

Aus dem Institut für Biomedizinische Optik

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Alfred Vogel

Untersuchungen  
zu den Mechanismen  
der Proteininaktivierung  
an laserbestrahlten Goldnanopartikeln

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Marco Bever

aus Lübeck

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reginald Birngruber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian L. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.01.2011

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                          |           |
|----------|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                        | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Theoretische Grundlagen</b>                           | <b>7</b>  |
| 2.1      | Laserinduziertes Erhitzen von Nanopartikeln . . . . .    | 7         |
| 2.1.1    | Optische Eigenschaften von Metallnanopartikeln . . . . . | 7         |
| 2.1.2    | Erhitzen von Nanopartikeln mit Laserpulsen . . . . .     | 14        |
| 2.1.3    | Wärmeleitung . . . . .                                   | 15        |
| 2.2      | Thermisch induzierte Sekundäreffekte . . . . .           | 24        |
| 2.2.1    | Kavitationsblasenbildung . . . . .                       | 25        |
| 2.2.2    | Schmelzen und Verdampfen von Goldpartikeln . . . . .     | 38        |
| 2.3      | Denaturierung von Proteinen . . . . .                    | 41        |
| 2.3.1    | Proteinstruktur und -funktion . . . . .                  | 41        |
| 2.3.2    | Denaturierung durch Wärme . . . . .                      | 45        |
| 2.3.3    | Denaturierung an Grenzflächen . . . . .                  | 52        |
| 2.3.4    | Denaturierung durch Druck . . . . .                      | 54        |
| 2.3.5    | Proteinschädigung durch chemische Reaktionen . . . . .   | 54        |
| 2.3.6    | Zusammenfassung der Schadensmechanismen . . . . .        | 55        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>                             | <b>57</b> |
| 3.1      | Goldnanopartikel-Protein-Konjugate . . . . .             | 57        |
| 3.1.1    | Modellproteine . . . . .                                 | 57        |
| 3.1.2    | Konjugation von Goldpartikeln und Proteinen . . . . .    | 66        |
| 3.2      | Lasersysteme und Bestrahlungsaufbauten . . . . .         | 72        |
| 3.2.1    | Nanosekundenpuls-Bestrahlungsaufbau . . . . .            | 73        |
| 3.2.2    | Pikosekundenpuls-Bestrahlungsaufbau . . . . .            | 78        |

|          |                                                   |            |
|----------|---------------------------------------------------|------------|
| 3.2.3    | Bestrahlung der Proben und Dosimetrie . . . . .   | 81         |
| 3.3      | Versuchsdurchführung und Auswertung . . . . .     | 88         |
| 3.3.1    | Experimentelle Durchführung . . . . .             | 88         |
| 3.3.2    | Auswertung mit Microsoft Excel . . . . .          | 93         |
| <b>4</b> | <b>Experimentelle Ergebnisse</b>                  | <b>95</b>  |
| 4.1      | Voruntersuchungen . . . . .                       | 95         |
| 4.1.1    | Kontrollbestrahlung . . . . .                     | 96         |
| 4.1.2    | Kopplungseffizienzen . . . . .                    | 96         |
| 4.1.3    | Protein-zu-Goldpartikel-Relationen . . . . .      | 101        |
| 4.1.4    | Partikelaggregation und -fragmentierung . . . . . | 103        |
| 4.1.5    | Proteinaggregation und -fragmentierung . . . . .  | 111        |
| 4.2      | Bestrahlungsexperimente . . . . .                 | 113        |
| 4.2.1    | Bestrahlung mit Pikosekundenpulsen . . . . .      | 113        |
| 4.2.2    | Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen . . . . .      | 129        |
| 4.3      | Langzeit-Temperaturdenaturierung . . . . .        | 135        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>                                 | <b>137</b> |
| 5.1      | Voruntersuchungen . . . . .                       | 137        |
| 5.2      | Bestrahlung mit Pikosekundenpulsen . . . . .      | 145        |
| 5.3      | Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen . . . . .      | 158        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung und Ausblick</b>               | <b>167</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                       | <b>171</b> |
|          | <b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>          | <b>185</b> |
|          | <b>Danksagung</b>                                 | <b>189</b> |

# Kapitel 1

## Einleitung

Mit Laserstrahlung lassen sich Materialien mit äußerster Präzision bearbeiten. Dabei können durch starke Fokussierung der Laserstrahlen sehr hohe Temperaturen in kleinsten Regionen erzeugt werden [1]. Aufgrund dieser Präzision sind Laser auch für medizinische und biologische Anwendungen von großer Bedeutung. So können kleinste Gefäße selektiv verödet und Hautschichten präzise abgetragen werden; vor allem aber lassen sich Augenkrankheiten und Sehschwächen mit fokussierter Laserstrahlung mikrometergenau behandeln [2–6].

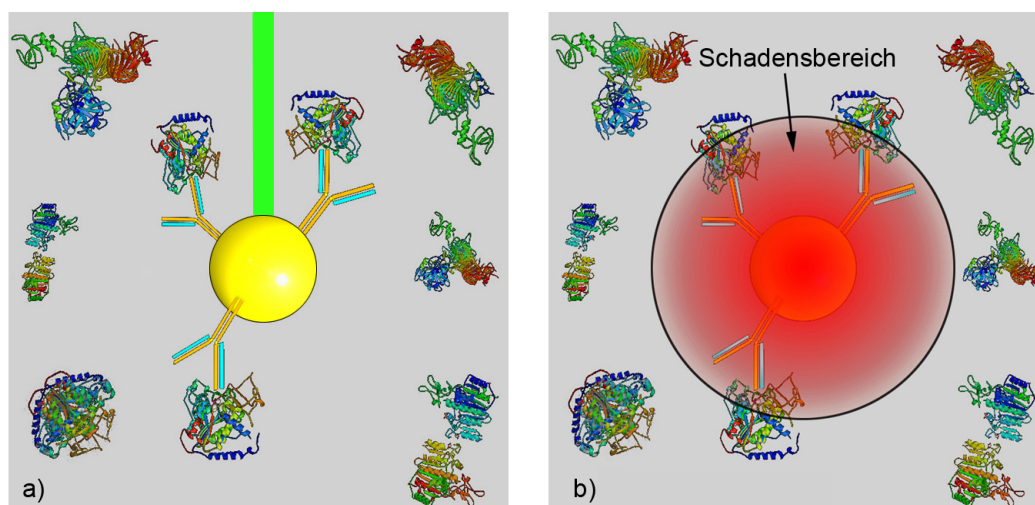
Wird Laserlicht aus dem sichtbaren Spektralbereich verwendet, können durch Optiken mit großer numerischer Apertur beugungsbegrenzte Fokusedurchmesser von etwa 500 nm realisiert werden [7]. Für die selektive Manipulation einzelner Zellen reicht eine starke Bündelung des Laserstrahls somit aus. Aufgrund von Plasmabildung, explosiver Verdampfung oder Wärmeleitung in die Umgebung sind die Schadensbereiche im Zielgebiet des Gewebes allerdings meist noch vergrößert [8, 9].

Um dagegen subzelluläre biologische Strukturen, wie z.B. die lediglich 5–50 nm großen Proteine, selektiv zu zerstören, sind noch feinere Techniken erforderlich. Ein mögliches Verfahren hierzu ist die Nanopartikel-assistierte Laserinaktivierung (NALI) von Proteinen, die den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt. Bei der NALI wird eine im Vergleich zur Umgebung viel stärkere Lichtabsorption der Zielstrukturen ausgenutzt, um die Bestrahlungsenergie

zu deponieren. Dazu werden zunächst Nanopartikel ( $\varnothing \approx 1 - 100 \text{ nm}$ ), die Licht einer bestimmten Wellenlänge besonders gut absorbieren, an die zu schädigenden Proteine gekoppelt. Wird das System dann mit kurzen Laserpulsen der entsprechenden Wellenlänge bestrahlt, können die Nanopartikel – abhängig von der Laserpulsdauer und der Höhe der Bestrahlung – stark erhitzt werden. Diese große Temperaturerhöhung führt dann entweder direkt durch thermische Schädigung oder mittelbar durch Kavitationsblasen oder andere Sekundärprozesse zu einer Zerstörung der biologischen Zielstrukturen [10]. Dabei ermöglicht die Verwendung einer Laserpulsdauer, die nicht viel größer als die thermische Einschlusszeit der absorbierenden Nanopartikel ist, die thermophysikalischen Effekte der NALI auf die unmittelbare Umgebung der Nanopartikel zu beschränken.

Werden viele Proteine innerhalb oder an der Membran einer Zelle mit Nanopartikeln gekoppelt, kann mittels NALI die ganze Zelle zerstört werden [11, 12]. Die selektive Zerstörung von krankhaften oder veränderten Zellen bzw. Zellverbänden mittels Laserbestrahlung von Nanopartikeln ist Inhalt der Nanopartikel-Zellchirurgie (*nanoparticle cell surgery*, NPCS). Welche physikalischen oder chemischen Effekte der erhitzten Partikel dabei genau für die Zellschädigung verantwortlich sind, ist noch nicht genau verstanden und wird zurzeit intensiv erforscht [10, 13].

Für ein neuartiges Verfahren innerhalb der NPCS sollen bestimmte intrazelluläre Proteine gezielt ausgeschaltet werden, ohne die Zelle in ihrer Gesamtheit zu schädigen, was in Abb. 1.1 schematisch dargestellt ist. Dazu werden zunächst Nanopartikel-Antikörper-Konjugate in die Zelle eingeschleust, die spezifisch an die Zielproteine koppeln. Hierdurch wird, über viele verschiedene Orte in der Zelle verstreut, eine sehr hohe räumliche Auflösung erreicht. Anschließend wird die Zelle oder ein ganzer Zellverband systemisch bestrahlt, wobei nur die biologischen Zielstrukturen geschädigt werden, die sich in unmittelbarer Nähe der Nanopartikel befinden. Neben dem langfristigen Ziel, durch fehlerhafte Proteine ausgelöste Krankheiten zu behandeln, kann mit dieser Methode auch die Funktion bestimmter Proteine durch deren gezielte Inaktivierung untersucht werden.



**Abbildung 1.1.** Schematische Darstellung zur selektiven Proteininaktivierung mittels Laserbestrahlung von Goldnanopartikeln. a) Die mit Antikörpern beschichteten Goldpartikel binden bestimmte Proteine innerhalb einer Multi-Protein-Matrix (z. B. in Zellen). Wird das System dann mit grünen Laserpulsen bestrahlt, werden die Nanopartikel stark erhitzt. b) Durch thermophysikalische oder chemische Prozesse werden Proteine im direkten Umfeld der Goldpartikel geschädigt. Die Proteine selbst absorbieren die Strahlung nicht, daher bleiben sie außerhalb des Schadensbereichs intakt.

**Wissenschaftlicher Stand bei Beginn dieser Arbeit.** Mit ultrakurzen Pikosekunden-Laserpulsen und wenige Nanometer großen Goldpartikeln können für sehr kurze Zeiten ( $< 100$  ps) Temperaturen von etlichen  $1000^{\circ}\text{C}$  in extrem kleinen Volumina (wenige Zeptoliter) erzeugt werden [14]. HÜTTMANN und RADT zeigten anhand von *in-vitro*-Bestrahlungsexperimenten, dass die an lasererhitzte Goldnanopartikel gekoppelten Enzyme *alkalische Phosphatase* und  *$\alpha$ -Chymotrypsin* inaktiviert werden können, wenn die Bestrahlung hoch genug ist [15, 16]. Als Ursachen für die Inaktivierung der Proteine wurden neben einer thermischen Denaturierung auch Disruption oder Schäden durch Kavitationsblasenbildung sowie photochemische Reaktionen in Betracht gezogen.

Bei den Bestrahlungsexperimenten von RADT wurden  $15\text{ nm}$  große Goldpartikel mit den genannten Enzymen beschichtet und mit  $35\text{ ps}$ - sowie  $6\text{ ns}$ -Laserpulsen bestrahlt [16]. Außerdem wurden magnetithaltige Silicamikro-

partikel ( $\varnothing > 8 \mu\text{m}$ ) mit den Enzymen gekoppelt und mit  $15 \mu\text{s}$ -Laserpulsen bestrahlt. Zusammengefasst führten die Experimente von RADT zu folgenden Ergebnissen [16]:

- Bei Bestrahlung mit  $35 \text{ ps}$ -Pulsen wird oberhalb von  $10 \text{ mJ/cm}^2$  eine Enzyminaktivierung beobachtet, die mit zunehmender Bestrahlung kontinuierlich ansteigt. Die Abhängigkeit der Inaktivierungsrate von der applizierten Bestrahlung ist bei alkalischer Phosphatase und  $\alpha$ -Chymotrypsin vergleichbar.
- Eine thermische Enzyminaktivierung, die durch die Arrhenius-Kinetik beschrieben werden kann, ist auszuschließen. Die Enzyminaktivierung ist entweder nicht thermisch bedingt oder die Arrheniusgleichung kann nicht zu sehr kurzen Heizdauern mit hohen Temperaturen extrapoliert werden.
- Die wahrscheinlichste Temperaturschwelle für das Einsetzen der Proteininaktivierung ist der Schmelzpunkt der Goldpartikel. Deren Schmelzbeginn wird durch das Einsetzen der in TEM-Bildern erkennbaren Partikelfragmentierung definiert.
- Eine Kavitationsblasenbildung um die lasererhitzten Goldpartikel führt nicht zu einer Enzyminaktivierung.
- Lineare photochemische Prozesse sind nicht für die Proteinschädigung verantwortlich.
- Nichtlineare photochemische Prozesse, Elektronenemissionen der Partikel am Schmelzpunkt und oberflächenverstärkte Mehrphotonen-Absorption könnten für die Proteininaktivierung verantwortlich sein.
- Der durch das lasererhitzte Nanopartikel erzeugte Schaden bleibt auf die Proteinlage direkt an der Partikeloberfläche begrenzt.

**Ziele dieser Arbeit.** Nachdem RADT *et al.* die grundlegenden Untersuchungen zur NALI von Proteinen durchführten, wurden in dieser Arbeit die Schadensmechanismen weiter *in vitro* untersucht. Die wesentlichen Arbeitsziele waren:

- Die weitere Aufklärung der relevanten physikalischen, chemischen und biologischen Schadensmechanismen.
- Die Bestimmung der für die NALI optimalen Laserstrahlparameter und Partikelgrößen.
- Eine genauere Bestimmung der Schadensreichweite.



# Kapitel 2

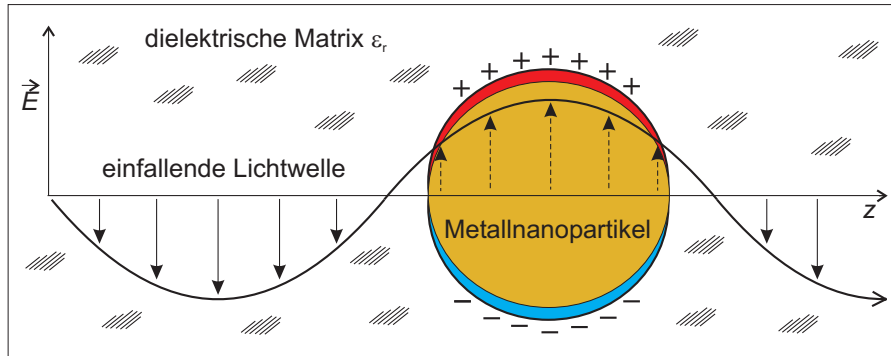
## Theoretische Grundlagen

### 2.1 Laserinduziertes Erhitzen von Nanopartikeln

In diesem Abschnitt sind die grundlegenden physikalischen Mechanismen, die mit der laserinduzierten Erhitzung von Goldnanopartikeln verbunden sind, dargestellt. Dazu werden zunächst die ungewöhnlichen optischen Eigenschaften der Nanopartikel erörtert. Die beiden darauf folgenden Teile befassen sich dann mit der Wirkung der Laserstrahlen auf die Teilchen und Berechnungen für die Temperaturentwicklung eines Goldpartikels und seiner wässrigen Umgebung während und nach einer Laserbestrahlung.

#### 2.1.1 Optische Eigenschaften von Metallnanopartikeln

Schon in der Antike wurden die besonderen optischen Eigenschaften metallischer Nanopartikel dazu ausgenutzt, um Glas für Trinkgefäße und Kirchenfenster zu färben [17]. Geringe Mengen von Kupfer, Silber und Gold wurden je nach Farbwunsch in bestimmten Verhältnissen geschmolzenem Glas zugesetzt und erzeugten so eine intensive Farbe im Glas. Die Ursache dieser intensiven Färbungen, metallische Nanopartikel im Glas, wurde erst viel später, 1857, von FARADAY und danach, 1904, von KIRCHNER und ZSIGMODY ausführlich untersucht [18, 19]. Das Färben von Glas durch Nanopartikel ist

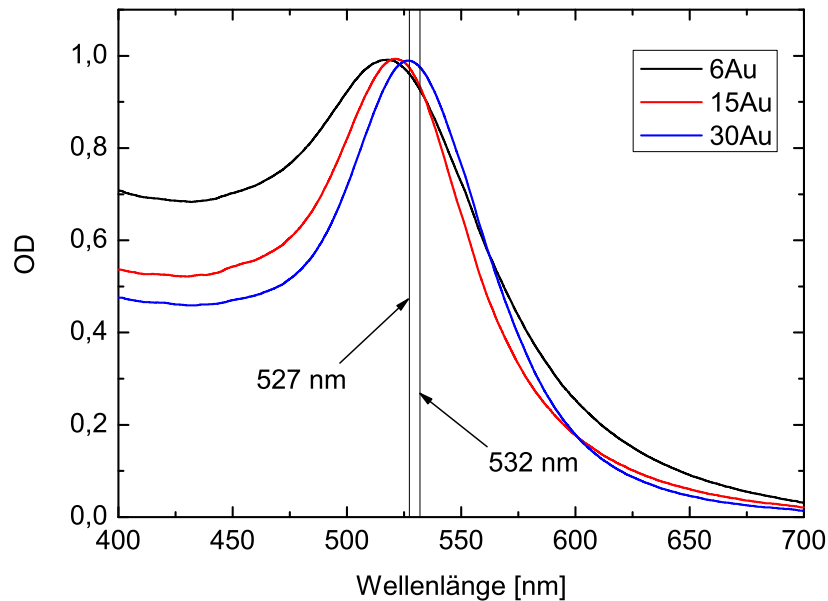


**Abbildung 2.1.** Zur Entstehung von Oberflächenplasmonen: Das elektrische Feld des einfallenden Lichts verursacht eine Verschiebung der Leitungselektronen gegen die positiv geladenen Ionenrümpfe im Nanopartikel. Da das E-Feld zeitlich oszilliert, werden die Elektronen zu Schwingungen um ihre Gleichgewichtslage angeregt.

wahrscheinlich die erste Nutzung von Nanotechnologie durch den Menschen.

**Lichtabsorption durch Anregung von Oberflächenplasmonen.** Die optischen Eigenschaften von Metall (Absorption und Reflexion) ändern sich, wenn es in extrem kleine Partikel aufgeteilt wird. Besitzen die Partikel eine Größe im Nanometerbereich, lässt sich mit Licht eine besondere elektronische Anregung stimulieren: Die Oberflächenplasmonen, oder genauer, das *Oberflächenplasmon-Polariton* [20, 21]. Oberflächenplasmonen sind durch ein äußeres oszillierendes elektrisches Feld angeregte kollektive Oszillationen der freien Leitungselektronen auf der Oberfläche von Metallen. Sie entstehen, weil die gegen die positiv geladenen Ionenrümpfe verschobenen Leitungselektronen und die Rückstellkraft durch die Coulomb-Wechselwirkung ein schwingungsfähiges System bilden, so wie es in Abb. 2.1 illustriert ist. Beim Oberflächenplasmon-Polariton handelt es sich speziell um eine zum einfallenden Licht *transversale* kollektive Schwingung der Leitungselektronen. Eine solche Anregung tritt nur bei sehr kleinen Strukturen in der Größenordnung der frequenzabhängigen Eindringtiefe des elektromagnetischen Feldes in einen metallischen Festkörper auf. Im Bereich der Lichtfrequenzen liegt diese für Metalle bei einigen Nanometern, was bei den in dieser Arbeit verwendeten Partikelgrößen erfüllt ist [7].

Die charakteristischen Eigenschaften des oszillierenden Systems, insbesondere seine Resonanzfrequenz, hängen von Größe, Form und Material der Metallpartikel sowie von Grenz- und Oberflächeneffekten ab. Bei sphärischen Partikeln, die sehr klein gegenüber der einfallenden Wellenlänge sind, kann das Feld der Lichtwelle als konstant über die Teilchengröße angesehen werden. Bei dieser *quasistatischen* Näherung ist nur eine reine *Dipol-Oszillation* möglich, während bei größeren Partikeln auch höhere Moden angeregt werden. So entstehen oberhalb von 100 nm auch quadrupolare Plasmonenresonanzen, welche zu einer zweiten Absorptionsbande mit niedrigerer Frequenz führen [20]. Zudem entstehen bei größeren Teilchen auch noch Verluste durch Oberflächenstreuung, welche die Resonanzeffizienz verringern. Da die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel mit 6, 15 und 30 nm Durchmesser um mehr als einen Faktor 10 kleiner als die Wellenlängen des sichtbaren Spektralbereichs sind, tritt hier maßgeblich eine Dipol-Resonanz auf. Bei diesen Partikelgrößen sind die Resonanzfrequenzen sehr ähnlich, wie die Absorptionsspektren in Abb. 2.2 zeigen.



**Abbildung 2.2.** Gemessene Absorptionsspektren von Hydrosolen mit 6, 15 und 30 nm großen Goldpartikeln. Die Resonanzabsorption dieser Teilchen liegt je nach Partikelgröße zwischen 520 und 530 nm. Die beiden vertikalen Linien entsprechen den Emissionslinien der beiden in dieser Arbeit verwendeten Laser.

**Berechnung der Resonanzabsorption nach der Mie-Theorie.** Die Resonanzabsorption eines homogenen, sphärischen Metallpartikels, das in einem transparenten Dielektrikum eingebettet ist, lässt sich aus der klassischen Elektrodynamik theoretisch berechnen. Dies wurde im Jahre 1908 zum ersten Mal von GUSTAV MIE publiziert und begründete die nach ihm benannte Mie-Theorie, mit der die Streu- und Absorptionseigenschaften solcher Metallnanopartikel *exakt* vorhergesagt werden können [22]. Da die Komplexität dieser Berechnungen den Rahmen dieser Arbeit überschreitet, wird hier nur das grundlegende Konzept dargelegt; für eine detaillierte Beschreibung sei auf die Arbeiten von KREIBIG und VOLLMER oder VAN DE HULST verwiesen [20, 23].

Um die elektrischen und magnetischen Felder innerhalb und außerhalb eines Metallpartikels zu bestimmen, löste MIE die Maxwell-Gleichungen für ein dielektrisches Medium ohne freie Ladungen  $\rho$  und Ströme  $\vec{J}$ ,

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} \cdot \vec{D} &= 0 & \vec{\nabla} \times \vec{E} &= -\frac{d}{dt}\vec{B} \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{B} &= 0 & \vec{\nabla} \times \vec{H} &= \frac{d}{dt}\vec{D},\end{aligned}\tag{2.1}$$

in dem eine unendlich ausgedehnte ebene Welle auf eine Metallkugel trifft. Hierbei sind  $\vec{E}$  und  $\vec{H}$  die elektrische bzw. magnetische Feldstärke sowie  $\vec{D}$  und  $\vec{B}$  die elektrische bzw. magnetische Flussdichte. Die Lösungen müssen dabei den Stetigkeitsbedingungen an der Grenzfläche Partikeloberfläche – Dielektrikum

$$\begin{aligned}\left[\left(\vec{E}_a - \vec{E}_i\right) \times \vec{n}\right]_{\text{Grenzfläche}} &= 0 \\ \left[\left(\vec{H}_a - \vec{H}_i\right) \times \vec{n}\right]_{\text{Grenzfläche}} &= 0\end{aligned}\tag{2.2}$$

für die tangentialen Komponenten und

$$\begin{aligned}\left[\left(\epsilon_m \vec{E}_a - \tilde{\epsilon}(\lambda) \vec{E}_i\right) \cdot \vec{n}\right]_{\text{Grenzfläche}} &= 0 \\ \left[\left(\vec{H}_a - \vec{H}_i\right) \cdot \vec{n}\right]_{\text{Grenzfläche}} &= 0\end{aligned}\tag{2.3}$$

für die senkrechten Komponenten der elektrischen bzw. magnetischen Felder genügen. Die Indizes „ $i$ “ und „ $a$ “ kennzeichnen den Bereich innerhalb und außerhalb des Partikels.  $\vec{n}$  ist der Flächeneinheitsvektor der Partikeloberfläche. Während die komplexe dielektrische Funktion des Partikelmaterials  $\tilde{\epsilon}(\lambda) = \epsilon_1 + i\epsilon_2$  stark frequenzabhängig ist, kann die reellwertige Dielektrizitätszahl des umgebenden Mediums  $\epsilon_m$  in der Regel als frequenzunabhängig angenommen werden. Ebenso wird das Medium als isotrop betrachtet. Anders als die dielektrische Zahl bzw. die dielektrische Funktion spielt die Permeabilitätszahl  $\mu$  hier praktisch keine Rolle, da weder Goldpartikel noch Dielektrikum magnetisch sind. Daher kann  $\mu = 1$  gesetzt werden.

Weil es sich hier um ein kugelsymmetrisches Problem handelt, führte Mie die Berechnungen in Kugelkoordinaten mit Ursprung im Partikelzentrum durch und erhielt so die Wirkungsquerschnitte für Extinktion, Streuung und Absorption durch Multipolentwicklung des elektromagnetischen Feldes:

$$\sigma_{ext}(\lambda) = \frac{\lambda^2}{2\pi\epsilon_m} \sum_{L=1}^{\infty} (-1)^L \operatorname{Im} \{a_L - b_L\}, \quad (2.4)$$

$$\sigma_{str}(\lambda) = \frac{\lambda^2}{2\pi\epsilon_m} \sum_{L=1}^{\infty} \frac{|a_L|^2 - |b_L|^2}{2L+1}, \quad (2.5)$$

$$\sigma_{abs}(\lambda) = \sigma_{ext}(\lambda) - \sigma_{str}(\lambda) \quad (2.6)$$

[22]. Hierbei geben die Streukoeffizienten  $a_L$  und  $b_L$  den Beitrag der  $L$ -ten elektrischen bzw. magnetischen Multipolschwingung an ( $L$  ist die Ordnung der Multipolschwingung) und  $\lambda$  ist die Vakuum-Wellenlänge des einfallenden Lichtes.

Für im Verhältnis zur Wellenlänge sehr kleine Partikel ( $R \ll \lambda$ ) kann das anregende elektromagnetische Feld näherungsweise als konstant über die Partikelabmessungen angenommen werden. Dadurch entsteht eine reine Dipol-Oszillation (höhere Moden werden bei dieser quasistatischen Näherung vernachlässigt). Entsprechend kann die Multipolentwicklung der Gleichungen 2.4 und 2.5 mit hinreichender Genauigkeit bei  $L = 1$  abgebrochen werden. Für die Streukoeffizienten gilt dabei:

$$a_1 = -2\alpha_R^3 \cdot \frac{\tilde{\epsilon}(\lambda) - \epsilon_m}{\tilde{\epsilon}(\lambda) + 2\epsilon_m} \quad \text{und} \quad a_L = 0 \quad \text{für } L > 1, \quad (2.7)$$

$$b_1 = -\frac{1}{15}\alpha_R^5 \cdot \frac{\tilde{\epsilon}(\lambda) - \epsilon_m}{\epsilon_m} \quad \text{und} \quad b_L = 0 \quad \text{für } L > 1 \quad (2.8)$$

$$\text{mit} \quad \alpha_R = 2\pi \frac{R}{\lambda} \sqrt{\epsilon_m} \quad (2.9)$$

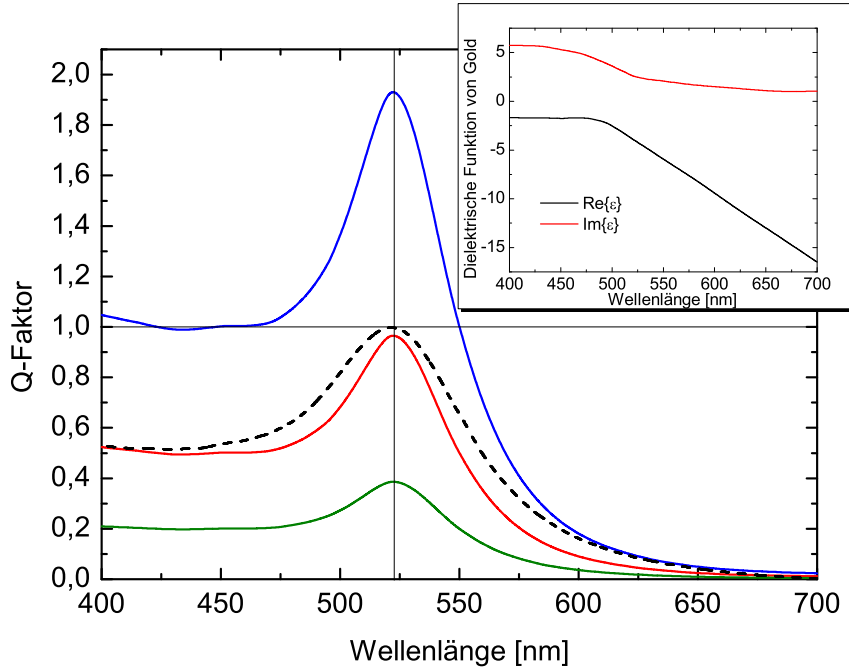
[22]. Nach Gl. 2.9 wird für die Voraussetzung  $R \ll \lambda$  der Koeffizient  $\alpha_R \ll 1$ . Daraus ergeben sich zwei Schlussfolgerungen:

1. Die Extinktion nach Gl. 2.4 wird durch den elektrischen Streukoeffizienten  $a_1$  der dipolaren Partialwelle dominiert; die magnetische Anregung kann dagegen vernachlässigt werden.
2. Die Streuung von Licht an dem Metallpartikel ist ebenfalls vernachlässigbar, da der reellwertige Summand in Gl. 2.5 sehr klein wird. Somit folgt für die Absorption schließlich das Ergebnis dieser Näherungslösung mit

$$\sigma_{abs}(\lambda) \cong \sigma_{ext}^{Dipol}(\lambda) \approx 24 \cdot \frac{\pi^2 R^3}{\lambda} \cdot \frac{\epsilon_m^{3/2} \operatorname{Im}\{\tilde{\epsilon}(\lambda)\}}{(\operatorname{Re}\{\tilde{\epsilon}(\lambda)\} + 2\epsilon_m)^2 + \operatorname{Im}\{\tilde{\epsilon}(\lambda)\}^2}. \quad (2.10)$$

**Absorptionseffizienz.** An Gl. 2.10 ist gut zu erkennen, dass die charakteristische Resonanzabsorption eines sphärischen Nanopartikels von der Teilchengröße und den Materialparametern des Teilchens und seiner Umgebung abhängt. Mit Kenntnis der Partikelgröße und der Materialparameter lassen sich die optischen Eigenschaften dann berechnen. Für die Darstellung und den Vergleich der Absorptionsquerschnitte unterschiedlicher Teilchengrößen ist es nützlich, die Extinktions- respektive Absorptionsquerschnitte zunächst auf die jeweiligen Querschnittsflächen der Partikelgrößen zu normieren, wodurch die Absorptionseffizienz, oder auch der Q-Faktor

$$Q_{abs}(\lambda) = \frac{\sigma_{abs}(\lambda)}{R^2 \pi} \quad (2.11)$$



**Abbildung 2.3.** Nach der Mie-Theorie berechnete Absorptionseffizienzen für 6 nm (grün), 15 nm (rot) und 30 nm (blau) Goldpartikel in Wasser ( $\epsilon_m = 1,77$ ). Zum Vergleich: Die gestrichelte schwarze Linie zeigt die experimentell gemessene Absorption einer 15 nm Goldpartikellösung (vgl. Abb. 2.2). Theorie und Experiment liefern hier eine gute Übereinstimmung mit dem Resonanzmaximum bei 522 nm (vertikale Linie). Oben rechts ist die für die Berechnung der Q-Faktoren nach Gl. 2.10 herangezogene dielektrische Funktion von Gold gezeigt, die aus experimentell bestimmten Daten stammt und interpoliert wurde [24]. Ihr Realteil ist in Schwarz und ihr Imaginärteil in Rot dargestellt.

definiert ist. Nach dem Einsetzen der Materialwerte in Gl. 2.10 folgen mit Gl. 2.11 die in Abb. 2.3 dargestellten Absorptionseffizienzen. Der Grafik ist eine wichtige Eigenschaft der Goldnanopartikel zu entnehmen, die eine direkte Folge der elektrodynamischen Charakteristik dieses Systems ist: Die Q-Faktoren können bei Dipol-Resonanz ab einer bestimmten Größe größer als Eins werden, d. h. sie absorbieren mehr Licht als ihr geometrischer Durchschnitt es erlauben würde. Die Q-Faktoren für einige in dieser Arbeit wichtigen Wellenlängen sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

| $\varnothing_{\text{Goldpartikel}}$ | 520 nm | 522 nm | 527 nm | 532 nm |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 6 nm                                | 0,38   | 0,39   | 0,38   | 0,35   |
| 15 nm                               | 0,96   | 0,97   | 0,94   | 0,87   |
| 30 nm                               | 1,92   | 1,93   | 1,88   | 1,74   |

**Tabelle 2.1.** Q-Faktoren aus Abb. 2.3, angegeben für das Resonanzmaximum bei 522 nm, die 527 nm-Emissionslinie des Nd:YLF-Lasers und die 532 nm-Linie des Nd:YAG-Lasers. Die Bestimmung der Goldpartikelkonzentration erfolgt durch die Messung der Absorption bei 520 nm.

### 2.1.2 Erhitzen von Nanopartikeln mit Laserpulsen

Nach den Ausführungen im letzten Unterabschnitt ist nun verständlich, dass mit Licht Energie in Form von Plasmonenschwingungen im Nanopartikel deponiert werden kann, die durch Zerfall der Plasmonen in Wärme umgewandelt wird. Dabei ist klar, dass das Nanopartikel um so mehr Energie absorbiert, je größer der Q-Faktor bzw. Absorptionsquerschnitt des Teilchens für die eingestrahlte Wellenlänge ist. Außerdem ist verständlich, dass mit zunehmender Lichtintensität auch steigende Energiebeträge im Teilchen deponiert werden. Allerdings gibt das erhitzte Partikel einen großen Teil der Wärme auch wieder an seine wässrige Umgebung ab. Aufgrund dieser Wärmeleitung sind nur sehr kurze Laserpulse zum Erreichen hoher Partikeltemperaturen geeignet.

**Thermalisierung des absorbierten Laserpulses im Goldpartikel.** Die Wechselwirkung von ultrakurzen Laserpulsen mit Edelmetallnanopartikeln wurde mit ultraschneller zeitaufgelöster optischer Spektroskopie und Röntgenstreuungsexperimenten in den letzten Jahren intensiv untersucht [25–29]. Dabei wurde das folgende Modell zur Erklärung der Erhitzung von Nanopartikeln durch Laserpulsabsorption entwickelt: Wenn die Wellenlänge bzw. Frequenz des Laserlichtes auf die Plasmonenresonanzfrequenz des Metallpartikels abgestimmt ist, erfolgt zuerst eine maximale Anregung der Plasmonenschwingung. Diese zerfällt dann innerhalb weniger 10 Femtosekunden durch die Erzeugung von Elektronen-Loch-Paaren (Exzitonen) im Leitungsband des Metallgitters (Intrabandanregung) [30]. Anschließend erfolgt die Thermalisierung.

sierung, also die Relaxation der nichtgleichgewichtsartigen Elektronenverteilung in eine gleichgewichtsartige Fermi-Verteilung, mittels Elektron-Elektron-Wechselwirkung innerhalb weniger 100 Femtosekunden [30]. Die Elektronentemperatur im Leitungsband kann dann wegen der geringen Wärmekapazität der Elektronen etliche 1000 Kelvin erreichen. Durch Streuung von Elektronen oberhalb der Fermi-Kante mit Phononen des Goldkristallgitters (Elektron-Phonon-Kopplung) kommt es dann innerhalb von etwa 500 – 800 Femtosekunden zum gegenseitigen Temperatúrausgleich [25]. Bei entsprechender Bestrahlung können hierbei Kristallgittertemperaturen von mehreren 1000 Kelvin entstehen, die neben einer abrupten thermischen Expansion zum Schmelzen und sogar zum Fragmentieren oder Verdampfen des Metallpartikels führen können [27, 29].

**Homogene Temperaturverteilung im Goldpartikel.** Nachdem sich das Goldpartikel durch die Laserpulsabsorption innerhalb von wenigen Pikosekunden stark erhitzt hat, folgt ein Energierelaxationsprozess in Form einer Phonon-Phonon-Wechselwirkung mit der umgebenden wässrigen Matrix. Das zeitliche Verhalten dieses Wärmetransfers durch die Partikelgrenzfläche in das Medium (Wärmeleitung) wurde von HU und HARTLAND für verschiedene Goldpartikelgrößen mittels *Pump-Probe*-Spektroskopie ausführlich untersucht [31]. Insbesondere erhielten sie für 5 nm große Goldpartikel eine Zeitkonstante von  $\tau = 10(\pm 5)$  ps, für 15 nm Partikel  $\tau = 50(\pm 10)$  ps und für 26 nm Teilchen  $\tau = 130(\pm 20)$  ps. Die kleineren Partikel haben aufgrund ihres größeren Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses eine erheblich kürzere Relaxationszeit. Da diese Zeitkonstanten um etwa eine bis zwei Größenordnungen höher als die innere Relaxationsdauer des Goldpartikels sind, kann die Thermalisierung bzw. Temperaturverteilung im Nanopartikel stets als räumlich homogen betrachtet werden.

### 2.1.3 Wärmeleitung

Die Wärmeleitung inner- und außerhalb eines Nanopartikels spielt eine zentrale Rolle bei der Temperaturentwicklung des gesamten Systems. Die An-

nahme einer schnellen Wärmeleitung innerhalb des Nanopartikels erlaubt dabei eine wichtige Vereinfachung bei der Lösung der Wärmeleitungsgleichung: Das kugelförmige Goldpartikel wird durch den Laserpuls räumlich homogen erhitzt, und genauso homogen wird es danach von seiner wässrigen Umgebung auch wieder gekühlt.

**Wärmeleitungsgleichung.** Bis zu einer Erwärmung auf  $T \leq 0,8 T_{\text{ev}}$  (Siedepunkt von Gold  $T_{\text{ev}} = 3129 \text{ K}$ ) beträgt der Dampfdruck von Gold weniger als 1% von dem bei dessen Siedepunkt [27]. In diesem Fall kann die Verdampfung von Gold vernachlässigt werden und das Partikel gibt seine Wärme durch Wärmeleitung an seine wässrige Umgebung ab, was durch die Wärmeleitungsgleichung (Fourier'sche Differentialgleichung)

$$\frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial t} - \kappa \Delta T(\vec{r}, t) = \frac{1}{\rho c_p} \cdot q(\vec{r}, t) \quad (2.12)$$

beschrieben werden kann. Darin sind  $T$  die Partikeltemperatur bei den Koordinaten  $\vec{r}$  zur Zeit  $t$  sowie  $\rho$ ,  $c_p$  und  $\kappa$  die Dichte, Wärmekapazität und Wärmediffusivität des umgebenden Wassers. Der Quellterm  $q(\vec{r}, t)$  beschreibt das Aufheizen des Absorbers durch den Laserpuls, die beiden anderen Terme auf der linken Seite der Gleichung die räumliche und zeitliche Temperaturentwicklung des Systems. Da die Wärmediffusivität  $\kappa$  und die volumetrische Wärmekapazität  $\rho c_p$  nur eine schwache Temperaturabhängigkeit aufweisen, können diese zur Vereinfachung der Lösung von Gl. 2.12 als temperaturunabhängig angenommen werden [32]. Auch sollen Wärmeübergangswiderstände (z.B. durch Dampfblasenbildung) zunächst vernachlässigt werden, hierauf wird später noch eingegangen.

**Lösung der Wärmeleitungsgleichung für eine Punktquelle.** Sei zunächst der denkbar einfachste Fall angenommen: Eine punktförmige und infinitesimal kurz erhitzte sowie auf  $q = 1$  normierte Quelle (in Kugelkoordinaten):  $q(r, r', t, t') \rightarrow \delta(r - r')\delta(t - t')$ . Für diesen Quellterm ist die einfachste

Lösung von Gl. 2.12 die *Greensche Funktion* [33]:

$$g(r, t) = \frac{1}{8\rho c_p(\pi\kappa t)^{3/2}} \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{4\kappa t}\right). \quad (2.13)$$

Da in einem homogenen Medium aufgrund der Linearität der Wärmeleitungsgleichung das räumliche und zeitliche Superpositionsprinzip gilt, lässt sich die Wärmeleitungsgleichung für jede beliebige volumetrische Leistungsdichte  $q(\vec{r}, t)$  durch Faltung mit Gl. 2.13 lösen:

$$T(\vec{r}, t) = g(\vec{r}, t) \otimes q(\vec{r}, t) = \int_0^t \int_V g(\vec{r} - \vec{r}', t - t') q(\vec{r}', t') d^3r' dt'. \quad (2.14)$$

### Lösung der Wärmeleitungsgleichung für kugelförmige Partikel.

Für räumlich ausgedehnte Quellen, die an ein Medium mit anderen Materialparametern grenzen, verliert das räumliche Superpositionsprinzip aufgrund der unterschiedlichen thermischen Materialeigenschaften von Absorber und Medium seine Gültigkeit, was die Herleitung analytischer Lösungen erschwert. Für simple Geometrien können jedoch analytische Lösungen gefunden werden. So ist es GOLDENBERG und TRANTER 1952 gelungen, eine analytische Lösung der Wärmeleitungsgleichung für eine Kugel, die von einem unendlichen Medium umgeben ist, herzuleiten [34]. Unter Annahme einer konstanten, räumlich homogenen Leistungszufuhr  $q$  im Teilchenvolumen  $4/3\pi \cdot R^3$  erhielten sie:

$$\begin{aligned} T_1(r, t) &= R^2 \frac{q}{K_1} \left( \frac{K_1}{3K_2} + \frac{1}{6} \left( 1 - \frac{r^2}{R^2} \right) - \right. \\ &\quad \left. \frac{2Rb}{r\pi} \int_0^\infty \frac{\exp(-\kappa_1 t y^2 / R^2)}{y} \cdot \frac{(\sin y - y \cos y) \sin(yr/R)}{(c \sin y - y \cos y)^2 + (by \sin y)^2} dy \right) \\ T_2(r, t) &= \frac{R^3}{r} \frac{q}{K_1} \left( \frac{K_1}{3K_2} - \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\exp(-\kappa_1 t y^2 / R^2)}{y^3} \cdot \right. \\ &\quad \left. \frac{(\sin y - y \cos y)(by \sin y \cos \delta y - (c \sin y - y \cos y) \sin \delta y)}{(c \sin y - y \cos y)^2 + (by \sin y)^2} dy \right) \end{aligned} \quad (2.15)$$

$$\text{mit} \quad b = \frac{K_2}{K_1} \sqrt{\frac{\kappa_1}{\kappa_2}}, \quad c = 1 - \frac{K_2}{K_1}, \quad \delta = \left( \frac{r}{R} - 1 \right) \sqrt{\frac{\kappa_1}{\kappa_2}}.$$

Hierbei kennzeichnen die Indizes „1“ und „2“ den Raum innerhalb der Kugel und außerhalb im Medium.  $K_1$  und  $K_2$  sind die entsprechenden Wärmeleitfähigkeiten ( $K = \kappa \rho c_p$ ) und  $y$  ist die Integrationsvariable. Da bei den Experimenten die mittleren Abstände der Nanopartikel untereinander im Verhältnis zu ihren Abmessungen groß waren ( $S_{Au-Au}/R_{Au} \approx 150$ ), kann die Näherung eines unendlich ausgedehnten Mediums hier herangezogen werden.

Weil das Superpositionsprinzip im Zeitbereich auch weiterhin gilt, können mit den Gleichungen 2.15 der örtliche und zeitliche Temperaturverlauf des Systems nach Absorption eines zeitlichen *Rechteckpulses* der Dauer  $\tau_\square$  mittels

$$\begin{aligned} T_\square(r, t, \tau_\square) &= T_i(r, t) - T_i(r, t - \tau_\square) \\ \text{mit} \quad i &= 1 \text{ für } r \leq R \quad \text{und} \quad i = 2 \text{ für } r > R \end{aligned} \quad (2.16)$$

berechnet werden. Außerdem berechnet sich die volumetrische Leistungsdichte  $q$  in den Gleichungen 2.15 aus den experimentellen Parametern nach

$$q = \frac{1}{\tau_\square} \cdot \frac{\overbrace{HQ_{abs}\pi R^2}^{E_{abs}}}{4/3 \cdot \pi R^3} = \frac{3HQ_{abs}}{4R\tau_\square}. \quad (2.17)$$

Hierbei sind  $H$  die Bestrahlung oder *Fluenz* durch den Laserpuls (meist in  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  angegeben) und  $E_{abs} = \sigma_{abs}H$  die vom Partikel absorbierte Energie. Zusammengefasst beschreiben die Gleichungen 2.15–2.17 also die Temperaturentwicklung innerhalb ( $T_1$ ) und außerhalb ( $T_2$ ) des Nanopartikels, wenn zum Zeitpunkt  $t = 0$  ein Laserstrahl das Nanopartikel mit einer konstanten Heizrate für die Dauer  $\tau_\square$  erwärmt. Da die Partikeltemperatur stets als räumlich homogen betrachtet wird, ist die zeitliche Temperaturentwicklung des Partikels und seiner wässrigen Umgebung durch  $T_2$  und die Randbedingung

$$T_1 = T_2 \quad \text{am Ort } r = R, \quad \text{für } \forall t, \quad (2.18)$$

bestimmt.

In Wirklichkeit besitzt der zeitliche Verlauf der Laserpulse keine Rechteckform, sondern häufig eine Gaußform. Um nun den Temperaturverlauf des Systems für beliebige zeitliche Pulsformen respektive variierende Heizraten zu berechnen, wird das Zeitintervall für die Wärmezufuhr immer weiter verkürzt, bis schließlich eine infinitesimal kurze, dann aber als konstant angenommene Erwärmung stattfindet. Mit dieser numerischen Näherung kann die Temperaturantwort  $T_\delta$  am Ort  $r$  dann nach

$$\begin{aligned} T_{\delta(r,t)} &= \lim_{\Delta t \rightarrow 0} T_\square(r, t, \Delta t) \\ \text{mit} \quad q &= \frac{3H Q_{abs}}{4R\Delta t} \end{aligned} \quad (2.19)$$

berechnet werden. Mit Gl. 2.19 lässt sich nun aufgrund der zeitlichen Linearität der Wärmeleitungsgleichung der zeitabhängige Temperaturverlauf am Ort  $r$  für eine Bestrahlung mit beliebiger zeitlicher Pulsform berechnen. Dazu wird zunächst der zeitliche Verlauf des Laserpulses, beschrieben durch  $f(t)$ , auf Eins normiert,  $\int f(t)dt = 1$ , und dann im Zeitbereich mit  $T_\delta$  gefaltet:

$$T(r, t) = T_\delta(r, t) \otimes f(t). \quad (2.20)$$

**Temperatursimulationen.** Mit den Gleichungen 2.15–2.20 lässt sich also mittels numerischer Berechnung der Temperaturantwort auf eine infinitesimal kurzzeitige Erwärmung mit konstanter Heizrate auch die Temperaturantwort des Nanopartikels und seiner Umgebung auf einen gaußförmigen Laserpuls bestimmen. Allerdings sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es sich hierbei lediglich um grobe Näherungen handelt, weil gleich mehrere Effekte unberücksichtigt bleiben:

- An der Grenzfläche zwischen zwei Materialien existiert ein Wärmeübergangswiderstand, der *Kapitza-Widerstand*  $R_K$ :

$$R_K = \frac{1}{G_K} = \frac{\Delta T}{q''} \quad \text{mit} \quad q'' = \frac{1}{F} \frac{dQ}{dt} \quad (2.21)$$

[35]. Er wird durch die Quantisierung der Wärmeleitung im Partikel

mittels Phononen und deren Streuung an der Materialgrenzfläche verursacht [36]. Dieser Wärmeübergangswiderstand tritt vor allem dann in Erscheinung, wenn die freie Weglänge der Phononen größer als die Partikelabmessungen ist oder sehr große Wärmeflüsse  $dQ/dt$  durch die Materialgrenzfläche  $F$  entstehen [37]. Von PLECH *et al.* wurde die Wärmeleitfähigkeit der Goldnanopartikel-Wasser-Grenzfläche zu  $G_K = (105 \pm 15) \frac{\text{MW}}{\text{m}^2\text{K}}$  bestimmt [29]. In dieser Arbeit wurde  $G_K$  jedoch vereinfachend als unendlich groß angenommen.

Der Kapitza-Widerstand behindert beim erhitzten Nanopartikel den Wärmeabfluss in die Umgebung. Dies wirkt sich insbesondere dann stark auf die Temperaturentwicklung des Partikels aus, wenn die Wärmeleitung *während* der Pulsabsorption eine große Rolle spielt, so wie es bei der Anregung mit den Nanosekunden-Laserpulsen der Fall ist. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Nanosekundenlaser liegt die Laserpuls-Heizdauer bei über 10 ns, während sich die gesamte Temperaturrelaxation im Bereich von nur 12–172 ps abspielt [31]. Bei dieser im Vergleich zur Temperaturrelaxation lange dauernden Laserpulsabsorption kann das Partikel die absorbierte Energie ständig an seine Umgebung abgeben; die Kühlung durch das Wasser ist hier somit äußerst effektiv. Daher ist für einen gewissen Temperaturanstieg des Nanopartikels bei ns-Pulsen eine deutlich größere Heizleistung bzw. Bestrahlung erforderlich als bei ps-Pulsen.

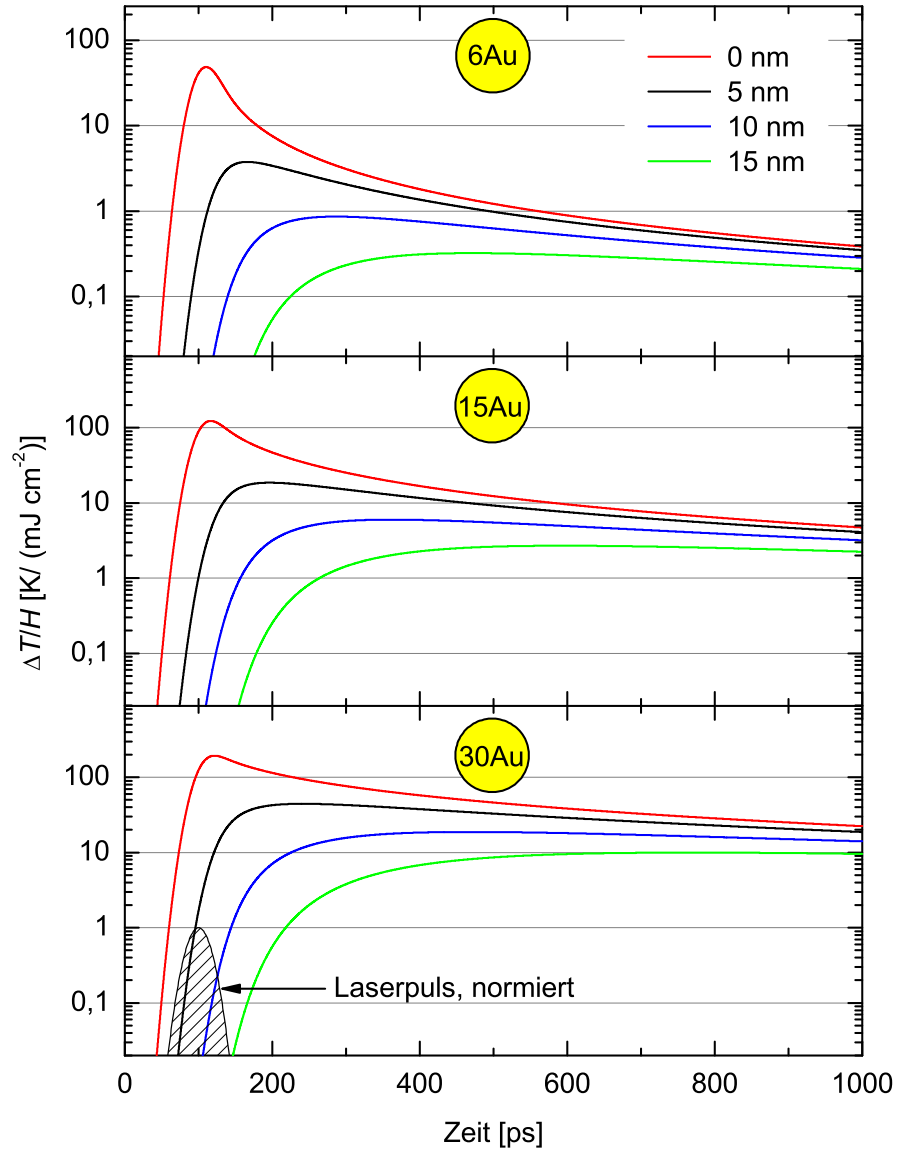
Da der Kapitza-Widerstand die Wärmeleitung respektive Kühlung an der Partikeloberfläche reduziert, erreichen die Goldpartikel beim laserinduzierten Erhitzen im Inneren eine höhere Spitzentemperatur als die nach den Gleichungen 2.15–2.20 berechnete; insbesondere die sehr kleinen 6 nm Partikel, bei denen sich der Kapitza-Widerstand aufgrund ihres großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses am stärksten auswirkt.

- Bildung von Dampfblasen. Spätestens wenn das erhitzte Partikel eine bestimmte Grenztemperatur, den *spinodalen Punkt* von Wasser bei Normaldruck, erreicht, ist ein flüssiger Phasenzustand des Wassers an

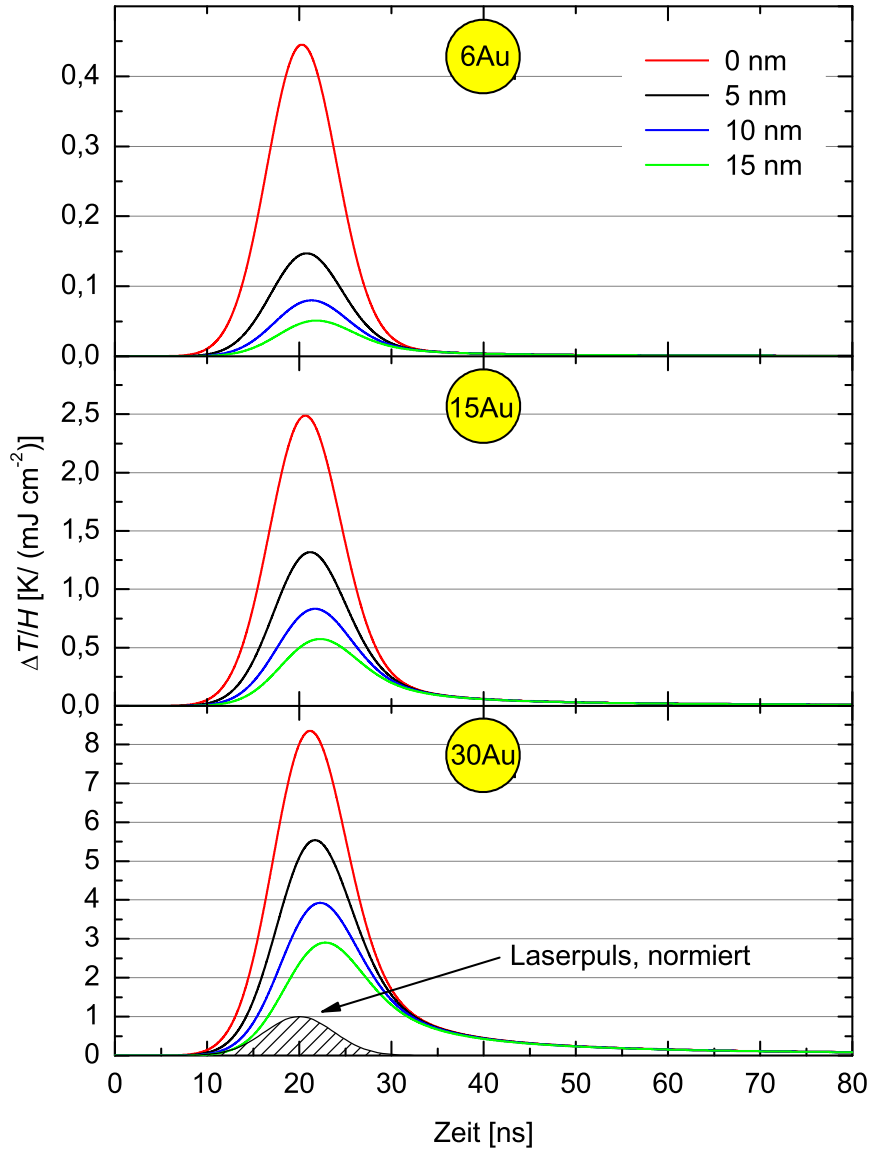
der Partikelgrenzfläche nicht mehr möglich. Dann entsteht eine Dampf- bzw. Kavitationsblase um das Partikel herum, welche es thermisch isoliert (Verlust der Kühlung). Gleichzeitig ändert sich dabei die Brechzahl des umgebenden Mediums und damit die elektrodynamische Charakteristik des Systems, so dass die Voraussetzungen für eine Resonanzabsorption bei der verwendeten Wellenlänge nicht mehr gegeben sind. Diese Thematik wird in Abschnitt 2.2.1 nochmal ausführlich behandelt.

- Latente Wärme des Goldes und Absinken der Absorptionseffizienz beim Schmelzprozess. Nach dem Erreichen der Schmelztemperatur von Gold ( $1064\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wird ein Teil der absorbierten Energie für den Phasenübergang fest  $\rightarrow$  flüssig benötigt. Zusätzlich sinken die Q-Faktoren der Partikel beim Aufschmelzen um bis zu 75% ab [20, 38]. Daher verliert dieses einfache thermische Modell ab dem Partikelschmelzen seine Gültigkeit.

In dieser Arbeit wurden die laserinduzierten Temperaturentwicklungen in und um die Nanopartikel unter Vernachlässigung des Wärmeübergangswiderstands, der Dampfblasenbildung und der Materialphasenübergänge berechnet. Die Temperaturentwicklungen nach Absorption eines 35 ps-Pulses bei 527 nm sind in Abb. 2.4 dargestellt und die für einen 8,8 ns-Puls bei 532 nm in Abb. 2.5.



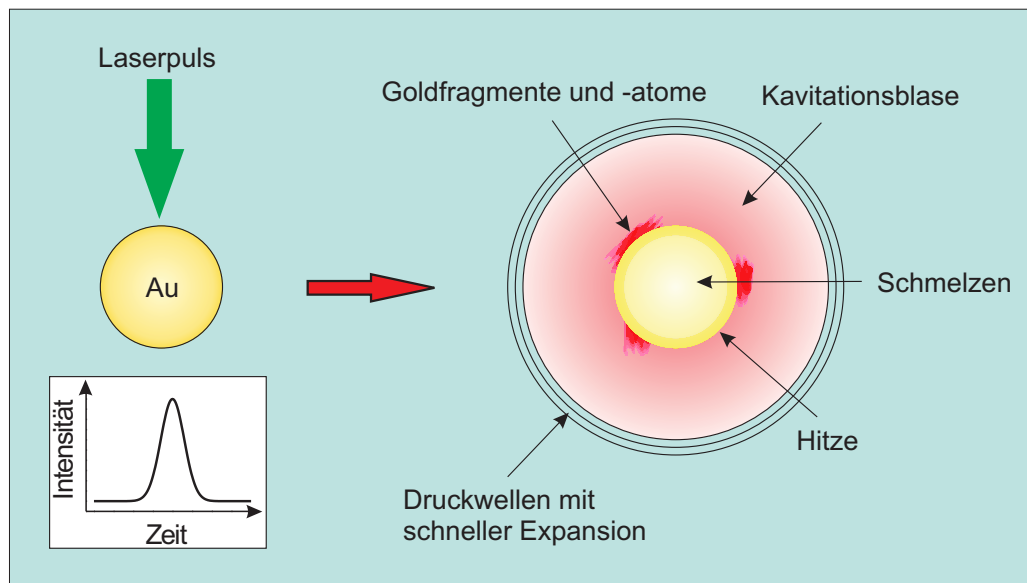
**Abbildung 2.4.** Temperaturverlauf bei der Absorption eines 35 ps-Pulses (mit  $\lambda = 527$  nm) bei einer Bestrahlung von  $1 \text{ mJ/cm}^2$  an der Oberfläche (rote Kurve) von 6 nm (oben), 15 nm (mitte) und 30 nm (unten) Goldpartikeln sowie in deren wässriger Umgebung in 5 nm (schwarz), 10 nm (blau) und 15 nm (grün) Abstand von der Partikeloberfläche. Diesen Berechnungen wurde ein zeitlich gaußförmiger Laserpuls mit 35 ps Halbwertsbreite zugrunde gelegt, der nach 100 ps sein Maximum erreicht. Die Q-Faktoren wurden der Tabelle 2.1 entnommen. Aufgrund des gegenüber der Pulsdauer langsamen Temperatenausgleichs entstehen starke Temperaturunterschiede zwischen der Partikeloberfläche und den Wasserschichten. Zur besseren Übersicht wurde daher eine halblogarithmische Darstellung gewählt.



**Abbildung 2.5.** Temperaturverlauf bei der Absorption eines 8,8 ns-Pulses (mit  $\lambda = 532$  nm) bei einer Bestrahlung von  $1 \text{ mJ/cm}^2$  an der Oberfläche (rote Kurve) von 6 nm (oben), 15 nm (mitte) und 30 nm (unten) Goldpartikeln sowie in deren wässriger Umgebung in 5 nm (schwarz), 10 nm (blau) und 15 nm (grün) Abstand von der Partikeloberfläche. Diesen Berechnungen wurde ein zeitlich gaußförmiger Laserpuls mit 8,8 ns Halbwertsbreite zugrunde gelegt, der nach 20 ns sein Maximum erreicht. Die Q-Faktoren wurden der Tabelle 2.1 entnommen. Aufgrund der Wärmeleitung zwischen dem Partikel und seiner Umgebung während der Laserpulsabsorption sind hier bedeutend höhere Bestrahlungen erforderlich, um ähnliche Spitzentemperaturen wie bei der Pikosekundenpuls-Absorption zu erzeugen.

