten⁴¹
- Auch Eisenoxid-Partikel, hauptsächlich durch Fällung synthetisiert, wurden mit Polyelektrolyten komplexiert, zum Beispiel durch Schwarz et. al⁴².
- 2013 demonstrierten Deng et. al, aus der Gruppe von P. Hammond, das *LbL*-Verfahren an Polystyrol Latex-Nanopartikeln ($d = 120$ nm) mit abwechselnd komplexierten Poly-*L*-Arginin und siRNA.

Soweit ersichtlich, werden alle Multischalenpartikel entweder mittels TEM analysiert oder ihr hydrodynamischer Radius mit einem Zetasizer (Malvern) bei einem Winkel von 90° oder gar bei Rückstreuung (173°-Winkel) bestimmt. Da TEM-Aufnahmen im Trockenen durchgeführt werden, liefern sie keine Aussage über Aggregatbildung. Zudem wird nur ein kleiner Ausschnitt der Probe abgebildet. DLS liefert bei 90° ebenfalls keine genaue Aussage über den mittleren Radius der Probe (siehe Abschnitt 4.2.2), da bei höheren Messwinkeln größere Partikel und Aggregate nicht mehr detektiert werden. Erst eine winkelabhängige Messung mit anschließender Extrapolation von q^2 gegen 0 ergibt $\langle R_h^{-1} \rangle_z^{-1}$.

Schneider und Decher analysierten 20-Schicht-Komplexe auf Goldtemplaten ($d = 13,5$ nm) mit abwechselnd adsorbierten PSS und PAH, wobei sie neben TEM-Aufnahmen die Position des Plasmon-Peaks aufnahmen, um das Aggregationsverhalten zu beobachten (2008)^{43,44}. Dabei stellten sie genaue Bedingungen auf, um vorwiegend einzelne Multischalen-Partikel zu regenerieren. Zum Beispiel soll ein großer Polymerkettenüberschuss gewährleistet sein. Zudem wird die Komplexierung in Abwesenheit von Salz empfohlen, da eine Aggregation bei Salzzugabe beobachtet wurde.

3.4.3 Polyethylenglykol-Modifikation

Negativ geladene Partikel werden nicht in Zellen aufgenommen, da sie abstoßende Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der Zellwände erfahren. Positive Partikel erfahren dagegen eine unspezifische Zellaufnahme. Somit ist keiner der verwendeten Polyelektrolyte geeignet, um als letzte Polymerschicht für den zielgerichteten Zelltransport der Komplexe verwendet zu werden. Es ist nötig, die Mehrschichtpartikel mit einer „Schutzhülle“ zu versehen, zum Beispiel bestehend aus Polyethylenglykol (PEG). PEG wird in der Kosmetik in Cremes und Lotionen sowie in der pharmazeutischen Industrie z.B. beim Tablettieren und als Wirkstoffträger eingesetzt.

Folgende Eigenschaften machen Polyethylenglykol zu einem geeigneten Modifikationsmittel⁴⁵:

- Ungeladen
- Hydrophil
- Hohe Kettenbeweglichkeit
- Sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslich
- Reaktionsträge
- Niedrige Toxizität und Immunogenität
- Relativ zu anderen Polymeren besitzt PEG einen großen hydrodynamischen Radius bei kleiner Molmasse, da die Molmasse der Wiederholungseinheiten mit 44 gmol^{-1} gering ist. Somit ergeben sich beispielsweise bei einer Polymermasse von 5000 gmol^{-1} ca. 110 Wiederholungseinheiten mit $l_{mono} = 0,37 \text{ nm}$

Eine Modifikation mit PEG kann für das System folgende Vorteile bringen:

- Sterische Abschirmung der Ladungen⁴⁶
- Stabilität in Lösungen mit hoher Ionenstärke⁴⁷
- Schutz vor unspezifischer Proteinadsorption^{48, 49}
- Schutz vor Aufnahme und Zerstörung durch das Retikuloendotheliale System (RES)⁵⁰ und damit erhöhte Zirkulationszeit im Blut
- Schutz vor unspezifischer Zellaufnahme⁵¹

4. Methoden

4.1 Einleitung

Makroskopische Proben sowie ihre atomare Molekülebene lassen sich mittels Analysemethoden untersuchen, deren chemische und physikalische Grundlagen hinlänglich bekannt sind. Inspiriert von der Natur (DNA, Proteine, Zellen...) steigt die Entwicklung neuer Materialien im „Zwischenbereich“, 1-1000 nm, sodass analytische Methoden zur Untersuchung der Struktur und Eigenschaften dieser Größenordnung von steigendem Interesse sind.

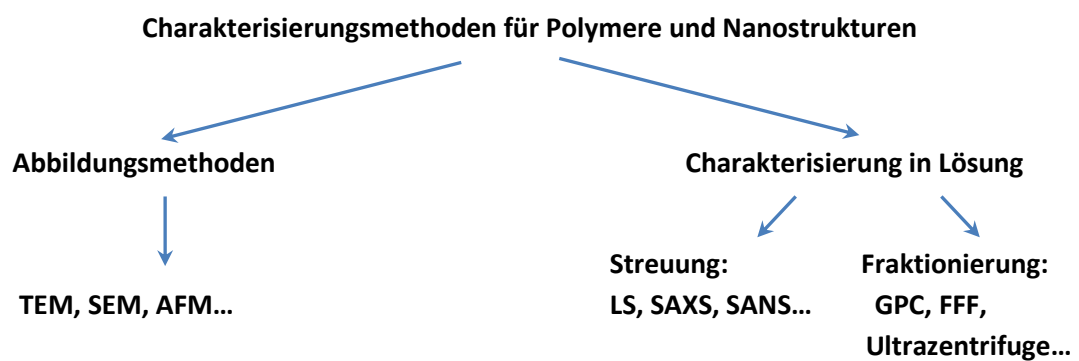


Abbildung 6

Analytische Methoden zur Charakterisierung von Polymeren und Strukturen im Nanometer-Bereich

Bildgebende Methoden wie Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) liefern direkte Strukturabbildungen, können aber durch Artefakte bei der Präparation verfälscht werden (z.B. Trocknen der Probe). Die Charakterisierung in Lösung bietet hingegen den Vorteil, dass die ungestörte Probenstruktur untersucht wird, wobei man eine gute Statistik erhält. Zudem können Partikel mit einer Größe von wenigen Nanometern z.B. mittels Lichtstreuung analysiert werden. Die Nachteile dieser Methoden liegen in der oft komplizierten Datenanalyse und den nicht immer eindeutig zu interpretierenden Ergebnissen. Um Nanostrukturen genau charakterisieren zu können, ist daher eine Kombination mehrerer Methoden nötig.

4.2 Lichtstreuung^{52, 53}

Streuung an Materie kann nicht nur durch sichtbares Licht, sondern auch durch Neutronen- oder Röntgenstrahlung verursacht werden. Je nach verwendeter Strahlung unterscheidet man zwischen Lichtstreuung (LS), Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS) oder Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS). In Tabelle 1 ist ein Überblick über die Messmethoden inklusive Wellenlängen- und Messwinkelbereich sowie dem jeweiligen Streuzentrum im Atom zu sehen.

Tabelle 1

Drei auf Streuung beruhende Messmethoden im Vergleich

Strahlung	Methode	λ / nm	Messwinkel / °	Streuendes Element
VIS	LS	$400 \leq \lambda \leq 800$	$15 \leq \theta \leq 150$	Oszillierendes Dipol
Neutronen	SANS	$0.5 \leq \lambda \leq 2$	$0.5 \leq \theta \leq 10$	Atomkern
Röntgen	SAXS	$0.07 \leq \lambda \leq 0.15$	$0.2 \leq \theta \leq 10$	Elektronen

In der vorliegenden Arbeit werden die statische (SLS) und dynamische Lichtstreuung (DLS) verwendet. In der SLS wird die Intensität zeitgemittelt detektiert und man erhält Informationen über Molekülmassen, Partikelform und Größenverteilung. Dagegen wird in der dynamischen Lichtstreuung die Zeitabhängigkeit der Intensität bei einem festen Winkel detektiert. Hierbei kann die Verteilung des Diffusionskoeffizienten und daraus die des hydrodynamischen Radius erhalten werden.

4.2.1 Statische Lichtstreuung (SLS)

Streuung an einzelnen Teilchen

Wird Licht auf ein Partikel gestrahlt, so erzeugt das elektromagnetische Strahlungsfeld einen oszillierenden Dipol (Hertzscher Dipol). Dieser Dipol emittiert eine Streustrahlung in alle Raumrichtungen der Streuebene und senkrecht zum oszillierenden Dipolmoment $\vec{m}(t)$ mit der Frequenz des eingestrahnten Lichts (Abbildung 7). Das Dipolmoment kann durch die Polarisierbarkeit α und das elektrische Feld des Primärstrahls $\vec{E}(t)$ beschrieben werden:

$$\vec{m}(t) = \alpha E_0 e^{(i\omega t - \vec{k}x)} \quad (7)$$

mit der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu = \frac{2\pi c}{\lambda}$ und dem Wellenvektor $|\vec{k}| = 2\pi/\lambda$.

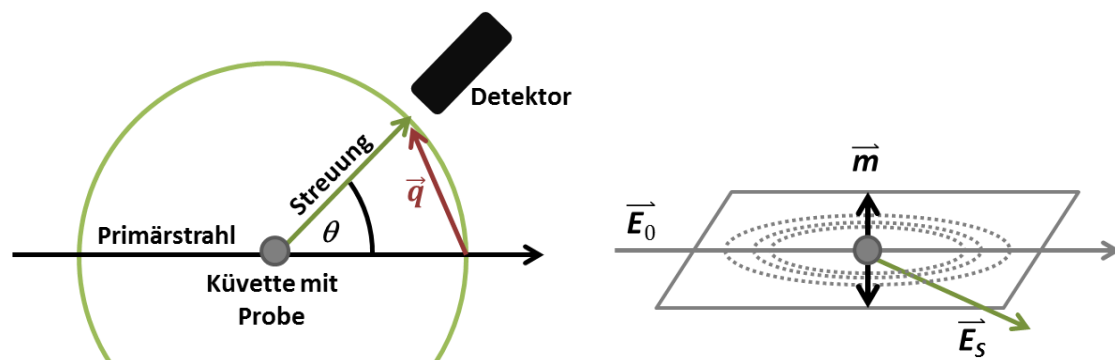


Abbildung 7

Schematischer Aufbau eines Lichtstreuerversuchs mit dem Streuwinkel θ und dem Streuvektor \vec{q} (links), sowie Darstellung eines oszillierenden Dipols bei Anregung mit \vec{E}_0 (rechts)

Im experimentellen Aufbau wird monochromatisches und kohärentes Licht eingesetzt. Typisch sind Gas- und Festkörperlaser mit Wellenlängen zwischen 488 nm und 800 nm. Bei einem Lichtstreuexperiment wird nicht das elektrische Feld, sondern dessen Intensität gemessen, die wie folgt definiert ist:

$$I = \vec{E}_s \cdot \vec{E}_s^* = |E_s^2| \quad (8)$$

mit

$$\vec{E}_s(t) = \left(\frac{\partial^2 \vec{m}}{\partial t^2} \right) \frac{1}{rc^2} \quad (9)$$

ergibt sich die *Rayleigh-Streuung* für N punktförmige Streuzentren:

$$\frac{I_s}{I_0} = N \frac{1}{r^2} \frac{16\pi^4}{\lambda^4} \alpha^2 \quad (10)$$

Streuung in Lösung

Wie oben beschrieben, ist die Polarisierbarkeit der Probe ausschlaggebend für die resultierende Streuung. In Lösung wird die Polarisierbarkeit zum einen durch Dichte- zum anderen durch Konzentrationsfluktuationen verursacht. Partikel, die sehr viel kleiner als die Wellenlänge des Lichts sind ($d < \lambda/20$), können als punktförmige Streuzentren betrachtet werden. Somit hängt die Streuintensität nur von ihrer Streukraft b sowie Konzentrationsfluktuation ab:

$$I \propto b^2 kT \frac{c}{\left(\frac{\partial \pi}{\partial c}\right)_T} \quad (11)$$

mit der *van't Hoff'schen* Gleichung für reale Lösungen:

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = kT \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \right) \quad (12)$$

Die Streukraft b wird auch als Kontrastfaktor K bezeichnet und beinhaltet den Brechungsindex des Lösungsmittels n_0 sowie die Änderung des Brechungsindex durch Konzentrationsänderungen $\left(\frac{dn}{dc}\right)$:

$$b^2 = K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (13)$$

Die Intensität der Lösung ($I_{Lsg.}$) wird experimentell mit einem bekannten Standard (z.B. I_{Tol} für Toluol) und dem jeweiligen Lösungsmittel (I_{LM}) kalibriert, sodass sie nicht vom Volumen oder dem Detektorabstand abhängt. Man erhält das *Rayleigh-Verhältnis* $R(\theta)$:

$$R(\theta) = \frac{I_{Lsg} - I_{LM}}{I_{Tol}} RR_{Tol} \quad (14)$$

Setzt man Gleichung (12) bis (14) in Gl. (11) ein, so erhält man eine fundamentale Formel (15) für die Streuung an kleinen Teilchen. Durch Auftragung von $K \cdot c/R(\theta)$ gegen c lässt sich nun die molekulare Masse M der Probe bestimmen.

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad (15)$$

Bei polydispersen Systemen wird dabei das Gewichtsmittel der Molmasse M_w bestimmt.

Im realen System findet man jedoch keine „Punktstreuer“ sondern eine Vielzahl an Streuzentren, deren Streulicht je nach Phasenverschiebung bei gleicher Frequenz konstruktiv oder destruktiv interferiert.

Um die Winkelabhängigkeit in Streuexperimenten zu betrachten, wird der Streuvektor \vec{q} eingeführt. Er wird aus der Differenz der ausgehenden (\vec{k}) und der ankommenden elektromagnetischen Welle (\vec{k}_0) gebildet.

$$\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}_0 \text{ mit } k = k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (16)+(17)$$

Für den Betrag des Streuvektors erhält man somit (Abbildung 8 links):

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (18)$$

θ : Streuwinkel
 λ_0 : Wellenlänge im Vakuum
 n : Brechungsindex



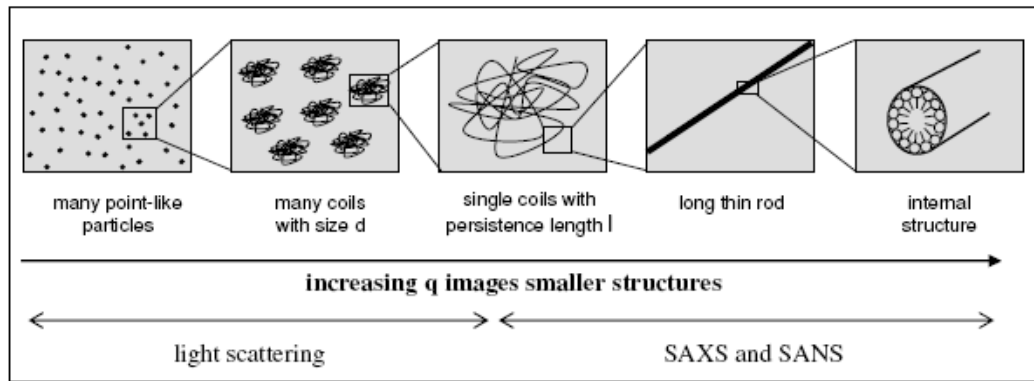
Abbildung 8

Schematische Darstellung des Streuvektors \vec{q} bei der Streuung an einem punktförmigen Streuer (links) und Phasenverschiebung der resultierenden elektromagnetischen Welle \vec{k} bei der Streuung an zwei Streuzentren.

Die Phasenverschiebung bei Streuung an zwei Zentren lässt sich aus dem Streuvektor \vec{q} und dem Abstandsvektor \vec{r} berechnen:

$$\varphi = -\vec{q}\vec{r} \quad (19)$$

Da die Dimension des Streuvektors eine inverse Länge ist, wird dieser auch als „inverse Lupe“ bezeichnet. Werden große Teilchen mit einem dementsprechend großen r betrachtet, so muss q klein gewählt werden, für kleine r -Werte dagegen groß. Eine Anpassung des Streuvektors wird erreicht, indem entweder der Streuwinkel θ oder die Wellenlänge λ variiert wird.

**Abbildung 9**

Je kleiner der zu betrachtende Teil der Probe ist, desto höher muss q gewählt werden⁵³

Handelt es sich bei der Probe um Partikel, die größer als $1/10$ der Wellenlänge sind, so muss die oben beschriebene intramolekulare Interferenz des Streulichts durch Einführung des Formfaktors $P(q)$ berücksichtigt werden. Er wird durch die Summe aller Streuzentren gebildet. Diese kann mittels einer Taylorreihe entwickelt werden, die wiederum für kleine q nach dem 2. Glied abgebrochen werden darf:

$$P(q) = \frac{1}{Z^2} \sum_{i=1}^Z \sum_{j=1}^Z \langle \exp(-iqr_{ij}) \rangle = 1 - \frac{q^2}{3! Z^2} \sum_{i=1}^Z \sum_{j=1}^Z \langle r_{ij}^2 \rangle = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \quad (20)$$

$r_{ij} = r_i - r_j$: Betrag des Abstandsvektors zwischen Streuzentren i und j

Z : Anzahl der Streuzentren

$\langle R_g^2 \rangle_z$: Das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats des Partikels

Unter Berücksichtigung des Formfaktors wird Gleichung (19) zur *Zimm*-Gleichung für streuende Teilchen in der Größenordnung $10 \text{ nm} < r < 50 \text{ nm}$:

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \right) + 2A_2c \quad (21)$$

Die *Zimm*-Gleichung kann zur Darstellung eines Zimmplots verwendet werden, bei dem $K \cdot c / R(\theta)$ gegen $q^2 + kc$ aufgetragen wird ($k = \text{Spreizfaktor}$). Werden $c \rightarrow 0$ und $q \rightarrow 0$ extrapoliert, so kann aus dem Achsenabschnitt das reziproke Gewichtsmittel der Molmasse ermittelt werden. Die Steigung der Extrapolation $q \rightarrow 0$ liefert den 2. Virialkoeffizienten, die Steigung bei $c \rightarrow 0$ das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats.

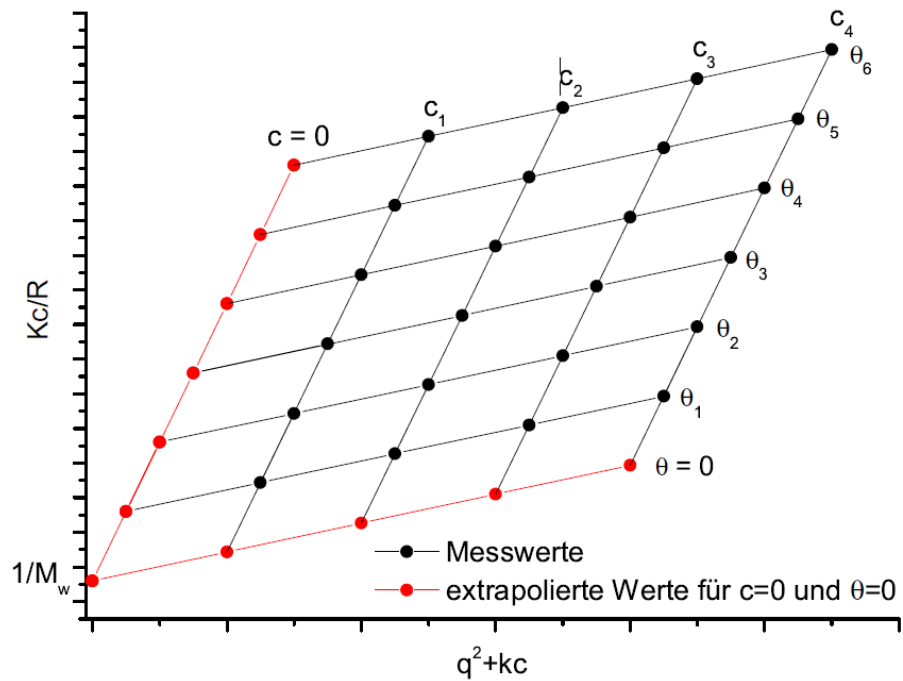


Abbildung 10

Exemplarischer Zimm-Plot: Die Messungen bei verschiedenen Konzentrationen werden extrapoliert (rot), um den Virialkoeffizienten, die reziproke Molmasse und das Trägheitsradienquadrat zu bestimmen⁵⁴

4.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

In der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird nicht der Mittelwert der Intensität, sondern ihre Fluktuation als Funktion der Zeit bei einem festen Winkel gemessen. Die *Brown'sche* Bewegung der Partikel im Streuvolumen hängt von ihrer Größe ab: Kleine Partikel bewegen sich schneller, große langsamer. Somit hängt die Intensität von dem Diffusionskoeffizienten der Probe ab.

Die zeitliche Änderung der Partikelorte wird durch die *van-Hove-Autokorrelationsfunktion* $G_s(\vec{r}, t)$ beschrieben, indem die Fluktuation in Intervalle τ_x unterteilt und diese mit dem Zeitpunkt t verglichen werden. Die Autokorrelationsfunktion lässt sich dann mittels Fouriertransformation in den dynamischen Strukturfaktor F_s im q -Raum umwandeln:

$$G_s(\vec{r}, \tau) = \langle n(\vec{r}, t)n(\vec{r}, t + \tau) \rangle_{V,T} \Leftrightarrow F_s(\vec{q}, \tau) = \int G_s(\vec{r}, \tau) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (22)$$

In stark verdünnten Lösungen kann für $G_s(\vec{r}, t)$ eine Gauß-Funktion aufgestellt werden, wobei die Bewegung der Teilchen durch das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle$ beschrieben wird:

$$G_s(\vec{r}, \tau) = (2\pi/3\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle)^{3/2} e^{-\frac{3r(\tau)^2}{2\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle}} \quad (23)$$

$$\text{Dabei gilt nach Stokes-Einstein: } \langle \Delta R(\tau)^2 \rangle = 6D\tau \quad (24)$$

D entspricht dem *Stokes-Einstein*-Diffusionskoeffizienten und ist proportional zum reziproken hydrodynamischen Radius R_h und der Viskosität η :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (25)$$

Die Analyse der experimentellen Daten erfolgt folgendermaßen (Abbildung 11):

1. Im Experiment wird die Intensität als Funktion der Zeit gemessen $I(t)$
2. $I(t)$ wird mittels eines Korrelators in die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ umgewandelt:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad (26)$$

3. $g_2(\tau)$ wird mit Hilfe der *Siegert-Relation* in $g_1(\tau)$ umgerechnet, um die Korrelationsfunktion des elektrischen Feldes zu erhalten:

$$g_1(\tau) = \sqrt{\frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2}} - 1 = e^{-q^2 D \tau} \quad (27)$$

4. Durch Analyse von $g_1(\tau)$ wird der Diffusionskoeffizient D erhalten

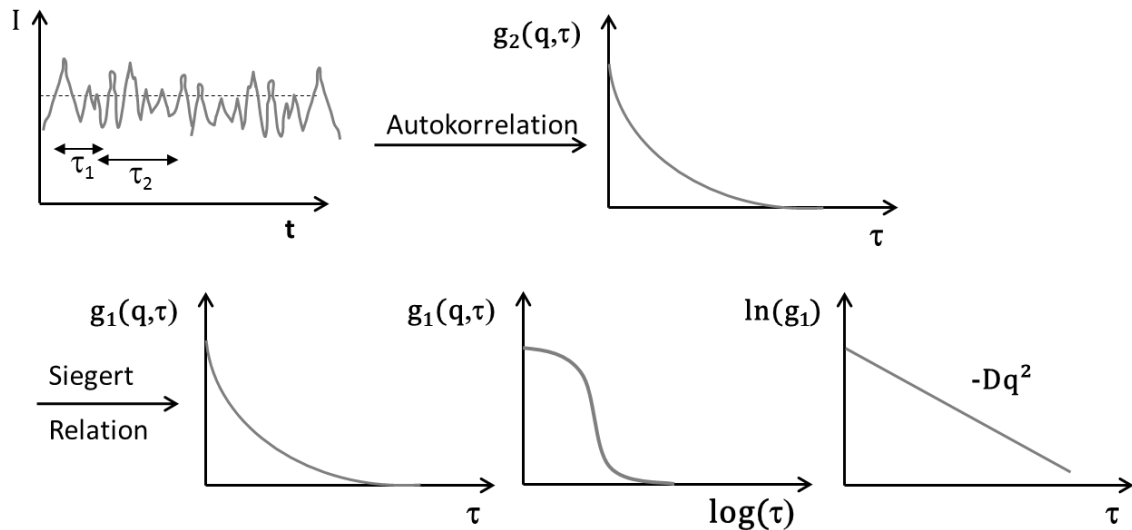


Abbildung 11

Am Beispiel eines einfachen exponentiellen Abfalls (Pseudo-1-Komponentensystem) ist die Datenanalyse der dynamischen Lichtstreuung demonstriert.

Polydisperse Proben

Für polydisperse Proben wird $g_1(\tau)$ durch die Überlagerung mehrerer Exponentialfunktionen gebildet, die mit dem Formfaktor $P(D_i)$ gewichtet werden:

$$g_1(\vec{q}, \tau) = \int P(D_i) e^{-q^2 D_i \tau} \partial D_i \quad (28)$$

Die Entwicklung einer Taylor-Reihe führt zum *Kumulanten-Verfahren*:

$$\ln g_1(\vec{q}, \tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{1}{2!} \kappa_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \kappa_3 \tau^3 + \dots \quad (29)$$

wobei für die ersten beiden Kumulanten κ gilt:

$$\kappa_1 = \langle D \rangle q^2 \quad (30)$$

$$\kappa_2 = (\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2) q^4 \quad (31)$$

κ_1 liefert den Diffusionskoeffizienten und damit den hydrodynamischen Radius. Zudem kann ein Maß für die Polydispersität erhalten werden:

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\kappa_2}{\kappa_1^2}} \quad (32)$$

Für Teilchen größer als 10 nm ist der Diffusionskoeffizient winkelabhängig, sodass aus der Anfangssteigung der Korrelationsfunktion nur apparente Diffusionskoeffizienten je Winkel erhalten werden. Erst bei Extrapolation auf $q^2 \rightarrow 0$ ($P_{q=0} \rightarrow 1$), kann aus dem Achsenabschnitt das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten abgelesen werden:

$$D_{app}(q) = \frac{\sum_i N_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum_i N_i M_i^2 P_i(q)} = \langle D \rangle_z (1 + C \langle R_g \rangle_z q^2 + k_D c) \quad (33)$$

C : dimensionslose Größe, die von der Molekülstruktur & Polydispersität abhängig ist

Um den kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius R_h als inverses z-Mittel zu erhalten, wird die *Stokes-Einstein-Beziehung* (Gl. (34)) und das z-Mittel des Selbstdiffusionskoeffizienten $\langle D \rangle_z$ verwendet:

$$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = \frac{kT}{6\pi\eta \langle D \rangle_z} \quad (35)$$

Aggregationsverhalten

Eine Möglichkeit, das Aggregationsverhalten einer Probe in Lösung zu bestimmen, ist die im Arbeitskreis Schmidt von Dr. Kristin Mohr entwickelte Methode⁵⁵. Dafür werden zuerst die Lösung (z.B. humanes Blutserum) sowie die Probe einzeln mittels DLS vermessen und die jeweiligen Korrelationsfunktionen $g_{1,S}(t)$ bzw. $g_{1,NP}(t)$ bestimmt. Dann wird die Probe in das Serum gegeben und erneut mittels DLS vermessen. Der erste Fit-Versuch der erhaltenen Korrelationsfunktion $g_{1,M}(t)$ ist die Summe beider Fitfunktionen $g_{1,S}(t)$ und $g_{1,NP}(t)$, wobei nur die jeweiligen Amplituden f_i variiert werden. Falls dieser Fit $g_{1,M}(t)$ nicht perfekt beschreibt, so wird eine neue Fitfunktion $g_{1,N}(t)$ aufgestellt. Diese enthält neben $g_{1,S}(t)$ und $g_{1,NP}(t)$ noch einen dritten Term $g_{1,Agg}(t)$, der den Anteil an vorhandenen Aggregaten darstellt.

$$g_{1,N}(t) = f_S g_{1,S}(t) + f_{NP} g_{1,NP}(t) + f_{Agg} g_{1,Agg}(t) \quad (36)$$

4.2.3 Lichtstreuung an Polyelektrolyten

Polyelektrolyte weisen sowohl in Wasser als auch in organischen Lösemitteln langreichweitige Coulomb-Wechselwirkungen auf. Die damit verbundenen abstoßenden Wechselwirkungen zwischen gleichgeladenen Makroionen behindern die isotrope Verteilung der Teilchen in der Küvette. Um die elektrostatischen Wechselwirkungen zu unterdrücken, ist eine Zugabe von niedermolekularem Salz wie NaCl nötig. Dieses schirmt Ladungen ab und ermöglicht die Messung des Trägheitsradius. In der dynamischen Lichtstreuung werden bei Abwesenheit von Salz zwei Phänomene beobachtet: ein *slow mode* und ein *fast mode*. Beim *slow mode* handelt es sich um einen zweiten langsamen Relaxationsprozess, dessen genaue Ursache bislang ungeklärt ist. Der *fast mode* dagegen entsteht durch Wechselwirkungen mit den Gegenionen, deren schnelle Diffusion an die Ketten koppelt und diese beschleunigt. Beide Phänomene verhindern die experimentelle Bestimmung des Diffusionskoeffizienten einzelner Polyelektrolytketten und sie werden erst durch die Zugabe von Salz unterdrückt.

4.2.4 Topologie

Aus der Kombination von DLS und SLS können Auskünfte über die Topologie der untersuchten Probe gewonnen werden, genauer aus dem Quotienten beider Radien:

$$\rho = \frac{R_g}{R_h} = \sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z \langle R_h^{-1} \rangle_z} \quad (37)$$

Tabelle 2

ρ -Verhältnisse verschiedener Partikeltopologien

Struktur	ρ -Verhältnis
Homogene Kugel	0,775
Hohle Kugel	1
Ellipsoid	0,775 - 4
Polymer-Knäul im θ -Lösungsmittel	1,505

4.3 Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS) und ζ -Potential⁵⁶

Der elektrische Zustand einer geladenen Oberfläche wird vereinfacht durch die sogenannte elektrochemische Doppelschicht (EDS) beschrieben. Die innere Schicht besteht aus fixierten Ladungen, während die äußere diffus in der Lösung verteilt ist, aber trotzdem in Kontakt mit der Oberfläche steht. An die diffuse Schicht grenzt die *Gleitschicht*, an der das ζ -Potential gemessen wird. Dieses Potential ist wegen den abschirmenden Ionen kleiner als das eigentliche Oberflächenpotential (Abbildung 12).

Üblicherweise wird die elektrophoretische Mobilität μ_e und damit ζ mittels elektrophoretischer Lichtstreuung (ELS) gemessen. Ähnlich wie in der DLS fluktuieren die Partikel in der Lösung, jedoch handelt sich hierbei um eine elektrophoretische Bewegung. Mobilität und Potential stehen durch die Henry-Formel in Beziehung:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f_1(\kappa a) \quad (38)$$

ε :	Dielektrizitätskonstanten
η	Viskosität
f_1 :	Korrekturfaktor
κ :	Debye-Hückel-Parameter
a :	Abstand zur Oberfläche

Der Korrekturfaktor liegt im Bereich von 1 ($\kappa a = 0$) bis 1,5 ($\kappa a = \infty$), sodass für dicke EDS die Hückel-Gleichung erhalten wird:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \quad (39)$$

Dagegen kann für dünne Doppelschichten die *Smoluchowski*-Gleichung formuliert werden:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (40)$$

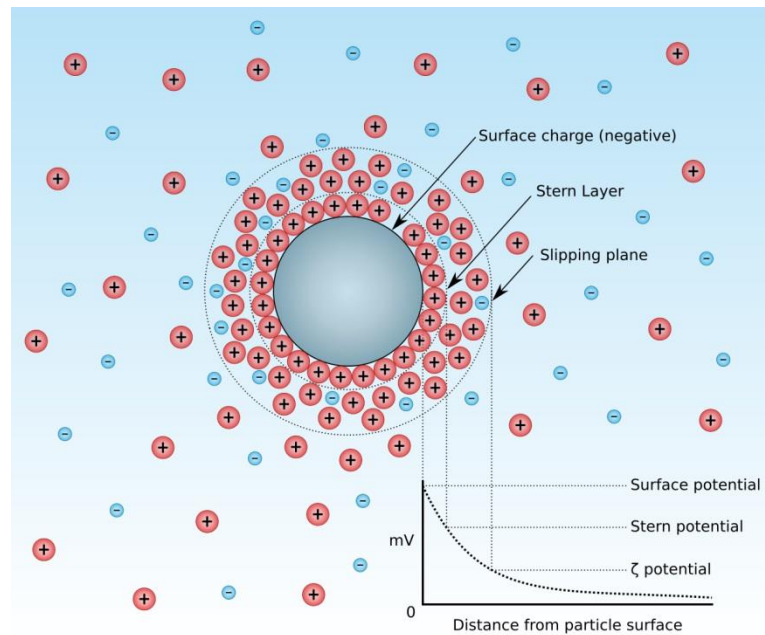


Abbildung 12: Stern-Schicht und Gleit-Schicht der elektrischen Doppelschicht in Kolloid-Lösungen⁵⁷

In der elektrophoretischen Lichtstreuung wird ein Laserstrahl in einen Referenz- und einen Anregungsstrahl aufgespalten. Der Anregungsstrahl durchquert die Probe, an der ein elektrisches Feld anliegt, um eine Bewegung der Nanopartikel zu induzieren. Wird das Licht an einem sich bewegenden Partikel gestreut, so kommt es zu einer Phasenverschiebung, die proportional zu Mobilität μ_e ist.

4.4 Infrarot-Spektroskopie (IR)⁵⁸

Die Infrarot-Spektroskopie basiert auf der Absorption von elektromagnetischen Wellen im infraroten Spektralbereich ($10.000 - 10 \text{ cm}^{-1}$) und der daraus resultierenden Anregung von Molekülschwingungen. Die von den Molekülen absorbierte Anregungsenergie ist von den enthaltenen Atomen sowie von deren Bindungsstärke zueinander abhängig und kann deshalb zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung einer Probe genutzt werden. Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur zunächst im Grundschwingungszustand $\nu = 0$ und können in höhere Schwingungsniveaus angeregt werden. Reale Moleküle verhalten sich auf Grund der Repulsion der Atomhüllen disharmonisch und können mit Hilfe des Morse-Potentials beschrieben werden. Die Abstände zwischen den einzelnen Schwingungsniveaus sind dabei nicht äquidistant, sondern nehmen mit steigender Energie ab (Konvergenz), bis sie eine Dissoziationsgrenze erreichen (Abbildung 13).

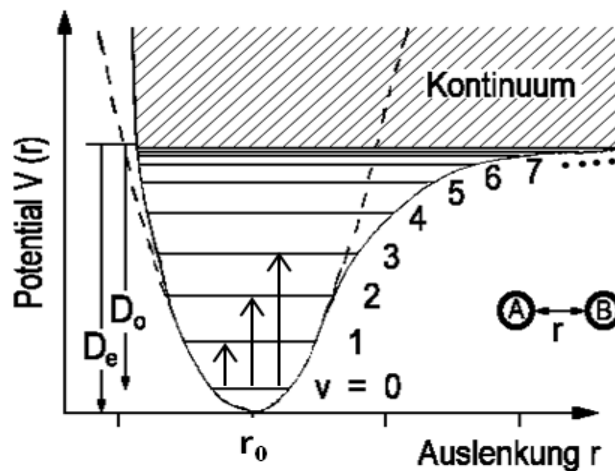


Abbildung 13

Das Morse-Potential eines anharmonischen Oszillators⁵⁴

Normalschwingungen können in Valenz-, d.h. Änderung der Bindungslänge, und Deformationsschwingungen, d.h. Änderung des Bindungswinkels, unterteilt werden. Ihre Zahl kann aus den Schwingungsfreiheitsgraden ermittelt werden, die für ein N -atomiges Molekül wie folgt berechnet werden:

$$3N - 6 \text{ (für nicht lineare Moleküle) bzw. } 3N - 5 \text{ (für lin. Moleküle)} \quad (41)$$

Die Voraussetzung für IR-aktive Schwingungen ist, dass sich dabei das Dipolmoment μ des Moleküls ändert:

$$\frac{d\mu}{dr} \neq 0 \quad (42)$$

Das IR-Spektrum ist kein Linien- sondern ein Bandenspektrum, da ein Schwingungszustand aus mehreren Rotationszuständen besteht, deren Wahrscheinlichkeit wiederum die Form der Banden vorgibt. Im Spektrum wird die Transmission gegen die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ des eingestrahlten Lichts aufgetragen. Diese ist eine reziproke Wellenlänge λ und damit direkt proportional zur absorbierten Energie E .

