

**Nano-Heizplatten:
Optothermisches DNA-Schmelzen
mit Gold-Nanopartikeln**

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Joachim Stehr

aus Bamberg

München, im September 2008

Betreuer: Prof. Dr. Jochen Feldmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Kotthaus

weitere Mitglieder der Promotionskommission:

Prof. Dr. Philip Tinnefeld und Prof. Dr. Ulrich Gerland

Mündliche Prüfung am 17.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	5
2.1	Freie Gold-Nanopartikel.....	6
2.1.1	Optische Anregung von Nanopartikeln.....	6
2.1.2	Dämpfungsmechanismen der Plasmonoszillation.....	9
2.1.3	Dielektrische Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln.....	11
2.1.4	Mie-Theorie.....	16
2.1.5	Optothermische Eigenschaften freier Gold-Nanopartikel.....	19
2.2	Aggregate aus Gold-Nanopartikeln.....	27
2.2.1	Optische Eigenschaften von Aggregaten.....	27
2.2.2	Optothermische Eigenschaften von Aggregaten.....	31
2.3	Hybridsystem DNA/Gold-Nanopartikel.....	33
2.3.1	DNA.....	33
2.3.2	Freie DNA-funktionalisierte Gold-Nanopartikel.....	39
2.3.3	Aggregate aus DNA-gebundenen Gold-Nanopartikeln.....	41
3	Experimentelle und numerische Methoden.....	47
3.1	Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit DNA.....	48
3.2	Herstellung von DNA-gebundenen Aggregaten.....	49
3.3	Messung der optothermisch induzierten Extinktionsänderung.....	50
3.4	Diskrete Dipol Approximation.....	53

3.5 Finite Elemente	55
4 DNA-Schmelzen durch globales optothermisches Heizen	57
4.1 Optothermisches Schmelzen von DNA durch kontinuierliches, optisches Heizen von Gold-Nanopartikeln	58
4.2 Globales optothermisches Heizen durch lokal absorbierende Objekte.....	66
5 DNA-Schmelzen durch lokales optothermisches Heizen	73
5.1 Spektroskopie an lokal geheizten DNA-gebundenen Nanopartikel-Aggregaten	74
5.2 Zeitaufgelöste Messungen an lasergeheizten Gold-Nanopartikel-Aggregaten.....	77
5.2.1 Die optothermische Schmelzkurve.....	83
5.2.2 Der plasmonische Ursprung der optisch induzierten Extinktionsänderung	87
5.2.3 Die Aufheiz- und Abkühlodynamik optothermisch geheizter Aggregate.....	94
6 Die optothermische Schmelztemperatur: Überhitzung der DNA.....	99
6.1 Extrapolation der optothermischen Schmelztemperatur	101
6.2 Modellrechnung zur Erwärmung von Gold-Aggregaten	103
6.3 Limitierte Reaktionszeit der DNA als Ursache für die DNA-Überhitzung.	111
7 Anwendung: Schnelle SNP-Detektion nach optothermischem Einpuls-Heizen.....	115
8 Zusammenfassung und Ausblick	121
Literaturverzeichnis	129
Anhang.....	143
Danksagung.....	145

Kurzfassung

Die Plasmonresonanz und der daraus resultierende hohe Absorptionsquerschnitt erlauben es, Gold-Nanopartikel als optothermische Konverter einzusetzen und Licht effizient in Wärme umzuwandeln. Diese optisch induzierte Wärme wird in dieser Arbeit genutzt, um goldgebundene DNA kontrolliert zu erwärmen und schließlich zu schmelzen. Gold-Nanopartikel werden somit zu optothermischen „Nano-Heizplatten“. Neben der optothermischen Umwandlung werden die plasmonischen Eigenschaften der Nanopartikel hierbei auch zur Detektion des Bindungszustandes der DNA eingesetzt. DNA-funktionalisierte Gold-Nanopartikel werden durch DNA-Hybridisierung miteinander zu großen Aggregaten aus bis zu 10.000 Partikeln verbunden. Extinktionsspektren der Nanopartikel-Aggregate zeigen im Vergleich zu Spektren freier Nanopartikel aufgrund der abstandsabhängigen Plasmonenkopplung eine rotverschobene und verbreiterte Plasmonresonanz. Diese Extinktionsänderung der Nanopartikel kann als Indikator für DNA-Schmelzen eingesetzt werden, da DNA-Schmelzen zum Auflösen des Aggregatverbandes führt.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sowohl kontinuierliche als auch gepulste Laserbestrahlung mit Pulsdauern von ~ 100 ns ausreichend hohe Temperaturen in Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln erzeugt, um die DNA darin optothermisch zu schmelzen. Während im Fall kontinuierlicher Anregung eine globale, homogene Erwärmung des gesamten bestrahlten Volumens stattfindet, führt gepulste Anregung zu einer stark lokalisierten Erwärmung der Nanopartikel-Aggregate.