## 2.2 Thermisch induzierte Sekundäreffekte

Nachdem im letzten Abschnitt erklärt wurde, wie Goldpartikel mit Laserstrahlung erhitzt werden können, stellt sich nun die für diese Arbeit zentrale Frage, welche thermophysikalischen Effekte für die Inaktivierung bzw. Schädigung der umgebenden Proteine verantwortlich sind. Zum einen könnte die Hitze selbst eine Denaturierung der Proteine hervorrufen. Andererseits entstehen während oder nach der Laserpulsabsorption Dampfblasen um den Absorber, sobald dieser eine bestimmte Temperatur erreicht. Die sich schnell ausbreitenden Dampfblasen verändern die direkte Umgebung der gebundenen Proteine drastisch. Infolge einer weiteren Erhitzung kann das Partikel dann schmelzen. Bei noch höheren Bestrahlungen fragmentieren oder verdampfen die Goldpartikel. Unterstützt durch die Kavitationsblasendynamik diffundieren geschmolzene Partikelfragmente und Goldatome dann in die Umgebung und beeinflussen dort möglicherweise weitere Biomoleküle. Abb. 2.6 gibt einen schematischen Überblick über die im Folgenden beschriebenen Sekundäreffekte, die bei lasererhitzten Nanopartikeln auftreten können.



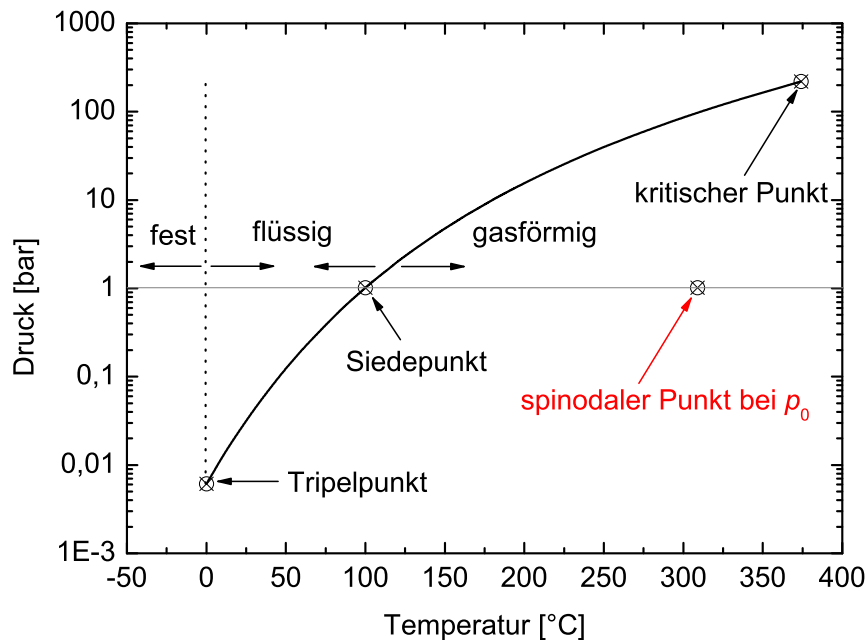
**Abbildung 2.6.** Überblick über die thermophysikalischen Effekte nach laserinduzierter Erhitzung eines Goldnanopartikels in Wasser (Abbildung verändert nach [10]).

### 2.2.1 Kavitationsblasenbildung

Der erste bei einer hinreichenden Temperaturerhöhung des Partikels ausgelöste Sekundäreffekt ist eine Dampf- oder Kavitationsblasenbildung. Kavitationsblasen spielen in dieser Arbeit gleich aus mehreren Gründen eine wichtige Rolle. So werden die optischen und thermodynamischen Eigenschaften des Systems stark verändert, was die weitere Temperaturentwicklung von Nanopartikel und Umgebung beeinflusst. Außerdem könnte es bei der explosionsartigen Blasenbildung zur Proteindenaturierung und/oder zu einer Abtrennung der Proteine vom Goldpartikel kommen. Eine gezielte Proteindenaturierung wäre hier beabsichtigt, eine Abtrennung der Proteine hingegen eher kontraproduktiv für die NALI. Im Folgenden werden die wichtigsten Grundlagen zur Kavitationsblasenbildung um lasererhitzte Nanopartikel kurz erläutert.

#### Überhitzung des Wassers am Partikel – Nukleationstemperatur.

Abb. 2.7 zeigt schematisch das Phasendiagramm von Wasser. Im thermodyna-



**Abbildung 2.7.** Phasendiagramm von Wasser (Daten nach [39]). Flüssige und gasförmige Phase sind durch die Binodale getrennt. Die waagerechte graue Linie markiert den atmosphärischen Normaldruck  $p_0$ .

mischen Gleichgewicht sind bei Temperaturen ab dem Tripelpunkt von Wasser (273,16 K; 611,657 Pa [40]) der Sättigungsdampfdruck des Wassers  $p_{sat}(T)$  und der Umgebungsdruck  $p(T)$  gleich. Dieses Gleichgewicht wird durch die *Binodale* beschrieben. Bei Temperaturen oberhalb der Binodalen ist der Wasserdampfdruck größer als der Umgebungsdruck und das Wasser beginnt zu sieden (wenn der Phasenübergang flüssig  $\rightarrow$  gasförmig unter isobaren Bedingungen stattfindet, wird das als Sieden bezeichnet, bei einem isothermen, durch Druckerniedrigung verursachten Phasenwechsel liegt dagegen Kavitation vor [41]). Ab dem kritischen Punkt  $T_c$  (647,1 K; 22,06 MPa [40]) ist gar kein flüssiger Aggregatzustand mehr möglich, egal wie hoch der Umgebungsdruck noch steigt. Der spinodale Punkt  $T_{sp}$  gibt dagegen die Temperatur bei einem bestimmten Druck an, ab der auch im Nichtgleichgewicht kein flüssiger Phasenzustand des Wassers mehr möglich ist. Er liegt nach BLANDER und THORMÄHLEN für den atmosphärischen Normaldruck ( $p_0 = 101,3 \text{ kPa}$ ) bei ungefähr 90% der kritischen Temperatur des Wassers, also bei rund 582 K bzw. 309 °C [42, 43].

Am Verlauf der Binodalen ist das bekannte Phänomen zu erkennen, dass Wasser unter atmosphärischem Normaldruck bei einer Temperatur von 100 °C zu sieden beginnt. Allerdings kann Wasser unter bestimmten Umständen auch auf Temperaturen weit oberhalb von 100 °C überhitzt werden ohne dabei zu verdampfen [44]. Überhitztes Wasser ist eine metastabile Flüssigkeit, weil erst ein Überwinden der Energiebarriere in der freien Enthalpie durch thermodynamische Fluktuationen den Phasenübergang flüssig  $\rightarrow$  gasförmig ablaufen lässt [9, 32]. Dieser metastabile Zustand kann sich bei Atmosphärendruck theoretisch bis zum entsprechenden spinodalen Punkt fortsetzen. Da die thermodynamischen Fluktuationen statistische Prozesse sind, kann Wasser insbesondere bei kurzen Heizzeiten stark überhitzt werden. So wurde bei Experimenten mit ultradünnen Platindrähtchen, die mit einer Heizrate von  $8,6 \cdot 10^7 \text{ K/s}$  erhitzt worden sind, eine mittlere Nukleationstemperatur von 303 °C gemessen [45]. Ähnliche Blasenbildungstemperaturen wurden auch von NEUMANN *et al.* bei lasererhitzten Goldkugeln gefunden [46]. Und erst vor kurzem wurden Nukleationstemperaturen von laserangeregten Goldnanopartikeln von KOTAIDIS *et al.* mittels Röntgenstreuungsexperimen-

ten gemessen, wobei die Schwelle zu 85% des kritischen Punktes von Wasser, entsprechend einer Temperatur von ca. 277 °C, bestimmt wurde [26].

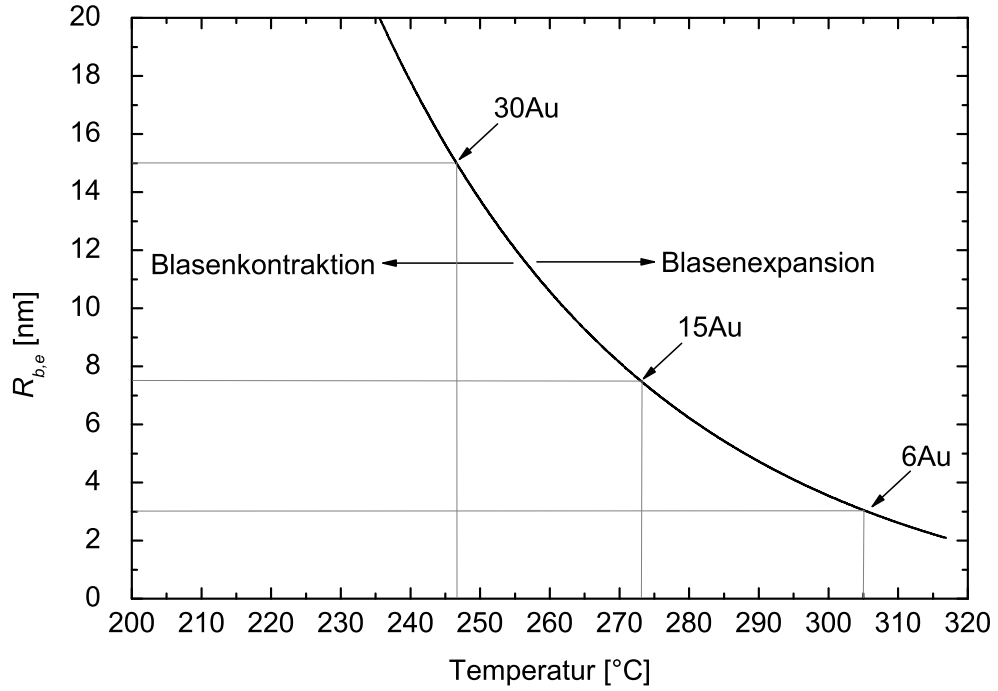
Die physikalische Ursache für die enorme Überhitzungsfähigkeit des Wassers ist dessen große Oberflächenspannung  $\sigma$ , die der Verdampfung entgegenwirkt. Für den temperaturabhängigen labilen Gleichgewichtsradius einer Kavitationsblase  $R_{b,e}$  in überhitztem Wasser gilt nach der klassischen homogenen Nukleationstheorie:

$$R_{b,e}(T) = \frac{2\sigma(T)}{\eta(T)p_{sat}(T) - p_0} \quad \text{mit} \quad \eta(T) = \exp\left(\frac{p_0 - p_{sat}(T)}{\rho(T)R_x T}\right) \quad (2.22)$$

[32, 47]. Hierbei sind  $R_x$  die spezifische Gaskonstante des Wasserdampfes und  $\eta(T)p_{sat}(T) = p_b$  der Druck innerhalb der Blase. Die Gleichung 2.22 zeigt, dass wegen  $R_{b,e} \sim 1/(p_b - konst.)$  der Blaseninnendruck mit abnehmender Kavitationsblasengröße zunimmt. Um sehr kleine (Nano-) Kavitationsblasen gegen die Oberflächenspannung des Wassers zu erzeugen, ist also ein hoher Druck erforderlich.

Da der Sättigungsdampfdruck  $p_{sat}(T)$  bei konstantem Volumen mit steigender Temperatur zunimmt, können durch entsprechendes Erhitzen des Wassers Drücke erreicht werden, die Kavitationsblasen in den Abmessungen der Goldnanopartikel erzeugen. Dabei muss die Nukleationstemperatur mit abnehmender Partikelgröße zunehmen, was anhand von Abb. 2.8 verdeutlicht wird. Die Grafik zeigt, dass bei 30 nm Goldnanopartikeln eine Nukleation ab etwa 247 °C erwartet werden kann und bei 15 nm Partikeln ab ca. 273 °C. Bei den 6 nm großen Teilchen ist sogar eine Temperaturerhöhung auf 305 °C nötig, um Kavitationsblasen zu erzeugen. Diese Werte stimmen recht gut mit den von KOTAIDIS, GLOD und NEUMANN experimentell gefundenen Werten überein [26, 45, 46].

**Phasenexplosion und Blasendynamik.** Wenn erst einmal die Nukleationsschwelle erreicht ist, verdampft das überhitzte Wasser an der Peripherie des Partikels und es entsteht eine schnell expandierende Gasblase. In dieser Kavitationsblase wird nach der thermodynamischen Zustandsgleichung von Wasser anfangs ein Druck von ca. 38 bar (bei 247 °C) bis 92 bar (bei 305 °C)



**Abbildung 2.8.** Nach Gl. 2.22 berechneter labiler Gleichgewichtsradius  $R_{b,e}$  im instabilen thermodynamischen Gleichgewicht bei Normaldruck (verändert nach [32]). Bei Temperaturen oberhalb der Nukleationstemperatur von  $R_{b,e}$  erfolgt eine explosionsartige Blasenexpansion, bei tieferen Temperaturen dagegen kollabiert die Blase. Die zu erwartenden Nukleationstemperaturen für Blasenradien, die den Abmessungen der in dieser Arbeit verwendeten Goldpartikel entsprechen, sind markiert.

erreicht (vgl. Abb. 2.7). Der Blaseninnendruck lässt die Blasenoberfläche gegen den äußeren (Luft-) Druck und die Trägheit des Wassers immer weiter expandieren, bis die Energie der Kavitationsblase vollständig aufgebraucht ist. An dieser Stelle hat die Kavitationsblase ihren größtmöglichen Radius  $R_{b,max}$  erreicht und ihre gesamte kinetische in potentielle Energie umgewandelt. Die Blasenenergie lässt sich dann unter Vernachlässigung von Viskosität und Oberflächenspannung des Wassers durch die verrichtete Volumenarbeit (mechanische Energie der Blase) nach

$$E_b = V_b \Delta p = \frac{4}{3} \pi R_{b,max}^3 (p_0 - p_{sat}(T_0)) \quad (2.23)$$

abschätzen, wenn eine Blasenexpansion bis in solche Regionen erfolgt, in denen die Flüssigkeit nur noch Raumtemperatur ( $T_0$ ) hat [32]. Nach dem Erreichen der maximalen potentiellen Energie bei  $R_{b,max}$  wird die Blase, vom Umgebungsdruck  $p_0$  und der Oberflächenspannung  $\sigma$  getrieben, wieder kollabieren. Während dieses Implosionsprozesses wird der Wasserdampf in der Blase immer stärker komprimiert, bis irgendwann der Blasendruck wieder so groß wird, dass die Blase erneut expandiert. Dieser Prozess kann mehrfach stattfinden, wenn die Anfangsenergie groß genug ist; dann treten gedämpfte Blasenoszillationen auf [48]. Diese Oszillationen dauern insgesamt so lange, bis die Anfangsenergie der Kavitationsblase durch Umwandlung in Wärme vollständig aufgebraucht ist.

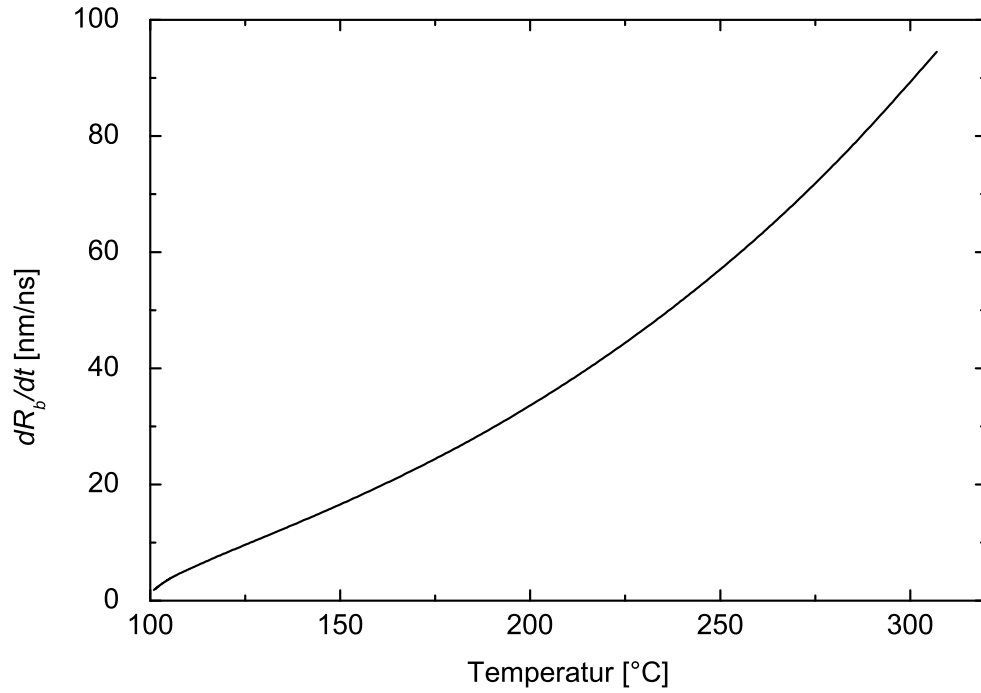
Das *Rayleigh-Plesset-Modell* beschreibt die Dynamik einer kugelförmigen Gasblase in einer Flüssigkeit [41]. Abschätzungen mit diesem Modell verdeutlichen mit welcher Geschwindigkeit die Gasblasen bei den oben genannten Drücken expandieren. Demnach kann unter der Annahme eines ortsunabhängigen Blaseninnendrucks (homobare Näherung) die Blasendynamik durch

$$R_b \ddot{R}_b + \frac{3}{2} \dot{R}_b^2 = \frac{1}{\rho} \left( p_b - p_0 - \frac{2\sigma}{R_b} - 4\mu \frac{\dot{R}_b}{R_b} \right) \quad (2.24)$$

beschrieben werden [32]. Unter Vernachlässigung von Viskosität  $\mu$  und Oberflächenspannung  $\sigma$  des Wassers sowie unter Annahme einer konstanten Grenzflächengeschwindigkeit ( $\ddot{R}_b = 0$ ) bei Nukleationsbeginn resultiert daraus die Blasenexpansionsgeschwindigkeit  $\dot{R}$  im überhitzten Wasser:

$$\frac{dR_b(T)}{dt} = \sqrt{\frac{2}{3} \cdot \frac{p_{sat}(T) - p_0}{\rho(T)}}. \quad (2.25)$$

Folglich hängt die anfängliche Expansionsgeschwindigkeit nur von der Druckdifferenz zwischen dem Initialdruck der Blase  $p_{b,i} = p_{sat}(T)$  und dem Umgebungsdruck  $p_0$  sowie von der Dichte des Wassers  $\rho(T)$  an der Blasengrenzfläche ab. Insbesondere folgen für die oben angegebenen Initial-Blasendrücke von bis zu 92 bar (bei 305 °C) Blasenexpansionsgeschwindigkeiten von bis zu 93 m/s, wie auch aus Abb. 2.9 abgelesen werden kann.



**Abbildung 2.9.** Nach Gl. 2.25 berechnete Blasenexpansionsgeschwindigkeit bei Nukleationsbeginn in überhitztem Wasser (Parameter des Wassers nach [40]).

**Blasengröße.** Wie weit sich die Kavitationsblasen um die lasererhitzten Partikel ausdehnen und wie stark deren Wirkung auf ihre Umgebung ist, wird zurzeit, insbesondere im Hinblick auf zellbiologische Anwendungen, intensiv erforscht [10, 13]. So sind z.B. erst vor kurzem Experimente mit zeitaufgelöster Röntgenspektroskopie an lasererhitzten Goldnanopartikeln durchgeführt worden, um Nukleationstemperaturen und Blasenausdehnung sowie das Schmelzen und Verdampfen der Goldpartikel zu untersuchen [26, 27, 49, 50]. Zur theoretischen Beschreibung der Kavitationsblasendynamik wurden dabei verschiedene Modelle herangezogen, welche zwar nur Näherungslösungen sind, die aber die experimentellen Ergebnisse recht gut erklären. So lässt sich auch die maximale Blasenausdehnung mit dem Rayleigh-Plesset-Modell berechnen. Demnach gilt unter Vernachlässigung der Oberflächenspannung und

der Viskosität von Wasser für den maximalen Blasenradius

$$R_{b,max} \approx \frac{\tau_c}{0.915} \cdot \sqrt{\frac{p_0 - p_{sat}(T_0)}{\rho(T_0)}}, \quad (2.26)$$

so dass  $R_{b,max}$  näherungsweise durch Kenntnis der Kollapszeit  $\tau_c$  bestimmt werden kann [32]. Bei immer kleineren Blasenabmessungen auf der niedrigen Nanometerskala gewinnt die Oberflächenspannung allerdings immer mehr an Bedeutung. Hier führt deren Vernachlässigung zu wachsenden Fehlern, so dass das vollständige Rayleigh-Plesset-Modell (Gl. 2.24) angewendet werden muss, welches Oberflächenspannung und Viskosität berücksichtigt. Beispielsweise haben KOTAIDIS *et al.* durch UV-Femtosekundenpuls-Bestrahlung (bei 400 nm) von 9 nm Goldpartikeln wenige Nanometer große Kavitationsblasen erzeugt und mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (*Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) vermessen [50]. Hierbei fanden sie eine ausgezeichnete Übereinstimmung beim Vergleich der aus den SAXS-Streusignalen erhaltenen Blasengrößen mit numerischen Berechnungen nach dem vollständigen Rayleigh-Plesset-Modell.

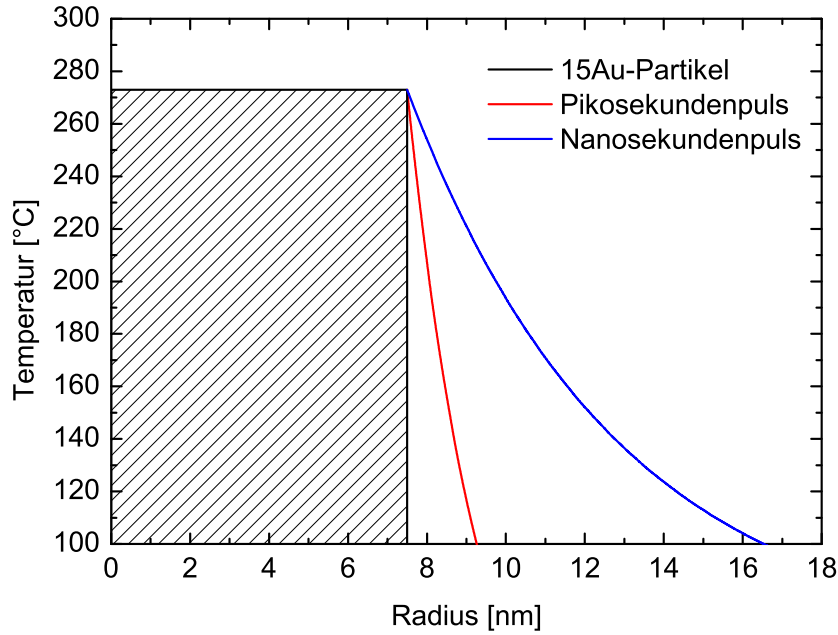
Auch Kavitationsblasenform und Nukleationsschwellen nach Laseranregung von Goldpartikeln wurden von KOTAIDIS *et al.* untersucht. Zunächst einmal konnte durch die Analyse der SAXS-Daten eine sphärische Form der Kavitationsblasen bestätigt werden [50]. Dabei beobachteten sie die ersten Blasen bei den 9 nm Partikeln ab einer Bestrahlung von 29 mJ/cm<sup>2</sup>; darunter war keine Nukleation erkennbar [50]. Bei Bestrahlung mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> wurden dann schon Blasenradien von etwa 20 nm mit einer Kollapszeit von 650 ps gemessen. Mit einer linearen Regression des bestrahlungsabhängigen Blasenvolumens berechneten sie den Nukleationsschwellenwert für die 9 nm Partikel dann zu 30 mJ/cm<sup>2</sup> (bei 400 nm) [26]. Für diese Bestrahlung wurde der Blasenradius zu 7,2 nm bestimmt und die anfängliche Blasenexpansionsgeschwindigkeit zu 90 m/s, was mit den oben angeführten Abschätzungen sehr gut übereinstimmt.

Auch 39 nm große Goldpartikel wurden mit den UV-Laserpulsen angeregt und mittels SAXS untersucht [26]. Erwartungsgemäß lag bei diesen Partikel-

größen die Schwelle für die Nukleation aufgrund des höheren Absorptionsquerschnitts und niedrigeren Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses deutlich niedriger. Bereits eine Bestrahlung von etwa  $8 \text{ mJ/cm}^2$  führte hier zur Blasenbildung und bei  $150 \text{ mJ/cm}^2$  hatten die Kavitationsblasen um die  $39 \text{ nm}$  Partikel schon einen Durchmesser von etwa  $200 \text{ nm}$  [26]. Eine weitere wichtige Beobachtung bei den SAXS-Experimenten war, dass das Blasenvolumen linear mit der Bestrahlung zunimmt. Dies erlaubt eine Abschätzung der Kavitationsblasenausdehnung nach einer Laserpulsabsorption, wenn die Proportionalitätskonstante für das System bekannt ist.

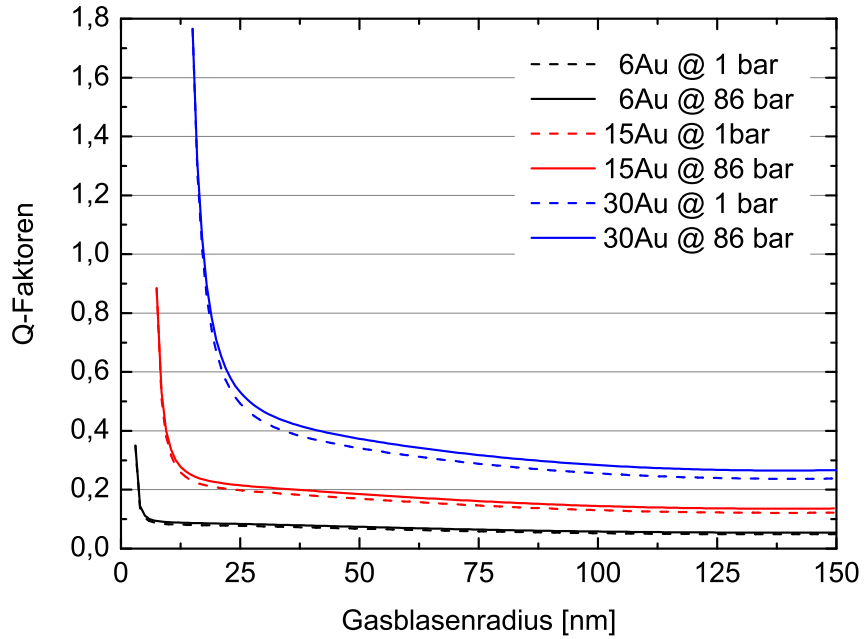
**Blasenentwicklung nach der Pikosekundenpuls-Absorption.** Da die Pikosekundenpuls-Absorption weitgehend im thermischen Einschluss erfolgt, sollten Temperaturentwicklung und Blasendynamik ähnlich verlaufen wie bei der o. g. Anregung mit Femtosekundenpulsen. Somit kann auch hier ein linearer Zusammenhang zwischen Bestrahlung und Blasenvolumen erwartet werden. Demnach lassen sich mit Pikosekundenpuls-Anregung durch Variation der Bestrahlung beliebige Blasenausdehnungen vom Nanometerbereich bis in die mikroskopische Skala erreichen.

**Blasenentwicklung bei und nach der Nanosekundenpuls-Absorption.** Im Gegensatz zur Blasenausdehnung nach einer Pikosekundenpuls-Absorption, die sich aufgrund des thermischen Einschlusses kontinuierlich dosieren lässt, verhält sich das System bei Nanosekundenpuls-Absorption nicht so deterministisch. Dies soll anhand der Abbildungen 2.10 und 2.11 erklärt werden. In Abb. 2.10 ist zu erkennen, dass bei einer Nanosekundenpuls-Bestrahlung, die zu einer bestimmten Partikeltemperatur führt, die überhitzte Wasserschicht um das Partikel deutlich voluminöser ist als die nach der Absorption eines Pikosekundenpulses (bei identischer Partikeltemperatur). Bei der Nanosekundenpuls-Bestrahlung wird an der Kavitationsschwelle also mehr Energie deponiert, die in ein Blasenwachstum umgewandelt werden kann. Daher ist die hierdurch verursachte minimale Kavitationsblase größer als eine durch Pikosekundenpulse erzeugte.



**Abbildung 2.10.** Nach den Gleichungen 2.15–2.20 berechneter radialer Temperaturverlauf nach bzw. bei laserinduzierter Erhitzung eines 15 nm Goldpartikels mit ps- bzw. ns-Pulsen auf eine angenommene Nukleationstemperatur von 273 °C. Das räumlich homogen erhitze Partikel hat einen Radius von 7,5 nm (schraffierter Bereich). Bei Pikosekundenpuls-Bestrahlung (rote Kurve) bleibt die Überhitzung des Wassers im Vergleich zur Nanosekundenpuls-Bestrahlung (blaue Kurve) auf ein deutlich kleineres Volumen beschränkt.

Beim Erreichen der Nukleationsschwelle verdampft die überhitzte Wasserschicht schlagartig, woraus ein sofortiger Einbruch der Partikelkühlung resultiert. Diese thermische Isolation konnte ebenfalls durch die SAXS-Untersuchungen von KOTAIDIS *et al.* bestätigt werden [26]. Sobald sich die Dampfblase ausgebildet hat, bricht allerdings auch die Resonanzabsorption zusammen, was durch eine Erweiterung der Mie-Theorie auf ein Zwei-Sphären-Modell (Goldpartikel im Zentrum einer homogenen, sphärischen Dampfblase) berechnet werden kann [51]. Die entsprechenden Simulationen sind in Abb. 2.11 dargestellt. Für die Berechnung der Q-Faktoren wurden hierbei zwei hypothetische Grenzfälle angenommen: 1. Eine sich gerade bildende Dampfblase bei einer maximalen Nukleationstemperatur von 300 °C mit  $p_b = p_{sat} = 86$  bar und einer Wasserdampfdichte von 46,15 kg/m<sup>3</sup> (durchgezogene Kur-



**Abbildung 2.11.** Berechnung der Absorptionseffizienzen bei 532 nm von 6 nm (schwarz), 15 nm (rot) und 30 nm (blau) Goldnanopartikeln, die sich im Zentrum einer homogenen, sphärischen Dampfblase mit dem Radius  $R_b$  befinden.

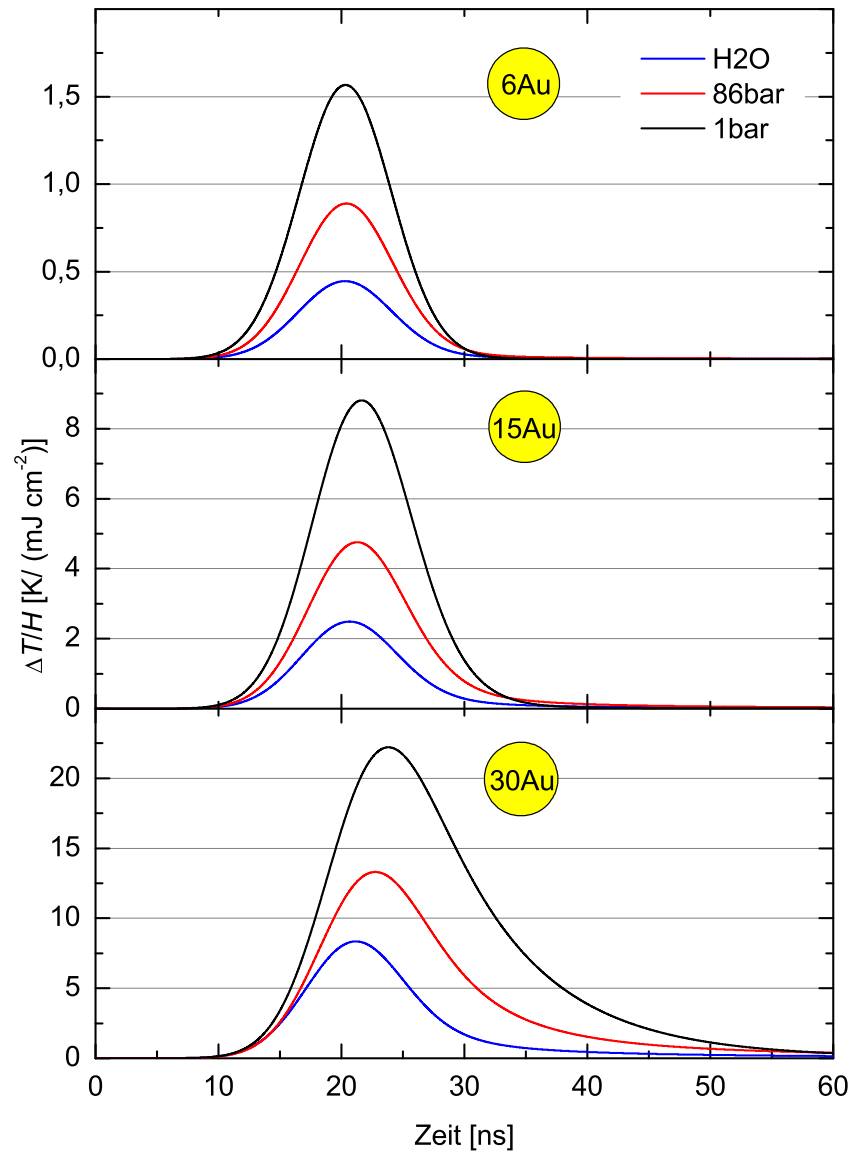
ven, Parameter aus [40]). 2. Eine Gasblase bei 100 °C im Gleichgewicht mit dem Atmosphärendruck ( $p_b = p_0 \approx 1$  bar) und einer Wasserdampfdichte von  $0,60 \text{ kg/m}^3$  (gestrichelte Linien). Mit diesen Parametern lassen sich nun nach [52] die Brechzahlen des Wasserdampfes für beide Grenzfälle berechnen. So beträgt seine Brechzahl bei 300 °C für eine Wellenlänge von 532 nm  $n = 1,0168$ , bei 100 °C dagegen  $n = 1,00022$ . Letztere entspricht in etwa der Brechzahl von Luft bei dieser Temperatur. Da diese beiden Brechzahlen im Vergleich zu der von flüssigem Wasser ( $n_{\text{Wasser}} = 1,33$ ) sehr dicht beisammen liegen und die Plasmonenresonanz nach Gl. 2.10 bei ansonsten identischen Parametern nur von der Brechzahl (bzw. der Dielektrizitätszahl  $\epsilon_m = n^2$ ) des umgebenden Mediums abhängt, ist der Verlauf der Absorption bei beiden Grenzfällen nahezu identisch, wie in Abb. 2.11 gut zu erkennen ist. Die Berechnungen nach dem Zwei-Sphären-Modell zeigen, dass die Lichtabsorption der Partikel bei einer Blasenbildung sehr schnell abnimmt. Bereits durch wenige Nanometer Wasserdampfschicht beträgt die Absorptionseffizienz nur

noch einen Bruchteil von derjenigen vor der Blasenbildung. Die verbleibende Absorption strebt dann schnell asymptotisch gegen einen Wert, der sich nur noch wenig mit einer weiteren Blasenausdehnung ändert. In Tabelle 2.2 sind die Absorptionseffizienzen beispielhaft für einen Dampfblasenradius von 150 nm angegeben.

| $\varnothing_{\text{Goldpartikel}}$ | Wasser<br>$\epsilon = 1,77$ | Dampf @ 300 °C<br>$\rightarrow \epsilon = 1,03388$ | Dampf @ 100 °C<br>$\rightarrow \epsilon = 1,00044$ | Luft<br>$\epsilon = 1,00058$ |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------|
| 6 nm                                | 0,35                        | 0,05                                               | 0,05                                               | 0,05                         |
| 15 nm                               | 0,87                        | 0,14                                               | 0,12                                               | 0,12                         |
| 30 nm                               | 1,74                        | 0,27                                               | 0,24                                               | 0,24                         |

**Tabelle 2.2.** Q-Faktoren bei 532 nm für Goldnanopartikel, die sich im Zentrum einer 300 nm großen Wasser-, Wasserdampf- und Luftblase befinden. Bei Luft und Wasser wurde eine Temperatur von 20 °C angenommen (Parameter aus [40]).

Die Tatsache, dass die Ausdehnung der Dampfblase nur in der initialen Phase eine bedeutende Änderung der Absorptionseffizienz bewirkt, ermöglicht eine einfache Abschätzung über die Auswirkungen der beiden gegensätzlichen Effekte beim Laserheizen der Nanopartikel: 1. Der Verlust der Absorption, und 2. der Verlust der Wärmeleitung, die durch die Kavitationsblase bewirkt werden. Es stellt sich die Frage, ob bei der ns-Bestrahlung die geringere Kühlung durch den Wasserdampf ausreicht, um der Verringerung der Absorption entgegenzuwirken. Wenn nun mit den in Tab. 2.2 aufgeführten Absorptionseffizienzen und den dazugehörigen thermodynamischen Parametern von Wasserdampf die Partikeltemperaturen für die beiden genannten Grenzfälle nach den Gleichungen 2.15–2.20 berechnet werden, ergeben sich die in Abb. 2.12 dargestellten Temperaturverläufe. An den Kurven ist deutlich zu erkennen, dass trotz reduzierter Absorptionseffizienz ein erheblicher Temperaturanstieg durch die Blasenbildung erzeugt wird. Die Reduzierung der Kühlung wirkt sich also stärker aus als der Verlust der Absorption. So steigt bspw. die Temperatur eines 15 nm Partikels in Wasser (blaue Kurve) trotz effektiver Plasmonenanregung um nur 2,5 °C pro  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  an. Wird nun das Partikel in der expandierten 100 °C heißen Wasserdampfblase (Grenzfall 2) mit der gleichen Fluenz bestrahlt, erwärmt es sich dagegen um fast 9 °C. Selbst in der 300 °C heißen intermediären Phase, unmittelbar nach der



**Abbildung 2.12.** Temperaturentwicklung während und nach Nanosekundenpuls-Bestrahlung (8,8 ns) eines 6 nm (oben), 15 nm (Mitte) und 30 nm (unten) Goldpartikels, das sich in Wasser (blau), oder einer Wasserdampfblase mit 300 °C u. 86 bar (rot) oder 100 °C u. 1 bar (schwarz), befindet.

Phasenexplosion (Grenzfall 1), ergibt sich immer noch fast die doppelte Temperaturerhöhung ( $4,8\text{ °C pro mJ/cm}^2$ ). Ähnlich verhält es sich auch mit den anderen Partikelgrößen (siehe Abb. 2.12).

**Zusammenfassung.** Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich Temperaturentwicklung und Kavitationsblasendynamik bei Piko- und Femtosekundenpuls-Bestrahlung ähnlich verhalten sollten, weil sich beide Systeme im thermischen Einschluss befinden. Hier kann mit verhältnismäßig geringer Bestrahlung die Temperatur im Partikel stark erhöht werden (z. B. bei 15Au um etwa  $121\text{ °C pro mJ/cm}^2$ ). Dagegen muss bei Nanosekundenpuls-Bestrahlung unterhalb der Nukleationsschwelle aufgrund der guten Wärmeleitung bzw. Kühlung grob 20 – 100-mal (abhängig von der Partikelgröße) mehr Energie aufgewendet werden, um das Partikel auf identische Temperaturen aufzuheizen.

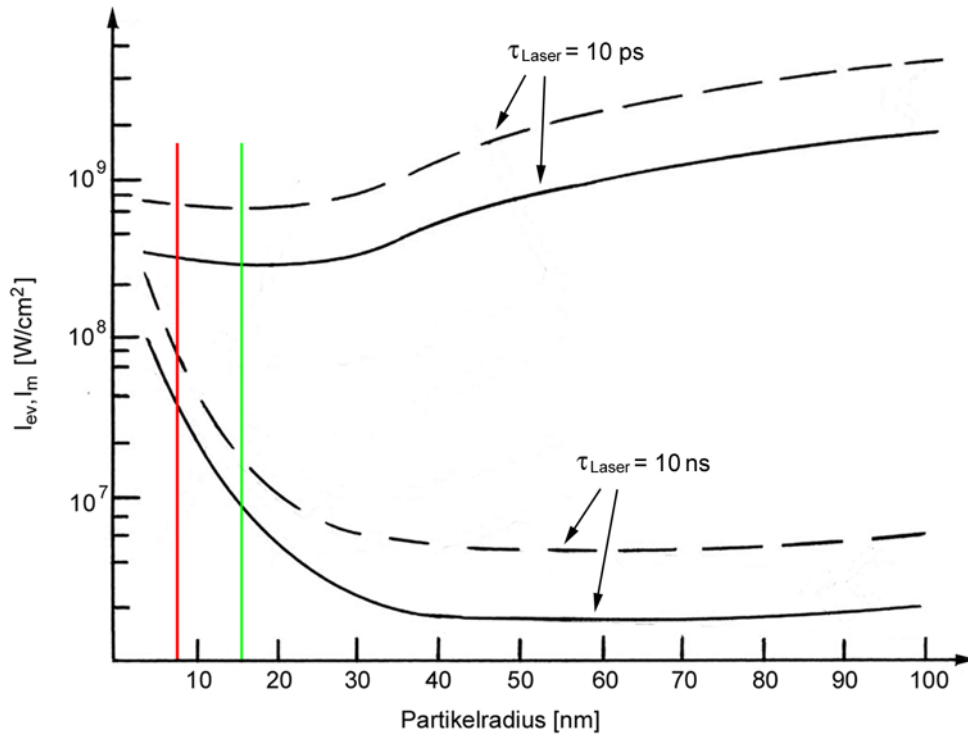
Das Kavitationsblasenvolumen wächst bei Femtosekundenpuls-Absorption linear mit der Bestrahlung an. Der gleiche Effekt kann auch für Pikosekundenpulse erwartet werden. Durch Variation der Bestrahlung lassen sich demnach beliebige Blasengrößen erzeugen, auch Kavitationsblasen von nur wenigen Nanometern Durchmesser. Wird die Nukleationsschwelle dagegen unter Nanosekundenpuls-Bestrahlung erreicht, verdampft ein viel größeres Wasservolumen, wodurch größere Blasen entstehen. Somit dürfte die Nanosekundenbestrahlung also Vorteile haben, wenn möglichst große Kavitationsblasen erzeugt werden sollen. Dagegen könnte die Pikosekundenbestrahlung von Vorteil sein, wenn kleine Blasen benötigt werden.

Komplizierter wird es bei Nanosekundenpulsen vor allem dann, wenn die Nukleationstemperatur *während* der Laserpulsabsorption überschritten wird. Infolge der plötzlich ausbleibenden Kühlung nach der Blasenbildung heizt die Energie des „restlichen“ Laserpulses das Partikel sprunghaft auf, was zum abrupten Schmelzen und Fragmentieren oder sogar zum Verdampfen des Goldpartikels führen kann.

### 2.2.2 Schmelzen und Verdampfen von Goldpartikeln

Neben der Kavitationsblasenbildung führt die laserinduzierte Erhitzung der Goldnanopartikel noch zu weiteren Effekten, die Auswirkungen auf die Teilchen und deren unmittelbare Umgebung haben (vgl. Abb. 2.6). So ist bei zunehmender Bestrahlung nach dem Überschreiten der Nukleationstemperatur zunächst ein Schmelzen des Partikelmaterials zu erwarten. Bei noch höheren Energien kann das Partikel fragmentieren oder sogar verdampfen.

**Schmelz- und Siedepunkt bei Laseranregung.** Ähnlich wie bei der Nukleationstemperatur für Kavitationsblasen ist auch hier die Kenntnis der Schwellenwerte für das Einsetzen des Schmelzvorgangs bzw. Verdampfens von Bedeutung für die Bestimmung der NALI-Schadensmechanismen. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass die Schmelztemperatur von Goldnanopartikeln deutlich niedriger liegt als die Schmelztemperatur von massivem Gold ( $T_m = 1064^\circ\text{C}$ ) [27, 29]. So haben z.B. PLECH *et al.* lasererhitzte Goldnanopartikel mittels zeitaufgelöster Röntgenstreuung auf Strukturänderung des Kristallgitters untersucht und dabei herausgefunden, dass Goldnanopartikel bereits bei etwa der Hälfte der ursprünglich erwarteten Laserleistung zu schmelzen *beginnen* [29]. Ähnliche Phänomene wurden auch bei Platinpartikeln beobachtet, und Untersuchungen an Bleinanopartikeln zeigten, dass ein Schmelzen der Partikeloberfläche bereits bei etwa 70% der normalen Schmelztemperatur auftritt [53, 54]. PLECH *et al.* vertreten dabei die These, dass sich beim Schmelzbeginn zunächst eine dünne flüssige Goldschicht um den (noch) kristallinen Kern des Teilchens ausbildet. Die dazu notwendige Temperaturerhöhung wurde mittels Vermessung der Kristallgitterabstände zu oberhalb von  $529^\circ\text{C}$  bestimmt [29]. Dabei zeigte sich, dass die Partikel bei dieser Temperaturerhöhung noch keine Größenänderung erfahren, was auf ein unvollständiges Aufschmelzen hindeutet. Nach einer Verdopplung der Laserleistung, was technisch dem Erreichen des Massenschmelzpunktes von Gold entsprach, wurde dagegen ein vollständiges Schmelzen beobachtet. Die zeitaufgelösten Messdaten dazu ergaben, dass sich dieser Schmelzvorgang innerhalb der ersten 100 Pikosekunden vollzieht [29]. Außerdem wurde auch



**Abbildung 2.13.** Bestrahlungsstärke, die zum Schmelzen (durchgezogene Linien) und Verdampfen (gestrichelte Linien) der Goldpartikel notwendig ist. Die oberen Kurven gelten für eine Laserpulsdauer von 10 ps und die unteren beiden für 10 ns. Die rote Linie markiert die für die 15 nm Partikel erwarteten Intensitäten, die grüne Linie entsprechend für 30 nm. Für 6 nm große Goldpartikel sind keine Angaben verfügbar (Grafik verändert nach [27]).

noch ein Rekristallisationsprozess beobachtet, der sich innerhalb eines Zeitraums von etwa 5 ns abspielt [29].

Eine gute Übersicht über den Zusammenhang zwischen applizierter Bestrahlung und dem Schmelzen und Verdampfen von Goldnanopartikeln gibt eine Zusammenfassung von PUSTOVALOV, in der theoretische Berechnungen mit einigen experimentellen Ergebnissen kombiniert wurden [27]. In Abb. 2.13 sind die für diese Arbeit interessanten Kurven wiedergegeben und in Tab. 2.3 die relevanten Werte daraus zusammengefasst.

Ein Vergleich der in Abb. 2.4 vorgestellten Temperaturrechnungen mit den Werten in Tab. 2.3 zeigt, dass die Temperaturschwellen für Dampfblasenbildung und Schmelzen der Nanopartikel bei Erhitzung mit Pikosekun-

|       | $H_m$ @ 10 ns          | $H_{ev}$ @ 10 ns       | $H_m$ @ 10 ps          | $H_{ev}$ @ 10 ps       |
|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 15 nm | 350 mJ/cm <sup>2</sup> | 780 mJ/cm <sup>2</sup> | 2,9 mJ/cm <sup>2</sup> | 6,8 mJ/cm <sup>2</sup> |
| 30 nm | 90 mJ/cm <sup>2</sup>  | 170 mJ/cm <sup>2</sup> | 2,6 mJ/cm <sup>2</sup> | 6,2 mJ/cm <sup>2</sup> |

**Tabelle 2.3.** Aus Abb. 2.13 abgelesene Werte für die zum Schmelzen und Verdampfen der Partikel benötigten Bestrahlungen  $H_m$  bzw.  $H_{ev}$ .

denpulsen sehr dicht beisammenliegen. Dies wurde auch von KOTAIDIS *et al.* bei der Femtosekundenpuls-Bestrahlung von Goldpartikeln beobachtet [26]. Er gibt für 30 nm Partikel ein Nukleationstemperatur-zu-Schmelzpunkt-Verhältnis von  $T_{nuc}/T_m \approx 1$  und für 15 nm Teilchen sogar  $1 \lesssim T_{nuc}/T_m \lesssim 1,4$  an. Konkret bedeutet dies, dass bei der Erzeugung einer Kavitationsblase praktisch immer auch ein (zumindest oberflächlicher) Schmelzprozess stattfindet, so dass im Endeffekt nur schwer zwischen einem Kavitationsblasen-verursachten Schadensmechanismus und einer Proteinschädigung durch den Schmelzprozess unterschieden werden kann.

**Fragmentierung, Verdampfung und Diffusion.** Bei einer weiteren Erhöhung der Bestrahlung wird nach dem Erreichen des Schmelzpunktes zunächst ein Teil der absorbierten Energie für die Phasenumwandlung benötigt (latente Schmelzwärme). Sobald das Aufschmelzen komplett abgeschlossen ist, heizt sich das Partikel weiter auf. In diesem Bereich kann eine Teilchenfragmentierung auftreten [10, 49, 55–57]. Das Nanopartikel kann dann bis zum Siedepunkt von Gold ( $T_{ev} = 2856^\circ\text{C}$ ) erhitzt werden [27]. Nach dem Überwinden der latenten Verdampfungswärme verdampft das Partikelmateriale schließlich. Die dynamischen Kavitationsblasen-Prozesse (Aufschwingen und Kollaps der Blase, Blasenoszillationen) können die Partikelfragmentierung und die Diffusion von Goldfragmenten, -ionen oder -atomen in die Umgebung unterstützen.

## 2.3 Denaturierung von Proteinen

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten biologischen Grundlagen, die zum Verständnis der Mechanismen der Proteininaktivierung beitragen sollen, kurz dargelegt. Dazu wird zunächst der Aufbau von Proteinen sowie der Zusammenhang zwischen ihrer charakteristischen dreidimensionalen Struktur und ihrer spezifischen biologischen Funktion beschrieben. Im Anschluss werden dann Modelle entwickelt, wie die Proteinstruktur manipuliert werden kann, um die Proteinfunktion zu stören.

### 2.3.1 Proteinstruktur und -funktion

Proteine gehören zu den wesentlichen Aufbaustoffen aller Lebewesen. Sie sind an allen biochemischen Reaktionen der Atmung, des Wachstums und der Zellteilung beteiligt. In den Zellen katalysieren sie die chemische Umwandlung niedermolekularer Verbindungen, ermöglichen die Aktivität und Bewegung der Zellen und stabilisieren deren Struktur [58]. Außerdem steuern Proteine die Aktivität von Genen, die wiederum Struktur und Funktion der Zellen festlegen. Proteine sorgen für den Transport von Substanzen durch Zellmembranen und katalysieren ihre eigene Synthese sowie die weiterer Makromoleküle. Aufgrund der Vielseitigkeit ihrer Aufgaben besitzen Proteine eine sehr unterschiedliche Gestalt und Größe.

**Proteinstruktur.** Die Struktur eines Proteins ist von fundamentaler Bedeutung für seine Funktionsweise, denn das Biomolekül entwickelt seine spezifische Funktion nur dann, wenn es in einer genau festgelegten dreidimensionalen Form *gefaltet* ist. Dabei hat sich diese räumliche Struktur im Laufe der Evolution so entwickelt, dass seine biologische Funktion sehr effizient und gleichzeitig streng kontrolliert abläuft; Proteinstruktur und -funktion sind also untrennbar miteinander verknüpft [58].

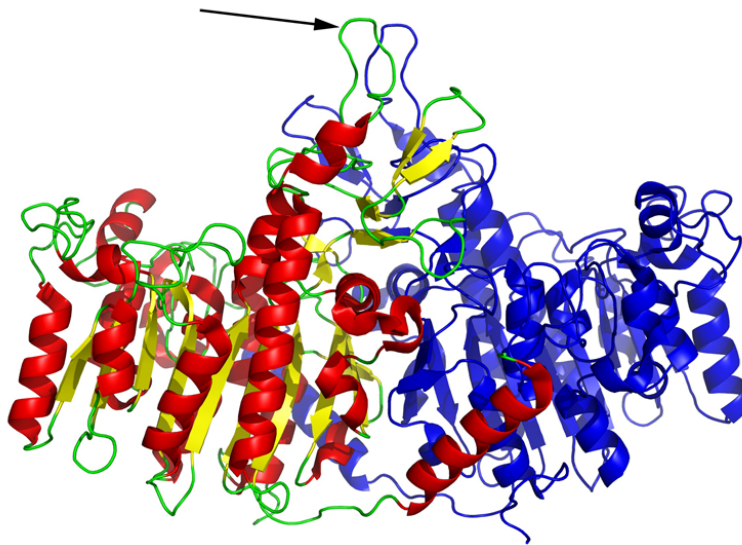
Proteine sind lineare Polymere aus Aminosäuren, die über kovalente Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die insgesamt 20 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren, aus denen alle in der Natur vorkommenden Proteine aufgebaut sind, unterscheiden sich dabei nur durch ihre Seitenketten.

So besitzen die gut wasserlöslichen Aminosäuren polare Seitenketten, während die nicht oder nur schlecht wasserlöslichen Aminosäuren hydrophobe Seitenketten aufweisen.

Die dreidimensionale Proteinstruktur wird für gewöhnlich auf 4 Ebenen definiert. Die unterste Ebene, die *Primärstruktur*, entspricht dabei der linearen Anordnung der Aminosäuren innerhalb der Polypeptidkette, deren Länge zwischen 50 und 10.000 Aminosäurebausteinen betragen kann [35]. Durch unterschiedlichste Verknüpfung der 20 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren ließe sich theoretisch schon bei der unteren Grenze von nur 50 Peptiden mit  $20^{50} \approx 1,1 \cdot 10^{65}$  eine extrem hohe Zahl von Primärstrukturen herstellen. Aus dieser hohen Anzahl von möglichen Sequenzisomeren wird in biologischen Systemen jedoch nur eine einzige Auswahl realisiert, festgelegt durch den genetischen Code für das entsprechende Protein.

Die *Sekundärstruktur* wird durch die räumliche Faltung einzelner Abschnitte der Polypeptidkette erzeugt. Ohne weitere stabilisierende Wechselwirkungen nimmt die Polypeptidkette die Form eines *Zufallsknäuels* an [58]. Durch stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH- und CO-Gruppen der Peptidbindungen bilden sich regelmäßige Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -*Helices* (Spirale) oder  $\beta$ -*Stränge* (gerader Abschnitt) aus (siehe Abb. 2.14). Wenn mehrere  $\beta$ -Stränge sich seitlich aneinanderlegen, entsteht ein  $\beta$ -*Faltblatt*. Außerdem werden noch U-förmige Abschnitte aus 4 Aminosäuren als *Haarnadelbiegung* bezeichnet. Diese befinden sich meist an solchen Stellen auf der Oberfläche von Proteinen, wo die Polypeptidkette wieder in das Proteininnere zurückläuft [58].

Unter *Tertiärstruktur* wird die räumliche Anordnung der gesamten Polypeptidkette verstanden. Im Gegensatz zur Sekundärstruktur, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird, entsteht die Tertiärstruktur hauptsächlich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen unpolaren Seitenketten (in einigen Proteinen wird die Tertiärstruktur zusätzlich noch durch prosthetische Gruppen und kovalente Disulfidbrücken, die sich zwischen den beiden Schwefelatomen von zwei Cysteinen ausbilden können, stabilisiert) [58]. Die hydrophoben WW ordnen die  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, Haarnadelbiegungen und Zufallsknäuel in einer wohldefinierten Weise an und be-



**Abbildung 2.14.** Quartärstruktur der alkalischen Phosphatase aus Eismeergranaten (nach [59]). Die lineare Anordnung der Aminosäuren (Primärstruktur) bildet das Rückgrat (grün) der beiden Monomere (zur besseren Unterscheidung ist das linke Monomer mehrfarbig und das rechte in Blau dargestellt). Die Polypeptidketten bilden durch Wasserstoffbrückenbindungen an bestimmten Stellen regelmäßige Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices (rot),  $\beta$ -Faltblätter (gelb) und Haarnadelbiegungen (Pfeil) aus. Diese Strukturen wiederum falten sich unter hydrophober WW zu einer wohldefinierten Tertiärstruktur. Beide Untereinheiten dieses Homodimers werden außerdem durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe WW zu einer übergeordneten Quartärstruktur verknüpft.

stimmen damit die dreidimensionale Struktur des Polypeptids. Bei Proteinen, die nur aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen (Monomer), entspricht die Tertiärstruktur somit der resultierenden Proteinstruktur.

Die *Quartärstruktur* bildet schließlich die höchste Ebene der strukturellen Organisation eines Proteins. Sie beschreibt die Anzahl und die räumliche Anordnung von mehreren Untereinheiten in einem multimeren Protein. Multimere können aus identischen (Homomer) oder unterschiedlichen Unterheiten (Heteromer) aufgebaut sein, die an bestimmten Stellen durch Wasserstoffbrückenbindung oder hydrophobe WW zusammengehalten werden. Zur Veranschaulichung der Strukturdefinitionen ist in Abb. 2.14 die Quartärstruktur von alkalischer Phosphatase aus Eismeergranaten dargestellt.

Insgesamt umspannt die Größe der meisten Proteine einen Bereich zwi-

schen 5 und 50 nm. Abhängig von der Aufgabe des Proteins kommen dabei die unterschiedlichsten Proteinformen vor. So besitzen lösliche Proteine (z. B. lösliche Enzyme) meist eine globuläre Struktur, während Strukturproteine wie das Kollagen (Bindegewebs-Protein) eher langgestreckt sind.

**Spezifische Proteinfunktion.** Die Funktion eines Proteins wird durch seine dreidimensionale Konformation bestimmt. Bei den meisten Proteinen liegen 60% der Polypeptidkette in den beiden geordneten Sekundärstrukturen  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt vor, der Rest besteht aus Haarnadelbiegungen und Zufallsknäueln [58]. Die beiden regelmäßigen Sekundärstrukturen werden dann durch die proteinspezifische Faltung in der richtigen Weise zueinander angeordnet, so dass an bestimmten Stellen des Proteins eine funktionelle geometrische Struktur ausgebildet wird. Bei katalytisch aktiven Proteinen, den Enzymen, werden solche Stellen als *aktives Zentrum* bezeichnet, da die katalysierte Reaktion genau an diesem Ort abläuft. Bei Antikörpern, einer weiteren wichtigen Proteinklasse, bilden  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen an definierten Orten auf der Proteinoberfläche eine zu bestimmten Biomolekülen komplementäre Struktur aus, um diese an sich zu binden. Diese spezifische Antigen-Antikörper-Bindung ist vergleichbar mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und bildet die Grundlage der Immunabwehr in Organismen.

**Funktionsverlust durch Denaturierung.** Weil die Proteinfunktion durch die Proteinstruktur bestimmt wird, bedeutet eine Änderung dieser Struktur in der Regel auch den Funktionsverlust. Theoretisch könnte jede Polypeptidkette aus  $n$  Aminosäureresten in  $8^n$  möglichen Konformationen vorliegen, da im Polypeptid-Rückgrat 8 Bindungswinkel sterisch möglich sind [58]. Normalerweise besitzt jedoch jedes Molekül eines bestimmten Proteins die gleiche Konformation, die als *nativer Zustand* bezeichnet wird. In diesem nativen Zustand ist die Faltung des Proteins am stabilsten, weil hier das dreidimensionale Polypeptid-System insgesamt ein Minimum an potentieller Energie besitzt (diese thermodynamische Hypothese ermöglicht es, Proteinstrukturen durch *molecular modeling* theoretisch zu berechnen [60–62]). Wird nun das native Protein bestimmten physikalischen oder chemischen Einflüssen ausgesetzt,

können sich die nichtkovalenten Bindungen zwischen den Aminosäureseitenketten lösen und das Protein entfaltet sich. Dieser Entfaltungsprozess, der als *Denaturieren* bezeichnet wird, kann z. B. durch pH-Veränderung, bestimmte Chemikalien und auch durch Temperaturerhöhung ausgelöst werden.

**Renaturierung.** Oft ist die Proteindenaturierung reversibel. Wenn bspw. bestimmte chemische Substanzen eine Denaturierung verursachen, können sich einige vollkommen entfaltete Proteine in den nativen Zustand zurückfalten, wenn die Chemikalien wieder entfernt werden. Bei diesem Renaturierungsprozess werden dann die hydrophoben WW sowie die Wasserstoffbrücken- und Disulfidbindungen wiederhergestellt. Somit können Proteine einen gesamten Denaturierungs-Renaturierungs-Zyklus durchlaufen [58].

### 2.3.2 Denaturierung durch Wärme

Die Proteinkonformation wird oberhalb der Sekundärstruktur, abgesehen von Disulfidbrücken und prosthetischen Gruppen, allein durch hydrophobe WW und Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Durch die Zufuhr von thermischer Energie lassen sich diese niederenergetischen Bindungen lösen. Dadurch wird die charakteristische Proteinstruktur verändert, und das Biomolekül verliert seine biologische Funktion.

**Thermische Denaturierung.** Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie schwach die nichtkovalenten Bindungen im Vergleich zu den kovalenten Bindungen innerhalb biologischer Systeme sind, ist in Tab. 2.4 eine Übersicht verschiedener Bindungsenergien zusammengestellt. So ist der Tabelle zu entnehmen, dass die Stärke der kovalenten Bindungen um bis zu zwei Größenordnungen höher ist als die der nichtkovalenten. Trotzdem bewirken letztere aufgrund ihrer großen Anzahl eine hohe Stabilität der Polypeptidkonformation. Damit sich aber Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines Polypeptids überhaupt erst ausbilden können, müssen zuerst die Bindungen der beteiligten Gruppen an Wassermoleküle gelöst werden. Dieser Abspaltungsprozess kostet Energie, weshalb die Netto-Energiedifferenz der Wasser-

| Einfachbindung | Energie [eV] | Doppelbindung                                                            | Energie [eV] |
|----------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------|
| O–H            | 4,77         | C=O                                                                      | 7,38         |
| H–H            | 4,51         | C=N                                                                      | 6,38         |
| P–O            | 4,34         | C=C                                                                      | 6,34         |
| C–H            | 4,30         | P=O                                                                      | 5,21         |
| N–H            | 4,04         |                                                                          |              |
| C–O            | 3,65         | Dreifachbindung: C≡C                                                     | 8,46         |
| C–C            | 3,60         |                                                                          |              |
| S–H            | 3,51         | Wasserstoffbrücken in H <sub>2</sub> O                                   | 0,22         |
| C–N            | 3,04         | Wasserstoffbrücken in...                                                 |              |
| C–S            | 2,69         | ...OH <sup>+</sup> ...X <sup>−</sup> / NH <sup>+</sup> ...X <sup>−</sup> | 0,04–0,09    |
| N–O            | 2,30         | Van der Waals-WW                                                         | ≤ 0,04       |
| S–S            | 2,21         | hydrophobe WW                                                            | ≤ 0,1        |

**Tabelle 2.4.** Übersicht über die wichtigsten in biologischen Systemen vorkommenden Bindungsenergien (Werte nach [58]).

stoffbrückenbindung im Protein nur noch etwa 0,026 eV beträgt, was nicht wesentlich mehr ist als die unter physiologischen Bedingungen verfügbare thermische Energie [58]. Daraus wird ersichtlich, dass bereits eine moderate Temperaturerhöhung diese schwachen Bindungen lösen kann.

Grundsätzlich lässt sich jedes Protein thermisch denaturieren. Die dazu notwendigen Temperaturen sind jedoch bei nahezu jedem Proteintyp unterschiedlich, abhängig von der Lebensform und den äußeren Bedingungen. So enthalten z.B. Flechten aus Polarzonen Proteine, die bereits bei Temperaturen ab 40 °C zu denaturieren beginnen. Andererseits gibt es thermophile Organismen, wie das Archaeobakterium *Pyrococcus abyssi*, das aus ca. 1.500 äußerst thermostabilen Proteinen besteht, die bis zu 120 °C tolerieren [63]. Nur die enorme Thermostabilität seiner Proteine ermöglicht diesem marinen, anaeroben und hyperthermophilen Organismus, der an den *Black Smokern* in der Tiefsee vorkommt, ein optimales Wachstum bei Wassertemperaturen von fast 100 °C [64].