Eine spezielle Variante der Infrarot-Spektroskopie ist die FT-IR (ATR)-Spektroskopie („Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance“). Die Probe wird auf die Oberfläche eines Reflexionselements, welches Mehrfachreflexionen zulässt (z.B. Prisma oder ATR-Kristall), positioniert. Der fokussierte Infrarotstrahl wird entlang des Elements totalreflektiert (Abbildung 14). Dabei werden alle Molekülschwingungen der Probe auf einmal angeregt, sodass die detektierte Intensität über eine Fouriertransformation von der Zeit- in die Frequenzabhängigkeit transformiert werden muss.

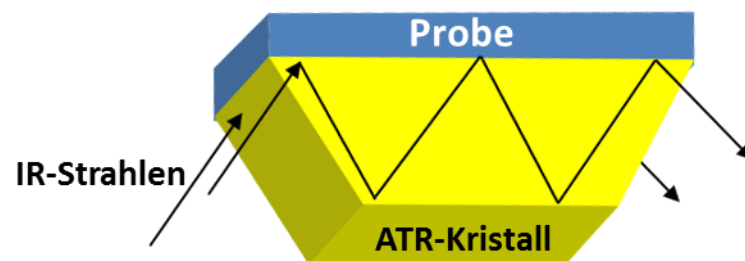


Abbildung 14

Funktionsweise der FT-IR-Spektroskopie mit Totalreflexion der IR-Strahlen innerhalb eines ATR-Kristalls

4.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy, AFM*) ist eine nicht optische Methode, um nicht leitende Oberflächen zu analysieren⁵⁹. Die Probe wird auf einem 3D-Piezoscanner aufgegeben, der sie unter der feinen Spitze eines Federbalkens (Cantilever) bewegt. Durch Änderungen der Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Spitze wird der Cantilever ausgelenkt, was mittels eines auf die Spitze gerichteten Laserstrahls und einer Viersegment-Photodiode detektiert wird. Das Oberflächenbild entsteht aus der rasterförmigen Bewegung des unter Spannung verformbaren Piezokristalls (inverser Piezoeffekt) und aus der Auslenkung des Federbalkens.

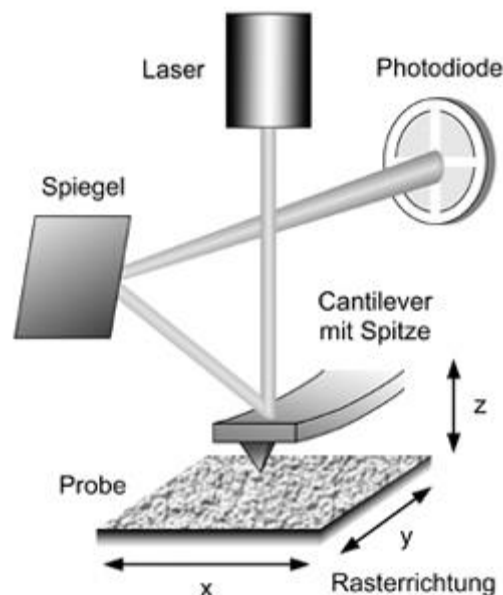


Abbildung 15

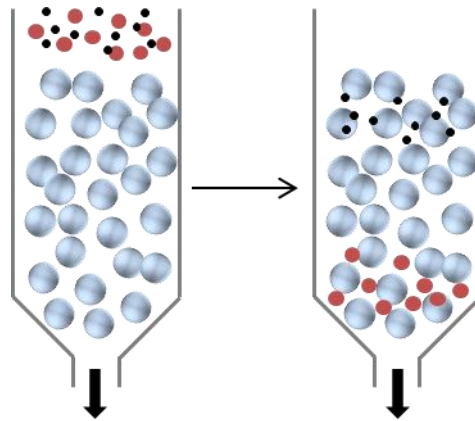
Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops⁶⁰

Eine der Betriebsmodi ist der *contact-mode*, bei der die Spitze im repulsiven Kontakt mit der Probenoberfläche steht. Über die Federbalken-Auslenkung (bei konstantem Abstand zwischen Probe und Oberfläche) bzw. über das z-Signal des Piezokristalls (bei konstanter Cantilever-Kraft auf die Oberfläche) können hierbei topographische Informationen erhalten werden. Allerdings kann die Oberfläche beschädigt werden, sodass dieser Modus nur für die Untersuchung harter Proben geeignet ist. Im *tapping-mode* hingegen lassen sich empfindliche Proben zerstörungsfrei untersuchen. Der Federbalken wird durch ein weiteres Piezoelement zur Oszillation mit konstanter Amplitude nahe seiner

Resonanzfrequenz gebracht, und steht damit nicht mehr im Dauerkontakt mit der Oberfläche. Die Wechselwirkungen der Spitze mit der Probe können zu einer Änderung sowohl der Amplitude als auch der Oszillationsphase führen. So kann aus der Amplitudenänderung eine topographische Karte der Oberfläche erhalten werden, während die Phasenverschiebung Aussagen über die Materialeigenschaften der Probe zulässt. In dieser Arbeit werden alle AFM-Aufnahmen im *tapping-mode* aufgezeichnet.

4.6 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) wird auch als SEC (*size exclusion chromatography*) bezeichnet und ist eine spezielle Form der Flüssigkeitschromatographie. Sie ermöglicht es, durch Größenausschlussprinzip das Molekulargewicht sowie die Verteilung einer polymeren Probe zu bestimmen. Dazu wird das zu untersuchende Material in einem Eluenten gelöst (mobile Phase) und durch eine oder mehrere Säulen mit porösem Füllmaterial (stationäre Phase) eluiert. Das Füllmaterial besteht meist aus hochvernetztem Polystyrol mit definierten Porengrößen. Das hydrodynamische Volumen V_h der Polymere, welches wiederum von ihrer Molmasse abhängt, bestimmt ihre Permeation in die Poren der stationären Phase (Abbildung 16). Partikel, deren V_h größer als die Poren ist, passieren ungehindert die Säule und eluieren zuerst ($k = 0$, obere Ausschlussgrenze). Sehr kleine Moleküle hingegen können in das gesamte Porenvolumen V_p diffundieren und werden nicht mehr aufgetrennt ($k = 1$, untere Ausschlussgrenze). Eine gute Auftrennung erfolgt daher nur bei einem hydrodynamischen Radius der zwischen beiden Ausschlussgrenzen liegt ($k = 0-1$). Die Detektion der Eluate kann zum Beispiel mittels eines UV- oder Brechungsindexdetektors stattfinden. Das Signal des RI-Detektors ist dabei proportional zur Massenkonzentration des Polymers in der Lösung.

**Abbildung 16**

Schematische Darstellung des Trennprinzips einer GPC-Säule (grau = stationäre Phase; rot = große Partikel; schwarz = kleine Partikel)

Die GPC ist keine Absolutmethode, deswegen muss eine Kalibrierung mit engverteilten Standards durchgeführt werden. Voraussetzungen für die Standards sind eine bekannte Molmasse, die durch absolute Messmethoden (z.B. SLS, MALDI) bestimmt wurde, sowie eine chemische und strukturelle Ähnlichkeit mit der Probe. Die Kalibrierungskurve für ein gegebenes Polymer-Lösungsmittel-System wird durch

$$V_e = C_1 - C_2 \cdot \log(M) \quad (43)$$

berechnet.

C_1, C_2 :	Konstanten
V_e :	Elutionsvolumen
M :	Molmasse

4.7 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Atome, die aus einer ungeraden Zahl an Neutronen bzw. Protonen aufgebaut sind, besitzen ein magnetisches Moment (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si ...). Im statischen äußeren Magnetfeld gibt es somit zwei Orientierungsmöglichkeiten und die magnetische Kernspinquantenzahl nimmt unterschiedliche Werte m_i an. Ein elektromagnetisches Feld kann eine Umorientierung der Kernmomentachse erzwingen (Kernresonanz). Diese Energie ΔE hängt von den magnetischen Eigenschaften des Atomkerns ab und ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfelds H_0 :

$$\Delta E = h\nu = \frac{\mu_1 H_0}{i} \quad (44)$$

ΔE :	Energiedifferenz
h :	Planck'sches Wirkungsquantum
μ_1 :	magnetisches Kernmoment
i :	Kernspin

Experimentell wird die gelöste Probe von einer Induktionsspule umgeben, in der ein hochfrequentes Wechselfeld erzeugt wird. Die Feldstärke wird so lange variiert, bis ein Resonanzfall zu beobachten ist. Aus der Stromänderung erhält man dann das Resonanzsignal.

Die Elektronenhülle eines Atoms schirmt den Kern ab, sodass das äußere Magnetfeld in Umgebung des Kerns geschwächt wird (diamagnetische Abschirmung). Damit erscheint das Resonanzsignal bei einer höheren Feldstärke im Vergleich zu einem nicht abgeschirmten Kern. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung bezeichnet, da er von der chemischen Umgebung des Kerns abhängt.

$$H_{eff} = H_0 - \sigma H_0 \quad (45)$$

H_{eff} :	Effektives Magnetfeld
H_0 :	Statisches Magnetfeld
σ :	Magnetische Abschirmung

Aus der Feldstärkedifferenz erhält man die chemische Verschiebung δ , ein vom Magnetfeld unabhängiges Maß. Es handelt sich dabei um eine dimensionslose Größe in der Größenordnung von 10^{-5} - 10^{-7} . Bei der ^1H - bzw. ^{13}C -Spektroskopie wird als innerer Standard meist Tetramethylsilan (TMS) verwendet, da es eine Resonanzfrequenz hat, die von der Konzentration und der chemischen Zusammensetzung der Lösung unabhängig ist.

$$\delta = \frac{H_S - H_i}{H_0} \quad (46)$$

H_S :	Resonanzfeldstärke des Standards
H_i :	Resonanzfeldstärke der Probe i
H_0 :	Statisches Magnetfeld

4.8 UV/VIS Spektroskopie

In der UV/VIS Spektroskopie wird die Absorption von sichtbarem und ultraviolettem Licht beobachtet. Eine notwendige Voraussetzung dafür ist, dass die Energie des eingestrahnten Photons $h\nu$ gleich der Energiedifferenz ΔE der Energieniveaus ist, zwischen denen ein Elektronenübergang stattfindet. Zudem gilt die Auswahlregel, dass der Impuls- bzw. Drehimpuls erhalten bleiben muss.

Ultraviolettes bzw. sichtbares Licht enthält genügend Energie, um π -Elektronen aus bindenden (oder n-Elektronen aus nichtbindenden) in antibindende Molekülorbitale zu überführen und so einen elektronisch angeregten Zustand zu erzeugen. Die energieärmste Anregung erfolgt meist durch Anhebung eines Elektrons vom HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) in das LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*).

Experimentell wird zunächst durch einen Monochromator die zur Messung ausgewählte Wellenlänge im Bereich 190-800 nm selektiert und diese dann sowohl durch die Probe als auch durch eine Vergleichslösung gestrahlt. Die wellenlängenabhängige Absorption A wird anschließend mit einem Photomultiplier detektiert. Sie ist nach dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz für monochromatisches Licht und unter Vernachlässigung von Reflexion und Streuung proportional zur Konzentration des Fluorophors:

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * d \quad (47)$$

ε	Molarer Absorptionskoeffizient
c	Konzentration des Fluorophors
d :	Weglänge des Lichts durch die Probe

4.9 Fluoreszenzspektroskopie

In der Fluoreszenzspektroskopie wird die Emission von Licht nach Anregung durch Photonen beobachtet. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist dabei zu einer höheren Wellenlänge verschoben (Stokes-Verschiebung). Zudem kann es zu einer Abschwächung der Fluoreszenzintensität kommen, der Fluoreszenzauslöschung (*quenching*).

Im Fluorimeter ist der Detektor im 90° Winkel zur Anregungsquelle aufgestellt, um die Anregungsstrahlung λ_{ex} nicht mit zu erfassen. Je nachdem, ob λ_{ex} oder λ_{em} festgehalten wird, wird ein Emissions- oder ein Anregungsspektrum erhalten.

4.10 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)⁶¹

Mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist es möglich, innerhalb kurzer Messzeiten und mit einer geringen Probenkonzentration den Diffusionskoeffizienten einzelner Moleküle zu bestimmen. Dazu wird die Probe mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Aus dem zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals einzelner Moleküle erhält man Informationen über charakteristische Zeiten der beteiligten dynamischen Prozesse. Das Gerät beruht auf dem Prinzip eines inversen konfokalen Mikroskops, bei dem der Laserstrahl in ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur gelenkt und auf die Probe fokussiert wird. Dadurch wird ein sehr kleines Anregungsvolumen in der Größenordnung von $1 \mu\text{m}$ erzeugt. Ist die Probenlösung ausreichend niedrig konzentriert, so diffundieren die Farbstoff-Moleküle im Idealfall einzeln durch das Fokusvolumen. Dabei gilt: Je höhere die Konzentration der Partikel ist, desto niedriger ist die relative Fluktuation. Die Fluktuation $\delta F(t)$ des Messsignals kann beschrieben werden als eine Abhängigkeit von der lokalen Konzentrationsänderung δC und der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon detektiert werden kann. $W(r)$ wird mit einer dreidimensionalen Gauß-Funktion angenähert.

$$\delta F(t) = \int_V W(r) \delta(\eta C(r, t)) dV \quad (48)$$

Analog zur dynamischen Lichtstreuung wird eine normierte Intensitätsautokorrelationsfunktion aufgestellt⁶²:

$$g(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (49)$$

s: Axiales Verhältnis z_0/r_0

Der Diffusionskoeffizient D des fluoreszierenden Partikels lässt sich aus der Diffusionszeit τ_D und r_0 aus vorangegangener Kalibrierung des Detektorvolumens bestimmen.

$$D = \frac{r_0^2}{4\tau_D} \quad (50)$$

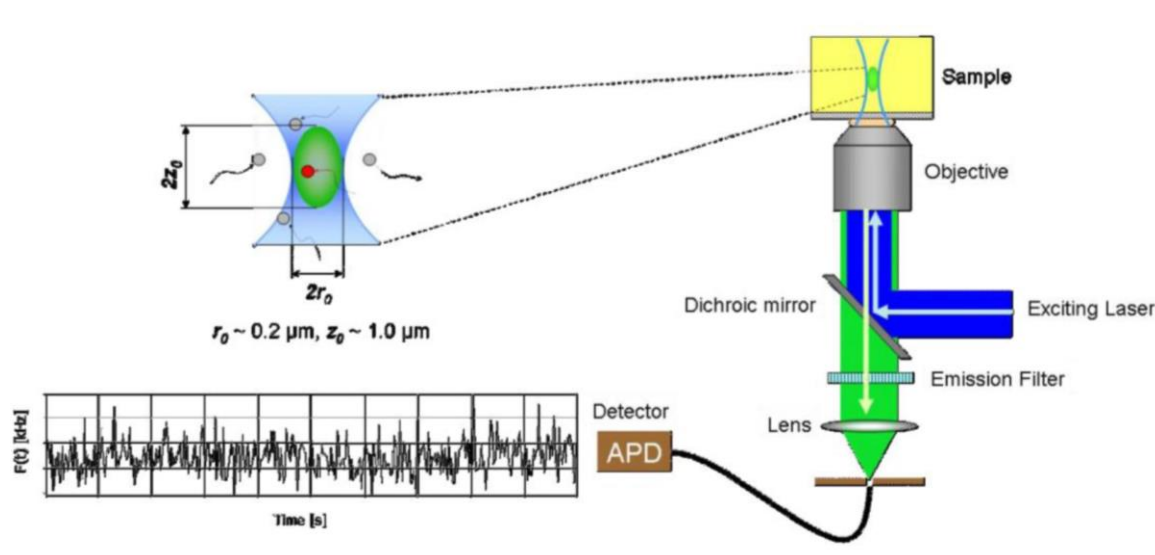


Abbildung 17

Aufbau eines Fluoreszenzkorrelationsspektrometers (rechts), eine schematische Darstellung des ellipsoiden Messvolumens (link oben) und die exemplarische Zeitspur einer Messung (links unten)⁶³

4.11 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Ernst Abbé zeigte bereits 1878, dass die Auflösung optischer Mikroskope durch die Wellenlänge des Lichts limitiert ist⁶⁴, d.h. auch mittels UV-Licht können maximal Größenordnungen von $0,1 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Erst durch die Entdeckung der Welleneigenschaften sich bewegender Elektronen, die de Broglie 1924 theoretisch zeigte und Davison und Germer 1927 bestätigten⁶⁵, änderte sich diese Limitation. Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie erlaubt die kurze Wellenlänge der Elektronen in der Elektronenmikroskopie eine drastische Verbesserung der Auflösung, sodass auch Proben im Nanometer-Bereich abgebildet werden können. Das erste

Elektronenmikroskop wurde 1931 von Max Knoll und Ernst Ruska, Technische Hochschule Berlin, gebaut und publiziert⁶⁶.

Über mehrere magnetische Linsen wird der Elektronenstrahl auf die Probe fokussiert, die z.B. auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Netz fein verteilt ist. Mittels Aperturblenden kann zwischen zwei Betriebsmodi, der Abbildung bzw. dem Beugungsbild, gewechselt werden.

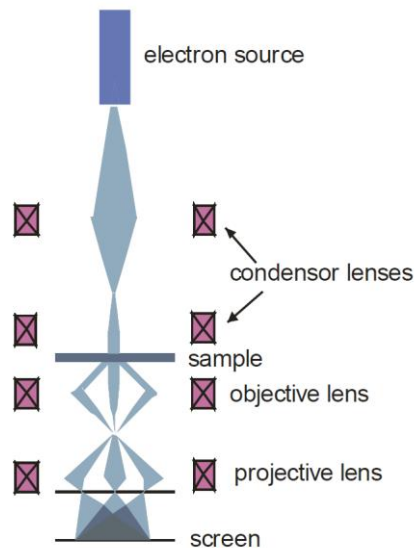


Abbildung 18

Schematische Darstellung des Elektronenstrahls von der Quelle über die Probe bis zum Detektor⁵⁷

Hier ist anzufügen, dass das *Abbé*-Limit der Lichtmikroskopie an fluoreszenzmarkierten Proben mittlerweile umgangen werden konnte. 2014 ging der Nobelpreis für Chemie an Stefan Hell für die Entwicklung des STED-Mikroskops und an Eric Betzig und William Moerner für die Einzelmolekül-Mikroskopie.

4.12 Super Conducting Quantum Interference Device-Magnetometer (SQUID)^{22, 67}

Super-Conducting-Quantum-Interference-Device-(SQUID)-Magnetometer bieten eine hohe Genauigkeit bei der Messung sehr kleiner Magnetfelder bzw. Flussdichten. Das SQUID besteht aus einem supraleitenden Ring, der zwei Isolatorstellen besitzt, die als Josephson-Kontakte bezeichnet werden. Dabei kann eine periodische Abhängigkeit der Spannung $U(\Phi)$ vom magnetischen Flussquant Φ_0 beobachtet werden:

$$\Phi_0 = \frac{h}{2e} = 2,07 * 10^{-17} Tm^2 \quad (51)$$

h : Plancks'ches Wirkungsquantum
 e : Elementarladung

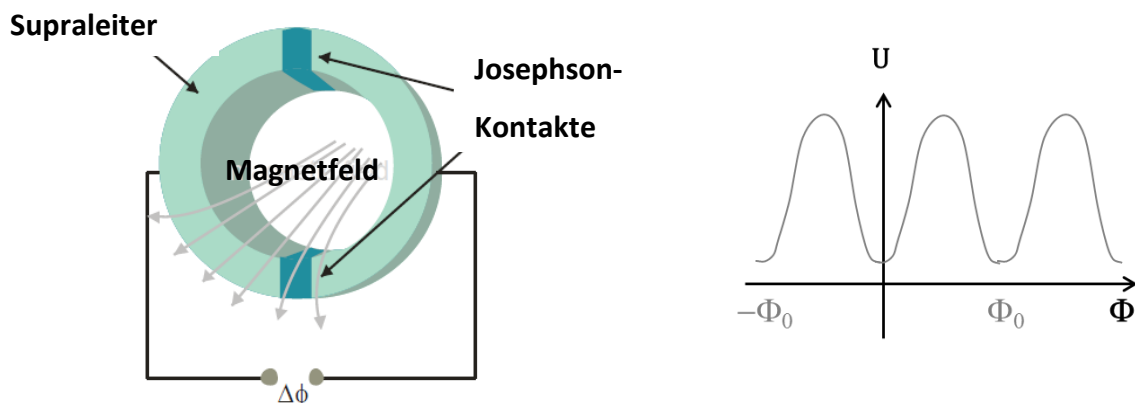


Abbildung 19

Schematische Darstellung eines SQUID (links)⁵⁷ und periodische Abhängigkeit der Spannung U vom magnetischen Flussquant Φ_0 (rechts)

SQUID und Probe sind im Magnetometer räumlich getrennt. Eine Aufnahmespule um die Probe nimmt das magnetische Signal auf und leitet es in das SQUID induktiv ein. Die große Anzahl an Spulenwindungen erhöht dabei die Auflösung.

So kann die Magnetisierung der Probe in Abhängigkeit vom magnetischen Feld gemessen werden, um eine temperaturspezifische Hysteresekurve zu erhalten. Zudem lässt sich durch die Messung der *zero-field-cooled* (ZFC) und *field-cooled* (FC) Magnetisierung die *blocking*-Temperatur ermitteln. Im ZFC-Verfahren wird die Probe zunächst in Abwesenheit eines Magnetfelds auf $T = 5 K$ gekühlt. Dann wird ein

Magnetfeld angelegt und die Probe langsam erwärmt, während gleichzeitig die Magnetisierung erfasst wird. Anschließend folgt der FC-Prozess, bei dem die Probe in Anwesenheit des Magnetfeldes wieder langsam abgekühlt wird. Dabei wird die *blocking*-Temperatur erreicht, bei der das Kriterium $M_{FC} - M_{ZFC} \neq 0$ erfüllt ist, d.h. bei der die zwei Magnetisierungskurven voneinander abzweigen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Eisenoxid-Nanopartikel

5.1.1 Synthese

Der erste Schritt zur Entwicklung eines partikulären Transfektionsmittels ist die Synthese eines geeigneten Templats für das spätere *Layer-by-Layer*-Verfahren. Die Eisenoxid-Nanopartikel sollen dabei reproduzierbar synthetisiert werden und eine enge Größenverteilung besitzen, damit nach jeder Schichtbildung die Radiusänderung mittels dynamischer Lichtstreuung genau detektiert werden kann.

Eine geeignete Methode zur Synthese magnetischer Eisenoxid-Nanokristalle, die den gestellten Anforderungen genügen, ist 2004 von Hyeon et al.¹⁹ publiziert worden. Dabei wird aus Eisen(III)chlorid und Natriumoleat in einer Mischung aus Hexan, Ethanol und Wasser die Vorstufe Eisenoleat hergestellt. Dieses wird zusammen mit Ölsäure in 1-Octadecen gelöst und mit einer konstanten Heizrate bis zum Sieden erhitzt. Nach weiteren dreißig Minuten bei 315°C können monodisperse Fe₃O₄-Nanopartikel isoliert werden (Vergl. Kapitel 7.3.1).

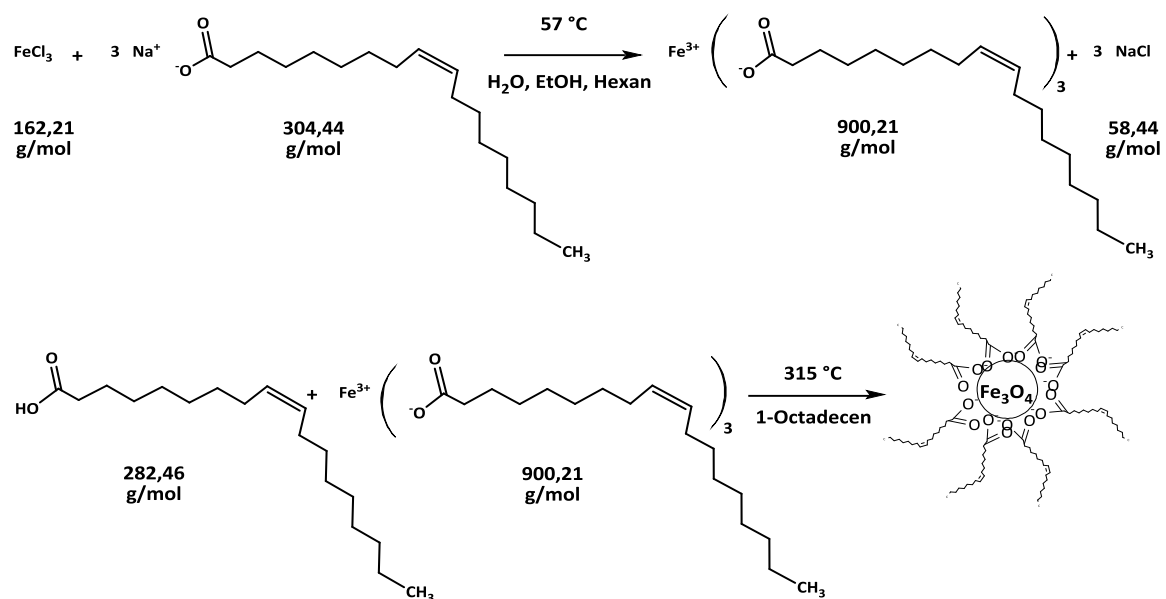


Abbildung 20

2-Stufen-Synthese definierter Eisenoxidnanopartikel durch Thermolyse in 1-Octadecen und mit Ölsäure als Stabilisator

Diese Nanopartikel sind mit einer Schicht aus Oleat-Molekülen stabilisiert und somit nicht in Wasser dispergierbar. Um sie in eine wässrige Lösung zu überführen und somit für Polyelektrolyte zugänglich zu machen, ist ein Austausch mit hydrophilen Liganden nötig. Nach Xu et al.⁶⁸ geht dieser Ligandentausch leichter vonstatten, wenn die Oleathülle zum Teil durch das raumeinnehmende Molekül Trioctylphosphinoxid (TOPO) ersetzt wird. So soll eine dicht gepackte, hydrophobe Schichtbildung vermieden werden und ein effektiver Ligandentausch möglich sein.

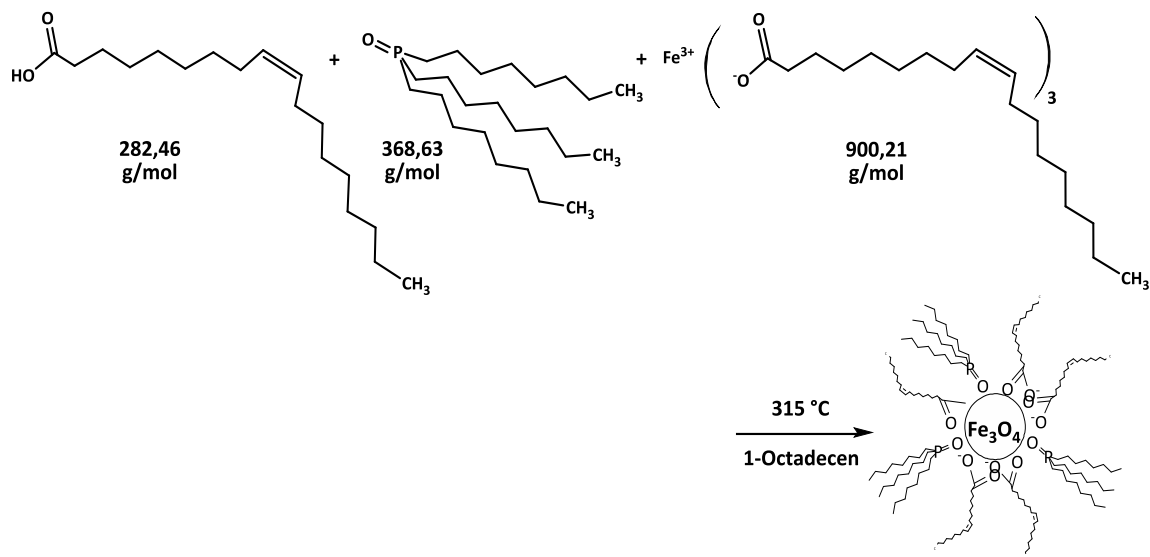


Abbildung 21

Thermolyse in Gegenwart eines Ölsäure/ Trioctylphosphinoxid-Gemisches zur Synthese definierter Eisenoxidnanopartikel mit einer labilen Liganden-Schicht

Die Vorstufe zu Eisenoleat ist identisch mit der Synthese nach Hyeon, lediglich bei der Thermolyse wird neben Ölsäure das Trioctylphosphinoxid zugegeben. Beide Synthesewege liefern einen schwarzen Niederschlag, der reversibel in organischen Lösungsmitteln wie Toluol dispergierbar ist (Vergl. Kapitel 7.3.2). In Tabelle 3 sind die zwei Synthesewege mit den dazugehörigen Produktbezeichnungen aufgeführt.

Tabelle 3

Bezeichnung der nach zwei Methoden synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikeln

Syntheseweg	Liganden	Bezeichnung
Hyeon et al. ¹⁹	Ölsäure	OL- Fe_3O_4
Xu et al. ⁶⁸	Ölsäure + Trioctylphosphinoxid	TOPO/OL- Fe_3O_4

5.1.2 Charakterisierung

TEM Aufnahmen der Proben OL-Fe₃O₄ und TOPO/OL-Fe₃O₄ sind in Abbildung 22 zu sehen. Die Nanopartikel, die lediglich Oleatmoleküle als Liganden tragen, besitzen eine nahezu sphärische Form mit sehr enger Größenverteilung (oben), während die Trioctylphosphinoxid-stabilisierten Kristalle unregelmäßige Verformungen aufweisen (unten). Zudem besteht die Probe TOPO/OL-Fe₃O₄ aus zwei Fraktionen mit einem Durchmesser von ca. 5 nm bzw. 20 nm und ist damit für eine weitere Verwendung zu breit verteilt. Die Einführung des zweiten, raumfüllenden Liganden TOPO verhindert ein homogenes, sphärisches Kristallwachstum und führt zur Ausbildung von Ecken und Kanten.

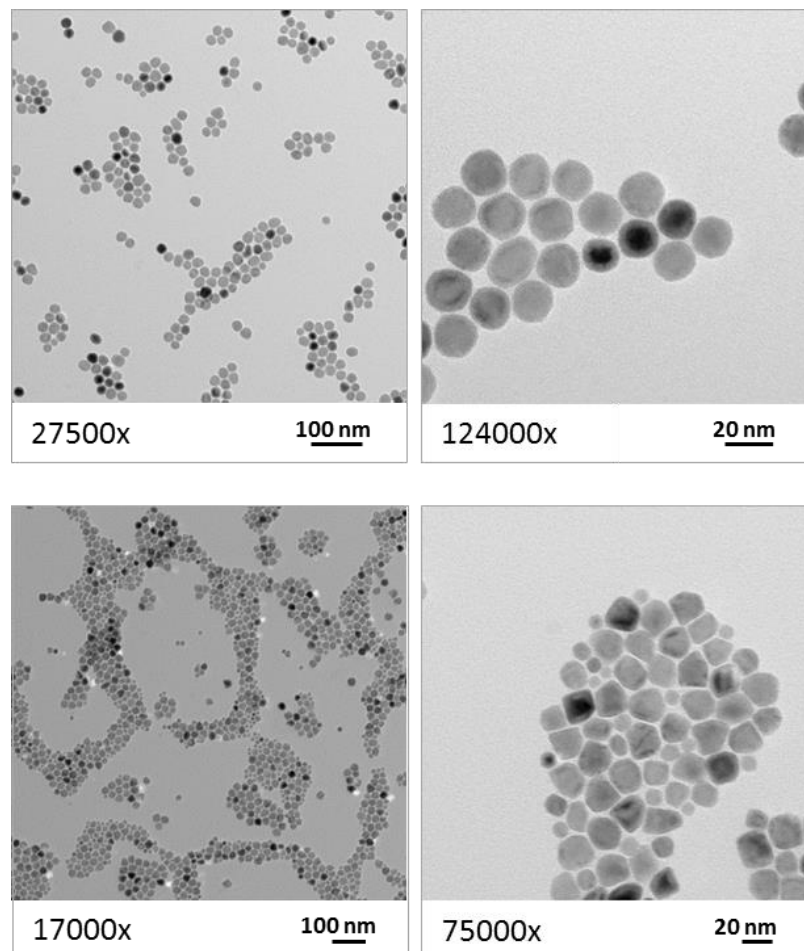


Abbildung 22

TEM-Aufnahmen der Eisenoxid-Nanopartikeln nach Adsorption auf Kohlefilm aus Toluolhaltiger Lösung: OL-Fe₃O₄ (oben) und TOPO/OL-Fe₃O₄ (unten)

Da die OL-Fe₃O₄-Nanopartikel für eine Verwendung als Template bei der Ausbildung polymerer Mehrschichtpartikel besser geeignet sind, werden sie genauer untersucht. Aus der Mittelung von 120 Partikeln der TEM-Aufnahme wird ein Durchmesser von 17,3 nm erhalten.

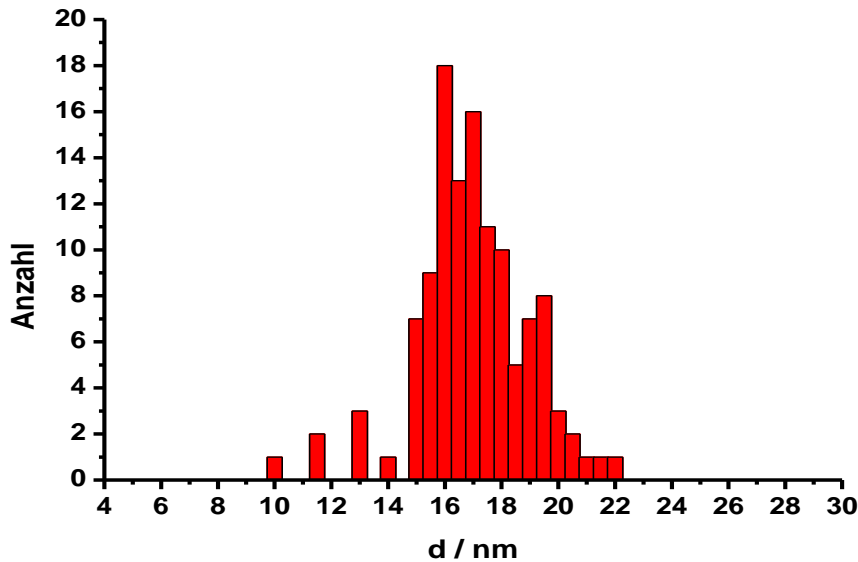


Abbildung 23

Größenverteilung der Probe OL-Fe₃O₄

Geht man von einer sphärischen Form der Partikel aus, so kann ihre mittlere Molmasse aus dem Radius und der Dichte von Magnetit ($\rho = 5,2 \text{ gcm}^{-3}$) berechnet werden:

$$M_n = \rho \frac{4}{3} \pi r^3 N_A = 5,2 \times 10^{-21} \text{ gnm}^{-3} \times \frac{4}{3} \pi \left(\frac{17,3}{2} \text{ nm} \right)^3 \times N_A \quad (52)$$

$$M_n = 8,5 \times 10^6 \text{ gmol}^{-1}$$

$$O_n = 4\pi r^2 = 4\pi \left(\frac{17,3}{2} \text{ nm} \right)^2 = 940 \text{ nm}^2 \quad (53)$$

Die Oberfläche (O) eines sphärischen Nanopartikels mit einem Durchmesser von 17,3 nm beträgt 940 nm² (Gleichung 54).

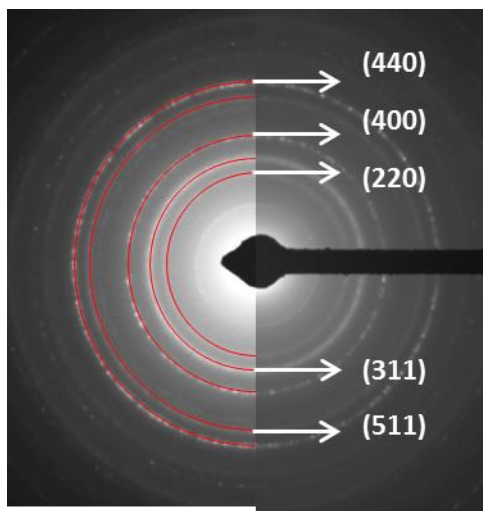
Zudem werden beide Proben mittels DLS im Winkelbereich von 30° bis 158° untersucht. Sie werden in Toluol verdünnt und mit einem LCR-Spritzenfilter (Porengröße 450 nm) filtriert. Die jeweiligen Korrelationsfunktionen lassen sich monoexponentiell fiten. Die TOPO/OL-stabilisierte Probe ist mit einem hydrodynamischen Radius von 12,8 nm etwas größer als die OL-Fe₃O₄-Nanopartikel, deren Radius 10,8 nm beträgt.