Da alle Proteine – egal aus welcher Lebensform – aus den gleichen 20 Aminosäuren aufgebaut sind, ist deren Thermostabilität allein durch die jeweilige Proteinstruktur festgelegt. Dabei sind die Mechanismen, die zur Proteinentfaltung infolge einer Temperaturerhöhung führen, bei allen Prote-

inen gleich: Durch die Zufuhr von thermischer Energie werden die schwachen, nichtkovalenten Bindungen gelöst und das Protein nimmt eine andere Konformation an, in welcher es durch die höhere kinetische oder thermodynamische Energie vorübergehend stabilisiert wird [65]. Im einfachsten Fall einer *irreversiblen* Denaturierung ist die Polypeptidkettenstruktur innerhalb dieser metastabilen Konformation dann derart *verknäuel*t, dass eine spontane Rückfaltung nach Temperatursenkung nicht mehr möglich oder fehlerhaft ist. Darüber hinaus können eine irreguläre Zusammenlagerung von entfalteten Peptidkettensegmenten über nichtkovalente oder kovalente Veränderungen in der Polypeptidkette eine Wiederherstellung der nativen Struktur verhindern [65].

**Ratenprozess.** Die Proteindenaturierung durch Wärme ist eine endotherme chemische Reaktion und daher ein temperaturabhängiger Ratenprozess. Jede chemische Reaktion kann durch eine mathematische Gleichung (das sogenannte *Geschwindigkeitsgesetz*) beschrieben werden, in der die Konzentrationen der Reaktanden mit der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  in Relation stehen. Das Geschwindigkeitsgesetz für die chemische Reaktion 1. Ordnung (einstufige Reaktion) des Reaktanden  $A$  lautet:

$$v_A := -\frac{dc_A}{dt} = k \cdot c_A \quad (2.27)$$

[66]. Hierin sind  $k$  die Geschwindigkeitskonstante (oder Ratenkonstante) und  $c_A$  die Konzentration des Reaktanden  $A$ . Da die Ratenkonstante temperaturabhängig ist ( $k \rightarrow k(T)$ ) und der Temperaturverlauf zeitabhängig sein kann ( $T \rightarrow T(t)$ ), gilt für das Geschwindigkeitsgesetz allgemein:

$$-\frac{dc_A(t)}{dt} = k(T(t)) \cdot c_A(t). \quad (2.28)$$

Die Lösung von Gl. 2.28 lautet:

$$\Omega := -\ln \left( \frac{c_A(t)}{c_0} \right) = \int_0^t k(T(t')) dt', \quad (2.29)$$

wobei  $c_0$  die Konzentration des Reaktanden  $A$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  ist. Gl. 2.29 wird als *Arrhenius-Integral* und im Falle der thermischen Denaturierung bzw. Inaktivierung von Biomolekülen auch als *Schädigungsintegral* bezeichnet [67, 68].

**Zeitabhängiges Arrhenius-Modell.** Die Geschwindigkeitskonstante  $k(T)$  nimmt mit ansteigender Temperatur gemäß der *Arrhenius-Gleichung*

$$k(T) = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R_g T}\right) \quad (2.30)$$

zu [66, 67]. Hierin sind  $E_a$  die Reaktanden-spezifische Aktivierungsenergie, die überwunden werden muss, damit die chemische Reaktion ablaufen kann,  $T$  die absolute thermodynamische Temperatur und  $R_g = 8,314 \text{ J/mol K}$  die universelle Gaskonstante.  $A_0$  ist ein präexponentieller Faktor, der für die jeweilige Reaktion charakteristisch ist. Thermodynamische Berechnungen lassen zwar eine lineare Abhängigkeit von  $A_0$  von der Temperatur erwarten sowie eine exponentielle Abhängigkeit von der Entropieänderung  $\Delta S$  des Systems:

$$A_0 \sim T \cdot \exp\left(\frac{\Delta S}{R_g}\right) \quad (2.31)$$

[68]. Im Bereich zwischen  $\sim 293 \text{ K}$  (Raumtemperatur) und  $\sim 582 \text{ K}$  (spinodaler Punkt bei  $p_0$ ) kann in Gl. 2.30 die lineare Temperaturabhängigkeit von  $A_0$  gegenüber der starken Temperaturabhängigkeit des Exponentialterms  $\exp(-E_a/R_g T)$  jedoch vernachlässigt werden, so dass  $A_0$  als konstanter Faktor betrachtet werden kann, der von der Entropieänderung des Proteins bei der Denaturierung abhängt und für jeden Proteintyp empirisch bestimmt werden muss.

Sind nun  $c(t)$  und  $c_0$  in Gl. 2.29 die Konzentrationen der funktionsfähigen Proteine zum Zeitpunkt  $t$  bzw.  $t = 0$  und  $k(T(t'))$  die spezifische, temperaturabhängige Inaktivierungsrate, die durch die zeitabhängige Arrhenius-Gleichung

$$k(T(t')) = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R_g T(t')}\right) \quad (2.32)$$

beschrieben werden kann, dann lautet das Schädigungsintegral für die temperaturabhängige Proteindenaturierung schließlich:

$$\Omega(t) := \ln \left( \frac{c_0}{c(t)} \right) = A_0 \cdot \int_0^t \exp \left( -\frac{E_a}{R_g T(t')} \right) dt' \quad (2.33)$$

[68]. Bei Kenntnis der Temperaturexposition  $T(t)$  sowie der Aktivierungsenergie  $E_a$  und des präexponentiellen Faktors  $A_0$  des Systems kann mit diesem Schädigungsintegral der Grad der Denaturierung bzw. Inaktivierung für jeden Zeitpunkt berechnet werden.

Die Aktivierungsenergie verschiedener Proteintypen hängt stark vom pH-Wert ihres Lösungsmittels ab und liegt meist in einem Bereich zwischen 200 und 800 kJ/mol [68, 69]. Da diese Energien relativ hoch sind, ist der Wert des Exponentialterms  $\exp(-E_a/R_g T)$  in Gl. 2.30 extrem klein, z. B.  $4,68 \cdot 10^{-33}$  für 50 °C und  $E_a = 200$  kJ/mol. Dass trotzdem nennenswerte Denaturierungsraten in der Größenordnung von  $10^{-4}$  1/s bei Temperaturen von nur 50 °C auftreten, kann nur durch die sehr große Entropiedifferenz zwischen dem geordneten Anfangszustand des Proteins (dem räumlich hohen Ordnungszustand der nativen Konformation) und dem ungeordneten Zustand der entfalteten Polypeptidkette erklärt werden [68]. Die große Entropiezunahme beim Entfaltungsprozess kann die hohe Aktivierungsenergie-Barriere also statistisch kompensieren.

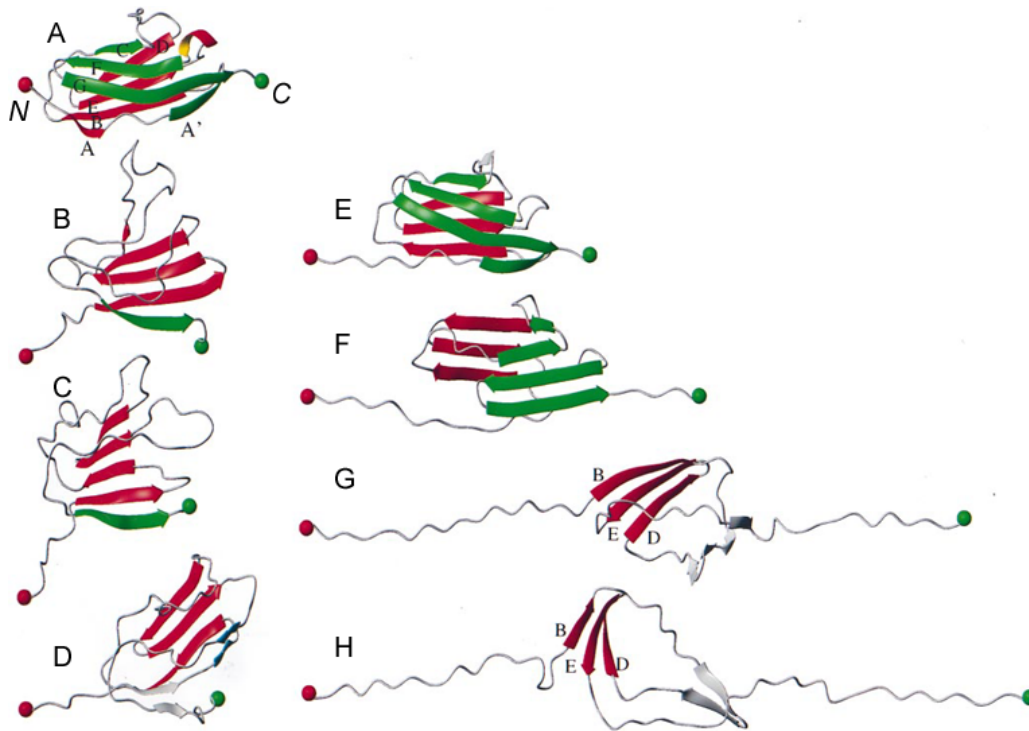
Die Arrhenius-Parameter für die in dieser Arbeit verwendete alkalische Phosphatase wurden von RADT durch Temperatursprungexperimente bereits bestimmt [16]. Dabei erhielt er für die Aktivierungsenergie  $E_a = 161$  kJ/mol und für den präexponentiellen Faktor  $A_0 = 1,85 \cdot 10^{23}$  1/s. Ausgehend von einer maximalen Wassertemperatur von etwa 300 °C in der angrenzenden Wasserschicht des Nanopartikels (vgl. Abschnitt 2.2.1) wären für eine 50%-ige Proteinschädigung nach Gl. 2.33 nur etwa 1,8 ns Heizdauer nötig. Nach Vergleich mit Abb. 2.5 liegt dies bei der Nanosekundenpuls-Absorption durchaus im realisierbaren Bereich. Aufgrund der längeren Wärmezufuhr und des größeren erhitzten Wasservolumens erscheint eine thermische Inaktivierung bei der Nanosekunden-Bestrahlung deutlich wahrscheinlicher als bei den Pikose-

kundenpulsen. Bei letzteren liegt die Heizdauer nach Abb. 2.4 deutlich im Sub-Nanosekundenbereich, was eine thermische Inaktivierung unwahrscheinlich macht.

**Entfaltungsdynamik.** Dass durch Nanosekundenpulse erzeugte Heizdauern tatsächlich eine zumindest teilweise Entfaltung der Polypeptidketten bewirken könnte, zeigen zahlreiche Untersuchungen an Modellproteinen, z. B. dem *Engrailed Homeodomain Protein*, dessen Faltungs- und Entfaltungsraten von MAYOR *et al.* berechnet und gemessen wurden [70]. So errechneten sie beispielsweise  $\sim 7,5$  ns für die Halbwertszeit der Entfaltung dieses Proteins bei 100 °C. Für die für Proteine sehr hohe Temperatur von 225 °C ergaben die molekulardynamischen Berechnungen sogar, dass die Denaturierung bereits nach nur 260 ps beginnt [70]. Ähnlich kurze Entfaltungszeiten wurden z. B. auch für die Denaturierung der 1TIT-Domäne des menschlichen *Titin*-Proteins erhalten, dargestellt in Abb. 2.15 [71]. PACI *et al.* geben für Temperaturen um 177 °C Entfaltungszeiten von wenigen Nanosekunden an. Bei 227 °C erhielten sie aus den Berechnungen Entfaltungszeiten von unter 500 ps [71].

Viele molekulardynamische Simulationen zeigen, dass bei hohen Temperaturen extrem kurze Entfaltungszeiten auftreten. Allerdings ergeben diese Berechnungen auch, dass sich die entarteten Polypeptidketten wieder zurückfalten können, so dass ein kurzzeitiger Temperatursprung meist keine irreversible Schädigung verursacht [70]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ent- und Rückfaltung eines Proteins umgekehrte Prozesse sein könnten, allerdings nur bei kurzen Temperatursprüngen und einfachen Polypeptiden [72].

**Irreversible Denaturierung.** Die bisher betrachteten Entfaltungsprozesse werden allein auf die thermodynamischen Veränderungen der nicht-kovalenten Bindungen zurückgeführt. Hier kann eine Rückfaltung in den nativen Zustand stattfinden, wenn keine Aggregation auftritt. Beispielsweise denaturieren Lysozym-Proteine aus Hühnereiweiß durch kurzzeitiges Erhitzen auf 100 °C, so dass sie vollkommen ihre Funktion verlieren. Wenn sie jedoch sofort wieder abkühlen, erlangen sie ihre Aktivität vollständig zurück [65]. Dabei ha-



**Abbildung 2.15.** Von PACI *et al.* berechneter Entfaltungsverlauf für die 1TIT Domäne des menschlichen *Titin*-Proteins bei 450 K. Der Parameter  $r_{NC}$  beschreibt den Abstand zwischen dem N- und dem C-terminalen Ende der Polypeptidkette. A) Röntgenkristallstruktur (1TIT),  $r_{NC} = 45 \text{ \AA}$ . Die Sequenz B–D zeigt die temperaturinduzierte Entfaltung: B) 0,6 ns,  $r_{NC} = 34 \text{ \AA}$ ; C) 1,5 ns,  $r_{NC} = 37 \text{ \AA}$ ; D) 4,8 ns,  $r_{NC} = 38 \text{ \AA}$ . Die Sequenz E–H beschreibt eine durch Einwirkung von atomarer Kraft verursachte Entfaltung: E)  $r_{NC} = 54 \text{ \AA}$ ; F)  $r_{NC} = 75 \text{ \AA}$ ; G)  $r_{NC} = 126 \text{ \AA}$ ; H)  $r_{NC} = 138 \text{ \AA}$  (Abbildung verändert nach [71]).

ben AHERN und KLIBANOV durch zahlreiche Experimente zur thermischen Inaktivierung von Lysozymen aus Hühnereiweiß herausgefunden, dass die *irreversible* Denaturierung auch oder gerade aufgrund kovalenter Änderungen in der Polypeptidkette verursacht wird [65]. Eine Desaminierung von Asparaginresten, die Hydrolyse von Peptidbindungen an den Asparaginsäuren und die Zerstörung von Disulfidbindungen sowie die Bildung von Zufallskonformationen sind für die Irreversibilität der Entfaltung verantwortlich. Dabei hängt der Grad der kovalenten Veränderungen vom pH-Wert, der Dauer der Wärmezufuhr und der Temperatur ab. So geben AHERN und KLIBANOV an, dass pro Stunde Temperaturerhöhung auf 100 °C beim nativen pH-Wert

des Lysozyms (pH 8) etwa 18 Desaminierungen von Asparaginresten, 6 Zerstörungen von Cystein-Seitenketten und 32 irreguläre Formationsbildungen auftreten [65].

Insgesamt hängt die Kinetik der thermischen Proteindenaturierung neben Faktoren wie dem pH-Wert und der Ionenstärke des Lösungsmittels davon ab, wie hoch die Temperatur ist, wie lange die Wärmezufuhr erfolgt, an welchen Stellen im Protein die Denaturierung beginnt und welchen Zeitraum der Entfaltungsprozess benötigt. Außerdem hängt die Irreversibilität der Denaturierung von der Proteinkonzentration, der Anzahl und Anordnung der Asparagine und Cysteine sowie der Anwesenheit von Aggregationspartnern und möglicherweise auch noch von weiteren Parametern ab. Da hier etliche Unbekannte im Spiel sind, die sich zudem noch gegenseitig beeinflussen können, lassen sich keine allgemein gültigen Regeln für proteinspezifische Inaktivierungstemperaturen und Heizdauern angeben.

### 2.3.3 Denaturierung an Grenzflächen

In Abschnitt 2.2.1 ist beschrieben, dass ab bestimmten Partikeltemperaturen Kavitationsblasen entstehen. Innerhalb und an der Grenzfläche der Kavitationsblasen ändert sich die Umgebung der Proteine drastisch. So ist neben hohen Temperaturen und Drücken auch mit dem Schwund des Lösungsmittels und starken Dichteschwankungen beim Aufschwingen und Kollaps der Blase zu rechnen. Außerdem ist seit langem bekannt, dass wasserlösliche Proteine an hydrophoben Grenzflächen denaturieren können [73].

**Hydrophobe Wechselwirkung.** Es sind hauptsächlich die hydrophoben WW zwischen den apolaren Aminosäureseitenketten, die für die Gestalt und Stabilität der Tertiärstruktur verantwortlich sind. Dabei ist die treibende Kraft bei diesem Bindungstyp nicht die direkte Wirkung der apolaren Moleküle aufeinander, sondern das Bestreben des Systems (Protein und Lösungsmittel), möglichst viele Wassermoleküle in den energetisch günstigsten Zustand zu bringen. Ein apolares Molekül kann mit den Wassermolekülen selbst keine Wasserstoffbrückenbindung eingehen. Daher stört es die norma-

le, energetisch günstigste Wasserstruktur und erzeugt praktisch einen „Käfig“ aus Wassermolekülen um das apolare System herum. Die hydrophobe WW wird also durch die kollektiven Wasserstoffbrückenbindungen der umgebenden Wassermoleküle erzeugt.

**Grenzflächendenaturierung.** Wasserlösliche Proteine nehmen eine Konformation ein, bei der die unpolaren, hydrophoben Bereiche der Polypeptidketten nach innen und die polaren, hydrophilen Regionen nach außen gerichtet sind. Gerät nun ein solches Protein an eine Grenzfläche mit hydrophobem Charakter, dann richten sich die normalerweise innen liegenden hydrophoben Gruppen aufgrund der Kräfteverschiebung an der Grenzfläche aus [74]. Dies führt zu einer strukturellen Änderung, deren Ausmaß vom Proteintyp, der Proteinkonzentration, dem Lösungsmittel und der Grenzflächenbeschaffenheit abhängt. Insbesondere die Art der Grenzfläche (flüssig–flüssig, flüssig–fest oder flüssig–gasförmig) und die Expositionsdauer haben dabei großen Einfluss auf die Entfaltung [75].

Luft und Öl besitzen beide einen hydrophoben Charakter. Aus diesem Grund können sich wasserlösliche Proteine an einer Grenzfläche Wasser–Öl oder Wasser–Luft entfalten und dabei einen wasserunlöslichen monomolekularen Film auf der Oberfläche bilden [73]. Dieser Effekt führt z. B. beim Schütteln von wässrigen Proteinlösungen zur Schaumbildung. Abhängig vom Proteintyp und der Expositionszeit zur Luftschicht, kann hierbei ein erheblicher Teil der Proteine irreversibel denaturieren [76, 77].

**Denaturierung an und in Kavitationsblasen.** Bei der bisherigen Betrachtung zur Grenzflächendenaturierung wurde von einer semi-hydrophoben Grenzfläche ausgegangen. Da bei der Phasenumwandlung von Wasser zu Wasserdampf die Wasserstoffbrückenbindungen kollektiv aufbrechen, kann eine Dampfblase auch als hydrophob betrachtet werden. Demnach können wasserlösliche Proteine an Kavitationsblasengrenzflächen ebenfalls denaturieren, wenn die Expositionsdauer hinreichend groß ist. Verbleibt das Protein aufgrund einer sehr festen Bindung auch nach der Blasenbildung am Goldpartikel, ist es während der Lebensdauer der Kavitationsblase nicht mehr von

flüssigem Wasser umgeben. Außerdem destabilisieren sich auch die Wasserstoffbrückenbindungen von Wassermolekülen innerhalb des Proteins. Dabei ist bekannt, dass im Inneren von Proteinen gebundene Wassermoleküle die Proteinstruktur stabilisieren [78, 79]. Ohne flüssiges Wasser gehen die hydrophoben WW verloren, was bei ausreichender Expositionszeit zur Denaturierung führt. Ob dieser Prozess dann irreversibel ist, kann allerdings nicht vorhergesagt werden. Irreversible Denaturierung wurde bei durch Schall- und Ultraschall erzeugter Kavitation beobachtet. Als Schadensmechanismus werden hier jedoch eher chemische Ursachen in Betracht gezogen, weil sich die Denaturierung durch protektive Zusätze (z. B. Radikalfänger oder reduzierende Substanzen) verringern lässt [80–83].

### 2.3.4 Denaturierung durch Druck

Proteine können auch durch hohen Druck denaturieren [84]. Der Grad der Druckdenaturierung ist dabei temperaturabhängig, und die Proteine können reversibel und irreversibel denaturieren [85, 86]. Hierzu sind allerdings sehr hohe Drücke von mindestens 1.500 bar erforderlich [87, 88]. Die Kavitationsblasen um die laserbestrahlten Goldnanopartikel haben jedoch einen Initial-Blasendruck von höchstens 92 bar (siehe Abschnitt 2.2.1), so dass eine Denaturierung durch den Blaseninnendruck oder die auslaufenden Druckwellen unwahrscheinlich ist.

### 2.3.5 Proteinschädigung durch chemische Reaktionen

**Schädigung durch Lichtabsorption.** Photochemie ist ein weiterer Mechanismus, der zu einer Proteinschädigung führen kann. Das grüne Laserlicht des in dieser Arbeit verwendeten Nd:YLF-Lasers ( $\lambda = 527 \text{ nm}$ ) enthält Lichtquanten der Energie  $E_{\text{photon}} = hc/\lambda = 2,35 \text{ eV}$ . Nach Tab. 2.4 sind diese Lichtquanten energetisch in der Lage, Disulfidbrücken oder N–O-Bindungen aufzubrechen. Weil die meisten Proteine in diesem Wellenlängenbereich jedoch nicht absorbieren, sind Proteinschäden durch eine einfache Lichtabsorption nicht zu erwarten.

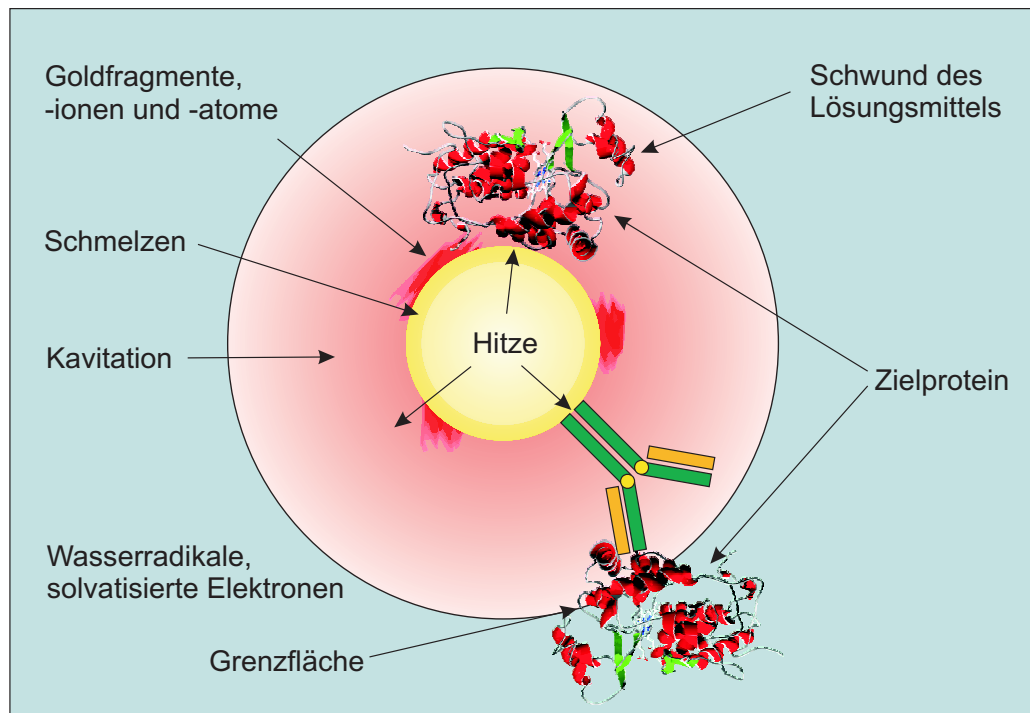
**Schädigung durch Zwei-Photonen-Absorption.** Aufgrund der elektronischen Struktur der Aromaten innerhalb einiger Aminosäuren absorbieren Proteine UV-Licht zwischen 200 und 300 nm [89, 90]. So besitzen Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin ein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum mit einem Maximum zwischen 200 und 230 nm und einem weiteren bei etwa 280 nm. Wenn nun – mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit – in solch einer Aminosäure zwei 527 nm-Photonen gleichzeitig am selben Ort eintreffen, können beide Photonen mit einer resultierenden Gesamtenergie von 4,7 eV (entsprechend einer Wellenlänge 264 nm) von der Aminosäure absorbiert werden. Diese Energiedeposition kann dann zu kovalenten Schäden innerhalb von Proteinen oder zu anderen Effekten wie einer Quervernetzung zwischen zwei Aminosäuren führen [91, 92]. Allerdings müssen diese Schäden nicht unbedingt zu einem Funktionsverlust führen, da das Protein von vielen nichtkovalenten Wechselwirkungen stabilisiert wird. Es kommt darauf an, wo im Polypeptid der Schaden auftritt und wie viele Schäden insgesamt erzeugt werden. Letztlich sind photochemische Schäden durch Zwei-Photonen-Absorption also rein statistischer Natur und nehmen in erster Näherung linear mit der Expositionszeit und quadratisch mit der Bestrahlungsstärke zu.

**Schädigung durch Partikelfragmentierung.** Wenn das Goldpartikel sehr stark erhitzt wird, kann das Partikel fragmentieren oder sogar verdampfen. Bei diesen Prozessen entstehen neben Goldfragmenten, -atomen und -ionen auch solvatisierte Elektronen, welche Proteine schädigen können [57, 93, 94]. Da diese zum Teil chemisch reaktiven Produkte durch die dynamischen Kavitationsblasen-Prozesse im Probenvolumen unspezifisch verteilt werden, können sie auch nicht-lokale Effekte der NALI bewirken.

### 2.3.6 Zusammenfassung der Schadensmechanismen

In Abb. 2.16 sind die Schädigungsmechanismen der Nanopartikel-assistierten Laserinaktivierung von Proteinen nochmal schematisch zusammengefasst. Deren Ausgangspunkt ist zunächst der Temperaturanstieg im Nanopartikel und seiner wässrigen Umgebung. Temperaturen von bis zu 300 °C können bei hin-

reichend langer Wärmezufuhr eine rein thermische Denaturierung der an das Goldpartikel gekoppelten Proteine bewirken. Bei Wassertemperaturen oberhalb der Nukleationsschwelle entsteht eine Dampfblase mit großen Dichteschwankungen und hohen Temperaturen um das Partikel herum. Innerhalb der Kavitationsblase ist kein flüssiges Wasser mehr vorhanden. Dadurch werden die hydrophoben Wechselwirkungen im Protein destabilisiert. Außerdem ist an der Dampfblasenwand noch mit einer Grenzflächendenaturierung zu rechnen. Bei extrem starker Erhitzung bis über den Schmelzpunkt von Gold hinaus können schließlich noch chemische Schäden durch solvatisierte Elektronen und Wasserradikale sowie deren Folgeprodukte erzeugt werden.



**Abbildung 2.16.** Schädigungsmechanismen der NALI.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Goldnanopartikel-Protein-Konjugate

Bereits in den frühen 1960er Jahren wurde kolloidales Gold für elektronenmikroskopische Untersuchungen von biologischen Strukturen eingesetzt [95]. Die hohe Elektronendichte der Goldatome bewirkt einen guten Elektronenmikroskopie-Kontrast und seine chemische Stabilität prädestinieren dieses Material für den Einsatz in der Histologie. Nachdem das kolloidale Gold zunächst ziellos ohne Tracer-Moleküle in Gewebsschnitte mikroinjiziert wurde, um anschließend die Verteilung der Goldpartikel zu untersuchen, wurden ab 1971 die Goldpartikel mit spezifischen Antikörpern beschichtet, um bestimmte Antigen-Regionen innerhalb von biologischen Proben nachzuweisen bzw. sichtbar zu machen [96]. Kurze Zeit später erkannten Wissenschaftler dann, dass sich die Nanopartikel-Antikörper-Konjugate in Kombination mit Silberfärbung sogar als Kontrastmittel für lichtmikroskopische Aufnahmen eignen [97, 98].

#### 3.1.1 Modellproteine

In dieser Arbeit wurden Goldpartikel nicht als Kontrastmittel zur Visualisierung von Gewebsstrukturen, sondern als Absorber für Laserstrahlung mit dem Ziel der Denaturierung gekoppelter Modellproteine eingesetzt. Damit die absorbierte Energie effektiv vom Goldpartikel auf seine Proteinhülle übertra-

gen wird, muss das Nanopartikel-Protein-System mindestens für die Dauer von der Probenherstellung bis zum Bestrahlungsexperiment stabil sein. Andererseits müssen die Proteine auch im gebundenem Zustand katalytisch aktiv bleiben. Die Forderung einer hinreichenden katalytischen Aktivität bei gleichzeitig stabiler Bindung schränkt die Wahl der Testenzyme ein.

Die Bindung von Proteinen an die Goldpartikel gelingt aufgrund von drei Wechselwirkungen [99]:

- Elektrostatische Anziehung zwischen dem negativ geladenen Goldpartikel und einer positiv geladenen Region auf der Proteinoberfläche.
- Hydrophobe Wechselwirkung zwischen Protein und Goldpartikel.
- Koordinative Bindung (Elektronenpaarbindung) zwischen den Leitungselektronen des Goldes und Schwefelatomen, welche in den Aminosäuren Cystein und Methionin auftreten.

Die koordinative Bindung spielt bei den in dieser Arbeit verwendeten Proteinen praktisch keine Rolle, da die Schwefelatome bei diesen nicht an der Proteinoberfläche liegen [100]. Auch die hydrophobe Wechselwirkung ist zunächst eher von untergeordneter Bedeutung, da die Außenseiten der Enzyme und Antikörper sehr hydrophil sind. Allerdings wirkt die hydrophobe WW stabilisierend, nachdem die Bindung aufgrund der dominierenden elektrostatischen Anziehung zustandegekommen ist. Dementsprechend sind positiv geladene Regionen an der Proteinoberfläche eine zwingende Voraussetzung für eine stabile Goldpartikel-Protein-Kopplung.

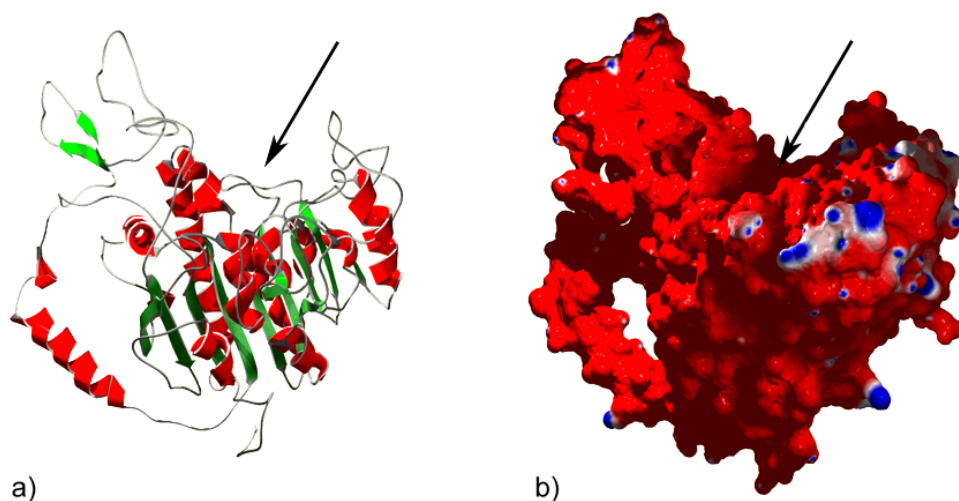
**Alkalische Phosphatase aus der Rinderdarmschleimhaut (AP).** Das hauptsächlich verwendete Modellprotein war die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1), ein Zink und Magnesium enthaltendes, homodimeres Glykoprotein, das der Enzymkategorie der Hydrolasen zugeordnet wird [101]. Es kommt in unterschiedlichen Formen in nahezu allen Lebewesen vor, beginnend beim Bakterium *Escherichia coli* bis hin zum Menschen [102]. In größeren Mengen ist es in Knochen, Darm, Plazenta, Leber und Nieren von Säugetieren zu

finden. Die charakteristische biochemische Funktion dieses hochaktiven Enzyms ist die Entfernung von Phosphat-Gruppen (Dephosphorylierung) bei Proteinen, Nukleotiden und Alkaloiden [103]. In den Lebenswissenschaften findet es eine weit verbreitete Anwendung als Markerenzym für Immunglobuline (Antikörper) in verschiedenen immunochemischen Anwendungen wie ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), Immunoblotting und Immunohistochemie.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde insbesondere die alkalische Phosphatase aus der Darmschleimhaut von Rindern verwendet, im Folgenden nur noch mit AP bezeichnet. Speziell dieses Enzym war gleich aus mehreren Gründen besonders gut geeignet:

- Säugetier-AP besitzt eine 10 – 100-fach höhere Aktivität als bakterielle AP [104].
- Für dieses Enzym existieren spezifische Antikörper (*Rezap*), welche gut an Goldpartikel koppeln.
- Es lässt sich hervorragend an Goldpartikel koppeln, sowohl direkt (Au-AP) als auch über den Rezap-Antikörper (Au-Rezap-AP).
- Es bleibt nach der Kopplung katalytisch aktiv.
- Es ist unter Laborbedingungen einfach zu handhaben und lange haltbar (ca. 1% Aktivitätsverlust pro Woche bei 4 °C Lagerungstemperatur).
- Die Enzymaktivität der Au-(Rezap)-AP-Konjugate ist mit handelsüblichen Substraten und einem optischen Enzymtest einfach, schnell und genau messbar.
- Es ist in sehr reiner Form kostengünstig kommerziell erhältlich.

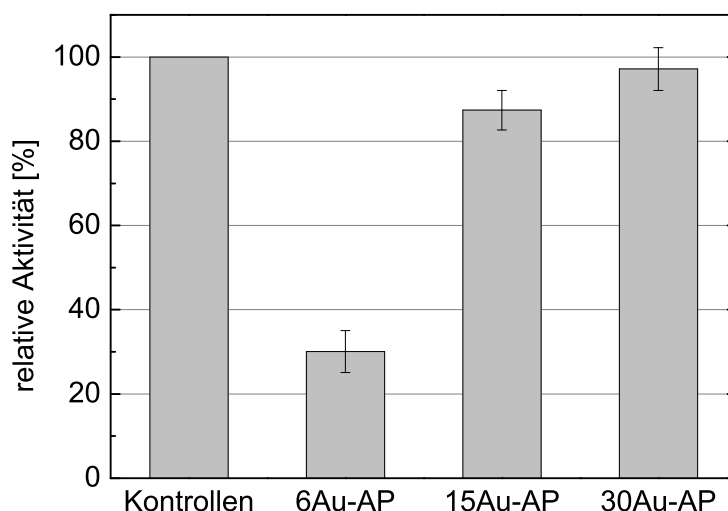
Das Enzym wurde unter der Produktnummer P5521-1KU von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen [105, 106]. Es besitzt lt. Hersteller einschließlich der Kohlenhydratanteile ein Molekulargewicht von etwa 160 kDa, was durch SDS-PAGE



**Abbildung 3.1.** a) Berechnete Struktur des A-Monomers der alkalischen Phosphatase aus der Rinderdarmschleimhaut. b) Gerenderte Oberflächenladung des Proteins bei pH 7. Die kationischen Bereiche (potenzielle Goldpartikel-Bindungsstellen) sind blau dargestellt, die anionischen rot. Der schwarze Pfeil zeigt auf das aktive Zentrum des Proteins, das zwei  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen und ein  $\text{Mg}^{2+}$  enthält.

(*Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*) bestimmt wurde. Es entwickelt seine optimale Aktivität für den Substratumsatz von pN-PP (para-Nitrophenylphosphat) bei pH 9,8 und 37 °C und sein isoelektrischer Punkt (IEP) wurde zu 5,68 berechnet [101, 107].

Leider liegen für dieses Protein bisher keine Strukturinformationen aus Röntgenkristallstrukturanalysen vor. Daher musste die Proteinstruktur theoretisch berechnet werden, um daraus die Abmessungen und die für die direkte Kopplung wichtige Oberflächenladungsverteilung zu erhalten. Für die Berechnung der Proteinstruktur wurde die von WEISSIG *et al.* aus DNA-Analysen bestimmte Aminosäuresequenz herangezogen [108]. Die Primärsequenz wurde dann per Textdatei elektronisch an den GENO3D-Modellrechner geschickt [61, 62]. Dieser suchte nach den in der Aminosäuresequenz ähnlichsten Proteinen mit bekannter Struktur (→ menschliche Plazenta-AP [109]) und berechnete auf dieser Grundlage mittels Energieminimierung die wahrscheinlichste Struktur der gesuchten AP. Anschließend wurden mit diesen Daten mit dem *Swiss-PdbViewer* sowie *POV-Ray* die Tertiärstruktur und Oberflächenladungsverteilung des A-Monomers berechnet, dargestellt in Abb. 3.1.



**Abbildung 3.2.** Relative Enzymaktivität von AP nach Kopplung an 6, 15, und 30 nm Goldpartikel. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit dem in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen optischen Enzymtest.

Für eine detaillierte Strukturbeschreibung von hochkonservierter Säugetier-AP sei auf die Publikation von LE DU verwiesen [109]. Aus der in Abb. 3.1 gezeigten Simulation gehen nur die Abmessungen und die Oberflächenladungsverteilung hervor. Demnach besitzt das Monomer eine Größe von etwa ( $B \times H \times T$ )  $7,5 \times 7,5 \times 5$  nm. Da die beiden Monomere leicht gegeneinander verdreht sind, ergeben sich für das gesamte Homodimer Abmessungen von ungefähr  $15 \times 7,5 \times 8$  nm [109]. Aus der Oberflächensimulation wird ersichtlich, dass das Enzym bei pH 7 ausgeprägte kationische Bereiche besitzt, welche unweit des aktiven Zentrums lokalisiert sind. Dies bedeutet einerseits, dass die Phosphatase gute Bindungsstellen für die anionischen Goldpartikel besitzt, was die hohe Au-AP-Bindungsstabilität erklärt.

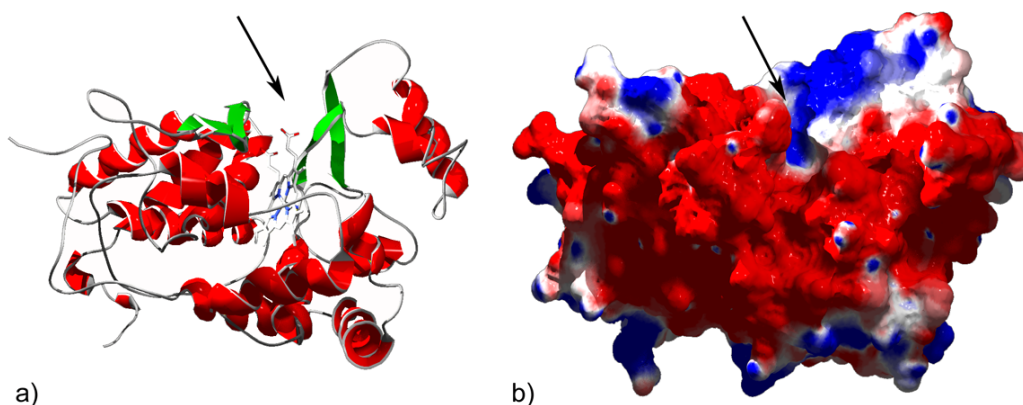
Auf der anderen Seite kann durch die Partikel-Bindung in der Nähe des aktiven Zentrums auch die enzymatische Aktivität der Proteine reduziert werden. So war zu beobachten, dass die AP-Enzymaktivität nach der Konjugation im optimalen Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnis (siehe Abschnitt 3.1.2) geringer war als die Aktivität ungebundener Enzyme mit gleicher Konzentration, gezeigt in Abb. 3.2. Aus dem Diagramm geht hervor, dass die Aktivitätsreduktion mit abnehmender Partikelgröße zunimmt: Von geringen

3% bei 30 nm Partikeln über rund 13% bei den 15 nm großen Teilchen bis hin zu 70% Aktivitätsverlust bei 6 nm Partikeln. Dies liegt möglicherweise daran, dass das elektrische Feld bzw. die elektrostatische Anziehung des Partikels eine Verzerrung der Proteinstruktur nahe des aktiven Zentrums hervorruft und damit eine Hemmung der Enzymaktivität bewirkt. Diese sterische Verzerrung nimmt dann nach Abb. 3.2 mit abnehmender Partikelgröße zu. Denkbar ist auch, dass es aufgrund der geringen Partikelgröße und der hohen Partikeldichte im optimalen Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnis (siehe Abschnitt 3.1.2) zu AP-Au<sub>x</sub>-Mehrfachbindungen (d. h. mehrere Goldpartikel pro Protein) kommt, woraus Einschränkungen der Enzymaktivität resultieren könnten. Da die Aktivität der bestrahlten Proben immer ins Verhältnis zur Aktivität der unbestrahlten Kontrollen gesetzt wurde, spielte die Reduzierung der Enzymaktivität infolge der Konjugation bei den Bestrahlungsexperimenten praktisch keine Rolle.

**Peroxidase aus Meerrettichwurzeln (HRP).** Ein weiteres verwendetes Protein war die Meerrettich-Peroxidase (*peroxidase from horseradish roots*, EC 1.11.1.7), ein monomeres, katalytisch hochaktives Enzym, das Ferriprotoporphyrin IX (Häm) im aktiven Zentrum enthält [110]. Peroxidasen kommen weit verbreitet in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Wirbeltieren vor und oxidieren verschiedenste Substrate unter Reduktion von Wasserstoffperoxid, weshalb dieses Enzym der Kategorie der Oxireduktasen zugeordnet wird [111].

Die verwendete Meerrettich-Peroxidase, im Weiteren mit HRP bezeichnet, wurde aus den Wurzeln der Pflanze *Amaracia rusticana* gewonnen. Sie wurde von Sigma-Aldrich unter der Produktbezeichnung P6140-2KU bezogen [112]. Das Molekulargewicht der HRP beträgt rd. 44 kDa. Es setzt sich zusammen aus 33.890 Da für die Polypeptidkette und ca. 700 Da für die prosthetische Häm-Gruppe einschließlich Ca<sup>2+</sup>-Ion sowie 9.400 Da für gebundene Kohlenhydrate verschiedener Komposition. Seine maximale Aktivität für den Substratumsatz von OPD (o-Phenylendiamin) entfaltet es bei etwa 20 °C zwischen pH 6,0 und 6,5 und sein isoelektrischer Punkt (IEP) wurde zu 6,24 berechnet [107, 111].

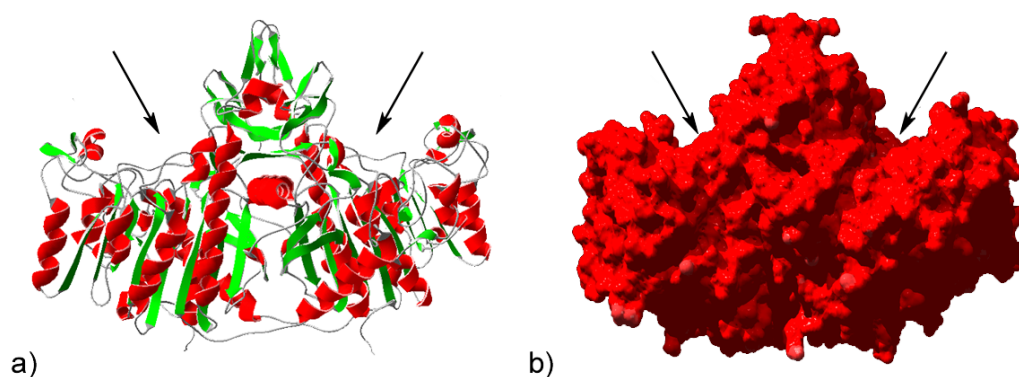
Die Struktur der HRP ist durch Röntgenkristallstrukturanalysen bekannt



**Abbildung 3.3.** a) Struktur der Meerrettich-Peroxidase nach BERGLUND *et al.* [113]. b) Berechnete Oberflächenladung des Proteins bei pH 7, dargestellt mit den kationischen (blau) und anionischen (rot) Regionen. Die schwarzen Pfeile weisen auf das aktive Zentrum des Proteins, das ein Häm-Molekül enthält.

und hier nach *Protein Data Bank* Modell „1H5A“ in Abb. 3.3 wiedergegeben [113, 114]. Nach den Strukturanalysen besitzt das recht kompakte Enzym Abmessungen von etwa (B x H x T) 5,7 x 3,8 x 4 nm. Weiterhin zeigt die Oberflächensimulation die Existenz ausgeprägter kationischer Bereiche, welche sich im Gegensatz zur AP (vgl. Abb. 3.1) aber auf mehrere Orte rund um das HRP-Molekül verteilen. Daher können diese Proteine elektrostatisch an die Goldpartikel koppeln, ohne dass ihre enzymatische Aktivität entscheidend beeinflusst wird. Dies konnte experimentell auch bestätigt werden: Im Gegensatz zur starken Aktivitätsminderung um 70% bei der Kopplung von AP an die 6 nm Partikel wird die HRP-Aktivität nach der Bindung an diese Partikel um lediglich 10% reduziert. Allerdings waren die 6 und 30 nm Au-HRP-Konjugate recht instabil; hier war bereits nach wenigen Stunden eine Aggregation der Goldpartikel zu beobachten.

**Alkalische Phosphatase aus der Darmanhangdrüse von Eismeergarnelen (SAP).** Für einige Kontrollexperimente wurde die thermolabile alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) aus Shrimps (*Pandalus borealis*) verwendet, im Folgenden mit SAP bezeichnet. Dieser Typ der alkalischen Phosphatase, ebenfalls ein hochaktives Homodimer mit Zink und Magnesium im aktiven



**Abbildung 3.4.** a) Struktur der alkalischen Phosphatase aus Shrimps nach DE BACKER *et al.* [59, 118]. b) Die Oberflächenladung des Proteins hat bei pH 7 ausschließlich anionischen Charakter.

Zentrum, wurde ursprünglich aus der Darmanhangdrüse von Eismeergarnelen isoliert [115]. Ihre biologische Funktion entspricht der von AP aus der Rinderdarmschleimhaut, und sie ist enzymatisch ähnlich stark aktiv. Im Gegensatz zur Säugetier-AP wird SAP jedoch nach 15 Minuten Wärmeeinwirkung von 65 °C vollständig irreversibel denaturiert, was dieses Enzym für technische Anwendungen besonders interessant macht [116].

SAP wurde unter der Produktnummer P9088-1KU von Sigma-Aldrich erworben [117]. Die optimale Aktivität für den pNPP-Substratumsatz entwickelt es bei etwa 37 °C zwischen pH 8,0 und 10,4 und der isoelektrische Punkt liegt bei geringen 3,7 [101, 116]. Das Molekulargewicht des gesamten Glykoproteins beträgt lt. SDS-PAGE ca. 155 kDa, das Molekulargewicht der beiden isolierten Polypeptidketten (ohne Kohlenhydrate) beträgt dagegen ungefähr 106 kDa [59, 115].

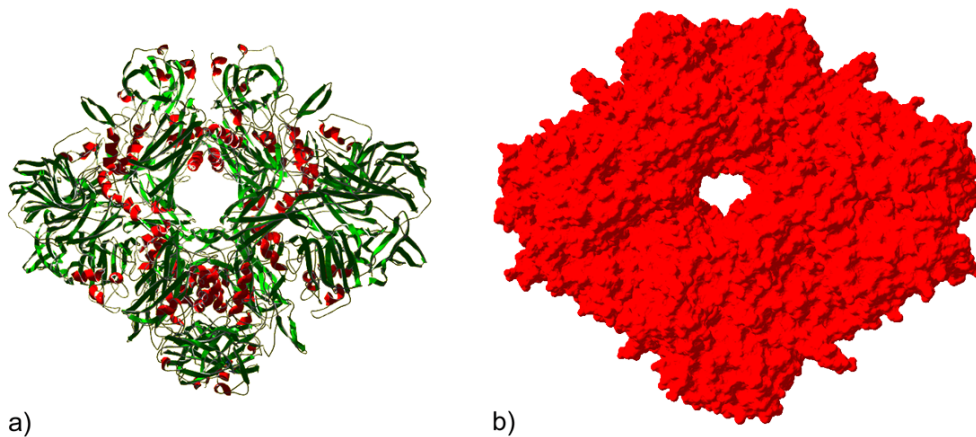
Die Enzymstruktur ist nach *Protein Data Bank* Modell „1SHN“ in Abb. 3.4 wiedergegeben [118]. Das gesamte Protein misst etwa (B x H x T) 9,5 x 6,5 x 5 nm und ist damit etwas kleiner als die Rinder-AP [59]. In seiner Oberflächenladungsverteilung unterscheidet sich SAP erheblich von der Säugetier-AP, denn es besitzt bei neutralem pH-Wert keine kationischen Bereiche, was eine elektrostatische Kopplung mit den Goldpartikeln praktisch unmöglich

macht. Dies wurde durch zahlreiche erfolglose Kopplungsversuche auch bestätigt.

**Beta-Galactosidase aus dem Bakterium *E. coli* ( $\beta$ -Gal).** Wie SAP spielt auch die Beta-Galactosidase (EC 3.2.1.23) in dieser Arbeit eine eher untergeordnete Rolle, da sie ebenfalls eine hochgradig anionische Oberfläche besitzt. Dieses Enzym aus der Gruppe der Hydrolasen, das in unterschiedlicher Form in fast allen Lebewesen vorkommt, katalysiert die Hydrolase von  $\beta$ -Galactosiden zu Monosacchariden [119].

Die in dieser Arbeit verwendete  $\beta$ -Galactosidase aus dem Bakterium *E. coli* wurde unter der Produktnummer G5635-1KU von Sigma-Aldrich bezogen [120]. Das Protein besteht aus vier identischen Untereinheiten mit jeweils 1023 Aminosäuren [121]. Das gesamte Molekulargewicht des Tetramers beträgt etwa 465,4 kDa [122]. Maximale Aktivität für den Substratumsatz von oNPG (O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) entwickelt es bei pH 7,3 und der isoelektrische Punkt liegt bei 7,3 [120].

In Abb. 3.5 ist die Struktur von  $\beta$ -Gal nach *Protein Data Bank* Modell „1F4H“ dargestellt [114, 123]. Das Tetramer hat Abmessungen von etwa 17,5 x 13,3 x 11 nm und bei pH 7 einen anionischen Oberflächencharakter, was auch hier eine stabile elektrostatische Bindung an die Goldpartikel verhindert.



**Abbildung 3.5.** a) Quartärstruktur der  $\beta$ -Galactosidase nach JUERS *et al.* [123]. b) Auch dieses Protein hat bei pH 7 eine ausgesprochen negative Oberflächenladung.

**Rezap- und Mib-1-Antikörper.** Außer den genannten Enzymen wurden noch zwei Antikörper-Typen in einigen Experimenten verwendet: 1. *Rezap* und 2. *Mib-1*. Bei Rezap handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen das CD30-Protein und die alkalische Phosphatase aus der Rinderdarmschleimhaut [124]. Somit fungierte Rezap als spezifisches Bindungsmolekül für AP. Beim Mib-1, im Folgenden als Mib1 bezeichnet, handelt es sich dagegen um einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen das *Ki-67*-Protein [125, 126]. Dieser Antikörper geht keine Bindung mit dem AP-Molekül ein. Mit den aus den Antikörpern gebildeten Konjugaten wurde die Abstandsabhängigkeit der AP-Inaktivierung untersucht. Beide Antikörper-Typen wurden vom Forschungszentrum Borstel, Abteilung für Immunologie und Zellbiologie, bezogen.

### 3.1.2 Konjugation von Goldpartikeln und Proteinen

Alle verwendeten Nanopartikel-Protein-Konjugate wurden nach den Protokollen von Aurion und British Biocell International (BBI), von denen die 6 nm und 15 nm (Aurion) sowie die 30 nm (BBI) Goldpartikel bezogen wurden, hergestellt [127, 128]. Im Folgenden werden die Konjugate, die bspw. aus 6 nm Goldpartikeln und AP bestehen, als 6Au-AP bezeichnet. Konjugate, die aus 15 nm Partikel, den AP-spezifischen Rezap-Antikörpern und AP bestehen, werden 15Au-Rezap-AP genannt. Bei anderen Partikelgrößen und/oder Proteinen ist die Nomenklatur entsprechend angepasst. Bezüglich der Herstellung der Konjugate werden die wichtigsten Sachverhalte nun kurz erläutert, für detailliertere Informationen sei auf [127–130] verwiesen.

**Partikelkonzentrationen.** Laut Hersteller hatten die in dieser Arbeit verwendeten Goldpartikellösungen bei einer Extinktion von  $OD_{520\text{ nm}} = 1$  die folgenden Teilchenkonzentrationen [128, 131]:

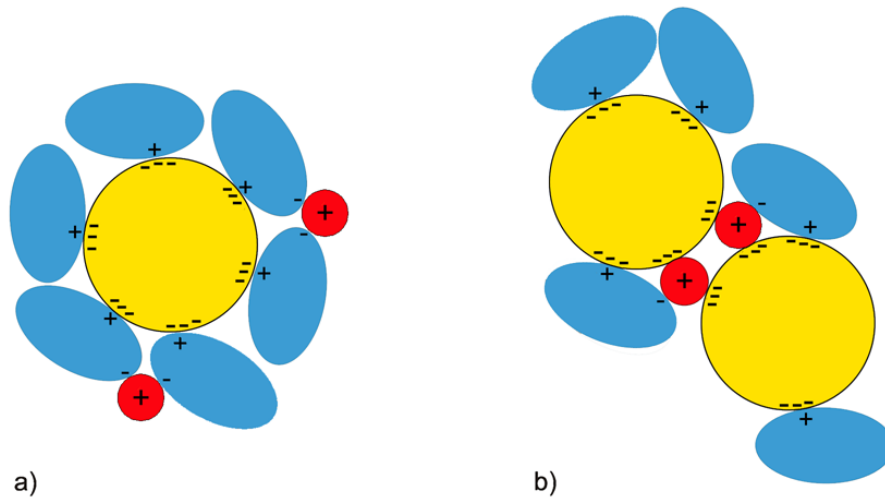
- 6Au:  $2,4 \cdot 10^{13} \text{ ml}^{-1}$ .
- 15Au:  $1,5 \cdot 10^{12} \text{ ml}^{-1}$ .
- 30Au:  $2 \cdot 10^{11} \text{ ml}^{-1}$ .

Mit diesen Goldpartikellösungen wurden alle Konjugate hergestellt.

**Konjugation am isoelektrischen Punkt.** Das Einstellen der Protein- und Goldlösungen auf den isoelektrischen Punkt (IEP) des zu koppelnden Proteins ist für die Konjugation von entscheidender Bedeutung. Am IEP sind gleich viele Aminogruppen des Polypeptids positiv geladen, wie Säuregruppen negativ. Somit ist bei diesem pH-Wert die Summenladung des Proteins praktisch null. Daher findet zwar keine Proteinwanderung in einem äußeren elektrischen Feld mehr statt, das Protein kann sich aufgrund *lokaler* Residuenladungen wohl aber verformen und ausrichten. Überdies erreicht auch die Löslichkeit der Proteine bei elektrostatischer Neutralität ein Minimum, was deren Adsorption an die Goldpartikel stark begünstigt. Werden die auf den IEP eingestellten Protein- und Goldlösungen nun zusammengebracht, gelangen die elektrisch neutralen Proteine durch Diffusion in den lokalen Wirkungsbereich der Nanopartikel, richten sich aufgrund deren elektrostatischer Felder aus und koppeln mit ihren kationischen Oberflächenresiduen an [132].

**Optimales Protein-zu-Goldpartikel Verhältnis.** Qualitativ gute Goldpartikel-Protein-Konjugate sollten einlagig und möglichst gleichmäßig mit Proteinen beschichtet sein, so wie es in Abb. 3.6 a) schematisch dargestellt ist. Dann sind sie verhältnismäßig unempfindlich gegenüber einer Änderung der Ionenstärke in ihrer wässrigen Umgebung. Dagegen aggregieren die Konjugate bei unvollständiger Protein-Bedeckung schnell, wenn positive Ionen zugesetzt werden (siehe Abb. 3.6 b). Diese Aggregation bewirkt eine Veränderung der Lichtabsorption. Dies macht einerseits die Konjugate für den Zweck als Absorber im grünen Spektralbereich unbrauchbar, wird aber andererseits auch gerade dazu ausgenutzt die Mindestmenge an Proteinen zu ermitteln, die für eine einlagige Beschichtung der Goldpartikel gerade ausreicht. Durch Kenntnis der jeweiligen Partikel- und Proteinkonzentration lässt sich das optimale Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnis dann berechnen.

Die Bestimmung der Proteinmenge für die Herstellung eines flächendeckenden Protein-Monolayers wurde für *jede* Protein- und Goldpartikelcharge durchgeführt, da die pH-Werte sowie die Protein- und Partikelkonzentrationen



**Abbildung 3.6.** a) Optimale Kopplung: Das anionische Goldpartikel (gelb) ist flächendeckend von einer einlagigen Proteinschicht (blau) umgeben und bietet positiven Ionen (rot) keine Bindungsmöglichkeit. b) Aggregation: Bei zu geringer Proteinkonzentration verbleibt teilweise noch freie Goldoberfläche. Hier bewirken positiv geladene Ionen eine sofortige Anlagerung benachbarter Goldpartikel.

meist etwas unterschiedlich waren. Die Testreihen wurden dabei in mehreren Stufen durchgeführt, um größtmögliche Genauigkeit zu erreichen. Zunächst wurden 5 ml einer 2 mM Natriumtetraborat-Lösung (Boraxlösung) und 3–5 ml der Aurion- bzw. BBI-Goldlösung mittels Titration geringer Mengen (einige Mikroliter) von 100 mM HCl (pH ↓) und 100 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH ↑) auf den IEP des zu koppelnden Enzyms eingestellt. Anschließend wurden 50–100 µl der Enzym-Stammlösung (Proteinkonzentration 1–2 mg/ml) mit der auf den IEP eingestellten Boraxlösung so verdünnt, dass die Proteinkonzentration genau 0,1 mg/ml betrug. Dann sind die Kammern einer Reihe einer 96-Well-Platte mit je 200 µl der auf den IEP angepassten Goldlösung befüllt und mit zunehmenden Mengen der 0,1 mg/ml-Proteinlösung versehen worden, so wie es in Tab. 3.1 schematisiert ist. Zusätzlich wurden die Kammern mit der auf den IEP eingestellten Boraxlösung so aufgefüllt, dass alle das gleiche Endvolumen hatten. Dann wurden die Lösungen für etwa 20 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationsphase wurden jeder befüllten 96-Well-Kammer 20 µl einer 10%-igen NaCl-Lösung zugesetzt. Die Reaktion der unvollständig be-

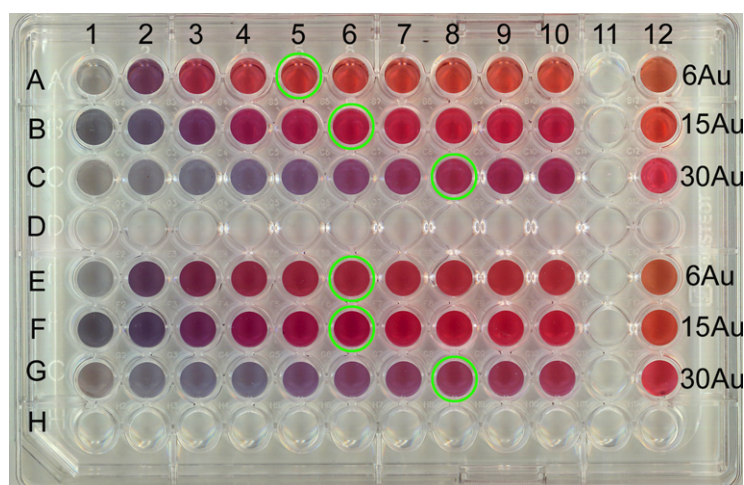
|   | 1     | 2     | 3            | 4            | 5     | 6     | 7     | 8     |
|---|-------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0 µl  | 10 µl | 20 µl        | <u>30 µl</u> | 40 µl | 50 µl | 60 µl | 70 µl |
| B | 15 µl | 20 µl | <u>25 µl</u> | 30 µl        | 35 µl | 40 µl | -     | -     |
| C | 20 µl | 22 µl | <u>24 µl</u> | 26 µl        | 28 µl | 30 µl | -     | -     |

**Tabelle 3.1.** Schema zur visuellen Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration. In den Kammern A1 – C8 einer 96-Well-Platte befinden sich jeweils 200 µl Goldlösung. Die Werte in der Tabelle entsprechen den zugegebenen Mengen von Proteinlösung, die unterstrichenen Werte entsprechen den Mengen, ab denen keine Farbveränderung aufgrund von Partikelaggregation mehr beobachtet wird. Hier wird in drei Genauigkeitsstufen gearbeitet, erst mit 10 µl Inkrement (Reihe A), dann mit 5 µl (B) und schließlich mit 2 µl (C).

schichteten Goldpartikel auf die  $\text{Na}^+$ -Ionen resultierte dann sehr schnell in einem wie in Abb. 3.7 gezeigten Farbumschlag ins Blaugraue. Dabei waren die unterschiedlichen Verfärbungen der einzelnen Kammern selbst bei geringen Proteinmengenänderungen von nur 1 µl so deutlich zu erkennen, dass die Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration mit hoher Genauigkeit visuell erfolgen konnte.

**Finale Konjugation und Stabilisierung mit BSA.** Nach der Bestimmung des optimalen Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnisses, konnte die Probenpräparation beginnen. Je nach benötigter Menge wurden dafür 3–6 ml der auf den IEP des zu koppelnden Proteins eingestellten Goldlösung verwendet. Anschließend wurde unter ständigem Rühren die auf den IEP eingestellte Proteinlösung tröpfchenweise hinzugegeben bis das richtige Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnis erreicht war. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation hatte sich dann ein Protein-Monolayer um die Goldpartikel ausgebildet.

So gut sich die Proteine auch (statistisch) um die Partikel verteilen, es verbleiben trotzdem immer unbedeckte Flächen auf den Goldpartikeln, die bei hinreichender Größe eine Aggregation der neu gebildeten Konjugate bewirken können [127]. Aus diesem Grund wurden der Goldlösung nach der Inkubation mit den Modellenzymen zusätzlich noch 300–600 µl einer 10%-igen, ebenfalls auf den IEP eingestellten, BSA-Lösung (*Bovine Serum Albumin*, Fa. Sigma-Aldrich) hinzugegeben, so dass die finale BSA-Konzentration



**Abbildung 3.7.** Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration bei der Koppelung von AP an unterschiedliche Goldpartikelgrößen. Zur Fehlervermeidung und Qualitätskontrolle wurden die Proben immer doppelt angefertigt, hier mit folgender Belegung der 96-Well-Platte: Reihen A u. E mit 5  $\mu$ l Schrittweite für 6Au-AP, Reihen B u. F mit 1  $\mu$ l Inkrement für 15Au-AP und Reihen C u. G ebenfalls mit 1  $\mu$ l für 30Au-AP. Spalte 1 enthielt reine Goldlösung mit NaCl, Spalte 12 enthielt Goldlösung ohne NaCl. Ab den grün markierten Kammern wurde in Richtung zu höheren Konzentrationen keine Farbänderung mehr beobachtet und die optimalen Proteinmengen gefunden. Hier: 200  $\mu$ l 6Au + 40  $\mu$ l AP<sub>0,1mg/ml</sub>, 200  $\mu$ l 15Au + 13  $\mu$ l AP<sub>0,1mg/ml</sub> und 200  $\mu$ l 30Au + 5  $\mu$ l AP<sub>0,1mg/ml</sub>.

ca. 1% betrug. Während der folgenden zehnminütigen Inkubationszeit konnten die recht kompakten BSA-Moleküle die noch freien Abschnitte auf den Goldpartikeln bedecken und so einen stabilisierenden Schutzfilm bilden.

**Aufreinigung der Konjugate durch Ultrazentrifugation.** Nach der Stabilisierung mit BSA-Proteinen wurden die Konjugate in einer Ultrazentrifuge (CUTL 100, Fa. Beckman) mit folgenden Parametern abzentrifugiert:

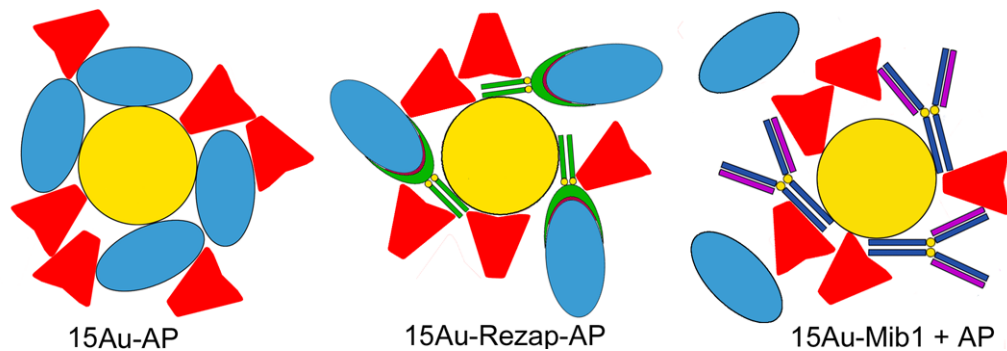
- 6Au-Konjugate: 1 h bei 45.000  $g$  und 4 °C.
- 15Au-Konjugate: 1 h bei 15.000  $g$  und 4 °C.
- 30Au-Konjugate: 30 min bei 12.000  $g$  und 4 °C.

Durch die Zentrifugation werden die Konjugate von den nicht gebundenen Enzymen getrennt. Dies gelingt aufgrund der unterschiedlichen Dichte von

Konjugaten und freien Proteinen. Letztere haben nur ungefähr die Dichte von Wasser und verbleiben nach der Zentrifugation im wässrigen Überstand, während sich die Au-Protein-Konjugate am Boden des Gefäßes zu einem Pellet verdichten (Sediment). Nach der Zentrifugation wurde der wässrige Überstand vorsichtig entfernt und das verbliebene Konjugate-Pellet *auf* eine 20%-ige Glycerollösung aufgetragen und erneut mit den oben angegebenen Parametern abzentrifugiert. Das glycerolhaltige Wasser bewirkt durch seine höhere Viskosität einen höheren Diffusionswiderstand für die freien Enzyme, so dass nach diesem zweiten Aufreinigungsschritt praktisch keine ungebundenen Enzyme mehr im Sediment verbleiben. Nach dem erneuten Entfernen des Überstands lagen die Au-Protein-Konjugate dann schließlich in reiner Form vor.

**Weitere Stabilisierung mit BSA.** Die frisch hergestellten Proben, insbesondere die 6Au- und 30-Au-Konjugate, waren in dieser reinen Form nicht lange stabil. Meist hatten sich nach wenigen Stunden bis wenigen Tagen größere (makroskopisch sichtbare) Gold-Protein-Aggregate gebildet, die nicht mehr wasserlöslich waren. Um die hergestellten Proben haltbarer zu machen, wurden sie mit wenigen Mikrolitern eines BSA-haltigen Lösungsmittels, Puffer A (mit 1% BSA-Gehalt), versetzt.

**Konjugatetypen.** Nach der Herstellung der Konjugate und der Stabilisierung mit BSA sollten die Konjugate die in Abb. 3.8 schematisch dargestellten Charakteristiken aufweisen. Dabei ist anzumerken, dass die Goldpartikel-Antikörper-Konjugate vor den Bestrahlungsexperimenten für etwa eine Stunde mit einer bestimmten Menge AP inkubiert worden sind. Diese Menge wurde jeweils so berechnet, dass jedem AP-Molekül wenigstens 3–4 Antikörper als potenzielle Bindungspartner zur Verfügung standen. Dies gewährleistete, dass bei 15Au-Rezap-AP möglichst wenig freie Enzyme in der Probenlösung verblieben. Während Rezap als Bindungsmolekül zwischen Goldpartikel und AP fungierte, wurde mit den Mib1-Antikörpern die Partikeloberfläche unspezifisch abgesättigt, um eine (direkte) Bindung von AP-Molekülen zu verhindern. Durch die Hinzugabe von AP zu den 15Au-Mib1-Konjugaten wurden



**Abbildung 3.8.** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Konjugatetypen am Beispiel von  $^{15}\text{Au}$  (gelb), den beiden Antikörpern Rezap (grün/braun) und Mib1 (dunkelblau/lila) und AP (blau). Die stabilisierenden BSA-Moleküle sind in Rot dargestellt.

also praktisch ungebundene (quasifreie) Enzyme in einer Goldpartikellösung erhalten ( $^{15}\text{Au}$ -Mib1 + AP; das „+“-Zeichen soll andeuten, dass den  $^{15}\text{Au}$ -Mib1-Konjugaten AP-Moleküle zugesetzt wurden, die jedoch keine Bindung eingingen).

## 3.2 Lasersysteme und Bestrahlungsaufbauten

Zur Untersuchung von Wirkung und Mechanismen der NALI wurden zwei Bestrahlungsaufbauten realisiert, wie sie in ähnlicher Weise auch von RADT *et al.* verwendet worden sind [16]. Für eine präzisere Analyse der Bestrahlungsabhängigkeit der Proteininaktivierung musste die Technik allerdings weiterentwickelt werden; insbesondere wurde der Aufbau durch eine computergesteuerte Strahlabschwächung und einen Probenhalter mit 384 Kammern ergänzt. Die Kombination mit einer programmierbaren 2-Achsen-Schrittmotorsteuerung des Probenhalters ermöglichte dabei einen hohen Automatisierungsgrad mit beträchtlichem Probendurchsatz und sehr guter Reproduzierbarkeit der Messdaten. Für die Erzeugung der Laserpulse wurden zwei Lasersysteme eingesetzt: Ein Nanosekundenpuls-Laser und ein Pikosekundenpuls-Laser. Im Folgenden sind die beiden Lasersysteme samt Bestrahlungsaufbau näher beschrieben.

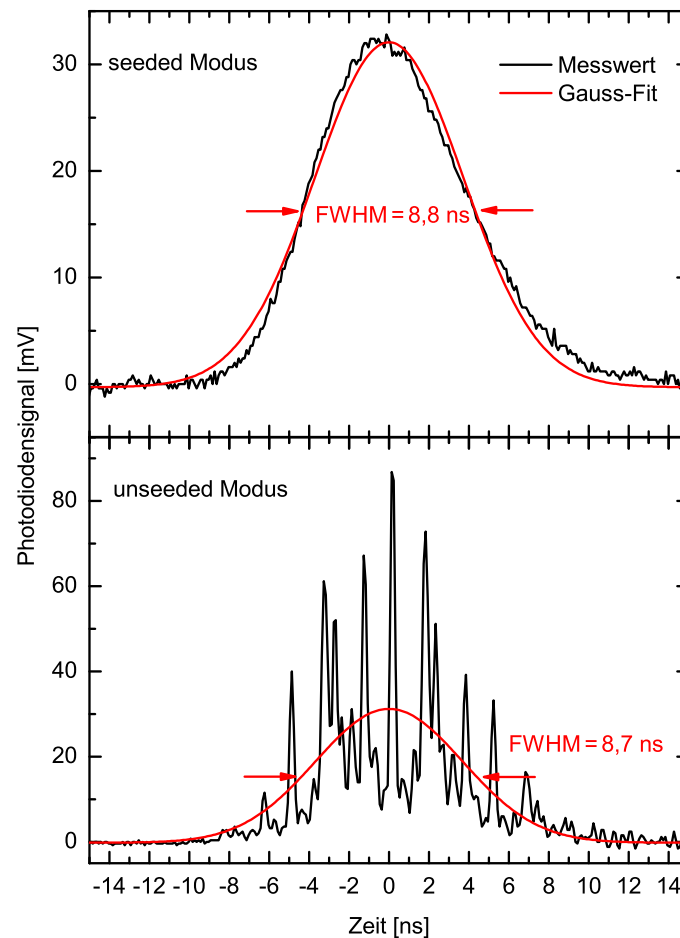
### 3.2.1 Nanosekundenpuls-Bestrahlungsaufbau

**Nd:YAG-IR-Laser.** Als Laserkonsole kam ein geseedeter, gütegeschalteter Nd:YAG-Laser (Quanta-Ray LAB-130, Fa. Spectra-Physics) zum Einsatz, der Laserpulse mit einer Wellenlänge von 1064 nm und einer Linienbreite von  $1 \text{ cm}^{-1}$  erzeugt. Er wurde mit 10 Hz Repetitionsrate betrieben und lieferte dabei eine maximale Pulsenergie von 350 mJ bei einer Puls-zu-Puls-Stabilität von  $\Delta E/E \approx \pm 10\%$ . Die Pulsdauer (FWHM) im Infraroten betrug bei 22 °C Umgebungstemperatur etwa 11 ns. Da sowohl Pulsdauer als auch Pulsenergie mit einer Änderung der Raumtemperatur deutlich variierten, musste diese mit Hilfe einer Klimaanlage stabilisiert werden.

**Zeitliche Pulsform des Nd:YAG-Nanosekundenlasers.** Die in einem Laser anschwingenden longitudinalen Moden sind im freilaufenden Betrieb weitgehend unabhängig voneinander [133]. Sie besitzen statistische und zeitlich schwankende Phasenbeziehungen zueinander. Durch konstruktive und destruktive Überlagerungen der Feldstärkeamplituden kommt es zu starken Intensitätsschwankungen. Dies führt zu einer statistischen, schnellen Modulation der Laserleistung, woraus eine zeitliche Pulsform resultiert, die einer schnellen Abfolge sehr scharfer Intensitätsspitzen (*Spiking*) mit ungleichmäßigen Amplituden entspricht, so wie es in Abb. 3.9 unten gezeigt ist.

Fast alle kommerziellen Nanosekundenpuls-Lasersysteme liefern solche Spiking-Pulse, die lediglich zeitlich gemittelt ein gaußförmiges Profil haben. Derartige Pulsformen mit stark variierenden Spitzenleistungen werden bei Wechselwirkungen mit Nanosystemen mit geringen Wärmekapazitäten und kurzen Relaxationszeiten einen nicht vernachlässigbaren Einfluss haben. Aus diesem Grund wurde für die Bestrahlungsexperimente in dieser Arbeit ein geseedeter Nd:YAG-Nanosekundenlaser verwendet, der nur eine longitudinale Mode emittiert und damit zeitlich gaußförmige Pulse liefert, wie im oberen Diagramm in Abb. 3.9 gezeigt ist.

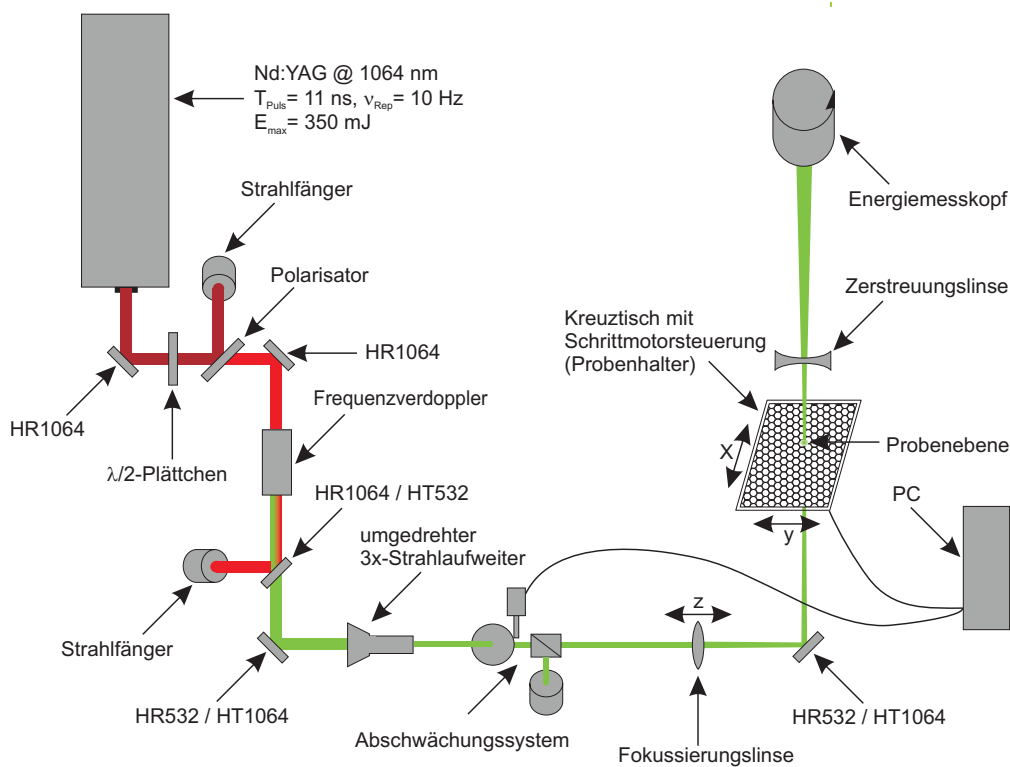
Der zeitliche Verlauf der 532 nm-Laserpulse wurde mit einer ultraschnellen Photodiode (AR-S1, Fa. Antel) und einem 3 GHz-Speicheroszilloskop (TDS 694C, Fa. Tektronix) mit hoher Zeitauflösung (10 GS/s) gemessen. An



**Abbildung 3.9.** Vergleich des zeitlichen Verlaufs von 532 nm-Laserpulsen im geseedeten (oben) und ungeseedeten (unten) Betrieb des Nd:YAG-Lasers.

die Messwerte wurde dann jeweils eine Gaußfunktion angepasst und aus den Fitparametern die Pulsdauer (Halbwertsbreite) berechnet. Sie betrug bei 22 °C Umgebungstemperatur und 10 Hz Repetitionsrate aufgrund der Pulsverkürzung durch die Frequenzverdoppelung etwa 8,8 ns im geseedeten bzw. 8,7 ns im ungeseedeten Modus.

**Abschwächung und Frequenzverdopplung des IR-Laserstrahls.** Für die Bestrahlungsexperimente wurden Laserpulse im Wellenlängenbereich von 527–532 nm benötigt. Hierzu ist ein Frequenzverdoppler in den IR-Strahlen-



**Abbildung 3.10.** Schematische Darstellung des Experimentalaufbaus für die Bestrahlungsexperimente mit Nanosekundenpulsen.

gang integriert worden, wie in Abbildung 3.10 schematisch dargestellt ist. Da eine operative Pulsenergie von 350 mJ zu hoch für einige optische Komponenten (z.B. den umgedrehten Strahlaufweiter) war, wurde der Laserstrahl zunächst mit einem für 1064 nm hochreflektierenden Spiegel (HR1064) in eine erste Strahlabschwächungsanordnung, bestehend aus einem drehbaren  $\lambda/2$ -Plättchen und einem Dünnschichtpolarisator, gelenkt. Je nach Bedarf konnte der transmittierte IR-Laserstrahl mit dieser Anordnung stufenlos auf Pulsenergien zwischen 25 und 50 mJ voreingestellt werden.

Der Laserstrahl wurde dann über einen weiteren HR1064-Spiegel in den Frequenzverdoppler (SHG-25, Fa. Quantel International) geleitet, welcher mit einer Konversionseffizienz von etwa 20 % Laserstrahlen mit einer Wellenlänge von 532 nm und einer Pulsdauer von 8,8 ns produzierte. Um anschließend die 80% IR-Reststrahlung aus dem Strahl herauszufiltern, wurde

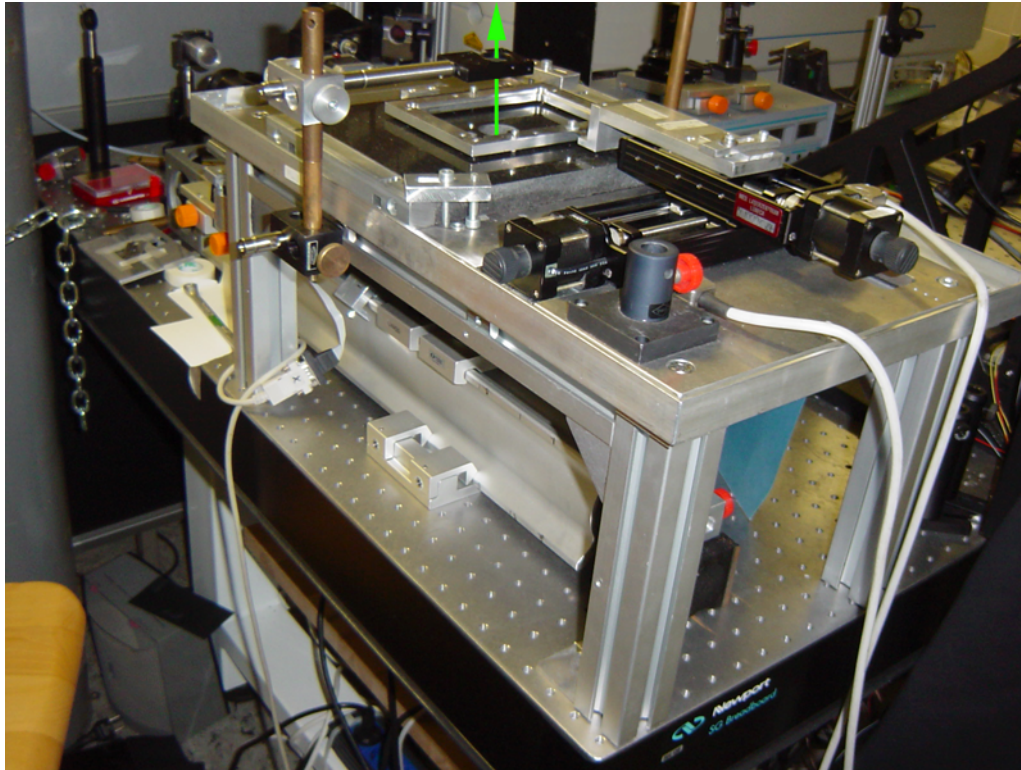
direkt hinter dem Frequenzverdoppler ein für 1064 nm hochreflektierender und gleichzeitig für 532 nm hochtransmittierender Spiegel (HR1064/HT532) angebracht. Die verbliebenen IR-Anteile (ca. 1%), welche der transmittierte Strahl dann noch enthielt, wurden mit einem für 532 nm hochreflektierenden und für 1064 nm hochtransmittierenden Spiegel (HR532/HT1064) herausgefiltert und der 532 nm-Laserstrahl in Richtung Eingangsapertur des automatischen Strahlabschwächungssystems gelenkt.

### **Schrittmotorgesteuerte Abschwächung des 532 nm-Laserstrahls.**

Da die Aperturen des automatischen Abschwächers für den ursprünglichen Laserstrahl nicht groß genug waren, musste der Strahldurchmesser zunächst mit einem umgedrehten 3-fach Strahlaufweiter (3x Beamexpander, 532 nm, Fa. Sill Optics GmbH) verringert werden. Der komprimierte Strahl hatte dann einen Durchmesser von etwa 3 mm. Das Abschwächungssystem selbst bestand aus einem drehbaren  $\lambda/2$ -Plättchen und einem Prismenpolarisator samt Strahlfänger. Eine mittels PC-Schrittmotorkarte (SM30, Fa. OWIS GmbH) und Schrittmotor (Vexta PX245-02AA, Fa. Oriental Motor GmbH) gesteuerte Drehung des  $\lambda/2$ -Plättchens bewirkte dann eine stufenlose Abschwächung der Pulsenergien auf Werte von 0 mJ bis 10 mJ.

Der Vorteil dieser Automatisierung lag in der genauen Reproduzierbarkeit der Pulsenergien während der Bestrahlungsexperimente. Einmal durch eine Energiereferenzmessung am Anfang eines Experimentes kalibriert, konnten die Proben im Probenhalter ohne Unterbrechung mit verschiedenen Pulsenergien bestrahlt werden. Hierdurch konnte der Probendurchsatz um mehr als einen Faktor 10 im Vergleich zu der von RADT verwendeten Anordnung beschleunigt werden [16].

**Universeller Bestrahlungstisch mit Schrittmotorsteuerung.** Zur Bestrahlung von mehreren Proben und zum Abrastern größerer Probenflächen wurden die Proben mit einem computergesteuerten Probenhalter im Laserstrahl verfahren. Die Variation des Strahlquerschnitts, was durch eine in Strahlrichtung verschiebbare Plankonvexlinse ( $f = 300$  mm) erfolgte, ermöglichte in Kombination mit der automatischen Abschwächung die Einstellung



**Abbildung 3.11.** Fotografie der Probestischkonstruktion. Der aufsteigende Laserstrahl, der durch eine Bohrung in der Granitplatte geführt wurde, ist hier mit einem grünen Pfeil angedeutet.

der gewünschten Bestrahlungen in der Probenebene.

Wie Abb. 3.11 zeigt, bestand der Bestrahlungstisch aus einem Aluminiumgerüst mit einer polierten Granitplatte, die eine Bohrung für den Strahldurchlass in der Mitte hat. Direkt unter der Bohrung befand sich ein HR532-Spiegel zur Umlenkung des Laserstrahls in einen vertikalen Verlauf, so dass die Proben von unten bestrahlt werden konnten. Oberhalb der Bohrung befand sich eine Anordnung zur Messung der Pulsenergien. Um eine Zerstörung des Energiemesskopfes (PE25-SH, Fa. Ophir) durch eine zu hohe Bestrahlungsstärke zu verhindern, ist der Strahl mit einer Plankonkavlinse ( $f = 50 \text{ mm}$ ) so aufgeweitet worden, dass die Sensorfläche des Messkopfes vollständig ausgeleuchtet wurde.

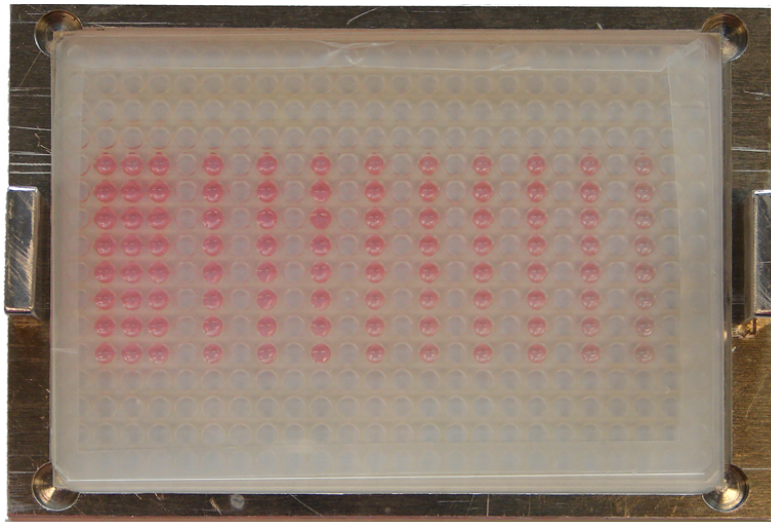
Auf der Granitplatte war eine 2-Achsen-Schrittmotorsteuerung (Fa. Micos) angebracht, die ebenfalls von der SM30-Schrittmotorkarte gesteuert wurde.

de. Mit dieser Anordnung konnte der Probenhalter in der x-y-Ebene stufenlos verfahren werden. Die Steuerung der insgesamt drei Schrittmotoren erfolgte mit einer in LabVIEW (Fa. National Instruments) implementierten Skriptsprache, die aus Steuerbefehlen für die Positionierung der Proben und zur Einstellung der Pulsenergie bestand.

**Der Probenhalter.** Um genaue Messergebnisse zu erhalten, mussten zahlreiche Einzelexperimente mit vielen Kombinationen von Proben und Pulsenergien durchgeführt werden, wobei gleichzeitig immer mehrere Kammern für unbestrahlte Proben (Kontrollen) reserviert wurden. Die Verwendung einer gläsernen 384-Well-Mikrotiterplatte (Fa. mikrogas chemtech GmbH) mit Kammervolumina von 24  $\mu$ l hatte für die Versuchsdurchführung gleich mehrere Vorteile: Wegen des relativ großen Probenvolumens von 18–20  $\mu$ l waren Verdunstung von Probenflüssigkeit während der Bestrahlung und statistische Pipettierfehler praktisch vernachlässigbar; letztere betrugen nur etwa 5%. Außerdem konnten aufgrund des Layouts der Mikrotiterplatte und der Automatisierung bis zu 16 Proben (Reihen) mit 24 verschiedenen Bestrahlungen (Spalten) in einem einzigen Bestrahlungsexperiment bestrahlt werden. Praktisch bewährt hatte sich allerdings die Verwendung von maximal 8 Proben mit jeweils 8–9 Fluenzen sowie drei Kontrollen (für eine höhere Messgenauigkeit), so wie es in Abb. 3.12 demonstriert ist. Diese Anzahl an Proben konnte im Anschluss an ein Bestrahlungsexperiment in eine einzige mit Substrat gefüllte 96-Well-Platte umpipettiert und ausgewertet werden.

### 3.2.2 Pikosekundenpuls-Bestrahlungsaufbau

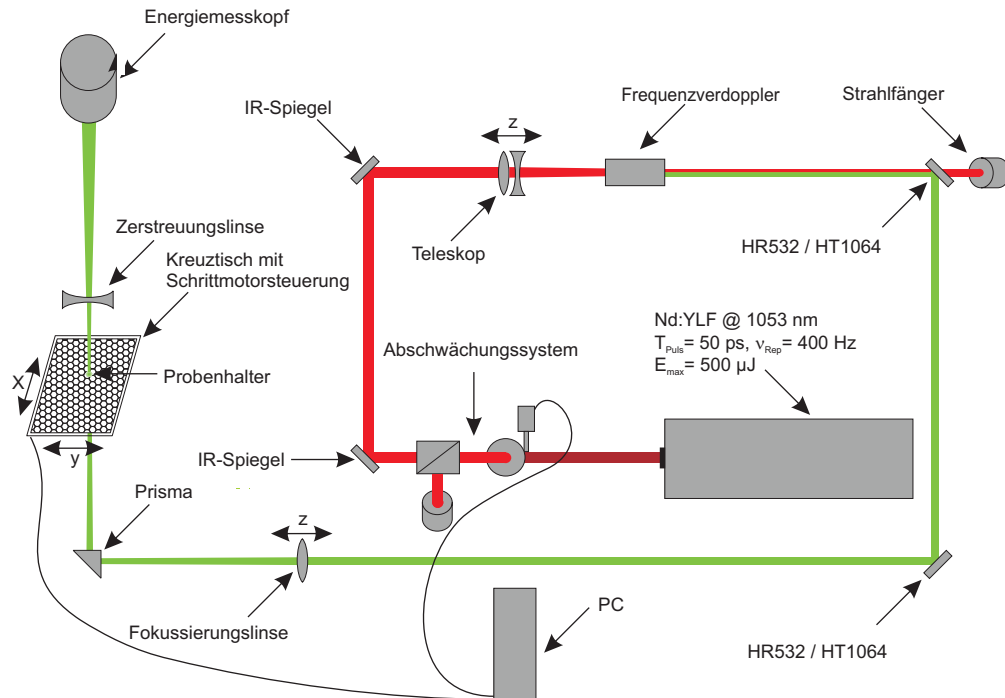
**Modengekoppelter Nd:YLF-Laser.** Als Laserkonsole diente ein modengekoppelter Nd:YLF-Laser (ISL2001, Fa. ISL Laser), welcher Laserstrahlung mit einer Wellenlänge von 1053 nm erzeugte. Der Laser arbeitete mit Repetitionsraten zwischen 100 und 1000 Hz, wobei für die Experimente entweder 400 oder 500 Hz gewählt wurden. Die maximale Pulsenergie im Infraroten betrug etwa 500  $\mu$ J bei einer Pulsdauer von 50 ps und Puls-zu-Puls-Schwankungen von etwa 15%.



**Abbildung 3.12.** Fotografie der 384-well Mikrotiterplatte in der Rahmenkonstruktion für die Befestigung am Bestrahlungstisch. Bei diesem Beispiel wurden 8 Proben (Reihen) mit neun verschiedenen Pulsenergiestufen (Spalten) in einem Bestrahlungsexperiment bestrahlt. In den ersten drei Spalten befanden sich die jeweiligen Kontrollen.

**Zeitliche Pulsform des Nd:YLF-Pikosekundenlasers.** Anders als bei dem gütegeschalteten Nd:YAG-Nanosekundenlaser, bleiben die longitudinalen Moden im Nd:YLF-Resonator des Pikosekundenlasers in einer festen Phasenbeziehung zueinander. Diese Modensynchronisation wird durch die Modulation der Verluste bei der Puls-Auskopplung mittels eines akustooptischen Modulators (AOM) erreicht, dessen Frequenz mit der Umlaufzeit eines Pulses im Resonator synchronisiert ist. Aufgrund der festen Phasenbeziehung besitzen die Pikosekundenpulse zeitlich immer einen glatten gaußförmigen Verlauf [133].

Die Pulsdauer der IR-Pikosekundenpulse wurde experimentell mit einem Autokorrelator zu etwa 50 ps bestimmt. Um der Pulsverkürzung durch die Frequenzverdoppelung Rechnung zu tragen, wurde die IR-Pulsdauer mit einem Faktor  $1/\sqrt{2}$  multipliziert. Demnach betrug die Dauer der 527 nm-Pulse bei 20 °C etwa 35 ps.



**Abbildung 3.13.** Schema des Experimentalaufbaus für die Bestrahlungsexperimente mit Pikosekundenpulsen

**Schrittmotorgesteuerte Abschwächung des IR-Laserstrahls und Frequenzverdopplung.** Der apparative Aufbau für die Pikosekundenpuls-Bestrahlungsexperimente war, wie Abb. 3.13 schematisch zeigt, dem für die Nanosekundenpuls-Bestrahlung sehr ähnlich (vgl. Abschnitt 3.2.1). So kam auch hier der universelle Bestrahlungstisch zum Einsatz. Anders als in dem Nanosekunden-Bestrahlungsaufbau wurde hier der Laserstrahl bereits vor der Frequenzverdopplung computergesteuert stufenlos abgeschwächt, ebenfalls mit einem mittels Schrittmotor (M061-CE02, Fa. Superior Electric) drehbaren  $\lambda/2$ -Plättchen und einem Prismenpolarisator. Nach dem Abschwächer wurde der Laserstrahl dann über zwei IR-Spiegel und ein Teleskop in den Frequenzverdoppler (LBO-Kristall bei 180 °C) gelenkt. Das Teleskop diente dabei zur Verringerung des Strahldurchmessers, um die Bestrahlungsstärke im Frequenzverdoppler zu erhöhen. Optimal justiert wurden so bis zu 30% Konversionseffizienz erreicht. Hinter dem Frequenzverdoppler wurden die ver-

bliebenen IR-Anteile dann durch zwei HR532/HT1064-Spiegel ausgekoppelt und der 527 nm-Laserstrahl in Richtung des universellen Bestrahlungstisches gelenkt. Nach dem Passieren der Plankonvexlinse ( $f = 300$  mm) wurde der Laserstrahl mit einem Quarzglasprisma in die Vertikale umgelenkt. Da die ps-Laserpulse nur eine maximale Pulsenergie von ca. 150  $\mu$ J bei einer Pulsdauer von etwa 35 ps hatten, wurde für die Pulsenergiedetektion am Bestrahlungstisch ein empfindlicherer Energiemesskopf (PE10-SH, Fa. Ophir) verwendet.

### 3.2.3 Bestrahlung der Proben und Dosimetrie

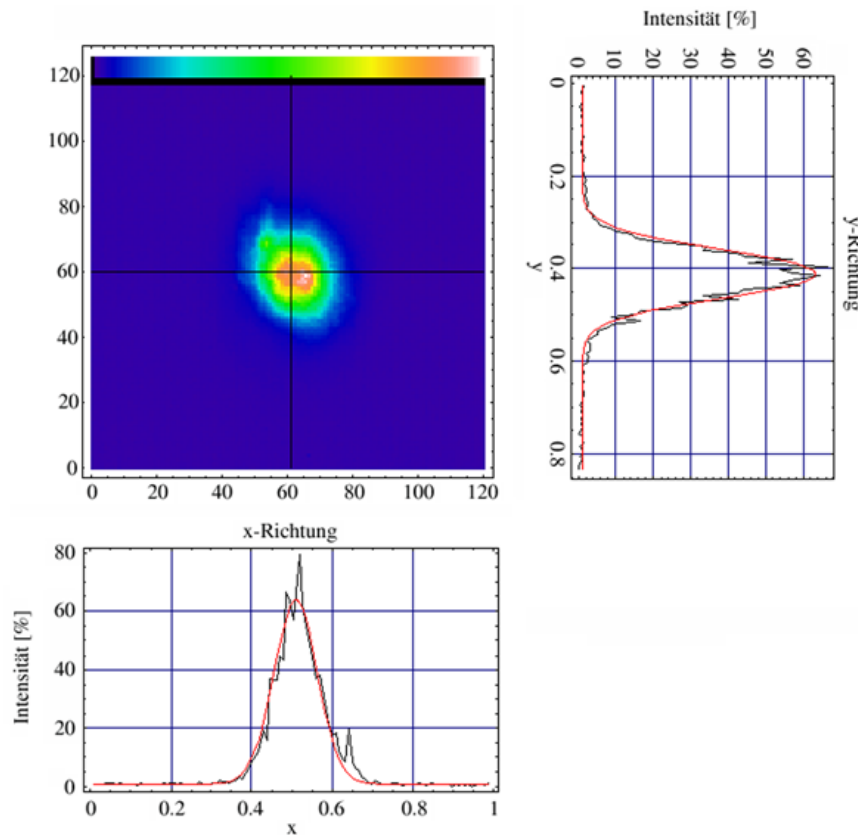
**Räumliche Intensitätsverteilung der Laserstrahlen.** Der Grundmode TEM<sub>00</sub> hat eine besonders einfache, gleichförmige Feldverteilung. Bei Resonatoren mit Hohlspiegeln, wie sie auch bei den hier verwendeten Lasersystemen vorkamen, weist dieser Grundmode quer zu seiner Strahlrichtung ein gaußförmiges Intensitätsprofil auf, weshalb solche Laserstrahlen auch als Gaußstrahlen bezeichnet werden. Ein Vorteil der Gaußstrahlen ist, dass sie auch nach dem Durchlaufen linearer Optiken gaußförmig bleiben. Außerdem ist der Divergenzwinkel des Gaußstrahls deutlich kleiner als z.B. bei einem zylindrischen (*top hat*) Intensitätsprofil.

Beide Lasersysteme waren so konfiguriert, dass sie ausschließlich im TEM<sub>00</sub>-Grundmode arbeiteten. Abhängig von der Betriebstemperatur des Lasers, der Strahlführung und vor allem von variierenden Positionen der Fokussierungslinse wurden bei fast jedem Bestrahlungsexperiment unterschiedliche Gaußverteilungen respektive Strahldurchmesser in der x-y-Ebene der Probe erzeugt. Zur quantitativen Bestimmung der Bestrahlung und zur Qualitätssicherung der Messergebnisse musste daher vor jedem Experiment das räumliche Strahlprofil in der Probenebene neu vermessen werden. Hierzu wurden zwei Methoden angewandt, eine direkte Analyse mit einer CCD-Kamera oder eine Messung des Strahlquerschnitts mit dem Messerschneideverfahren:

- *Strahlprofilmessung mit der CCD-Kamera:* Nach dem Warmlaufen des Lasers und einer starken Abschwächung des Laserstrahls durch einen geeichten Graufilter (OD 4, Fa. Schott) wurde eine Mattscheibe in Form eines weiß beschichteten Objektträgers in der Probenebene positioniert.

Der Laserspot wurde dann von einer CCD-Kamera (DMK 30H12/C oder DMK 21BF04, Fa. The Imaging Source) mit 1:2,8-Fotoobjektiv (Nikkor 28 mm, Fa. Nikon) aufgenommen. Die daraus erhaltenen digitalen Bilddaten (256 Graustufen) wurden anschließend auf einem PC mittels einer in Mathematica (Fa. Wolfram Research) entwickelten Programmroutine ausgewertet. Zur Berechnung des räumlichen Profils wurde dabei die zweidimensionale Gauß'sche Glockenkurve  $f(x, y) = a \cdot \exp\left(-((x - x_0)/\delta x)^2 + ((y - y_0)/\delta y)^2\right) + b$  an die Bilddaten angepasst, so wie es in Abb. 3.14 illustriert ist. Aus den Fitkurven wurden dann die  $1/e$ -Intensitätsabfälle in  $x$ - und  $y$ -Richtung respektive die relativen Strahlradien  $\delta x$  und  $\delta y$  bestimmt. Zusammen mit den Skalierungsfaktoren für die beiden Dimensionen, welche aus einer CCD-Aufnahme einer beleuchteten Lochblende mit definiertem Durchmesser ermittelt wurden, konnten damit die absoluten Strahlradien  $r_x$  und  $r_y$  in der Probenebene bestimmt werden. Daraus ergab sich zusammen mit der gemessenen Pulsenergie  $E$  dann die Bestrahlung im Maximum der Gauß-Kurve zu  $H = E/(\pi r_x r_y)$ .

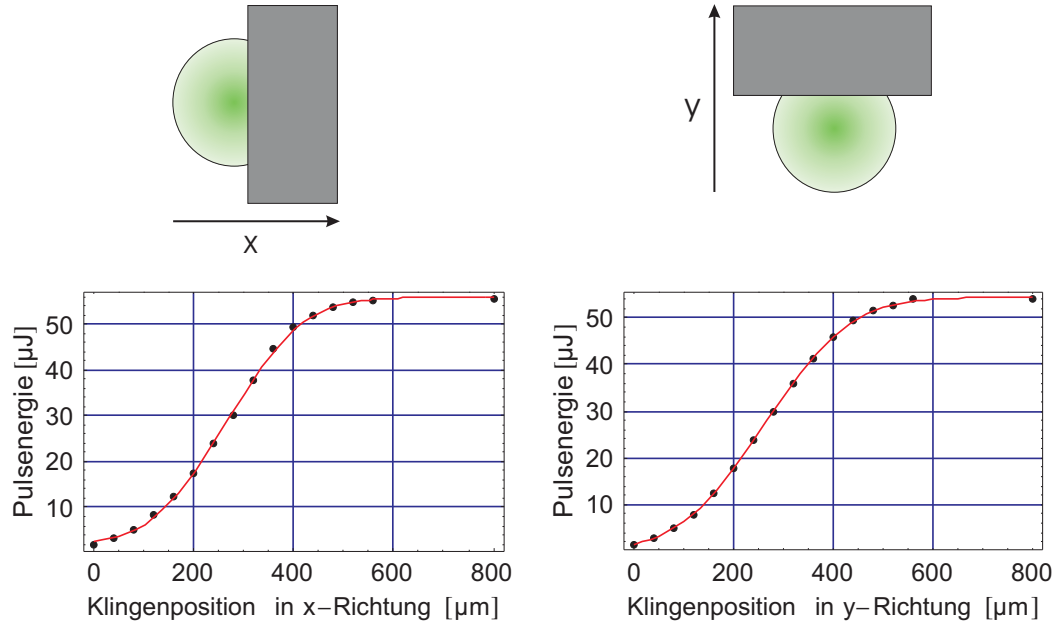
- *Strahlprofilmessung mit der Messerschneide:* Als zweite Methode wurde die Messerschneidentechnik zur Messung der Strahlradien verwendet. Hierzu wurde in der Probenebene eine Rasierklinge in kleinen Schrittweiten (je nach Spotgröße 10 – 100  $\mu\text{m}$ ) unidirektional aus dem Strahl gefahren (gezogen) und dabei die transmittierte Pulsenergie als Funktion der Rasierklingenposition gemessen, so wie es in Abb. 3.15 demonstriert ist. Durch Fit mit dem bei einem eindimensionalen Abschneiden eines gaußförmigen Strahlprofils erwarteten Intensitätsverlaufs,  $E(x) = E_0 \pi r_x^2 (1 + \text{Erf}((x - a)/r_x))/2$ , konnten die Strahlradien  $r_x$  und  $r_y$  jeweils direkt bestimmt und zusammen mit der gemessenen Pulsenergie die Bestrahlung berechnet werden. Da mit dieser Methode die Strahlabmessungen deutlich schneller bestimmt werden konnten, wurde sie meist der CCD-Kamera-Analyse bevorzugt. Mit letzterer wurden allerdings in regelmäßigen Abständen die Messungen mit der Messerschneide verifiziert.



**Abbildung 3.14.** Vermessung des räumlichen Strahlprofils mit einer CCD-Kamera und Softwareanalyse. Hier ist eine Aufnahme des Pikosekunden-Laserspots in der Probenebene in Falschfarben-Darstellung gezeigt. Die gemessenen Intensitätsverteilungen sind in Schwarz und die Fitkurven in Rot dargestellt.

**Scannende Bestrahlung.** Für eine zuverlässige Dosimetrie bei den Bestrahlungsexperimenten war eine möglichst homogene Bestrahlung der Konjugate über das gesamte Probenvolumen erforderlich. Hierbei gab es jedoch einige technische Probleme, die nur näherungsweise gelöst werden konnten:

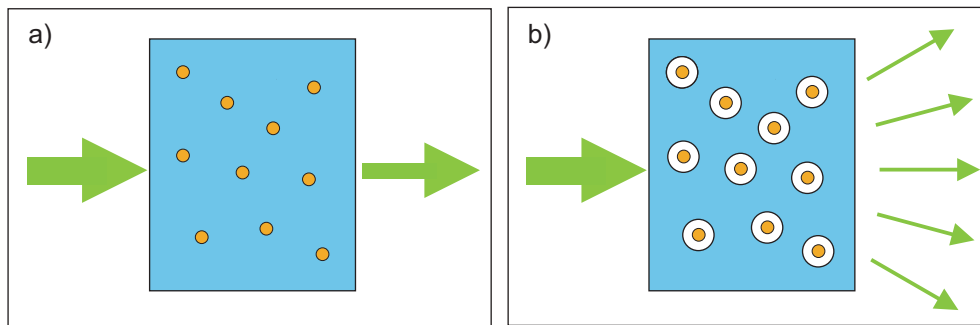
- Durch Absorption der Laserstrahlen in den unteren „Schichten“ der Probe wird die Intensität in den oberen Schichten gemäß dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz  $I = I_0 \cdot e^{-\mu d}$  reduziert ( $I$  ist die Intensität,  $\mu$  der Absorptionskoeffizient und  $d$  die Schichtdicke). Diese Abschätzung der oberen Schichten wurde durch eine geringe Schicht- bzw. Probendicke ( $\leq 1,8 \text{ mm}$ ) und einen hohen Verdünnungsgrad der Proben



**Abbildung 3.15.** Bestimmung des Strahlquerschnittes mit der Messerschneidentechnik. Links wurde die Rasierklinge in 40  $\mu\text{m}$ -Schritten in x-Richtung aus dem Pikosekundenlaserstrahl gezogen, rechts in y-Richtung. Die Messpunkte sind in Schwarz und die Fitkurven in Rot dargestellt.

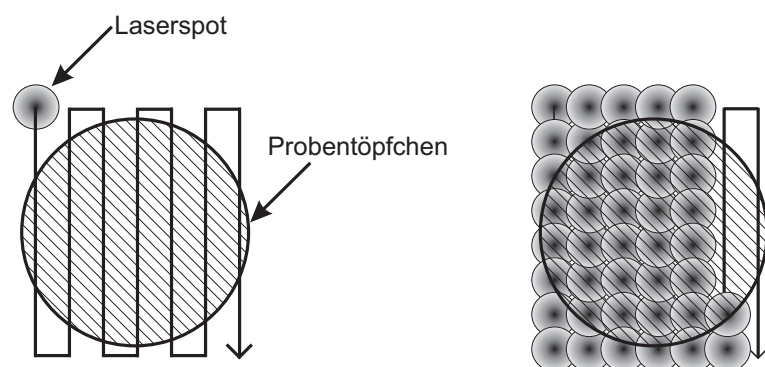
reduziert. Die Verdünnung wurde meist auf  $OD_{520\text{nm}} \simeq 0,4$  eingestellt, so dass nach  $OD = -\log(I/I_0)$  die Lichttransmission durch die 1,8 mm dicke Probe mindestens 85% betrug.

- In Abschnitt 2.2.1 ist beschrieben, dass *während* der Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen eine transiente kollektive Dampfblasenbildung auftritt, wenn die Bestrahlung hoch genug ist. Durch diese kollektive Blasenbildung werden die Streueigenschaften der Partikel verändert, so dass es zu einer optischen Abschirmung der oberen Schichten in der Probe während der Laserpulsdauer kommen kann. Dieser als „*optical limiting*“ bezeichnete Effekt ist in Abb. 3.16 schematisch dargestellt. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass bei der Bestrahlung von Kohlenstoffpartikellösungen mit ns-Pulsen eine signifikante Reduzierung der transmittierten Pulsenergie auftritt [32, 134, 135]. Auch hier waren eine niedrige Probenkonzentration und eine geringe Probentiefe die einzigen Möglichkeiten, diesen Effekt zu minimieren.



**Abbildung 3.16.** Zum Prinzip des *optical-limiting*-Effektes (verändert nach NEUMANN [32]): a) Lineare Absorption der Laserstrahlung. b) Nach Bildung transienter Kavitationsblasen steigt die Extinktion aufgrund der starken Lichtstreuung an den Blasengrenzflächen.

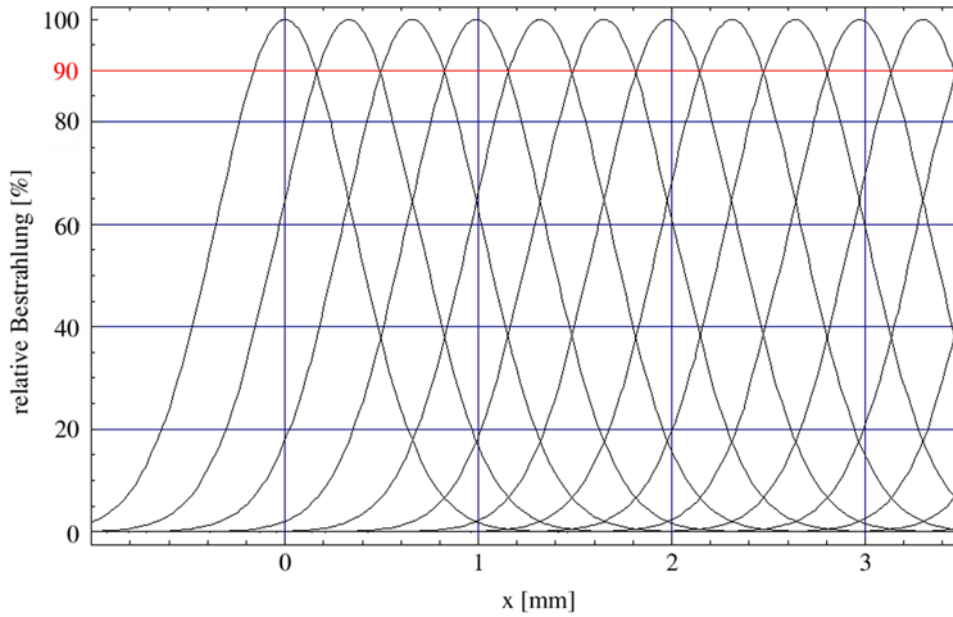
- Eine homogene Bestrahlung der Proben war aufgrund des im Vergleich zum Spotdurchmesser ( $< 1\text{ mm}$ ) großen Probenöpfchendurchmessers ( $3,5\text{ mm}$ ) nicht möglich. Die einfachste und sicherste Methode für eine homogene Bestrahlung wäre eine Strahlaufweitung bis weit über die Probenfläche hinaus mit Nutzung des zentralen Bereichs gewesen, was in etwa einem Rechteck- oder Zylinderprofil entspricht. Diese Methode scheiterte allerdings an den hohen erforderlichen Bestrahlungen von bis zu  $\sim 200\text{ mJ/cm}^2$  bei ps-Bestrahlung und  $\sim 1000\text{ mJ/cm}^2$  bei ns-Bestrahlung. Derart hohe Fluenzen konnten mit den zur Verfügung stehenden Pulsenergien von  $10\text{ mJ}$  bei ns-Pulsen und  $150\text{ }\mu\text{J}$  bei ps-Pulsen nur durch eine entsprechende Fokussierung des Laserstrahls erreicht werden. Damit trotz der kleinen Spotgrößen die gesamte Probenfläche bestrahlt werden konnte, mussten die Proben, wie in Abb. 3.17 demonstriert, vom Laserstrahl überlappend abgerastert werden. Dies hatte zur Folge, dass jeder Ort im Probenvolumen mit mehreren Laserpulsen unterschiedlicher Fluenz bestrahlt wurde, was eine exakte Dosimetrie erschwert. Denn die NALI-Wirkung hängt neben Pulsdauer, Pulsform und Bestrahlung auch von der Zahl der applizierten Laserpulse ab [16]. Um dennoch reproduzierbare Bestrahlungsexperimente durchführen zu können, wurden die Steuerbefehle für den 2-Achsen-Schrittmotor des Probenhalters dem räumlichen (gaußförmigen) Profil des Laserspots



**Abbildung 3.17.** Scanmuster (Draufsicht): Der Probenhalter wurde während der Bestrahlung mäanderförmig durch den Laserstrahl gefahren, um die gesamte Probenfläche auszuleuchten. Eine lange Bahn (x-Achse, senkrecht dargestellt) entspricht dabei einer Pulsbahn. Die Puls-zu-Puls-Abstände werden hier bei fester Repetitionsrate allein durch die Geschwindigkeit des x-Achsen-Schrittmotors bestimmt. Die Pulsbahn-zu-Pulsbahn-Abstände (y-Achse, horizontal dargestellt) werden dagegen durch Positionierung des Probentisches mit dem y-Achsen-Schrittmotor erzeugt.

und der Repetitionsrate des Lasers bei jedem Experiment individuell so angepasst, dass jeder Ort in der Probe wenigstens einen Laserpuls mit einer Bestrahlung von mindestens 90% des Spitzenwertes erhielt (siehe Abb. 3.18). Da die thermophysikalischen Effekte der NALI hauptsächlich von den Spitzenwerten der Bestrahlung verursacht werden, sollte der Fehler bei der Dosimetrie dementsprechend höchstens 10% betragen.

Eine andere Möglichkeit zur homogenen Bestrahlung der Proben wäre z.B. die Verwendung von kleinsten Probenvolumen (Nanoliterbereich) gewesen. Entsprechende Untersuchungen hatte RADT in seiner Arbeit durchgeführt [16]. Der technische Aufwand hierzu ist jedoch sehr hoch, denn Nanoliter-Proben müssen in Klimakammern bestrahlt werden, weil die geringen Probenmengen ansonsten schnell verdunsten [16]. Außerdem hat sich gezeigt, dass die statistischen Fehler bezüglich der Enzymaktivitätsbestimmung beim Pipettieren von kleinsten Probenmengen relativ groß werden. So wurden am Anfang dieser Arbeit noch Probenvolumen von jeweils 3  $\mu\text{l}$  in einer 18-Well-Platte bestrahlt. Diese Probenmengen waren für eine genaue Analyse der Enzymaktivitäten



**Abbildung 3.18.** Simulation des Scanmusters in x-Richtung (Seitenansicht): Die Geschwindigkeit des Schrittmotors für die x-Achse des Probenhalters wurde der räumlichen Intensitätsverteilung des Laserspots und der Repetitionsrate des Lasers derart angepasst, dass jeder Ort mindestens eine Bestrahlung von 90% des Maximalwertes erhält.

jedoch nicht ausreichend, so dass der in Abb. 3.12 gezeigte Probenhalter mit 18  $\mu\text{l}$  Probenvolumen pro Kammer in Kombination mit der rasternden Bestrahlung verwendet wurde.

- Als letztes wird noch die Diffusion (*Brownsche Bewegung*) der Goldpartikelkonjugate in ihrer wässrigen Umgebung betrachtet. Während des Abrasterns können unbestrahlte Konjugate in bereits bestrahlte Regionen diffundieren und umgekehrt. ALBERT EINSTEIN hat 1905 gezeigt, dass die mittlere quadratische Verschiebung  $\lambda^2$  eines Teilchens durch  $\lambda^2 = \Delta t k_B T (3r\pi\eta)^{-1}$  berechnet werden kann [136]. Hierbei sind  $k_B = 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $r$  der Partikelradius,  $\eta$  die dynamische Viskosität und  $\Delta t$  das betrachtete Zeitintervall. Da kleinere Partikel weiter diffundieren können als größere ( $\lambda \sim 1/\sqrt{r}$ ), sind hier nur kurz die Ergebnisse aus den Berechnungen für die 6 nm großen Partikel angegeben: Während eines

10 ns dauernden Laserpulses könnten die 6 nm Partikel theoretisch eine Diffusionsstrecke von maximal 38  $\mu\text{m}$  zurücklegen, zwischen zwei Pulsen (x-Achse, 10 Hz Repetitionsrate) höchstens 120 nm und zwischen zwei Pulsbahnen (y-Achse, ca. 15 s pro Zyklus) maximal 1,5  $\mu\text{m}$ . Bei Strahlradian oberhalb von wenigstens 180  $\mu\text{m}$  können diese Strecken jedoch vollkommen vernachlässigt werden.

### 3.3 Versuchsdurchführung und Auswertung

In diesem Abschnitt wird zunächst der praktische Ablauf der Bestrahlungsexperimente erklärt, gefolgt von einer Beschreibung der Auswertung der bestrahlten Konjugate mittels eines photometrischen Enzymtests. Am Ende dieses Kapitels wird dann noch kurz beschrieben, wie aus den Daten des Enzymtests die relativen Enzymaktivitäten bestimmt wurden.

#### 3.3.1 Experimentelle Durchführung

**Sterile Anfertigung und Verarbeitung der Proben.** Für jedes Experiment wurden die Nanopartikel-Protein-Konjugate nach der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Methode neu angefertigt oder zumindest durch Ultrazentrifugation frisch aufgereinigt. Dabei wurde bei der Herstellung der Konjugate und ihrer weiteren Verarbeitung sehr auf die Sauberkeit bzw. Sterilität aller verwendeten Materialien und Werkzeuge geachtet, da schon kleinste Verunreinigungen zu Störungen bei der Konjugation oder zu fehlerhafter Enzymkinetik führen können. Die Proben wurden daher stets in einer Sterilbank (BSB6A, Fa. Gelaire) angefertigt.

**Einstellung der Probenkonzentration.** Unmittelbar vor der Durchführung der Bestrahlungsexperimente wurden wenige  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Konjugatesuspension mit etwa 1 ml Natriumphosphatpuffer (PBS ohne Ca und Mg bei pH 7,2, Fa. PAA Laboratories GmbH) so verdünnt, dass die fertige Probenlösung bei einer Wellenlänge von 520 nm eine OD von 0,4 (bei 1 cm Probendicke) hatte, gemessen mit einer Quarzglasküvette (Fa. Hellma

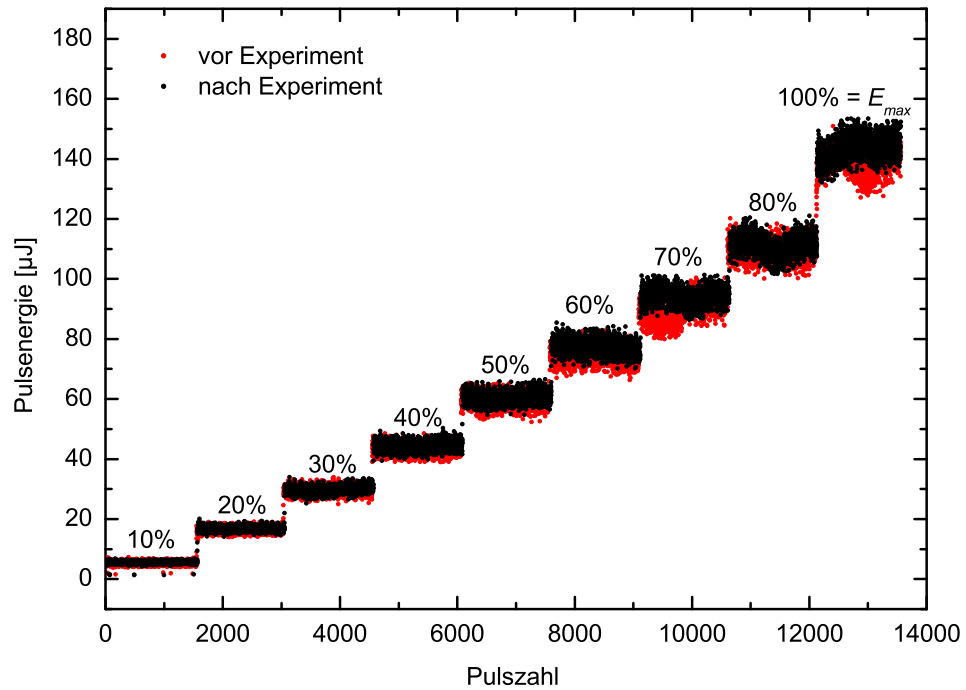
GmbH) und einem Spektrometer (UV/VIS Spectrometer Lambda 14P, Fa. Perkin Elmer). Diese Messung wurde konsequent vor jedem Bestrahlungsexperiment durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Proben bei einer Schichtdicke von etwa 1,8 mm eine identische Lichttransmission von 85% aufweisen und somit keine größere Enzymaktivität in höheren Probenschichten durch Lichtabschattung (s. o.) verbleibt.

**Reinigung des Probenhalters.** Nach Fertigstellung der Proben erfolgte die sorgfältige Reinigung der 384-Well-Platte. Diese wurde zuerst gründlich mit einer Zahnbürste und 2%-iger Hellmanexlösung (Spezial-Reinigungskonzentrat, Fa. Hellmanex GmbH) gewaschen, dann mit 70%-iger Ethanollösung gespült und anschließend noch mit bidestilliertem Wasser gespült. Zum Schluss erfolgte noch die Trocknung mit gereinigter Druckluft. Bei stärkeren Verunreinigungen wurden diese Reinigungsschritte mehrfach durchgeführt.

**Messung der Laserstrahlparameter und Berechnung des Scanmusters.** Nach einer ein- bis zweistündigen Warmlaufphase des Lasers wurden Intensitätsverteilung und Pulsenergie des Laserstrahls geprüft. Dann wurden die Strahlradien nach einer der beiden in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Methoden ermittelt, wobei meist die Messerschneiden-Technik bevorzugt wurde. Bei einer Änderung des Strahldurchmessers, bei Störungen im Strahlprofil oder bei zu geringer Pulsenergie mussten die Strahlführung und/oder der Laser nachjustiert und anschließend das Strahlprofil erneut vermessen werden.

Aus den Laserstrahlparametern wurden dann die Steuerparameter für die 2-Achsen-Schrittmotorsteuerung des Probenhalters nach den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Anforderungen berechnet. Gleichzeitig sind dabei die Steuerungsparameter für den Schrittmotor des Abschwächers so programmiert worden, dass bis zu 9 verschiedene Bestrahlungsstufen während eines Experimentes appliziert werden konnten, bspw. mit 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% und 100% der Pulsenergie (vgl. Abb. 3.12).

**Kalibrierung der Pulsenergien.** Als nächstes wurde ein Bestrahlungsdurchgang mit gekürzten Steuerungsparametern simuliert und dabei die an-



**Abbildung 3.19.** Messung der Abschwächung der Pikosekundenlaser-Pulsenergie unmittelbar vor (rot) und nach (schwarz) einem Bestrahlungsexperiment.

steigenden Pulsenergiestufen gemessen. Dazu wurden die Steuerungsparameter auf jeweils 6 Pulsbahnzüge pro Bestrahlungsstufe reduziert und damit das Programm gestartet. Während dieses Durchlaufes wurden die gemessenen Pulsenergien ununterbrochen aufgezeichnet.

Nach dem Bestrahlungsexperiment wurde die gleiche Prozedur noch einmal durchgeführt und die Messdaten von vor und nach dem Experiment miteinander verglichen, so wie es in Abb. 3.19 gezeigt ist. Wenn die Mittelwerte der einzelnen Pulsenergiestufen hierbei um mehr als 10% voneinander abweichen, wurde das gesamte Experiment verworfen. Bei deren Übereinstimmung wurde angenommen, dass auch während des Bestrahlungsexperimentes die entsprechenden Bestrahlungen appliziert worden sind.

**Befüllen des Probenhalters und Bestrahlung.** Nach der Pulsenergiekalibration wurde die 384-Well-Mikrotiterplatte, wie in Abb. 3.12 illustriert, mit den Proben befüllt. Dabei sind verschiedene Proben mit einem Volumen von je 18 µl pro Kammer in jeweils eine Reihe gefüllt worden. Meist wurden insgesamt 12 Spalten befüllt, von denen die ersten 3 nicht bestrahlt wurden (Kontrollen). Die anderen 9 Spalten wurden dann mit den ansteigenden Pulsenergiestufen bestrahlt. Mit dieser Probenmatrix aus höchstens 8 Reihen (8 Proben) und 12 Spalten konnte beim nachfolgenden optischen Enzymtest genau eine 96-Well-Platte komplett ausgenutzt werden.

Nach dem Befüllen wurde die 384-Well-Platte mit einer Dichtung aus Teflonfolie versehen und mit einem Deckglas verschlossen. Dies verhinderte eine Verdunstung des Probenmaterials während des Bestrahlungsexperimentes. Anschließend wurde der Probenhalter vorsichtig am Probenstisch befestigt und der Startpunkt des Probenhalters (Well A-1) durch manuelles Justieren der Schrittmotoren eingestellt. Dann wurde das Bestrahlungsexperiment gestartet. Abhängig von den Strahlparametern und je nach Anzahl der applizierten Bestrahlungsstufen dauerte ein Bestrahlungsexperiment zwischen 1,5 und 3 Stunden. Unmittelbar nach dem Experiment wurden der Probenhalter entfernt und dann nach den o.g. Methoden nochmals die Pulsenergiestufen gemessen (siehe Abb. 3.19).