Tabelle 4

Hydrodynamische Radien beider Proben (filtriert mit LCR 450 nm und gemessen in Toluol bei 30° bis 158°)

Partikel	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm}$
OL-Fe ₃ O ₄	10,8
TOPO/OL-Fe ₃ O ₄	12,8

Um zu zeigen, dass es sich bei den Eisenoxid-Kristallen um Magnetit mit der Strukturformel Fe₃O₄ handelt, wird mittels TEM die Elektronenbeugung untersucht. Dabei können die auftretenden Reflexe den Kristallebenen eines Magnetit-Kristalls zugeordnet werden.



d / nm	Reflex
0,29	(220)
0,25	(311)
0,21	(400)
0,16	(511)
0,15	(440)

Abbildung 24

Elektronenbeugungsbild der Probe OL-Fe₃O₄ (links) mit zugehörigen Reflexen (rechts)

Die magnetischen Eigenschaften der Eisenoxidnanopartikel lassen sich mit einem *Super-Conducting-Quantum-Interference-Device* (SQUID) Magnetometer bestimmen. Zunächst werden die Magnetisierungskurven durch Auftragung von der Magnetisierung M gegen die Feldstärke H bei 5 K und 300 K erhalten, wobei die maximale Feldstärke 60000 Oe beträgt. Bei 5 K ist eine leichte Hysterese zu erkennen, die typisch für ferrimagnetische Stoffe ist. Somit liegt diese Temperatur unter der *blocking*-Temperatur T_B . Dagegen zeigen die Eisenoxidnanopartikel bei 300 K keine Remanenz und Koerzitivität, sondern

ein superparamagnetisches Verhalten mit einer magnetischen Sättigung M_s von 61 emu/g. Die *blocking*-Temperatur T_B lässt sich durch eine *zero-field-cooled* (ZFC)- mit anschließender *field-cooled* (FC) Magnetisierung bestimmen und beträgt 254 K.

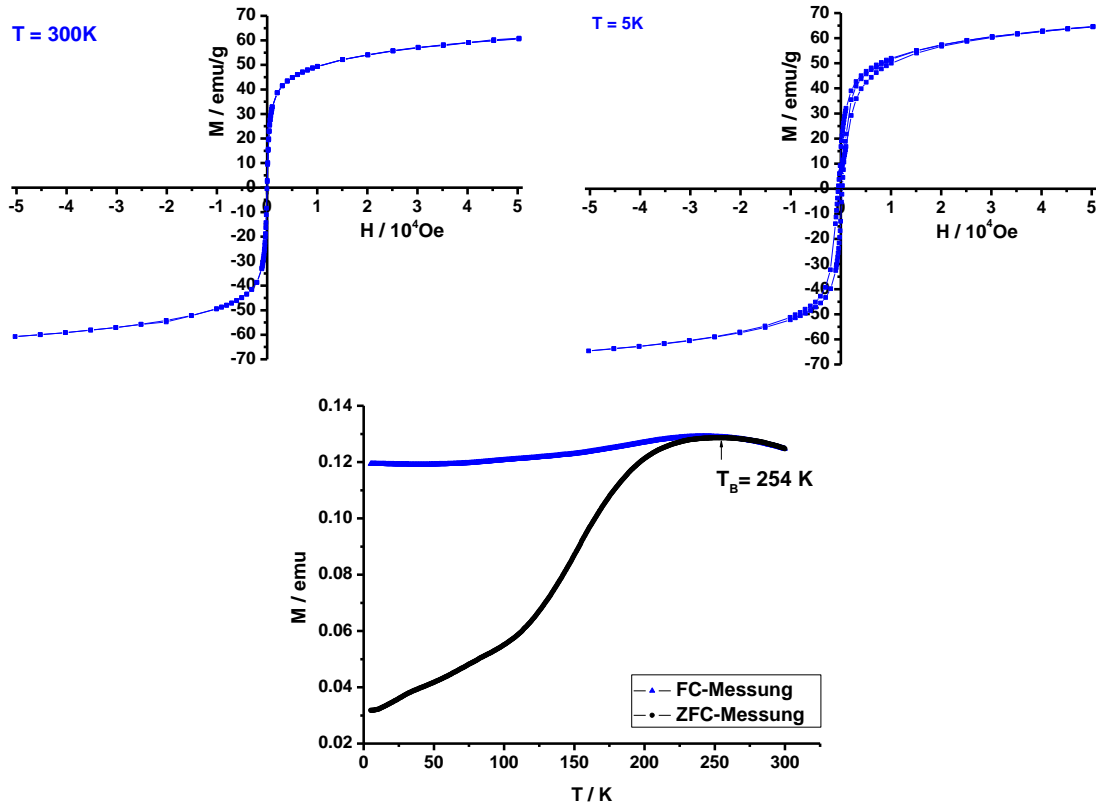


Abbildung 25

Magnetisierungskurven der OL- Fe_3O_4 -Nanopartikeln bei 300 K und 5 K (oben), sowie *zero-field-cooled*- (ZFC) / *field-cooled*- (FC) Magnetisierung (unten)

5.1.3 Zusammenfassung

Für die Synthese von definierten Eisenoxid-Nanopartikeln werden zwei Methoden verwendet. Die Trioctylphosphinoxid/Oleat-stabilisierten Kristalle weisen in den TEM-Aufnahmen Deformationen wie Ecken auf und besitzen eine breitere Größenverteilung als die in Gegenwart von Ölsäure synthetisierten Nanopartikel. Deswegen werden die OL- Fe_3O_4 -Partikel für die weiteren Versuche verwendet. Aus der TEM-Aufnahme wird ein mittlerer Durchmesser von 17,3 nm erhalten, während die DLS einen hydrodynamischen Radius von 10,8 nm liefert. Damit ist der hydrodynamische Durchmesser mit 21,6 nm um etwa 25 % größer als der mittlere Kerndurchmesser im

getrockneten Zustand. Die SQUID-Messung zeigt, dass die Partikel bei Raumtemperatur superparamagnetisch sind. Die Magnetit-Struktur kann durch Elektronenbeugung bestätigt werden.

5.2 Ligandentausch

5.2.1 1-Stufen-Ligandentausch

Die engverteilten Eisenoxid-Nanopartikel besitzen eine organische Hülle und sind deshalb nicht in Wasser dispergierbar. Um sie in wässrige Lösung überführen zu können, ist eine Oberflächenmodifikation mit hydrophilen Gruppen nötig.

Zunächst wird der Austausch der stabilisierenden Schicht in einem Reaktionsschritt vorgenommen. Dazu werden die Partikel in Chloroform dispergiert, während die jeweiligen Liganden in DMSO gelöst sind⁶⁹. Chatechol-Ankersind nach Xu et. al für die Komplexierung von Eisenionen geeignet⁷⁰, weswegen Dopamin sowie 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure als Liganden untersucht werden. Zudem wird der Ligandentausch mit Dopamin-modifiziertem Polyethylenglykol sowie Glutathion durchgeführt.

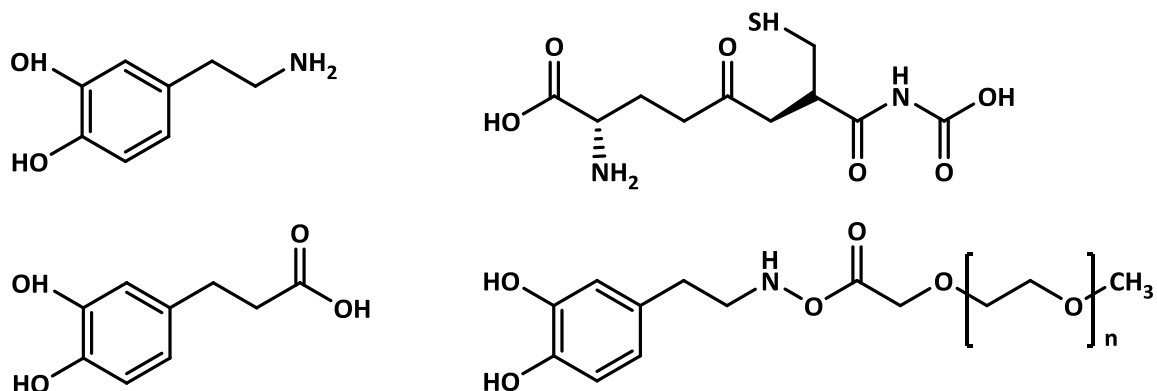


Abbildung 26

Liganden zur Oberflächenmodifizierung der OL-Fe₃O₄-Nanopartikel: Dopamin, Glutathion, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure und Dopamin-modifiziertes Polyethylenglykol (von links oben nach rechts unten)

Der Phasentransfer wird entweder durch Rühren bei verschiedenen Temperaturen, durch Ultraschall oder durch langes Schütteln initiiert. Die verwendeten Durchführungsvarianten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Kann der Niederschlag nach beendeter Reaktion homogen in MilliQ-H₂O dispergiert werden, so wird die Lösung mit einem GHP-Spritzenfilter (Porengröße 450 nm) filtriert. Bei einigen der

Versuchsvarianten bilden die Partikel augenscheinlich eine Suspension im wässrigen Milieu, jedoch lässt sich keine dieser Proben anschließend durch einen Spritzenfilter mit 450 nm große Poren filtrieren. Demnach findet kein vollständiger Ligandentausch statt und durch den jeweiligen Rückstand an hydrophober Hülle agglomerieren die Eisenoxidpartikel, sobald sie in Wasser überführt werden.

Tabelle 5

Übersicht aller 1-Stufen-Ligandentauschversuche an OL-Fe₃O₄-NPs mit Angaben über Liganden-Stoffmenge pro 1 mg NPs, Reaktionsdurchführung und Dispergierbarkeit in H₂O. Ist eine Dispersion zu beobachten, so wird anschließend die Filtration mit einem GHP-450 nm Spritzenfilter überprüft [✓ = möglich; x = nicht möglich]

Ligand	n / mmol	Durchführung		H ₂ O	Filtration
Dopamin	0,026	Rühren 70°C	1 h	✓	x
	0,026	Rühren 70°C	3 h	✓	x
	0,026	Rühren 40°C	17 h	x	
	0,13	Rühren 40°C	18 h	x	
	1,3	US-Bad	4 h	✓	x
	1,3	Schütteln RT	144 h	✓	x
3-(3,4-Dihydroxyphenyl) propionsäure	0,11	US-Bad	2,5 h	x	
	1,1	Schütteln RT	144 h	x	
	1,1	Rühren 40°C	15 h	x	
Polyethylenglykol-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethylamin	0,007	Rühren RT	48 h	✓	x
Glutathion	0,33	Rühren RT	72 h	✓	x

5.2.2 2-Stufen-Ligandentausch

Die Versuche, die Oleat-Hülle in einem Schritt vollständig zu tauschen, führen zu keinem Erfolg. Deswegen wird ein Zwei-Stufen-Ligandentausch nach Hatakeyama und Kishi⁷¹ untersucht. Carbonsäuren mit Mercapto-Gruppen sind für die Komplexierung von Eisenoxid gut geeignet, jedoch können Thiolgruppen die Spinellstruktur von Magnetit auflösen⁷². Ihre hohe Affinität zu Eisen kann trotzdem ausgenutzt werden, indem sie als temporäre Liganden verwendet werden. Dazu wird die OL-Fe₃O₄-Toluol-Lösung mit Meso-2,3-Dithioweinsäure (DMSA), die in DMSO gelöst ist, versetzt und unter Argon-Atmosphäre im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird der Niederschlag in eine 0,1 M Natriumcitratlösung (pH = 8) überführt und nochmals ins Ultraschallbad gehalten. Durch den höheren Chelat-Effekt der drei Carbonylgruppen ist Natriumcitrat affiner gegenüber Eisenoxid und damit in der Lage die DMSA-Moleküle zu verdrängen (Abbildung 27).

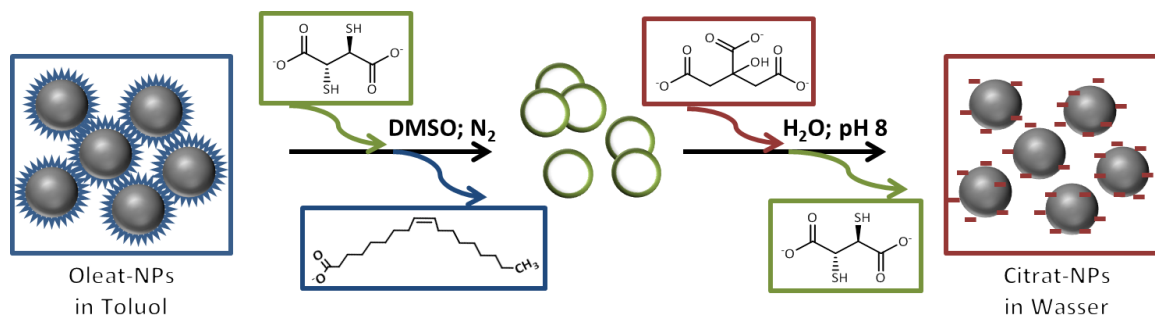


Abbildung 27

Schematische Darstellung der Überführung von Oleat-stabilisierten Nanopartikeln zuerst in DMSA-haltigem DMSO und anschließend in wässriger Natriumcitrat-Lösung

Die durch den Zwei-Stufen-Ligandentausch in wässriger Lösung überführten Nanopartikel werden als Cit-Fe₃O₄ bezeichnet. Sie lassen sich mit einem GHP-Spritzenfilter (450 nm) filtrieren und können somit genauer untersucht werden. Die TEM-Aufnahmen (Abbildung 28) zeigen Partikel, die identisch mit den OL-Fe₃O₄-Kristallen sind (Abbildung 22 oben). Sie besitzen ebenfalls eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 17 nm.

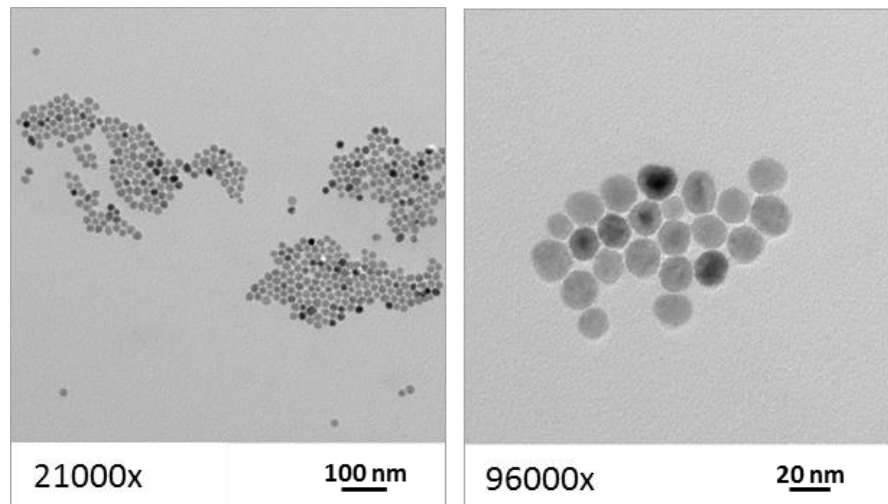


Abbildung 28

TEM-Aufnahmen der Cit-Fe₃O₄-Nanopartikeln nach Adsorption auf Kohlefilm aus wässriger Lösung

Eine weitere Möglichkeit für die bildliche Darstellung der Partikel ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM). Hierbei werden die Partikel durch schnelle Rotation (spin-casting) auf ein Mica-Plättchen fein verteilt und im *tapping-mode* aufgenommen. Da die Spitze mit einem Durchmesser von 20 nm in der Größenordnung der Partikel liegt, kann ihr Durchmesser nicht aus der horizontalen Distanz ermittelt werden. Wird jedoch die Höhe (vertikale Distanz) gemessen, so erhält man Durchmesser, die mit den Werten der TEM-Aufnahme übereinstimmen. In Abbildung 29 ist beispielhaft die Analyse eines Partikels gezeigt: Die horizontale Messung (grün) liefert einen Durchmesser von 46,9 nm, die Höhe (schwarz) dagegen wird zu 16,4 nm bestimmt.

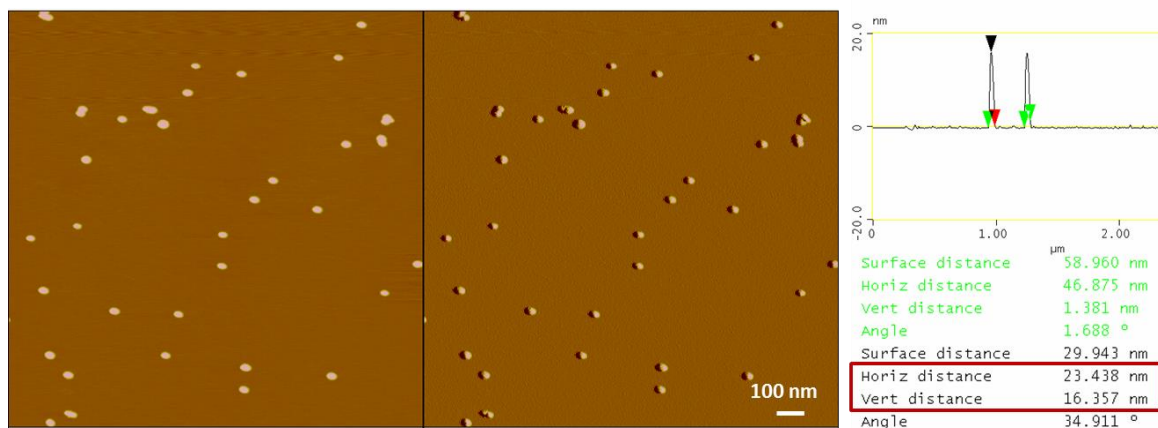


Abbildung 29

AFM-Aufnahme der Cit-Fe₃O₄ auf Mica (spin-casting mit $c = 0,1 \text{ gL}^{-1}$ in H₂O). Von links nach rechts: Höhenbild, Amplitudenbild und beispielhafte Analyse der Höhe (schwarz) und Breite (grün) eines Partikels

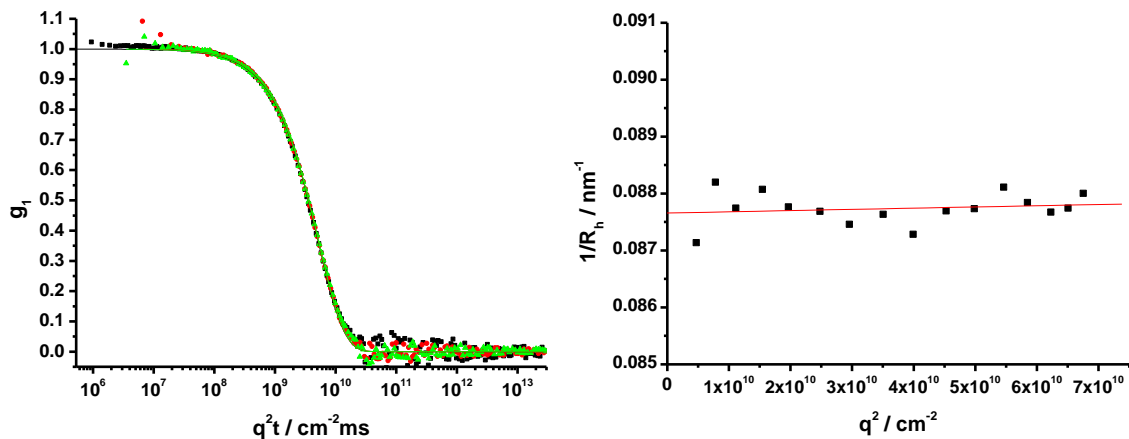
Die Analysen mittels TEM und AFM werden an trockenen Proben durchgeführt und können keine Aussage über eine Partikelaggregation liefern. Um zu überprüfen, ob der Ligandentausch vollständig ist und die Partikel somit einzeln vorliegen, wird dynamische Lichtstreuung an der Cit-Fe₃O₄-Probe gemessen. Sie wird in MilliQ-H₂O verdünnt und mit einem GHP-Spritzenfilter (Porengröße 450 nm) filtriert. Die erhaltene Korrelationsfunktion kann monoexponentiell gefittet werden, wobei ein $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 11,4$ nm erhalten wird. Dieser ist nahezu identisch mit dem hydrodynamischen Radius vor dem Ligandentausch ($\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 10,8$ nm). Somit ist der Ligandentausch vollständig und aggregationsfrei durchgeführt worden.

Tabelle 6

Vergleich der hydrodynamischen Radien vor und nach der Überführung in Wasser (gemessen bei 30° bis 158°)

Partikel	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm}$	Filter	Lösungsmittel
OL-Fe ₃ O ₄	10,8	LCR 450 nm	Toluol
Cit-Fe ₃ O ₄	11,4	GHP 450 nm	MilliQ-H ₂ O

Die Citrat-stabilisierten Eisenoxidpartikel zeigen trotz ihrer negativen Oberflächenladung keinen sichtbaren *slow* oder *fast mode*. Die Korrelationsfunktionen der 30°, 90° und 158° Messungen lassen sich monoexponentiell fitten und liegen übereinander. Die Extrapolation der $1/R_h$ -Werte, errechnet aus den jeweiligen Diffusionskoeffizienten, zeigt lediglich eine 2%ige Steigung.


Abbildung 30

DLS der Probe Cit-Fe₃O₄ in MilliQ-H₂O bei $c = 35 \text{ mgL}^{-1}$ – Links: Korrelationsfunktionen der Messungen bei 30° (schwarz), 90° (rot) und 158° (grün) zeigen keine Abweichung; Rechts: Extrapolation von $1/R_h$ gegen 0 zur Bestimmung von $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$

Das ζ -Potential in MilliQ-H₂O kann mit einem Zetasizer zu ca. – 40 mV bestimmt werden. Dieser Wert wird nicht als absolut betrachtet, sondern dient nur der Kontrolle. Damit besitzen die Partikel wie erwartet eine negative Oberflächenladung.

5.2.3 Bestimmung des Eisengehalts

Für die Bestimmung des Eisengehalts in einem Citrat-stabilisierten Nanopartikel wird 1,10-Phenanthrolin verwendet⁸. Zunächst muss die Konzentration an Cit-Fe₃O₄ mittels Gefriertrocknung bestimmt werden, wobei eine Portion der Stammlösung im zuvor tarierten Gefäß im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit wird. Dann werden die Partikel ($m = 1,4 \text{ mg}$) mit konzentrierter Salzsäure zersetzt und die freien Fe³⁺-Ionen zu Fe²⁺ reduziert. Unter Zugabe von 1,10-Phenanthrolin können Ferroin-Komplexe (Tri-1,10-phenanthrolineisen(II)-Ionen) gebildet werden, die bei einer Wellenlänge von 511 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen. Um aus der Absorption die Konzentration an Eisen zu berechnen, ist eine Kalibrierung mit Ammoniumeisen(II)sulfat (Mohrsches Salz) nötig. Die erhaltene Kalibriergerade liefert die Eisenkonzentration $c(\text{Fe}^{2+})$:

$$c(\text{Fe}^{2+}) = \frac{Abs_{511\text{nm}}}{0,213 \text{ mL}\mu\text{g}^{-1}} = \frac{0,13}{0,213 \text{ mL}\mu\text{g}^{-1}} = 0,61 \mu\text{g mL}^{-1} \quad (54)$$

Daraus folgt für die Nanopartikel-Probe, die eine Absorption von 0,13 aufweist, eine Fe^{2+} -Konzentration von 0,61 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die HCl-haltige Stammlösung enthält somit 808 μg Fe^{2+} , woraus sich eine Masse von 1,12 mg an Fe_3O_4 -Nanopartikeln berechnen lässt. Damit besteht die Probe zu 80 % aus Magnetit und enthält 1 mmol Natriumcitrat. Bei einem mittleren Partikel-Durchmesser von 17,3 nm und einer Partikel-Oberfläche von 940 nm^2 wäre die Oberflächenbeladung von Citrat $1,5 \cdot 10^{-23} \text{ molnm}^{-2}$. Das würde bedeuten, dass sich 9 Liganden auf 1 nm^2 befinden. Die Zahl erscheint etwas zu hoch: Zum einen können sich freie Citratmoleküle in der Lösung befinden, obwohl die Nanopartikel mittels Fällung und Amicon®-Zentrifugenfiltration aufgereinigt wurden. Zum anderen würden Fehler bei der Einwaage und Kalibrierung die Eisenkonzentration und damit alle weiteren errechneten Werte verfälschen.

5.2.4 Salzstabilität

Eine wichtige Eigenschaft von Nanopartikeln ist ihre Stabilität in salzhaltiger Lösung. Dafür wird die Cit- Fe_3O_4 -Probe in Gegenwart unterschiedlicher Salz-Konzentrationen mittels DLS vermessen. Dabei wird zunächst die Partikellösung in eine Küvette vorgelegt und mit 50 mM NaCl-Lösung titriert. Die Probe scheint bis zu einer NaCl-Konzentration von 37 mM stabil zu sein, wobei der Radius bei $c(\text{NaCl}) = 37 \text{ mM}$ um einen Nanometer gestiegen ist. Um in der Küvette eine NaCl-Konzentration von 50 mM zu erreichen, wird ein Tropfen einer 1 M Salzlösung zutitriert. Dabei tritt eine starke Erhöhung des hydrodynamischen Radius bis 90 nm auf (Abbildung 31). Somit sind die Cit- Fe_3O_4 schon bei einer Salzkonzentration von 50 mM aggregiert und können nicht ohne weitere Stabilisierung in einen physiologischen Puffer wie PBS überführt werden.

Da üblicherweise die Partikellösung zum Puffer gegeben wird, werden im zweiten Test unterschiedlich konzentrierte Salzlösungen in der Küvette vorgelegt und die Partikel zugegeben, sodass die Partikel-Endkonzentrationen gleich sind (Abbildung 31 rechts). Dabei steigt der hydrodynamische Radius bereits bei 15 mM NaCl um einen Nanometer und ist bei 25 mM auf 15 nm angewachsen. Die Cit- Fe_3O_4 -Nanokristalle sind demnach NaCl gegenüber empfindlicher als im ersten Versuch ersichtlich und beginnen schon in

Anwesenheit geringer Salzmengen zu aggregieren. Dies war zu erwarten, da eine sterische Stabilisierung durch niedermolekulare Liganden wie Citrat-Moleküle nicht gelingen kann.

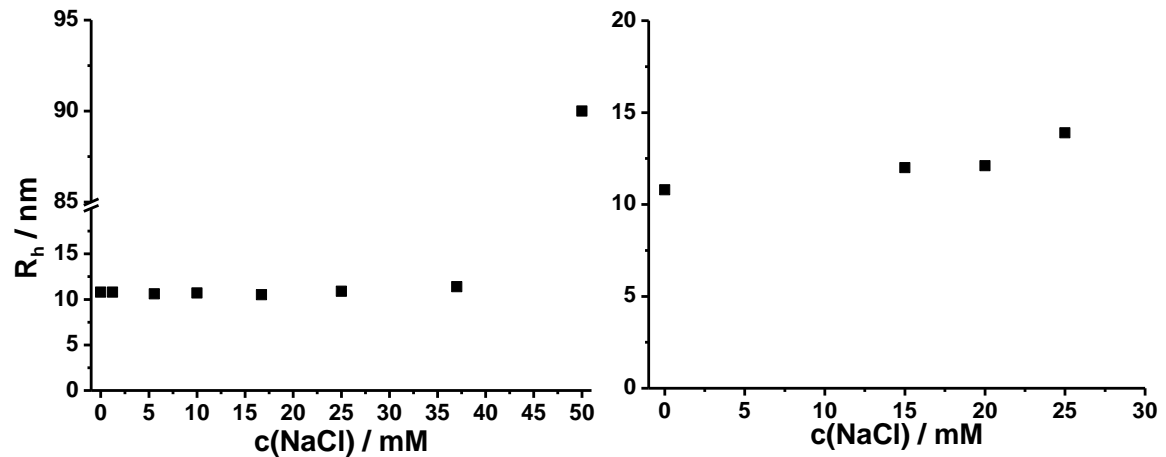


Abbildung 31

$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ der Cit-Fe₃O₄-Probe in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen.

Links: Fe₃O₄-Cit wird in der Küvette vorgelegt ($c_{start}(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}) = 33 \text{ mgL}^{-1}$) und mit einer 50 mM NaCl-Lösung titriert, sodass die Partikelkonzentration sinkt.

Rechts: Fe₃O₄-Cit wird in unterschiedlich konzentrierten NaCl-Lösungen verdünnt, sodass die Partikel-Endkonzentration $c_{ende}(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}) = 33 \text{ mgL}^{-1}$ beträgt

5.2.5 Zusammenfassung

Die Versuche, OL-Fe₃O₄ in einem Reaktionsschritt in Wasser zu überführen, liefern mit keinem der verwendeten Liganden (Dopamin, Glutathion, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure und Dopamin-modifiziertes Polyethylenglykol) aggregatfreie wässrige Dispersionen. Geht man jedoch von DMSA als Zwischenligand aus und überführt die Partikel anschließend in eine Natriumcitrat-Lösung, so bilden sich aggregatfreie, Citrat-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Radius von 11,4 nm. Diese reagieren empfindlich auf die Zugabe von Salz, da sie lediglich durch die Coulomb-Abstoßung negativ geladener Citrat-Liganden in Lösung gehalten werden. Bereits niedrige NaCl-Konzentrationen wie $c = 25 \text{ mM}$ führen durch Abschirmung der Ladung zur Aggregation und zu einem Wachstum des mittleren hydrodynamischen Radius. Da die Cit-Fe₃O₄-Nanopartikel in physiologischen Puffern instabil sind, müssen sie mit einer sterisch abschirmenden Hülle versehen werden.

5.3 *Layer-by-Layer*-Verfahren - ein Modellsystem

5.3.1 Verwendete Polyelektrolyte

Unter Verwendung der Cit-Fe₃O₄-Nanopartikel als sphärische Template sollen polymere Mehrschichtpartikel gebildet werden, die siRNA enthalten. Dazu wird zunächst ein Modellsystem aus synthetischen Polymeren entwickelt, um die Parameter des Beschichtens (Konzentration, Volumen, Geschwindigkeit) zu ermitteln.

Als Polykationen dient das Homopolypeptid Poly-L-Lysin · HBr (PLL) mit der Größe 15.000-30.000 g mol⁻¹ nach Herstellerangabe. Es besitzt einen hohen *pKs*-Wert (*pKs* = 9,4⁷³) und liegt damit in reinem Milli-Q-H₂O fast vollständig protoniert vor. PLL hat entscheidende Vorteile für das Modellsystem: Es kann in größeren Mengen käuflich erworben werden und ist, da es aus Aminosäuren besteht, biologisch abbaubar⁷⁴.

Zudem wird das von Dr. Wenqiang Chai synthetisierte Polyhexylsperminacrylamid · HBr (PHSAM) verwendet⁷⁵. Es besteht aus N-Alkylsperminacrylamid-Seitenketten, die mittels RAFT-Methode ($M_w = 120000 \text{ g mol}^{-1}$; $P_w = 150$; $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} (0,15 \text{ M NaCl}) = 9,8 \text{ nm}$) polymerisiert worden sind. Jede Seitenkette kann bis zu vier positive Ladungen tragen.

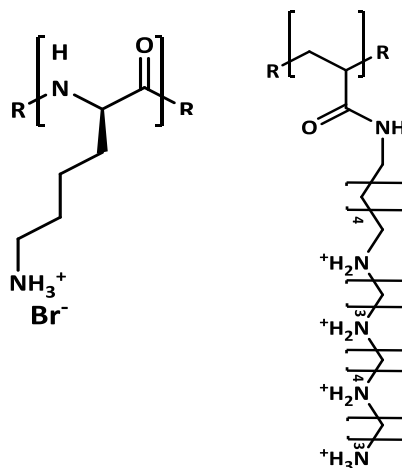


Abbildung 32

Die Polymere PLL und PHSAM (von links nach rechts) werden als Polykationen für das *Layer-by-Layer*-Verfahren verwendet

Da im Großteil der Versuche das Poly-L-Lysin · HBr verwendet wird, wird es mittels statischer Lichtstreuung genauer untersucht. In einer wässrigen 150 mM NaCl-Lösung

wird die Molmasse $M_w = 26900 \text{ g mol}^{-1}$ erhalten. Bei einer Lysin · HBr-Molmasse von $227,1 \text{ g mol}^{-1}$ erhält man den Polymerisationsgrad $P_w = 118$.

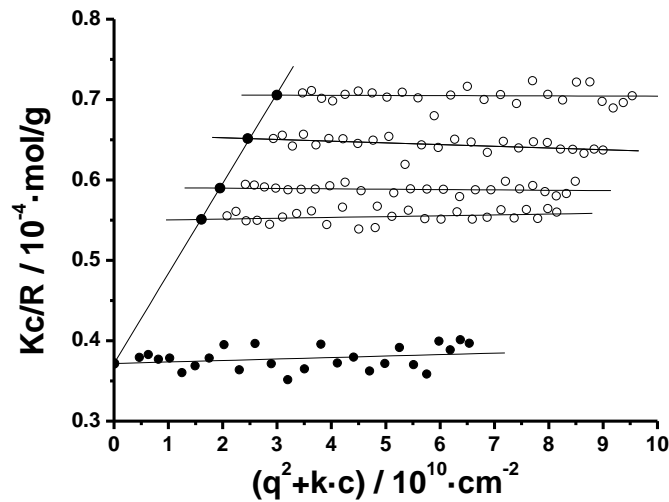


Abbildung 33

Zimplot von PLL 15-30 kDa in 0,15 M wässriger NaCl-Lösung bei $T = 293,1 \text{ K}$; Filter GHP 450 nm; von oben: $c_1 = 10,000 \text{ g L}^{-1}$, $c_2 = 8,210 \text{ g L}^{-1}$, $c_3 = 6,502 \text{ g L}^{-1}$, $c_4 = 5,368 \text{ g L}^{-1}$, $c_5 = 0$; $A_2 = 1,68 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ und $dn/dc = 0,1631 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; $M_w = 26900 \text{ g mol}^{-1}$

Das körpereigene Polysaccharid Heparin (Hep) wird als Polyanion eingesetzt. Es besteht aus variierenden Folgen von D-Glucosaminen und Uronsäuren, die eine variable Zahl an Sulfat-Gruppen tragen und damit stark negativ geladen sind. Heparin hat eine gerinnungshemmende Wirkung und wird zum Beispiel zur Thrombosen-Prophylaxe verabreicht.

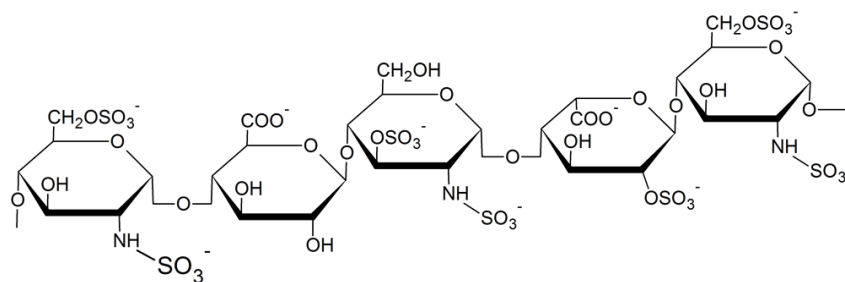


Abbildung 34

Beispielhafte Sequenz der Zucker-Bausteine D-Glucosamin und Uronsäure im Polysaccharid Heparin

Die Molmasse des verwendeten Heparins (SIGMA Aldrich) wird mittels statischer Lichtstreuung zu $M_w = 23300 \text{ g mol}^{-1}$ bestimmt. Da die Konzentrationen eine 3%ige negative Steigung aufweisen, ist die Molmasse mit einem Fehler von $\pm 800 \text{ g mol}^{-1}$ behaftet. Das Heparin ist ein aus Schweinedarm-Schleimhaut extrahiertes Polysaccharid und weist eine breite Molmassenverteilung auf. Dies ist an dem hohen Wert $\mu_2(90^\circ, \text{Kumulantenfit}) = 0,2$ zu erkennen.

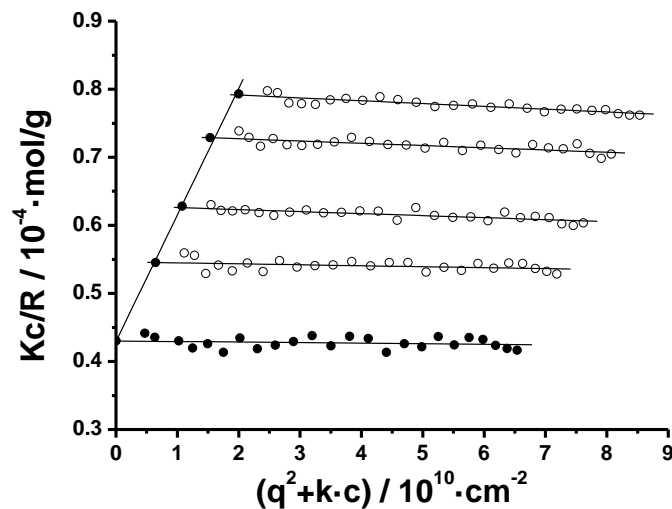


Abbildung 35

Zimmplot von Heparin in 0,15 M wässriger NaCl-Lösung bei $T = 293,1 \text{ K}$; Filter GHP 200 nm; von oben: $c_1 = 4,000 \text{ gL}^{-1}$, $c_2 = 3,070 \text{ gL}^{-1}$, $c_3 = 2,159 \text{ gL}^{-1}$, $c_4 = 1,292 \text{ gL}^{-1}$, $c_5 = 0$; $A_2 = 4,7 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ und $dn/dc = 0,1197 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; $M_w = 23300 \text{ g mol}^{-1}$ ($\pm 800 \text{ g mol}^{-1}$)

Die Polyelektrolyte werden zudem in 150 mM NaCl-Lösung gelöst und mittels dynamischer Lichtstreuung vermessen. Die jeweiligen hydrodynamischen Radien sind in Tabelle 7 zu sehen.