**Enzymaktivitätsmessung mittels photometrischem Test.** Nach der Bestrahlung der Proben wurden die Kammern einer transparenten 96-Well-Platte unter sterilen Bedingungen mit jeweils 150 µl Substrat befüllt. Dabei wurden folgende Substrate verwendet (alle in dieser Arbeit verwendeten Substrate wurden bei Sigma-Aldrich gekauft; für deren exakte Zubereitung und die Berechnung der absoluten enzymatischen Kinetik aus der Farbreaktion sei auf die jeweilige Produktbeschreibung von Sigma-Aldrich verwiesen [105]):

- para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Nachweismittel für AP und SAP. Das pNPP wurde unter der Produktnummer N9389 von Sigma-Aldrich bezogen und gemäß Anleitung in einer Gebrauchskonzentration von 1 mg/ml hergestellt.

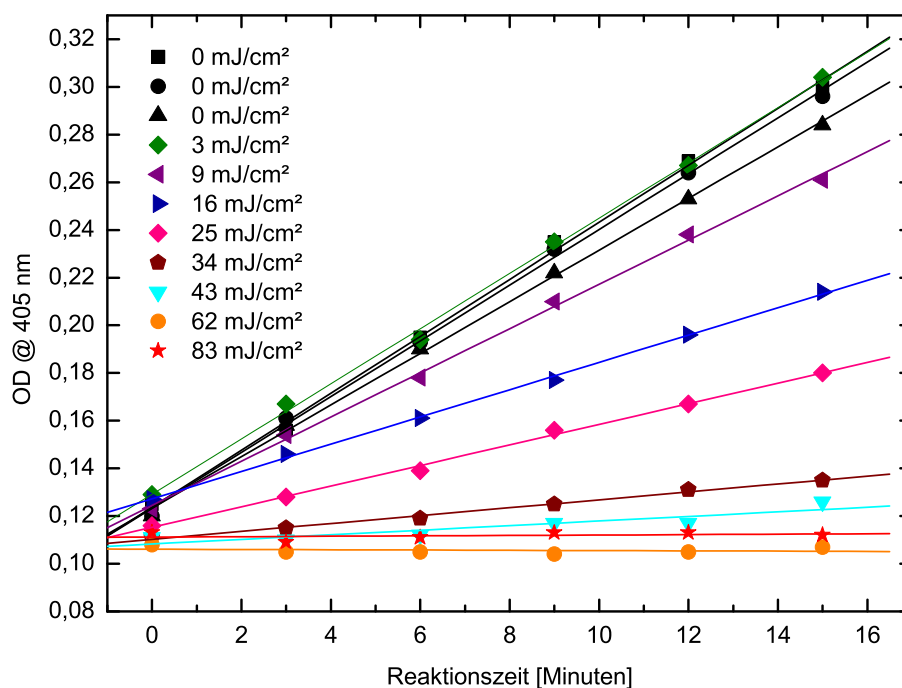
- ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (oNPG) für  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Reagenz mit der Produktnummer N1127 wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml angefertigt.
- o-Phenylendiamin (OPD) als Nachweismittel für die Meerrettich-Peroxidase. Es wurde unter der Produktnummer P9187 bezogen und in einer Gebrauchskonzentration von 0,4 mg/ml hergestellt.

Direkt nach dem Befüllen der 96-Well-Platte mit Substrat wurden aus den Probenpipetten der bestrahlten 384-Well-Platte jeweils 10  $\mu$ l Probenmaterial entnommen und in die Kammern der 96-Well-Platte umpipettiert. Hierzu wurde eine 8-fach Pipette (8x Finnpiquette, 2–10  $\mu$ l, Fa. Thermo Scientific) verwendet. Danach wurden die enzymatischen Farbreaktionen in mindestens 5 gleichmäßigen Zeitabständen mit einem *ELISA-Reader* (Microplate Reader EL312e, Fa. Bio-Tek Instruments) gemessen. Zwischen den Messungen musste die 96-Well-Platte dunkel und im Falle der AP-Aktivitätsmessung bei 37 °C gelagert werden, da die Substrate lichtempfindlich sind und AP erst bei Körpertemperatur seine optimale Aktivität entfaltet.

In Abb. 3.20 ist das Ergebnis einer solchen enzymoptischen Messreihe nach einem Bestrahlungsexperiment exemplarisch gezeigt. Das Diagramm zeigt deutlich die unterschiedlich starken enzymatischen Reaktionen, welche idealerweise zeitlich linear verlaufen. Die 3 Kontrollen (schwarz) sowie die mit lediglich 3 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlte Probe (grün) zeigen erwartungsgemäß die höchsten Enzymaktivitäten. Die Steigungen der Regressionsgeraden nehmen dann mit zunehmender Bestrahlung respektive sinkender Enzymaktivität ab. Hierbei wird deutlich, warum die absolute Aktivität bei diesem Verfahren keine Rolle spielt: Es kommt nur auf die *Steigung* der jeweiligen Geraden an, welche bei konstanter Proteinkonzentration ausschließlich von der Enzymaktivität abhängt. Der Mittelwert der Steigungen von 3 Kontrollen definiert die maximale Proteinaktivität (100%), die Steigungen aller anderen Ausgleichsgeraden (bestrahlte Proben) werden dann auf diesen Wert normiert.

### 3.3.2 Auswertung mit Microsoft Excel

Für jede Probe eines Bestrahlungsexperimentes wurde eine Auswertung nach Abb. 3.20 durchgeführt. Dazu wurde eine Routine in Microsoft Excel programmiert, mit der die Rohdaten des ELISA-Readers (die gemessenen optischen Dichten) bequem weiterverarbeitet werden konnten. Nach dem Einlesen der Daten in die Excel-Maske wurde das Experiment zunächst auf Plausibilität geprüft, d. h. die Messwerte mussten in etwa den in Abb. 3.20 gezeigten linearen Verlauf besitzen. Bei nichtlinearen Kurvenverläufen oder starken Schwankungen der Einzelmesswerte (variierende Absorption durch Bläschen im Substrat in der 96-Well-Platte) wurde das Experiment bzw. die jeweilige Probenanalyse verworfen. Ansonsten wurden die Ausgleichsgeraden wie in Abb. 3.20 mit Excel berechnet und die Steigungen der bestrahlten Proben auf die dazugehörigen Kontrollen normiert. Zusammen mit den Ergebnissen aus den o. g. Messungen der Pulsenergiestufen und Strahlradian wurden dann die relativen Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der applizierten Bestrahlung erhalten.



**Abbildung 3.20.** Mit dem optischen Enzymtest bestimmte Enzymkinetik einer 15Au-AP-Probe nach einem Bestrahlungsexperiment mit 35 ps-Pulsen. Die x-Achse entspricht der Reaktionszeit der Enzyme mit dem Substrat bei 37°C. Die y-Achse beschreibt die gemessene Lichtabsorption bei 405 nm. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Messungen betrugen hier jeweils 3 Minuten. Für eine gute Statistik wurde die 96-Well-Platte insgesamt 6 mal ausgelesen. Diese Probe wurde mit 8 unterschiedlichen Fluenzen bestrahlt.

# Kapitel 4

## Experimentelle Ergebnisse

### 4.1 Voruntersuchungen

In diesem Kapitel sind die experimentellen Ergebnisse aus den Untersuchungen in dieser Arbeit präsentiert. Bevor jedoch die Resultate zur bestrahlungsabhängigen Enzyminaktivierung vorgestellt werden, sind zunächst ein paar grundlegende Kontrollexperimente zu erörtern, die zur Klärung der Schadensmechanismen beitragen. Diese Experimente stellten sicher, dass

1. die Testproteine selbst hinreichend laserstrahlenunempfindlich sind, d. h. ein photochemischer Effekt durch einfache Licht- oder Zwei-Photonen-Absorption nicht auftritt oder höchstens eine untergeordnete Rolle spielt.
2. sich die Proteine stabil mit den Nanopartikeln verbinden lassen, wobei diese Verbindung zumindest vom Zeitpunkt der Konjugation bis zur Bestrahlung stabil bleiben muss.
3. es für die Untersuchung der Schadensreichweite der NALI geeignete Antikörper gibt, die einerseits an die Goldnanopartikel koppeln und gleichzeitig die Zielproteine spezifisch binden.
4. die Proteine auch während der Bindung am Nanopartikel bzw. Antikörper ausreichend enzymatisch aktiv bleiben.

5. die Goldpartikel über einen gewissen Fluenzbereich stabil bleiben, d. h. sie dürfen nicht schon bei niedrigen Bestrahlungen fragmentieren oder verdampfen.

#### 4.1.1 Kontrollbestrahlung

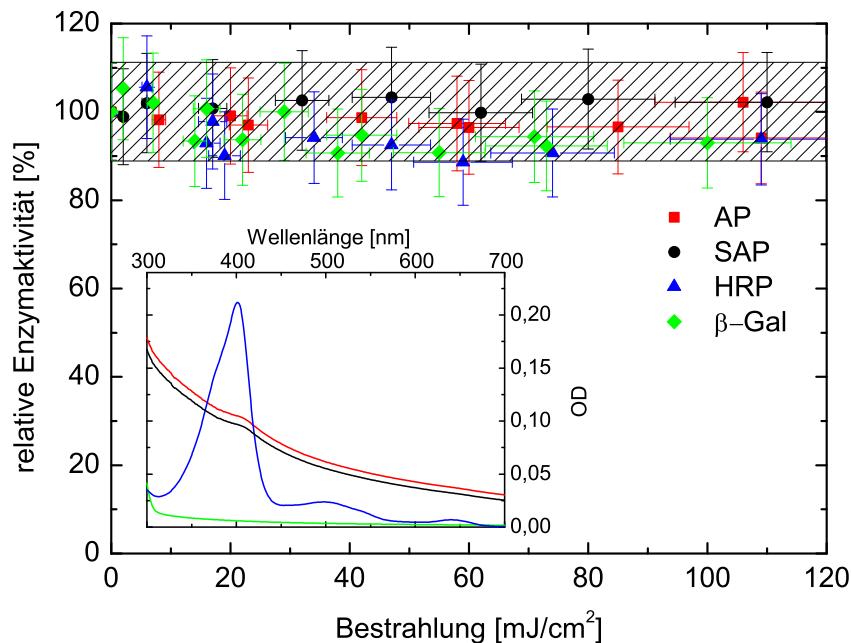
**Untersuchung auf Proteinschädigung durch Lichtabsorption.** In Abschnitt 2.3.5 ist angeführt, dass die Laserstrahlen bei einer Wellenlänge von 527 nm eine Photonenenergie von 2,35 eV besitzen und dadurch energetisch in der Lage sind, schwache kovalente Einfachbindungen aufzubrechen (S–S, N–O, siehe Tab. 2.4). Gleichzeitig wird aber auch bemerkt, dass Proteine i. d. R. in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbieren (wohl aber Licht streuen), so dass keine direkte Photoschädigung zu erwarten ist.

Anders verhält es sich allerdings bei Proteinen, die prosthetische Gruppen mit Metallionen besitzen, so wie die Meerrettich-Peroxidase. Ihr katalytisch aktives Zentrum enthält ein eisenhaltiges Häm-Molekül, das auch Licht im sichtbaren Spektralbereich absorbiert, wie das kleine Diagramm in Abb. 4.1 zeigt. Die charakteristische Absorption dieses Metallo-Enzyms liegt jedoch unterhalb von 450 nm; oberhalb dieser Wellenlänge werden nur noch schwache Absorptionsbanden beobachtet. Bei 527 bzw. 532 nm sind auch hier keine bedeutenden photochemischen Schäden durch einfache Lichtabsorption zu erwarten.

Insgesamt zeigen die Kontrollbestrahlungen von Proteinlösungen ohne Goldpartikel (Proteinkonzentration jeweils 0,1 mg/ml) mit 35 ps-Pulsen, dass bis zu einer maximalen Bestrahlung von etwa 100–110 mJ/cm<sup>2</sup> bei keinem der verwendeten Modellenzyme eine signifikante Aktivitätsänderung aufgrund von einfacher oder Zwei-Photonen-Absorption auftritt (siehe Abb. 4.1).

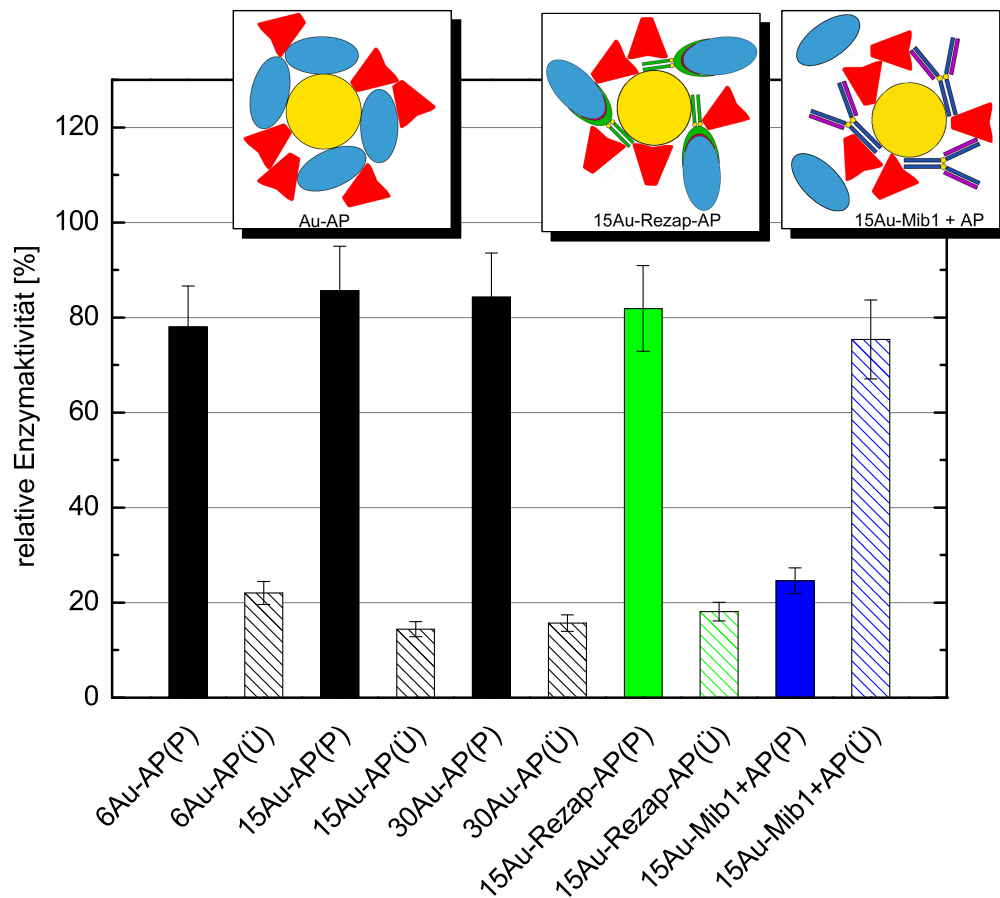
#### 4.1.2 Kopplungseffizienzen

**Kopplung von Au-AP.** Nach dem Nachweis für die hinreichende Bestrahlungsunempfindlichkeit der Proteine wurde überprüft, wie stabil sich die Enzyme mit den anionischen Goldnanopartikeln konjugieren lassen. Zuerst wurden die Au-AP-Konjugate nach der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen



**Abbildung 4.1.** Kleines Diagramm: Extinktionsspektren der Modellenzyme AP (rot), SAP (schwarz), HRP (blau) und  $\beta$ -Gal (grün). Großes Diagramm: Kontrollbestrahlung von ungebundenen Enzymen mit 35 ps-Laserpulsen ( $\lambda = 527$  nm). Die x-Achse entspricht der Bestrahlung und die y-Achse der verbleibenden Enzymaktivität. Der Fehlerbereich für die Aktivitätsbestimmung ist grau schraffiert. Außerhalb des Fehlerbereichs weist keines der bestrahlten Enzyme eine signifikante Inaktivierung auf.

Methode angefertigt und mit PBS-Puffer verdünnt, so dass die Gebrauchslösungen jeweils eine OD von 0,4 hatten (siehe Abschnitt 3.3.1). Anschließend wurden die Proben (Probenvolumen jeweils ca. 1,5 ml) in der Ultrazentrifuge mit den in Abschnitt 3.1.2 angegebenen Parametern abzentrifugiert. Danach wurden Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt und letzteres wieder in PBS-Puffer resuspendiert, so dass das ursprüngliche Probenvolumen von 1,5 ml wieder erreicht wurde. Schließlich wurden die Enzymaktivitäten von Pelletlösung und Überstand gemessen. Durch Vergleich der beiden Aktivitäten (Ü gegen P) konnten unter Berücksichtigung der jeweiligen Probenvolumen die Bindungsverhältnisse bestimmt werden: Je mehr (weniger) Aktivität im Pellet (Überstand) war, desto besser war die Kopplungseffizienz bzw. Bindungsstabilität der Enzyme an die Goldpartikel.



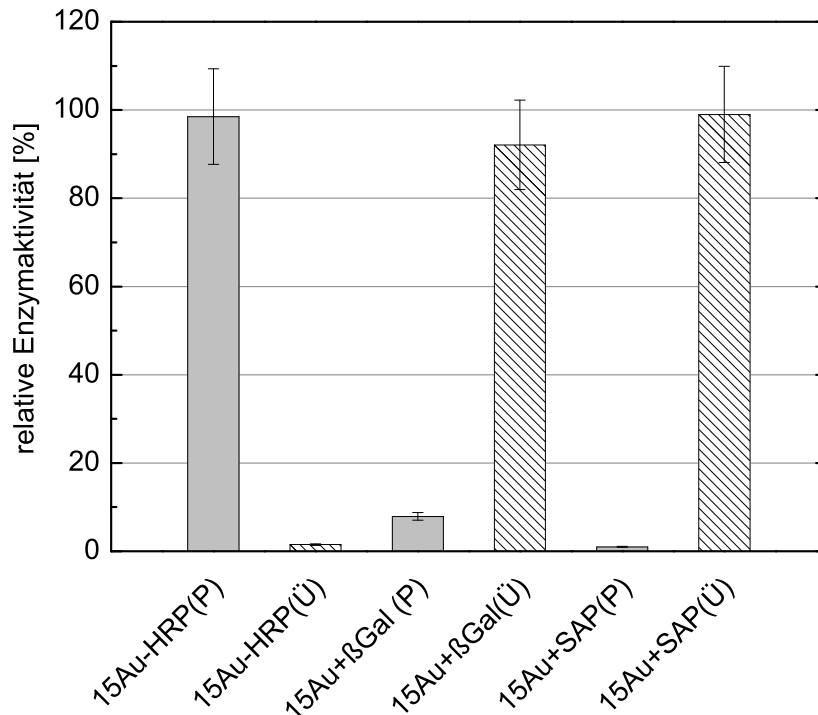
**Abbildung 4.2.** Kopplungseffizienzen von verschiedenen Au-AP-Konjugaten. Die relative Aktivität des Pellets ( $\rightarrow$  gebundene Proteine) wird durch die voll gefärbten Balken beschrieben und die des Überstandes ( $\rightarrow$  ungebundene Enzyme) durch die schraffierten. Die Bilder im oberen Teil des Diagramms stellen den Konjugatetyp schematisch dar. Links: Direkt gekoppelte Au-AP-Konjugate. Mitte: 15Au-Rezap-AP-Konjugate. Rechts: 15Au-Mib1-Konjugate + ungebundene AP-Moleküle. Die roten Figuren repräsentieren die BSA-Moleküle.

In Abb. 4.2 sind die durch Ultrazentrifugationsexperimente bestimmten Kopplungseffizienzen dargestellt. Aus dem Diagramm geht hervor, dass sich in den 6-, 15- und 30Au-AP-Proben (in Schwarz dargestellt) nach der Zentrifugation noch rund 78–85% der Aktivität an den Goldpartikeln befanden und nur 15–22% Aktivität von ungebundenen Proteinen herrührten. Insbesondere für 6Au-AP muss die Kopplungseffizienz aber noch deutlich nach oben korrigiert werden, weil die an die 6 nm Partikel gebundenen AP-

Moleküle eine um 70% reduzierte Enzymaktivität aufweisen, wie in Abb. 3.2 gezeigt ist. Unter Berücksichtigung dieser partikelgrößenabhängigen Aktivitätsreduktion betrugen die Kopplungseffizienzen von 6Au-AP und 15Au-AP ca. 92% bzw. 87%. Die 30Au-AP-Konjugate hatten mit 85% eine etwas geringere Bindungseffizienz und wurden schnell instabil. Bereits nach wenigen Tagen war die Enzymaktivität bei diesen Konjugaten so gut wie verschwunden.

**Kopplung von 15Au-Rezap-AP und 15Au-Mib1 + AP.** Wegen der schlechten Haltbarkeit der 30Au-Konjugate und der geringen Heizeffizienz bei den 6Au-Partikeln wurden die meisten Experimente mit 15Au-Konjugaten durchgeführt. Daher wurden auch die Antikörper-Konjugate nur mit 15Au-Partikeln hergestellt. In Abschnitt 3.1.2 ist beschrieben, dass 15Au-Rezap und 15Au-Mib1 jeweils vor den Bestrahlungsexperimenten für etwa eine Stunde mit einer bestimmten Menge AP inkubiert worden sind, so dass jedem AP-Molekül wenigstens 3–4 Antikörper als potenzielle Bindungspartner zur Verfügung standen. Dies sollte bei den 15Au-Rezap-Konjugaten für eine hohe Bindungseffizienz sorgen. Abb. 4.2 zeigt, dass bei 15Au-Rezap-AP die Bindungseffizienz mit ca. 82% der Aktivität im Pellet ähnlich gut wie bei den direkt gekoppelten 15Au-AP-Konjugaten war. Dagegen wurde bei 15Au-Mib1 + AP beobachtet, dass rund 75% der Aktivität als ungebundene Proteine im Überstand verblieben, während 25% der AP-Moleküle unspezifisch an die 15Au-Mib1-Konjugate koppelten.

**Kopplung von 15Au mit HRP,  $\beta$ -Gal und SAP.** Die Ergebnisse aus den Kopplungsexperimenten mit HRP,  $\beta$ -Gal und SAP sind in Abb. 4.3 dargestellt. Hier ist gut zu erkennen, dass sich HRP ausgezeichnet mit den 15Au-Partikeln koppeln ließ, wobei die Bindungseffizienz bei über 99% lag. Dagegen waren zahlreiche Versuche, SAP an die Goldpartikel zu binden, gescheitert. Selbst bei pH-Werten unter 3 konnten keine kationischen Bereiche auf der Proteinhülle erzeugt werden, welche eine Bindung dieser Proteine an die anionischen Goldpartikel ermöglicht hätten. Somit konnten die thermolabilen SAP-Moleküle in der Probenlösung stets als freie Proteine betrachtet werden.



**Abbildung 4.3.** Kopplungseffizienz der 15Au-Partikel mit HRP,  $\beta$ -Gal und SAP. Die relative Aktivität des Pellets ( $\rightarrow$  gebundene Proteine) wird wieder durch die voll gefärbten Balken beschrieben und die des Überstandes ( $\rightarrow$  ungebundene Enzyme) durch die schraffierten.

$\beta$ -Gal ließ sich ebenfalls kaum an die Goldpartikel koppeln, wie Abb. 4.3 zeigt. So war hier nur eine rudimentäre Bindung von etwa 10% zu beobachten. Auch bei diesem Enzym blieb eine Senkung des pH-Wertes weitgehend erfolglos für die Konjugation. Anfangs schien diese Methode zwar zu funktionieren, denn der Farbumschlag wie in Abb. 3.7 wurde durch die Senkung des pH-Wertes deutlich hinausgezögert. Letztendlich hatten sich die Proteine jedoch immer wieder abgelöst und die Goldpartikel aggregierten. Somit kann auch dieses Protein als quasifrei betrachtet werden; allerdings muss hier mit einer möglichen geringen Rest-Bindung gerechnet werden.

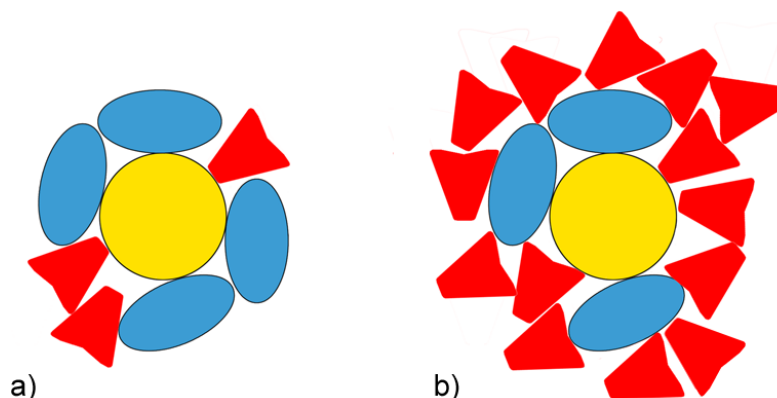
### 4.1.3 Protein-zu-Goldpartikel-Relationen

In Abschnitt 3.1.2 ist erwähnt, dass die frisch hergestellten Konjugate schon nach kurzer Zeit aggregierten, was sich durch die Zugabe von etwas BSA verhindern ließ. Die Kenntnis der dabei eingesetzten BSA-Menge ermöglicht eine quantitative Abschätzung über die *in vitro* BSA-zu-Goldpartikel- bzw. BSA-zu-Enzym-Verhältnisse.

**Anzahl der AP-Moleküle pro 15Au.** Wie in Abb. 3.7 dargestellt, wurde das optimale AP-zu-15Au-Verhältnis bei der Zugabe von etwa 13  $\mu\text{l}$  AP<sub>0,1 mg/ml</sub> in 200  $\mu\text{l}$  Goldlösung (bei  $OD = 1$ ) erreicht. Bei einem Proteingewicht von 160 kDa (siehe Abschnitt 3.1.1) und einem (lt. Hersteller) Proteingehalt in der Protein-Stocklösung von etwa 50%, enthielten die 13  $\mu\text{l}$  der AP-Lösung ungefähr  $2,45 \cdot 10^{12}$  AP-Moleküle. In den 200  $\mu\text{l}$  der 15Au-Lösung waren dagegen etwa  $3 \cdot 10^{11}$  Nanopartikel enthalten [131]. Somit kamen unter Berücksichtigung der o.g. Bindungseffizienz von rund 87% auf jedes 15Au-Partikel im statistischen Mittel etwa 7,1 AP-Moleküle.

**Partikelkonzentration der fertigen Konjugate.** Das finale Konjugatevolumen, das aus ursprünglich 3 ml der 15Au-Lösung abzentrifugiert wurde (vgl. Abschnitt 3.1.2), betrug meist zwischen 10 und 20  $\mu\text{l}$ . Diese Variation lag daran, dass die Abnahme des Überstandes nach der Zentrifugation nicht immer bis auf die letzten Mikroliter erfolgen konnte. Im Mittel betrug die finale Goldpartikelkonzentration etwa  $2,94(\pm 1,40) \cdot 10^{11} \mu\text{l}^{-1}$ , was durch Extinktionsmessungen an mehreren Proben bestimmt wurde.

**Stabilisierung mit BSA.** Für die BSA-Stabilisierung wurden die 10–20  $\mu\text{l}$  Konjugatesuspension mit einer jeweils identischen Menge an Puffer A versetzt. Dabei enthielt jeder Mikroliter Puffer A etwa  $2,95 \cdot 10^{13}$  BSA-Moleküle (Molekulargewicht  $\sim 66,4$  kDa), welche sich auf jeweils  $2,94 \cdot 10^{11}$  Partikel verteilten. Demnach kamen bei den BSA-stabilisierten Proben auf jedes Goldpartikel neben den rund 7 AP-Molekülen statistisch auch noch rund 100 BSA-Proteine. Damit waren ausreichend viele BSA-Moleküle vorhanden,



**Abbildung 4.4.** Schematische Darstellung der Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnisse bei den 15Au-AP-Konjugaten. Auf jedes Goldpartikel kommen statistisch rund 7 AP-Moleküle (blau), die ebenfalls etwa 15 nm lang sind. a) Ohne BSA-Stabilisierung: Bei der Probenpräparation wurden die Konjugate nur nach der ersten Zentrifugation mit BSA (rot) versetzt. Im zweiten Aufreinigungsschritt (Zentrifugation in Glycerollösung) wurden die meisten BSA-Moleküle dann wieder entfernt. b) Mit BSA-Stabilisierung: Durch die Zugabe von ein wenig Puffer A nach der zweiten Aufreinigung wurden jedem Konjugat in der Probe rund 100 BSA-Moleküle zugesetzt.

um die Konjugate regelrecht zu umhüllen, was in Abb. 4.4 schematisch dargestellt ist. Allerdings ist unklar, wie sich die genaue Oberflächenbelegung der Goldnanopartikel in Bezug auf die AP- (blaue Ellipsen) und BSA-Verteilung (rote Figuren) in Realität darstellt.

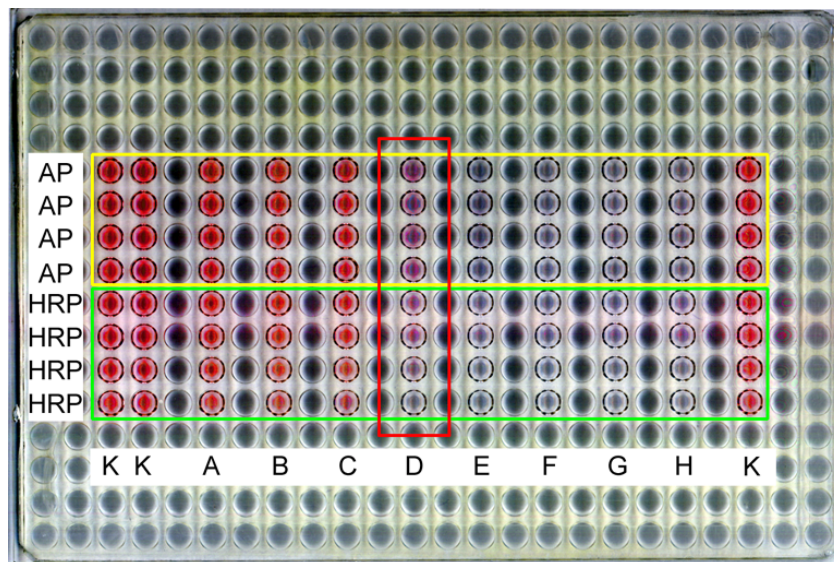
**Zusammenfassung aller Konjugate.** Analog zu 15Au-AP wurden auch die Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnisse der anderen Konjugate berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

| Probe      | Enzym/Au            | BSA/Au                 | BSA/Enzym            |
|------------|---------------------|------------------------|----------------------|
| 6Au-AP     | 1, 4( $\pm 0, 4$ )  | 8, 6( $\pm 4, 6$ )     | 6, 1( $\pm 4, 0$ )   |
| 15Au-AP    | 7, 1( $\pm 2, 3$ )  | 100, 3( $\pm 49, 1$ )  | 14, 1( $\pm 8, 6$ )  |
| 30Au-AP    | 20( $\pm 6, 6$ )    | 517, 5( $\pm 178, 4$ ) | 25, 9( $\pm 12, 3$ ) |
| 15Au-HRP   | 23, 4( $\pm 7, 7$ ) | 100, 3( $\pm 49, 1$ )  | 4, 3( $\pm 2, 5$ )   |
| 15Au-Rezap | 26, 8( $\pm 8, 8$ ) | 100, 3( $\pm 49, 1$ )  | 3, 7( $\pm 2, 2$ )   |
| 15Au-Mib1  | 28, 5( $\pm 9, 4$ ) | 100, 3( $\pm 49, 1$ )  | 3, 5( $\pm 2, 1$ )   |

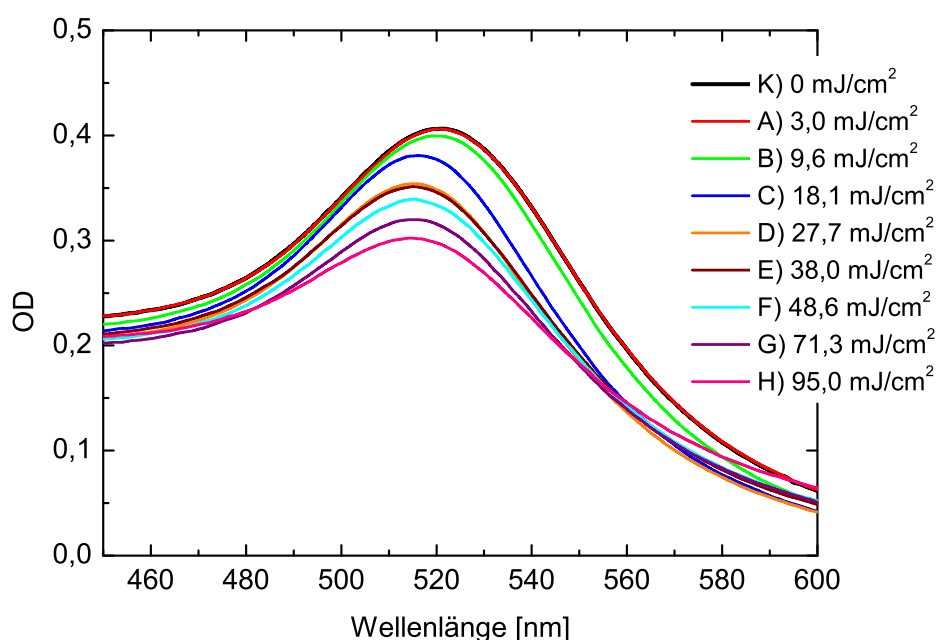
**Tabelle 4.1.** Protein-zu-Partikel-Relationen.

#### 4.1.4 Partikelaggregation und -fragmentierung

**Entfärbung von bestrahlten Konjugaten.** Zunächst soll ein Phänomen erwähnt werden, das im Probenhalter praktisch nach jedem Bestrahlungsexperiment zu beobachten war und in Abb. 4.5 exemplarisch gezeigt ist. Die bestrahlten Probenlösungen wiesen ab einer bestimmten Fluenz einen charakteristischen Farbumschlag von der typisch rötlichen Färbung übers Graublaue bis hin zur Farblosigkeit auf. Das Ausmaß des Farbumschlages war außer von der Bestrahlung noch vom verwendeten Lösungsmittel, dem Proteintyp und der Proteinkonzentration abhängig. Wie Abb. 4.5 zeigt, ist der Farbumschlag bei Verdünnung der Proben mit Natriumphosphatpuffer sehr deutlich zu erkennen. Bei Verdünnung mit dem Lösungsmittel der Goldpartikel (welches durch Abzentrifugieren der Goldpartikellösung gewonnen wurde) und bei hoher Proteinkonzentration war die Farbänderung zwar schwächer ausgeprägt, prinzipiell lag diese aber immer bei einer ähnlichen Dosis. Praktisch traten alle durch Pikosekundenpuls-Bestrahlung erzeugten sichtbaren Farbumschläge bei Fluenzen zwischen 20 und 32 mJ/cm<sup>2</sup> auf.



**Abbildung 4.5.** Farbänderung der Konjugate nach ps-Bestrahlung von 15Au-AP (gelb umrandet) und 15Au-HRP (grün umrandet) in Natriumphosphatpuffer. Zur Verdeutlichung wurde die Farbsättigung des Bildes erhöht. K) Kontrollen. A–H) Bestrahlung (in mJ/cm<sup>2</sup>) mit: A) 15,9(±2,2); B) 22(±3,1); C) 27,9(±3,9); D) 31,7(±4,4); E) 37,5(±5,3); F) 43,6(±6,1); G) 48,4(±6,8); H) 55(±7,7).



**Abbildung 4.6.** Typische Absorptionsspektren von 15Au-HRP-Konjugaten nach ps-Bestrahlung im Lösungsmittel der Goldpartikel. K) Kontrolle. A–H) Bestrahlung [ $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ] mit: A)  $3,0(\pm 0,4)$ ; B)  $9,6(\pm 1,3)$ ; C)  $18,1(\pm 2,5)$ ; D)  $27,7(\pm 3,9)$ ; E)  $38,0(\pm 5,3)$ ; F)  $48,6(\pm 6,8)$ ; G)  $71,3(\pm 10,0)$ ; H)  $95,0(\pm 13,3)$ .

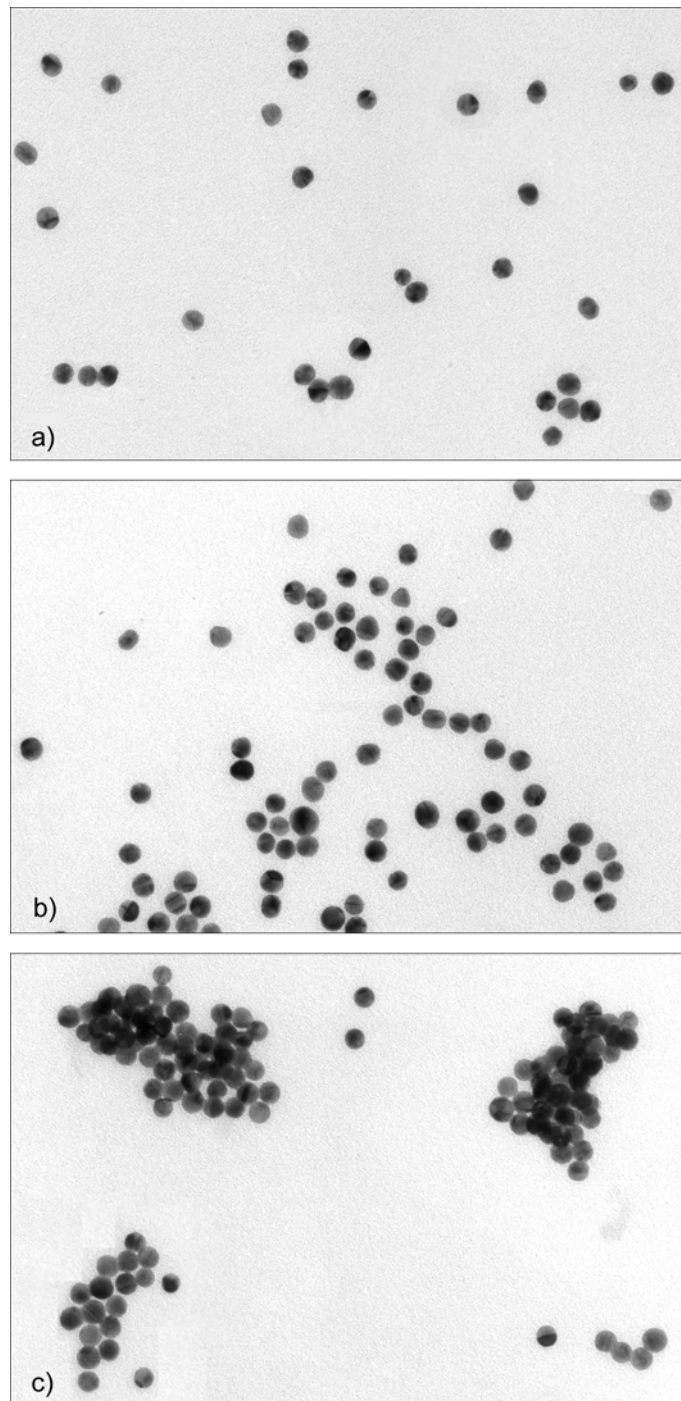
**Absorptionsspektren von bestrahlten 15Au-HRP-Konjugaten.** Für genauere Untersuchungen zu den Entfärbungen der Proben wurden Absorptionsspektren von mit 35 ps-Pulsen bestrahlten 15Au-HRP Konjugaten mit einem UV/VIS-Spektrometer (Lambda 14P, Fa. Perkin Elmer) gemessen. Da diese Messungen insgesamt etwas länger dauerten, wurden die Konjugate im stabilisierenden Lösungsmittel der Goldpartikel mit ansteigenden Fluenzen bestrahlt und anschließend mit dem Spektrometer untersucht. In Abb. 4.6 ist das Ergebnis aus einer dieser Untersuchungen exemplarisch vorgestellt.

Die Grafik zeigt, dass die Kontrolle (K) und die mit  $3,0 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  bestrahlte Probe (A) ein nahezu identisches Absorptionsspektrum besitzen. Dies deutet nach den Ausführungen in Abschnitt 2.1.1 auf eine unveränderte Form und Umgebung der Nanopartikel hin. Bei der mit  $9,6 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  bestrahlten Probe (B) erscheint dann eine sehr geringe Abnahme der Absorption, die allerdings in den Bereich der Messunsicherheit fallen kann. Bei einer Fluenz

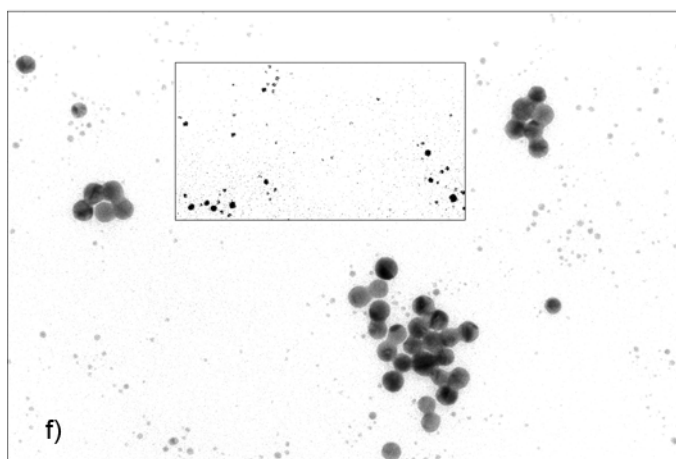
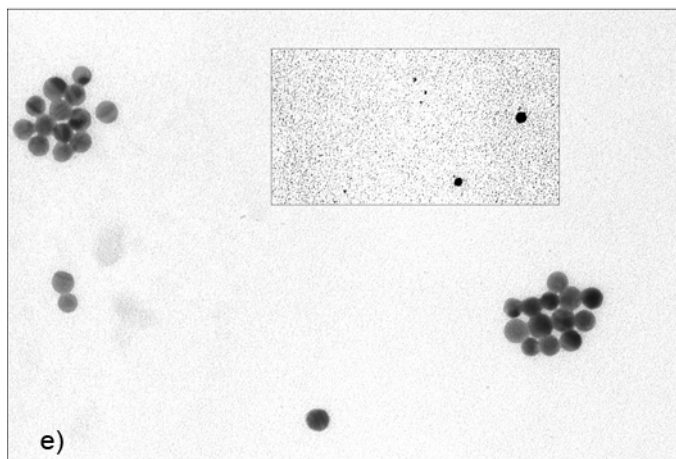
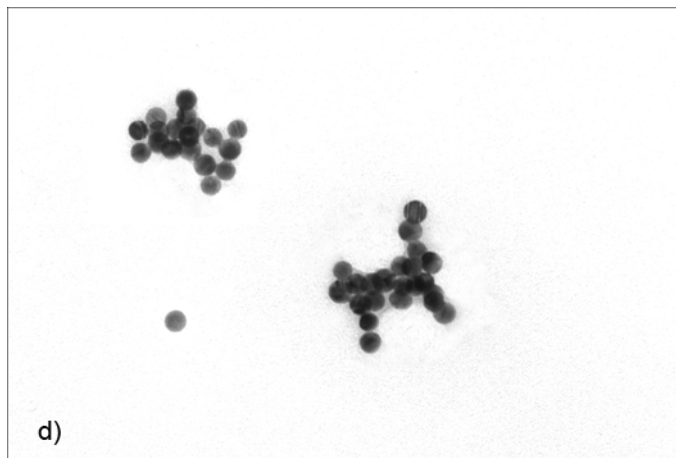
von  $18,1 \text{ mJ/cm}^2$  (C) tritt dann ein deutlicher Sprung in der Absorptionscharakteristik auf, der visuell allerdings noch nicht beobachtet werden konnte; dies war erst bei der mit  $27,7 \text{ mJ/cm}^2$  (D) bestrahlten Probe der Fall. Auffällig ist auch, dass sich das Absorptionsmaximum etwas in Richtung der kleineren Wellenlängen verschiebt.

**TEM-Untersuchungen von bestrahlten 15Au-AP-Konjugaten.** Um die Ursachen für die bestrahlungsabhängigen Farbumschläge bzw. die Veränderung der Absorptionscharakteristik herauszufinden und die Schwellen für Partikelschmelzen und -fragmentierung zu bestimmen, wurden 15Au-AP-Konjugate mit 35 ps-Pulsen bestrahlt und anschließend mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM Philips 400 T, Fa. Philips) untersucht (aus Kosten- und Zeitgründen wurden hier nur die 15Au-Partikel und die ps-Pulse ausgewählt, weil die meisten Bestrahlungsexperimente damit durchgeführt wurden). Abbildung 4.7 zeigt die wichtigsten daraus erhaltenen Bilder.

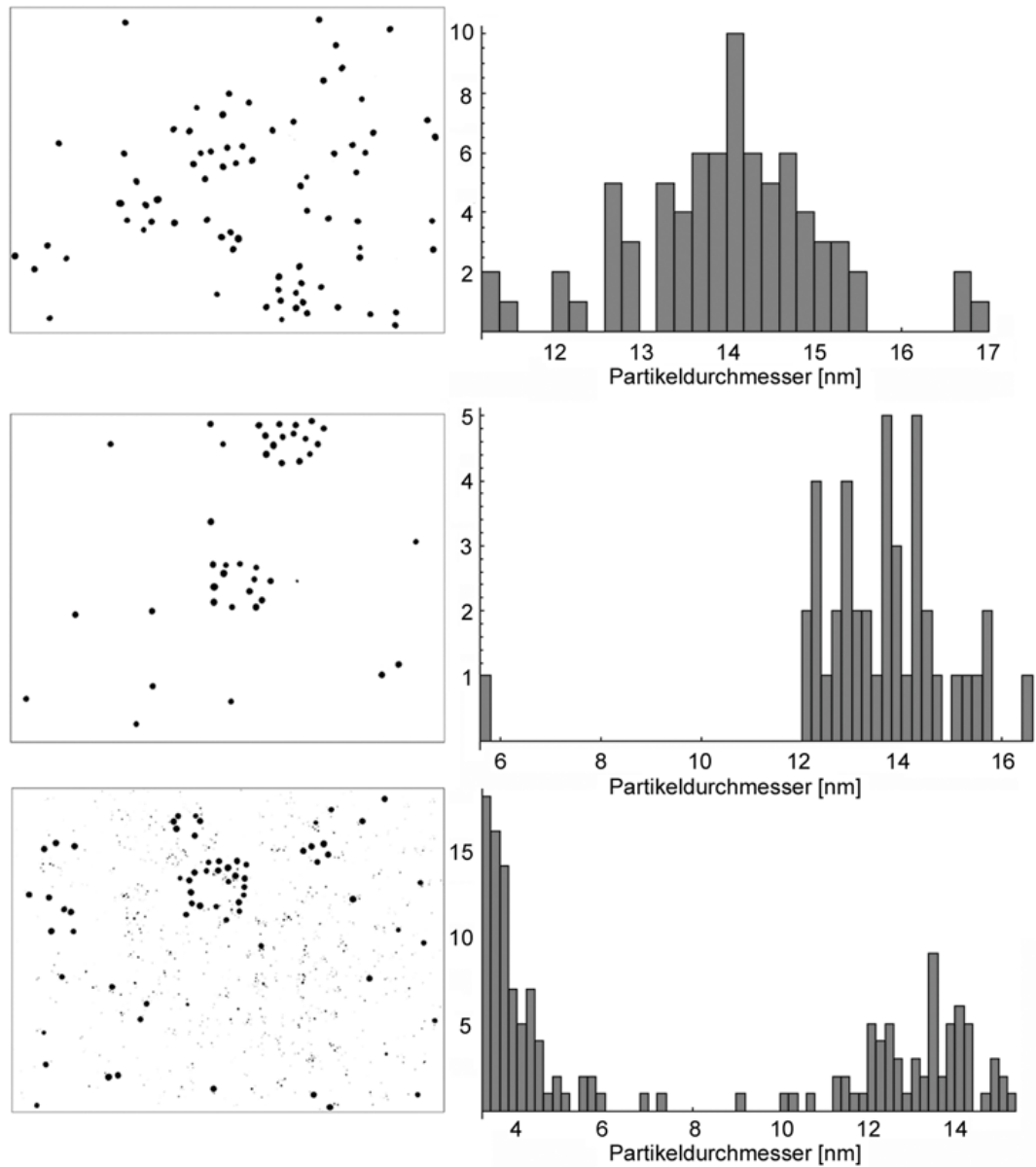
Um die Verteilung der Partikelgrößen aus den TEM-Aufnahmen zu erhalten, wurden Bildanalysen mit ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*, Version 1.3.8) gemacht. Dazu mussten die abgebildeten aggregierten Goldpartikel zunächst mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Photoshop 7, Fa. Adobe Systems Inc.) segmentiert werden. Mit ImageJ wurden dann die Randbereiche der Partikel definiert und deren relative Größenverteilung durch Auszählung der jeweiligen Flächenanteile bestimmt. Anschließend wurden die Flächenanteile mit Hilfe der aus den TEM-Aufnahmen bestimmten Skalierungsfaktoren in absolute Partikelgrößen umgerechnet. In den Abbildungen 4.8 und 4.9 sind die entsprechenden Ergebnisse hierzu gezeigt.



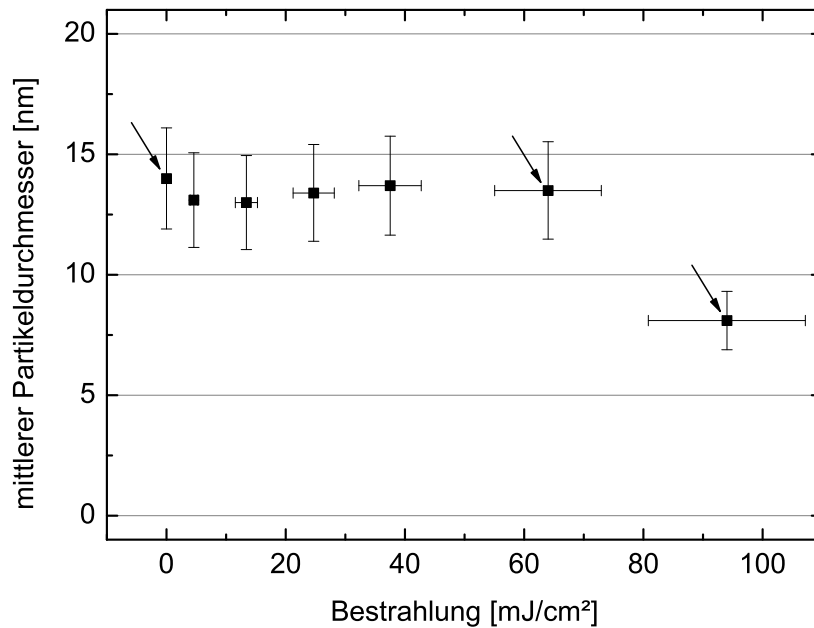
**Abbildung 4.7.** TEM-Aufnahmen von mit 35 ps-Laserpulsen bestrahlten  $^{15}\text{Au}$ -AP-Konjugaten bei 100.000-facher Vergrößerung. a) Unbestrahlte Kontrolle. b) Bestrahlung mit  $13,4 \text{ mJ/cm}^2$  und c)  $24,7 \text{ mJ/cm}^2$ .



**Fortsetzung von Abb. 4.7.** d) Bestrahlung mit  $37,6 \text{ mJ/cm}^2$ , e)  $64,5 \text{ mJ/cm}^2$  und f)  $94 \text{ mJ/cm}^2$ . In den kleinen eingerahmten Bereichen in e) und f) wurde der Kontrast um 80% erhöht, um die Goldfragmente hervorzuheben.



**Abbildung 4.8.** Bildanalysen der wichtigsten TEM-Aufnahmen mit ImageJ (links) mit Ausgabe der statistischen Verteilung der Partikelgrößen als Histogramme (rechts). Oben: Kontrolle. Mitte: Bestrahlung mit 64,5 mJ/cm<sup>2</sup>. Unten: Bestrahlung mit 94 mJ/cm<sup>2</sup>.



**Abbildung 4.9.** Mittlerer Partikeldurchmesser nach Bestrahlung von 15Au-AP mit 35 ps-Laserpulsen, erhalten aus der statistischen Bildanalyse mit ImageJ. Die Ergebnisse aus den in Abb. 4.8 gezeigten Auswertungen sind mit Pfeilen markiert

Durch die Analysen der TEM-Bilder (siehe Abb. 4.7) konnten die folgenden Zusammenhänge gefunden werden:

- Nach statistischer Auswertung ist der mittlere Durchmesser der Partikel bis  $64,5(\pm 9,0)$  mJ/cm<sup>2</sup> nahezu konstant und beträgt durchschnittlich  $13,45(\pm 0,34)$  nm. Eine visuelle Analyse der 240.000-fachen Vergrößerungen ergibt dagegen einen mittleren Partikeldurchmesser von etwa  $14,0(\pm 0,5)$  nm. Die Verringerung des Durchmessers um 0,5 nm bei der ImageJ-Analyse kann gut mit der Randunschärfe bei den Aufnahmen mit 100.000-facher Vergrößerung erklärt werden.
- Bis zu einer Bestrahlung von  $13,4(\pm 1,9)$  mJ/cm<sup>2</sup> ist keine Änderung der Partikelcharakteristik erkennbar. Sowohl Verteilung als auch Form der Nanopartikel entsprechen bis zu diesem Wert der Charakteristik der unbestrahlten Probe. Insbesondere sind auf den Bildern der bis zu dieser Fluenz bestrahlten Proben zahlreiche unförmige Teilchen zu erkennen, was ein Hinweis auf einen nicht erfolgten oder nur sehr un-

vollständigen Schmelzprozess ist.

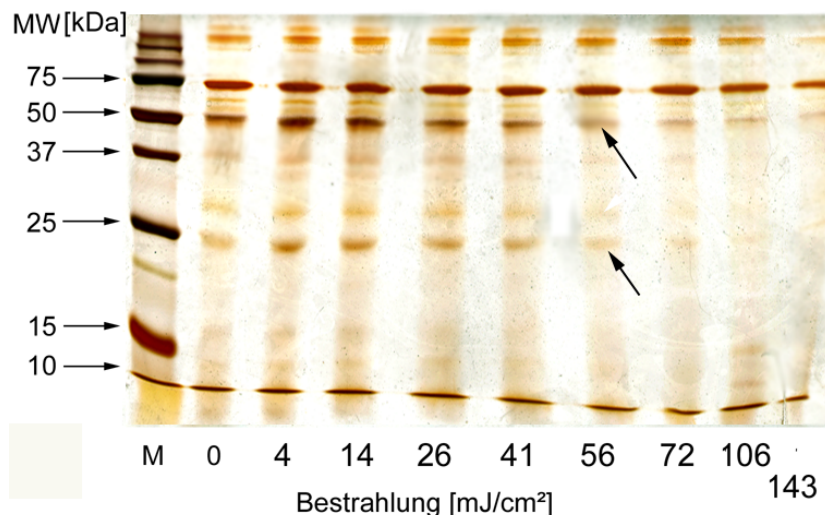
- Bei der mit  $24,7(\pm 3,5)$  mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Probe ist eine ausgeprägte Aggregation der Partikel zu größeren Komplexen zu erkennen. Außerdem sind auf den Aufnahmen dieser Probe fast keine unrunder Teilchen mehr zu erkennen, was auf einen fortgeschrittenen Schmelzvorgang (Aufschmelzen) der Nanopartikel bei dieser Bestrahlung hindeutet.
- Die Charakteristik der mit  $37,6(\pm 5,3)$  mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Probe entspricht weitgehend der zuletzt erwähnten. Allerdings ist die Aggregatbildung hier noch deutlicher ausgeprägt. Partikelfragmente sind bis zu dieser Bestrahlung noch nicht zu erkennen.
- Bei den mit  $64,5(\pm 9,0)$  mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Teilchen sind die ersten Partikelfragmente zu erkennen; allerdings werden diese wenigen Bruchstücke von ImageJ nicht erkannt, da der Fragmentierungsprozess bei dieser Bestrahlung anscheinend gerade erst beginnt. Mit einigen optischen Tricks, wie der künstlichen Erhöhung des Kontrasts oder Falschfarbendarstellung, können vereinzelte Fragmente jedoch visuell identifiziert werden.
- Nach einer Bestrahlung mit  $94(\pm 13)$  mJ/cm<sup>2</sup> ist eine deutliche Fragmentierung der Goldnanopartikel zu beobachten. Die zahlreichen Fragmente haben meist Durchmesser unterhalb von 5 nm, wie Abb. 4.8 zeigt. Außerdem scheinen die Partikel bei dieser Bestrahlung miteinander zu verschmelzen.

Die wichtigsten Ergebnisse aus den TEM-Untersuchungen waren die Bestimmung der Fragmentierungsschwelle zu etwas unterhalb von  $64,5$  mJ/cm<sup>2</sup> und die Beobachtung, dass die Partikel bis  $13,4$  mJ/cm<sup>2</sup> nicht oder nur unvollständig aufschmelzen.

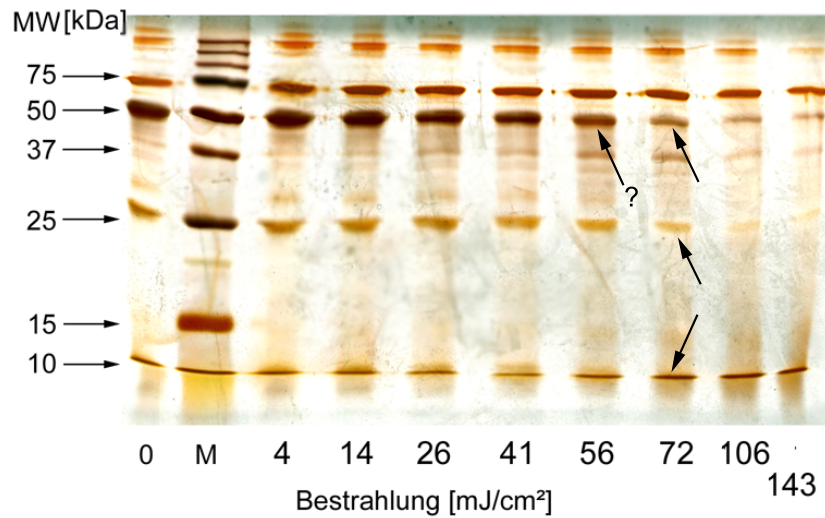
#### 4.1.5 Proteinaggregation und -fragmentierung

**Gelelektrophoresen von  $^{15}\text{Au}$ -Antikörper-Konjugaten.** Um herauszufinden, ob und wie sich die Partikelaggregation und -fragmentierung auf die gebundenen Proteine auswirken, wurden chromatographische Untersuchungen mittels Polyacrylamid Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) an mit 35 ps-Pulsen bestrahlten Konjugaten durchgeführt. Hierbei ließen sich jedoch ausgerechnet die wichtigen AP-Moleküle trotz mehrfacher Versuche mit unterschiedlichen Färbungen nicht darstellen. Die Gründe dafür sind unbekannt, allerdings ist es sehr gut möglich, dass die AP-Banden mit den starken BSA-Banden bei rund 70 kDa zusammenfielen, denn die etwa 160 kDa großen AP-Homodimere zerfallen bei der SDS-PAGE in ihre beiden Monomere [100].

Im Gegensatz zu AP ließen sich die beiden Untereinheiten beider Antikörper mit der Silberfärbung gut darstellen, wie in den Abbildungen 4.10 und 4.11 gezeigt ist. Hier sind die schweren und leichten Ketten der Antikörper, welche den Banden bei 50 bzw. 25 kDa entsprechen, gut zu erkennen. Zusammengefasst wurden durch visuelle Bildanalysen bei den Gelelektrophoresen die folgenden Ergebnisse gefunden:



**Abbildung 4.10.** Gelelektrophoresen mit Silberfärbung von mit 35 ps-Pulsen bestrahlten  $^{15}\text{Au}$ -Mib1-Konjugaten. Die Spalte M entspricht den Markern für das Molekulargewicht und die Spalte 0 der unbestrahlten Kontrolle. Die markanten Punkte, bei denen eine signifikante Änderung auftritt, sind mit Pfeilen markiert.



**Abbildung 4.11.** Gelelektrophoresen mit Silberfärbung von mit 35 ps-Pulsen bestrahlten  $^{15}\text{Au}$ -Rezap-Konjugaten.

- Bei Mib1 tritt eine signifikante Schwächung der Banden der schweren und leichten Seitenketten nach einer Bestrahlung mit  $56(\pm 8) \text{ mJ/cm}^2$  auf. Dieses Ergebnis wurde durch eine Gelfärbung mit *Coomassie Blue* bestätigt. Gleichzeitig ist bei den Färbungen zu erkennen, dass bei  $41(\pm 6) \text{ mJ/cm}^2$  die Banden noch voll ausgeprägt sind. Demnach ist bei der Bestrahlung von  $^{15}\text{Au}$ -Mib1 eine Fragmentierung der Antikörper bei einer Fluenz zwischen 41 und  $56 \text{ mJ/cm}^2$  zu erwarten.
- Bei Rezap ist nach einer Bestrahlung mit  $72(\pm 10) \text{ mJ/cm}^2$  sowohl eine deutliche Schwächung der Banden für die schweren und leichten Seitenketten der Antikörper zu erkennen, als auch eine Zunahme von niedermolekularen Fragmenten unterhalb von  $10 \text{ kDa}$ . Allerdings scheint die  $50 \text{ kDa}$ -Bande schon bei  $56(\pm 8) \text{ mJ/cm}^2$  ein wenig schwächer zu werden, wobei dies ein Artefakt der Silberfärbung sein kann. Insgesamt ist bei  $^{15}\text{Au}$ -Rezap mit einer Proteinfragmentierung zwischen 56 und  $72 \text{ mJ/cm}^2$  zu rechnen.

## 4.2 Bestrahlungsexperimente

Alle Bestrahlungsexperimente wurden nach der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt und mit unterschiedlichen Proben an verschiedenen Tagen wenigstens 5-mal wiederholt, um systematische Fehler zu vermeiden. Dabei sind alle Konjugate in Natriumphosphatpuffer bestrahlt worden, wenn nichts anderes angegeben ist. In Tab. 4.2 sind die in dieser Arbeit bestrahlten Konjugate bzw. Proteine sowie deren Bindungseigenschaften noch einmal zusammengefasst.

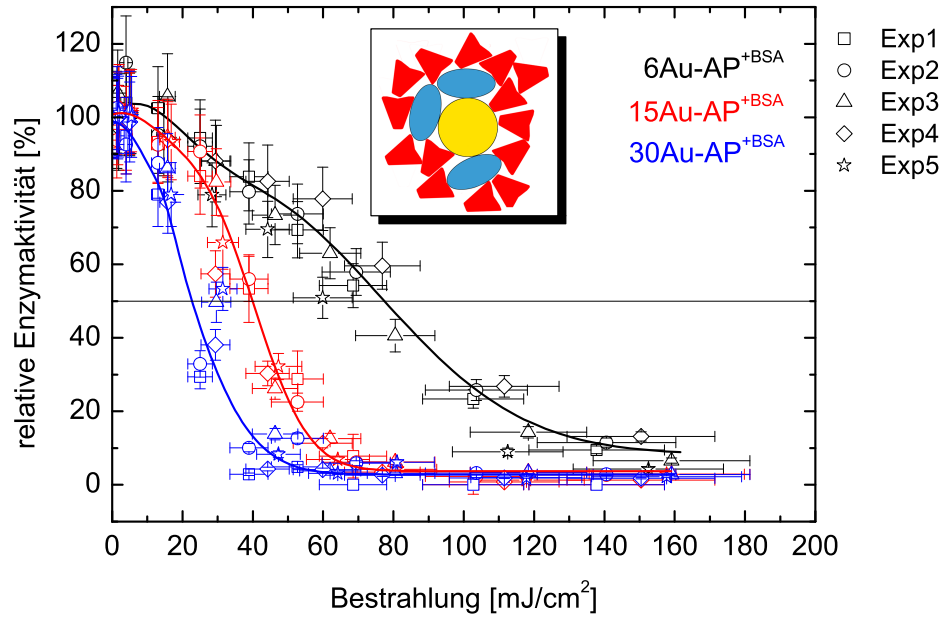
| Enzym        | direkt gebunden    | über Ak gebunden | ungebunden          |
|--------------|--------------------|------------------|---------------------|
| AP           | 6-, 15- u. 30Au-AP | 15Au-Rezap-AP    | 15Au-Mib1 + AP      |
| HRP          | 15Au-HRP           | Ak nicht vorh.   | nicht vorh.         |
| $\beta$ -Gal | nicht möglich      | Ak nicht vorh.   | 15Au + $\beta$ -Gal |
| SAP          | nicht möglich      | Ak nicht vorh.   | 15Au + SAP          |

**Tabelle 4.2.** Bestrahlte Proben nach den Eigenschaften der Proteinbindung.

### 4.2.1 Bestrahlung mit Pikosekundenpulsen

**Au-AP-Konjugate mit BSA-Stabilisierung.** In Abb. 4.12 sind die Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an den direkt gekoppelten 6-, 15- und 30Au-AP-Konjugaten, die nach ihrer Herstellung mit BSA stabilisiert wurden, präsentiert. In diesem typischen *Bestrahlungsdiagramm* ist die verbleibende relative Enzymaktivität gegen die applizierte Bestrahlung aufgetragen. Zur Veranschaulichung der Konjugatecharakteristik ist das System in dem kleinen Bild oben im Diagramm nochmal schematisch illustriert.

Die in Abb. 4.12 dargestellten Messergebnisse zeigen die nach Abb. 2.4 erwartete Eigenschaft, dass die 6 nm Goldpartikel aufgrund ihres sehr geringen Absorptionsquerschnittes wesentlich ineffizienter bei der bestrahlungsabhängigen Proteininaktivierung sind als die größeren Partikel. Um nun Dosischwellenwerte für eine 50%-ige Proteininaktivierung ( $H_{50\%}$ ) und andere signifikante Punkte zu bestimmen, wurden die Messwerte mit einer phänomenologischen Fitkurve, der Summe aus zwei gegeneinander verschobenen



**Abbildung 4.12.** Enzymaktivität von 6- (schwarz), 15- (rot) und 30Au-AP (blau) nach Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen. Diese Konjugate wurden nach ihrer Herstellung mit BSA stabilisiert. Die 50%-Überlebensrate der Proteine ist durch die schwarze Gerade markiert. Insgesamt sind hier 5 Experimente mit jeweils 2 Proben (Fehlerredundanz) aufgeführt.

Gaußkurven, mit den Fitparametern  $a, b, c, d, H_0$  und  $R$  angepasst:

$$A(H) = a \cdot \exp(-bH^2) + c \cdot \exp(-d(H - H_0)^2) + R. \quad (4.1)$$

Danach beschreibt  $A$  die mittlere relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der applizierten Bestrahlung  $H$ , und  $R$  ist die Restaktivität, die von ungebundenen Enzymen in der bestrahlten Probe herrührt. Die daraus erhaltenen Fits sind in den Bestrahlungsdiagrammen als durchgezogene Kurven dargestellt.

Gl. 4.1 gibt keine physikalisch-chemische Gesetzmäßigkeit wieder, sondern beschreibt phänomenologisch die Messdaten. Gaußfunktionen wurden verwendet, weil sie einen exponentiellen Abfall und gleichzeitig ein Plateau bei niedrigen Bestrahlungen beschreiben. Die zweite Gaußfunktion wurde eingeführt, da vor allem bei den Proben ohne BSA-Stabilisierung eine Schulter im Inaktivierungsverlauf der Enzyme auftaucht. Bei den BSA-stabilisierten

Proben ist diese Schulter meist zu „verschmiert“, um sie eindeutig zu erkennen. Besonders gut ist die Schulter am Verlauf der roten Kurven in den Abbildungen 4.14 und 4.15 sichtbar. Die Proteininaktivierung beginnt erst nach einem bestimmten Schwellenwert der Bestrahlung (Plateau) und nimmt dann zunächst kontinuierlich zu. Ab Bestrahlungen von etwa  $15\text{--}20\text{ mJ/cm}^2$  wird der steile Verlauf der Enzyminaktivierung reduziert, wodurch die Schulter entsteht, in deren Verlauf sich ein Wendepunkt  $W$  befindet, ab dem die Inaktivierungsrate wieder deutlich zunimmt. Dieser Wendepunkt lässt sich rechnerisch aus der Fitkurve nach Gl. 4.1 bestimmen. In Tab. 4.3 sind die Ergebnisse aus den in Abb. 4.12 gezeigten Inaktivierungskurven zusammengefasst.

| Probe          | $H_{50\%}$ in $\text{mJ/cm}^2$ | $W$ in $\text{mJ/cm}^2$ | $R$ in %        |
|----------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------|
| 6Au-AP (+BSA)  | $77,4(\pm 10,8)$               | $40,3(\pm 5,6)$         | $8,3 \pm (0,9)$ |
| 15Au-AP (+BSA) | $39,9(\pm 5,6)$                | $35,9(\pm 5,0)$         | $3,7 \pm (0,4)$ |
| 30Au-AP (+BSA) | $22,7(\pm 3,2)$                | $10,5(\pm 2,2)$         | $2,8 \pm (0,3)$ |

**Tabelle 4.3.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an BSA-stabilisierten Au-AP-Konjugaten.

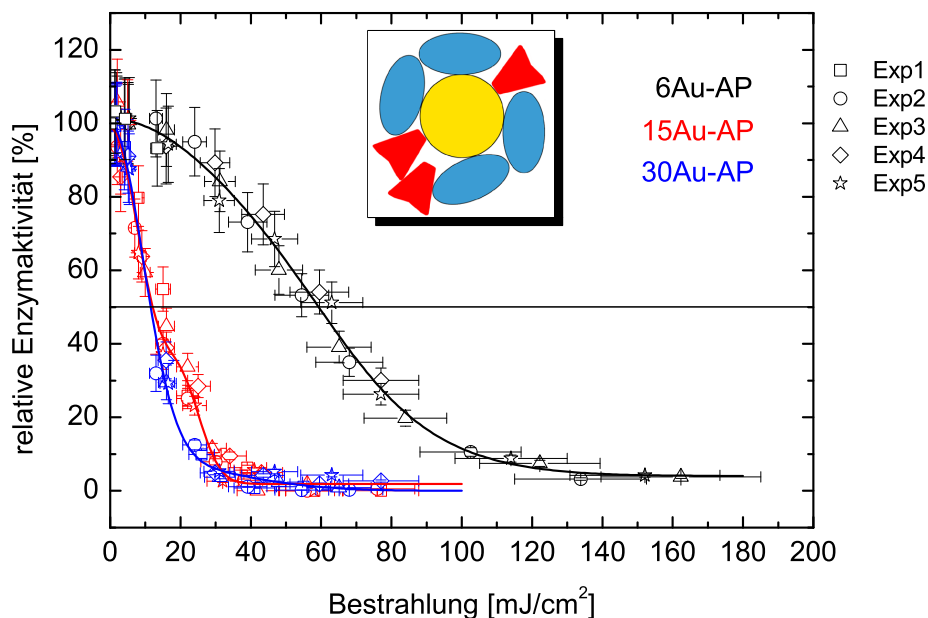
Auf zwei Beobachtungen nach den Bestrahlungsexperimenten soll an dieser Stelle explizit hingewiesen werden:

- Augenscheinlich war nach niedrigen Bestrahlungen von 6- und 15Au-AP eine leichte Aktivitätserhöhung über die (100%-ige) Aktivität der unbestrahlten Kontrollen zu beobachten. Bei 30Au-AP trat dieser Effekt nicht auf. Dies rührte wahrscheinlich von einem durch die Bestrahlung bedingten Ablösen der AP-Moleküle von den Goldpartikeln her, die im ungebundenen Zustand eine höhere Aktivität aufweisen (siehe Abb. 3.2). Die Aktivitätserhöhung nach niedrigen Bestrahlungen äußert sich in einigen Bestrahlungsdiagrammen in einer leichten Erhöhung des Plateaus über die 100%-ige Enzymaktivität der Kontrollen.
- Die zweite Beobachtung betrifft die Restaktivität  $R$  nach hoher Bestrahlung, bei der alle gebundenen Enzyme inaktiviert oder zerstört sein sollten. Bei den Untersuchungen zur Kopplung der Au-AP-Konjugate

zeigte sich eine Bindungseffizienz von 78–85% (vgl. Abb. 4.2), d. h. 15–22% der Aktivität rührten von ungebundenen AP-Molekülen her. Eine entsprechend hohe Restaktivität wurde bei den bestrahlten Proben nicht gemessen. Die geringe Restaktivität zwischen 2,8 und 8,3% ist demnach ein Hinweis auf einen nicht-lokalen Effekt.

**Au-AP-Konjugate ohne BSA-Stabilisierung.** Gemäß Protokoll wurden die Proben nach der Konjugation immer mit BSA stabilisiert und danach in Natriumphosphatpuffer bestrahlt. Bei einer Test-Bestrahlung im BSA-reichen Puffer A fiel die Enzyminaktivierung dagegen deutlich geringer aus. Im Umkehrschluss sollten die Proteine einfacher zu schädigen sein, wenn möglichst wenig BSA bei der Probenherstellung verwendet würde. Dies ist in der Tat der Fall, wie Abb. 4.13 zeigt.

Im Grunde weisen die Inaktivierungskurven von BSA-stabilisierten und unstabilisierten Konjugaten eine ähnliche Charakteristik auf, allerdings sind



**Abbildung 4.13.** Enzymaktivität von 6- (schwarz), 15- (rot) und 30Au-AP (blau) ohne BSA-Stabilisierung nach Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen. Auch hier sind insgesamt fünf Experimente durchgeführt worden. Die wichtigen Parameter aus den Kurvenanpassungen nach Gl. 4.1 sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

| Probe   | $H_{50\%}$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $W$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $R$ in %        |
|---------|----------------------------------|---------------------------|-----------------|
| 6Au-AP  | 59,3( $\pm 8,3$ )                | $N/A$                     | $4,0 \pm (0,4)$ |
| 15Au-AP | 12,1( $\pm 1,7$ )                | 17,7( $\pm 2,5$ )         | $1,9 \pm (0,2)$ |
| 30Au-AP | 11,5( $\pm 1,6$ )                | $N/A$                     | $0 \pm (0)$     |

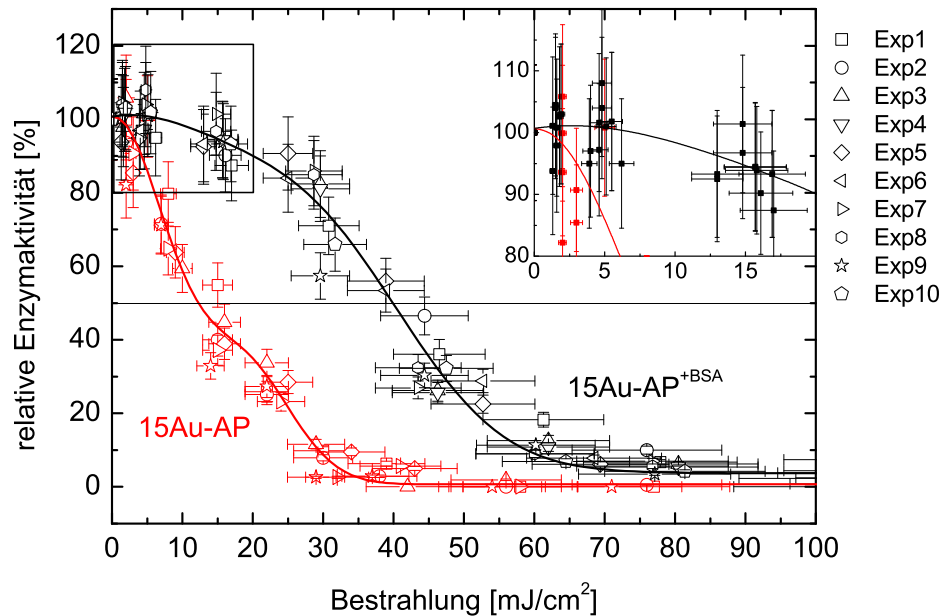
**Tabelle 4.4.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an Au-AP-Konjugaten ohne BSA-Stabilisierung. Für 6- und 30Au-AP konnten keine Wendepunkte aus der Anpassung nach Gl. 4.1 ermittelt werden.

bei letzteren deutlich niedrigere Fluenzen für eine gleichwertige Proteininaktivierung notwendig, wie der Vergleich von Tab. 4.4 mit Tab. 4.3 zeigt. So sind für eine 50%-ige Inaktivierung von 6Au-AP nur noch 59,3 statt 77,4 mJ/cm<sup>2</sup> nötig, bei 15Au-AP reichen nun etwa 12,1 statt 39,9 mJ/cm<sup>2</sup> aus und bei 30Au-AP nur 11,5 statt 22,7 mJ/cm<sup>2</sup>. Diese sehr deutlichen Unterschiede in der Inaktivierungskinetik zeigen die erhebliche Schutzwirkung durch die BSA-Moleküle.

Weiterhin ist in Abb. 4.13 zu erkennen, dass die Streuung der einzelnen Messwerte um die nach Gl. 4.1 angepassten Inaktivierungskurven geringer als bei den BSA-stabilisierten Konjugaten (vgl. 4.12) ist. Dies nach den Ausführungen in Abschnitt 4.1.3 auch verständlich, da das BSA-zu-Goldpartikel- bzw. das BSA-zu-Enzym-Verhältnis in praktisch jeder Probe variierte. Nach der Probenherstellung standen meist unterschiedliche Mengen von Goldkonjugaten zur Verfügung. Diese Probenmengen waren für eine individuelle Absorptionsmessung zur Bestimmung der jeweiligen Partikelkonzentration zu klein. Deshalb konnte die BSA-Zugabe zur Probenstabilisierung nicht an die aktuelle Partikelkonzentration angepasst werden. Offensichtlich bewirkten die dadurch hervorgerufenen unterschiedlichen BSA-zu-Partikel- bzw. BSA-zu-Enzym-Verhältnisse unterschiedliche Effizienzen bei der Enzyminaktivierung.

### 15Au-AP mit und ohne BSA-Stabilisierung im Direktvergleich.

Die Bestrahlungsexperimente an den Au-AP-Konjugaten mit und ohne BSA-Stabilisierung zeigen die gleichen charakteristischen Unterschiede bezüglich der Verwendung unterschiedlicher Partikelgrößen. Die 30 nm Partikel besit-



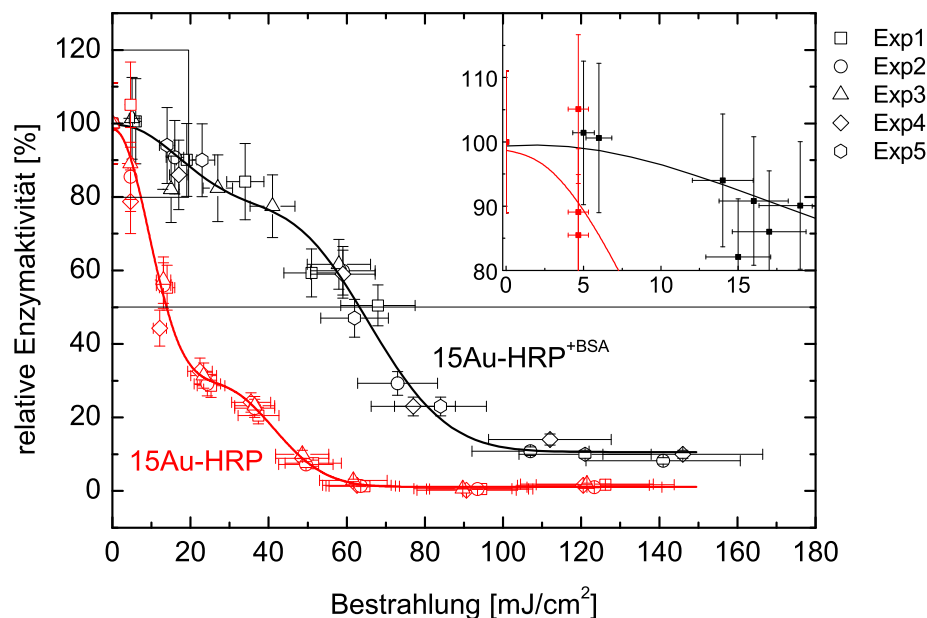
**Abbildung 4.14.** Vergleich der Inaktivierung von BSA-stabilisierten (schwarz) und unstabilisierten (rot) 15Au-AP nach Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen.

zen aufgrund ihres verhältnismäßig großen Absorptionsquerschnittes und im Vergleich zu 6- und 15Au kleinsten Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses bei gleicher Bestrahlung die größte Wirkung, die 6 nm Partikel die geringste. Allerdings waren die 30Au-Konjugate nicht lange haltbar (siehe Abschnitt 4.1.2). Die 15 nm Partikel besitzen dagegen beides, eine hohe Stabilität und eine gute Wirksamkeit bei der NALI. Entsprechend wurden die meisten Experimente auch mit den 15Au-Konjugaten durchgeführt.

Um den großen Einfluss der BSA-Moleküle bei der NALI nochmals zu verdeutlichen, sind in Abb. 4.14 die Inaktivierungskurven von BSA-stabilisierten und unstabilisierten 15Au-AP direkt gegenübergestellt. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass das BSA bei Bestrahlungen unterhalb von 20 mJ/cm² eine besonders starke Schutzwirkung auf die AP-Moleküle hat. So sind bis zu dieser Fluenz weniger als 10% Aktivitätsverlust bei den BSA-haltigen Konjugaten zu verzeichnen. Im Vergleich dazu tritt die gleiche 10%-ige Inaktivierung bei den unstabilisierten Proben bereits nach einer Bestrahlung von nur 4,2 mJ/cm² auf. Oberhalb von 20 mJ/cm² werden dann auch die stabilisierten

Konjugate mit zunehmender Bestrahlung mehr und mehr inaktiviert, wobei im Vergleich zu den unstabilisierten Proben immer erheblich höhere Fluenzen für die gleiche Wirkung notwendig sind. So zeigt der Vergleich der Tabellen 4.3 und 4.4, dass für eine 50%-ige Inaktivierung von BSA-stabilisierten und unstabilisierten 15Au-AP etwa  $39,9 \text{ mJ/cm}^2$  bzw.  $12,1 \text{ mJ/cm}^2$  erforderlich sind. Die BSA-Stabilisierung erhöht die für eine 50%-ige AP-Inaktivierung notwendige Bestrahlung also um das 3,3-fache.

**15Au-HRP mit und ohne BSA-Stabilisierung.** Um sicherzustellen, dass die Proteininaktivierung mittels lasererhitzter Nanopartikel kein AP-spezifischer Effekt ist, wurden Bestrahlungsexperimente an 15Au-HRP-Konjugaten durchgeführt. Die Meerrettich-Peroxidase (siehe Abschnitt 3.1.1) ließ sich mit den 15 nm großen Goldnanopartikeln stabil koppeln (siehe Abb. 4.3). In Abb. 4.15 und Tab. 4.5 sind die Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an BSA-stabilisierten und unstabilisierten 15Au-HRP-Konjugaten wieder direkt gegenübergestellt.



**Abbildung 4.15.** Vergleich der Inaktivierung von BSA-stabilisierten (schwarz) und unstabilisierten (rot) 15Au-HRP-Konjugaten nach Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen.

| Probe           | $H_{50\%}$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $W$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $R$ in %   |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------|------------|
| 15Au-HRP (+BSA) | 63,3(±8,9)                       | 36,4(±5,1)                | 10,6(±1,2) |
| 15Au-HRP        | 13,8(±1,9)                       | 26,7(±3,7)                | 1,1(±0,1)  |

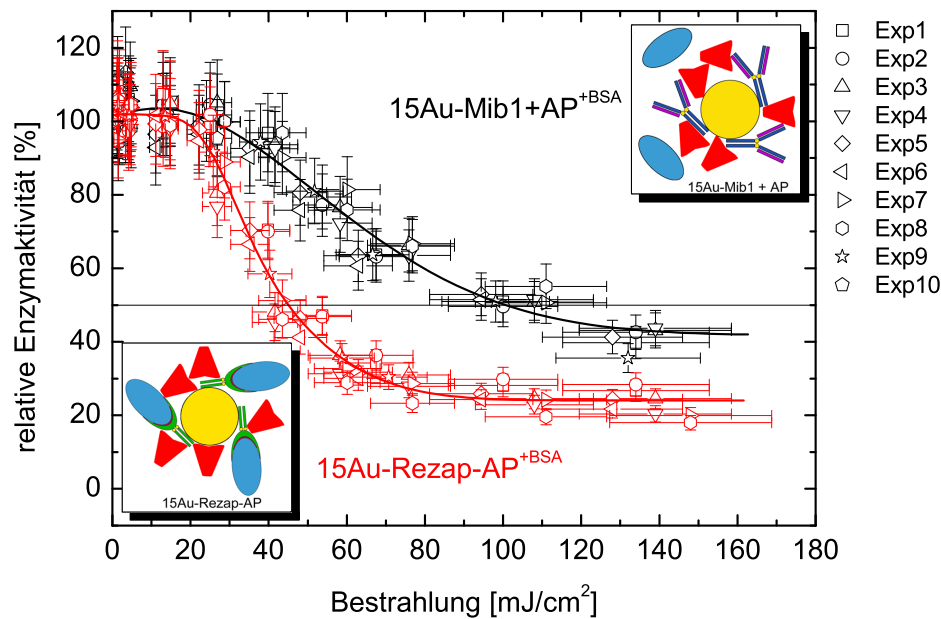
**Tabelle 4.5.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an den 15Au-HRP-Konjugaten mit und ohne BSA-Stabilisierung.

Bei diesen Proben ist die charakteristische Schulter im Kurvenverlauf besonders gut zu erkennen. Auch der Schutzeffekt durch die BSA-Moleküle zeigt sich wieder, hier sogar noch ausgeprägter als bei den 15Au-AP-Konjugaten. Während die 10%-ige Inaktivierung der unstabilisierten und BSA-stabilisierten Konjugate nach einer Bestrahlung von 4,8 bzw. 17,8 mJ/cm<sup>2</sup> noch vergleichbar mit der Wirkung bei 15Au-AP ist, scheint das BSA die HRP-Moleküle auch bei höheren Bestrahlungen zu stabilisieren. Hier steht einer Bestrahlung von 13,8 mJ/cm<sup>2</sup> für die 50%-ige Inaktivierung von unstabilisierten 15Au-HRP dann schon eine Fluenz von 63,3 mJ/cm<sup>2</sup> bei den stabilisierten Konjugaten gegenüber, was einer 4,6-fachen Erhöhung entspricht.

**15Au-Rezap-AP und 15Au-Mib1+AP.** Die Bestrahlungsexperimente an den Au-AP- und Au-HRP-Konjugaten haben gezeigt, dass sich direkt gekoppelte Enzyme durch lasererhitzte Nanopartikel effizient inaktivieren lassen. Um die Frage zu klären, ob bzw. bis zu welcher Fluenz die Wirkung der NALI räumlich begrenzt ist, wurden 15Au-Antikörper-Konjugate mit AP inkubiert und anschließend bestrahlt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 4.16 und Tab. 4.6 zusammengefasst.

| Probe         | $H_{50\%}$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $W$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $R$ in %   |
|---------------|----------------------------------|---------------------------|------------|
| 15Au-Rezap-AP | 45,0(±6,3)                       | N/A                       | 23,9(±2,6) |
| 15Au-Mib1+AP  | 100,6(±14,1)                     | N/A                       | 41,8(±4,6) |

**Tabelle 4.6.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an 15Au-Rezap-AP und 15Au-Mib1+AP (mit BSA-Stabilisierung). Aus den Fitkurven konnten keine Wendepunkte bestimmt werden.

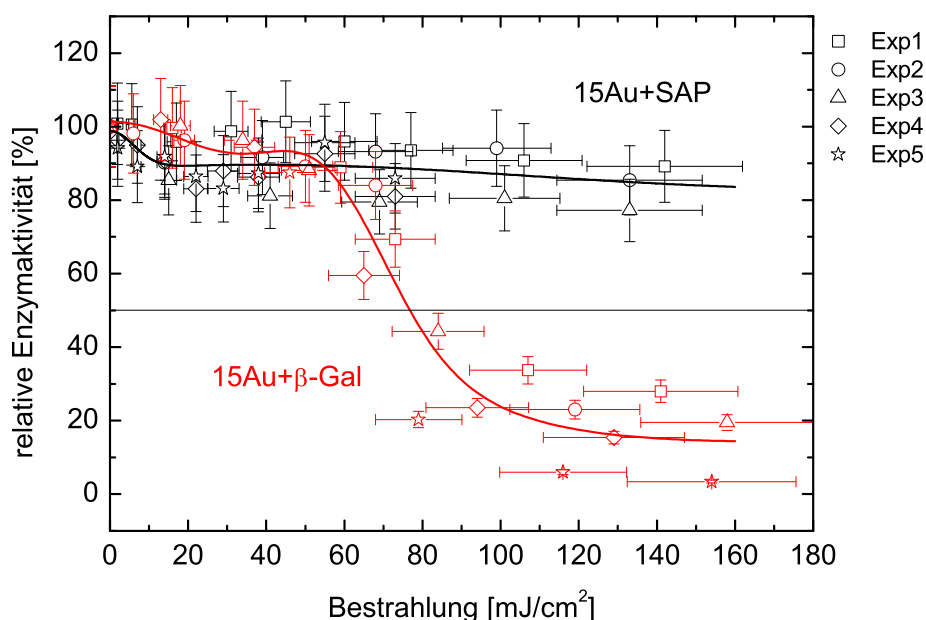


**Abbildung 4.16.** Aktivität von (über 15Au-Rezap) spezifisch gebundener (rot) sowie (durch 15Au-Mib1) ungebundener (schwarz) AP nach Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen. Alle Konjugate wurden nach der Aufreinigung mit BSA stabilisiert und anschließend mit einer identischen Menge an AP inkubiert. Um den bindenden und nicht-bindenden Charakter der Systeme zu betonen, wird hier die [-/+]-Nomenklatur verwendet: 15Au-Rezap-AP  $\rightarrow$  gebundenes AP, 15Au-Mib1+AP  $\rightarrow$  ungebundenes AP.

In dem Bestrahlungsdiagramm ist der unterschiedliche Inaktivierungsverlauf der beiden Konjugatesysteme gut zu erkennen. Für eine 50%-ige Enzym-inaktivierung ist bei den 15Au-Rezap-AP-Konjugaten eine Bestrahlung von etwa 45 mJ/cm<sup>2</sup> erforderlich. Bei dieser Bestrahlung verbleiben bei den unspezifischen 15Au-Mib1-Konjugaten dagegen noch über 86% aller AP-Moleküle intakt; die  $H_{50\%}$ -Dosis beträgt hier etwa 101 mJ/cm<sup>2</sup>. Dieses Ergebnis bestätigt einerseits die Annahme einer Fraktion von ungebundenen Enzymen bei den 15Au-Mib1-Konjugaten. Andererseits zeigt es, dass auch die ungebundenen Proteine bei hoher Bestrahlung inaktiviert werden. So ist die Restaktivität bei 15Au-Mib1+AP mit 41,8% erheblich geringer als die gemessene Aktivität im Überstand der Kontrollen von 75% (siehe Abb. 4.2). Das hier nur etwa die Hälfte der freien Enzyme intakt bleibt ist ein Hinweis auf einen nicht-lokalen Schädigungsmechanismus.

**15Au+SAP und 15Au+ $\beta$ -Gal.** Zur Untersuchung der nicht-lokalen Wirkung, die von den erhitzten Nanopartikeln ausgeht, wurden die nicht-bindende SAP sowie die kaum bindende  $\beta$ -Galactosidase in der 15Au-Lösung bestrahlt. Um vergleichbare Enzymkonzentrationen bzw. Protein-zu-Goldpartikel-Relationen wie bei den 15Au-AP-Proben zu erhalten, sind die zugesetzten Proteinnengen jeweils so berechnet worden, dass immer zwischen 4 und 7 Enzyme pro Goldpartikel in der Probenlösung waren. Außerdem wurden die Probenlösungen nach dem Inkubieren mit dem Lösungsmittel der Goldpartikel (welches durch Abzentrifugieren gewonnen wurde) auf eine optische Dichte von 0,4 verdünnt, um Abschattungseffekte bei der Bestrahlung zu vermeiden.

Die Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an 15Au+SAP und 15Au+ $\beta$ -Gal sind in Abb. 4.17 und Tab. 4.7 dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die SAP-Moleküle selbst nach höheren Bestrahlungen aktiv bleiben. Auch  $\beta$ -Gal bleibt zunächst bis etwa 55 mJ/cm<sup>2</sup> weitgehend intakt, um danach aber rapide zu denaturieren. Hier liegt die  $H_{50\%}$ -Dosis bei 76 mJ/cm<sup>2</sup>.



**Abbildung 4.17.** Enzymaktivität der ungebundenen Enzyme SAP (schwarz) und  $\beta$ -Gal (rot) in der 15Au-Lösung nach Bestrahlung mit 35 ps-Laserpulsen.

| Probe              | $H_{50\%}$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $W$ in mJ/cm <sup>2</sup> | $R$ in %          |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------|
| 15Au+SAP           | N/A                              | 31,6( $\pm 4,4$ )         | 82,2( $\pm 9,0$ ) |
| 15Au+ $\beta$ -Gal | 76,7( $\pm 10,7$ )               | 39,7( $\pm 5,6$ )         | 14,1( $\pm 1,6$ ) |

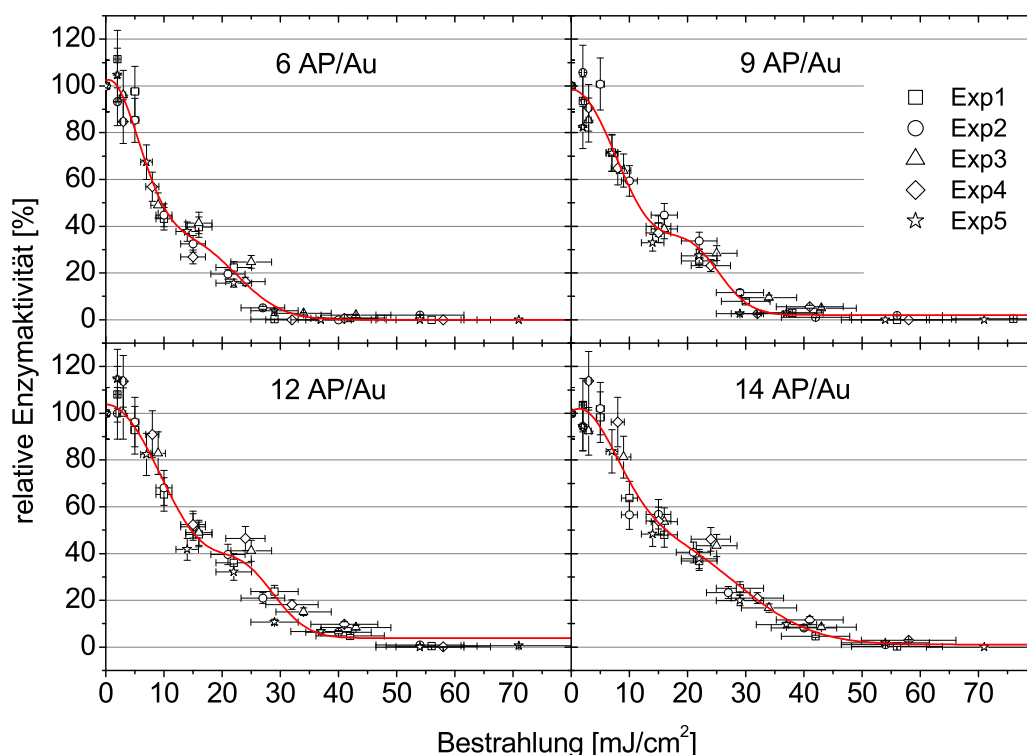
**Tabelle 4.7.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an ungebundenen Enzymen.

**Mit AP-Molekülen übersättigte 15Au-Lösung.** Für weitere Untersuchungen zu den nicht-lokalen Effekten wurden diverse Bestrahlungsexperimente an mit Enzymen übersättigten Goldlösungen (15 nm Partikel) durchgeführt. Dazu sind die zu der Goldlösung zugegebenen Proteinmengen jeweils so berechnet worden, dass das optimale Protein-zu-Goldpartikel-Verhältnis bei der Inkubation um definierte Werte überschritten wurde. Da die Goldpartikel nur eine begrenzte Zahl an Proteinen binden können (siehe Tab. 4.1), wird hierdurch eine bestimmte Fraktion an ungebundenen Enzymen in der Probenlösung erzeugt. Um eine gegenseitige Beeinflussung der freien AP-Moleküle zu minimieren, wurden geringe Übersättigungen gewählt. Nach der Inkubation der Goldpartikellösungen mit den Enzymen wurden diese mit Natriumphosphatpuffer auf eine optische Dichte von 0,4 verdünnt. Für die Bestimmung des freien Enzymanteils wurden die Proben unmittelbar vor den Bestrahlungsexperimenten aufgeteilt. Während der eine Teil dann bestrahlt worden ist, wurde mit dem anderen Teil das Kopplungsverhältnis mittels Ultrazentrifugation bestimmt (vgl. 4.1.2). Die Ergebnisse dieser kombinierten Experimente sind in Abb. 4.18 und Tab. 4.8 vorgestellt.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass mit zunehmender Übersättigung der Goldpartikellösung mit Enzymen erwartungsgemäß auch immer mehr unge-

| $\frac{AP}{Au}$ | $H_{50\%}$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $W$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $R$ [%]          | $A_P$ [%]         | $A_U$ [%]         |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 6               | 9,6( $\pm 1,7$ )                 | 15,5( $\pm 2,8$ )         | 0,0( $\pm 1,5$ ) | 80,5( $\pm 8,9$ ) | 19,5( $\pm 2,2$ ) |
| 9               | 11,4( $\pm 2,0$ )                | 17,7( $\pm 3,2$ )         | 2,0( $\pm 1,6$ ) | 73,5( $\pm 8,1$ ) | 26,5( $\pm 2,9$ ) |
| 12              | 14,7( $\pm 2,6$ )                | 20,5( $\pm 3,6$ )         | 3,8( $\pm 2,1$ ) | 68,9( $\pm 7,6$ ) | 31,1( $\pm 3,4$ ) |
| 14              | 16,3( $\pm 2,9$ )                | 20,6( $\pm 3,7$ )         | 1,1( $\pm 3,2$ ) | 68,0( $\pm 7,5$ ) | 32,0( $\pm 3,5$ ) |

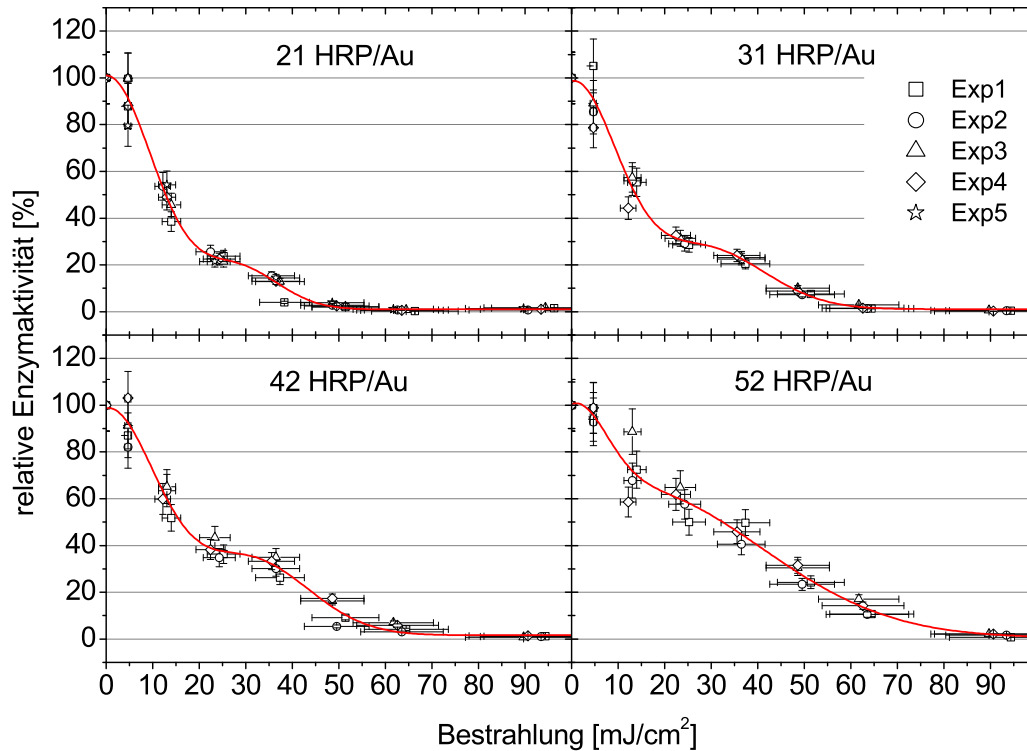
**Tabelle 4.8.** Ergebnisse aus den in Abb. 4.18 gezeigten Bestrahlungsdiagrammen mit den entsprechenden Aktivitätsverteilungen der freien Enzyme im Überstand ( $A_U$ ) und der gebundenen Enzyme im Pellet ( $A_P$ ).



**Abbildung 4.18.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an mit AP-Molekülen übersättigten 15Au-Lösungen.

bundene Moleküle in der Probenlösung verbleiben. Während die Aktivität des Pellets bei 6 AP/Au noch über 80% beträgt, wird bei 9 AP/Au nur noch ein Anteil von 73,5% beobachtet, gefolgt von 68,9% bei 12 AP/Au. Nichtsdestotrotz hätten in den 14 AP/Au-Proben theoretisch höchstens 50% der Enzyme binden dürfen. Dass hier trotzdem etwa 68% der Aktivität von gebundenen Proteinen herrühren, weist auf eine (zumindest teilweise) Bildung mehrlageriger Proteinschichten auf den Partikeln hin.

Weiterhin ist an Tab. 4.8 und in Abb. 4.18 zu erkennen, dass alle Proben eine sehr niedrige Restaktivität von maximal 3,8% aufweisen. Selbst bei den 2-fach übersättigten Proben (14 AP/Au), bei denen rund 32% der Enzyme ungebunden sind, ist ab ca. 50 mJ/cm² praktisch keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.



**Abbildung 4.19.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (35 ps-Pulse) an mit HRP-Molekülen übersättigten 15Au-Goldlösungen.

**Mit HRP-Molekülen übersättigte 15Au-Lösung.** Analog zu den eben beschriebenen Experimenten wurden auch Bestrahlungsexperimente an mit HRP-Molekülen übersättigten 15Au-Lösungen durchgeführt. Die Ergebnisse daraus sind in Abb. 4.19 und Tab. 4.9 präsentiert.

Die Diagramme zeigen im Prinzip das gleiche Verhalten wie bei den AP-haltigen Proben in Abb. 4.18: Mit zunehmender Proteinmenge nimmt der  $H_{50\%}$ -Schwellenwert zu, und die charakteristische Schulter, die sich hier bei etwa 20 mJ/cm² ausbildet, verschiebt sich in Richtung höherer Aktivität. Bei der Enzymaktivitätsbestimmung der zentrifugierten Konjugate fiel jedoch auf, dass die Kopplungseffizienz bei der HRP-Goldpartikel-Bindung sehr hoch war. Nach Tab. 4.1 sind für eine vollständige einlagige Bedeckung der Partikeloberfläche rund 23 Enzyme pro Partikel erforderlich. Hierbei beträgt die Kopplungseffizienz 99,3%. Dass bei einem Verhältnis von 52 HRP-

| $\frac{\text{HRP}}{\text{Au}}$ | $H_{50\%}$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $W$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $R$ [%]            | $A_P$ [%]            | $A_{\ddot{U}}$ [%] |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 21                             | 12, 8( $\pm 2, 2$ )              | 25, 9( $\pm 4, 6$ )       | 1, 0( $\pm 0, 7$ ) | 99, 3( $\pm 10, 9$ ) | 0, 7( $\pm 0, 1$ ) |
| 31                             | 13, 8( $\pm 2, 5$ )              | 26, 7( $\pm 4, 8$ )       | 1, 1( $\pm 1, 5$ ) | 98, 5( $\pm 10, 8$ ) | 1, 5( $\pm 0, 2$ ) |
| 42                             | 16, 0( $\pm 2, 8$ )              | 27, 3( $\pm 4, 9$ )       | 1, 6( $\pm 1, 3$ ) | 97, 3( $\pm 10, 7$ ) | 2, 7( $\pm 0, 3$ ) |
| 52                             | 32, 4( $\pm 5, 8$ )              | 21, 6( $\pm 3, 8$ )       | 0, 6( $\pm 2, 0$ ) | 92, 4( $\pm 10, 2$ ) | 7, 6( $\pm 0, 8$ ) |

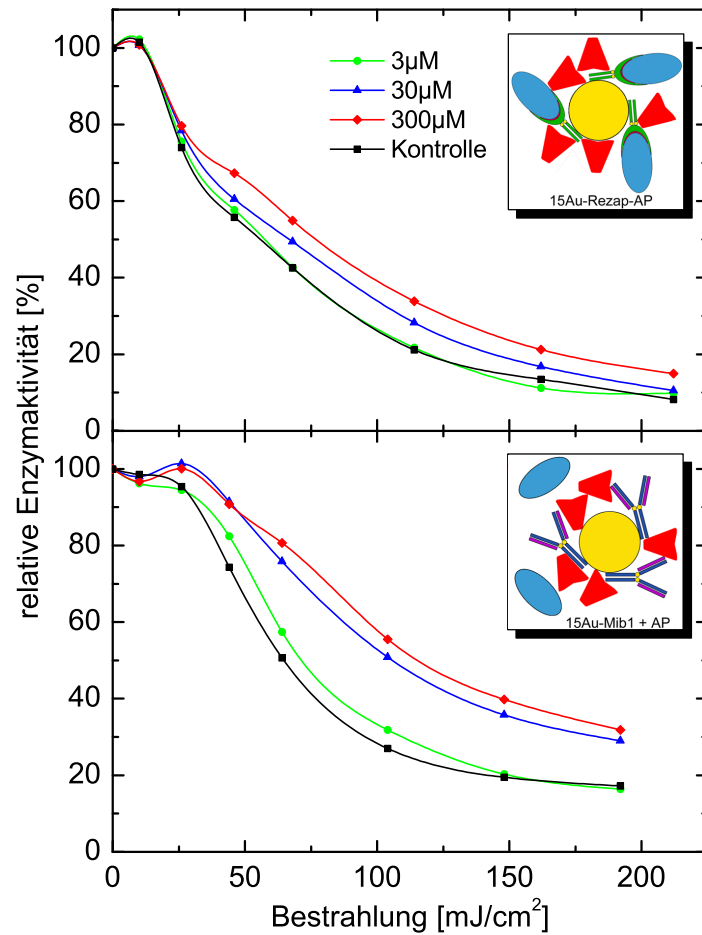
**Tabelle 4.9.** Ergebnisse aus den in Abb. 4.19 gezeigten Diagrammen mit den dazu gemessenen Aktivitätsverteilungen der freien Enzyme im Überstand ( $A_{\ddot{U}}$ ) und der gebundenen Enzyme im Pellet ( $A_P$ ).

Molekülen pro Goldpartikel noch über 92% der Enzyme an die Goldpartikel binden, ist ein weiterer Hinweis für die Ausbildung von Protein-Multilayern auf den Goldpartikeln. Nichtsdestotrotz verbleibt auch bei diesen Proben ein Anteil an ungebundenen Proteinen von etwa 7,6%, die bei höheren Bestrahlungen ebenfalls inaktiviert werden. Dies bedeutet in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Bestrahlungsexperimenten an 15Au+ $\beta$ -Gal und 15Au-Mib1+AP sowie den übersättigten 15Au-AP-Proben, dass auch ungebundene Proteine – ausgenommen SAP – inaktiviert werden können, wenn die Bestrahlung hoch genug ist.

**Bestrahlungsexperimente mit Radikalfängern.** Die schädigende nicht-lokale Wirkung der lasererhitzten Nanopartikel auf die freien Enzyme kann nach den Ausführungen in Abschnitt 2.3 verschiedene Ursachen haben. So sind z.B. chemische Effekte durch solvatisierte Elektronen, die bei der Partikelfragmentierung entstehen, erwähnt. Außerdem werden in extrem heißen Wasserdampf, insbesondere an stark erhitzten Metallflächen, die als Katalysator wirken können, H $\bullet$ - und OH $\bullet$ -Radikale infolge der thermischen Zersetzung des Wassers erzeugt [82, 137]. Um eine mögliche Schädigung der Proteine durch thermolytische Spaltprodukte des Wassers zu untersuchen, wurden den Proben vor den Bestrahlungsexperimenten verschiedene Mengen an Cysteamin zugesetzt. Cysteamin kann als *Radikalfänger* zur Verminderung biologischer Strahlenschäden (verursacht durch radiolytische Spaltprodukte des Wassers) bei radioaktiver Exposition eingesetzt werden [138]. Wie in Abschnitt 5.2 nochmal ausführlicher beschrieben wird, bewirkt das Cysteamin einen erheblichen *Konkurrenzschutz*, d.h. es fängt die schädlichen Radikale

noch vor dem Erreichen der Enzyme ab. Je höher die Cysteaminkonzentration ist und je größer der Abstand zwischen der Quelle der Radikale und den Proteinen ist, desto mehr Radikale können abgefangen werden.

Die Abstandsabhängigkeit der lasererzeugten Proteininaktivierung unter Cysteamin-Einfluss lässt sich am besten im direkten Vergleich zwischen  $^{15}\text{Au}$ -Rezap-AP und  $^{15}\text{Au}$ -Mib1+AP zeigen. In Abb. 4.20 sind die entsprechenden Bestrahlungsdiagramme dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl bei den  $^{15}\text{Au}$ -Rezap-AP-Konjugaten (oben) als auch bei  $^{15}\text{Au}$ -Mib1+AP (unten) eine zunehmende Konzentration von Cysteamin eine zunehmende Inaktivierungsresistenz bewirkt. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass das Cysteamin-zu-Enzym-Verhältnis 1000:1, 10.000:1 oder 100.000:1 betrug. Vor allem macht der Vergleich deutlich, dass das Cysteamin bei den ungebundenen (relativ weit von den Partikeln entfernten) AP-Molekülen in den  $^{15}\text{Au}$ -Mib1-Proben viel effizienter schützt. Ein weiteres Ergebnis aus diesen Experimenten ist, dass die Schutzwirkung von Cysteamin erst bei einer Bestrahlung im Bereich von etwa 15–20 mJ/cm<sup>2</sup> beginnt, bei geringeren Bestrahlungen sind die Inaktivierungskurven mit und ohne Cysteamin praktisch gleich.

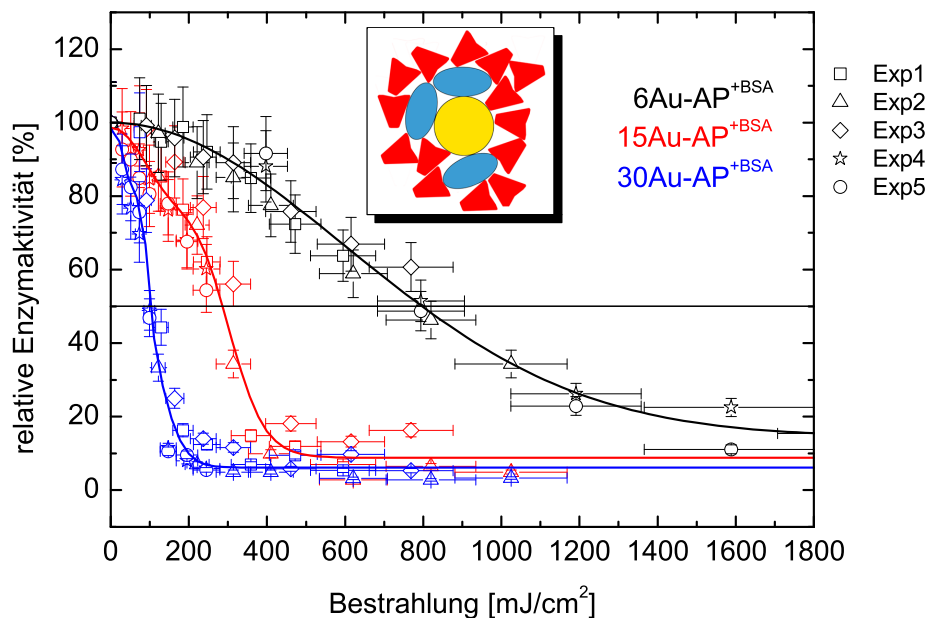


**Abbildung 4.20.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an 15Au-Rezap-AP (oben) und 15Au-Mib1+AP (unten) mit einer Cysteaminkonzentration von 0  $\mu\text{M}$  (schwarz, Kontrollen), 3  $\mu\text{M}$  (grün), 30  $\mu\text{M}$  (blau) und 300  $\mu\text{M}$  (rot). Die Partikel- und AP-Konzentrationen betrugen jeweils 1 nM bzw. 3 nM. Die Messpunkte entsprechen den Mittelwerten von je zwei Proben (zur besseren Übersicht wurden die Fehlerbalken weggelassen). Die durchgezogenen Linien sind einfache Splines durch die Messwerte, die eine Zuordnung für den Betrachter verbessern sollen.

### 4.2.2 Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen

**Au-AP mit BSA-Stabilisierung.** Analog zu den Experimenten mit den Pikosekundenpulsen, wurden zuerst die BSA-stabilisierten 6-, 15- und 30Au-AP-Konjugate mit den glatten gaußförmigen (geseedeten) Laserpulsen, wie sie im oberen Teil in Abb. 3.9 dargestellt sind, bestrahlt. Die Ergebnisse aus diesen Bestrahlungsexperimenten sind in Abb. 4.21 und Tab. 4.10 dargestellt.

Das Diagramm zeigt, dass auch bei Nanosekundenpuls-Bestrahlung die proteininaktivierende Wirkung der lasererhitzten Partikel mit zunehmender Teilchengröße zunimmt. Insbesondere ist der Unterschied zwischen den 6Au- und den 15Au-Konjugaten wieder am größten. Außerdem bestätigt der Vergleich mit den mit 35 ps-Pulsen bestrahlten identischen Proben (siehe Abb. 4.12) die Erwartung aus Abschnitt 2.1.3, dass bei 8,8 ns-Pulsen aufgrund der Wärmeleitung erheblich höhere Bestrahlungen für die gleiche Enzyminaktivierung erforderlich sind. So benötigen die 6Au-AP Konjugate für eine 50%-ige Proteininaktivierung eine Bestrahlung von 797 mJ/cm<sup>2</sup>. Die 15- und 30Au-AP-Konjugate erfordern für die gleiche Schädigung dagegen 285,7 bzw.



**Abbildung 4.21.** Verbleibende Enzymaktivität von BSA-stabilisierten Au-AP-Konjugaten nach Bestrahlung mit geseedeten 8,8 ns-Pulsen.

| Probe          | $H_{50\%}$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $W$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $R$ [%]            |
|----------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 6Au-AP (+BSA)  | 797, 0( $\pm 141, 9$ )           | N/A                       | 14, 5 $\pm$ (2, 7) |
| 15Au-AP (+BSA) | 285, 7( $\pm 50, 7$ )            | 174, 0( $\pm 31, 0$ )     | 8, 8 $\pm$ (2, 8)  |
| 30Au-AP (+BSA) | 102, 6( $\pm 18, 3$ )            | 66, 9( $\pm 11, 9$ )      | 6, 2 $\pm$ (1, 8)  |

**Tabelle 4.10.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (8,8 ns-Pulse) an BSA-stabilisierten Au-AP-Konjugaten.

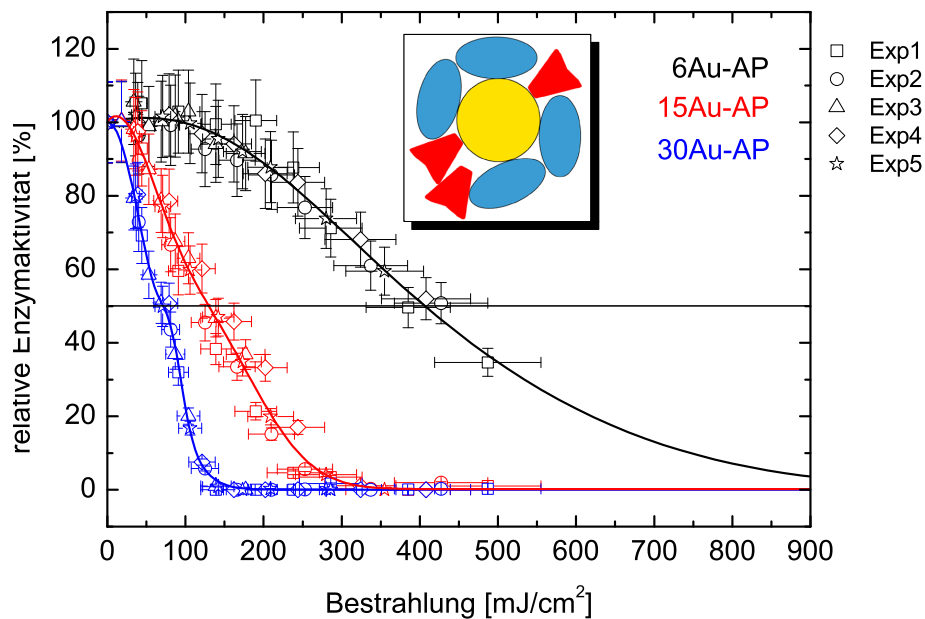
102,6 mJ/cm<sup>2</sup>.

Weiterhin ist in Abb. 4.21 wieder die charakteristische Schulter im Kurvenverlauf von 15- und 30Au-AP zu erkennen, deren Wendepunkt aus den Fitkurven zu 174 mJ/cm<sup>2</sup> bzw. 66,9 mJ/cm<sup>2</sup> berechnet wurde. Schließlich fällt beim Vergleich der Tabellen 4.10 und 4.3 auch noch auf, dass die Restaktivitäten bei den mit 8,8 ns-Pulsen bestrahlten Proben allesamt etwas höher als bei den ps-Experimenten sind.

**Au-AP ohne BSA-Stabilisierung.** Als nächstes sind in Abb. 4.22 und Tab. 4.11 die Ergebnisse aus den Nanosekunden-Bestrahlungsexperimenten an unstabilisierten Au-AP-Konjugaten zusammengefasst. Beim Vergleich mit den stabilisierten Proben in Abb. 4.21 fällt vor allem wieder die erhebliche Schutzwirkung durch die BSA-Moleküle auf. So benötigen die unstabilisierten Konjugate nur etwa die Hälfte der Bestrahlung für die gleiche Inaktivierung. Für eine 50%-ige Enzyminaktivierung sind bei 6Au-AP nun 406,6 mJ/cm<sup>2</sup>, bei 15Au-AP 129,7 mJ/cm<sup>2</sup> und bei 30Au-AP nur noch 71,4 mJ/cm<sup>2</sup> nötig. Bemerkenswert ist außerdem die niedrige Restaktivität bei allen drei Partikelgrößen, die ohne BSA-Stabilisierung praktisch null wird.

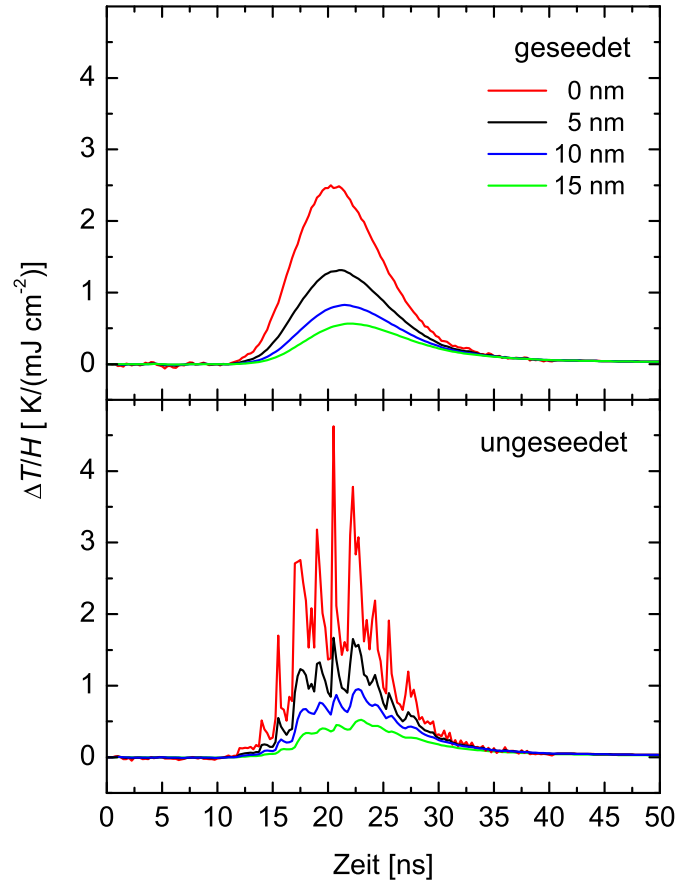
| Probe   | $H_{50\%}$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $W$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $R$ [%]           |
|---------|----------------------------------|---------------------------|-------------------|
| 6Au-AP  | 406, 6( $\pm 72, 4$ )            | N/A                       | 0, 0 $\pm$ (2, 5) |
| 15Au-AP | 129, 7( $\pm 23, 1$ )            | 121, 7( $\pm 21, 8$ )     | 0, 2 $\pm$ (1, 6) |
| 30Au-AP | 71, 4( $\pm 12, 7$ )             | 69, 6( $\pm 12, 4$ )      | 0, 1 $\pm$ (0, 4) |

**Tabelle 4.11.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an unstabilisierten Au-AP-Konjugaten.



**Abbildung 4.22.** Enzymaktivität von unstabilisierten Au-AP-Konjugaten nach Bestrahlung mit geseedeten 8,8 ns-Pulsen.

**Geseedete und ungeseedete Laserpulse – Temperaturrechnungen für 15Au.** Zeitlich glatte gaußförmige Nanosekundenpulse sind technisch nur aufwändig zu erzeugen. Normalerweise werden die Laser mit mehreren longitudinalen Moden betrieben, die statistisch interferieren und zu sehr hohen Spitzenleistungen führen. Dass unterschiedliche Enzyminaktivierungen bei Bestrahlung mit geseedeten und ungeseedeten Laserpulsen erwartet werden können, zeigen die in Abb. 4.23 dargestellten Temperaturrechnungen am Beispiel der 15Au-Partikel. Die beiden Kurven wurden durch Faltung der in Abb. 3.9 gezeigten normierten zeitlichen Laserpulsformen mit Gl. 2.19 unter Verwendung der Gl. 2.15 erhalten. Die Simulationen zeigen, dass die Spikes der ungeseedeten Laserpulse kurzzeitig deutlich höhere Spitzentemperaturen im Partikel erzeugen. Dieser Effekt wird jedoch bereits in 5 nm Abstand erheblich reduziert, weil das Wasser aufgrund seiner hohen Wärmekapazität eine stark ausgleichende Wirkung hat.



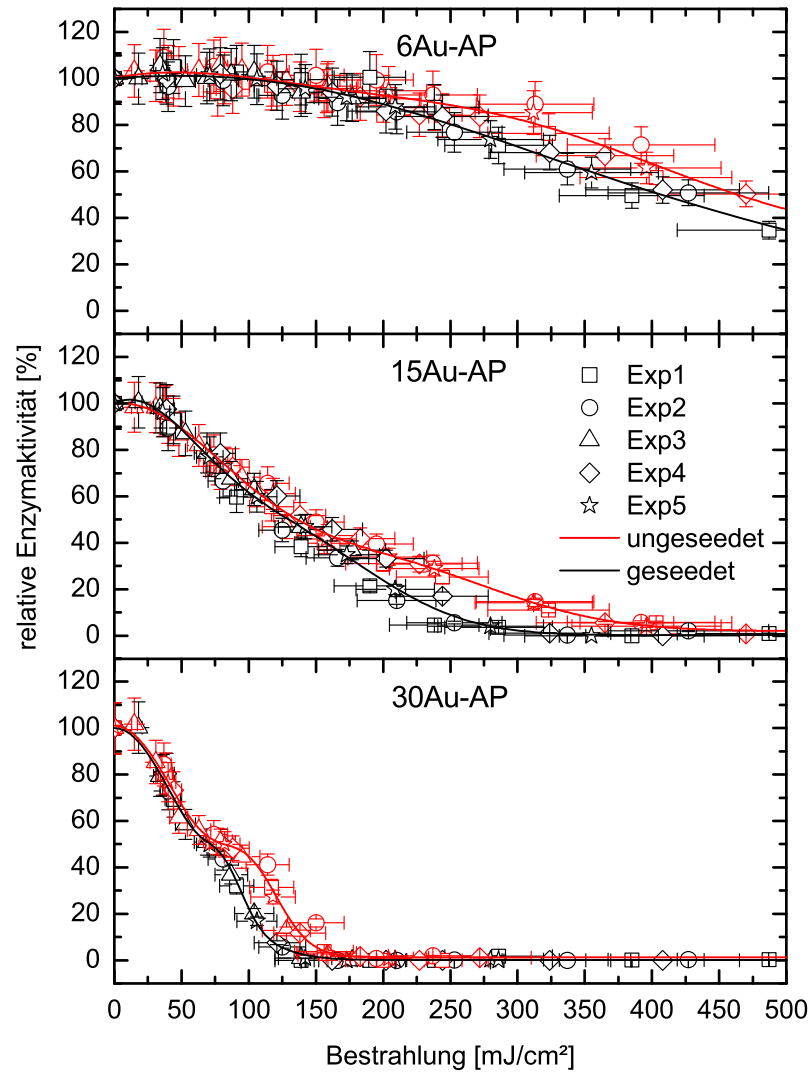
**Abbildung 4.23.** Temperaturentwicklungen bei Bestrahlung von 15 nm Goldpartikeln in Wasser mit gaußförmigen (geseedeten) Pulsen (oben) und (ungeseedeten) Pulsen, die starke Leistungsschwankungen aufweisen (unten). Die Temperaturentwicklung des Partikels ist in Rot dargestellt und die in 5, 10 und 15 nm Abstand in Schwarz, Blau und Grün.