Tabelle 7

Hydrodynamische Radien der Polyelektrolyte gemessen in wässriger NaCl-Lösung ($c = 150 \text{ mM}$)

Polyelektrolyt	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm}$
Poly-L-Lysin	2,3
Polyhexylsperminacrylamid	9,8
Heparin	3,5

5.3.2 Aufbau einer *Layer-by-Layer*-Apparatur

Um die Kolloidaggregation beim *LbL*-Verfahren möglichst auszuschließen, sollen folgende Grundvoraussetzungen beachtet werden:

- Partikel werden zu der Polyelektrolytlösung gegeben.
- Die Polyelektrolytmenge ist genügend hoch, um eine vollständige Partikel-Beschichtung zu erhalten.
- Die Zugabe erfolgt langsam, sodass jedes Partikel möglichst vollständig und einzeln beschichtet wird
- Abtrennung der überschüssigen Polymere von den beschichteten Kolloiden ist nach jedem Adsorptionsschritt notwendig, um keine kontaminierende Aggregate aus gegensätzlich geladenen Polymeren zu erhalten.
- Eine niedrige Polydispersität des sphärischen Templats führt zu uniformen polymeren Mehrschichtpartikeln.

Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wird für das *Layer-by-Layer*-Verfahren eine eigene Apparatur aufgebaut (Abbildung 36). Eine Spritzenpumpe injiziert mit regulierbarer und konstanter Geschwindigkeit die Nanopartikel-Lösung durch eine Kapillare in die Polyelektrolytlösung. Die Templat-Partikel verlassen unter Rühren die Kapillare durch eine Antidiffusionsspitze. Dies gewährleistet eine möglichst langsame sowie gleichmäßige Verteilung und verhindert die Rückdiffusion der Polyelektrolyte zur Partikellösung in der Kapillare bei abgeschalteter Dosierung.

Die Anlage wird vor jeder Benutzung zuerst mit 50 mL einer 0,1 M Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) und anschließend mit ca. 200 mL MilliQ-H₂O gespült, um sie von adsorbierten Eisenoxid-Partikeln zu befreien. Zudem werden zwei Anlagen verwendet – eine für die Beschichtung mit Polyanionen und eine für die Beschichtung mit Polykationen.

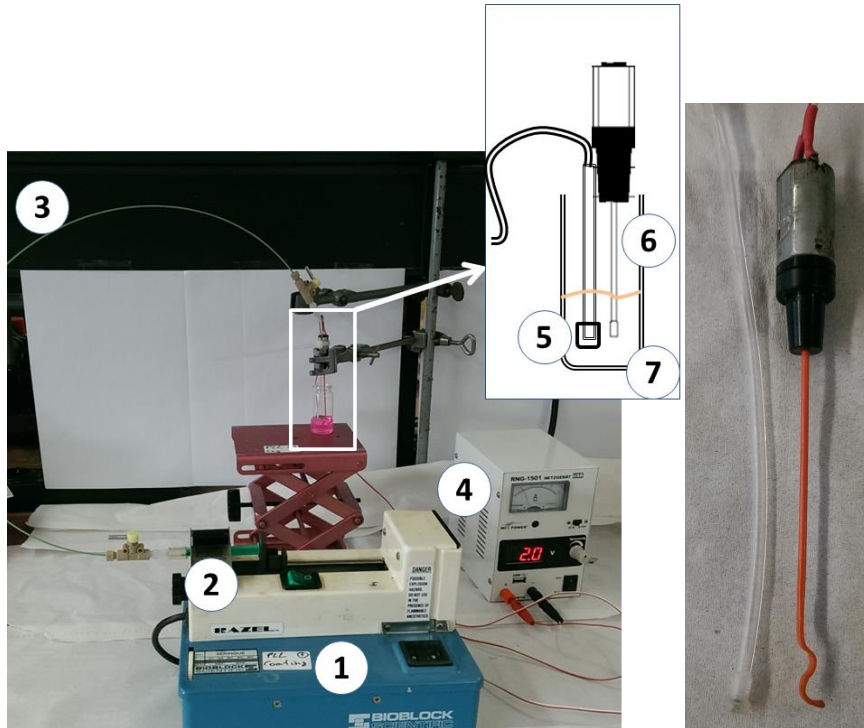


Abbildung 36

Layer-by-Layer-Aufbau – Eine Spritzenpumpe (1) injiziert mit konstanter Geschwindigkeit die Nanopartikel-Lösung (2) durch eine Kapillare in die Polyelektrolytlösung (7). Die Nanopartikel verlassen die Kapillare durch eine Antidiffusionsspitze (5) bei gleichzeitigem Rühren (4) + (6).

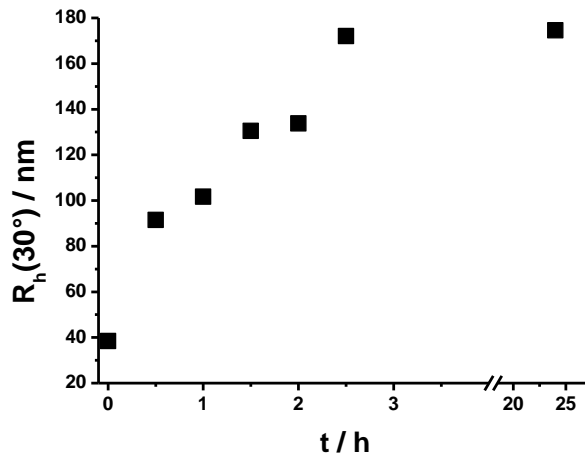
5.3.3 Synthese der Fe₃O₄-PLL-Komplexe in einer Küvette: Bestimmung der *LbL*-Parameter

Bevor Mehrschicht-Partikel gebildet werden können, müssen zunächst Parameter wie Konzentration und Ladungsverhältnis der einzelnen Schritte ermittelt werden. Dazu wird die oben beschriebene Apparatur in der Flow-Box mit filtriertem Methanol vom Staub befreit und an der Multiwinkel-Lichtstreuanlage aufgebaut. Die Nanopartikel werden über Spritzenfilter in eine Quarzglasküvette geleitet, die die Polymerlösung enthält. Dabei kann das Wachstum sofort und zeitabhängig sowie das Entstehen von Aggregaten winkelabhängig mittels dynamischer Lichtstreuung beobachtet werden.

1. Hohe Nanopartikel-Konzentration

Als Polykation wird zunächst PLL · HBr mit folgenden Parametern verwendet: $c = 1 \text{ gL}^{-1}$ im MilliQ-H₂O, $V = 3,4 \text{ mL}$, $m = 3,4 \text{ mg}$, positive Ladungen = $1 \cdot 10^{19}$. Die Cit-Fe₃O₄-Nanopartikel werden auf eine Konzentration von $0,5 \text{ gL}^{-1}$ bzw. 60 nmolL^{-1} in MilliQ-H₂O eingestellt. Die Zugabe erfolgt mit einer mittleren Spritzenpumpengeschwindigkeit (*SPG*) von $0,66 \text{ mLmin}^{-1}$. Die Zugabe-Zeit t ist zunächst 60 Sekunden, was einem Nanopartikel-Volumen von $0,66 \text{ mL}$, einer Partikel-Masse von $330 \text{ }\mu\text{g}$ und einer Stoffmenge von $2,55 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ entspricht.

Die Probe wird direkt nach der Zugabe sowie zeitabhängig bis 24 h nach der Komplexierung mittels DLS analysiert. Der erste gemessene hydrodynamische Radius (Winkel = 30°) liegt bereits bei 40 nm und ist damit wesentlich größer als die Templat-Partikel. Zudem beobachtet man nach 24 h ein Wachstum bis $R_h = 180 \text{ nm}$ (Abbildung 37). Diese Aggregation wird durch ein zu niedriges PLL : NP Verhältnis verursacht. Sowohl die Menge der positiv geladenen Partikel als auch die Zugabegeschwindigkeit zum Polykation kann zu hoch gewählt worden sein.

**Abbildung 37**

Zeitliches Wachstum des hydrodynamischen Radius bei folgenden Parametern: $V(\text{PLL}) = 3,4 \text{ mL}$; $c(\text{PLL}) = 1 \text{ gL}^{-1}$; $c(\text{NP}) = 0,5 \text{ gL}^{-1}$; $V(\text{NP}) = 0,66 \text{ mL}$; $SPG = 0,66 \text{ mLmin}^{-1}$

2. Verringerung der Spritzenpumpengeschwindigkeit

Die Spritzenpumpengeschwindigkeit (SPG) wird auf $0,214 \text{ ml/min}$ reduziert, alle anderen Parameter bleiben unverändert. Bei einer Zugabe von 60 Sekunden und damit einem Partikel-Volumen von $0,21 \text{ mL}$ ($m(\text{NP}) = 105 \mu\text{g}$) ist ein hydrodynamischer Radius von 27 nm zu beobachten, der auch nach 24h konstant bleibt. Bei Zugabe der doppelten Menge Eisenoxid-Nanopartikel ($m(\text{NP}) = 210 \mu\text{g}$) steigt jedoch der Radius auf über 80 nm , was auf eine Aggregatbildung schließen lässt (Tabelle 8). Um einzelne Kerntemplate zu beschichten, ist auch diese Partikelmenge zu hoch. Da die Reduzierung der Zugabegeschwindigkeit nicht ausreicht, muss im nächsten Schritt die Nanopartikel-Konzentration gesenkt werden.

Tabelle 8

Hydrodynamische Radien bei der Komplexierung mit folgenden Parametern: $V(\text{PLL}) = 3,4 \text{ mL}$; $c(\text{PLL}) = 1 \text{ gL}^{-1}$; $c(\text{NPs}) = 0,5 \text{ gL}^{-1}$; $SPG = 0,21 \text{ mLmin}^{-1}$ bei zwei Zugabe-Zeiten t

t / min	$V(\text{NPs}) / \text{mL}$	$R_h(30^\circ) / \text{nm}$
1	0,21	27
2	0,42	83

3. Senkung der Nanopartikelkonzentration

In Anlehnung an die Arbeit von Schneider und Decher⁴⁴ wird im nächsten Schritt die Nanopartikelkonzentration auf 3 nmolL^{-1} bzw. 25 mgL^{-1} herabgesenkt. Bei einer PLL-Konzentration von 1 gL^{-1} ist damit ein Verhältnis von Nanopartikeln zu PLL-Ketten 1 : 20.000 erreicht.

Die Einspritzung erfolgt mit einer Spritzenpumpengeschwindigkeit (*SPG*) von $0,214 \text{ ml/min}$, wobei jeweils 60 Sekunden (d.h. $0,21 \text{ mL}$) injiziert und anschließend die Autokorrelationsfunktion (ACF) bei 30° aufgenommen wird. Dieser Vorgang wird sechs Mal wiederholt, sodass das Partikel-Endvolumen $1,26 \text{ mL}$ und die -Endmasse $31,5 \mu\text{g}$ beträgt. In Abbildung 38 links ist die ACF von reinem Cit- Fe_3O_4 im Vergleich zu der ACF nach der Beschichtung (nach einer und nach sechs Minuten) aufgetragen. Nach Partikelinjektion ist eine Verschiebung zu höheren Diffusionszeiten und damit höheren Radien, aber ohne eine ausgeprägte Aggregation, detektierbar. Die Korrelationsfunktion lässt sich nur triexponentiell fitten, da die hohe PLL-Konzentration einen *fast mode* erzeugt. Dieser sinkt mit steigendem Nanopartikel-Anteil, kann aber auch bei einer Nanopartikel-Masse von $31,5 \mu\text{g}$ nicht vernachlässigt werden.

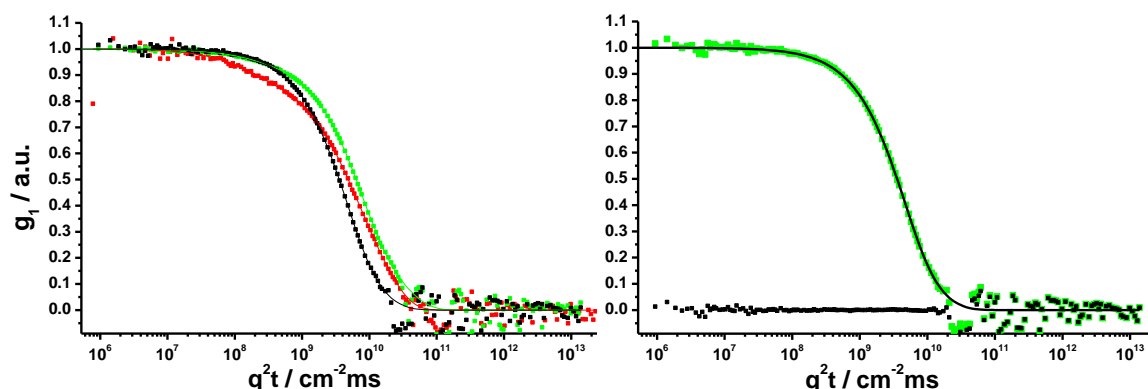


Abbildung 38

ACF und zugehörige Fit-Funktionen bei 30° . Links: Vergleich von reinen Nanopartikeln (schwarz) mit $V(\text{NPs})= 0,21 \text{ mL}$ (rot) und $V(\text{NP})=1,28 \text{ mL}$ (grün); Rechts: [tri- + biexponentieller] Fit der Messung nach Zugabe von $1,28 \text{ mL NP}$

Um den Partikel-Radius abzuschätzen, wird zunächst die reine Polyelektrolyt-Messung triexponentiell gefittet und die erhaltenen Koeffizienten notiert. Nach Zugabe von $1,26 \text{ mL}$ der Nanopartikel-Lösung wird ein [tri- + biexponentieller] Fit an die Korrelations-

funktion angelegt, wobei im triexponentiellen Teil die Polyelektrolyt-Koeffizienten eingetragen werden. Die erhaltene Fit-Funktion (Abbildung 38 rechts) liefert für den biexponentiellen Anteil einen hydrodynamischen Radius von 20 nm, der vergleichsweise nahe an dem Wert der reinen Cit-Fe₃O₄-Nanopartikeln ($R_h = 11,4$ nm) liegt. Somit werden die hier gewählten Parameter für das weitere *Layer-by-Layer*-Verfahren verwendet.

Die Polyelektrolyt-Beschichtung in der Küvette ist aufwendig, da die Apparatur zunächst vollständig vom Staub befreit werden muss. Gelingt dieser zeitintensive Prozess nicht, so wird die DLS-Messung durch Staubpartikel gestört und die Prozedur muss wiederholt werden. Zudem kann der hohe Polyelektrolyt-Überschuss nicht abgetrennt werden und beeinflusst die DLS-Messung.

Deswegen wird im nächsten Schritt überprüft, ob das *Layer-by-Layer*-Verfahren in einem Glasgefäß und damit unter nicht staubfreien Bedingungen durchgeführt werden kann. Die erhaltenen Komplexe können so zunächst vom überschüssigen Polyelektrolyt abgetrennt, dann staubfrei filtriert und schließlich mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert werden.

5.3.4 Synthese von Fe₃O₄-PLL-Komplexen im großen Maßstab

Die Abtrennung der Partikel von überschüssigem Polymer kann zum Beispiel über Zentrifugation oder Zentrifugenfiltration erfolgen. Da die verwendeten Template magnetisch sind, werden sie nach jeder Schichtbildung mit einem Neodym-Magnet (Werkstoff: NdFeB; Durchmesser 6 cm; $H > 10$ kOe) abgetrennt (Abbildung 39). Der magnetisch sedimentierte Feststoff wird drei Mal mit MilliQ-H₂O gespült und anschließend so in H₂O dispergiert, sodass die Endkonzentration der Konzentration vor der Zugabe entspricht (zum Beispiel 25 mgL⁻¹).

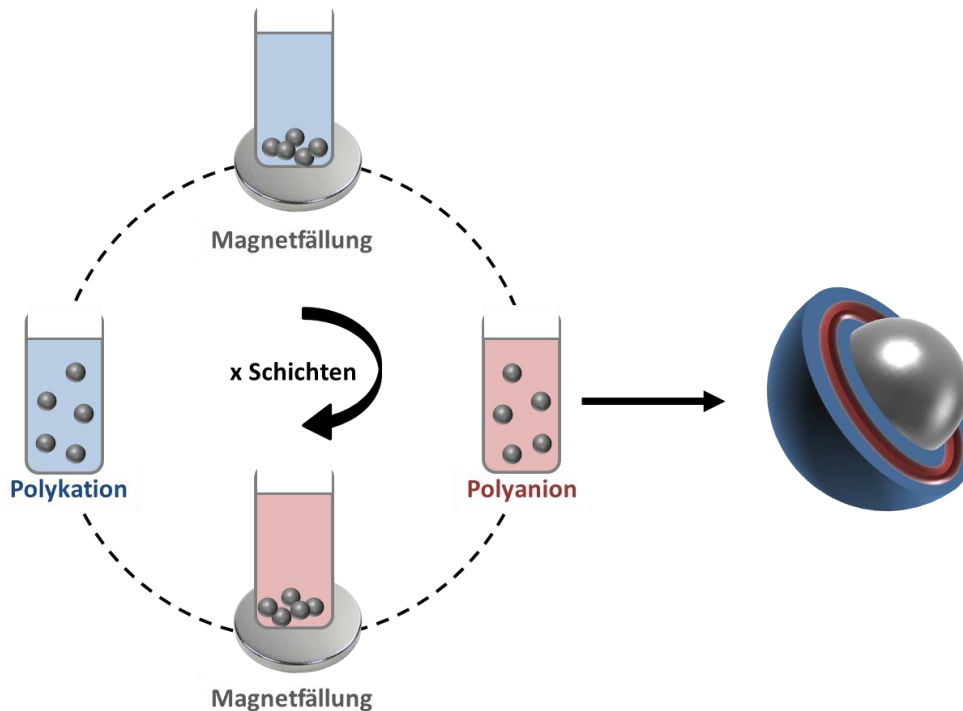


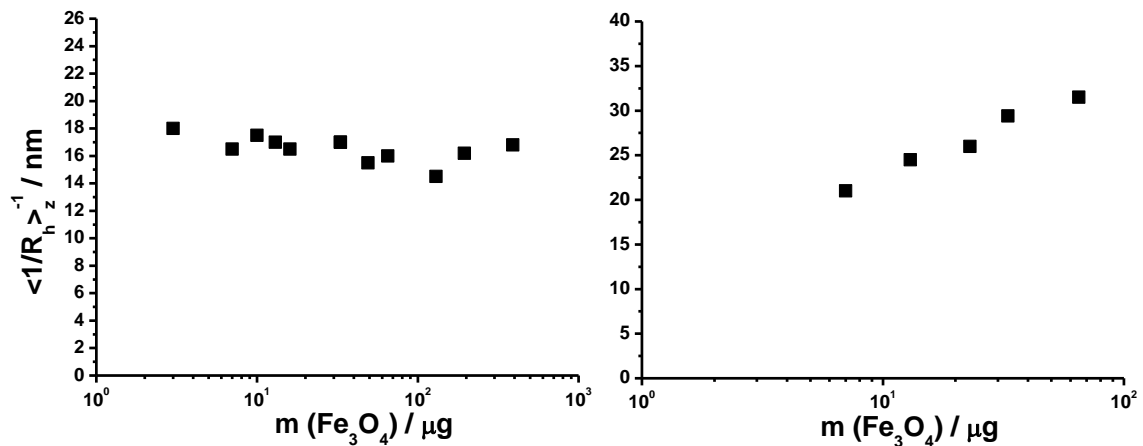
Abbildung 39

LbL-Methode zur Synthese von polymeren Mehrschichtpartikeln durch alternierenden Zusatz entgegengesetzt geladener Polyelektrolyte, wobei nach jedem Schritt die Partikel magnetisch abgetrennt werden.

Beschichtet werden Cit-Fe₃O₄-Partikel mit $c(\text{NP}) = 0,025 \text{ gL}^{-1}$ und einer Spritzenpumpengeschwindigkeit (*SPG*) von $0,13 \text{ mlmin}^{-1}$ (10 mL Spritze) in 4 mL einer 1 gL^{-1} PLL-Lösung (10 mL-Einweg-Schnappdeckelglas).

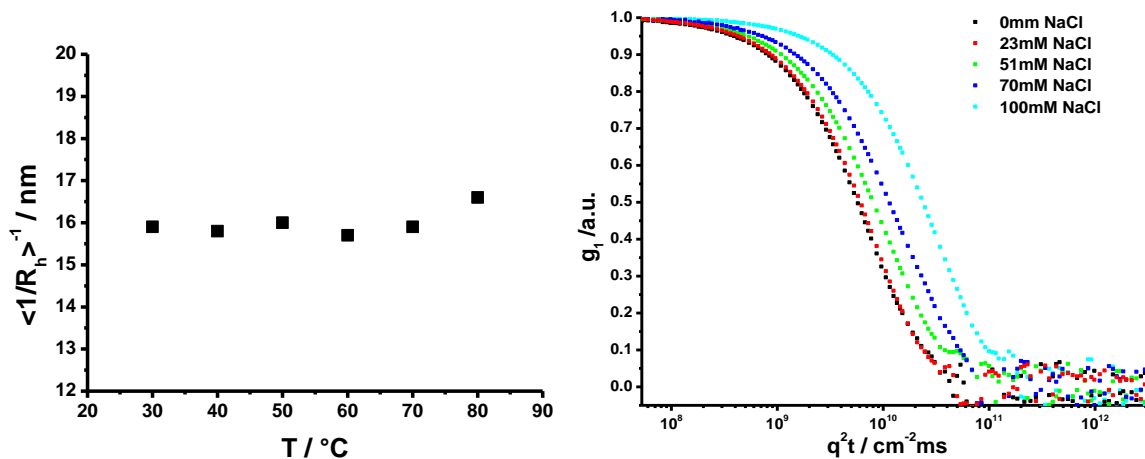
In Abwesenheit von Salz und einer Nanopartikel-Menge zwischen 7 und 400 μg bleibt der hydrodynamische Radius konstant im Bereich von 16 bis 18 nm, was einem Radiuszuwachs von 4,6 – 6,6 nm entspricht. Enthält die PLL-Lösung jedoch 17 mM Natriumchlorid, so ist der Radius bereits bei einer Zugabe von 7 μg auf 21 nm angestiegen. Zudem wachsen die Komplexe mit steigender Nanopartikel-Zahl (z.B. 32 nm bei 65 μg NP), sodass von einer Aggregation bei NaCl-Anwesenheit ausgegangen werden kann (Abbildung 40).

Da alle DLS-Messungen der geladenen Partikel salzfrei durchgeführt werden, sind die Einflüsse von *slow* und *fast mode* nicht zu vernachlässigen. Somit kann für die Fe₃O₄-PLL-Komplexe keine genaue Bestimmung der Schichtdicke erfolgen.

**Abbildung 40**

Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit von der zur PLL-Lösung zugegebenen Eisenoxid-Menge, ohne (links) und in Anwesenheit von (rechts) 1 gL^{-1} NaCl.

Die Fe_3O_4 -PLL-Komplexe werden auf ihre Stabilität bei Temperaturerhöhung und Salzzugabe untersucht. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, bleibt der hydrodynamische Radius beim Erwärmen bis 70°C konstant. Dagegen wächst der Radius bei Anwesenheit von NaCl: Die Komplexe in 51 mM NaCl-Lösung weisen zum Beispiel einen Radius von 23 nm auf, der mit Erhöhung der Salzkonzentration zunimmt. Somit reicht eine PLL-Schicht nicht aus, um die Partikel sterisch gegen den Einfluss von Salz abzuschirmen.

**Abbildung 41:**

Abhängigkeit des Radius von der Temperatur (links) und vom Salzgehalt (rechts) der in H_2O dispergierten Fe_3O_4 -PLL-Partikel

5.3.5 Polyhexylsperminacrylamid als Polykation

Cit-Fe₃O₄-NP ($c = 25 \text{ mgL}^{-1}$, SPG $0,13 \text{ mlmin}^{-1}$) werden über 2, 4, 8, 12 bzw. 16 Minuten in je 2,5 mL einer Polyhexylsperminacrylamid-Lösung ($c = 1 \text{ mgmL}^{-1}$, 10 mL-Einweg-Schnappdeckelglas) injiziert und anschließend magnetisch abgetrennt. Die DLS-Messung ergibt, dass der R_h in diesem Partikelmengen-Bereich nahezu konstant zwischen 17 und 20 nm beträgt. Die mit PHSAM beschichteten Partikel lassen sich demnach mit den Fe₃O₄-PLL-Komplexen aus Kapitel 5.3.4 vergleichen, obwohl das Spermin-Polymer die 10-fache Molmasse und einen fast 3-fach höheren Polymerisationsgrad besitzt. Da das Polyhexylsperminacrylamid nur in begrenzten Mengen vorhanden ist, wird es nicht weiter verwendet.

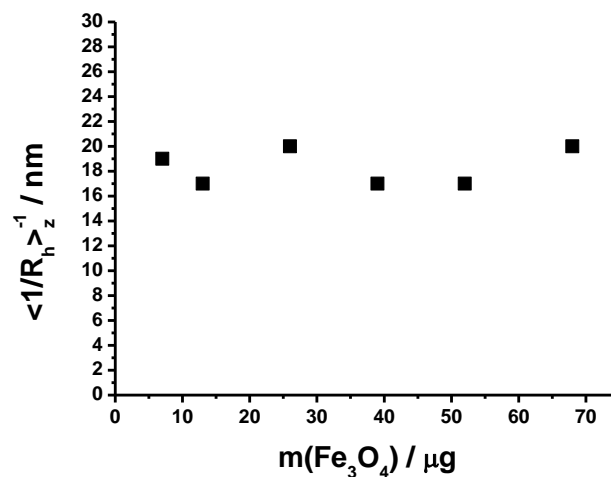


Abbildung 42

Hydrodynamische Radien der Fe₃O₄-PHSAM-Partikel abhängig von der zugegebenen Eisenoxid-Menge

5.3.6 Fünf-Schichten-Komplex Fe_3O_4 -[PLL-Hep]₂-PLL

Für die Herstellung eines Fünf-Schichten-Komplexes werden zunächst 4 mL einer Cit- Fe_3O_4 -Lösung ($c = 25 \text{ mgL}^{-1}$) mit der oben beschriebenen Anlage ($SPG = 0,13 \text{ mgmin}^{-1}$) zu 6 mL einer PLL-Lösung ($c = 4 \text{ gL}^{-1}$) gegeben. Die entstandenen Fe_3O_4 -PLL-NPs werden magnetisch abgetrennt und 0,5 mL dieser Lösung zur Analyse entnommen. Die verbliebene Fe_3O_4 -PLL-Lösung wird wiederum mit Heparin ($c = 4 \text{ gL}^{-1}$) beschichtet. Dieser Vorgang wird für die Herstellung von Fe_3O_4 -[PLL-Hep]₂-PLL wiederholt, wobei die Konzentration der Edukte konstant gehalten und lediglich das Volumen verringert wird (Tabelle 9). Nach jeder Schicht werden der hydrodynamische Radius, der Trägheitsradius sowie das ζ -Potential der Partikel gemessen (Abbildung 44).

Tabelle 9

Übersicht über die Bildung der einzelnen Schichten mit Angaben der Edukt-Volumina, der Radien aus DLS und SLS und des jeweiligen ρ -Verhältnisses. Zudem wird der jeweilige Anstieg der hydrodynamischen Radien ΔR_h berechnet, z.B. $\Delta R_{h,1} = R_{h,1} - R_{h,0}$

Nr.	Polymer	$V(\text{PEL}) /$ mL	$V(\text{NP}) /$ mL	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} /$ nm	$\Delta R_h /$ nm	$\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2} /$ nm	$\frac{\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}}{\langle 1/R_h \rangle_z^{-1}}$
1	PLL	6	4	14,5	3,1	12,2	0,84
2	Hep	6	3,5	17,3	2,8	23,8	1,38
3	PLL	6	3	24,7	7,4	27,1	1,09
4	Hep	4	2,5	27,1	2,4	34,1	1,25
5	PLL	4	2	28,7	1,6	-	-

In Abbildung 43 sind die Daten aus der statischen und dynamischen Lichtstreuung als Auftragung von $P(q)^{-1}$ bzw. R_h^{-1} gegen q^2 zu sehen. Die Ergebnisse der Lichtstreuversuche zeigen, dass die einzelnen Beschichtungsschritte frei von größeren Aggregaten durchgeführt werden. Die Mehrschichten-Komplexe besitzen nach fünf Schalen einen hydrodynamischen Radius unter 30 nm und haben damit die gewünschte Größenordnung für das Ziel dieser Arbeit – die Entwicklung eines partikulären Transfektionsmittels.

Um das Partikelwachstum beurteilen zu können, wird der jeweilige, hydrodynamische Radiusanstieg ΔR_h mit den Durchmessern der Polyelektrolyte verglichen: $d(\text{PLL}) = 4,6 \text{ nm}$ und $d(\text{Heparin}) = 7 \text{ nm}$. Allgemein sind die Schichtdicken kleiner als die Polyelektrolyt-Durchmesser (mit Ausnahme des Drei-Schichten-Komplexes), jedoch nicht klein genug, dass von einer vollständigen Polymeradsorption ausgegangen werden kann. Es handelt sich also um gequollene Schalen. Zudem scheint die Radien-Zunahme mit steigender Schalenanzahl geringer zu werden, was auf eine Komprimierung der Hülle durch Kettendurchdringung deuten würde.

Die Trägheitsradien wachsen stärker als die hydrodynamischen Radien und liegen ab der zweiten Schicht über R_h . Das ρ -Verhältnis liegt zwar nach der ersten PLL-Schicht noch unter 1 und entspricht damit einer homogenen Kugel. Es ist jedoch nach jeder weiteren Schicht durch den Einfluss der Polyelektrolythülle größer als 1.

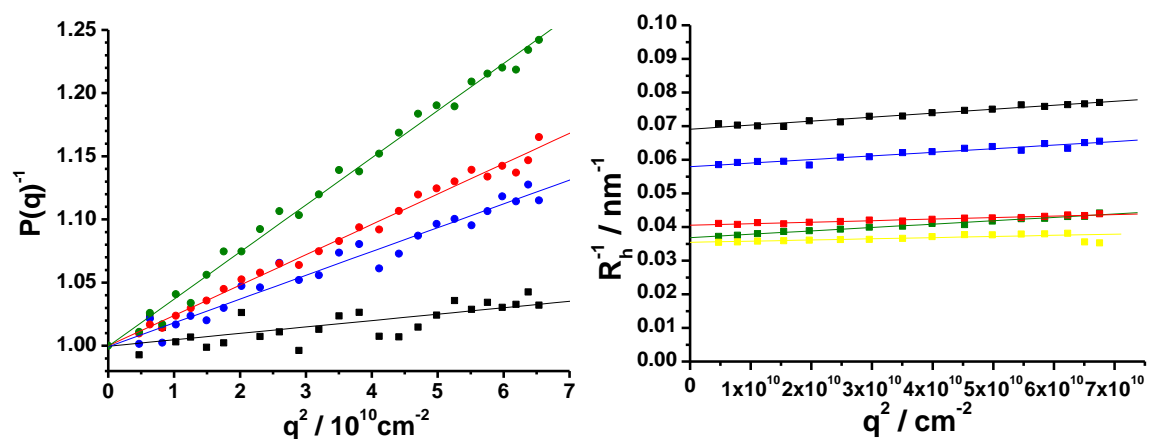


Abbildung 43

Links: Auftragung von $P(q)^{-1}$ gegen q^2 zur Ermittlung der Trägheitsradien nach jeder Schichtbildung (Daten aus SLS bei $c(\text{Partikel}) = 25 \text{ mgml}^{-1}$)

Rechts: Auftragung von R_h^{-1} gegen q^2 zur Ermittlung der hydrodynamischen Radien nach jeder Schichtbildung (Daten aus DLS bei $c(\text{Partikel}) = 25 \text{ mgml}^{-1}$)

Legende: Fe₃O₄-PLL (schwarz), Fe₃O₄-PLL-Hep (blau), Fe₃O₄-PLL-Hep-PLL (rot), Fe₃O₄-[PLL-Hep]₂ (grün) und Fe₃O₄-[PLL-Hep]₂-PLL (gelb)

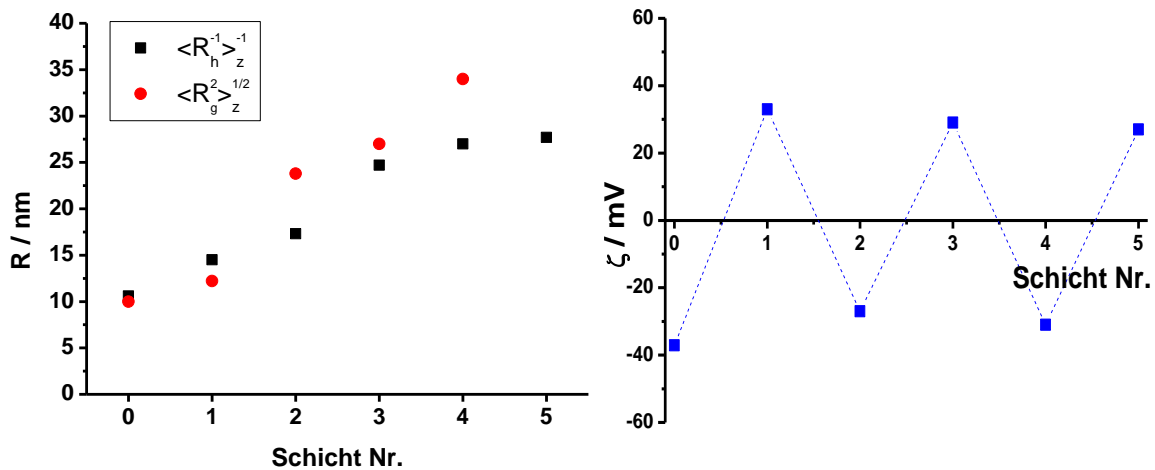


Abbildung 44

Radien (links) und Zetapotentiale (rechts) nach jeder Schicht und in MilliQ-H₂O, wobei 0 = Cit-Fe₃O₄; 1, 3 und 5 = PLL als äußere Schicht, 2 und 4 = Hep als äußere Schicht

Das Zetapotential wechselt nach jeder Schicht erwartungsgemäß sein Vorzeichen (Abbildung 44 rechts). Zum Beispiel weisen die Templat-Partikel mit Citrat-Hülle einen negativen Wert auf (0. Schicht), während die Fe₃O₄-PLL-NP stark positiv sind (1. Schicht). Hierbei sind die Potentiale nicht als absolut anzusehen, sie sollen lediglich den Vorzeichenwechsel nach jeder Schicht aufzeigen.