**Geseedete und ungeseedete Pulse – Bestrahlung von Au-AP.** Als letztes sollen in diesem Abschnitt noch die Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an unstabilisierten Au-AP-Konjugaten mit den ungeseedeten 8,7 ns-Pulsen präsentiert werden, beschrieben durch die roten Messpunkte und Fitkurven in Abb. 4.24. Um die Unterschiede zu den durch die glatten Pulse erzeugten Inaktivierungen aufzuzeigen, sind die entsprechenden Messdaten aus Abb. 4.22 nochmal direkt in Schwarz gegenübergestellt. Die aus den Fitkurven ermittelten Werte sind in den Tabellen 4.11 und 4.12 zusammengefasst.

| Probe   | $H_{50\%}$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $W$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] | $R$ [%]             | $H_T$ [mJ/cm <sup>2</sup> ] |
|---------|----------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 6Au-AP  | 463, 9( $\pm 82, 6$ )            | 222, 0( $\pm 39, 5$ )     | $30, 0 \pm (18, 0)$ | 158, 0( $\pm 28, 0$ )       |
| 15Au-AP | 136, 2( $\pm 24, 2$ )            | 208, 7( $\pm 37, 2$ )     | $2, 0 \pm (1, 9)$   | 135, 4( $\pm 24, 0$ )       |
| 30Au-AP | 81, 8( $\pm 14, 4$ )             | 83, 7( $\pm 14, 9$ )      | $1, 2 \pm (1, 1)$   | 69, 5( $\pm 12, 4$ )        |

**Tabelle 4.12.** Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten mit ungeseedeten 8,7 ns-Pulsen an unstabilisierten Au-AP-Konjugaten. Zusätzlich ist in dieser Tabelle noch die charakteristische Schwellenbestrahlung  $H_T$  aufgeführt, ab der die roten und schwarzen Fitkurven in Abb. 4.24 jeweils auseinanderlaufen.

Die Bestrahlungsdiagramme zeigen, dass bei allen drei Partikelgrößen ab einer bestimmten Bestrahlung  $H_T$  die Inaktivierung durch die geseedeten Laserpulse geringfügig größer bzw. effektiver ist. Dieser Effekt scheint kein Artefakt oder systematischer Fehler zu sein, da die Bestrahlungsexperimente mit geseedeten und ungeseedeten Pulsen immer abwechselnd durchgeführt und dabei die Laserstrahlparameter sorgfältig überwacht wurden. Außerdem scheinen die Schultern bei der geseedeten und ungeseedeten Laserinaktivierung bei der gleichen Bestrahlung, die mit  $H_T$  weitgehend übereinstimmt, zu beginnen, wobei die Schultern der roten Kurven deutlich ausgeprägter sind.



**Abbildung 4.24.** Vergleich der Inaktivierung von 6-, 15- und 30Au-AP-Konjugaten nach Bestrahlung mit geseedeten (schwarze Messpunkte) und ungeseedeten (rote Messpunkte) Laserpulsen. Die insgesamt 10 Bestrahlungsexperimente wurden immer abwechselnd im geseedeten und ungeseedeten Modus des Nd:YAG-Lasers durchgeführt.

### 4.3 Langzeit-Temperaturdenaturierung

**Denaturierung von AP und HRP bei 70 °C.** Um ein Bild davon zu bekommen, ob und wie sich die Kopplung von AP und HRP an die Goldpartikel mit und ohne Zugabe von BSA-Molekülen auf die temperaturabhängige Denaturierung der Enzyme auswirkt, wurden jeweils 4 verschiedene Proben gleichzeitig in einem auf 70 °C erwärmten Wasserbad für definierte Zeiten erwärmt und sofort danach in einem 0 °C kalten Wasserbad wieder abgekühlt. Als Proben wurden

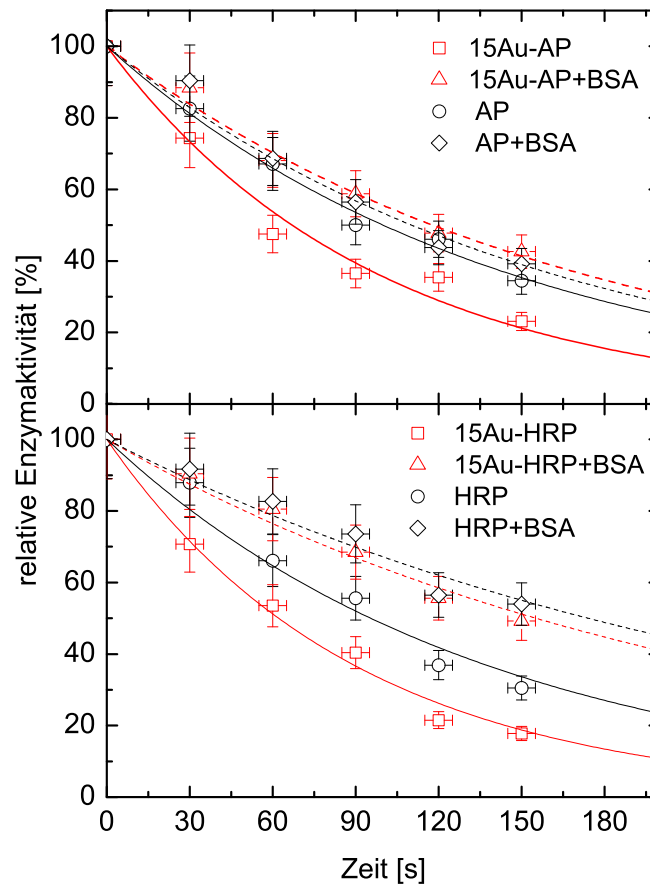
1. unstabilisierte 15Au-AP- und 15Au-HRP-Konjugate,
2. mit 100 BSA-Molekülen pro 15Au-AP/HRP stabilisierte Konjugate,
3. freie AP/HRP-Moleküle und
4. freie Enzyme mit einer zur Probe 2 identischen BSA-Konzentration

in Natriumphosphatpuffer verdünnt (Partikelkonzentration 1 nM) und dann erwärmt.

Abb. 4.25 zeigt die aus diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse. Die Messdaten, die der verbleibenden relativen Enzymaktivität  $A(t)$  nach der Heizdauer  $t$  entsprechen, wurden mit einer exponentiellen Zerfallsfunktion  $A(t) = \exp(-\alpha t)$  angepasst, wobei  $\alpha$  die aus dem Fit ermittelte Zerfallskonstante ist. In Tab. 4.13 sind die so erhaltenen Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten zusammengefasst.

| Probe        | $\alpha$ [1/s]           | $T_{1/2}$ [s]       |
|--------------|--------------------------|---------------------|
| 15Au-AP      | 0,01034( $\pm 0,00062$ ) | 67,0( $\pm 4,0$ )   |
| 15Au-AP+BSA  | 0,00588( $\pm 0,00022$ ) | 117,9( $\pm 4,4$ )  |
| AP           | 0,00694( $\pm 0,00022$ ) | 99,9( $\pm 3,2$ )   |
| AP+BSA       | 0,00628( $\pm 0,00035$ ) | 110,4( $\pm 6,2$ )  |
| 15Au-HRP     | 0,01115( $\pm 0,00045$ ) | 62,2( $\pm 2,5$ )   |
| 15Au-HRP+BSA | 0,00447( $\pm 0,00021$ ) | 155,1( $\pm 7,2$ )  |
| HRP          | 0,00726( $\pm 0,00048$ ) | 95,5( $\pm 6,3$ )   |
| HRP+BSA      | 0,00398( $\pm 0,00027$ ) | 174,2( $\pm 11,8$ ) |

**Tabelle 4.13.** Fitparameter aus den Messpunkten in Abb. 4.25 sowie die daraus berechneten Halbwertszeiten  $T_{1/2}$  bei der thermischen Denaturierung bei 70 °C.



**Abbildung 4.25.** Thermische Denaturierung von verschiedenen AP- (oben) und HRP-Systemen (unten) bei 70 °C. Die Fitkurven der BSA-haltigen Proben sind als gestrichelte Linien dargestellt, die der BSA-freien Proben als durchgezogene Linien.

Insgesamt zeigen die Inaktivierungskurven, dass die an die Goldpartikel gebundenen Enzyme erheblich schneller thermisch denaturieren als die freien Enzyme. Dies gilt allerdings nur für die Proben ohne BSA-Zusatz. Sobald BSA dazugegeben wird, sind die Denaturierungsraten der 15Au-Enzym-Konjugate vergleichbar oder sogar geringer als die der BSA-freien ungebundenen Enzyme. Demnach wirkt das BSA der temperaturbedingten Denaturierung der Proteine entgegen. Außerdem fällt in Abb. 4.25 auf, dass die BSA-Moleküle die ungebundenen HRP-Moleküle sehr effektiv vor einer thermischen Denaturierung schützen. Bei freier AP ist dieser Schutzeffekt nur schwach ausgeprägt; die Halbwertszeit verlängert sich hier nur um 10%.

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Voruntersuchungen

**Keine direkte Proteinschädigung durch Ein- oder Zwei-Photonen-Absorption bei 527 bzw. 532 nm.** Wie Abb. 4.1 zeigt, trat eine direkte Photoschädigung der Proteine aufgrund ihrer geringen Lichtabsorption bei 527 nm nicht auf. Dies wurde durch die Bestrahlungsexperimente an freien Proteinen mit 35 ps-Pulsen bis zu einer Bestrahlung von 100 – 110 mJ/cm<sup>2</sup> nachgewiesen. Außerhalb der Fehlergrenzen ist hier keine signifikante Aktivitätsreduktion zu erkennen. Bei Bestrahlungsexperimenten mit 6 ns-Pulsen beobachtete RADT auch nach hohen Bestrahlungen von 1000 mJ/cm<sup>2</sup> noch keine Inaktivierung von freien Enzymen [16]. Dies wurde auch durch in dieser Arbeit durchgeführte Experimente mit 8,8 ns-Pulsen bestätigt. Somit lässt sich feststellen, dass eine nennenswerte Inaktivierung der verwendeten Enzyme infolge einer direkten Schädigung durch Ein- oder Zwei-Photonen-Absorption bei den in dieser Arbeit verwendeten Bestrahlungsparametern nicht auftritt.

**15 nm Partikel bilden die stabilsten Konjugate.** Für die Anfertigung der verschiedenen Konjugate wurden zahlreiche Kopplungsversuche, wie sie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben sind, mit allen Kombinationen von Partikelgrößen und Enzymen durchgeführt. Dabei hatte sich immer wieder gezeigt, dass die 15 nm Partikel die stabilsten Konjugate bilden. So ließen sich bis

auf  $\beta$ -Gal und SAP alle Proteine mit den 15 nm Partikeln dauerhaft koppeln, wobei deren biologische Funktion über Wochen weitestgehend erhalten blieb.

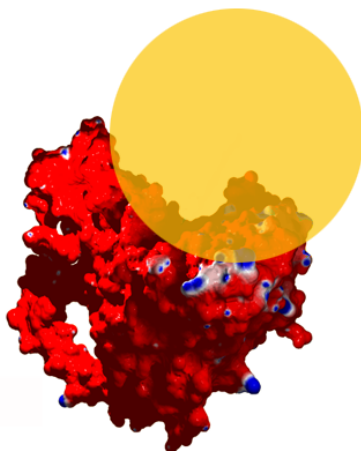
Zwar ließen sich auch die 6 und 30 nm Partikel mit AP und – zumindest kurzfristig – mit HRP konjugieren; diese Proben, insbesondere die ohne BSA-Stabilisierung, waren jedoch nach wenigen Stunden bis Tagen nicht mehr für die Experimente geeignet. Dabei waren die Effekte, welche die Proben unbrauchbar gemacht hatten, unterschiedlich. Die 6Au-AP-Konjugate blieben enzymatisch aktiv, neigten aber zur Verklumpung infolge einer vielfachen Aggregation. Bei den 30Au-AP-Konjugaten wurde dagegen nach wenigen Tagen fast keine Aktivität mehr in den Proben gemessen. Bei den 6- und 30Au-HRP-Konjugaten trat bereits nach wenigen Stunden eine erhebliche Aggregation auf. Eine Übersicht über die Bindungsstabilität aller hergestellten Konjugate ist in Tab. 5.1 gezeigt.

| Protein      | 6Au | 15Au | 30Au |
|--------------|-----|------|------|
| AP           | +   | ++   | +    |
| HRP          | +   | ++   | O    |
| $\beta$ -Gal | –   | –    | –    |
| SAP          | –   | –    | –    |
| Mib-1        |     | ++   |      |
| Rezap        |     | ++   |      |

**Tabelle 5.1.** Stabilität der hergestellten Konjugate. ++ sehr gute Stabilität, + gute Stabilität, O befriedigende Stabilität, – Konjugate konnten nicht hergestellt werden.

Die Neigung der 6Au-AP-Konjugate zur Aggregation lässt sich gut durch das in Tab. 4.1 beschriebene niedrige Protein-zu-Partikel-Verhältnis von nur 1,4:1 erklären. Demnach kommt auf die Mehrzahl der Goldpartikel jeweils nur ein einziges Enzym. Durch geometrische Überlegung lässt sich daraus schließen, dass bei den BSA-freien Proben Flächenanteile des Goldpartikels ungeschützt verbleiben, was zu Anlagerungen (siehe Abb. 3.6 b) führen kann. Hinzu kommt, dass die Partikelkonzentration bei den 6Au-Konjugaten bei gleicher OD etwa 16-mal höher ist als bei den 15Au-Konjugaten, was die Wahrscheinlichkeit für eine Wechselwirkung zwischen den Konjugaten erhöht.

Die Anlagerung von 6Au-AP-Konjugaten untereinander könnte auch ei-



**Abbildung 5.1.** Modellvorstellung bei der direkten Kopplung von 6Au und einem AP-Monomer.

ne Erklärung für den starken Aktivitätsverlust sein, der nach der Kopplung von 6Au und AP beobachtet wurde (siehe Abb. 3.2). So könnten die aktiven Zentren bzw. Substratbindungsstellen der Enzyme innerhalb der 6Au-AP-Komplexe durch gegenseitige Beeinflussung der Konjugate behindert werden. Außerdem ist vorstellbar, dass die Goldpartikel bevorzugt in der Nähe des aktiven Zentrums der AP-Monomere binden, denn die kationischen Bereiche des Proteins sind dort besonders ausgeprägt (siehe Abb. 3.1). Werden die Größenverhältnisse von 6Au und AP berücksichtigt, könnte sich z. B. das in Abb. 5.1 schematisch dargestellte System ergeben. Nach diesem Modell könnte das elektrostatische Feld des Goldpartikels die Proteinstruktur nahe des aktiven Zentrums etwas verzerren oder das Enzym zumindest in seiner Dynamik einschränken. Möglicherweise verdeckt das Partikel auch (zumindest teilweise) die Substratbindungsstelle.

Bei den 30Au-Konjugaten war wahrscheinlich eine eher schwache elektrostatische Bindung der Enzyme an die Oberfläche der größeren Goldnanopartikel für deren eingeschränkte Stabilität verantwortlich. Auf eine verminderte Bindungsstärke kann aus den Beobachtungen während einiger Kopplungsexperimente geschlossen werden. So traten bei den Konjugationsversuchen von 30Au mit HRP und  $\beta$ -Gal die in Abb. 3.7 illustrierten Farbumschläge nach Zugabe der NaCl-Lösung trotz hoher Proteinmengen (mehrfache Übersätti-

gung) und Optimierung des pH-Wertes auf. Der Aggregationsprozess nach NaCl-Zugabe verlief bei HRP zwar erheblich langsamer als bei  $\beta$ -Gal; grundsätzlich konnte die Aggregation aber nicht verhindert werden.

Einen weiteren Hinweis auf eine verminderte Bindungsstärke bei den 30Au-Konjugaten gibt die praktisch gleich bleibende Enzymaktivität von AP nach der Bindung an die 30Au-Partikel (siehe Abb. 3.2). Während bei 15Au-AP und vor allem bei 6Au-AP ein Verlust der Enzymaktivität nach der Konjugation registriert wurde, war dieser Effekt bei 30Au-AP nicht zu erkennen. Möglicherweise üben die 30 nm Partikel eine geringere elektrostatische Anziehung auf die gebundenen Proteine aus und können daher keine verzerrten Proteinstrukturen bewirken. Es ist aber auch denkbar, dass die Proteine aufgrund der Größe der 30Au-Partikel keine Strukturänderungen in der Nähe der aktiven Zentren erfahren.

Schließlich fällt bei der Betrachtung der Werte in Tab. 4.1 auf, dass die 30 nm Partikel etwa dreimal mehr AP-Moleküle binden als die 15 nm Partikel. Das Verhältnis ihrer Oberflächen beträgt allerdings 4:1. Theoretisch hätten die 30Au-Partikel also 7 weitere Proteine aufnehmen können. Dass die Goldpartikel insgesamt weniger Proteine binden als erwartet, kann als ein weiteres Indiz für eine geringere Bindungsstärke aufgefasst werden.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass 15Au-Partikel am besten für die Herstellung von stabilen Goldpartikel-Protein-Konjugaten geeignet sind. Diese Beobachtung wurde auch von RAHMANZADEH gemacht [124].

### **Schmelzen von 15Au bei Bestrahlungen zwischen 13,4 – 24,7 mJ/cm<sup>2</sup>.**

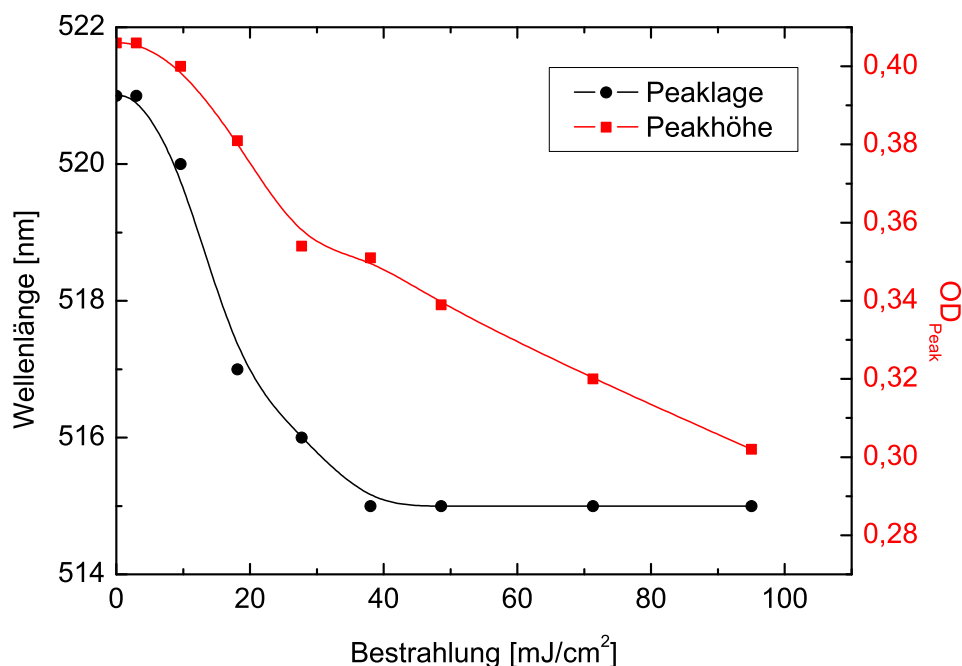
Die TEM-Aufnahmen (siehe Abb. 4.7) zeigen, dass bei einer Bestrahlung von 13,4 mJ/cm<sup>2</sup> (35 ps-Pulse) noch keine Veränderung der sichtbaren Partikelcharakteristik (Form und Verteilung) auftritt. Bei der Aufnahme der mit 24,7 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Probe ist dann eine Aggregation der Partikel zu größeren Komplexen zu erkennen. Außerdem sind die Partikel nach dieser Bestrahlung deutlich runder geworden, was auf ein Aufschmelzen hindeutet. Nach den TEM-Untersuchungen findet ein formverändernder Schmelzprozess also in einem Fluenzbereich zwischen 13,4 und 24,7 mJ/cm<sup>2</sup> statt.

Einerseits überrascht dieses Ergebnis ein wenig, da nach den Temperatur-

rechnungen für 15Au und 35 ps (siehe Abb. 2.4) bei einer Bestrahlung von  $13,4 \text{ mJ/cm}^2$  eine Spitzentemperatur bis deutlich über den Schmelzpunkt von Gold ( $1064^\circ\text{C}$ ) hinaus im Partikel erzeugt wird. Andererseits dauert hierbei die Temperaturerhöhung um über  $1000^\circ\text{C}$  insgesamt nur weniger als 60 ps. Dieser sehr kurzzeitige Temperatursprung reicht wahrscheinlich nicht für ein formveränderndes Aufschmelzen des Partikels aus. Hinzu kommt, dass mit dem *Einsetzen* des Schmelzvorgangs, der nach den Erläuterungen in Abschnitt 2.2.2 sogar deutlich unterhalb von  $1064^\circ\text{C}$  liegt, ein Teil der absorbierten Laserpulsenergie erst für die latente Schmelzwärme (Gold:  $63 \text{ kJ/kg}$ ) aufgewendet werden muss, bevor das (dann aufgeschmolzene) Partikel noch weiter erhitzt wird. Die hierzu notwendige Bestrahlung beträgt bei allen drei Partikelgrößen ca.  $1,3 \text{ mJ/cm}^2$ . Zusätzlich sinkt beim Aufschmelzen der Partikel die Absorption um bis zu 75% ab, was einer weiteren Temperaturerhöhung ebenfalls entgegenwirkt [20, 38].

**Erwarteter Schmelzbeginn von 15Au bei  $4,3 \text{ mJ/cm}^2$ .** Mit dem Einsetzen des Schmelzprozesses wirken also gleich mehrere Effekte einer weiteren Temperaturerhöhung des Partikels entgegen. Daher sind die in Abb. 2.4 gezeigten Temperaturrechnungen ab dem Schmelzpunkt nicht mehr gültig. Für den tatsächlichen Beginn eines Aufschmelzens einer dünnen flüssigen Goldschicht um den kristallinen Kern des Teilchens wird nach PLECH *et al.* eine Temperaturerhöhung von über  $529^\circ\text{C}$  benötigt (vgl. Abschnitt 2.2.2) [29]. Dies entspricht bei 35 ps-Pulsen nach den Temperaturrechnungen für 15Au einer Bestrahlung von nur  $4,3 \text{ mJ/cm}^2$ , was auch gut mit den Ergebnissen von PUSTOVALOV übereinstimmt (siehe Abb. 2.13). Es ist also oberhalb einer Bestrahlung von  $4,3 \text{ mJ/cm}^2$  mit dem Einsetzen des Schmelzens der 15 nm Goldpartikel zu rechnen.

**Beginn der Partikelaggregation zwischen  $13,4$  und  $18,1 \text{ mJ/cm}^2$ .** In Abb. 4.6 ist zu erkennen, dass die Absorptionsspektren der Konjugate bis zu einer Bestrahlung von  $9,6 \text{ mJ/cm}^2$  sehr ähnlich sind. Zwischen  $9,6$  und  $18,1 \text{ mJ/cm}^2$  tritt dann eine Abnahme sowie eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen auf (siehe Abb. 5.2).



**Abbildung 5.2.** Änderungen des Absorptionsmaximums von 15Au-HRP nach Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen. Die Abnahme des Absorptionsmaximums ist in Rot und seine Verschiebung in Schwarz dargestellt. Die Daten sind der Abb. 4.6 entnommen.

Eine Proteinhülle um das Goldpartikel resultiert in einer leicht erhöhten Brechzahl des umgebenden Mediums und bewirkt damit eine wenige Nanometer große Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen (Rotverschiebung) [139, 140]. Verschiebt sich die Absorption dagegen zu kleineren Wellenlängen, kann im Umkehrschluss gefolgert werden, dass gebundene Proteine abgelöst wurden. Ohne die schützende Proteinhülle können sich die Partikel zu Komplexen verbinden und bei hinreichender Bestrahlung bzw. Temperatur sogar zusammenschmelzen. Wegen des Verlustes der Plasmonenresonanz der aggregierten Partikel wird eine Abnahme der Absorption der Probe beobachtet, was die Abbildungen 4.6 und 5.2 ebenfalls zeigen.

Die Annahme einer Partikelaggregation wird durch die TEM-Aufnahmen (siehe Abb. 4.7) der mit  $24,7 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  bestrahlten Probe bestätigt. Hier zeigt sich eine Zusammenlagerung der Partikel zu größeren Komplexen. Eine Bestrahlung mit  $94 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  bewirkt sogar eine Verschmelzung der Partikel. Bei

der mit  $13,4 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlten Probe ist dagegen noch keine Aggregation erkennbar. Werden die Ergebnisse aus den TEM-Untersuchungen und den Absorptionsmessungen kombiniert, kann geschlussfolgert werden, dass der Aggregationsprozess im Bereich zwischen  $13,4$  und  $18,1 \text{ mJ/cm}^2$  einsetzt.

**Korrelation zwischen Partikelaggregation und -schmelzen.** Anscheinend steht die Aggregation der Partikel im Zusammenhang mit ihrem Schmelzen; zumindest treten beide Phänomene im selben Fluenzbereich auf. Es ist vorstellbar, dass die anionischen Goldpartikel durch das Aufschmelzen einen Teil ihrer Oberflächenladung verlieren und dadurch einen effektiven Ladungsverlust erleiden, was die Stabilität der elektrostatischen Bindung mit den Proteinen reduzieren würde [57, 141, 142]. Andererseits könnten die Enzyme auch durch die Kavitationsblasen abgelöst werden, z. B. durch die hydromechanischen Kräfte, die bei Blasenexpansion und -kollaps entstehen. Möglicherweise treten beide Effekte auch kombiniert auf, denn Blasenbildung und Schmelzen beginnen ja bei ähnlichen Fluenzen (siehe Abschnitt 2.2.2) [26].

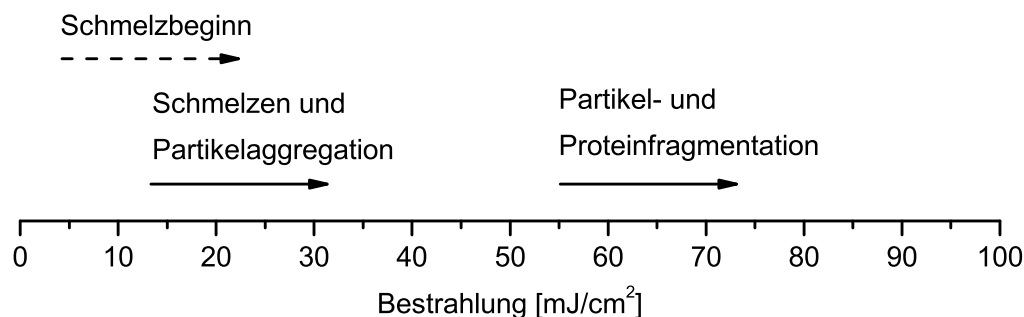
**Fragmentierung von 15Au zwischen 55 und  $64,5 \text{ mJ/cm}^2$ .** Die Schwelle für die Partikelfragmentierung konnte aus den TEM-Untersuchungen bestimmt werden. So zeigt Abb. 4.7, dass bei einer Bestrahlung mit  $64,5 \text{ mJ/cm}^2$  nur sporadisch Goldpartikelfragmente entstehen, die statistisch kaum zu erfassen sind (siehe Abbildungen 4.8 und 4.9). Demnach muss die Schwelle für die 15Au-Fragmentierung etwas unterhalb dieser Marke liegen. Dieses Ergebnis passt gut zu der von RADT angegebenen Fragmentierungsbestrahlung von  $55 \text{ mJ/cm}^2$  [16]. Entsprechend ist mit einer Fragmentierung von 15Au ab Bestrahlungen von ca.  $55 - 64,5 \text{ mJ/cm}^2$  zu rechnen.

**Proteinfragmentierung zwischen 56 und  $72 \text{ mJ/cm}^2$ .** Als weitere Ursache für die Aggregation der Goldpartikelkonjugate wurden zunächst fragmentierte Proteine in Betracht gezogen, die zur Aggregation mehrerer Nanopartikel infolge einer Aggregation der Proteinfragmente führen könnten. Um dies zu untersuchen, wurden chromatographische Aufnahmen von bestrahlten Konjugaten angefertigt (exemplarisch gezeigt in den Abbildungen

4.10 und 4.11). Dabei stellte sich unter Zuhilfenahme verschiedener Färbemethoden heraus, dass die gekoppelten Antikörper erst nach Bestrahlungen zwischen 56 und 72 mJ/cm<sup>2</sup> fragmentierten. Dagegen waren bei den mit bis zu 41 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Proben, bei denen bereits eine deutliche Partikelzusammenlagerung beobachtet wurde, noch keine Anzeichen einer Proteinzerstörung zu erkennen. Das spricht gegen eine Partikelaggregation infolge einer Verklebung durch Proteinfragmente.

**Korrelation zwischen Protein- und Partikelfragmentierung.** Der Vergleich der Schwellen für die Partikel- und Proteinfragmentierung lässt vermuten, dass entweder die Proteine durch den Fragmentierungsprozess selbst, oder die Partikel und Enzyme gleichzeitig, eventuell durch denselben Effekt, zerstört werden. Letzteres könnten starke hydromechanische Kräfte sein, die bei Blasenexpansion und -kollaps auftreten. Was dagegen beim Fragmentierungsprozess selbst die Proteine zerstören könnte, ist unklar. Hier kommen möglicherweise chemische Reaktionen in Frage. So berichten GRUA *et al.* und YAMADA *et al.* von thermischen und photoelektrischen Elektronenemissionen aus lasererhitzten Goldnanopartikeln [57, 142]. Die dadurch entstehenden solvatisierten Elektronen könnten die Proteine chemisch beeinflussen. Schließlich ist aber auch denkbar, dass die Goldfragmente beim Fragmentierungsprozess eine gewisse kinetische Energie erhalten und dadurch die Proteine zerstören [10, 57]. Dieser Effekt könnte dann durch die Kavitationsblasendynamik noch verstärkt werden.

**Kurzübersicht über die zu erwartenden Effekte.** In Abb. 5.3 sind die aus den Voruntersuchungen erhaltenen Informationen über die mit 35 ps-Pulsen bestrahlten 15Au-Partikel zusammengefasst. Oberhalb von 4,3 mJ/cm<sup>2</sup> kann mit dem Beginn des Partikelschmelzens gerechnet werden. Ein Aufschmelzen und eine Partikelaggregation werden ab 13,4 mJ/cm<sup>2</sup> erwartet. Ab 55 mJ/cm<sup>2</sup> tritt dann schließlich eine Fragmentierung von Goldpartikeln und Proteinen auf.

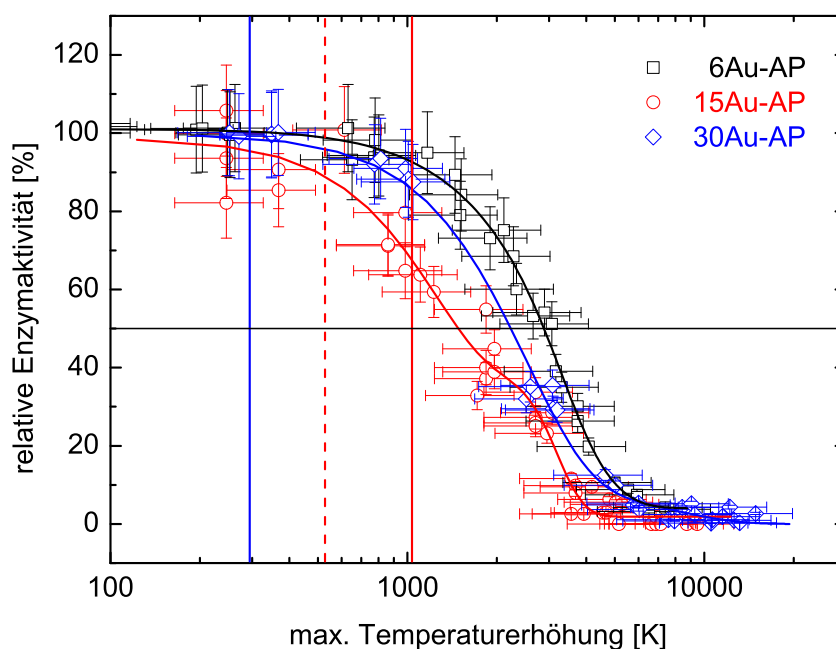


**Abbildung 5.3.** Übersicht der Resultate aus den Voruntersuchungen (15Au, 35 ps-Pulse).

## 5.2 Bestrahlung mit Pikosekundenpulsen

Für die Deutung der Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten ist es wichtig, die zur jeweiligen Proteininaktivierung gehörende maximale Partikeltemperatur zu kennen. Da die Partikeltemperaturen nicht direkt gemessen werden konnten, müssen die in Abb. 2.4 gezeigten Temperaturrechnungen für eine entsprechende Abschätzung herangezogen werden. Wie allerdings bereits erläutert wurde, sind die Temperaturrechnungen spätestens ab dem Erreichen des Schmelzpunktes der Partikel nicht mehr zuverlässig.

**15Au-Partikel sind am effizientesten für die NALI.** Als erstes sollen die in Abb. 4.13 gezeigten Messungen an unstabilisierten Au-AP-Konjugaten betrachtet werden. Nach linearer Umrechnung der darin angegebenen Bestrahlungen in maximale Partikeltemperaturen wird das in Abb. 5.4 gezeigte Diagramm erhalten. Hierin ist zu erkennen, dass die 15Au-Partikel bezüglich der Temperaturen am effizientesten für die NALI sind (vorausgesetzt die Temperaturrechnungen sind bis zumindest 1000 °C näherungsweise richtig). Außerdem wird an dem Diagramm sichtbar, dass das Erreichen der Nukleationsschwelle (blaue Vertikale) keinen signifikanten Einfluss auf die Enzyminaktivierung hat. Bestenfalls wird hier bei den 15Au-AP-Konjugaten eine 5–10%-ige Enzyminaktivierung registriert, was aber noch innerhalb der Fehlertoleranzen liegt. Eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität von 15Au-



**Abbildung 5.4.** Enzymaktivität von unstabilisierten 6-, 15- und 30Au-AP-Konjugaten in Abhängigkeit von der berechneten Partikelspitzentemperatur. Das korrespondierende Bestrahlungsdiagramm ist in Abb. 4.13 dargestellt. Die vertikale blaue Line bei  $\Delta T = 289\text{ K}$  markiert den spinodalen Punkt von Wasser, ab dem Kavitationsblasenbildung auftreten muss (bezogen auf eine absolute Umgebungstemperatur von  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Oberhalb der gestrichelten roten Linie bei  $\Delta T = 529\text{ K}$  kann ein partielles Aufschmelzen des Partikels beginnen. Die durchgezogene rote Vertikale markiert den Schmelzpunkt von massivem Gold ( $\Delta T = 1044\text{ K}$ ).

AP um ca. 30% ist dann erst im Bereich des Schmelzpunktes von massivem Gold (durchgezogene rote Vertikale) zu verzeichnen. Die 6- und 30Au-AP-Konjugate benötigen für eine ähnliche Inaktivierung sogar noch höhere Temperaturen. Für eine 50%-ige Inaktivierung von 6-, 15- und 30Au-AP ergeben sich nach Tab. 4.4 rechnerisch Partikeltemperaturen von 2908, 1502 und 2272  $^{\circ}\text{C}$ , welche allesamt deutlich über dem Schmelzpunkt der Partikel liegen, bis zu dem die Temperaturrechnungen realistische Ergebnisse liefern.

**Keine thermische Inaktivierung.** Die in Abschnitt 2.3.2 ausgeführte Berechnung nach Gl. 2.33 zeigt, dass für eine temperaturinduzierte 50%-ige AP-Inaktivierung bei einer Umgebungstemperatur von  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine Ex-

positionszeit von etwa 1,8 ns erforderlich ist. Diese Heizdauer kann mit den 35 ps-Pulsen jedoch nicht ansatzweise erreicht werden; auch nicht, wenn die Abkühlzeit mit berücksichtigt wird (z.B. bei 15Au:  $\tau \approx 90$  ps von  $T_{max}$  auf  $0,37 T_{max}$ ). Denn wegen der exponentiellen Abhängigkeit der Denaturierungsraten von der Temperatur, trägt nur ein kleiner Bereich um die Spitzentemperatur nennenswert zum Schädigungsintegral Gl. 2.33 bei. Außerdem wurde im Abschnitt 2.3.2 bereits dargelegt, dass die kürzesten Entfaltungszeiten bereits oberhalb von etwa 260 ps liegen [70]. Eine irreversible rein thermische Denaturierung der Proteine durch die ultrakurzen ps-Pulse ist daher äußerst unwahrscheinlich. Daran ändert auch die in Abschnitt 4.3 gezeigte Beobachtung nichts, dass die Goldpartikel eine thermische Denaturierung von nicht mit BSA stabilisierten Au-AP-Konjugaten beschleunigen; die Dauer der Wärmezufuhr ist bei ps-Bestrahlung einfach zu kurz.

**Enzyminaktivierung durch Schmelzen oder Blasenbildung.** Die Ergebnisse in Abb. 5.4 bestätigen die von RADT gemachte Feststellung, dass die Proteininaktivierung frühestens mit dem Schmelzen der Goldpartikel einsetzt [16]. Allerdings bedeutet das nicht unbedingt, dass die Proteininaktivierung nicht doch von Kavitationsblasen verursacht werden kann, wie RADT ausschließt. Denn wie bereits in Abschnitt 2.2.2 ausgeführt wurde, tritt eine Kavitationsblasenbildung bei 30Au erst ab dem Schmelzen des Partikels auf. Bei kleineren Partikelgrößen liegen die Nukleationstemperaturen laut KOTAIDIS *et al.* sogar noch über der Schmelztemperatur [26]. Zurückgeführt wird dieses Phänomen auf den in Abschnitt 2.1.3 erwähnten Grenzflächen-Wärmeleitwiderstand (Kapitza-Widerstand), der einen Temperatursprung an der Partikelgrenzfläche verursacht und dessen Einfluss mit abnehmender Partikelgröße zunimmt [29]. Da beide Effekte, Blasenbildung und Schmelzen, bei den hier verwendeten Partikelgrößen und Pulsdauern praktisch immer gemeinsam auftreten, ist eine Unterscheidung der Schadensmechanismen sehr erschwert.

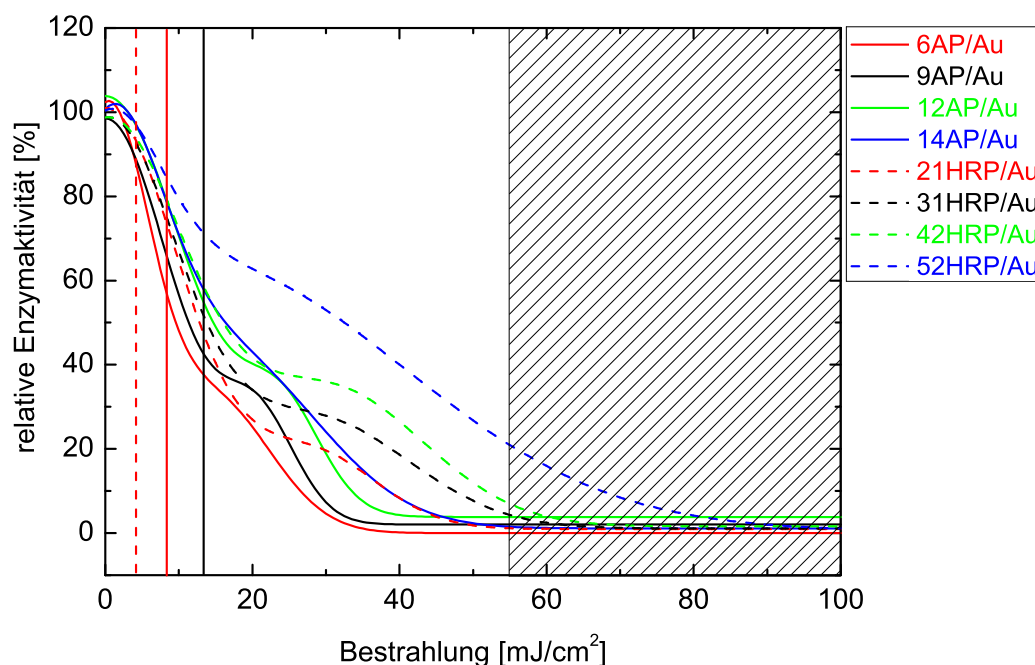
**Lokale Wirkung bis 18,4 mJ/cm<sup>2</sup>.** Bisher hat sich gezeigt, dass die 15Au-Partikel die stabilsten Konjugate bilden und am effizientesten für die

NALI sind (zumindest bei der Bestrahlung mit 35 ps-Pulsen). Um die Schädigungsmechanismen im *direkten* Umfeld der Goldpartikel zu untersuchen, wurden die in den Abbildungen 4.18 und 4.19 gezeigten Bestrahlungsexperimente an mit Proteinen übersättigten  $^{15}\text{Au}$ -Partikeln (ohne BSA-Zusatz) durchgeführt. Für einen direkten Vergleich dieser insgesamt 8 Inaktivierungskurven ist es sinnvoll, die Ergebnisse in einem Bestrahlungsdiagramm zusammenzufassen, dargestellt in Abb. 5.5.

Die in der Grafik gezeigten Kurven lassen sich dabei wie folgt interpretieren: Im Bereich zwischen dem theoretischen Schmelzbeginn (rot gestrichelte Senkrechte) und dem Erreichen des Schwellenwertes für das beobachtete Aufschmelzen und Aggregieren der Partikel (schwarze Vertikale) findet eine erhebliche Inaktivierung der direkt an die Partikel grenzenden Proteine (Protein-Monolayer) statt. Die ungebundenen oder die in einer zweiten Schicht angeordneten Proteine werden durch diesen Mechanismus nicht oder nur wenig beeinflusst. Dies kann aus der kontinuierlichen Zunahme der Aktivität oberhalb von  $13,4 \text{ mJ/cm}^2$  bei zunehmendem Enzym-zu-Partikel-Verhältnis geschlossen werden. Je mehr ungebundene bzw. nicht direkt gebundene Enzyme im bestrahlten Volumen sind, desto höher ist die verbleibende Restaktivität. Würde ein nicht-lokaler Schädigungsmechanismus ausbleiben, so sollten die Enzymaktivitäten bei höheren Bestrahlungen nicht weiter absinken.

Abbildung 5.5 macht jedoch gleichzeitig deutlich, dass, bis auf 52 HRP/Au, alle Proben praktisch vollkommen inaktiviert werden können noch bevor der Fragmentierungsprozess der Partikel beginnt. Die Kurven zeigen dabei alle das gleiche Verhalten: Kurz nach dem Beginn der Schulterausprägung bei Bestrahlungen etwas oberhalb von  $13,4 \text{ mJ/cm}^2$  setzt wieder eine fortschreitende Enzyminaktivierung ein. Die jeweiligen Schwellenwerte entsprechen dabei den in Abschnitt 4.2.1 aufgeführten Wendepunkten  $W$ , die für die unstabilisierten  $^{15}\text{Au}$ -AP- und  $^{15}\text{Au}$ -HRP-Konjugate in Abb. 5.6 als Säulendiagramme zusammengefasst sind.

Die Messdaten ergeben, dass die nicht-lokale Enzyminaktivierung bei  $^{15}\text{Au}$ -AP und  $^{15}\text{Au}$ -HRP im statistischen Mittel bei etwa  $18,4 \text{ mJ/cm}^2$  bzw.  $25,6 \text{ mJ/cm}^2$  einsetzt. Somit kann festgehalten werden, dass die Wirkung bei

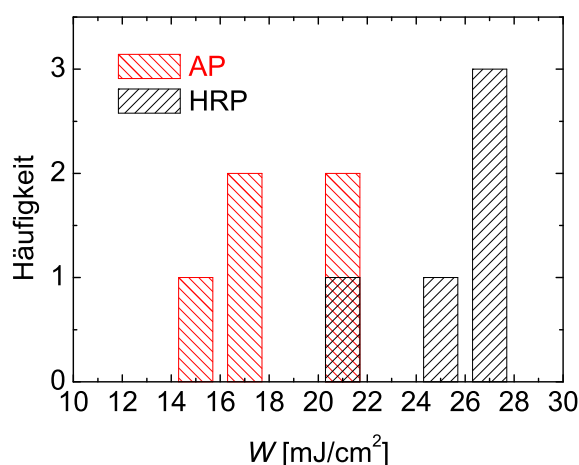


**Abbildung 5.5.** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten an mit Proteinen übersättigten 15Au-Partikeln. Für eine bessere Übersicht wurden die einzelnen Messpunkte weggelassen und nur die Fitkurven aus den Abbildungen 4.18 und 4.19 aufgeführt. Die rot gestrichelte Vertikale bei  $4,3 \text{ mJ/cm}^2$  markiert den Schwellenwert, ab dem mit einem Schmelzen und einer Kavitationsblasenbildung zu rechnen ist. Die durchgezogene rote Senkrechte entspricht der berechneten Bestrahlung (bei 35 ps) für das Erreichen des Schmelzpunktes von massivem Gold. Die schwarze Vertikale bei  $13,4 \text{ mJ/cm}^2$  markiert den Bereich, ab dem nach Abb. 5.3 ein Aufschmelzen und eine Partikelaggregation beobachtet wird. Der schraffierte Bereich entspricht den Bestrahlungen, bei denen eine Fragmentierung der Partikel auftritt. In der Legende ist die Zahl der eingesetzten Proteine pro 15Au-Partikel angegeben.

dieser Partikelgröße nur unterhalb einer Bestrahlung von etwa  $18,4 \text{ mJ/cm}^2$  räumlich beschränkt ist.

**Lokale Wirkung: Enzyminaktivierung durch Kavitationsblasen, möglicherweise in Kombination mit Wärme und Bindungskräften.**

Bei der Konjugateherstellung wurden die Goldpartikel stets zuerst mit Proteinen inkubiert und erst nach der Bildung der Proteinhülle mit BSA versetzt (siehe



**Abbildung 5.6.** Aus den Tabellen 4.4, 4.5, 4.8 und 4.9 zusammengefasste Wendepunkte für die 15Au-Konjugate (ohne BSA-Stabilisierung).

Abschnitt 3.1.2). Daher ist davon auszugehen, dass die gekoppelten Enzyme immer einen zumindest teilweise direkten Kontakt zur Partikeloberfläche haben, so wie es in Abb. 4.4 schematisch gezeigt ist. Zwar könnten die BSA-Moleküle Teile der Partikeloberfläche bedecken oder sich schützend zwischen den Proteinen anordnen, trotzdem würden die gekoppelten Enzyme die Goldpartikel zumindest an den Bindungsstellen berühren. Somit dürften die BSA-Moleküle nur wenig Schutz gegen chemisch reaktive Produkte bieten, die von den erhitzten Partikeln ausgehen und direkt in die Proteine eindringen. Die Abbildungen 4.14 und 4.15 zeigen jedoch, dass bei den BSA-stabilisierten Proben nach einer Bestrahlung mit  $18,4 \text{ mJ/cm}^2$  noch Enzymaktivitäten von über 91 bzw. 89% verbleiben, d. h. es denaturieren hier lediglich ca. 10% der Proteine. Dagegen werden bei 15Au-AP und 15Au-HRP ohne BSA durch diese Bestrahlung über 60% der Enzyme inaktiviert. Dies zeigt die ausgeprägte BSA-Schutzwirkung im Fluenzbereich für die lokale Wirkung. Eine Denaturierung aufgrund von chemischen Prozessen erscheint daher eher unwahrscheinlich, es sei denn, ein großer Anteil der Proteine wird durch die BSA-Moleküle von der Goldpartikeloberfläche verdrängt.

Wahrscheinlicher ist, dass die Enzyminaktivierung im lokalen Bereich durch Kavitationsblasen verursacht wird. BSA besitzt u. a. die Eigenschaft, an gewisse andere Proteine zu binden (ohne dabei deren Funktion zu behin-

dern) und sie dadurch wirkungsvoll vor einer Entfaltung zu schützen [100]. Dieser Schutzeffekt wurde auch für AP und HRP in den thermischen Denaturierungsexperimenten (siehe Abschnitt 4.3) nachgewiesen. Dabei ist das BSA selbst recht unempfindlich bezüglich einer Grenzflächendenaturierung. So fanden CLARKSON *et al.* in Experimenten zur Grenzflächendenaturierung von BSA und Pepsin in Schaum heraus, dass nur 10% der BSA-Moleküle irreversibel denaturierten, während 75% der Pepsin-Moleküle geschädigt wurden [76]. Da die BSA-Moleküle gegenüber hydrophoben Grenzflächen recht unempfindlich sind, ist eine enzymstabilisierende Wirkung durch BSA auch an bzw. in Kavitationsblasen sehr wahrscheinlich.

Die experimentellen Daten sprechen für eine lokale NALI-Wirkung durch Kavitationsblasen. Dabei ist nach den Ausführungen in Abschnitt 2.3.2 denkbar, dass die große Hitze in der Blase die Denaturierung noch verstärkt, da die Entfaltungsraten exponentiell von der Temperatur abhängen. Außerdem könnten auch die Goldpartikel selbst durch ihre Bindungskräfte eine Denaturierung der gekoppelten Proteine fördern, so wie es bei den Experimenten zur thermischen Langzeitdenaturierung beobachtet wurde (siehe Abschnitt 4.3).

**Reichweite der lokalen Wirkung.** Abb. 4.16 zeigt, dass die 15Au-Rezap-AP-Konjugate eine signifikante Inaktivierung erst ab ca.  $30 \text{ mJ/cm}^2$  aufweisen. Demnach ist die lokale Wirkung auf die direkt gebundenen Proteine (hier Antikörper) beschränkt. Gestützt wird diese Annahme auch durch Abb. 5.5, in der deutlich wird, dass bis zu einer Bestrahlung von  $18,4 \text{ mJ/cm}^2$  nur die direkt an die Goldpartikel grenzende Proteinlage geschädigt wird.

**Nicht-lokale Wirkung: Inaktivierung durch chemische Prozesse und Kavitationsblasen.** Die Abbildung 5.5 zeigt, dass praktisch alle Enzyme noch vor dem Erreichen der Fragmentierungsschwelle der Goldpartikel inaktiviert werden können. Demnach muss noch ein nicht-lokaler Schädigungsmechanismus existieren. Dabei ist gut vorstellbar, dass auch dieser Effekt von den Kavitationsblasen herrührt, denn nach den Ausführungen in Abschnitt 2.2.1 wachsen die Kavitationsblasen mit der 3. Wurzel der Blasenenergie (von der zu erwarten ist, dass sie bei ps-Pulsen mit ansteigender Be-

strahlung zunimmt) an. Z. B. untersuchten KOTAIDIS *et al.* die Blasengrößen nach UV-Femtosekundenpuls-Bestrahlung (400 nm) von 39 nm-Partikeln mittels Röntgenstreuungsexperimenten (siehe Abschnitt 2.2.1) [26]. Hierbei bestimmten sie die entsprechenden Blasengrößen (Durchmesser) zu ca. 130 nm bei 30 mJ/cm<sup>2</sup> und ca. 175 nm bei 60 mJ/cm<sup>2</sup>. Da die Absorptionseffizienz dieser Partikelgröße bei 400 nm um einen Faktor 1,5–2 geringer ist als die bei 527 nm, wären die Blasengrößen bei Bestrahlungen mit 527 nm-Laserpulsen entsprechend größer.

Möglicherweise sind Kavitationsblasen auch die Erklärung für das Ausbilden der charakteristischen Schulter im Kurvenverlauf der bestrahlungsabhängigen Enzyminaktivierung. Es fällt auf, dass diese Schultern in einem Fluenzbereich beginnen, in dem der Beginn des Aufschmelzens der Partikel erwartet wird (13,4 – 24,7 mJ/cm<sup>2</sup>). Demnach könnten die Schultern entstehen, weil ein Teil der absorbierten Energie für die Umwandlung der latenten Schmelzwärme (Phasenübergang fest → flüssig) verbraucht wird. Dadurch steht in diesem Fluenzbereich keine Energie für ein weiteres Blasenwachstum mehr zur Verfügung. Wenn die Schadensreichweite mit der Größe der Kavitationsblase korreliert, bildet sich eine Schulter in der Abhängigkeit der Proteininaktivierung von der Bestrahlung aus. Die Kavitationsblase wächst erst dann weiter, wenn das Partikel komplett aufgeschmolzen ist und die absorbierte Energie in ein weiteres Blasenwachstum umgewandelt werden kann. Dies entspricht dann dem Wendepunkt *W*, ab dem die Inaktivierung wieder zunimmt. Rechnungen zufolge beträgt die zur Phasenumwandlung von 15Au-Partikeln benötigte Bestrahlung (bei 35 ps-Pulsen) zwar nur  $\Delta H \approx 1,3 \text{ mJ/cm}^2$ , da allerdings während des Schmelzprozesses die Absorption um 75% sinkt, muss  $\Delta H$  in Realität entsprechend größer sein [38]. Außerdem zeigen die TEM-Aufnahmen, dass die Partikel vereinzelt größer oder kleiner sind. Vor allem aber sind die meisten Partikel nicht ganz rund, sondern von leicht elliptisch bis zum Teil sogar kantig. Solch ein heterogenes Gemisch von Partikelformen und -größen resultiert aufgrund der unterschiedlichen Absorptionseffizienzen in unterschiedlichen Schmelzpunkten, wodurch die Schulter im Inaktivierungsverlauf ebenfalls verbreitert und verschmiert wird.

Nach bisheriger Überlegung können die Kavitationsblasen auch eine nicht-

| Primärreaktionen                                                                         | Sekundärreaktion                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| $\text{H}_2\text{O} + Q_{\text{therm}} \rightarrow \text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet$ | $\text{H}^\bullet + \text{H}^\bullet \rightarrow \text{H}_2$             |
|                                                                                          | $\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ |
|                                                                                          | $\text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}$    |

**Tabelle 5.2.** Thermolyse des Wassers. Die thermisch angeregten Wassermoleküle können durch Dissoziation direkt in  $\text{H}^\bullet$ - und  $\text{OH}^\bullet$ -Radikale zerfallen. Die Primärprodukte können dann miteinander reagieren, wobei als Sekundärprodukte neben einfachen Wassermolekülen auch  $\text{H}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen.

lokale Enzymaktivierung verursachen, wenn sie eine hinreichende Ausdehnung erreichen. Je größer die Blasen dann sind, desto mehr (statistisch verteilte) Proteine werden erreicht. Dabei ist aber nicht nur die Blasenausdehnung selbst von Bedeutung, sondern auch die Lebensdauer der Kavitationsblase. Dabei ist klar, dass die „Kavitationsblasen-Expositionszeit“ und damit die potenzielle Schädigungsrate mit zunehmendem Abstand zum Goldpartikel immer kleiner werden.

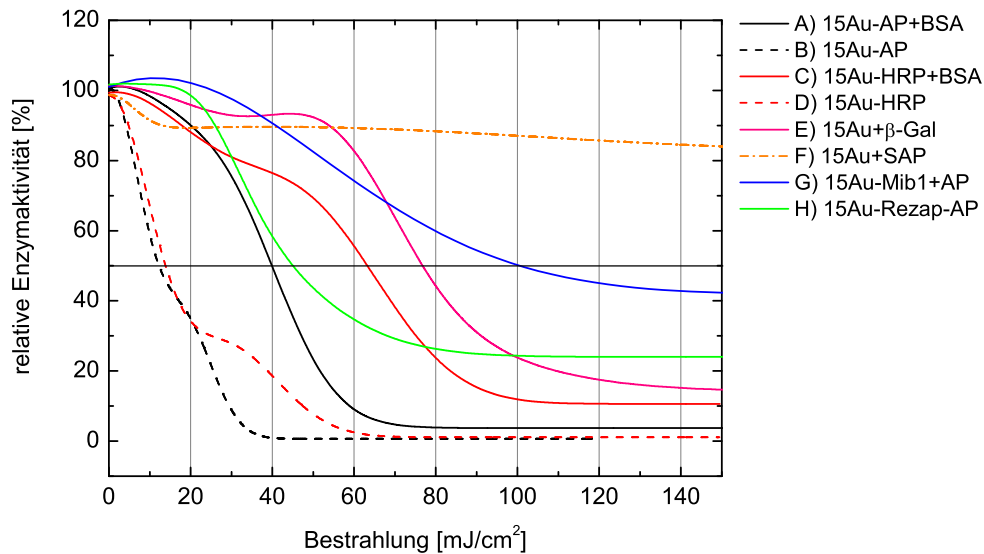
Neben den hydromechanischen Effekten bei der Kavitationsblasendynamik (Blasenexpansion, Blasen kollaps) und der hydrophoben Wirkung durch die Blasengrenzfläche bzw. das Blasenvolumen, entstehen innerhalb der Kavitationsblasen zudem Wasserradikale [81, 82]. Es ist seit langem bekannt, dass Biomoleküle bei radioaktiver Bestrahlung vor allem durch die chemisch reaktiven Spaltprodukte des Wassers geschädigt werden (indirekte Strahlenwirkung) [138]. Solche  $\text{H}^\bullet$ - und  $\text{OH}^\bullet$ -Radikale (*Primärprodukte*) entstehen auch bei der Thermolyse von Wassermolekülen in stark erhitzten ( $> 2200^\circ\text{C}$ ) Wasserdampfblasen [81, 99, 137]. Zusätzlich können erhitzte Metall(nanopartikel)flächen als Katalysatoren wirken und den thermolytischen Prozess verstärken [137]. Tab. 5.2 gibt einen Überblick über einige chemische Reaktionen, die bei der Thermolyse des Wassers entstehen.

Die chemische Schädigung von Biomolekülen durch Spaltprodukte des Wassers wird durch Radikal-Anlagerungsreaktionen oder durch Abstraktion von Wasserstoff erzeugt [138]. Außerdem können chemische Schäden durch reaktives  $\text{H}_2\text{O}_2$  hervorgerufen werden [143]. Werden Schutzsubstanzen mit exponierten SH-Gruppen, wie z. B. Cysteamin, dem System hinzugegeben, können diese sehr effektiv mit den Wasserradikalen reagieren und sie vor

dem Erreichen der Biomoleküle unschädlich machen (abfangen). Mit Hilfe dieses *Konkurrenzschutzes* kann die indirekte biologische Strahlenwirkung bei radioaktiver Bestrahlung stark reduziert werden [138].

Durch Wasserradikale verursachte chemische Prozesse können eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Proteinen spielen. Dies wurde bei Proteininaktivierungsexperimenten mit durch Ultraschall erzeugter Kavitation beobachtet [81]. Dass die Cysteamin-Moleküle auch bei der NALI eine signifikante Schutzwirkung aufweisen, ist ein deutlicher Hinweis auf eine (zumindest teilweise) Enzyminaktivierung durch die Spaltprodukte des Wassers. Dabei zeigt Abb. 4.20, dass diese Schutzwirkung erst oberhalb von etwa 15–20 mJ/cm<sup>2</sup> einsetzt. Dies ist auch zu erwarten, da gleichzeitig Wasserdampf und hohe Temperaturen für die Thermolyse der H<sub>2</sub>O-Moleküle erforderlich sind [137]. Dabei steigt mit zunehmender Bestrahlung bzw. Temperatur die Ausbeute an Wasserradikalen an. Gleichzeitig können die expandierenden Kavitationsblasen die Wasserradikale und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Moleküle unspezifisch in die Umgebung transportieren. Dies wäre eine schlüssige Erklärung für die effiziente nicht-lokale Inaktivierung von Proben mit geringem BSA-Gehalt bei hohen Bestrahlungen.

**BSA als Stabilisator und als Konkurrenzschutz.** Die Inaktivierungskurven in Abb. 4.20 zeigen, dass die niedermolekularen (ca. 77 Da) Cysteamin-Moleküle die Enzymdenaturierung reduzieren können, was durch eine Reaktion ihrer SH-Gruppen mit den Wasserradikalen erklärt werden kann [138]. Einen Konkurrenzschutz bewirken aber nicht nur Moleküle mit SH-Gruppen. Genaugenommen können alle Makromoleküle im bestrahlten Volumen Wasserradikale oder andere chemisch reaktive Produkte (solvatisierte Elektronen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Moleküle) abfangen. Je größer die Schutzmoleküle sind oder je höher ihre Konzentration ist, umso mehr Radikale können abgefangen werden. Somit besitzen die BSA-stabilisierten Proben gleich einen doppelten Schutzmechanismus gegen die Enzyminaktivierung: Dem Schutz vor einer strukturellen Entfaltung kommt auch noch ein (Konkurrenz-) Schutz vor chemisch reaktiven Molekülen hinzu.



**Abbildung 5.7.** Zusammenfassung der 35 ps-Bestrahlungsexperimente an den verschiedenen 15Au-Konjugaten.

**Zusammenfassung der Schadensmechanismen.** Mit den bisher entwickelten Modellen lassen sich im Prinzip alle Inaktivierungskurven aus Abschnitt 4.2.1 verstehen. Zur besseren Übersicht sind alle Fitkurven aus den Bestrahlungsexperimenten mit 35 ps-Pulsen an den verschiedenen 15Au-Konjugaten nochmal in Abb. 5.7 zusammengefasst.

Der Vergleich der Kurven zeigt, dass ausschließlich die unstabilisierten Konjugate (B und D) maßgeblich durch die lokale Wirkung, die bis zu einer Bestrahlung von  $18,4 \text{ mJ/cm}^2$  auftritt, inaktiviert werden können. Dieser Schädigungsmechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Denaturierung an oder in Kavitationsblasen, evtl. in Kombination mit erhöhter Temperatur und Bindungskräften. Bei den BSA-stabilisierten, den in 2. Lage angeordneten und den ungebundenen Enzymen führt dieser lokale Effekt nicht zu einer Denaturierung. Hier wirken die BSA-Moleküle als Stabilisatoren gegen die hydrophobe Entfaltung, bzw. ist hier die Reichweite der Wirkung zu gering.

Bei Bestrahlungen oberhalb von  $18,4 \text{ mJ/cm}^2$  beginnt zusammen mit dem Aufschmelzen der Partikel ein nicht-lokaler Inaktivierungsprozess, der von einer Kombination aus Kavitationsblasen-Effekten und chemischen Reaktio-

nen verursacht wird. Mit zunehmender Bestrahlung entstehen immer mehr Wasserradikale und gleichzeitig immer größere Kavitationsblasen, welche die Diffusion der Radikale in die Umgebung vorantreiben. Stärke und Reichweite dieses Effektes werden damit durch die Bestrahlung bestimmt, was erklärt, warum die ungebundenen Enzyme in 15Au-Mib1+AP (G), 15Au+SAP (F) und 15Au+ $\beta$ -Gal (E) zunächst schlecht inaktiviert werden können. Allerdings reagieren nicht alle Proteine gleichermaßen auf die chemischen Produkte. So zeigt Abb. 5.7, dass 15Au-AP+BSA (A) und 15Au-Rezap-AP (H) noch recht gut zwischen 20 und 50 mJ/cm<sup>2</sup> inaktiviert werden können, während 15Au-HRP+BSA (C) sich als deutlich widerstandsfähiger erweist.

Anders verhält es sich bei Bestrahlungen oberhalb von 55 mJ/cm<sup>2</sup>, wo eine Fragmentierung der Goldpartikel und der gebundenen Proteine auftritt. Außer bei 15Au+SAP (F) werden hier alle Modellenzyme erheblich inaktiviert, auch die freien AP- und  $\beta$ -Gal-Moleküle (G und E). Als Schädigungsmechanismen kommen hier zusätzlich Goldfragmente und solvatisierte Elektronen, die beim Fragmentierungsprozess entstehen, infrage [57]. Der Konkurrenzschutz durch andere Biomoleküle ist hier besonders ausgeprägt. So fällt auf, dass – außer 15Au+SAP – die 15Au-Mib1+AP- und 15Au-Rezap-AP-Proben die höchsten Restaktivitäten aufweisen. Trotz einer hohen Bestrahlung von 150 mJ/cm<sup>2</sup> verbleiben hier nach Tab. 4.6 noch ca. 42 bzw. 24% der AP-Moleküle aktiv. Die Erklärung hierfür dürfte in der großen Molekülmasse (150 kDa) und der hohen lokalen Konzentration der beiden Antikörper sowie in dem konzentrierten BSA-Gehalt liegen.

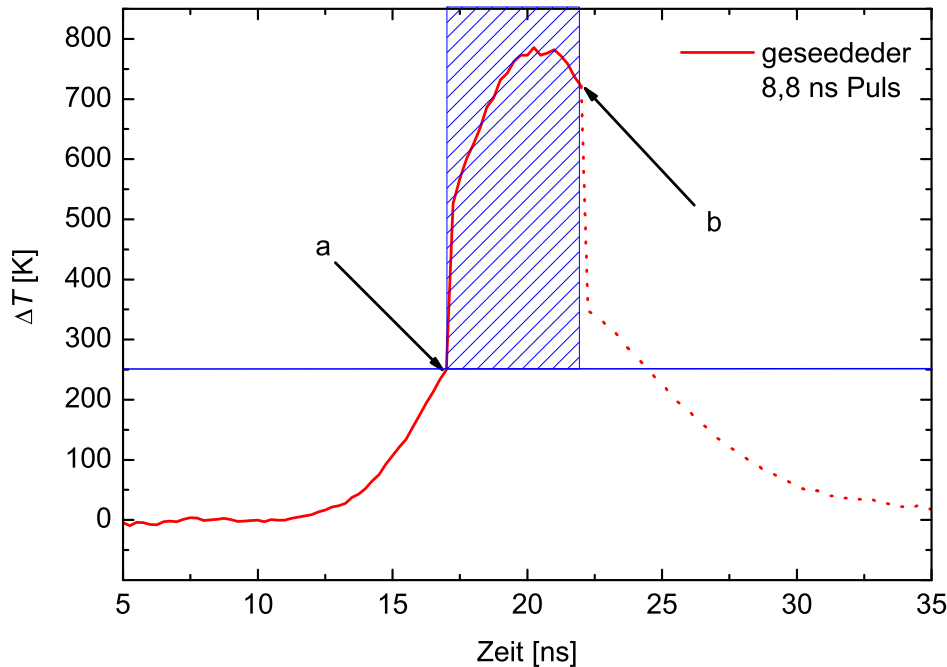
Insgesamt zeigt Abb. 5.7, dass die verschiedenen Modellenzyme sehr unterschiedlich auf die lasererhitzten Nanopartikel und die Stabilisierung mit BSA-Molekülen reagieren. Dies war nach den Ausführungen in Abschnitt 2.3 auch zu erwarten, weil sich die Bindungscharakteristik bei den meisten Proben unterscheidet und vor allem, weil die Proteinstrukturen unterschiedlich sind. So zeigt bereits der direkte Vergleich zwischen den BSA-stabilisierten 15Au-AP- und 15Au-HRP-Konjugaten, die beide die gleiche Kopplungscharakteristik besitzen, die deutlichen Unterschiede in der lasererzeugten Enzym-inaktivierung. Dagegen verhalten sich deren unstabilisierte Pendanten bezüglich der Inaktivierung recht ähnlich. Überraschend sind die Ergebnisse aus

den Bestrahlungsexperimenten an den  $^{15}\text{Au} + \text{SAP}$ -Proben. Zwar war das SAP in der Probenlösung stets ungebunden, jedoch wäre bei einer starken Fragmentierung der Goldpartikel und der hohen Konzentration von chemisch reaktiven Produkten bei hohen Bestrahlungen wenigstens eine deutliche Inaktivierung zu erwarten gewesen, wie es auch bei  $^{15}\text{Au} + \beta\text{-Gal}$  zu beobachten war. Diese ausgeprägte Resistenz von SAP zeigt, dass die NALI längst nicht für alle Proteine geeignet ist. Woher diese Unempfindlichkeit bei SAP kommt, ist unklar.

### 5.3 Bestrahlung mit Nanosekundenpulsen

**Unsicherheiten bei den Temperaturberechnungen.** Im Prinzip verhält sich die Proteininaktivierung bei der Nanosekunden-Bestrahlung ähnlich wie bei der Pikosekunden-Bestrahlung. Auch hier sind die größeren Partikel bei einer bestimmten Bestrahlung effektiver als die kleineren, und die Schutzwirkung durch die BSA-Moleküle tritt wieder sehr deutlich in Erscheinung. Bei genauerem Vergleich mit der Pikosekunden-NALI fällt jedoch auf, dass die Bestrahlungen, die zu einer nennenswerten Proteininaktivierung führen, bei ns-Pulsen wesentlich niedriger sind als nach den Ausführungen in Abschnitt 2.1.3 erwartet wird. So ist in Abschnitt 4.2.1 gezeigt, dass eine signifikante Proteininaktivierung erst ab dem Erreichen der Temperatur für das Schmelzen der Partikel auftritt, wie es auch von RADT beobachtet wurde [16]. Bei der Nanosekunden-NALI wären für das Schmelzen allerdings rechnerisch Bestrahlungen von mindestens 2345, 420 bzw. 125 mJ/cm<sup>2</sup> (für 6-, 15- und 30Au) erforderlich, vorausgesetzt die Bestrahlungen ließen sich linear nach den Ergebnissen in Abb. 2.5 in Temperaturerhöhungen umrechnen und Kavitationsblasen blieben vernachlässigt. Tatsächlich wurden für eine 50%-ige Proteininaktivierung von 6-, 15- und 30Au-AP aber nur Bestrahlungen von 407, 130 bzw. 71 mJ/cm<sup>2</sup> (siehe Tab. 4.11) benötigt.

Insbesondere die Bildung von Kavitationsblasen dürfte nach den Ausführungen in Abschnitt 2.2.1 bei der Nanosekundenpuls-Absorption für deutlich niedrigere Schmelz-Bestrahlungen sorgen. Dort ist gezeigt, dass die Temperaturen aufgrund der thermischen Isolierung etwa zwei- bis dreimal höher steigen als die ohne Berücksichtigung der Blasenbildung (vgl. Abb. 2.12). Abb. 5.8 veranschaulicht diesen Effekt. Demnach steigt die Partikeltemperatur ab dem Erreichen der Nukleationstemperatur (Punkt a) sprunghaft an und erreicht – abhängig von der Partikelgröße – eine zwei- bis dreimal so hohe Spitzentemperatur (ohne Berücksichtigung der Schmelzwärme). Unklar ist, wie die weitere Temperaturentwicklung am Ende der Blasenlebensdauer (Punkt b) aussieht. Wahrscheinlich wird das stark erhitzte Partikel nach dem Blasen-kollaps eine erneute Expansion der Kavitationsblase verursachen. Bei langen Heiz- bzw. Pulsdauern können so regelrechte Blasenoszillationen auftreten

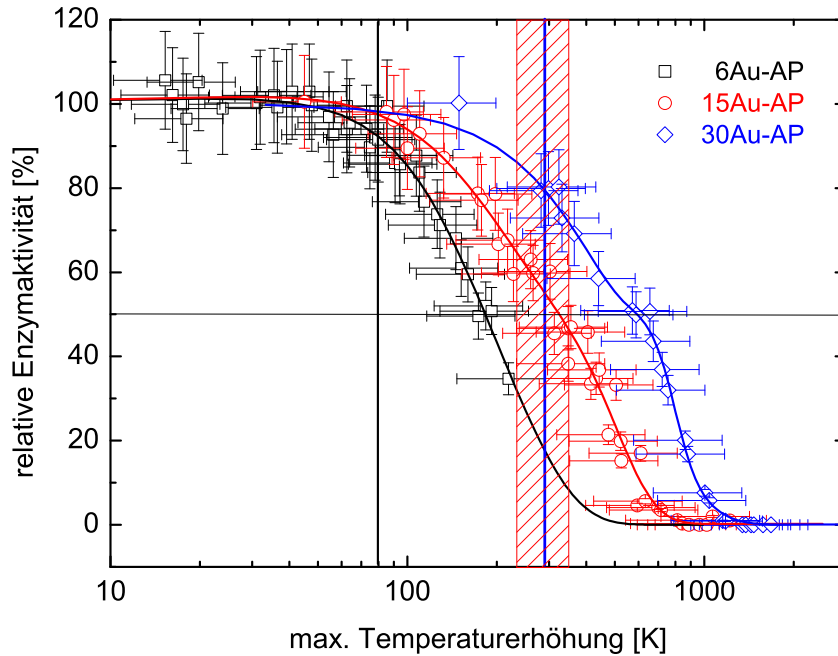


**Abbildung 5.8.** Qualitative Beschreibung der Temperaturentwicklung eines mit einer hypothetischen Fluenz von  $150 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlten  $15 \text{ nm}$  Goldpartikels unter Berücksichtigung der Kavitationsblasenbildung. Die blaue Horizontale entspricht einer Nukleationstemperatur von  $275^\circ\text{C}$  (vgl. Abschnitt 2.2.1), der schraffierte Bereich markiert eine hypothetische Blasenlebensdauer von  $5 \text{ ns}$ . Weitere Erklärungen im Text.

(dies hängt von der Blasenlebensdauer bzw. Blasengröße ab; siehe Abschnitt 2.2.1). Wie auch immer die Blasencharakteristik ist, die in Abb. 2.5 gezeigten Temperaturrechnungen vernachlässigen auftretende Temperatursprünge durch Blasenbildung *während* der Nanosekundenpuls-Absorption.

Eine weitere Unsicherheit in der Berechnung der Temperaturentwicklung rührt vom Kapitza-Wärmeleitwiderstand her, dessen Einfluss mit abnehmender Partikelgröße bzw. steigendem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis zunimmt (siehe Abschnitt 2.1.3). Der Grenzflächen-Wärmeleitwiderstand behindert während der ns-Puls-Absorption die Wärme(ab)leitung in die wässrige Umgebung des Partikels. Daher sind bereits vor der Blasenbildung die Temperaturen im Partikelinneren höher als die in Abb. 2.5 berechneten (die Temperaturentwicklung an der Partikeloberfläche selbst sollte bis zur Nuklea-

tionsschwelle jedoch stimmen). Neueren Modellrechnungen zufolge, die den Kapitza-Wärmeleitwiderstand berücksichtigen, ist die Temperatur im Inneren der 6-, 15- und 30Au-Partikel bei ns-Pulsen etwa 2,3-, 1,8- bzw. 1,5-mal höher als deren Oberflächentemperatur [144]. Die erhöhten Partikelinnentemperaturen führen daher zum Schmelzen bei entsprechend niedrigeren Bestrahlungen bzw. Oberflächentemperaturen. Abb. 5.9 zeigt, dass der Schmelzprozess (rot schraffierter Bereich) dadurch zum Teil sogar vor der Blasenbildung (blaue Vertikale) einsetzen kann.



**Abbildung 5.9.** Enzymaktivität von unstabilisierten 6-, 15- und 30Au-AP in Abhängigkeit von der berechneten Partikeloberflächentemperatur, ohne Berücksichtigung von Kavitationsblasenbildung und Kapitza-Wärmeleitwiderstand. Das korrespondierende Bestrahlungsdiagramm ist in Abb. 4.22 dargestellt. Die schwarze Vertikale entspricht dem Siedepunkt von Wasser bei Normaldruck. Die vertikale blaue Linie bei  $\Delta T = 289 \text{ K}$  markiert den spinodalen Punkt von Wasser. Aufgrund der für alle drei Partikelgrößen unterschiedlichen Auswirkungen des Kapitza-Wärmeleitwiderstands lässt sich in dieser Grafik keine diskrete Bestrahlung respektive Oberflächentemperatur, bei der der Beginn des Schmelzens erwartet wird ( $\Delta T = 529 \text{ K}$ ), angeben. Der entsprechende Bereich, in dem der Beginn des Schmelzens von 6-, 15- und 30Au hier erwartet werden kann, ist rot schraffiert dargestellt.

Die Inaktivierungskurven in Abb. 5.9 zeigen Abweichungen zu den in Abb. 5.4 präsentierten Verläufen. So besitzen die 6 nm Partikel bezüglich ihrer Oberflächentemperatur die größte NALI-Effizienz und die 30 nm Partikel die geringste. Außerdem setzt die Inaktivierung hier schon etwas oberhalb des Siedepunktes von Wasser ein. Bei der 50%-igen Enzyminaktivierung beträgt die umgerechnete Oberflächentemperatur der 6 nm-Partikel nur etwa 203 °C. Für eine 50%-ige Inaktivierung bei 203 °C wären nach den Berechnungen in Abschnitt 2.3.2 allerdings konstante Heizdauern von mehr als 1,7  $\mu$ s erforderlich, was etwa zwei Größenordnungen über der gesamten Heizdauer (Laserpulsdauer und Abkühlzeit) liegt. Die bei 6Au angenommene Temperatur von 203 °C bei der Nanosekundenpuls-Absorption wäre also weder für eine rein thermische Proteininaktivierung noch für eine Kavitationsblasenbildung ausreichend. Auch ein Schmelzprozess ist unwahrscheinlich, da selbst unter Berücksichtigung des Kapitza-Widerstands die Partikelinnentemperatur höchstens 441 °C betragen würde. Die einzig plausible Erklärung für die hohe Denaturierungsrate von 6Au-AP bei dieser recht moderaten Temperatur wäre ein stark unterstützender Entfaltungs-Effekt durch die Goldpartikel-Bindungskräfte, wie er auch bei den thermischen Langzeit-Denaturierungsexperimenten an 15Au-AP (ohne BSA-Stabilisierung) beobachtet wurde (siehe Abschnitt 4.3). Anders als bei den ps-Pulsen wäre die Dauer der Temperaturerhöhung bei den ns-Pulsen dann wohl groß genug, um eine durch Bindungskräfte unterstützte thermische Denaturierung zu verursachen. Dazu passt auch die oben genannte Vermutung, dass die 6 nm Goldpartikel bevorzugt in der Nähe des aktiven Zentrums der Enzyme binden könnten (siehe Abb. 5.1), wo sie die Enzymaktivität besonders effizient beeinflussen.

#### **Inaktivierung durch Kavitationsblasen und chemische Prozesse.**

Die Wirkung des Kapitza-Widerstands ist bei den 30Au-Partikeln am geringsten, so dass die blaue Kurve in Abb. 5.9 der Realität wohl am nächsten kommt. Im Inaktivierungsverlauf von 30Au-AP fällt auch die Schulter, die dem Phasenübergang fest  $\rightarrow$  flüssig des Goldpartikels zugeordnet wird, ungefähr in den Temperaturbereich des Aufschmelzens von Gold, wenn die Temperaturerhöhungen oberhalb der Nukleationsschwelle (blaue Vertikale) we-

gen der thermischen Isolierung durch die Dampfblase um etwa einen Faktor 2 nach oben korrigiert werden. Für die 30Au-AP-Konjugate ist als Schwellenwert für eine beginnende Enzyminaktivierung der spinodale Punkt von Wasser bzw. der einsetzende Schmelzprozess auszumachen (siehe Abb. 5.9). Somit könnte, wie schon bei der Pikosekundenpuls-Bestrahlung (vgl. Abschnitt 5.2), der erste Schädigungsmechanismus aus einer Kombination aus Kavitationsblasen-Effekten und Wärmezufuhr bestehen. Sobald die Nukleationstemperatur allerdings überschritten wird und sich eine Blase um das Partikel ausgebildet hat, steigt die Partikeltemperatur bei weiterer Lichtabsorption sprunghaft an, so dass der Punkt für das Aufschmelzen der Partikel sehr schnell erreicht wird (siehe Abb. 5.8). Hieraus wird ersichtlich, dass auch bei der Nanosekunden-Bestrahlung die Fluenzen für Blasenerzeugung und Partikelschmelzen eng beisammen liegen, was eine Unterscheidung zwischen einer durch Kavitationsblasen verursachten und einer Proteinschädigung durch den Schmelzprozess sehr erschwert. Da die Heizdauer bei der Nanosekundenpuls-Absorption zudem noch zwei Größenordnungen größer ist als bei der Pikosekunden-Bestrahlung, geht ein anfänglich oberflächlicher Schmelzprozess wesentlich leichter in ein Aufschmelzen der Partikel über. Dazu passt auch der Vergleich der 15Au-AP-Bestrahlungsexperimente in den Abbildungen 4.13 und 4.22, welcher zeigt, dass die 50%-ige Enzyminaktivierung bei der Nanosekunden-Bestrahlung erst nach dem vollständigen Aufschmelzen der Partikel auftritt ( $H_{50\%} > W$ ), während bei der Pikosekunden-Bestrahlung die 50%-ige Inaktivierung noch vor dem Aufschmelzen stattfindet ( $H_{50\%} < W$ ). Anders als bei den ps-Pulsen ist hier eine Unterscheidung zwischen einer lokal begrenzten und einer nicht-lokalen Wirkung also nicht möglich. Denn mit dem rapiden Aufschmelzen respektive großen Temperatursprung der Nanopartikel folgen die gleichen nicht-lokalen Schädigungsmechanismen wie bei der ps-Bestrahlung (Kavitationsblasen, Wasserradikale,  $H_2O_2$ -Moleküle, solvatisierte Elektronen), die unspezifisch alle Biomoleküle in der Umgebung der Nanopartikel schädigen können.

**Vergleich der NALI-Wirkung von geseedeten und ungeseedeten Nanosekundenpulsen.** In Abb. 4.24 ist der direkte Vergleich von Bestrahlungsexperimenten an Au-AP-Konjugaten mit gaußförmigen (geseedet) und Pulsen mit starken Intensitätsschwankungen (ungeseedet) gezeigt. Hierin ist zu erkennen, dass die bestrahlungsabhängige Enzyminaktivierung (bei allen drei Konjugatgrößen) bezüglich geseedeter und ungeseedeter Laserpulse zunächst praktisch gleich verläuft. Ab der Bestrahlung  $H_T$  (siehe Tab. 4.12) laufen die Inaktivierungskurven dann allerdings leicht auseinander, wobei die geseedeten Laserpulse im weiteren Verlauf effektiver für die NALI sind. Beim Vergleich der Wendepunkte  $W$  aus Tab. 4.11 mit den Werten für  $H_T$  fällt auf, dass die Wendepunkte für 15- und 30Au-AP (121,7 bzw. 69,6 mJ/cm<sup>2</sup>) etwas unterhalb oder genau bei der Bestrahlung  $H_T$  (135,4 bzw. 69,5 mJ/cm<sup>2</sup>) liegen. Da die Wendepunkte mit dem Aufschmelzen bzw. der Blasenbildung korrelieren, kann geschlussfolgert werden, dass sich die NALI-Wirkung von geseedeten und ungeseedeten Laserpulsen erst ab dem Aufschmelzen bzw. der Blasenbildung unterscheidet. Dazu passt auch die Überlegung, dass die Wärmekapazität des Goldpartikels die starken Temperaturschwankungen durch die ungeseedeten Laserpulse bis zum Schmelzprozess zum Teil noch ausgleichen kann.

Bleibt die Frage, welche Ursache die etwas unterschiedliche Inaktivierungseffizienz von geseedeten und ungeseedeten Laserpulsen hat. So sind die Schultern in den Bestrahlungsdiagrammen in Abb. 4.24 bei den ungeseedeten Laserpulsen etwas ausgeprägter, was auf einen verzögerten Schmelzprozess der Partikel hindeutet. Die Gründe dafür sind unklar. Möglicherweise werden die Kavitationsblasen bei geseedeten Laserpulsen etwas größer, da zu Beginn des Nukleationsprozesses kontinuierlich mehr Energie für das Blasenwachstum zur Verfügung steht. Denn die Intensitätsspitzen (Spikes) bei den ungeseedeten Laserpulsen sind zeitlich statistisch verteilt und es ist wahrscheinlich, dass zu Beginn einer Nukleation oft nur eine kleine Intensitätsspitze absorbiert wird, die gerade so für die Bildung einer kleinen Blase ausreicht. Ist die (kleine) Blase dann erstmal expandiert, können die folgenden Spikes nicht mehr wirksam in ein weiteres Blasenwachstum umgewandelt werden (bis die Blase wieder kollabiert ist). Größere Blasen sind für das Aufschmelzen der

Partikel effektiver, weil die thermische Isolierung länger anhält. Aufgrund der temperatenausgleichenden Wirkung der Wärmekapazität der Goldpartikel sind die Unterschiede in der Blasenausdehnung jedoch nicht so groß, was den recht geringen Unterschied in der Inaktivierungseffizienz von geseedeten und ungeseedeten Laserpulsen erklärt.

**Zusammenfassung.** Die Diskussion zeigt, dass sich die Bestrahlungen, insbesondere bei der Nanosekundenpuls-Absorption, mit dem in dieser Arbeit verwendeten einfachen Modell nur ungenau in Partikeltemperaturen umrechnen lassen. Der Kapitza-Grenzflächenwärmeleitwiderstand und die Blasenbildung sowie die latente Schmelzwärme und das Absinken der Absorptionseffizienz beim Aufschmelzen sind Faktoren, die für die Temperaturentwicklung von lasererhitzten Nanopartikeln eine wichtige Rolle spielen und für Temperatursimulationen nicht vernachlässigbar sind. Der Kapitza-Widerstand lässt die Temperatur im Innern der Partikel deutlich schneller steigen als an deren Oberfläche. Die Kavitationsblasenbildung bewirkt eine starke Reduzierung der Kühlung und lässt die Temperatur der Partikel während der ns-Puls-Absorption an der Kavitationsschwelle abrupt ansteigen. Blasenbildung und Schmelzprozess treten daher immer in einem ähnlichen Fluenzbereich auf, was eine genaue Unterscheidung zwischen einer Proteinschädigung durch Schmelzeffekte und Kavitationsblasen praktisch unmöglich macht.

Auch mit der Nanosekunden-Bestrahlung lassen sich an Goldnanopartikel gekoppelte Enzyme inaktivieren. Als Schadensmechanismen kommen die gleichen Effekte wie bei der Pikosekunden-Bestrahlung infrage, wobei die ps-NALI bezüglich der Wirkung pro Bestrahlung effizienter ist. Bei der ns-NALI sind die geseedeten Pulse etwas wirksamer als die ungeseedeten. Anders als bei den ps-Pulsen findet bei der ns-Bestrahlung eine 50%-ige AP-Inaktivierung erst nach dem vollständigen Aufschmelzen der Goldpartikel statt. Eine räumliche Beschränkung der NALI-Wirkung ist hier also nicht erkennbar. Die nach dem Aufschmelzen entstehenden chemischen Produkte (Wasserradikale, Wasserstoffperoxid, solvatisierte Elektronen) wären für eine intrazelluläre Anwendung der NALI innerhalb der NPCPS allerdings nicht unbedenklich, da sie u. U. auch DNA-Veränderungen hervorrufen und unspe-

zifisch andere Biomoleküle in ihrer Umgebung schädigen können (gleiches gilt natürlich auch für die ps-NALI). Wie groß die Gefahr dieser Kollateralschäden dann ist, hängt von den Quenchern in den Zellen ab und müsste im Einzelfall geprüft werden.



# Kapitel 6

## Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden grundlegende *in-vitro*-Untersuchungen zur Nanopartikel-assistierten Laserinaktivierung (NALI) von Proteinen durchgeführt. Zur Analyse der für die Proteininaktivierung verantwortlichen Schadensmechanismen und -reichweite und zur Bestimmung der effizientesten NALI-Parameter wurden 6, 15 und 30 nm große Goldpartikel mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) beschichtet und mit Laserstrahlen mit Pulsdauern von 35 ps und 8,8 ns bestrahlt. Die Wellenlängen betrugen dabei 527 bzw. 532 nm.

Um die proteinspezifische Wirkung der NALI zu untersuchen, wurden verschiedene Kombinationen aus 15 nm Goldpartikeln und drei weiteren Modellenzymen (Meerrettich-Peroxidase, HRP; Beta-Galactosidase,  $\beta$ -Gal; alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen, SAP) sowie zwei unterschiedliche Goldpartikel-Antikörper-Enzym-Systeme mit Pikosekundenpulsen bestrahlt. Die Effekte auf Goldnanopartikel und Proteine, die beim laserinduzierten Erhitzen der Partikel auftreten, wurden mittels Messung der bestrahlungsabhängigen Enzyminaktivierung, Absorptionsspektroskopie, Transmissions-Elektronenmikroskopie und chromatographischer Untersuchungen analysiert. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf einer Bestrahlung mit ps-Pulsen, bei denen sich die absorbierte Energie innerhalb der Partikel im thermischen Gleichgewicht befindet, bezüglich des umgebenden Wassers jedoch im thermischen Einschluss. Dadurch werden die relevanten physikalischen Prozesse wesentlich überschaubarer und Berechnungen der Temperatur in und um die Par-

tikel vergleichsweise einfach. Gleichzeitig werden bei der ps-NALI die höchste Energieeffizienz und die geringsten Nebenwirkungen erwartet. Bei den im geringen Maße durchgeführten Bestrahlungsexperimenten mit ns-Pulsen wurden die NALI-Effizienzen von gaußförmigen (geseedeten) und Laserpulsen mit Intensitätsschwankungen (ungeseedete Pulse) verglichen.

Für die Untersuchungen waren von den drei verwendeten Partikelgrößen die 15 nm Goldpartikel am besten geeignet, weil sie mit den kationischen Oberflächenbereichen der Proteine AP und HRP die stabilsten Konjugate bildeten, ohne dabei die Aktivität der gebundenen Enzyme maßgeblich einzuschränken. Bei der Bestrahlung mit ps-Pulsen wurde eine räumliche Beschränkung der NALI-Wirkung nur beobachtet, wenn ein bestimmter Bestrahlungsgrenzwert nicht überschritten wurde. So blieb bei der Bestrahlung von 15Au-AP und 15Au-HRP mit  $18 \text{ mJ/cm}^2$  die rund 60%-ige Inaktivierung auf die direkte Enzymlage um die Partikel beschränkt. Als lokale Schädigungsmechanismen kommen hier hydromechanische Kavitationsblasen-Effekte, die bei Blasenexpansion und -kollaps auftreten, und Grenzflächendenaturierung (hydrophobe Entfaltung) innerhalb der Blase oder an der Blasenwand infrage. Außerdem könnten die Hitze in der Dampfblase und die elektrostatischen Bindungskräfte des Goldpartikels den Denaturierungsprozess noch verstärken.

Durch Proteinstruktur-stabilisierende BSA-Moleküle lässt sich die lokale NALI-Wirkung verhindern oder zumindest stark abschwächen. Die Inaktivierung von BSA-stabilisierten 15Au-AP und 15Au-HRP betrug nach Bestrahlung mit  $18 \text{ mJ/cm}^2$  nur noch etwa 10%. Bei den 15Au-Rezap-AP-Konjugaten, bei denen sich jeweils ein Antikörper zwischen den Enzymen und dem Goldpartikel befindet, war bis zu dieser Bestrahlung noch gar keine Inaktivierung nachweisbar.

Die Untersuchungen haben allerdings auch deutlich gezeigt, dass – bis auf SAP – praktisch alle Proteine im bestrahlten Volumen denaturieren, wenn die Bestrahlung hinreichend groß ist; sogar die ungebundenen, in der Probenlösung gleichmäßig verteilten Enzyme. Dabei scheint der lokale in einen nicht-lokalen Schädigungsmechanismus überzugehen. Die TEM-Analysen ergeben, dass die 15Au-Partikel bei ps-Puls-Bestrahlungen zwischen 13 und  $25 \text{ mJ/cm}^2$  schmelzen. Bei diesem Prozess könnten Elektronen von den erhitz-

ten Partikeln abgegeben werden, die dann als solvatisierte Elektronen Proteine schädigen. Gleichzeitig werden bei hohen Temperaturen innerhalb der Dampfblasen Wassermoleküle thermisch gespalten. Dadurch entstehen chemisch reaktive Wasserradikale und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Moleküle, welche die Enzyme oder andere Biomoleküle unspezifisch schädigen können. Überdies werden mit weiter zunehmender Bestrahlung die Dampfblasen immer größer. Hierdurch kann der Transport der chemisch reaktiven Teilchen in größere Regionen um die Partikel erfolgen. Durch Radikalfänger (z.B. Cysteamin) und Biomoleküle wie das BSA oder andere Proteine können diese reaktiven Produkte abgefangen und damit unschädlich gemacht werden (Konkurrenzschutz). Untersuchungen haben gezeigt, dass vor allem die nicht-lokale NALI-Wirkung durch Cysteamin und Antikörper deutlich abgeschwächt werden kann.

Ab einer Bestrahlung von ca.  $55 \text{ mJ/cm}^2$  (ps-Pulse) fragmentieren die  $15\text{Au}$ -Partikel. Hierbei entstehen dann neben den eben genannten chemisch reaktiven Produkten auch noch Goldfragmente. Ob die (möglicherweise geladenen) Goldfragmente an sich eine chemische Wirkung haben, ist unklar. Da die kleinen  $6\text{Au}$ -Partikel aber die AP-Enzymaktivität alleine durch deren Bindung um immerhin 70% reduzieren können, wäre eine ähnliche Wirkung auch durch Goldfragmente (auch bei anderen Enzymen) denkbar.

Ebenso fragmentieren direkt an  $15\text{Au}$  gebundene Antikörper bei dieser Fluenz. Die Proteinfragmentierung wird entweder durch hydromechanische Kavitationsblasen-Effekte oder durch die Partikelfragmentierung selbst verursacht. Außerdem beginnen bei  $55 \text{ mJ/cm}^2$  selbst die relativ NALI-unempfindlichen, ungebundenen  $\beta$ -Galactosidase-Moleküle zu denaturieren. Das einzige Enzym, das diese Bestrahlung in der Umgebung von Goldpartikeln fast ohne Aktivitätsverlust übersteht, ist SAP. Die Gründe für die NALI-Resistenz von SAP sind unklar. Dies macht aber deutlich, dass die NALI-Wirkung stark vom Proteintyp abhängt.

Diese Arbeit zeigt, dass die Wirkung der NALI wesentlich stärker von der Struktur des Zielproteins und dessen unmittelbarer Umgebung abhängt als bisher angenommen. Gleichzeitig ist das Bestrahlungsfenster, in dem selektive (d.h. räumlich begrenzte) Effekte erreicht werden können, deutlich kleiner als erwartet. Eine selektive Proteininaktivierung innerhalb einer Multi-

Protein-Matrix erfordert eine geringere Entfernung des Proteins zu dem Partikel, als durch eine klassische Antikörperbindung erreicht wird. Erfolgversprechender erscheint hier der Einsatz von kleinen selektiv bindenden Molekülen wie FAB-Fragmenten, RNA oder kleinen Peptidsequenzen. Doch selbst wenn es gelingt, die Goldpartikel sehr dicht an den Zielstrukturen zu platzieren, so zeigen schon die *in-vitro*-Untersuchungen an BSA-stabilisierten Konjugaten oder Goldpartikeln mit gebundenen Antikörpern, dass die Inaktivierungsraten der Zielenzyme durch andere Biomoleküle deutlich reduziert werden können. Dabei existiert innerhalb der Zellen eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, die eine mögliche Schutzwirkung gegen die NALI-Effekte ausüben könnten. Daher müsste die NALI-Wirkung nicht nur für jeden infrage kommenden Proteintyp, sondern auch in lebenden Zellen getestet werden. Eine Übertragung der Ergebnisse von *in-vitro*-Studien auf lebende Zellen ist nicht ohne weiteres möglich.

Grundsätzlich ist der Ansatz, eine rein thermische Proteininaktivierung an lasererhitzten Nanopartikeln zu erreichen, sehr reizvoll. Ein mögliches Verfahren hierzu könnten Laserpulse mit geringer Bestrahlung sein, die mit hoher Repetitionsrate (kHz bis MHz) über einen längeren Zeitraum auf die Probe appliziert werden. Die Bestrahlung wäre dabei so zu begrenzen, dass thermophysikalische Sekundäreffekte wie Partikelschmelzen und Kavitationsblasenbildung ausbleiben. Die gepulste Bestrahlung ist erforderlich, um die Temperaturerhöhung auf die Partikelumgebung zu beschränken, und die längere Wärmezufuhr sollte nach der Arrhenius-Theorie trotz vergleichsweise niedriger Denaturierungsraten noch zu einer nennenswerten Inaktivierung von gebundenen Proteinen führen. Welche Pulsdauern (fs, ps, ns) und Bestrahlungszeiten bei diesem Verfahren am besten geeignet wären, und ob hinreichende Denaturierungsraten überhaupt erzeugt werden können, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

# Literaturverzeichnis

- [1] S. Panzer. Die Anwendung des Lasers für die Materialbearbeitung. *Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Physik (ZAMP)*, 16:138–155, 1965.
- [2] A. Vogel, P. Schweiger, A. Frieser, M. N. Asiyó und R. Birngruber. Intraocular Nd:YAG laser surgery: laser-tissue interaction, damagerange, and reduction of collateral effects. *IEEE J Quantum Electron*, 26(12):2240–2260, 1990.
- [3] J. Roider, F. Hillenkamp, T. Flotte und R. Birngruber. Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(18):8643–8647, 1993.
- [4] A. Vogel, M. R. Capon, M. N. Asiyó-Vogel und R. Birngruber. Intraocular photodisruption with picosecond and nanosecond laser pulses: tissue effects in cornea, lens, and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(7):3032–3044, 1994.
- [5] M. J. C. van Gemert. *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. Kluwer Academic Publ., 1995.
- [6] S. L. Kilmer. Laser treatment of tattoos. *Dermatol Clin*, 15(3):409–417, 1997.
- [7] H. Niedrig, Herausgeber. *Optik*, Band 3 von *Bergmann - Schaefer: Lehrbuch der Experimentalphysik*. Walter de Gruyter, Berlin und New York, 10. Auflage, 2004.

- [8] G. Paltauf und P. E. Dyer. Photomechanical processes and effects in ablation. *Chem Rev*, 103(2):487–518, 2003.
- [9] A. Vogel und V. Venugopalan. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev*, 103(2):577–644, 2003.
- [10] R. R. Letfullin, C. Joenathan, T. F. George und V. P. Zharov. Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermalolysis of cancer. *Nanomed*, 1(4):473–480, 2006.
- [11] G. Hüttmann, B. Radt, J. Serbin, B. I. Lange und R. Birngruber. High Precision Cell Surgery with Nanoparticles. *Med Laser Appl*, 17:9–14, 2002.
- [12] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. Wei, R. R. Anderson und C. P. Lin. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophys J*, 84(6):4023–4032, 2003.
- [13] V. P. Zharov, R. R. Letfullin und E. N. Galitovskaya. Microbubbles-overlapping mode for laser killing of cancer cells with absorbing nanoparticle clusters. *J Phys D: Appl Phys*, 38:2571–2581, 2005.
- [14] G. Hüttmann, J. Serbin, B. Radt, B. I. Lange und R. Birngruber. Model system for investigating laser-induced subcellular microeffects. Band 4257, Seiten 398–409. SPIE, 2001.
- [15] G. Hüttmann, B. Radt, J. Serbin und R. Birngruber. Inactivation of proteins by irradiation of gold nanoparticles with nano- and picosecond laser pulses. Band 5142, Seiten 88–95. SPIE, 2003.
- [16] B. Radt. *Inaktivierung von Proteinen und Zellen durch Laserbestrahlung von Mikropartikeln*. Dissertation, Universität Lübeck, 2002.
- [17] W. A. Weyl. *Coloured Glasses*. Dawson’s Pall Mall, London, 1959.
- [18] M. Faraday. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Phil Trans Royal Soc London*, 147:145–181, 1857.

- [19] F. Kirchner und R. Zsigmody. Über die Ursachen der Farbänderung von Gold Gelatinepräparaten. *Ann Phys*, 15:573–595, 1904.
- [20] U. Kreibig und M. Vollmer. *Optical Properties of Metal Clusters*. Number 25 in Springer Series in Materials Science. Springer-Verlag, Berlin, 1995.
- [21] H. Raether. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer Tracts in Modern Physics. Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- [22] G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metalösungen. *Annalen der Physik*, 330:377–445, 1908.
- [23] H. C. van de Hulst. *Light Scattering by Small Particles*. Structure of Matter Series. Dover Publications Inc., New York, 1981.
- [24] P. B. Johnson und R. W. Christy. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys Rev B*, 6(12):4370–4379, 1972.
- [25] G. V. Hartland. Measurements of the material properties of metal nanoparticles by time-resolved spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*, 6:5263–5274, 2004.
- [26] V. Kotaidis, C. Dahmen, G. von Plessen, F. Springer und A. Plech. Excitation of nanoscale vapor bubbles at the surface of gold nanoparticles in water. *J Chem Phys*, 124(18):184702, 2006.
- [27] V. K. Pustovalov. Investigation of threshold laser intensities for melting and evaporation of spherical and spheroidal nanoparticles in media by short laser pulses. *Chem Phys Lett*, 421:142–147, 2006.
- [28] S. Link und M. A. El-Sayed. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem*, 54:331–366, 2003.
- [29] A. Plech, V. Kotaidis, V. Grésillon, C. Dahmen und G. von Plessen. Laser-induced heating and melting of gold nanoparticles studied by time-resolved x-ray scattering. *Phys Rev B*, 70(19):195423, 2004.

- [30] M. Perner. *Optische Untersuchung der Elektronen- und Gitterdynamik in Edelmetall-Nanopartikeln*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1999.
- [31] M. Hu und G. V. Hartland. Heat Dissipation for Au Particles in Aqueous Solution: Relaxation Time versus Size. *J Phys Chem B*, 106(28):7029–7033, 2002.
- [32] J. Neumann. *Mikroskopische Untersuchungen zur laserinduzierten Blasenbildung und -dynamik an absorbierenden Mikropartikeln*. Dissertation, Universität Lübeck, 2005.
- [33] H. S. Carslaw und J. C. Jaeger. *Conduction of Heat in Solids*. Oxford University Press, 2. Auflage, 1959.
- [34] H. Goldenberg und C. J. Tranter. Heat flow in an infinite medium heated by a sphere. *Br J Appl Phys*, 3:296–298, 1952.
- [35] K. Kleinermanns, Herausgeber. *Gase, Nanosysteme, Flüssigkeiten*, Band 5 von *Bergmann - Schaefer: Lehrbuch der Experimentalphysik*. Walter de Gruyter, Berlin und New York, 2. Auflage, 2006.
- [36] G. Chen. Ballistic-Diffusive Equations for Transient Heat Conduction from Nano to Macroscales. *J Heat Trans*, 124:320–328, 2002.
- [37] Z. Ge, D. G. Cahill und P. V. Braun. AuPd Metal Nanoparticles as Probes of Nanoscale Thermal Transport in Aqueous Solution. *J Phys Chem B*, 108(49):18870–18875, 2004.
- [38] M. Otter. Optische Konstanten massiver Metalle. *Z Physik A*, 161(2):163–178, 1961.
- [39] D. R. Lide, Herausgeber. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 76. Auflage, 1996.
- [40] W. Wagner und A. Pruß. The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use. *J Phys Chem Ref Data*, 31(2):387–535, 2002.

- 
- [41] C. E. Brennen. *Cavitation and Bubble Dynamics*. Oxford University Press, New York, 1995.
  - [42] M. Blander und J. L. Katz. Bubble nucleation in liquids. *AIChE Journal*, 21(5):833–848, 1975.
  - [43] I. Thormählen. *Grenze der Überhitzbarkeit von Flüssigkeiten - Keimbildung und Keimaktivierung*. VDI Verlag, Düsseldorf, 1985.
  - [44] P. G. Debenedetti, Herausgeber. *Metastable liquids: concepts and principles*. Princeton University Press, 1996.
  - [45] S. Glod, D. Poulikakos, Z. Zhao und G. Yadigaroglu. An investigation of microscale explosive vaporization of water on an ultrathin Pt wire. *Int J Heat Mass Trans*, 45(2):367–379, 2002.
  - [46] J. Neumann und R. Brinkmann. Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses. *J Biomed Opt*, 10(2):024001, 2005.
  - [47] V. P. Carey. *Liquid-vapor phase-change phenomena: an introduction to the thermophysics of vaporization and condensation processes in heat transfer equipment*. Hemisphere, New York, NY, 6. Auflage, 1992.
  - [48] A. Vogel, W. Lauterborn und R. Timm. Optical and acoustic investigations of the dynamics of laser-produced cavitation bubbles near a solid boundary. *J Fluid Mech*, 206:299–338, 1989.
  - [49] A. Plech, V. Kotaidis, M. Lorenc und M. Wulff. Thermal dynamics in laser excited metal nanoparticles. *Chem Phys Lett*, 401:565–569, 2005.
  - [50] V. Kotaidis und A. Plech. Cavitation dynamics on the nanoscale. *Appl Phys Lett*, 87(21):2131021–2131023, 2005.
  - [51] S. Arnold. Nachweis von Kavitationsblasen um laserbestrahlte Nanopartikel. Diplomarbeit, Universität Lübeck, 2005.

- [52] IAPWS. The International Association for the Properties of Water and Steam. Technical report, International Association for the Properties of Water and Steam, Erlangen, Deutschland, 1997.
- [53] H. Sakai. Surface-induced melting of small particles. *Surf Sci*, 351:285–291, 1996.
- [54] Z. L. Wang, J. M. Petroski, T. C. Green und M. A. El-Sayed. Shape Transformation and Melting of Cubic and Tetrahedral Platinum Nanocrystals. *J Phys Chem B*, 102(35):6145–6151, 1998.
- [55] S. Link und M. A. El-Sayed. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, 19(3):409–453, 2000.
- [56] A. Plech, V. Kotaidis, M. Wulff, C. Dahmen und G. von Plessen. Light-induced structural phase behaviour of metal nanoparticle materials. *J Phys Conf Ser*, 21:50–55, 2005.
- [57] K. Yamada, Y. Tokumoto, T. Nagata und F. Mafune. Mechanism of laser-induced size-reduction of gold nanoparticles as studied by nanosecond transient absorption spectroscopy. *J Phys Chem B*, 110(24):11751–11756, 2006.
- [58] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk und J. Darnell. *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter, Berlin und New York, 1996.
- [59] M. M. de Backer, S. McSweeney, H. B. Rasmussen, B. W. Riise, P. Lindley und E. Hough. The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *J Mol Biol*, 318(5):1265–1274, 2002.
- [60] S. Govindarajan und R. A. Goldstein. On the thermodynamic hypothesis of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(10):5545–5549, 1998.
- [61] C. Combet, M. Jambon, G. Deléage und C. Geourjon. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics*, 18(1):213–214, 2002.

- 
- [62] GENO3D. Automatic modeling of proteins three-dimensional structure. Geno3D online, Release 2, Lyon, 2006.
- [63] A. Godfroy, N. D. Raven und R. J. Sharp. Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol Lett*, 186(1):127–132, 2000.
- [64] C. Vieille und G. J. Zeikus. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(1):1–43, 2001.
- [65] T. J. Ahern und A. M. Klibanov. The mechanisms of irreversible enzyme inactivation at 100C. *Science*, 228(4705):1280–1284, 1985.
- [66] C. E. Mortimer. *Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 6 Auflage, 1996.
- [67] S. Arrhenius. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Phys Chem*, 4:226–248, 1889.
- [68] R. Birngruber, F. Hillenkamp und V. P. Gabel. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys*, 48(6):781–796, Jun 1985.
- [69] S. Glasstone, K. J. Laidler und J. Eyring. *The Theory of Rate Processes*. McGraw-Hill, New York, 1941.
- [70] U. Mayor, C. M. Johnson, V. Daggett und A. R. Fersht. Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(25):13518–13522, 2000.
- [71] E. Paci und M. Karplus. Unfolding proteins by external forces and temperature: the importance of topology and energetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(12):6521–6526, 2000.
- [72] A. R. Dinner und M. Karplus. Is protein unfolding the reverse of protein folding? A lattice simulation analysis. *J Mol Biol*, 292(2):403–419, 1999.

- 
- [73] I. Langmuir. Protein monolayers. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 6:171–189, 1938.
- [74] C. Tanford. How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Sci*, 6(6):1358–1366, 1997.
- [75] R. J. Green, I. Hopkinson und R. A. L. Jones. Unfolding and Intermolecular Association in Globular Proteins Adsorbed at Interfaces. *Langmuir*, 15(15):5102–5110, 1999.
- [76] J. R. Clarkson, Z. F. Cui und R. C. Darton. Protein Denaturation in Foam: I. Mechanism Study. *J Colloid Interface Sci*, 215(2):323–332, 1999.
- [77] J. R. Clarkson, Z. F. Cui und R. C. Darton. Protein Denaturation in Foam: II. Surface Activity and Conformational Change. *J Colloid Interface Sci*, 215(2):333–338, 1999.
- [78] J. T. Edsall und H. A. McKenzie. Water and proteins. II. The location and dynamics of water in protein systems and its relation to their stability and properties. *Adv Biophys*, 16:53–183, 1983.
- [79] K. Takano, Y. Yamagata und K. Yutani. Buried water molecules contribute to the conformational stability of a protein. *Protein Eng*, 16(1):5–9, 2003.
- [80] L. A. Chambers und E. W. Flosdorf. THE DENATURATION OF PROTEINS BY SOUND WAVES OF AUDIBLE FREQUENCIES. *J Biol Chem*, 114:75–83, 1936.
- [81] W. T. Coakley, R. C. Brown, C. J. James und R. K. Gould. The inactivation of enzymes by ultrasonic cavitation at 20 kHz. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159(2):722–729, 1973.
- [82] M. A. Margulis. *Sonochemistry and Cavitation*. Taylor & Francis, 1. Auflage, 1995.

- [83] P. B. Stathopoulos, G. A. Scholz, Y. M. Hwang, J. A. O. Rumfeldt, J. R. Lepock und E. M. Meiering. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci*, 13(11):3017–3027, 2004.
- [84] P. W. Bridgman. THE COAGULATION OF ALBUMEN BY PRESSURE. *J Biol Chem*, 19:511–512, 1914.
- [85] K. Suzuki. Studies on the kinetics of protein denaturation under high pressure. *Rev Phys Chem Japan*, 29:91–98, 1960.
- [86] S. A. Hawley. Reversible Pressure-Temperature Denaturation of Chymotrypsin. *Biochemistry*, 10(13):2436–2442, 1971.
- [87] Balny. Pressure effects on weak interactions in biological systems. *J Phys: Condens. Matter*, 16:1245–1253, 2004.
- [88] P. Heindl. *Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Stabilität und Infektiosität von Prion-Proteinen*. Dissertation, Universität Karlsruhe, 2005.
- [89] A. D. McLaren und D. Shugar. *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids (Pure & Applied Biological Monograph)*. Elsevier, 1964.
- [90] B. Pullman und N. Goldblum, Herausgeber. *Excited States in Organic Chemistry and Biochemistry*. D. Reidel Publishing Company, Holland, 1977.
- [91] M. Burke und L. Augenstein. A comparison of the effects of ultraviolet and ionizing radiations on trypsin activity and on its constituent amino acids. *Biochem J*, 114:535–545, 1969.
- [92] D. A. Malencik und S. R. Anderson. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids*, 25:233–247, 2003.
- [93] M. Simic und E. Hayon. Reductive deamination of oligopeptides by solvated electrons in aqueous solution. *Radiat Res*, 48(2):244–255, 1971.

- 
- [94] T. E. McGrath, A. C. Beveridge und G.J. Diebold. Laser-Induced Regeneration of Colloidal Particles: The Effects of Thermal Inertia on the Chemical Reactivity of Laser-Heated Particles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38(22):3353–3356, 1999.
- [95] C. M. Feldherr und J. M. Marshall. The use of colloidal gold for studies of intracellular exchanges in the ameba *Chaos chaos*. *J Cell Biol*, 12:640–645, 1962.
- [96] W. P. Faulk und G. M. Taylor. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 8(11):1081–1083, 1971.
- [97] W. D. Geoghegan, J. J. Scillian und G. A. Ackerman. The detection of human B lymphocytes by both light and electron microscopy utilizing colloidal gold labeled anti-immunoglobulin. *Immunol Commun*, 7(1):1–12, 1978.
- [98] M. Horisberger und M. Vonlanthen. Fluorescent colloidal gold: a cytochemical marker for fluorescent and electron microscopy. *Histochemistry*, 64(1):115–118, Nov 1979.
- [99] C. S. S. R. Kumar, Herausgeber. *Nanomaterials for Cancer Diagnosis: 7. Nanotechnologies for the Life Sciences*. Wiley-VCH, Weinheim, 1. Auflage, 2006.
- [100] C. L. Schmidt. Persönliche Mitteilung. Universität Lübeck, 2007.
- [101] D. Schomburg, I. Schomburg und A. Chang. *Class 3.1 Hydrolases V*, Band 10 von *Springer Handbook of Enzymes*. Springer Verlag, Berlin, 2003.
- [102] T. W. Reid und I. B. Wilson. *The Enzymes*, Band 4. Academic Press, New York und London, 3. Auflage, 1971.
- [103] R. B. McComb, G. N. Bowers und S. Posen. *Alkaline phosphatase*. Plenum Press, New York, 1979.

- 
- [104] T. Manes, M. F. Hoylaerts, R. Müller, F. Lottspeich, W. Hölke und J. L. Millián. Genetic Complexity, Structure, and Characterization of Highly Active Bovine Intestinal Alkaline Phosphatases. *J Biol Chem*, 273(36):23353–23360, 1998.
- [105] Fa. SIGMA-ALDRICH. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, 2007.
- [106] Fa. SIGMA-ALDRICH. AP-Produktinformationen (P5521), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, 2007.
- [107] EMBL. European Molecular Biology Laboratory: WWW Gateway to Isoelectric Point Service, 2007.
- [108] H. Weissig, A. Schildge, M. F. Hoylaerts, M. Iqbal und J. L. Millián. Cloning and expression of the bovine intestinal alkaline phosphatase gene: biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Biochem J*, 290:503–508, 1993.
- [109] M. H. Le Du, T. Stigbrand, M. J. Taussig, A. Menez und E. A. Stura. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J Biol Chem*, 276(12):9158–9165, 2001.
- [110] L. M. Shannon, E. Kay und J. Y. Lew. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J Biol Chem*, 241(9):2166–2172, 1966.
- [111] D. Schomburg und I. Schomburg. *Class 1 Oxireductases X*, Band 25 von *Springer Handbook of Enzymes*. Springer Verlag, Berlin, 2005.
- [112] Fa. SIGMA-ALDRICH. HRP-Produktinformationen (P6140), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, 2007.
- [113] G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen und J. Hajdu. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417(6887):463–468, 2002.

- [114] PDB Protein Data Bank. Internet-Proteindatenbank, 2007.
- [115] R. Olsen, K. Overbo und B. Myrnes. Alkaline phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): a dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comp Biochem Physiol*, 99(4):755–761, 1991.
- [116] USBweb.com. Facts on SAP. USB Corporation, 26111 Miles Road, Cleveland, Ohio 44128, USA, 2007.
- [117] Fa. SIGMA-ALDRICH. SAP-Produktinformationen (P9088), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, 2007.
- [118] M. M. de Backer, S. McSweeney, P. F. Lindley und E. Hough. Ligand-binding and metal-exchange chrystallographic studies on shrimp alkaline phosphatase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60:1555–1561, 2004.
- [119] D. Schomburg, I. Schomburg und A. Chang. *Class 3.2 Hydrolases VII*, Band 12 von *Springer Handbook of Enzymes*. Springer Verlag, Berlin, 2003.
- [120] Fa. SIGMA-ALDRICH.  $\beta$ -Gal-Produktinformationen (G5635), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, 2007.
- [121] Brian W Matthews. The structure of *E. coli* beta-galactosidase. *C R Biol*, 328(6):549–556, 2005.
- [122] A. V. Fowler und I. Zabin. The amino acid sequence of beta galactosidase. I. Isolation and composition of tryptic peptides. *J Biol Chem*, 245(19):5032–5041, 1970.
- [123] D. H. Juers, R. H. Jacobson, D. Wigley, X. J. Zhang, R. E. Huber, D. E. Tronrud und B. W. Matthews. High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation. *Protein Sci*, 9(9):1685–1699, 2000.

- [124] R. Rahmanzadeh. Persönliche Mitteilung. Universität Lübeck, 2007.
- [125] G. Cattoretti, M. H. Becker, G. Key, M. Duchrow, C. Schlüter, J. Galle und J. Gerdes. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 168(4):357–363, 1992.
- [126] G. Key, M. H. Becker, B. Baron, M. Duchrow, C. Schlüter, H. D. Flad und J. Gerdes. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest*, 68(6):629–636, 1993.
- [127] Fa. AURION. *Aurion Gold Sols*. Aurion, Costerweg 5, 6702 AA Wageningen, NL, 2006.
- [128] Fa. BBI. *Preparation of Antibody/Protein-Gold Conjugates*. British Biocell International, Golden Gate, Ty Glas Avenue, Cardiff, CF14 5DX, UK, 2006.
- [129] A. J. Verkleij und J. L. M. Leunissen. *Immunogold Labeling in Cell Biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1989.
- [130] M. A. Hayat. *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. Academic Press, New York, 1989.
- [131] P. van de Plas. Persönliche Mitteilung. Fa. Aurion, NL, 2005.
- [132] R. Wilson. Nanoparticle conjugates and method of production thereof. Patent WO/2004/047,870, 2004.
- [133] J. Eichler und H. J. Eichler. *Laser - Bauformen, Strahlführungen, Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin, 4. Auflage, 2001.
- [134] O. Durand, V. Grolier-Mazza und R. Frey. Picosecond-resolution study of nonlinear scattering in carbon black suspensions in water and ethanol. *Opt Lett*, 23(18):1471–1473, 1998.

- [135] O. Durand, V. Grolier-Mazza und R. Frey. Temporal and Angular Analysis of Nonlinear Scattering in Carbon Black Suspensions in Water and Ethanol. *J Opt Soc Am B*, 16(9):1431–1438, 1999.
- [136] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann Phys*, 17:549–560, 1905.
- [137] J. O'M. Bockris, B. Dandapani, D. Cocke und J. Ghoroghchian. On the splitting of water. *Int J Hydrogen Energy*, 10(30):179–201, 1985.
- [138] H. Dertinger und H. Jung. *Molekulare Strahlenbiologie*. Springer Verlag, Berlin, 1969.
- [139] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani und W. C. W. Chan. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*, 6(4):662–668, 2006.
- [140] G. Raschke. *Molekulare Erkennung mit einzelnen Gold-Nanopartikeln*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005.
- [141] P. V. Kamat. Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. *J Phys Chem B*, 106(32):7729–7744, 2002.
- [142] P. Grua, J. P. Morreeuw, H. Bercegol., G. Jonusauskas und F. Vallee. Electron kinetics and emission for metal nanoparticles exposed to intense laser pulses. *Phys Rev B*, 68(3):035424, 2003.
- [143] C. M. Cooney, C. V. Morr, M. A. Nielsen und R. H. Schmidt. Hydrogen peroxide-induced denaturation-aggregation of whey proteins. *J Dairy Sci*, 54:753, 1971.
- [144] F. Rudnitzki. Modelling of the optical properties and temperature distribution in and around gold nanorods. Master's thesis, Universität Lübeck, 2008.

# Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

|                    |                                                                                          |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6Au                | 6 nm Goldpartikel                                                                        |
| 15Au               | 15 nm Goldpartikel                                                                       |
| 30Au               | 30 nm Goldpartikel                                                                       |
| 15Au-AP            | 15 nm Goldpartikel mit direkt gebundenen AP-Molekülen                                    |
| 15Au-AP+BSA        | 15 nm Goldpartikel mit direkt gebundenen AP-Molekülen<br>und mit BSA stabilisiert        |
| 15Au-HRP           | 15 nm Goldpartikel mit direkt gebundenen HRP-Molekülen                                   |
| 15Au-HRP+BSA       | 15 nm Goldpartikel mit direkt gebundenen HRP-Molekülen<br>und mit BSA stabilisiert       |
| 15Au+ $\beta$ -Gal | 15 nm Goldpartikel, versetzt mit Beta-Galactosidase                                      |
| 15Au+SAP           | 15 nm Goldpartikel, versetzt mit alkalischer Phospha-<br>tase aus Eismeergarnelen        |
| 15Au-Mib1+AP       | 15 nm Goldpartikel mit gebundenen Mib-1-Antikörpern,<br>versetzt mit AP                  |
| 15Au-Rezap-AP      | 15 nm Goldpartikel mit gebundenen Rezap-Antikörpern<br>und daran gebundenen AP-Molekülen |
| <i>A</i>           | relative Enzymaktivität (%)                                                              |

---

|                             |                                                                          |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| $a_L, b_L$                  | elektrischer und magnetischer Streukoeffizient                           |
| $A_0$                       | präexponentieller Faktor ( $s^{-1}$ )                                    |
| Ak                          | Antikörper                                                               |
| AP                          | alkalische Phosphatase aus der Rinderdarmschleimhaut                     |
| $\beta$ -Gal                | Beta-Galactosidase aus dem Bakterium E. coli                             |
| BSA                         | Rinderserumproteine                                                      |
| $c_A$                       | Konzentration des Reaktanden A ( $kg\ m^3$ )                             |
| $c_p$                       | spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck ( $J\ kg^{-1}\ K^{-1}$ ) |
| $E_a$                       | Aktivierungsenergie ( $J\ mol^{-1}$ )                                    |
| $E_b$                       | Energie einer Kavitationsblase (J)                                       |
| $\tilde{\epsilon}(\lambda)$ | komplexe, frequenzabhängige dielektrische Funktion                       |
| $f$                         | Brennweite (m)                                                           |
| $G_K$                       | Grenzflächen-Wärmeleitfähigkeit ( $W\ m^{-2}\ K^{-1}$ )                  |
| $H$                         | Bestrahlung oder Fluenz ( $J\ m^{-2}$ )                                  |
| $H_{50\%}$                  | Bestrahlungsdosis für eine 50%-ige Proteininaktivierung ( $J\ m^{-2}$ )  |
| HR532                       | hochreflektierend für 532 nm                                             |
| HRP                         | Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)                          |
| HT1064                      | hochtransmittierend für 1064 nm                                          |
| IEP                         | Isoelektrischer Punkt                                                    |
| $K$                         | Wärmeleitfähigkeit ( $W\ m^{-1}\ K^{-1}$ )                               |

---

|             |                                                                                           |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| $k$         | Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion ( $\text{s}^{-1}$ )                              |
| $\kappa$    | spezifische Wärmediffusivität oder Temperaturleitfähigkeit ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) |
| $k_B$       | Boltzmann-Konstante ( $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ )                                |
| $\lambda$   | Wellenlänge (m)                                                                           |
| $\mu$       | Permeabilitätszahl                                                                        |
| $\mu$       | Viskosität ( $\text{Pa s}$ )                                                              |
| NALI        | Nanopartikel-assistierte Laserinaktivierung                                               |
| NPCS        | Nanopartikel-Zellchirurgie (nanoparticle cell surgery)                                    |
| OD          | optische Dichte (bei 520 nm)                                                              |
| $\Omega$    | Schädigungsintegral                                                                       |
| $p_0$       | atmosphärischer Standarddruck ( $1,013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ )                           |
| $p_b$       | Blaseninnendruck (Pa)                                                                     |
| $p_{b,i}$   | Initialdruck der Blase (Pa)                                                               |
| $p_{sat}$   | Sättigungsdampfdruck (Pa)                                                                 |
| $q$         | volumetrische Leistungsdichte ( $\text{W m}^{-3}$ )                                       |
| $Q_{abs}$   | Absorptionseffizienz oder Q-Faktor                                                        |
| $\dot{Q}$   | Wärmefluss ( $\text{J s}^{-1}$ )                                                          |
| $R$         | Restaktivität (%)                                                                         |
| $R$         | Partikelradius (m)                                                                        |
| $R_{b,max}$ | maximaler Gasblasenradius (m)                                                             |
| $R_g$       | universelle Gaskonstante ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )                    |

|                                            |                                                                                 |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| $\rho$                                     | Dichte ( $\text{kg m}^{-3}$ )                                                   |
| $\rho c_p$                                 | volumetrische Wärmekapazität ( $\text{J m}^{-3} \text{ K}^{-1}$ )               |
| $R_K$                                      | Kapitza-Wärmeleitungswiderstand ( $\text{m}^2 \text{ K W}^{-1}$ )               |
| $\dot{R}$                                  | Blasenexpansionsgeschwindigkeit ( $\text{m s}^{-1}$ )                           |
| $R_x$                                      | spezifische Gaskonstante ( $\text{J K}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ )                  |
| $S$                                        | Entropie ( $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )                                 |
| SAP                                        | alkalische Phosphatase aus der Darmanhangdrüse von Eismeergarnelen              |
| $\sigma$                                   | Oberflächenspannung ( $\text{N m}^{-1}$ )                                       |
| $\sigma_{abs}, \sigma_{ext}, \sigma_{str}$ | Wirkungsquerschnitt für Absorption, Extinktion und Streuung ( $\text{m}^2$ )    |
| $T$                                        | Temperatur (K oder °C)                                                          |
| $T_0$                                      | Raumtemperatur (20 °C)                                                          |
| $\tau$                                     | Relaxationszeit (s)                                                             |
| $\tau_c$                                   | Kollapszeit einer Blase (s)                                                     |
| $T_c$                                      | kritischer Punkt von Wasser (647,1 K; 22,06 MPa)                                |
| $T_{ev}$                                   | Siedepunkt (K oder °C)                                                          |
| $T_m$                                      | Schmelztemperatur (K oder °C)                                                   |
| $T_{nuc}$                                  | Nukleationstemperatur (K oder °C)                                               |
| $T_{sp}$                                   | spinodaler Punkt bei Normaldruck (582 K; 101,3 kPa)                             |
| $W$                                        | Wendepunkt in der Schulter der Proteininaktivierungskurve ( $\text{J m}^{-2}$ ) |

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reginald Birngruber, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck, für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gereon Hüttmann, der mir als Aufgabensteller und Betreuer dieser Arbeit die Gelegenheit gab, aktuelle und hochinteressante Forschung im Bereich der Biophysik zu betreiben. Seine zahlreichen kompetenten Hilfestellungen und Anregungen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso herzlich sei Herrn Prof. Dr. Christian Schmidt vom Institut für Biologie der Universität zu Lübeck gedankt. Sein großer Erfahrungsschatz auf dem Gebiet der Molekularbiologie war äußerst hilfreich bei einigen biologischen bzw. biochemischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Gebert vom Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck danke ich für die Unterstützung bei den TEM-Untersuchungen.

Als Nächstes sei Herrn Dr. Ramtin Rahmanzadeh gedankt, der mir mit seinem biologischen Fachwissen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Barbara Flucke bedanken, die mir bei der Anfertigung der Proben half und mich bei der Arbeit im Zellabor unterstützt hat.

Bei Herrn Florian Rudnitzki möchte ich mich für das Korrekturlesen meiner Dissertation bedanken.

Schließlich danke ich noch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biomedizinische Optik, die diesen oder jenen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als letztes verbleibt mir noch, mich bei meiner Familie zu bedanken. An erster Stelle bei meiner Lebensgefährtin Birgitta Ladewig und unserem Sohn Janis. Beide haben mich mit viel Verständnis durch diese Zeit begleitet. Genauso danke ich meinen Eltern, auch sie haben mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt.

Diese Arbeit wurde durch Fördermittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung finanziert (BMBF Förderkennziffer 13N8461: Photonische Techniken zur zellulären Nanochirurgie), auch dafür sei gedankt. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Teilnahme an internationalen Konferenzen