Mittels dynamischer Lichtstreuung soll beurteilt werden, ob mit jeder Schicht die Anzahl an Mehrkern-Komplexe steigt und sich damit die Größenverteilung der Nanopartikel verändert. Dazu werden nach jeder Schichtbildung die Autokorrelationsfunktionen (ACF) bei einem Messwinkel von 30° aufgezeichnet (Abbildung 45 links). Durch Verschiebung der Funktionen entlang der x-Achse soll überprüft werden, ob die Funktionen deckungsgleich überlagert werden können. Der dazu erforderliche individuelle Verschiebungsfaktor X_s berechnet sich als das Verhältnis der gemittelten Relaxationszeit $\bar{\tau}_5$ des Multischichten-Endpartikels und $\bar{\tau}_s$ - bestimmt aus der jeweilig entsprechenden ACF der Komplexe 1 bis 4 (Gleichung 57). Diese Relaxationszeiten werden wiederum aus den Koeffizienten b bis e der individuellen biexponentiellen Fitfunktionen der ACF berechnet (Gleichung 55 und 56). Abbildung 45 rechts belegt eindeutig, dass die verschobenen ACF nahezu ideal aufeinander liegen und die Größenverteilung nach jeder Schicht erhalten bleibt. Somit kann belegt werden, dass der Anteil an Mehrkern-Komplexe während des Gesamtprozesses nicht steigt.

$$g_1(t) = a + b \cdot \exp\left(-\frac{t}{c}\right) + d \cdot \exp\left(-\frac{t}{e}\right) \quad (55)$$

$$\bar{\tau}_s = \left(\frac{b \cdot \frac{1}{c} + d \cdot \frac{1}{e}}{b + d} \right)^{-1} \quad (56)$$

$$X_s = \frac{\bar{\tau}_5}{\bar{\tau}_s} \quad (57)$$

$\bar{\tau}_s$ mittlere Diffusionszeit mit $s = 1-5$
 $b - e$ Koeffizienten der ACF
 X_s : Verschiebungsfaktor

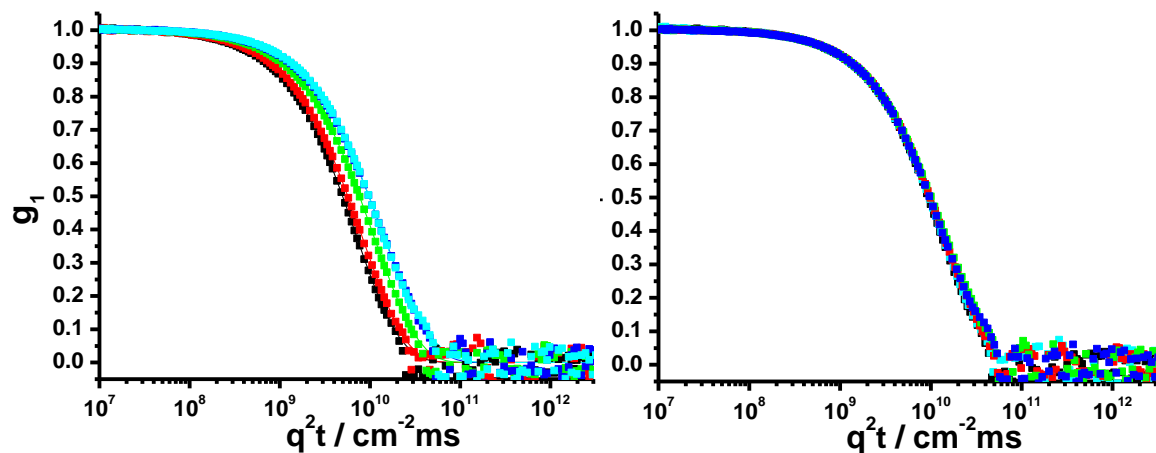


Abbildung 45

Linkes: ACF der Partikel nach jeder Schicht jeweils bei einem Messwinkel von 30°
 Rechts: ACF werden um einen Faktor X_s verschoben, sodass sie aufeinander liegen
 Legende: Fe_3O_4 -PLL (schwarz), Fe_3O_4 -PLL-Hep (rot), Fe_3O_4 -PLL-Hep-PLL (grün), Fe_3O_4 -
 $[\text{PLL-Hep}]_2$ (blau) und Fe_3O_4 - $[\text{PLL-Hep}]_2$ -PLL (türkis)

5.3.7 Zusammenfassung

Die oben beschriebene Apparatur mit Spritzenpumpe und Antidiffusionsspitze kann für das aggregatfreie *LbL*-Verfahren verwendet werden. Die Kombination aus hohem Überschuss an Polyelektrolyt ($c(\text{PLL}) = 1 \text{ gL}^{-1}$; $c(\text{NP}) = 0,025 \text{ gL}^{-1}$) und langsamer Injektionsgeschwindigkeit ($\text{SPG } 0,13 \text{ mlmin}^{-1}$) führt zu Fe_3O_4 -PLL Komplexen mit einem durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von 16 nm. Mit diesem System können 5-Schicht-Partikel Fe_3O_4 - $[\text{PLL-Hep}]_2$ -PLL gebildet werden, die aggregatfrei mit Radien von

unter 30 nm in der gewünschten Größenordnung liegen. Zudem wird ein Vorzeichenwechsel des Zetapotentials nach jeder Schicht-Bildung beobachtet, der für eine Etablierung des *LbL*-Verfahrens spricht. Die beschichteten Partikel sind nicht salzstabil und müssen modifiziert werden, um sie in ein biologisches Medium überführen zu können.

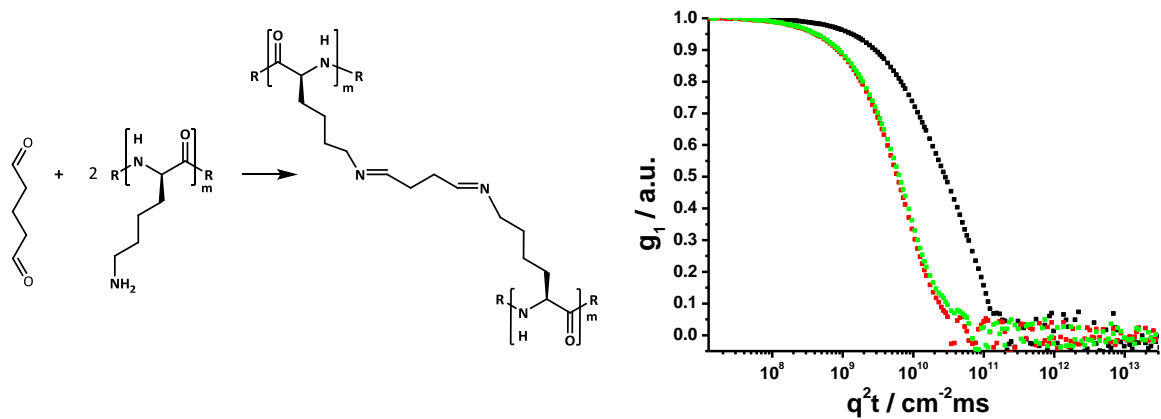
5.4 Stabilisierung durch Vernetzen der Komplexhülle

Eine Möglichkeit, die Partikel zu stabilisieren, ist ihre Hülle zu vernetzen. Zum einen wird so eine Diffusion der Polymere aus dem Komplex verhindert, zum anderen kann eine eventuelle Ladungsreduktion die Salzstabilität erhöhen. Im weiteren Verlauf werden verschiedene Methoden durchgeführt und diskutiert.

5.4.1 Vernetzen mit Glutaraldehyd

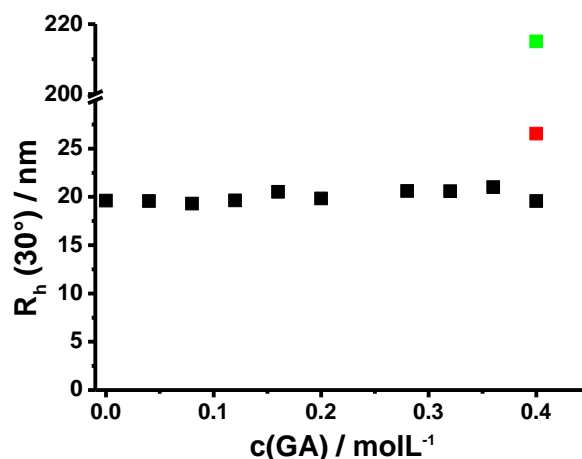
Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) trägt zwei reaktive Aldehydgruppen, die mit Amin-Gruppen zu Schiff'schen Basen (Imine) reagieren und so Netzwerke in Lysin-haltige Polymeren ausbilden können. Da Imine hydrolysiert werden können, ist eine Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid empfehlenswert⁷⁶.

Die Vernetzung der Fe_3O_4 -PLL-Komplexe mit Glutaraldehyd (GA) wird hier ohne Reduktionsphase in einer Lichtstreu-Küvette durchgeführt. DLS-Messungen werden jeweils nach Zugabe von 0,2 mmol Glutaraldehyd zu 50 μg der Nanopartikel sowie nach Zugabe von NaCl ($c_{\text{ende}}(\text{NaCl}) = 20 \text{ mmolL}^{-1}$) durchgeführt. Der Komplex-Radius verändert sich in Anwesenheit von GA minimal von 16,9 nm auf 18,1 nm, somit sind keine interpartikulären Verknüpfungen gebildet worden. Jedoch steigt R_h nach Salz-Zugabe auf 54 nm an (Abbildung 46). Das Dialdehyd hat die PLL-Hülle also nicht oder nicht ausreichend vernetzt, sodass die Komplexe durch Salz-Zugabe aggregieren.

**Abbildung 46**

Links: Reaktion von Glutaraldehyd mit zwei Amin-Gruppen zur Vernetzung von PLL; Rechts: ACF der Fe_3O_4 -PLL-Lösung vor GA-Zugabe (rot), nach Zugabe von 50 mM GA (grün) und nach Titration mit 20 mM NaCl (schwarz).

Um einen höheren Vernetzungsgrad zu erreichen, werden mehrere Parameter verändert. Zum einen wird eine höhere GA-Menge (0,8 mmol) zutitriert. Zum anderen wird der *pH*-Wert der Aldehydlösung zuvor mittels Natriumhydrogencarbonat von 5 auf 7,2 eingestellt. Wie in Abbildung 47 zu sehen, steigt der hydrodynamische Radius nach Reaktionsende um 6 nm. Obwohl hier vermutet werden kann, dass das Vernetzen eingesetzt hat, aggregieren die Partikel bei Salzzugabe auf über 200 nm. Somit hat auch hier keine Stabilisierung gegenüber niedermolekularem Salz stattgefunden.

**Abbildung 47**

Hydrodynamische Radien der Fe_3O_4 -PLL-Lösung während der Titration mit GA (schwarz), nach 24 h (rot) und nach Zugabe von 150 mM NaCl (grün)

5.4.2 Calciumchlorid zur Heparin-Stabilisierung

Heparin besitzt neben Carbonyl- auch Sulfat-Gruppen. Diese können mit Calcium Calciumsulfat-Komplexe mit einer Löslichkeitskonstante $K_L = 0,2 \text{ mmol}^2 \text{ L}^{-2}$ ausbilden. Titriert man Fe_3O_4 -PLL-Heparin-Partikel mit Calciumchlorid bis $c(\text{Ca}^{2+}) = 1,1 \text{ mmol L}^{-1}$, so kann ein leichtes Radienwachstum von 19 nm auf 21 nm beobachtet werden. Da CaCl_2 ein niedermolekulares Salz ist, besteht bei weiterer Zugabe die Gefahr der Aggregation. Auch diese Komplexe sind nicht salzstabil. Sie wachsen innerhalb von 12 h in einer 54 mM NaCl-Lösung auf 200 nm an.

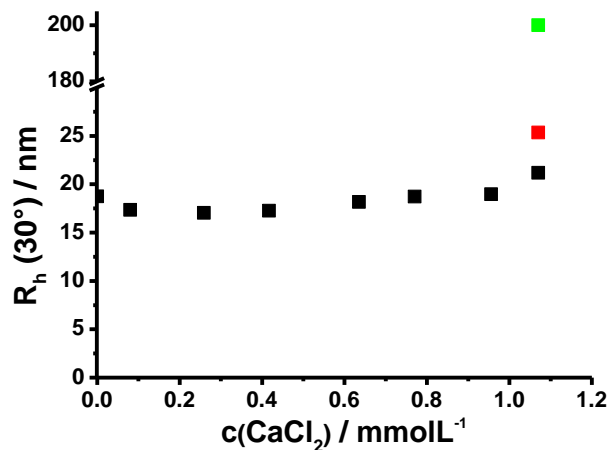
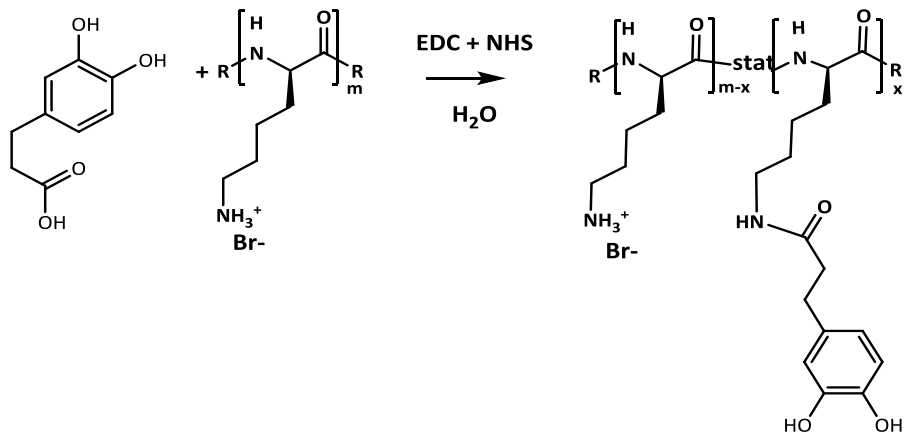


Abbildung 48

Titration mit CaCl_2 (schwarz), Zugabe von 54 mM NaCl (rot) und Inkubation für 12 h (grün)

5.4.3 Einführung eines Catechol-Ankers

Catechol-Gruppen sollen besonders gut für die Komplexierung von Eisen-Ionen geeignet sein⁷⁰. Deswegen wird PLL mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure modifiziert, sodass ein Teil der Lysine anstatt Amin-Gruppen Dihydroxyphenyl-Gruppen tragen. Die Kupplung zwischen Amin und Carboxylat erfolgt mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid.

**Abbildung 49**

Modifikation von PLL mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure durch EDC/NHS-Kupplung

Nach der Dialyse kann mittels $^1\text{H-NMR}$ der Kupplungsgrad bestimmt werden (Abbildung 50). Dazu werden die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren vor und nach Umsetzung mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure verglichen. Nach der Reaktion sind zusätzliche Signale zu beobachten: Die Signale bei 6.6 – 6.8 ppm können den drei aromatischen Protonen zugeordnet werden. Die zwei Multipletts bei 2.4 ppm und 2.8 ppm werden durch die vier aliphatischen Wasserstoffatome der Propionsäure verursacht. Aus dem Verhältnis dieser neuen Signale zu dem Polymerrückgrat-Proton bei 4.3 ppm kann ein Kupplungsgrad von 24% berechnet werden.

Das modifizierte PLL kann gemäß dem in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Konzept mittels *LbL*-Verfahren auf die $\text{Cit-Fe}_3\text{O}_4$ -Partikel aufgebracht werden. Anschließend werden die Radien der Komplexe vor und nach Zugabe von PBS-Puffer vermessen. Zunächst wird für die $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PLL}_{\text{cat}}$ -Partikel ein hydrodynamischer Radius von 19 nm erhalten. Wird diese Lösung mit PBS-Puffer im Verhältnis 1 zu 1 verdünnt, so steigt R_h nach 24 h auf 58 nm an. Somit sind die Partikel nicht in ein biologisches Medium überführbar.

Ein höherer Grad an Catechol-Gruppen ist nicht sinnvoll, denn dadurch würde die Anzahl an positiven Ladungen stark gesenkt und die nachfolgende Heparin-Komplexierung erschwert werden.

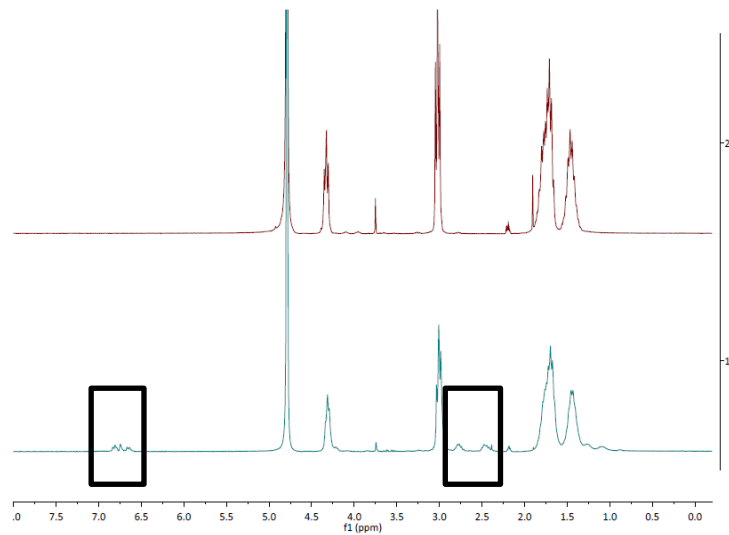


Abbildung 50

¹H-NMR-Spektren von Polylysin vor (rot) und nach (blau) Umsetzung mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure

5.4.4 Zusammenfassung

Vernetzung der PLL-Schicht mit Glutaraldehyd in verschiedenen Konzentrationen und *pH*-Werten sowie der Versuch, die Heparin-Schale mit Ca²⁺ Ionen zu stabilisieren, ändern die Größe der Komplexe nur wenig, stabilisieren aber auch nicht gegen niedermolekulares Salz.

Das Modifizieren von Polylysin mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure, um Catechol-Gruppen zu erhalten, kann mittels ¹H-NMR bestätigt und der Kupplungsgrad zu 25% bestimmt werden. Die Komplexierung von PLL_{cat} an negativ geladene Eisenoxid-Template liefert ebenfalls nicht die gewünschte Salzstabilität.

5.5 Stabilisierung der polymeren Mehrschichtpartikel durch Polyethylenglykol

Da die im Kapitel 5.4 beschriebenen Partikel-Modifikationen nicht erfolgreich sind, soll in diesem Abschnitt auf die sterische Stabilisierung mittels Polyethylenglykol (PEG) eingegangen werden. Da PEG kein Polyelektrolyt ist, kann es nicht mittels *Layer-by-Layer*-Verfahren auf die letzte Schicht der Komplexe aufgebracht werden. Wird es jedoch an ein Makroion chemisch gebunden, so kann dieses PEG-Polyelektrolyt-Addukt die letzte und damit stabilisierende Schicht bilden.

5.5.1 Stabilisierung mit *Block-co*-Polymeren

Zunächst werden lineare *Block-co*-Polymere aus Polyethylenglykol und Poly-L-Lysin mit unterschiedlichen *Block*längen verwendet. Ihre Synthese erfolgt in Zusammenarbeit mit Dr. ██████████ ausgehend von Lysin-NCA und käuflich erworbenem PEG-NH₂.

Tabelle 10

Übersicht über PEG_x-*block*-PLL_y-Polymere (x = PEG-Molmasse/1000 gmol⁻¹, y = PLL-Molmasse/1000 gmol⁻¹) mit Polymerisationsgrad P_w und Molmasse M_w der Blöcke, wobei die PEG-Daten den Herstellerangaben entsprechen. Die Angaben des PLL-*Blocks* werden aus dem Ansatz berechnet.

Polymer	$M_w(\text{PLL}) / \text{gmol}^{-1}$	$P_w(\text{PLL})$	$M_w(\text{PEG}) / \text{gmol}^{-1}$	$P_w(\text{PEG})$
PEG ₅ - <i>block</i> -PLL ₁₄	14000	60	5000	114
PEG ₅ - <i>block</i> -PLL ₇	7000	30	5000	114
PEG ₅ - <i>block</i> -PLL ₃	3000	13	5000	114
PEG ₁₀ - <i>block</i> -PLL ₆	6000	30	10.000	161

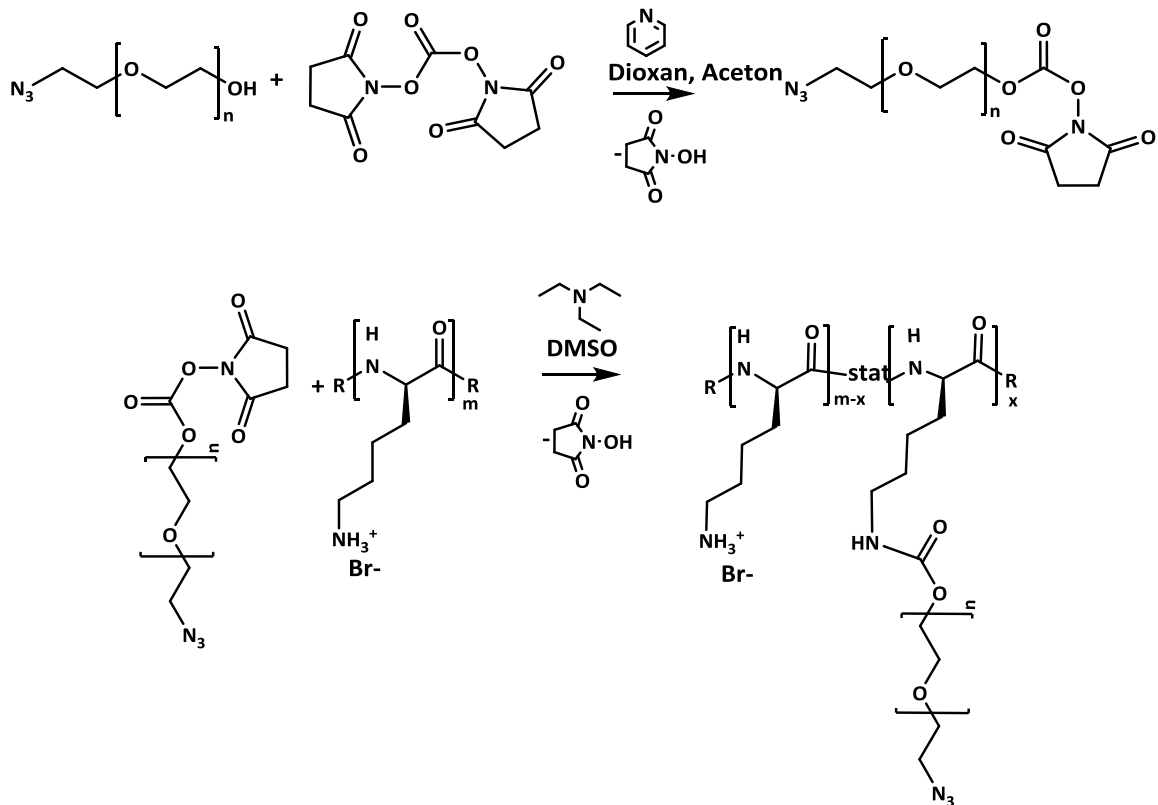
Das erste Polymer PEG₅-*block*-PLL₁₄ besteht aus 60 Wiederholungseinheiten Lysin und entspricht damit dem oben erwähnten, käuflich erworbenen PLL (SIGMA Aldrich). Die negativ geladenen Cit-Fe₃O₄ werden mit diesem *Block-co*-Polymer nach beschriebener Methode beschichtet und mit Natriumchlorid titriert. Die Zugabe von 150 mM NaCl liefert zunächst einen Radius von 58 nm, was dem Dreifachen der NP-PLL-Partikel entspricht. Dieser steigt mit der Zeit, sodass bereits nach einem Tag Aggregate mit einem Radius über 300 nm entstehen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Verhältnis von PEG zu PLL zu klein ist, um einen ausreichenden sterischen Schutz zu gewährleisten.

Zur Erhöhung des PEG-Gehalts werden die PLL-Wiederholungseinheiten zunächst auf 30, dann auf 13 verringert. Zuletzt wird eine höhere PEG-Molmasse von 10.000 g mol⁻¹ verwendet. Keiner dieser Versuche führt zu NP-Polymer-Komplexen, die bei Zugabe von 150 mM NaCl stabil bzw. langzeitstabil sind.

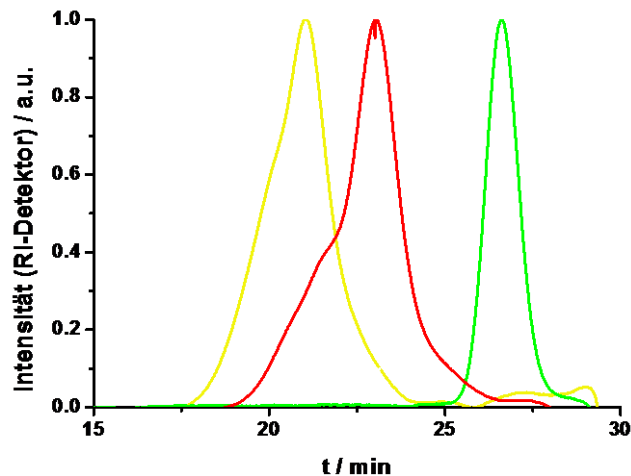
5.5.2 Synthese kammartiger PEG-*g*-PLL-Polymere

Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der PEG-Dichte ist das Aufpfropfen von Polyethylenglykol an die Poly-*L*-Lysin-Seitenketten. Dazu wird käuflich erworbenes PEG zum entsprechenden NHS-Ester umgesetzt⁷⁷ und an die Aminogruppen der Lysin-Seitenketten konjugiert⁴⁸, wobei ein beliebiger Konjugationsgrad eingestellt werden kann. Zusätzlich können die PEG-Ketten eine Azid-Endgruppe tragen, die für eine kupferfreie Click-Chemie Verwendung finden kann.

Die Aufreinigung des Produkts von überschüssigem PEG wird durch Dialyse gegen MilliQ-H₂O durchgeführt und mittels wässriger GPC kontrolliert. Wie in Abbildung 51 zu sehen ist, besitzt das PLL-Signal eine Schulter. Die N₃-PEG-*g*-PLL-Probe hat ein ähnliches Chromatogramm, das jedoch zu höheren Molekulargewichten verschoben ist, und weist keinen Peak bei der Elutionszeit von reinem N₃-PEG auf. Damit ist das Produkt frei von Edukten. Da PLL nicht wechselwirkungsfrei eluiert, kann weder für die Edukte noch für das Produkt eine genaue Molmasse mittels GPC ermittelt werden.

**Abbildung 51**

Modifikation von PEG mit Di-(N,N'-succimidyl)-carbonat zu einem NHS-Ester und anschließender Konjugation an den Seitenketten von PLL

**Abbildung 52**

Normiertes GPC-Chromatogramm von N₃-PEG (grün), PLL (rot) und N₃-PEG-g-PLL nach Dialyse (blau) in H₂O:ACN = 1:1 mit 0,15 % TFA, Fluss 0,7 mlmin⁻¹, NOVEMA Säulen

Der Pfropfungsgrad $[\gamma]$ des kammartigen Polymers kann mittels NMR abgeschätzt werden (Abbildung 53). Dazu werden PEG-NHS, PLL und das Produkt PEG-*g*-PLL in D₂O gelöst und ihre ¹H-NMR-Spektren aufgenommen. Die sechs Protonen der PLL-Seitenkette $-(CH_2)_3-$ bilden bei einer Verschiebung von 1.3 - 1.9 ppm ein Multipllett. Dieses kann integriert und in Verhältnis zu den vier Ethylenoxid-Protonen $-(CH_2-CH_2-O)-$ bei 3.5 - 3.8 ppm gesetzt werden, um so das Verhältnis von PEG zu Lysin-Monomeren zu ermitteln.

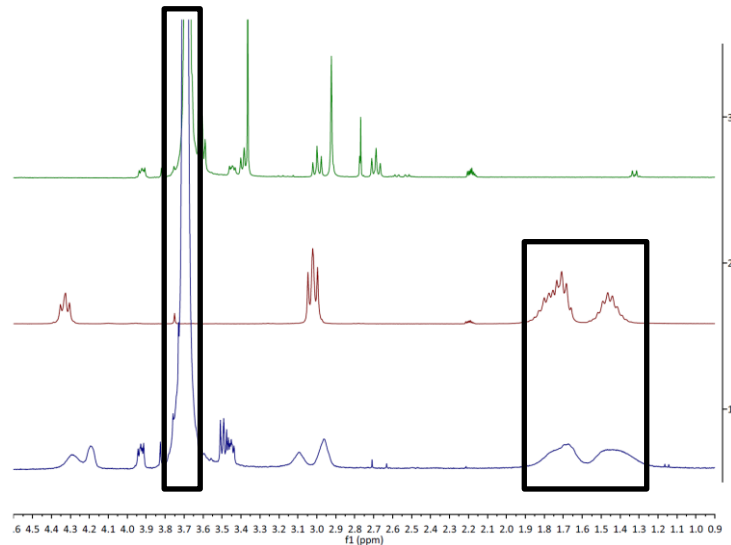


Abbildung 53

Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von PEG-NHS (grün), PLL (rot) und PEG_x-g_y-PLL_z (blau) in D₂O bei 300 Hz

Der erfolgreiche Umsatz lässt sich auch mittels IR-Messung nachweisen. Ein Vergleich der Spektren von reinem PLL mit PEG-*g*-PLL (Abbildung 54 links) zeigt die nach der Pfropfung entstandene Bande mit einem Maximum von 1100 cm⁻¹. Sie kann der antisymmetrischen Valenzschwingung der C-O-C-Ether-Gruppen zwischen 1140 cm⁻¹ bis 1070 cm⁻¹ zugeordnet werden. Zudem kann im IR-Spektrum des Polymers N₃-PEG-*g*-PLL eine schwache Azid-Bande bei 2100 cm⁻¹ beobachtet werden (Abbildung 54 rechts).

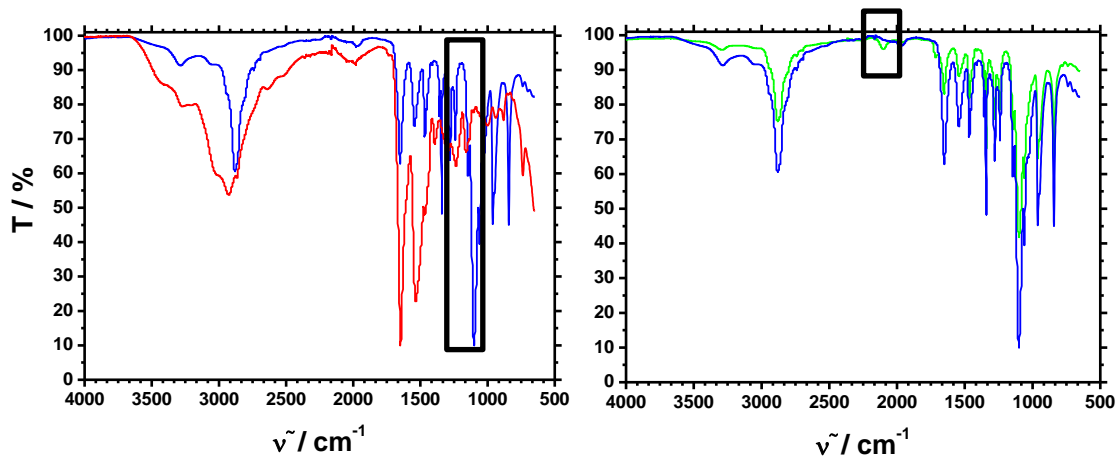


Abbildung 54

IR-Spektren von PLL (rot, links), PEG-*g*-PLL (blau, links und rechts) und N₃-PEG-*g*-PLL (grün, rechts), gemessen als Feststoffe

Ausgehend von den käuflich erworbenen Polymeren PLL (SIGMA Aldrich) und PEG (SIGMA Aldrich) bzw. N₃-PEG (Iris-Biotech) werden verschiedene PEG_{*x*}-*g*_[*y*]-PLL_{*z*}-Polymere (*x* = PEG-Molmasse/1000 g mol⁻¹, [*y*] = Pfropfdichte/%, *z* = PLL-Molmasse/1000 g mol⁻¹) synthetisiert. In Tabelle 11 sind beispielhaft vier dieser Polymere aufgeführt.

Als Rückgrat wird jeweils PLL mit einer Molmasse von 26900 g mol⁻¹ verwendet und das Aufpfropfen wird mit Polyethylenglykol durchgeführt, das teilweise eine Azid-Funktionalisierung trägt. Das erste kammartige Polymer PEG₂-*g*_[65]-PLL₂₇ trägt zu 65 % PEG Seitenketten, d.h. 2 von 3 Lysin-Monomere sind modifiziert. Die Polymere 2 bis 4 sind dagegen nur noch zu 25% – 35% gepfropft, also trägt nur jede dritte bis vierte Lysin-Gruppe ein PEG. Die Molmassen aller Kammpolymere lassen sich aus der Molmasse und dem Polymerisationsgrad von PLL, der Pfropfdichte [*y*] und der Molmasse von PEG abschätzen (Gleichung 58). Die erhaltenen Werte sind ebenfalls in Tabelle 11 zu sehen.

$$M_w(\text{Bürste}) = 26900 \text{ g mol}^{-1} + \frac{[y]}{100} * 118 * M_n(\text{PEG}) \text{ g mol}^{-1} \quad (58)$$

Die PLL-Molmasse und der entsprechende Polymerisationsgrad werden durch statische Lichtstreuung (Abschnitt 5.3.1), die Molmasse der PEG-Polymere mittels GPC bestimmt.

Tabelle 11

Mit und ohne Azid-Endgruppen synthetisierte $\text{PEG}_x\text{-g}_{[y]}\text{-PLL}_z$ (x = PEG-Molmasse/1000 g mol^{-1} , $[y]$ = Pfropfdichte/% , z = PLL-Molmasse/1000 g mol^{-1}) mit Molmassen der Edukt- und Produkt-Polymere sowie die jeweiligen Pfropfdichten (aus NMR), d.h. prozentualer Anteil der mit PEG funktionalisierten Lysin-Seitenketten

Polymer	Firma (PEG)	$M_w(\text{PLL}) / \text{g mol}^{-1}$	$M_w(\text{PEG}) / \text{g mol}^{-1}$	Pfropfdichte	$M_{w,ges} / \text{g mol}^{-1}$
$\text{PEG}_2\text{-g}_{[65]}\text{-PLL}_{27}$	SIGMA	26.900	2000	65%	180.000
$\text{PEG}_2\text{-g}_{[27]}\text{-PLL}_{27}$	SIGMA	26.900	2000	27%	90.600
$\text{N}_3\text{-PEG}_{3,2}\text{-g}_{[34]}\text{-PLL}_{27}$	Iris-Biotech	26.900	3.200	34%	155.300
$\text{N}_3\text{-PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27}$	Iris-Biotech	26.900	3.200	26%	125.000

5.5.3 Salzstabilität der mit PEG-g-PLL beschichteten Nanopartikel

$\text{PEG}_x\text{-g}_{[y]}\text{-PLL}_z$ als erste Schicht

Die negativ geladenen Cit- Fe_3O_4 werden mit den jeweiligen kammartigen Polymeren nach beschriebener Methode beschichtet, wobei jeweils 1 mL an Nanopartikeln ($c = 0,025 \text{ g L}^{-1}$) zu 4 ml einer 4 g/L Polymerlösung zugegeben wird. Nach magnetischer Abtrennung werden sie mittels DLS untersucht. Anschließend wird die Nanopartikel-Lösung in der Küvette entweder mit NaCl titriert, sodass eine Salzkonzentration von 0,15 M erreicht wird, oder mit dem gleichen Volumen an PBS-Puffer (pH=7,4; 0,15 M NaCl) versetzt. Die Radien vor und nach der Salzzugabe sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Alle Polymer-Partikel-Komplexe sind unabhängig von der Pfropfdichte oder der Azid-Funktionalisierung sowohl in 150 mM NaCl-Lösung als auch in PBS-Puffer verdünnt langzeit-salzstabil. Der hydrodynamische Radius der $\text{PEG}_2\text{-g}_{[65]}\text{-PLL}_{27}$ -Nanopartikel wächst nach Zugabe von PBS-Puffer und einer 22-tägigen Inkubation lediglich von 17 nm auf 18,5 nm, was im Fehlerbereich liegt. Die Radien aller anderen Polymer-Komplexe

werden nach der Salzzugabe etwas kleiner, sodass sie im Mittel zwischen 18 nm und 21 nm liegen. Am Beispiel des N_3 -PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ soll der Radien-Zuwachs mit dem hydrodynamischen Polymer-Durchmesser verglichen werden: $D_h(N_3\text{-PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27})$ ist 20 nm, während der Zuwachs ΔR_h des entsprechenden Nanopartikel-Komplexes 6,6 nm beträgt.

Tabelle 12

Hydrodynamische Radien der mit PEG_x-g_[y]-PLL_z beschichteten Fe₃O₄-Nanopartikel bei einem Streuwinkel von 30° vor und nach Salzzugabe (150 mM NaCl oder 1 zu 1 in PBS-Puffer verdünnt) sowie nach x Tagen (+xT)

Polymere Schicht	R_h (30°) / nm	R_h (30°) +NaCl / nm	R_h (30°) +NaCl / nm	R_h (30°) +PBS / nm	R_h (30°) +PBS / nm
PEG ₂ -g _[65] -PLL ₂₇	17	16,8	16,7 (+9T)	18,4	18,5 (+22T)
PEG ₂ -g _[27] -PLL ₂₇	21,5	17,2	18,2 (+6T)	-	-
N ₃ -PEG _{3,2} -g _[34] -PLL ₂₇	24,5	-	-	21,5	20,9 (+7T)
N ₃ -PEG _{3,2} -g _[26] -PLL ₂₇	21	-	-	18	18,1 (+7T)

Die PEG₂-g_[27]-PLL₂₇-Nanopartikel werden zudem von XXXXXXXXXX in Serum gemessen (Abbildung 55). Die Auswertung der 30°-Messung wird mit einem [tri- + biexponentiellen] Fit durchgeführt, der die Koeffizienten des Serums sowie die der Nanopartikel enthält. Das Residuum zeigt, dass die Komplexe nahezu aggregatfrei bleiben und somit auch in Serum stabil sind.

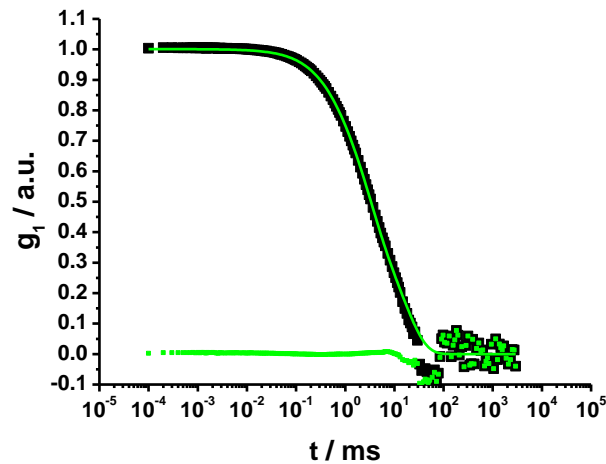


Abbildung 55

ACF der PEG₂-g_[27]-PLL₂₇-NP in Serum bei 30° (schwarz) mit [tri- + biexponentieller] Fit und daraus folgendem Residuum (grün)

PEG₂-g_[27]-PLL₂₇ als dritte Schicht

Als nächstes werden 2-Schicht-Partikel (Fe₃O₄-PLL-Hep) mit PEG₂-g_[27]-PLL₂₇ zu einem 3-Schalen-Komplex umgesetzt. Der hydrodynamische Radius wächst zwar nach der dritten Schicht um 10 nm, bleibt aber in Gegenwart von 150 mM NaCl (Tabelle 13) über 5 Tage stabil. Hier ist der Anstieg der Radien von der zweiten zur dritten Schale mit 10 nm größer als das Wachstum des Partikels Fe₃O₄-[PEG₂-g_[27]-PLL₂₇] (S. 89).

Tabelle 13

Hydrodynamische Radien bei 30° von 2-Schicht-Partikeln (Fe₃O₄-PLL-Hep) vor und nach Beschichtung mit PEG₂-g_[27]-PLL₂₇ sowie nach Zugabe von 150 mM NaCl

Komplex	<i>R_h</i> (30°) / nm
Fe ₃ O ₄ -PLL-Hep	20,1
Fe ₃ O ₄ -PLL-Hep-[PEG ₂ -g _[27] -PLL ₂₇]	30,4
Fe ₃ O ₄ -PLL-Hep-[PEG ₂ -g _[27] -PLL ₂₇] + 150 mM NaCl	30,6
Fe ₃ O ₄ -PLL-Hep-[PEG ₂ -g _[27] -PLL ₂₇] + 150 mM NaCl, + 5T	32

Wie in Abbildung 56 zu sehen, sind die Fe_3O_4 -PLL-Hep-[PEG₂-*g*_[27]-PLL₂₇]-Partikel auch gegen Salzsäure resistent: Bei einem *pH* von 1,2 bzw. einer HCl-Konzentration von 82 mM ist R_h (30°) mit 32 nm um lediglich 2 nm gewachsen.

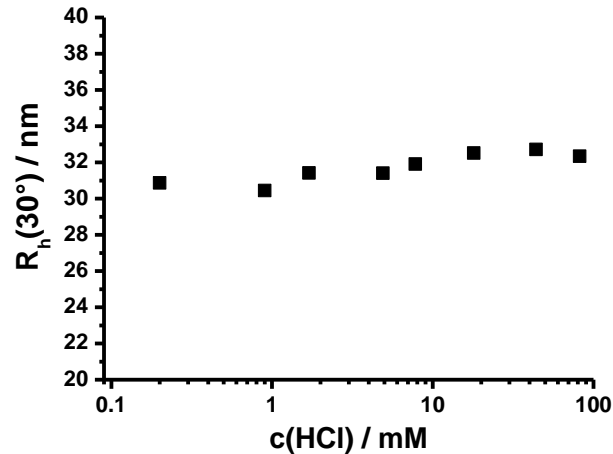


Abbildung 56

Hydrodynamischer Radius der Fe_3O_4 -PLL-Hep-[PEG₂-*g*_[27]-PLL₂₇] Komplexe nach Titration mit Salzsäure

5.5.4 Zusammenfassung

Block-co-Polymere PEG_x-*block*-PLL_y mit verschiedenen PEG zu PLL Verhältnissen können die Ladungen der Cit- Fe_3O_4 nicht ausreichend abschirmen, um sie gegen Salz-bedingte Aggregation zu schützen. Wird das Polyethylenglykol jedoch aufgepfropft, so entstehen kammartige PEG-*g*-PLL Polymere, die zur Stabilisierung verwendet werden können. Dies ist auch unabhängig davon, ob die PEG-Ketten Azid-Endgruppen zu kupferfreien Click-Chemie tragen oder nicht. Die PEG-*g*-PLL-NP-Komplexe sind in 150 mM NaCl-Lösung, in PBS-Puffer und in Serum stabil bzw. weisen vernachlässigbare Aggregatbildung auf. Eingesetzt als dritte Schicht liefern diese Polymere ebenfalls salzstabile 3-Schalen-Komplexe, deren Radius sogar bei *pH* = 1,2 konstant bleibt.

5.6 Komplexierung von siRNA

5.6.1 Analyse der verwendeten siRNA-ATTO565

Drei Voraussetzungen für die Herstellung eines polymeren Mehrschichtpartikels zum Transport von Nukleinsäuren sind erfüllt worden:

- Synthese uniformer, magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel als Trägersystem
- Erfolgreiche Etablierung eines *LbL*-Verfahrens mit käuflich erworbenen Polyelektrolyten
- PEGylierung von Poly-*L*-Lysin zur Stabilisierung in Salz-haltigen Medien.

Der nächste Schritt zur Bildung eines Transfektionsmittels ist die Komplexierung einer Nukleinsäure. Dafür wird eine siRNA verwendet, die eine Herunterregulierung der GFP-Expression (*green fluorescent protein*) initiiert. Sie besteht aus 22 Basenpaaren und ist am Leitstrang mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO565 modifiziert. Die Molmasse M_w beträgt 14.884,56 g mol⁻¹.

Vor der Verwendung im *LbL*-Verfahren wird überprüft, in welchem Volumen-Verhältnis der Stammlösung die Einzelstränge hybridisiert werden müssen. Dazu wird der Leitstrang (*sense*) mit unterschiedlichen Volumina des Gegenstrangs (*antisense*) in Gegenwart von PBS bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgt mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).

Das Gel wird zunächst ohne Färbung bei einer Wellenlänge von 533 nm gescannt, um den Farbstoff ATTO565 anzuregen. Anschließend wird das Gel mit *SYBR® Gold* gefärbt und wieder gescannt (Abbildung 57). Vor dem Färben ist in jeder Probe (1-7) die hybridisierte siRNA sowie die Kontrollbande mit dem Leitstrang (s) zu sehen. Zudem enthalten Probe 1 und 2 freien Leitstrang-ATTO565. Durch Anfärben mit *SYBR® Gold* wird der nichtmarkierte Strang und damit der *antisense*-Überschuss in den Proben 5-7 sichtbar. Aus dem Vergleich beider Aufnahmen ist zu schließen, dass die Einzelstränge aus der Stammlösung in einem Volumen-Verhältnis von 1 : 1 hybridisiert werden können.

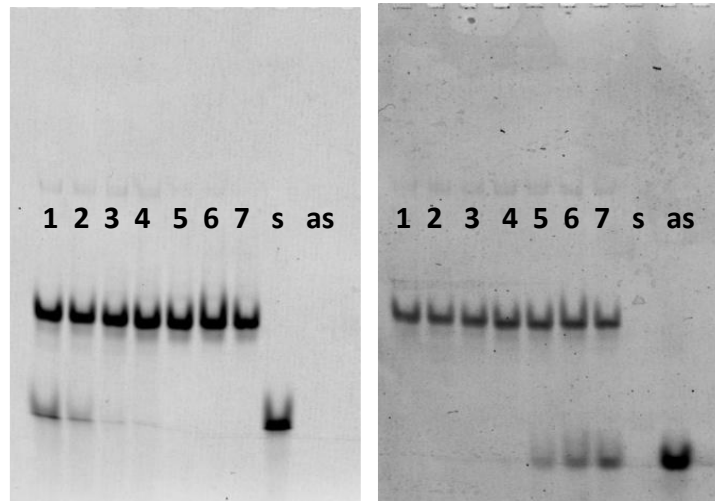


Abbildung 57

15 % Native PAGE (20 °C, 11 W, 385 V, TBE-Puffer, 3h) der hybridisierten siRNA vor (links) und nach Färben (rechts) mit SYBR® Gold. Die Proben 1 - 7 entsprechen den Volumen-Verhältnissen 0,7 - 1,3; zur Kontrollen werden zudem s = *sense* und as = *antisense* aufgetragen.

Die siRNA wird zudem mittels DLS untersucht. Wird die Probe mit einem 450 nm Filter staubfrei filtriert, weist sie eine bimodale Verteilung auf mit $R_h = 8,3$ nm (**Abbildung 58**). Verwendet man jedoch einen Anotop-Filter mit einer Porengröße von 20 nm, so wird ein Radius von 3,5 nm erhalten. Dieser Wert entspricht der siRNA-Molmasse von ca. 15.000 gmol^{-1} . Die Konzentration der unfiltrierten siRNA ist niedrig und wird durch eine Anotop-Filtration weiter gesenkt. Somit ist das Signal zu Rausch – Verhältnis niedrig und die Basislinie fehlerbehaftet (schwarze Auftragung). Die Mode bei hohen Diffusionszeiten kann monoexponentiell mit einem $R_h = 7000$ nm gefittet werden (grauer Fit) und ist durch Messfehler verursacht.

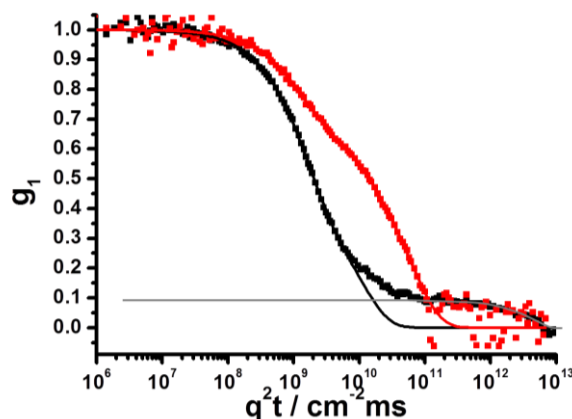


Abbildung 58

ACF der hybridisierten siRNA nach der Filtration mit LCR 450 nm (rot) und mit Anotop 20 nm (schwarz), gemessen in PBS-Puffer bei einem Winkel von 30°

5.6.2 siRNA-Komplexierung durch Fe₃O₄-PLL-Partikeln

Für das *LbL*-Verfahren muss die Hybridisierung der Einzelstränge ohne Salz durchgeführt werden, da die Partikel bei einer anschließenden Beschichtung aggregieren würden. Dazu wird mit einem *Oligonucleotide Properties Calculator*⁷⁸ die Schmelztemperatur T_M bei Abwesenheit von Salz berechnet. Der erhaltenen Wert $T_M = 54\text{ °C}$ wird als Hybridisierungstemperatur verwendet. Hier kann nicht mittels Gelelektrophorese gezeigt werden, ob die Hybridisierung erfolgreich ist. Für die PAGE ist nämlich ein Laufpuffer notwendig, der einzeln vorliegende Stränge hybridisieren würde.

Die Komplexierung der negativ geladenen, doppelsträngigen siRNA erfolgt mit dem *LbL*-Verfahren an zuvor synthetisierten Fe₃O₄-PLL-Partikeln. Dabei ist die Nukleinsäurekonzentration mit $0,744\text{ gL}^{-1}$ (0,05mM) etwas niedriger als die üblich verwendete Polyelektrolyt-Konzentration. Die Radien der Komplexe vor und nach siRNA-Beschichtung sind in Tabelle 14 aufgeführt. Der hydrodynamische Radius des Einschicht-Partikels ist mit 20,8 nm größer als der durchschnittliche Fe₃O₄-PLL-Radius von 16 nm – 18 nm. Die Komplexierung mit siRNA lässt diesen aggregatfrei auf 23,4 nm anwachsen. Zudem ist die Partikel-Lösung nach Magnetfällung und 3 x Waschen mit MilliQ-H₂O schwach violett gefärbt und fluoresziert unter UV-Licht. Dies deutet auf eine erfolgreiche siRNA-Komplexierung hin.

Tabelle 14

Hydrodynamische Radien vor und nach Komplexierung mit siRNA

Komplex	R_h (30°) / nm
Fe ₃ O ₄ -PLL-	20,8
Fe ₃ O ₄ -PLL-siRNA	23,4

5.6.3 Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen an Fe₃O₄-PLL-siRNA

Nun muss die Frage geklärt werden, ob sich die siRNA tatsächlich im Komplex befindet. Dazu wird mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) die Diffusionszeit der reinen siRNA-ATTO565 mit der Diffusion der Fe₃O₄-PLL-siRNA-Partikel verglichen. Wie in Abbildung 59 zu sehen, weichen die ACF beider Proben kaum voneinander ab, somit sind auch die Diffusionskoeffizienten nahezu identisch. Nach Farbstoff-Kalibrierung wird jeweils ein hydrodynamischer Radius von ca. 2 nm erhalten, welcher der reinen siRNA-ATTO565 entspricht. Es werden in der Lösung also keine Komplexe aus Nanopartikeln und siRNA detektiert.

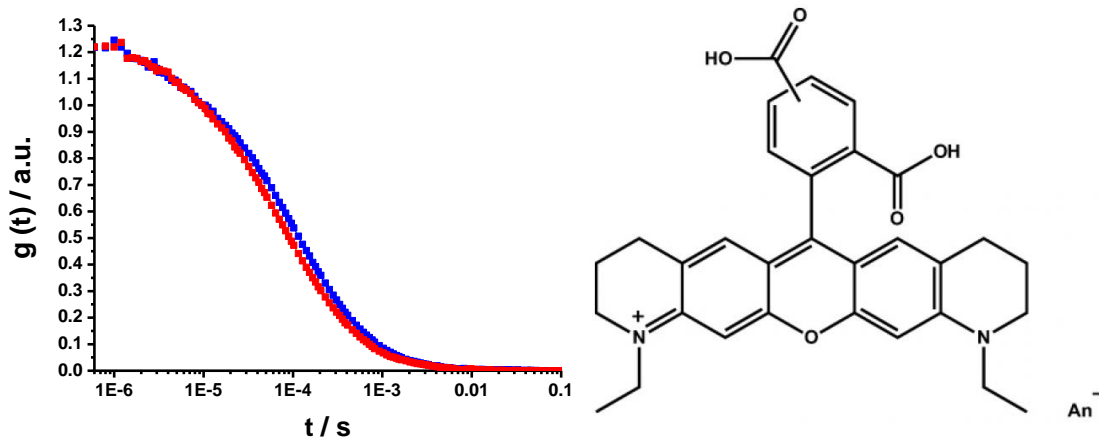


Abbildung 59

Links: ACF der FCS-Messung - Vergleich von reiner siRNA (blau) mit der Probe Fe₃O₄-PLL-siRNA (rot)

Rechts: Struktur von ATTO565

Es gibt zwei mögliche Erklärungen, warum mittels FCS keine Komplexe detektierbar sind:

- Die siRNA wird nicht komplexiert
- Die Farbstoff-Fluoreszenz wird im Komplex ausgelöscht (*quenching*) - *Quenching* kann entweder durch den Eisenoxid-Kern oder durch die Nähe der Fluorophore zueinander verursacht werden (Konzentrationsauslöschung).

Zur Überprüfung dieser Thesen werden die Fe_3O_4 -PLL-siRNA-Nanopartikel mit Salzsäure zerstört und mittels UV/VIS - sowie Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Vor dem Zersetzen zeigen die Fe_3O_4 -PLL-siRNA-Partikel eine Absorption von $A_{569} = 0,026$ (Abbildung 60). Dies entspricht einer Farbstoffkonzentration von $0,4 \mu\text{M}$. Da das Verhältnis siRNA-Molekül zu Fluorophor 1 : 1 beträgt, beträgt die siRNA-Konzentration ebenfalls $0,4 \mu\text{M}$. In dem Reaktionsvolumen von 1 mL sind somit 400 pmol siRNA und 3 pmol Nanopartikel (errechnet aus $c(\text{Komplexe}) = 25 \text{ mgL}^{-1}$, $V(\text{Komplexe}) = 1 \text{ mL}$). Nach einstündiger Inkubation in 2 M HCl-Lösung ist A_{569} lediglich auf 0,024 gesunken. Die Absorptions-änderung beträgt 7 % und liegt im Fehlerbereich der Messung. Somit hat die Salzsäure keinen Einfluss auf die Absorption des Farbstoffs und kann nachfolgend bei der Fluoreszenzanalyse eingesetzt werden.

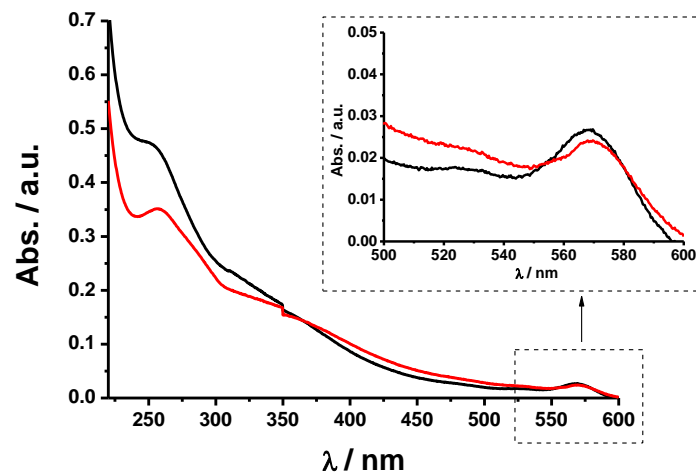


Abbildung 60

UV/VIS-Absorption der Fe_3O_4 -PLL-siRNA-Partikel vor (schwarz) und nach Zugabe (rot) von HCl, d.h. $c(\text{HCl, Küvette}) = 2 \text{ M}$ und $c(\text{Komplexe}) = 25 \text{ mgL}^{-1}$

Betrachtet man die Fluoreszenzspektren (Abbildung 61), so ist nach HCl-Zugabe die Intensität weiter gesunken. Ein Anstieg der Fluoreszenz nach Zerstörung der Partikel würde für das Freisetzen der siRNA-Moleküle aus dem Komplex und damit eine interne Fluoreszenzauslöschung sprechen. Da aber hier die Farbstoff-Intensität sinkt, kann ein *quenching* nicht nachgewiesen werden. Zudem weisen die Spektren jeweils einen starken Peak bei der Wellenlänge des Anregungs- bzw. Emissionslichts auf. Dabei handelt es sich um die *Rayleigh*-Streuung (elastische Streuung) an kolloidalen Partikeln.

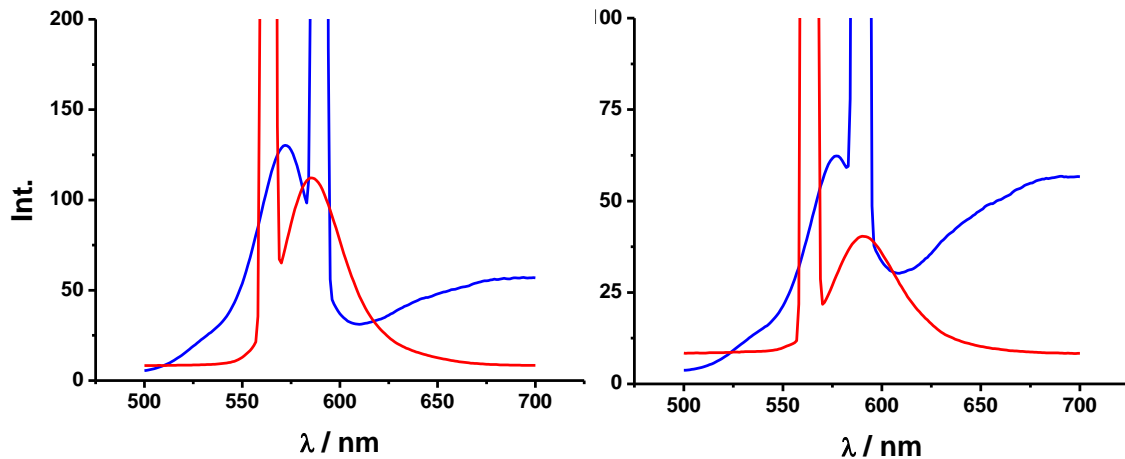


Abbildung 61

Fluoreszenzspektren der Fe_3O_4 -PLL-siRNA-Partikel vor (links) und nach Zugabe (rechts) von HCl. Das Anregungsspektrum ist jeweils blau, die Emission rot dargestellt.

5.6.4 Zusammenfassung

Um aus dem *LbL*-Modellsystem ein Transfektionsmittel zu entwickeln, wird in diesem Schritt die siRNA-Komplexierung an Fe_3O_4 -PLL-Partikel untersucht. Zuvor werden die RNA-Einzelstränge salzfrei hybridisiert und per Amicon-Filtration aufgereinigt. Es entstehen aggregatfreie Komplexe und die Lösung fluoresziert unter UV-Licht. Jedoch werden mittels FCS nur Diffusionskoeffizienten detektiert, die der freien siRNA entsprechen.

Somit muss nun geklärt werden, ob die siRNA nicht komplexiert wird oder ob seine Fluoreszenz durch den Eisenoxid-Kern gelöscht wird. Durch die Zersetzung der Fe_3O_4 -PLL-siRNA-Komplexe mit HCl soll gezeigt werden, ob ein *quenching* vorliegt. Nach Inkubation mit Salzsäure ist im Emissions-Spektrum jedoch kein Anstieg der Farbstoff-Intensität bzw. der siRNA-Konzentration zu beobachten. Da siRNA kostenintensiv ist, werden die weiteren Untersuchungen mit farbstoffmarkiertem Poly-L-Lysin durchgeführt.

5.7 Farbstoffmarkiertes N_3 -PEG-*g*-PLL - Polymer

Das PEGylierte und Azid-modifizierte Polymer N_3 -PEG_{3,2}-*g*[₂₆]-PLL₂₇ wird mit dem Farbstoff DBCO-PEG₄-5/6-Carboxyrhodamin 110 (DBCO-CR₁₁₀) umgesetzt. Die [3+2] Cycloaddition von Cyclooctin mit der Azid-Gruppe zum Triazolen kann kupferfrei und bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

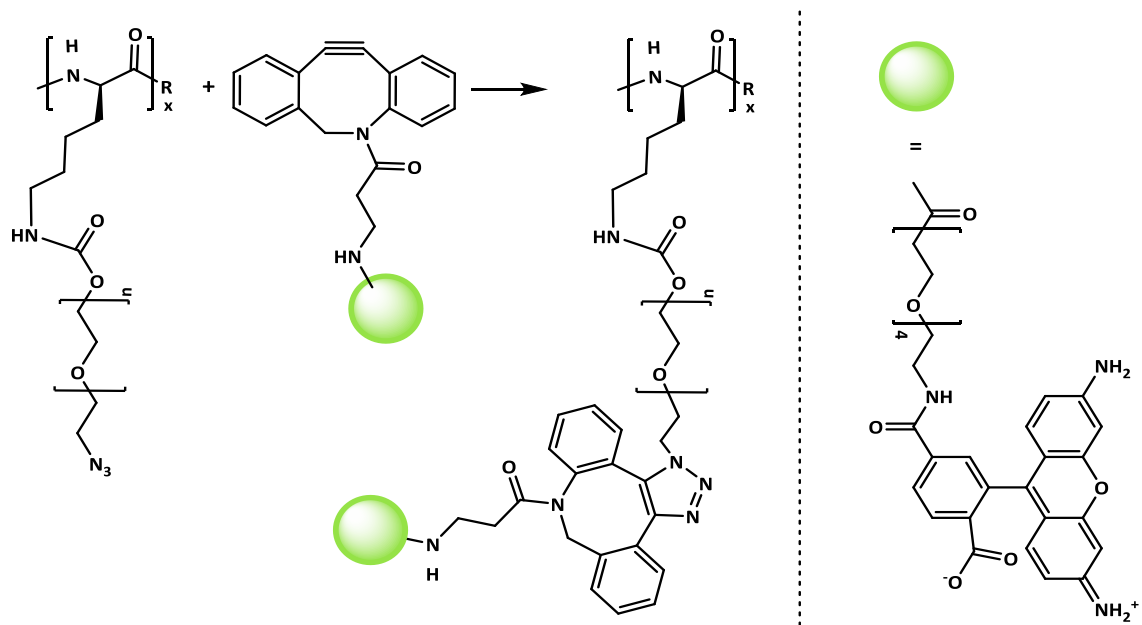


Abbildung 62

Kupferfreie Click-Chemie zur Farbstoffmarkierung des N_3 -PEG_{3,2}-*g*[₂₆]-PLL₂₇-Polymers mit DBCO-PEG₄-5/6-Carboxyrhodamin 110

Zur Farbstoffmarkierung des Polymers werden drei Ansätze durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Amicon® Zentrifugenfiltration, wobei die Zentrifugenschritte so lange wiederholt werden, bis das Eluat unter UV-Licht keine Fluoreszenz aufweist. Mittels UV/VIS Spektroskopie können folgende Stoffmengen-Verhältnisse bestimmt werden: 1, 4 bzw. 10 Fluorophore pro Polymer (Abbildung 63).

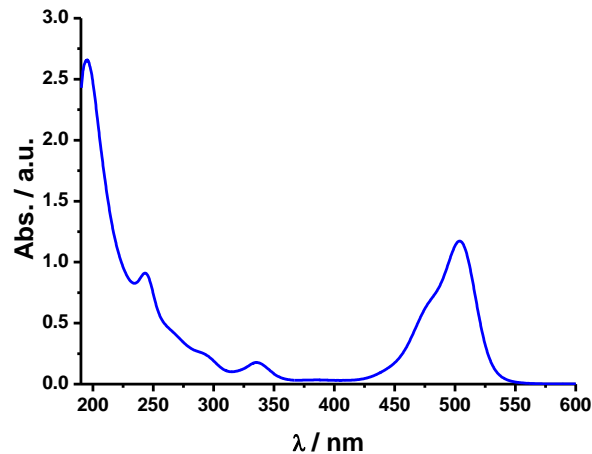


Abbildung 63

Beispielhaftes Absorptionsspektrum des mit 4 DBCO-CR₁₁₀ pro Kette markierten N₃-PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇-Polymers mit einem Absorptionsmaximum bei 504 nm; $c(\text{DBCO-CR}_{110}) = 16 \mu\text{M}$ in MilliQ-H₂O.

Die Polymere werden mittels DLS vermessen und anschließend mit dem etablierten LbL-Verfahren auf Citrat-haltige Eisenoxid-Nanopartikel aufgebracht. Die drei erhaltenen Komplexe Fe₃O₄-[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇] x DBCO-CR₁₁₀ weisen unter UV-Licht eine schwache Fluoreszenz auf. Ihre Radien werden ebenfalls aus der dynamischen Lichtstreuung ermittelt (Tabelle 15). Die einfach und vierfach markierten Polymere bilden nahezu aggregatfreie Nanopartikel-Komplexe aus, die zudem salzstabil sind. Das Polymer mit zehn Farbstoffen pro Kette aggregiert dagegen bereits vor Komplexierung bei Anwesenheit von Salz. Zudem sind die Fe₃O₄-[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇] x 10 DBCO-CR₁₁₀ Komplexe mit 86 nm viel zu groß und aggregieren in 150 mM NaCl-Lösung.

Für die Untersuchung des *quenching*-Effekts werden nachfolgend das vierfach fluoreszenzmarkierte Polymer sowie die dazugehörigen Komplexe untersucht, da der hydrodynamische Radius dieses Polymers dem nichtmarkierten entspricht.

Tabelle 15:

Hydrodynamische Radien des Polymers N_3 -PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ vor Farbstoffmarkierung und nach Modifikation mit 1, 4 und 10 Moleküle DBCO-CR₁₁₀, sowie die Radien der entsprechenden NP-Polymer-Komplexe gemessen in wässriger 150 mM NaCl-Lösung. Die eingeklammerten Werte sind in MilliQ-H₂O gemessen.

DBCO-CR ₁₁₀ pro Polymer	R_h (30°, Polymer) / nm	R_h (30°, Komplex) / nm
0	9,9	21
1	16,5	30
4	10,1	25
10	(15) 200	(86) 300

5.7.1 Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen an PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀ und den dazugehörigen Fe₃O₄-Komplexen

Mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wird die Diffusionszeit des Polymers PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀ und anschließend die des Komplexes aus Nanopartikel und Polymer gemessen. Ein Vergleich zeigt, dass die ACF der Produkt-Lösung ein wenig zu höheren Diffusionszeiten verschoben ist. Nach Farbstoff-Kalibrierung werden für das Polymer ein Radius von 7,6 nm und 3 Farbstoffe pro Kette ermittelt. An die PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀-Nanopartikel-Probe wird ein zwei-Komponenten-Fit angelegt, wobei eine Komponente die Werte des Polymers enthält. Dieser Fit enthält zu 80 % Partikel mit $R_h = 7,6$ nm und zu 20 % Partikel mit $R_h = 37$ nm. Die zweite Fraktion kann auf fluoreszierende Komplexe und damit eine erfolgreiche Beschichtung hindeuten. Jedoch ist der Anteil an freiem Polymer wesentlich höher. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fraktion mit dem größeren Radius aus Polymeraggregaten besteht, die aufgrund vieler hydrophober Farbstoffe aggregiert sind.

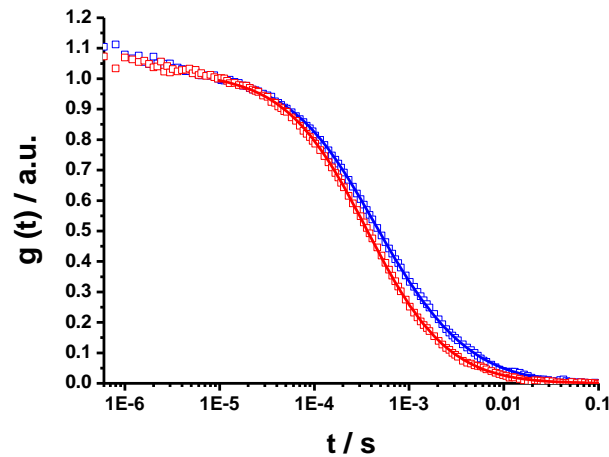


Abbildung 64

ACF der FCS-Messung - Vergleich von $\text{PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}$ (rot) mit der Probe $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}[\text{PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}]$ (blau)

Das Absorptionsspektrum des fluoreszenzmarkierten Polymers wird mit dem des Polymers nach Nanopartikel-Zugabe verglichen (Abbildung 65). In Gegenwart der $\text{Cit-Fe}_3\text{O}_4$ -Partikel scheint die Absorption zunächst zu steigen. Zieht man jedoch das Spektrum der reinen Nanopartikel von dem der Mischung ab, so wird die ursprüngliche Absorption erhalten. Die Partikel absorbieren also eindeutig Photonen mit der Wellenlänge des Farbstoff-Absorptionsmaximums. Dies bestätigt, dass die Eisenoxid-Kerne die Fluoreszenz des Polymers bei Anbindung löschen können.

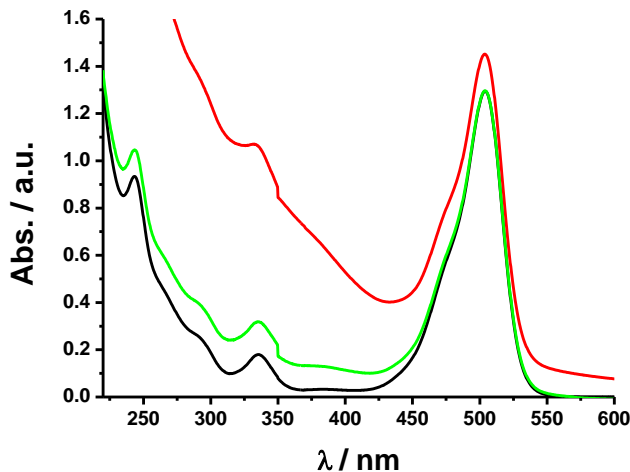


Abbildung 65

Absorptionsspektren des Polymers $\text{PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}$ in H_2O mit $A = 1,297$ und $c = 1,753 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (schwarz), in Gegenwart von $\text{Cit-Fe}_3\text{O}_4$ ($c = 25 \text{ mgL}^{-1}$) mit $A = 1,444$ (rot) und korrigiert auf reine $\text{Cit-Fe}_3\text{O}_4$ Lösung (grün).

Um das Phänomen des *quenchings* zu untersuchen, wird die Probe $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}$ mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht, mit Salzsäure zerstört und erneut gemessen. Auch hier ist die Rayleigh-Streuung zu sehen. Die Intensität der Emission sinkt nach HCl-Zugabe um 11 % im Vergleich zur Anregungsintensität. Insgesamt würden *quenching*-Effekte zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz nach Zerstörung der Partikel führen. Denn das Freisetzen der Polymer-Moleküle aus dem Komplex würde die Fluoreszenzauslöschung durch Farbstoff-Nähe und durch den Eisenoxid-Kern aufheben. Da aber hier die Intensität fast unverändert bleibt, kann auch an den $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-[PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}]$ -Komplexen kein *quenching* nachgewiesen werden.

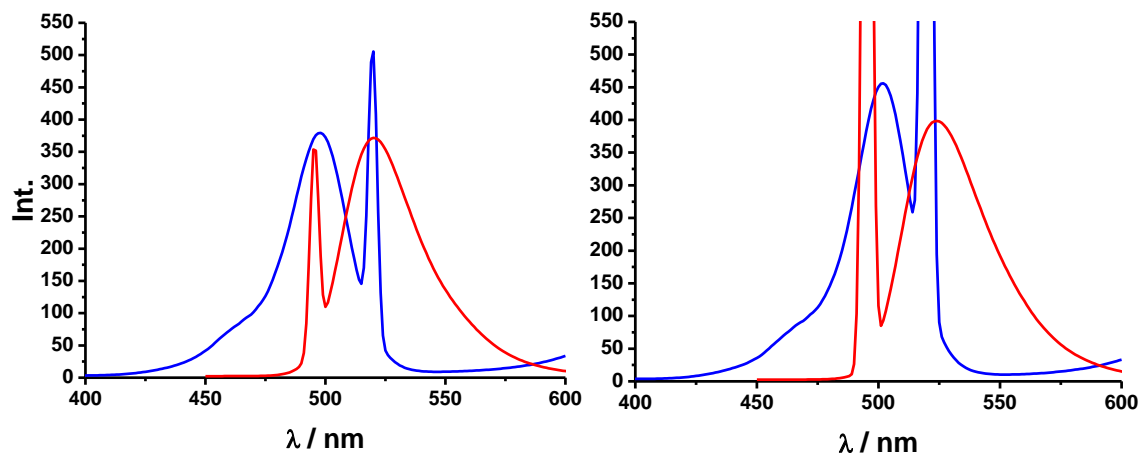


Abbildung 66

Fluoreszenzspektren der $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-[PEG}_{3,2}\text{-g}_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}]$ -Partikel vor (links) und nach Zugabe (rechts) von HCl. Das Anregungsspektrum ist jeweils blau, die Emission rot dargestellt.

Eine weitere Erklärung für das Nicht-Detektieren der Komplexe im FCS wäre, dass die Komplexierung zwar bis zur Magnetfällung erfolgreich ist, die Polymere jedoch nur schwach gebunden werden. Werden die Nanopartikel wieder in Milli-Q- H_2O dispergiert, könnten die Polyelektrolyte dann teilweise wieder dissoziieren. Somit entsteht eventuell ein Gleichgewicht, bei dem ein schneller Austausch zwischen den komplexierten und freien Polyelektrolyten stattfindet. Mittels FCS würde daraufhin nur die dissoziierte Fraktion beobachtet werden können. Im nächsten Abschnitt soll deshalb eine mögliche Dissoziation der Polymerhülle untersucht werden.

5.7.2 Mehrfache magnetinduzierte Aufreinigung von Fe_3O_4 -[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀]

Es soll untersucht werden, ob die Polymerhülle nur schwach am Partikel gebunden ist und deswegen dissoziieren kann. Dazu wird die fluoreszenzmarkierte Probe Fe_3O_4 -[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀] drei Mal magnetisch sedimentiert, und jeweils auf Fluoreszenz, Größe sowie Salzstabilität untersucht.

Die Partikellösung fluoresziert nach der ersten Aufreinigung schwach. Bereits nach der zweiten magnetinduzierten Sedimentation ist jedoch keine Fluoreszenz der Partikel zu beobachten, während der zweite Überstand schwach fluoresziert und der dritte nicht (Tabelle 16). Dies bedeutet, dass einmaliges Sedimentieren die Partikel nicht vollständig vom farbstoffmarkierten Polyelektrolyten befreit, welcher anschließend mittels FCS detektiert wird (vergl. Abschnitt 5.7.1). Die Menge an freiem Polymer ist aber sehr gering und kann für nachfolgende Beschichtungsversuche vernachlässigt werden.

Für die DLS Messungen werden die Proben nicht filtriert, sondern lediglich in VV-filtriertem H₂O verdünnt, um die unerwünschte Abtrennung eventuell entstandener Aggregate zu vermeiden. Die DLS-Analyse liefert folgende Ergebnisse (Tabelle 16):

- Die Partikel sind nach der ersten Sedimentation mit einem Radius von 25,5 nm (Messwinkel 30°) in PBS-Puffer stabil.
- Nach der zweiten Aufreinigung kann die Messung bei einem Winkel von 30° nicht sinnvoll ausgewertet werden, da hier nicht zwischen Staub und Aggregaten unterschieden werden kann. Jedoch liefert die 39°-Messung einen Radius, welcher der ersten Probe entspricht und sich auch nach PBS-Zugabe nicht ändert.
- Die dritte magnetinduzierte Sedimentation zeigt ein anderes Verhalten. Die Aggregation ist nicht nur bei 30° zu beobachten, sondern auch bei höheren Messwinkeln. Diese ist aber nicht vollständig, zum Beispiel werden 65 % an 600 nm- und 35 % an 37 nm-großen Radien detektiert (Abbildung 67).
- Nach zwei Wochen ist die Probe vollständig aggregiert und hat sich am Küvettenboden abgesetzt.

Gegen die Dissoziation der PEGgPLL-Hülle spricht zum einen, dass die Partikel auch nach zweimaligem Aufreinigen immer noch salzstabil sind. Zum anderen müsste der Überstand des dritten Schrittes auch fluoreszieren, wenn die Hülle nach und nach vom Partikel weg diffundieren würde.

Tabelle 16

Vergleich der Probe $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}[\text{PEG}_{3,2}\text{-}g_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}]$ nach eins bis drei magnetischen Separationen. Die Partikel sowie der jeweilige Überstand werden auf Fluoreszenz untersucht. Die Probe wird in H_2O sowie 1:1 in PBS verdünnt und ohne Filtration mittels DLS vermessen.

Anzahl magnetischer Separationen	$R_h(\text{H}_2\text{O}) / \text{nm}$	$R_h(+\text{PBS}) / \text{nm}$	Partikel - Fluoreszenz	Überstand- Fluoreszenz
1	25,5 (30°)	25,5 (30°)	schwach	stark
2	27,7 (39°)	25,8 (39°)	nein	schwach
3	Aggregation		nein	nein

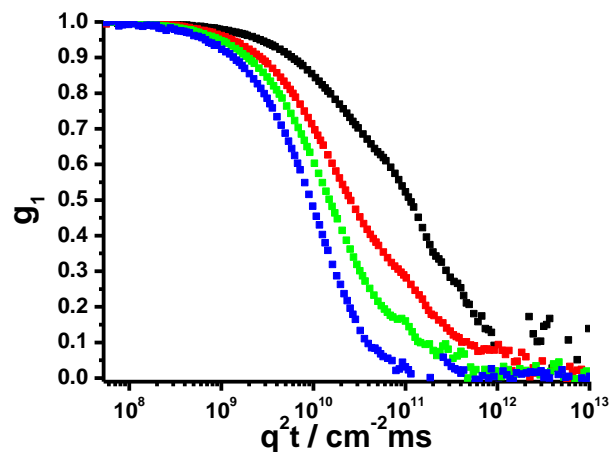


Abbildung 67

Winkelabhängige ACF der Probe $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}[\text{PEG}_{3,2}\text{-}g_{[26]}\text{-PLL}_{27} \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}]$: 30° (schwarz), 39° (rot), 47° (grün) und 90° (rot)

5.7.3 Zusammenfassung

Die Synthesen von ein- und vierfach fluoreszenzmarkierten Polymeren aus N_3 -PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ und DBCO-CR₁₁₀ sowie die dazugehörigen Ein-Schicht-Komplexe Fe_3O_4 -[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇] x DBCO-CR₁₁₀ können erfolgreich durchgeführt werden. Die 10-fache Farbstoffumsetzung liefert dagegen ein Polymer, das bei 150 mM NaCl aggregiert. Zudem bildet es mit den Cit-Fe₃O₄-NPS Agglomerate, die ebenfalls nicht salzstabil sind. Die Anzahl hydrophober Farbstoffe ist hier zu hoch gewählt.

Das Polymer mit vier Farbstoffen wird mittels *LbL*-Verfahren auf Cit-Fe₃O₄ aufgetragen und man erhält Komplexe mit einem Radius von 25 nm. Die FCS-Messung dieser Partikel zeigt vorwiegend freies Polymer, jedoch auch 20 % einer Spezies in der Größenordnung des Ein-Schicht-Komplexes. Da dieser Anteil gering ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier lediglich um hydrophobe Polymeraggregate handelt.

Die Komplex-Probe wird vor und nach Inkubation mit Salzsäure betrachtet, um eine mögliche Fluoreszenzauslöschung zu untersuchen. Durch die Zerstörung der Partikel sollte im Fall des *quenching*-Phänomens die Fluoreszenz deutlich ansteigen. Dies ist hier aber nicht der Fall. Somit kann für die Partikel Fe_3O_4 -[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀], sowie für die siRNA-Komplexe, eine Fluoreszenzauslöschung nicht nachgewiesen werden.

Zudem wird die Frage adressiert, ob die Polyelektrolyte eventuell nur schwach gebunden werden und bei Dispersion der Komplexe in Milli-Q-H₂O teilweise wieder dissoziieren. Bei dem Versuch, die Partikel mehrfach magnetinduziert aufzureinigen, wird festgestellt, dass das erste Sedimentieren die Komplexe nicht vollständig von überschüssigen Polyelektrolyten befreit. Zudem bleiben die Partikel auch nach der zweiten Sedimentation salzstabil mit einem Radius von 25 nm. Erst das dritte Mal induziert eine Aggregation, aber der entsprechende Überstand fluoresziert nicht, was für eine Polymerdissoziation sprechen würde.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines effizienten Transfektionsmittels. Dazu wurde die *Layer-by-Layer*-Methode so modifiziert, dass auch Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 20 nm aggregatfrei beschichtet werden konnten. Die Nukleinsäure sollte dabei zum Schutz gegen Nukleasen zwischen Schichten der biologisch abbaubaren Polyelektrolyte Poly-L-Lysin und Heparin komplexiert werden. Als Kerntemplate wurden Magnetit-Nanopartikel gewählt, da sie magnetische Eigenschaften besitzen und damit Vorteile wie *in vivo* Detektion mittels MRT aufweisen. Zudem war die Partikel-Abtrennung bzw. Fällung mit einem Magneten möglich.

Die Synthese definierter Eisenoxid-Nanopartikel gelang durch die Eisenoleat-Thermolyse in Gegenwart von Ölsäure. TEM-Aufnahmen zeigten sphärische OL-Fe₃O₄-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 17,3 nm, deren molare Masse zu $8,5 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ errechnet werden konnte. Dynamische Lichtstreuung lieferte einen hydrodynamischen Radius von 10,8 nm und damit einen Durchmesser von 21,6 nm, der nur wenig von dem Kerndurchmesser im getrockneten Zustand abwich. Eine SQUID-Messung bestätigte, dass die Partikel bei Raumtemperatur superparamagnetisch sind. Zudem konnte die Magnetit-Struktur durch Elektronenbeugung nachgewiesen werden. Die Überführung der zunächst nur in organischen Lösungsmitteln dispergierbaren Nanopartikel in Wasser gelang durch eine zwei-Stufen-Reaktion. Dabei wurden die OL-Fe₃O₄-Partikel zunächst mit Meso-2,3-Dithioweinsäure in DMSO inkubiert und anschließend in eine Natriumcitrat-Lösung überführt. So entstanden aggregatfreie, Citrat-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Radius von 11,4 nm. Da sie lediglich durch die Coulomb-Abstoßung der negativ geladenen Citrat-Liganden in Lösung gehalten wurden, aggregierten sie bei Zugabe von niedermolekularem Salz.

Für das aggregatfreie *LbL*-Verfahren an Cit-Fe₃O₄-Partikel wurde eine Apparatur bestehend aus einer Spritzenpumpe, einer Kapillare, einem Rührer und einer Antidiffusionsspitze entwickelt. Mit der Kombination aus hohem Überschuss an Polyelektrolyt und langsamer Injektionsgeschwindigkeit entstanden Fe₃O₄-PLL-

Komplexe, die einen durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von 16 nm aufwiesen. Als Modellsystem wurden aus Poly-*L*-Lysin und Heparin mit dieser Apparatur 5-Schicht-Partikel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-[PLL-Hep]}_2\text{-PLL}$ gebildet, die mit Radien von unter 30 nm in der gewünschten Größenordnung lagen. Der Vorzeichenwechsel des Zetapotentials nach jeder Schicht-Bildung sprach für eine erfolgreiche Etablierung des *LbL*-Verfahrens an Eisenoxid-Templaten. Die beschichteten Partikel waren nicht salzstabil und mussten modifiziert werden, um sie in ein biologisches Medium überführen zu können. Zunächst wurde versucht, die PLL-Schicht mit Glutaraldehyd in verschiedenen Konzentrationen und *pH*-Werten zu vernetzen sowie die Heparin-Schale mit Ca^{2+} Ionen zu stabilisieren. Auch wurde Polylysin vor der Komplexierung mit Cit- Fe_3O_4 -Partikeln mit Catechol-Gruppen modifiziert, um eine höhere Polymerstabilität zu erreichen. Keiner dieser Versuche lieferte die gewünschte Salzstabilität.

Da Polyethylenglykol (PEG) durch seine sterische Abschirmungen die Partikelstabilität beeinflussen kann, wurden zunächst *Block-co*-Polymere aus Polyethylenglykol und Poly-*L*-Lysin synthetisiert. Diese Zweiblock-Polymere lieferten jedoch auch keine salzstabilen Komplexe, daher wurde die PEG-Dichte erhöht, indem es auf Poly-*L*-Lysin aufgepfropft wurde. Die so entstandenen kammartigen PEG-*g*-PLL Polymere konnten die Komplexe in 150 mM NaCl-Lösung, in PBS-Puffer und in Serum stabilisieren und eine Aggregation verhindern. Zudem wurden PEG-Ketten mit Azid-Endgruppen verwendet, um eine nachfolgende kupferfreie Click-Chemie zu ermöglichen.

Um aus dem *LbL*-Modellsystem mit den Polyelektrolyten PLL und Heparin ein Transfektionsmittel zu entwickeln, war im nächsten Schritt die siRNA-Komplexierung an $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PLL}$ -Partikel nötig. Dabei entstanden aggregatfreie Komplexe und die Lösung fluoreszierte unter UV-Licht. Die Untersuchung mittels FCS zeigte jedoch nur Diffusionskoeffizienten, die der freien siRNA entsprachen. Eine mögliche Fluoreszenz-auslöschung, verursacht durch den Eisenoxidkern oder durch die Nähe der Farbstoffe im Komplex, musste untersucht werden. Dazu wurden die Partikel mit Salzsäure zerstört und mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Da jedoch nach der Zerstörung kein Intensitätsanstieg zu beobachten war, konnte eine Fluoreszenzauslöschung nicht bestätigt werden.

Weiterhin wurde das PEGylierte Polymer N_3 -PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ mit 1, 4 und 10 DBCO-PEG₄-5/6-Carboxyrhodamin 110-Farbstoffen modifiziert. Die entsprechenden Eisenoxid-Komplexe der einfach und vierfach fluoreszenzmarkierten Polymere waren salzstabil. Der Komplex Fe_3O_4 -[PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀] wurde anschließend ebenfalls mittels FCS analysiert. Neben vorwiegend freiem Polymer wurden 20 % Partikel in der Größenordnung des Ein-Schicht-Komplexes beobachtet. Dabei könnte es sich jedoch auch um hydrophobe Polymeraggregate handeln. Das *quenching*-Phänomen konnte auch hier mittels Fluoreszenzspektroskopie nicht nachgewiesen werden.

Da zum einen die Zetapotential-Messungen ein eindeutiges Vorzeichenwechsel zeigten und zum anderen die PEGylierten PLL-Polymere als äußere Schicht einen salzstabilisierenden Effekt hatten (in 150 mM NaCl-Lösung, in PBS-Puffer und in Serum), schien die *Layer-by-Layer*-Methode an den 17 nm große Eisenoxid-Nanopartikeln (aus TEM-Messungen) erfolgreich zu sein. Um die Multischicht-Partikel später in Zellkulturen detektieren zu können, war die Komplexierung mit farbstoffmarkierten Polyelektrolyten nötig. Jedoch konnten weder die Komplexe aus Nanopartikeln und siRNA-ATTO565 bzw. aus Nanopartikeln und PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ x 4 DBCO-CR₁₁₀ in FCS-Messungen eindeutig detektiert werden. Ebenso wenig wurde durch Fluoreszenzspektroskopie eindeutig ein *quenching*-Phänomen beobachtet.

Für diese Beobachtungen sind mehrere Erklärungen denkbar. Zum einen könnten die hydrophoben Farbstoffe eine störungsfreie Komplexierung verhindern. Andererseits kann tatsächlich eine Fluoreszenzauslöschung stattgefunden haben. Diese würde aber nicht detektiert werden, wenn die Kerne eventuell nicht vollständig zerstört wurden. Wie oben gezeigt, hatte die PEGylierte PLL-Schicht einen großen Stabilisierungseffekt und könnte der Salzsäure entgegenwirken.

Eine andere Erklärung, warum mittels FCS keine Fluoreszenz beobachten werden konnte, wäre eine schwache Komplexierung der Polyelektrolyte. Bei einer Dispersion der Komplexe nach magnetischer Aufreinigung würde die Schale dann teilweise wieder dissoziieren. Um diese Theorie zu untersuchen, wurden die Carboxyrhodamin-markierten Komplexe mehrfach magnetinduziert sedimentiert. Die Partikel blieben auch nach der zweiten Sedimentation salzstabil und wiesen einen Radius von 25 nm auf. Erst

die dritte magnetinduzierte Sedimentation induzierte eine Aggregation. Da aber der entsprechende Überstand nicht fluoreszierte, konnte eine Polymerdissoziation nicht nachgewiesen werden.

Das in dieser Doktorarbeit entwickelte *LbL*-System ist vielversprechend, denn alle Beschichtungsschritte wurden aggregatfrei durchgeführt, wie mittels winkelabhängiger DLS bestätigt werden konnte. Jedoch sind weitere Untersuchungen mit farbstoffmarkierten Polymeren nötig, um der Ursache auf den Grund zu gehen, warum in FCS-Messungen keine oder kaum fluoreszenzmarkierte Komplexe zu sehen sind. Der Einsatz eines Nahinfrarot-Farbstoffes könnte der potentiellen Fluoreszenzauslöschung entgegenwirken, jedoch müsste dann das FCS-Gerät die entsprechende Ausstattung aufweisen.

7. Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Chemikalie / Material	Firma	Bestellnr.
1,4-Dioxan	SIGMA-Aldrich	33147
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	SIGMA-Aldrich	E1769
1-Octadecen	SIGMA-Aldrich	O806
1,10-Phenanthrolin	SIGMA-Aldrich	131377
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure	SIGMA-Aldrich	102601
4-(Dimethylamino)pyridin	SIGMA-Aldrich	107700
Aceton	Acros Organics	176800025
Ammoniumacetat	SIGMA-Aldrich	A7330
Ammoniumeisen(II)sulfat	SIGMA-Aldrich	215406
Bromwasserstoffsäure wt. 33 % in Eisessig	Acros Organics	123180010
Calciumchlorid	SIGMA-Aldrich	C1016
DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamin 110	Jena Bioscience	CLK-A127
Diethylether	SIGMA-Aldrich	32203
Dimethylsulfoxid	SIGMA-Aldrich	276855
Di-(N,N'-succimidyl)carbonat	SIGMA-Aldrich	43720
Dopamin	SIGMA-Aldrich	H8502
Eisen(III)chlorid	Riedel de Haen	12321
Ethanol	SIGMA-Aldrich	32205
Ethylendiamintetraessigsäure	SIGMA-Aldrich	E9884
Glutaraldehyd 25 % in H ₂ O	SIGMA-Aldrich	G5882
Glutathion	SIGMA-Aldrich	PHR1359
Heparin Natriumchlorid (aus Schweinedarm-Schleimhaut)	SIGMA-Aldrich	H3393-100KU

Hydroxylaminhydrochlorid	SIGMA-Aldrich	255580
L-Lysin(Z)-NCA	Synthetisiert von Dr. [REDACTED]	
meso-2,3-Dithioweinsäure	SIGMA-Aldrich	D7881
Natriumcitrat	SIGMA-Aldrich	S4641
Natriumchlorid	SIGMA-Aldrich	S9888
Natriumoleat 95%	ABCR	MFCD00004438
n-Hexan	SIGMA-Aldrich	34859
N-Hydroxysuccinimid	SIGMA-Aldrich	130672
N ₃ -Polyethylenglycol-OH 3300 gmol ⁻¹	RAPP Polymere	133000-00-5
Ölsäure	ABCR	AB135232
PBS-Puffer	life technologies®	14190
Methoxypolyethylenglycol	SIGMA-Aldrich	85973
Polyethylenglycol-NH ₂ 5000 gmol ⁻¹	SIGMA-Aldrich	06679
Polyethylenglycol-NH ₂ 10.000 gmol ⁻¹	SIGMA-Aldrich	07965
Polyethylenglycol-NHS 2000 gmol ⁻¹	SIGMA-Aldrich	41214
Poly-L-Lysin Hydrobromid	SIGMA-Aldrich	P7890
Salzsäure	SIGMA-Aldrich	320331
siRNA, 3' ATTO565 sense: GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-ATTO565 antisense: GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG	IBA-Solutions for Life Sciences	156065-156066
Triethylamin	SIGMA-Aldrich	T0886
Trifluoressigsäure	SIGMA-Aldrich	302031
Trioctylphosphinoxid	SIGMA-Aldrich	223301

7.2 Mess- und Analysemethoden

7.2.1 Lichtstreuung

SLS: Die Anlage besteht aus einem Helium-Neon-Laser (JDS Uniphase 1145p-3083, Wellenlänge 632,8 nm, Leistung 25 mW) und einer Detektionseinheit (Goniometer ALV-SP86, ALV/High QEAPD Avalanche-Photodioden, Faseroptikdetektionssystem, ALV 3000 Korrelator von der Firma ALV, Langen)

DLS: DLS wird an einer Vielwinkelanlage detektiert, bestehend aus einem ALV/CGS-8F DLS/SLS 5022F Goniometer, acht APD Avalanche-Photodioden, acht ALV 7004 Korrelatoren und einem Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 632,8 nm, Leistung 21 mW).

Küvetten: Verwendet werden Küvetten aus Quarzglas der Firma Hellma, Müllheim mit einem Durchmesser von 20 mm bzw. 10 mm und einem Volumen von 14 mL bzw. 5 mL. Sie werden vor dem Gebrauch mit destilliertem Aceton gespült und danach in einer Flow-Box mit der Öffnung nach unten staubfrei getrocknet.

Filter: Die verwendeten Filter für die Probenvorbereitung sind in Tabelle 17 zu sehen.

Tabelle 17

Übersicht über die bei Lichtstreuversuchen verwendeten Filter

Filter-Typ	Porengröße	Membran-Material	Membran-Durchmesser	Firma
Anotop™25	20 nm	Anopore™ Aluminumoxid	10 mm	<i>Whatman, Maidstone, UK</i>
Acrodisc®GHP	450 nm	Hydrophilisiertes Polypropylen	13 & 25 mm	<i>Pall Corporation, Port Washington, NY, USA</i>
Millipore LCR	450 nm	Hydrophiles PTFE	13 mm	<i>Millipore, Billerica, MA, USA</i>
Millex® VV	100 nm	Hydrophiles PVDF	33 mm	<i>Millipore, Billerica, MA, USA</i>

7.2.2 LbL-Verfahren

Die verwendete Anlage setzt sich aus einem Miniatur-Rührer (60SKIT/A), einer Spritzenpumpe (Razel® Scientific Instruments), einer Antidiffusionsspitze (Valve M6 der Firma Deutsche Metrohm GmbH), Kapillaren und Verbindungsteile (IDEX Health & Science) zusammen.

7.2.3 AFM-Aufnahmen

Die AFM-Messungen werden von [REDACTED] mit einem Nanoscope IIIa (Multimode) AFM-Mikroskop der Firma Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA. aufgenommen Die verwendeten Cantileverspitzen von der Firma Nanosensors, Wetzlar-Blankenfeld haben eine Resonanzfrequenz von ca. 300 kHz und bestehen aus Silicium mit einer Federkonstanten von 42 N/m und einem Radius von etwa 10 nm. Alle Proben werden durch „spin-coating“ (ca. 5000 Umdrehungen pro Minute) auf frisch gespaltenem Mica aufgetragen und im tapping-mode™ untersucht.

7.2.4 GPC-Messungen

Die GPC-Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt. Alle Polyelektrolyte werden in einer Mischung aus H₂O und Acetonitril im Verhältnis 1:1 mit 0,15 % Trifluoressigsäure gemessen. Der Fluss beträgt jeweils 0,7 mLmin⁻¹. Die GPC-Apparatur setzt sich aus einer Hitachi L-2130 Pumpe, einem VWR 7614 Entgaser, einem Hitachi L2350 Säulenofen, einem RI-Detektor des Typs Hitachi L-2490, einem UV-Detektor (Waters 486 bei $\lambda = 280$ nm) und Novema Säulen (30, 300, 3000) zusammen. Die Messungen werden bei 25 °C durchgeführt und es werden 20 μ L einer Polymerlösung mit $c = 1$ gL⁻¹ gelöst im Laufmittel eingespritzt.

7.2.5 NMR-Messungen

Alle ^1H -NMR-Messungen werden mit einer ^1H -300 Ultra Shield Anlage bei 293K aufgenommen, wobei die Messzeit pro Spektrum jeweils 7 Minuten beträgt.

7.2.6 FCS-Messungen

Die FCS-Messungen werden am Max-Planck-Institut für Polymerforschung von [REDACTED] durchgeführt. Der Aufbau des FCS-Geräts ist ein kommerziell erhältlicher mit einem inversen IX 70 Mikroskop, einem FluoView 300 konfokalen Laser (beides von Olympus) und eine FCS Einheit (PicoQuant). Die Fluorophore werden durch einen Argon Laser (CVI Melles Griot) mit einer Laserleistung von 4% (8 mW Gesamtleistung) angeregt. Die Detektion erfolgt mittels einer Avalanche Photodiode und das Fluoreszenzsignal wird nach dem Filtern mit einem LP488R Raman Edge Langpass-Filter aufgenommen.

7.2.7 IR-Messungen

Für die IR-Messung wird ein Nicolet iS10 FT-IR Spektrometer von Thermo Scientific mit einer ATR-Einheit verwendet. Die Proben werden als Feststoffe aufgetragen. Der Messbereich ist $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$. Die Auswertung erfolgt mit der Software OMNIC

7.2.8 UV/VIS-Messungen

Die UV-Vis-Messungen werden mit einem Carry 100Bio UV-Vis Spektrometer (Varian, Inc) im Wellenlängenbereich von 600 nm – 190 nm und bei 293 K aufgenommen.

7.2.9 Zeta-Potential-Messung

Zeta-Potentiale werden an einem Malvern Instruments „Zetasizer Nano ZS“ unter Verwendung der „Zetasizer Software“ gemessen. Die Küvetten sind die von Malvern vertriebenen Einmalküvetten (aus Polystyrol Typ „DTS1060“ für Messungen in wässriger Lösung). Mit einem Helium-Neon-Laser (Wellenlänge = 633 nm) wird die Probe angeregt und die elektrophoretische Mobilität wird mittels elektrophoretischer Lichtstreuung bei einem Messwinkel von 170° bestimmt. Die Nanopartikel-Proben werden bei einer Konzentration von $c = 25 \text{ mgL}^{-1}$ in MilliQ-H₂O vermessen, wobei sie zuvor entgast werden.

7.3 Synthesevorschriften

7.3.1 Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart von Ölsäure (OL)¹⁹

1. Stufe: Eisenoleat-Komplexe

Tabelle 18

Verwendete Chemikalien für Bildung von Eisenoleat-Komplexen

	<i>m / g</i>	<i>n / mmol</i>	<i>eq.</i>
FeCl₃ x 6H₂O	5,40	20	1
Natriumoleat	19,23	60	3

In einem 1 L Dreihalskolben werden 5,4 g Eisenchlorid und 19,23 g Natriumoleat in einer Mischung aus 30 mL MilliQ-H₂O, 40 mL Ethanol und 70 mL Hexan gelöst, bis zum Sieden (57°C) erhitzt und bei dieser Temperatur für 4 h gehalten. Die schwarze organische Lösung wird sieben Mal mit je 50 mL MilliQ-H₂O gewaschen. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert und das dunkelbraune, wachsartige Produkt am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 12,14 g (13,5 mmol, 68 % der Theorie)

2. Stufe: Eisenoxidnanopartikel

Tabelle 19

Verwendete Chemikalien für Thermolyse der Eisenoleat-Komplexen

	<i>m / g</i>	<i>n / mmol</i>	<i>eq.</i>
Fe(Oleat)₃	12,14	13,5	2
Ölsäure	1,93	6,75	1

12,14 g Eisenoleat und 1,93 g Ölsäure werden in 67,5 g 1-Octadecen bei Raumtemperatur gelöst. Diese Lösung wird in einem Dreihalsrundkolben mit KPG-Rührer auf

315 °C Innentemperatur erhitzt (Heizrate = 18 °C min⁻¹) und 30 min bei dieser Temperatur gehalten. Nach Erreichen der Siedetemperatur wird die zu Beginn klare Lösung trüb und braun-schwarz. Durch Ethanol-Fällung und Zentrifugation (10 min, 4000 RPM) lassen sich die Oleat-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel isolieren.

Ausbeute: ca. 550 mg

7.3.2 Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart von Ölsäure & Trioctylphosphinoxid⁶⁸

1. Stufe: Eisenoleat-Komplexe

Synthese der Eisenoleat-Komplexe erfolgt wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben.

Ausbeute: 16 g (18 mmol, 90 % der Theorie)

2. Stufe: Eisenoxidnanopartikel

Tabelle 20

Verwendete Chemikalien für die zweite Stufe der in Gegenwart von Ölsäure und Trioctylphosphinoxid synthetisierten Fe₃O₄Nanopartikel

	<i>m</i> / g	<i>n</i> / mmol	<i>eq.</i>
Fe(Oleat) ₃	16,00	18,0	2
Ölsäure	1,49	5,3	1
Trioctylphosphinoxid	1,45	3,7	

16 g Eisenoleat, 1,49 g Ölsäure und 1,45 g Trioctylphosphinoxid werden in 90 g 1-Octadecen bei Raumtemperatur gelöst. Diese Lösung wird in einem Dreihalsrundkolben mit KPG-Rührer bis zum Sieden erhitzt (Heizrate = 18 °C min⁻¹) und bei 315 °C für 30 min gehalten. Durch Ethanolfällung und Zentrifugation (10 min, 4000 RPM) lassen sich die durch eine Mischung aus OL und TOPO stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel isolieren.

Ausbeute: ca. 280 mg

7.3.3 1-Stufen-Ligandentausch zur Partikel-Überführung in wässriger Lösung⁶⁹

Zur Überführung der OL- bzw. TOPO/OL-stabilisierten Eisenoxidpartikel in wässriger Lösung werden die Nanopartikel in Chloroform gelöst, wobei eine Konzentration von 3 - 7 mg/mL eingestellt wird. Die jeweils in DMSO gelösten Liganden werden zugegeben und das Reaktionsgemisch wird entweder unter Rühren erhitzt, im Ultraschallbad gehalten oder geschüttelt. In Tabelle 21 ist eine Übersicht aller Liganden und Reaktionsparameter dargestellt. Die Stoffmenge an Liganden bezieht sich auf 1 mg an Nanopartikeln ($n = 1.2 \cdot 10^{-10}$ mol). Zur Aufarbeitung wird die Lösung zunächst zentrifugiert, dann wird der Niederschlag in Methanol redispersiert, erneut zentrifugiert und mit MilliQ-H₂O versetzt. Falls dabei eine homogene Dispersion entsteht, wird die Lösung mit einem Spritzenfilter (GHP 450 nm) filtriert.

Tabelle 21

Übersicht aller 1-Stufen-Ligandentauschversuche an OL-Fe₃O₄-NPs mit Angaben über Liganden-Stoffmenge pro 1 mg NPs und Reaktionsdurchführung.

Ligand	<i>n</i> / mmol	Durchführung	
Dopamin	0,026	Rühren 70°C	1 h
	0,026	Rühren 70°C	3 h
	0,026	Rühren 40°C	17 h
	0,130	Rühren 40°C	18 h
	1,300	US-Bad	4 h
	1,300	Schütteln RT	6 d
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure	0,110	US-Bad	2,5 h
	1,100	Schütteln RT	6 d
	1,100	Rühren 40°C	15 h
Glutathion	0,330	Rühren RT	3 d
Polyethylenglykol-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethylamin	0,007	Rühren RT	2 d

7.3.4 2-Stufen-Ligandentausch zur Partikel-Überführung in wässriger Lösung⁷¹

Tabelle 22

Verwendete Chemikalien für den 2-Stufen-Ligandentausch

	<i>m</i> / mg	<i>n</i> / mmol
Fe₃O₄	180	$1.4 \cdot 10^{-5}$
meso-2,3-Dithioweinsäure (DMSA)	182	1,0
Natriumcitrat	588	2,3

18 mL einer Toluol-haltigen Fe₃O₄-Lösung (10 mg/mL) werden mit 4 mL einer Lösung bestehend aus 182 mg meso-2,3-Dithioweinsäure in DMSO versetzt und unter Argon-Atmosphäre 4 h lang im Ultraschallbad dispergiert. Nach Magnetfällung werden die Nanopartikel zwei Mal mit Ethanol versetzt und zentrifugiert (10 Minuten, 4000 RPM). Der erhaltene Niederschlag wird in 20 mL einer 0,1 M Natriumcitrat-Lösung (pH=8,5) aufgenommen und für 7 h im Ultraschallbad gehalten. Zur Aufarbeitung werden die Fe₃O₄-Partikel mit 1,4-Dioxan gefällt, zentrifugiert (10 Minuten, 4000 RPM) und in Milli-Q-H₂O resuspendiert. Anschließend wird die Lösung mittels Amicon® Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze $M_W = 10$ kDa, 15 min, 2000 RPM, gegen MilliQ-H₂O, 10 Wiederholungen) von überschüssigen Liganden befreit.

Ausbeute: 40 mL einer 4,3 mg/mL Fe₃O₄-Lösung ($m[\text{NPs}] = 172$ mg)

7.3.5 Eisenbestimmung mit 1,10-Phenanthrolin⁸

Tabelle 23

Verwendete Chemikalien für die Eisenbestimmung mit 1,10-Phenanthrolin

	<i>m</i> / mg
Cit-Fe₃O₄-Nanopartikel	1,4
Ammoniumacetat	771,0
Hydroxylaminhydrochlorid	100,0
1,10-Phenanthrolin	30,0
Ammoniumeisen(II)sulfat	31,0

1,4 mg Nanopartikel werden mit 5 mL konzentrierter HCl versetzt und für 1 h inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit MilliQ-H₂O auf 25 mL verdünnt. 50 µL dieser Stammlösung ($c = 0,056 \text{ g/L}$) werden mit 2 mL Acetatpuffer (pH=4), 100 µL einer 10% Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung sowie 500 µL einer 0,3 % 1,10-Phenanthrolin-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wird das Absorptionsmaximum bei 511 nm gemessen. Zur Errechnung des Eisengehalts wird eine Kalibrierung benötigt, die mit Ammoniumeisen(II)sulfat (Mohrsches Salz) durchgeführt wird. Dazu wird zuerst eine Stammlösung mit $c(\text{Mohr}) = 3,92 \text{ mmol/L}$ und daraus eine Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 24). Aus dem Absorptionsmaximum dieser fünf Proben wird eine Kalibrierung ermittelt (siehe Anhang):

$$c(\text{Fe}^{2+}) = \frac{Abs_{511nm}}{0,213 \text{ mL}\mu\text{g}^{-1}} = \frac{0,13}{0,213 \text{ mL}\mu\text{g}^{-1}} = 0,61 \mu\text{g mL}^{-1} \quad (59)$$

Daraus folgt für die Nanopartikel-Probe, die eine Absorption von 0,13 aufweist, eine Fe²⁺-Konzentration von 0,61 µg mL⁻¹. Die HCl-haltige Stammlösung enthält somit 808 µg Fe²⁺, woraus sich eine Masse von 1,12 mg an Fe₃O₄-Nanopartikel berechnen lässt. Damit besteht die Probe zu 80 % aus Nanopartikeln.

Tabelle 24

Verdünnungsreihe der Ammoniumeisen(II)sulfat-Stammlösung für die Kalibrierung der Eisen-Bestimmung

	$c(\text{Fe}^{2+})_{\text{end}} / \mu\text{gml}^{-1}$	$c(\text{Mohr})_{\text{end}} / \text{mmol l}^{-1}$	$c(\text{Mohr})_{\text{vorVerd}} / \text{mmol l}^{-1}$	$V_{\text{vorVerd}}(\text{Stammlösung}) / \mu\text{l}$	$V_{\text{end}} / \text{ml}$
1	0,5	0,009	0,475	6,5	2,65
2	1	0,018	0,949	12,5	2,65
3	2	0,036	1,898	25,0	2,65
4	3	0,054	2,847	37,5	2,65
5	4	0,072	3,796	50,0	2,65

7.3.6 Layer-by-Layer-Verfahren

Tabelle 25

Beispielhafter Ansatz für die Beschichtung der Nanopartikel mit einem Polyelektrolyten

	c / gL^{-1}	V / mL
Nanopartikel	0,025	4
Polyelektrolyt	1,000	6

Allgemeine Vorschrift

Es werden zwei Anlagen verwendet (Kapitel 5.3.2) – eine für die Beschichtung mit Polyanionen und eine für die Beschichtung mit Polykationen. Vor der Benutzung wird die jeweilige Anlage zuerst mit 50 mL einer 0,1 M Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) und anschließend mit ca. 200 mL MilliQ-H₂O gespült. Die zu beschichtenden Nanopartikel werden in der Konzentration $c(\text{NP}) = 0,025 \text{ gL}^{-1}$ in MilliQ-H₂O verdünnt und mittels einer Spritzenpumpe mit einer konstanten Spritzenpumpengeschwindigkeit (*SPG*) von $0,13 \text{ mLmin}^{-1}$ (10 mL Spritze) zur Polyelektrolytlösung gegeben. Diese hat typischerweise eine Konzentration $c(\text{PEL}) = 1 \text{ gL}^{-1}$ in MilliQ-H₂O und ein Volumen von 4 mL – 6 mL. Nach beendeter Zugabe werden die Partikel mittels eines Magneten abgetrennt. Die Länge des Fällungsprozesses ist abhängig vom zugegebenen Volumen an Nanopartikeln, wobei die ungefähre Fällungsdauer ca. 24 h pro mL NP-Lösung beträgt. Anschließend wird der Überstand mit Spritze und Kanüle vorsichtig entfernt und der magnetische Niederschlag 3 x mit MilliQ-H₂O gespült. Schließlich werden die Nanopartikel so in MilliQ-H₂O dispergiert, dass ihre Konzentration wieder 25 mgL^{-1} beträgt.

7.3.7 Fe₃O₄-PLL-Komplexe mit Glutaraldehyd vernetzen

Um die polymere Schicht der Fe₃O₄-PLL-Komplexe mittels Glutaraldehyd zu vernetzen, werden 2 mL der Nanopartikel-Lösung ($c = 25 \text{ mgmL}^{-1}$) in einer Küvette vorgelegt. Die Lösung wird mit einer Glutaraldehyd-Lösung bei Raumtemperatur titriert und mittels DLS vermessen. Nach 24 h Schütteln wird der hydrodynamische Radius der Probe erneut bestimmt, dann wird sie mit NaCl versetzt und erneut in der Lichtstreuung vermessen. Die Glutaraldehyd-Lösung wird im ersten Versuch mit einem $pH = 5$ verwendet, während für den zweiten Versuch ein pH von 7,2 mit NaHCO₃ eingestellt wird.

Tabelle 26

Parameter für das Vernetzen der Fe₃O₄-PLL-Komplexe mit Glutaraldehyd (GA): Masse der Nanopartikel, Konzentration der zutitrierten GA-Lösung, die GA-Endkonzentration und die NaCl-Konzentration in der Küvette

pH - Wert	$m(\text{NP}) / \mu\text{g}$	$c(\text{GA}) / \text{mmolL}^{-1}$	$n_{\text{end}}(\text{GA}) / \text{mmol}$	$c(\text{NaCl}) / \text{mmolL}^{-1}$
5	50	0,1	0,2	20
7,2	50	0,5	0,8	150

7.3.8 Titration der Fe₃O₄-PLL-Heparin-Komplexe mit Calciumchlorid zur Heparin-Stabilisierung

Der Versuch, Heparin-Sulfatgruppen mit Ca²⁺ zu stabilisieren, wird in der Küvette durchgeführt. Dazu werden 2 mL Fe₃O₄-PLL-Heparin-Komplexe ($c = 25 \text{ mgmL}^{-1}$) vorgelegt und mit 5 mM CaCl₂-Lösung titriert. Nach Ende der Zugabe beträgt die Ca²⁺-Konzentration in der Küvette 1,1 mM. Anschließend wird die Lösung mit NaCl versetzt, sodass in der Küvette die Konzentration $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmolL}^{-1}$ beträgt. Nach jedem Schritt wird der hydrodynamische Radius der Probe bestimmt.

7.3.9 Poly-L-Lysin-Modifikation mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure

Tabelle 27

Ansatz für die EDC-Kupplung von Poly-L-Lysin mit 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure (DHPP)

	<i>m</i> / mg	<i>n</i> / mmol	<i>eq.</i>
Poly-L-Lysin (PLL)	100	$6,6 \cdot 10^{-3}$	1
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure (DHPP)	20,6	0,11	17
1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC)	28,8	0,15	23
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	34,5	0,3	46

100 mg PLL werden in 4 mL, die Edukte DHPP, EDC und NHS in je 1 mL MilliQ-H₂O gelöst. Nach 15 Minuten werden die Lösungen vereinigt und für 72 h bei 25 °C geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Amicon® Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze $M_w = 10$ kDa, 12 min, 2000 RPM, gegen MilliQ-H₂O, 10 Wiederholungen). Die braun-gefärbte Lösung wird über Nacht im Hochvakuum gefriergetrocknet.

Ausbeute: 18 mg (1,2 μmol, 18 % der Theorie)

¹H-NMR (D₂O): δ/ppm: 6,83 (m, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,64 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 3,01 (m, 2H), 2,78 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 1,7-1,4 (m, 6H)

7.3.10 PEG-*block*-PLL-Polymere

Tabelle 28

Die Ansätze zur Synthese von vier unterschiedlichen PEG_x-*block*-PLL_y-Polymeren ($x = M_w(\text{PEG})/1000 \text{ g mol}^{-1}$; $x = M_w(\text{PLL})/1000 \text{ g mol}^{-1}$)

	Edukt	<i>m</i> / mg	<i>M_w</i> / g mol ⁻¹	<i>n</i> / mmol	<i>eq.</i>
PEG ₅ - <i>block</i> -PLL ₁₄	L-Lysin(Z)-NCA	108	306,3	0,35	60
	PEG-NH ₂	28	5000	5,5*10 ⁻³	1
PEG ₅ - <i>block</i> -PLL ₇	L-Lysin(Z)-NCA	106	306,3	0,35	30
	PEG-NH ₂	60	5000	12*10 ⁻³	1
PEG ₅ - <i>block</i> -PLL ₃	L-Lysin(Z)-NCA	80	306,3	0,26	13
	PEG-NH ₂	100	5000	0,02	1
PEG ₁₀ - <i>block</i> -PLL ₆	L-Lysin(Z)-NCA	84	306,3	0,27	27
	PEG-NH ₂	100	10000	0,01	1

PEG wird unter Erwärmen in 1 mL frisch destilliertem DMF gelöst und unter Argon-Gegenstrom zum Z-geschützten L-Lysin(Z)-NCA gegeben. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur, unter Schutzgasatmosphäre und unter Lichtausschluss drei Tage lang gerührt. Das Polymer wird drei Mal in Stabilisator-freiem Diethylether gefällt und im Hochvakuum über Nacht getrocknet. Zum Entfernen der Z-Schutzgruppe wird das Produkt in 3 mL Trifluoressigsäure gelöst und mit einem Überschuss an HBr versetzt. Nach 2 h wird das Polymer wieder drei Mal in Diethylether gefällt und über Nacht vom Lösungsmittel befreit. Die Aufreinigung erfolgt mittels Amicon® Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze $M_w = 3 \text{ kDa}$, 16 min, 4000 RPM, gegen MilliQ-H₂O, 5 Wiederholungen).

Allgemeine Ausbeute: 60 % vor dem Entschützen; 25 % nach Amicon-Aufreinigung

7.3.11 Polyethylenglykol-*g*-Poly-*L*-Lysin

1. Stufe: Polyethylenglykol-N-Hydroxysuccinimid-Ester⁷⁷

Tabelle 29

Verwendete Chemikalien für die erste Stufe der Modifikation von PLL mit PEG

	<i>m</i> / g	<i>n</i> / mmol	eq.
N₃-Polyethylenglykol-OH	0,5	0,15	1
Di-(N,N'-succinimidyl)carbonat	19,23	60	7
4-(Dimethylamino)pyridin	122,17	128,3	7

0,5 g Polyethylenglykol werden in 5 mL wasserfreiem 1,4-Dioxan, Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat und 4-(Dimethylamino)pyridin werden in je 1,5 mL wasserfreiem Aceton gelöst. Die drei Lösungen werden vereinigt und für 6 h gerührt. Anschließend wird das modifizierte Polymer in Stabilisator-freiem Diethylether gefällt, 5 min bei 4000 RPM zentrifugiert und der Niederschlag in 5 mL Dioxan gelöst. Diese Aufreinigungsprozedur wird drei Mal wiederholt, wobei nach dem letzten Fällen das Produkt aus Dioxan gefriergetrocknet wird.

Ausbeute: 370 mg (0,1 mmol, 75 % der Theorie)

2. Stufe: Polyethylenglykol-*g*-Poly-*L*-Lysin⁴⁸

Tabelle 30

Verwendete Chemikalien für die zweite Stufe der Modifikation von PLL mit PEG

	<i>m</i> / mg	<i>n</i> / mmol	eq.
Polyethylenglykol-N-Hydroxysuccinimid-Ester	370	0,11	22
Poly-<i>L</i>-Lysin (PLL)	72,8	4,85*10 ⁻³	1

370 mg Polyethylenglykol-N-Hydroxysuccinimid-Ester und 72,8 mg PLL werden in je 4 mL wasserfreiem DMSO gelöst. Die PLL-Lösung wird mit 200 μ L Triethylamin versetzt und zur Polyethylenglykol-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht im Dunkeln geschüttelt, anschließend in 12 mL MilliQ-H₂O gegeben und mit 6 M HCl versetzt, sodass ein pH von 3 erreicht wird. Um überschüssiges Polyethylenglykol zu entfernen, wird die Lösung auf zwei Float-A-LyzerTM (Ausschlussgrenze $M_w = 8-10$ kDa; SpectrumTM Laboratories Spectra/PorTM) verteilt und für 4 Tage gegen MilliQ-H₂O dialysiert. Abschließend wird das Produkt durch Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 280 mg (63 % der Theorie)

7.3.12 Farbstoffmarkierung von N₃-PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ mit DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamin 110

Tabelle 31

Beispielhafter Ansatz zur Click-Reaktion von N₃-PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ mit DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamin 110: 10 Fluorophore pro Polymer

	<i>m</i> / mg	<i>n</i> / μ mol	<i>eq.</i>
N ₃ -PEG _{3,2} -g _[26] -PLL ₂₇	10	0,08	1
DBCO-CR ₁₁₀	0.90	1	12,5

Zur Farbstoffmarkierung des Azid-funktionalisierten Polymers N₃-PEG_{3,2}-g_[26]-PLL₂₇ wird die Stoffmenge des Farbstoffs DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamin 110 so gewählt, dass $n_{\text{tatsächlich}} = n_{\text{theoretisch}} \times 25\%$. Der Farbstoff wird mit dem entsprechenden Volumen an DMSO versetzt, sodass $c(\text{DBCO-CR}_{110}) = 5 \text{ mmolL}^{-1}$ ist. Das Polymer wird in 1 mL H₂O gelöst und nach Fluorophor-Zugabe für 24 h bei 20 °C und unter Lichtausschluss geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Amicon[®] Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze $M_w = 50$ kDa, 7 min, 3000 RPM, gegen MilliQ-H₂O, 50-60 Wiederholungen), bis das Eluat unter UV-Licht keine Fluoreszenz zeigt.

Ausbeute: 9 mg (83 % der Theorie)

7.3.13 Hybridisierung der siRNA

Hybridisierung in PBS-Puffer

Tabelle 32

Hybridisierung des Leitstrangs (*sense*) mit dem Folgestrang (*antisense*) in unterschiedlichen Verhältnissen und in 1xPBS-Puffer

Verhältnis	$V(\text{sense}) / \mu\text{L}$	$V(\text{antisense}) / \mu\text{L}$	$V(10\text{xPBS}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$
0,70	2,50	1,75	5,00	40,75
0,80	2,50	2,00	5,00	40,50
0,90	2,50	2,25	5,00	40,25
1,00	2,50	2,50	5,00	40,00
1,10	2,50	2,75	5,00	39,75
1,20	2,50	3,00	5,00	39,50
1,30	2,50	3,25	5,00	39,25

Die zwei Einzelstränge mit $c_{\text{start}} = 0,1 \text{ mM}$ werden in unterschiedlichen Volumen-Verhältnissen hybridisiert. Dazu werden sie auf $c_{\text{ende}} = 5 \mu\text{M}$ in 1x PBS-Puffer verdünnt. Nach 3 minütiger Inkubation bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ werden die Proben für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Die Analyse erfolgt mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 11 W, 385 V und mit dem Laufmittel TBE-Puffer. Nach einer Laufzeit von 3 h wird das Gel zunächst bei einer Wellenlänge von 533 nm gescannt (Typhoon-Scanner). Dann wird es 10 min mit SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain gefärbt und wiederum gescannt.

Salzfreie Hybridisierung

Jeweils 1 mL der Einzelstränge mit $c = 0,1 \text{ mM}$ werden zusammengegeben und zunächst für 10 Minuten bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Dann wird die Temperatur auf $54 \text{ }^\circ\text{C}$ gesenkt und die Nukleinsäure für 4 h inkubiert. Die Endkonzentration der siRNA beträgt $0,05 \text{ mM}$ bzw. $0,744 \text{ gL}^{-1}$ in 2 mL H_2O .

Die Hybridisierung kann nicht mittels Gelelektrophorese detektiert werden. Die Probe wird schließlich mit einem 20 nm Anotop-Spritzenfilter filtriert.

Literatur

1. Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S., Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5, (4), 275-84.
2. Haag, R.; Kratz, F., Polymer therapeutics: Concepts and applications. *Angew Chem Int Edit* **2006**, 45, (8), 1198-1215.
3. Ho, D.; Sun, X. L.; Sun, S. H., Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Accounts Chem Res* **2011**, 44, (10), 875-882.
4. Hendrie, P. C.; Russell, D. W., Gene targeting with viral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2005**, 12, (1), 9-17.
5. Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo - Polyethylenimine. *P Natl Acad Sci USA* **1995**, 92, (16), 7297-7301.
6. Kingston, R. E.; Chen, C. A.; Rose, J. K., Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Mol Biol* **2003**, Chapter 9, Unit 9 1.
7. Feynman, R. P., There is plenty of room at the bottom. *Annual Meeting of the American Physical Society* **1959**.
8. Jain, T. K.; Reddy, M. K.; Morales, M. A.; Leslie-Pelecky, D. L.; Labhasetwar, V., Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular pharmaceutics* **2008**, 5, (2), 316-27.
9. Schmid, G., *Nanoparticles - From Theory to Application*. 2 ed.; Wiley-VCH: 2010.
10. Massart, R., Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE T Magn* **1981**, 17, (2), 1247-1248.
11. Massart, R.; Cabuil, V., Effect of Some Parameters on the Formation of Colloidal Magnetite in Alkaline-Medium - Yield and Particle-Size Control. *J Chim Phys Pcb* **1987**, 84, (7-8), 967-973.
12. Mikhaylova, M.; Kim, D. K.; Bobrysheva, N.; Osmolowsky, M.; Semenov, V.; Tsakalakos, T.; Muhammed, M., Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: Dependence on surface modification. *Langmuir* **2004**, 20, (6), 2472-2477.
13. Chen, T. J.; Cheng, T. H.; Chen, C. Y.; Hsu, S. C. N.; Cheng, T. L.; Liu, G. C.; Wang, Y. M., Targeted Herceptin-dextran iron oxide nanoparticles for noninvasive imaging of HER2/neu receptors using MRI. *J Biol Inorg Chem* **2009**, 14, (2), 253-260.
14. Molday, R. S.; Mackenzie, D., Immunospecific Ferromagnetic Iron-Dextran Reagents for the Labeling and Magnetic Separation of Cells. *J Immunol Methods* **1982**, 52, (3), 353-367.
15. Ravikumar, C.; Bandyopadhyaya, R., Mechanistic Study on Magnetite Nanoparticle Formation by Thermal Decomposition and Coprecipitation Routes. *J Phys Chem C* **2011**, 115, (5), 1380-1387.
16. Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Bin Na, H., Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J Am Chem Soc* **2001**, 123, (51), 12798-12801.
17. Sun, S. H.; Zeng, H., Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J Am Chem Soc* **2002**, 124, (28), 8204-8205.
18. Jana, N. R.; Chen, Y. F.; Peng, X. G., Size- and shape-controlled magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) oxide nanocrystals via a simple and general approach. *Chem Mater* **2004**, 16, (20), 3931-3935.

19. Park, J.; An, K. J.; Hwang, Y. S.; Park, J. G.; Noh, H. J.; Kim, J. Y.; Park, J. H.; Hwang, N. M.; Hyeon, T., Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater* **2004**, *3*, (12), 891-895.
20. Yu, W. W.; Falkner, J. C.; Yavuz, C. T.; Colvin, V. L., Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem Commun* **2004**, (20), 2306-2307.
21. Riedel, E., *Anorganische Chemie*. Walter de Gruyter: Berlin, 2004; Vol. 6.
22. Bedanta, S.; Kleemann, W., Supermagnetism. *J Phys D Appl Phys* **2009**, *42*, (1).
23. Mahl, D. Synthese, Löslichkeit und Stabilität von Gold-Nanopartikeln in biologischen Medien. Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2011.
24. Cossart, P.; Helenius, A., Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2014**, *6*, (8).
25. Behr, J. P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* **1997**, *51*, (1-2), 34-36.
26. Benjaminsen, R. V.; Matthebjerg, M. A.; Henriksen, J. R.; Moghimi, S. M.; Andresen, T. L., The Possible "Proton Sponge" Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Molecular Therapy* **2013**, *21*, (1), 149-157.
27. Giemsa, A. Aufnahme, Metabolisierung und Toxizität von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIOs). Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, 2013.
28. Schillinger, U.; Brill, T.; Rudolph, C.; Huth, S.; Gersting, S.; Krotz, F.; Hirschberger, J.; Bergemann, C.; Plank, C., Advances in magnetofection - magnetically guided nucleic acid delivery. *J Magn Magn Mater* **2005**, *293*, (1), 501-508.
29. Dalby, B.; Cates, S.; Harris, A.; Ohki, E. C.; Tilkins, M. L.; Price, P. J.; Ciccarone, V. C., Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **2004**, *33*, (2), 95-103.
30. Mah, C.; Fraitas, T. J., Jr.; Zolotukhin, I.; Song, S.; Flotte, T. R.; Dobson, J.; Batich, C.; Byrne, B. J., Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2002**, *6*, (1), 106-12.
31. Huttinger, C.; Hirschberger, J.; Jahnke, A.; Kostlin, R.; Brill, T.; Plank, C.; Kuchenhoff, H.; Krieger, S.; Schillinger, U., Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial. *The journal of gene medicine* **2008**, *10*, (6), 655-67.
32. Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J., Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, *210*, (1-2), 831-835.
33. Decher, G., Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277*, (5330), 1232-1237.
34. Poon, Z.; Chang, D.; Zhao, X. Y.; Hammond, P. T., Layer-by-Layer Nanoparticles with a pH-Sheddable Layer for in Vivo Targeting of Tumor Hypoxia. *ACS nano* **2011**, *5*, (6), 4284-4292.
35. Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Caruso, F.; Davis, S. A.; Mohwald, H., Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew Chem Int Edit* **1998**, *37*, (16), 2202-2205.

36. Dorris, A. C.; Douglas, K. L.; Tabrizian, M.; Barrett, C. J., Control of DNA incorporation into nanoparticles with poly(L-lysine) multilayers. *Can J Chem* **2008**, *86*, (12), 1085-1094.
37. Reibetanz, U.; Chen, M. H. A.; Mutukumaraswamy, S.; Liaw, Z. Y.; Oh, B. H. L.; Venkatraman, S.; Donath, E.; Neu, B., Colloidal DNA Carriers for Direct Localization in Cell Compartments by pH Sensing. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, (7), 1779-1784.
38. Schuler, C.; Caruso, F., Decomposable hollow biopolymer-based capsules. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, (3), 921-926.
39. Katagiri, K.; Matsuda, A.; Caruso, F., Effect of UV-irradiation on polyelectrolyte multilayered films and hollow capsules prepared by layer-by-layer assembly. *Macromolecules* **2006**, *39*, (23), 8067-8074.
40. Caruso, F.; Spasova, M.; Saigueirino-Maceira, V.; Liz-Marzan, L. M., Multilayer assemblies of silica-encapsulated gold nanoparticles on decomposable colloid templates. *Adv Mater* **2001**, *13*, (14), 1090-+.
41. Richardson, J. J.; Ejima, H.; Lorcher, S. L.; Liang, K.; Senn, P.; Cui, J. W.; Caruso, F., Preparation of Nano- and Microcapsules by Electrophoretic Polymer Assembly. *Angew Chem Int Edit* **2013**, *52*, (25), 6455-6458.
42. Schwarz, S.; Wong, J. E.; Bornemann, J.; Hodenius, M.; Himmelreich, U.; Richtering, W.; Hoehn, M.; Zenke, M.; Hieronymus, T., Polyelectrolyte coating of iron oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2012**, *8*, (5), 682-91.
43. Schneider, G.; Decher, G., From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres. *Nano Lett* **2004**, *4*, (10), 1833-1839.
44. Schneider, G.; Decher, G., Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly. investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability. *Langmuir* **2008**, *24*, (5), 1778-1789.
45. Harris, J. M., *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry*. Plenum Press: New York, 1992.
46. Rimann, M.; Luhmann, T.; Textor, M.; Guerino, B.; Ogier, J.; Hall, H., Characterization of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles for the delivery of therapeutic DNA. *Bioconjugate Chem* **2008**, *19*, (2), 548-557.
47. Zopes, D.; Stein, B.; Mathur, S.; Graf, C., Improved Stability of "Naked" Gold Nanoparticles Enabled by in Situ Coating with Mono and Multivalent Thiol PEG Ligands. *Langmuir* **2013**, *29*, (36), 11217-11226.
48. Huang, N. P.; Michel, R.; Voros, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi, A.; Elbert, D. L.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D., Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Surface-analytical characterization and resistance to serum and fibrinogen adsorption. *Langmuir* **2001**, *17*, (2), 489-498.
49. Miyama, H.; Shimada, H.; Fujii, N.; Nosaka, Y.; Noishiki, Y., Graft-Copolymerization of Methoxypoly(Ethylene Glycohol) Methacrylate onto Polyacrylonitrile and Evaluation of Nonthrombogenicity of the Copolymer. *J Appl Polym Sci* **1988**, *35*, (1), 115-125.
50. Kohler, N.; Sun, C.; Fichtenholtz, A.; Gunn, J.; Fang, C.; Zhang, M. Q., Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small* **2006**, *2*, (6), 785-792.
51. Xie, J.; Xu, C.; Kohler, N.; Hou, Y.; Sun, S., Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Adv Mater* **2007**, *19*, (20), 3163-+.

52. Schmidt, M., Simultaneous Static and Dynamic Light Scattering in Dynamic Light Scattering. In Brown, W., Ed. Clarendon Press: Oxford, 1993.
53. Schärfl, W., *Light Scattering from Polymer Solutions*. Springer: Heidelberg, 2007.
54. Hörtz, C. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2014.
55. Rausch, K.; Reuter, A.; Fischer, K.; Schmidt, M., Evaluation of nanoparticle aggregation in human blood serum. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, (11), 2836-9.
56. Delgado, A. V.; Gonzalez-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J.; International Union of, P.; Applied Chemistry, P.; Biophysical Chemistry Division, I. T. R., Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of colloid and interface science* **2007**, *309*, (2), 194-224.
57. Utech, S. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2011.
58. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005; Vol. 7.
59. Obermair, C., *Nanostrukturierung mittels Rasterkraftmikroskopie und Elektrochemie*. Cuvillier: Göttingen 2005.
60. http://www.nike.bam.de/de/kompetenz/methoden/geometrie/methoden_afm-rastersondenmikroskopie.htm
61. Hausteil, E.; Schwill, P., Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications. In *Biophysics Textbook Online*, 2004.
62. <http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html>.
63. Abé, S. A. Synthese und Charakterisierung von polymerbasierten Trägersystemen für biomedizinische Anwendungen. Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Mainz, 2014.
64. Abbé, E., *Die optischen Hilfsmittel der Mikroskopie. Bericht über die wissenschaftlichen Apparate auf der Londoner internationalen Ausstellung*. Vieweg: Braunschweig, 1876.
65. Davisson, C. J.; Germer, L. H., *Phys. Rev.* **1927**, *30*, 705.
66. Knoll, M.; Ruska, E. Z., *Physik* **1932**, *78*, 21.
67. Clarke, J.; Braginski, A. I., *The SQUID Handbook*. Wiley-VCH: Weinheim, 2004
68. Xu, Y. L.; Qin, Y.; Palchoudhury, S.; Bao, Y. P., Water-Soluble Iron Oxide Nanoparticles with High Stability and Selective Surface Functionality. *Langmuir* **2011**, *27*, (14), 8990-8997.
69. Xie, J.; Chen, K.; Huang, J.; Lee, S.; Wang, J. H.; Gao, J.; Li, X. G.; Chen, X. Y., PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31*, (11), 3016-3022.
70. Xu, C. J.; Xu, K. M.; Gu, H. W.; Zheng, R. K.; Liu, H.; Zhang, X. X.; Guo, Z. H.; Xu, B., Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, (32), 9938-9939.
71. Hatakeyama, M.; Kishi, H.; Kita, Y.; Imai, K.; Nishio, K.; Karasawa, S.; Masaike, Y.; Sakamoto, S.; Sandhu, A.; Tanimoto, A.; Gomi, T.; Kohda, E.; Abe, M.; Handa, H., A two-step ligand exchange reaction generates highly water-dispersed magnetic nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Chem* **2011**, *21*, (16), 5959-5966.
72. Borghi, E. B.; Morando, P. J.; Blesa, M. A., Dissolution of Magnetite by Mercaptocarboxylic Acids. *Langmuir* **1991**, *7*, (8), 1652-1659.
73. Burke, S. E.; Barrett, C. J., pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, (6), 1773-1783.
74. Ren, K. F.; Ji, J.; Shen, J. C., Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-L-lysine/DNA films. *Biomaterials* **2006**, *27*, (7), 1152-1159.

75. Chai, W. Synthese und Charakterisierung von multivalenten kationischen Tensiden und Polymeren. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2012.
76. Avrameas, S.; Ternynck, T., The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* **1969**, 6, (1), 53-66.
77. Miron, T.; Wilchek, M., A Simplified Method for the Preparation of Succinimidyl Carbonate Polyethylene-Glycol for Coupling to Proteins. *Bioconjugate Chem* **1993**, 4, (6), 568-569.
78. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Abkürzungsverzeichnis

A_2	2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks
Abb.	Abbildungsverzeichnis
ACF	Autokorrelationsfunktion
AFM	atomic force microscopy
c	Konzentration
D	Diffusionskoeffizient
D ₂ O	Deuteriumoxid
DBCO	Dibenzocyclooctin
DBCO-CR ₁₁₀	DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamin 110
DMF	Dimethylformamid
DMSA	Dithiobersteinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GA	Glutaraldehyd
h	Stunden
Hep	Heparin
M	Gramm pro Mol
M_n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M_w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
min	Minuten
MION	<i>monocrystalline iron oxide nanoparticles</i>
n	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NP	Nanopartikel
PAA	Polyacrylsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	Polyallylamin

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDADMAC	Polydiallyldimethylamoniumchlorid
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglykol
PEL	Polyelektrolyt
PHSAM	Polyhexylsperminacrylamid
PLA	Poly- <i>L</i> -Arginin
PLL	Poly- <i>L</i> -Lysin
PSS	Polystyrolsulfonat
R_h	Hydrodynamischer Radius
R_g	Trägheitsradius
RNA	Ribonukleinsäure
RES	Retikuloendotheliales System
s	Sekunden
SLS	Statische Lichtstreuung
SPG	Spritzenpumpengeschwindigkeit
V	Volumen

Anhang

Zu Kapitel 5.1.2

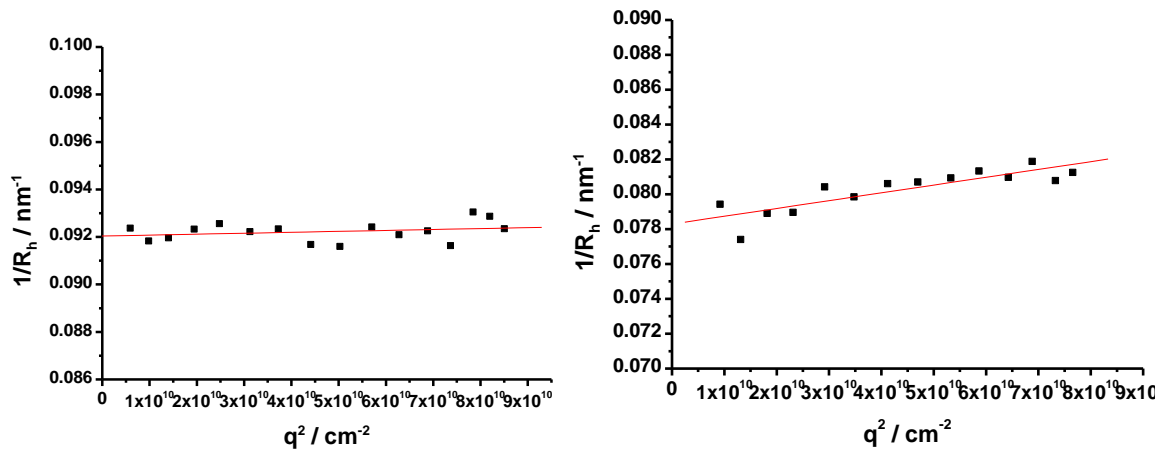


Abbildung 68

Winkelabhängige DLS-Messungen der im Organischen löslichen Eisenoxid-Nanopartikeln (Toluol, LCR 450 nm filtrierte).

Links: OL- Fe_3O_4 mit $R_h = 10,8 \text{ nm}$

Rechts: TOPO/OL- Fe_3O_4 $R_h = 12,8 \text{ nm}$

Zu Kapitel 5.2.2

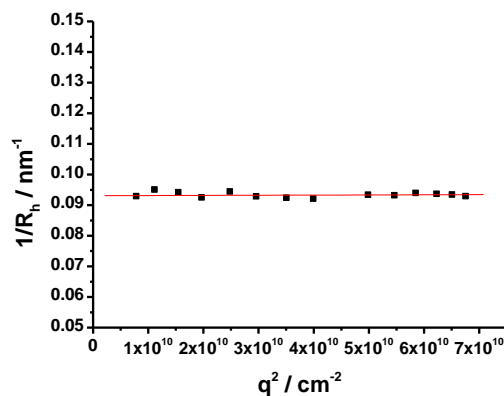


Abbildung 69

Winkelabhängige DLS-Messung der Probe Cit- Fe_3O_4 (H_2O , LCR 450 nm filtrierte) mit $R_h = 11,4 \text{ nm}$

Zu Kapitel 5.3.1

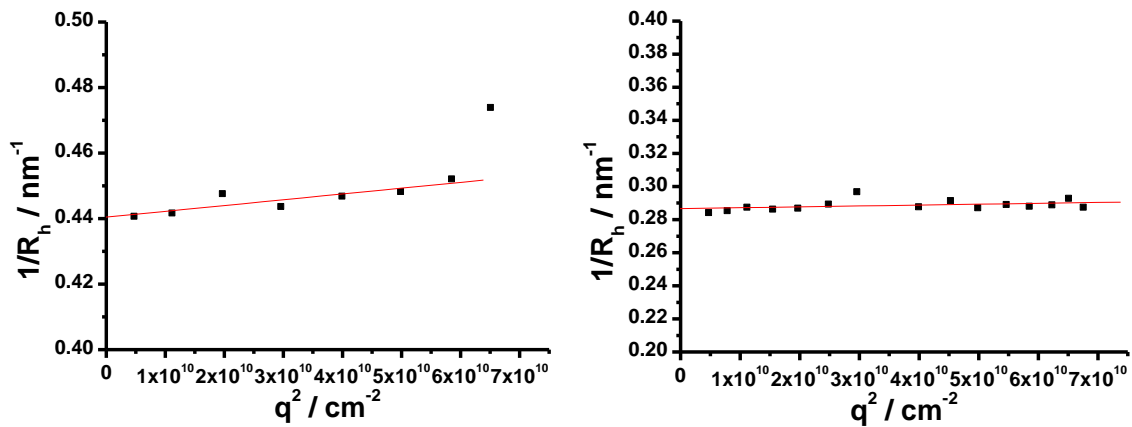


Abbildung 70

Winkelabhängige DLS-Messungen der Polyelektrolyte (jeweils biexponentielle Fitfunktionen).

Links: PLL (150 mM NaCl, 6,5 g/L, LCR 450 nm filtriert) mit $R_h = 2,3 \text{ nm}$

Rechts: Heparin (150 mM NaCl, g/L, LCR 450 nm filtriert) mit $R_h = 3,5 \text{ nm}$

Zu Kapitel 5.4.3

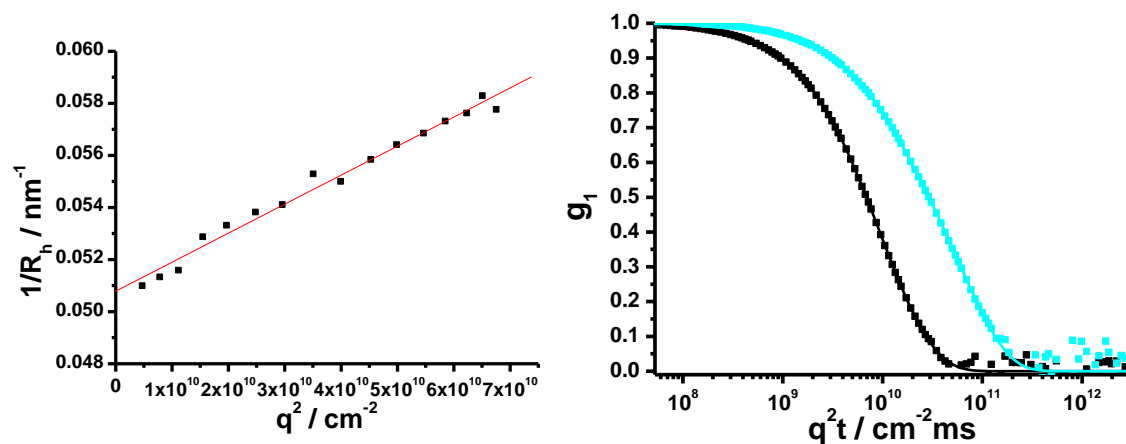


Abbildung 71

Links: Winkelabhängige DLS-Messung der Probe NP-PLL_{cat} (H₂O, GHP 450 nm filtriert) mit $R_h = 19 \text{ nm}$

Rechts: Vergleich der ACF (bei 30°) vor (schwarz) und nach (türkis) Zugabe von Salz → R_h steigt auf 58 nm an

Zu Kapitel 5.5.3

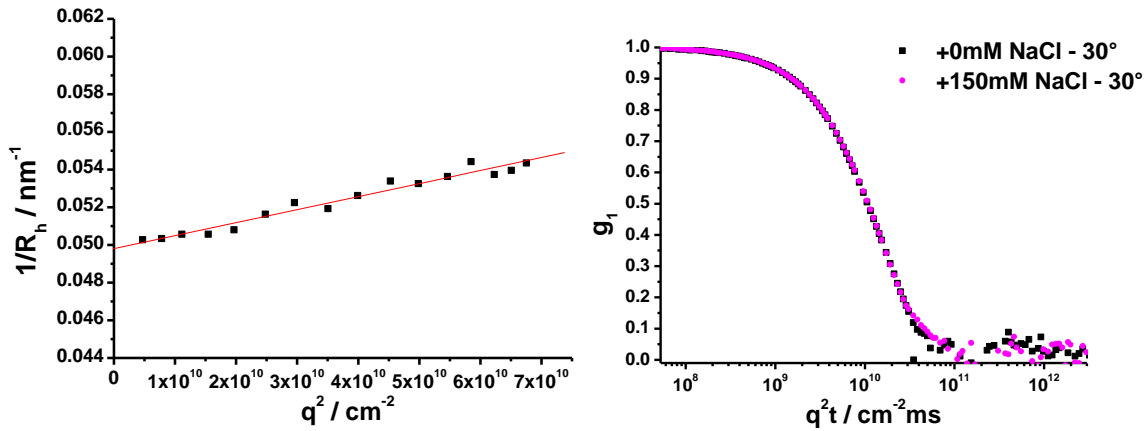


Abbildung 72

Links: Winkelabhängige DLS-Messung der Probe NP-PLL-Hep (H_2O , GHP 450 nm filtriert) mit $R_h = 20,1 \text{ nm}$

Rechts: Vergleich der ACF (bei 30°) der Probe NP-PLL-Hep-[PEG₂-g_[27]-PLL₂₇] vor (schwarz) und nach (pink) Zugabe von Salz $\rightarrow R_h$ bleibt konstant auf 30 nm

Zu Kapitel 5.6.3

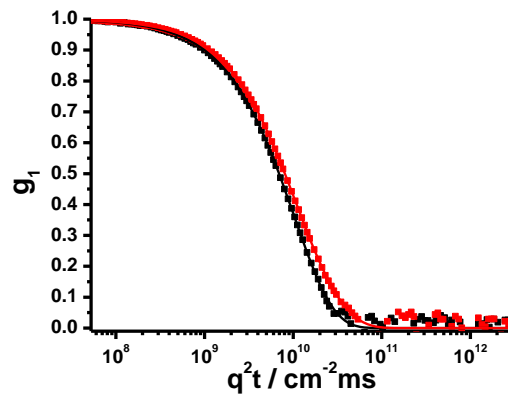


Abbildung 73

Vergleich der ACF (bei 30°) der Proben NP-PLL (schwarz) und NP-PLL-siRNA $\rightarrow R_h$ steigt von 20,8 nm auf 23,4 nm.

Zu Kapitel 5.7

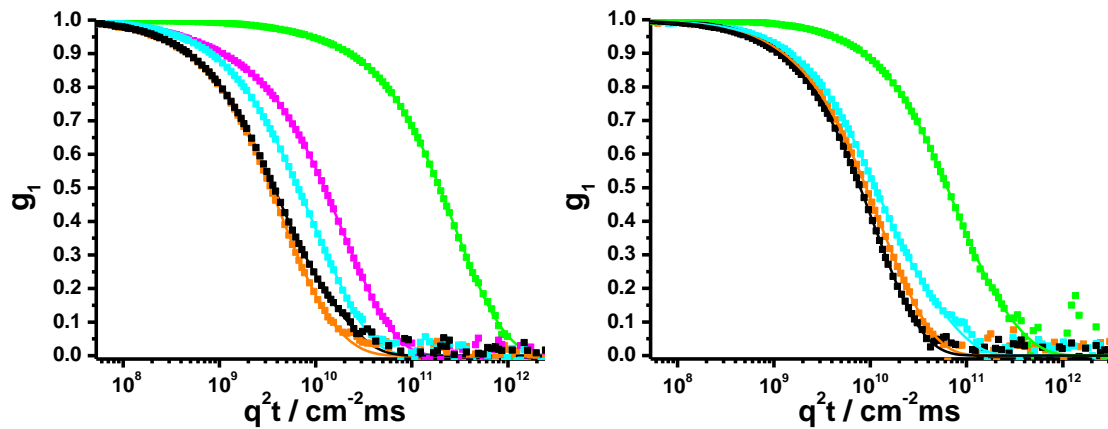


Abbildung 74

Links: Vergleich der ACF (bei 30°) der Polymere $[\text{PEG}_{3,2}\text{-}g_{[26]}\text{-PLL}_{27}] \times \text{DBCO-CR}_{110}$ mit $X = 0$ (schwarz), $X = 1$ (türkis), $X = 4$ (orange), $X = 10$ ohne NaCl (pink), $X = 10$ mit NaCl (grün), Rechts: Vergleich der ACF (bei 30°) der Komplexe $\text{NP-}[\text{PEG}_{3,2}\text{-}g_{[26]}\text{-PLL}_{27}] \times \text{DBCO-CR}_{110}$ mit $X = 0$ (schwarz), $X = 1$ (türkis), $X = 4$ (orange), $X = 10$ ohne NaCl (grün)

Zu Kapitel 5.7.2

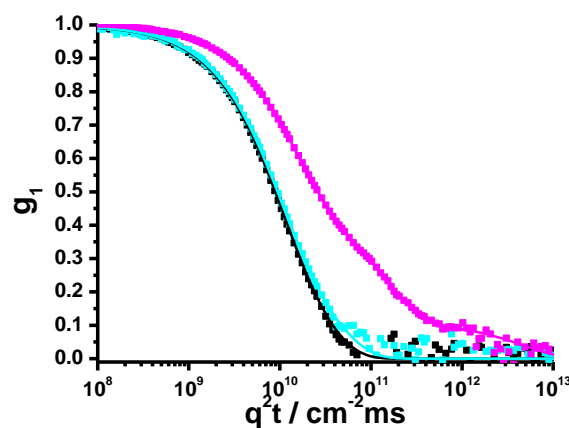


Abbildung 75

Vergleich der ACF (bei 39°) der Komplexe $\text{NP-}[\text{PEG}_{3,2}\text{-}g_{[26]}\text{-PLL}_{27}] \times 4 \text{ DBCO-CR}_{110}$ nach jeweiliger magnetischer Separation: Erste Sep. = schwarz, zweite Sep. = türkis, dritte Sep. = pink