Optische Anrege-Abfrage-Experimente erlauben die zeitliche Auflösung des Aufheizprozesses der Aggregate während der gepulsten Anregung und der Abkühlung der Aggregate auf der Mikrosekunden-Zeitskala. Bei ausreichend hoher eingestrahelter Leistungsdichte wird beobachtet, dass Gold-Nanopartikel aus dem Aggregatsverband freigesetzt werden und die freigesetzten Partikel auf der Millisekunden-Zeitskala auseinander diffundieren. Dies zeigt, dass während der kurzen erwärmten Phase Schmelzen der DNA stattgefunden hat. Um DNA-Schmelzen beobachten zu können, muss eine bestimmte Schwelle der eingestrahelten Leistungsdichte überschritten werden. Diese Schwelle hängt sowohl von der Größe der Aggregate als auch von der Ausgangstemperatur des Wärmebades ab. Je kleiner die Temperaturdifferenz zwischen DNA-Schmelztemperatur und Ausgangstemperatur, desto geringer ist die benötigte optisch eingestrahelte Leistungsdichte, um optothermisches DNA-Schmelzen zu induzieren. Eine genaue Analyse dieses Verhaltens zeigt, dass die DNA in kurzzeitig optisch erwärmten Aggregaten bei einer „optothermischen Schmelztemperatur“ schmilzt, die weit über der „klassischen Schmelztemperatur“ liegt, die bei langsamer Erhitzung der DNA beobachtet wird. Diese erhöhte optothermische Schmelztemperatur wird durch eine numerische Modellrechnung der optisch induzierten Temperatur in den Aggregaten bestätigt. Das hierbei verwendete Modell berücksichtigt sowohl die Plasmonenkopplung als auch Abschattungseffekte im Nanopartikel-Aggregat, die aufgrund der limitierten Eindringtiefe des Heizlasers im Aggregat entstehen. Die kurzzeitige Überhitzung der DNA wird als Folge der limitierten chemischen Reaktionszeit der DNA diskutiert.

Schließlich wird der Nachweis einer Punktmutation in der verbindenden DNA durch einen einzigen Laserpuls als Anwendung des optothermischen DNA-Schmelzens vorgestellt.

1 Einleitung

Die DNA zweier Menschen ist in nahezu jeder ihrer $3 \cdot 10^9$ Basenpaare identisch. Es sind kleinste Abweichungen im DNA-Muster, die zwei Individuen einzigartig und unterscheidbar machen. Genetische Merkmale unterschiedlichster Art ergeben sich hierbei oftmals bereits aus der Änderung eines einzelnen DNA-Basenpaares, die auch Single Nucleotide Polymorphisms oder SNPs genannt werden. Etwa 6 Mio. SNPs sind derzeit bekannt und in Datenbanken verzeichnet. Welche genetische Funktion oder Auswirkung der jeweilige SNP hat, ist jedoch nur von einem kleinen Bruchteil bekannt. Einige SNPs sind vollkommen ungefährlich und bestimmen Größe, Haar- oder Augenfarbe eines Menschen. Andere SNPs sind verantwortlich für ein erhöhtes Risiko für Herzinfarkt, Krebs, Diabetes oder Thrombose, für die Anfälligkeit auf medikamentöse Nebenwirkungen oder die Verträglichkeit bestimmter Medikamentengruppen. [5]

Ist die Position bekannt, an der der verantwortliche SNP auftreten kann, so kann dort nach dem SNP gesucht werden und somit gezielt auf genetische Merkmale hin untersucht werden. Eines der Standardverfahren zur SNP-Analyse ist die DNA-Schmelzanalyse. Hier werden die DNA-Doppelstränge langsam, schrittweise erwärmt, bis sie zu DNA-Einzelsträngen aufschmelzen. Die Schmelztemperatur, bei der diese Auftrennung erfolgt, ist für DNA mit und ohne SNP unterschiedlich, so dass dieses Verfahren eine Unterscheidung von DNA mit und ohne SNP erlaubt. Das Schmelzen der DNA wird größtenteils durch optische Methoden beobachtet, wobei meist Farbstoffe als Indikatoren für den Bindungszustand der DNA zum Einsatz kommen. [6, 7]

Gold-Nanopartikel bieten aufgrund ihrer plasmonischen Eigenschaften die Möglichkeit, DNA-Bindungen optisch detektierbar zu machen, sind chemisch sehr stabil und können

zudem über Thiolbindungen gezielt mit DNA verbunden werden.[8] Die Plasmonresonanz von Gold-Nanopartikeln ist eine Folge kollektiv oszillierender Elektronen im Partikel und liegt im sichtbaren Spektralbereich. Die spektrale Lage des Resonanzmaximums, sowie die Resonanzbreite sind nicht nur von Partikelgröße, -form und -material abhängig, sondern insbesondere auch vom Brechungsindex der nächsten Partikelumgebung.[9, 10] Letzteres nutzt man z.B. in hochsensitiven Antikörpersensoren.[11] Eine besonders deutliche spektrale Änderung ergibt sich, wenn man mehrere Gold-Nanopartikel so nahe zusammenbringt, dass ihr Abstand vergleichbar zum Partikeldurchmesser wird. Dann können die Partikelplasmonen koppeln und als Folge kann eine deutliche Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz im Vergleich zu Partikeln mit großem Abstand beobachtet werden.[12, 13] Dies ist die Grundlage, um Gold-Nanopartikel als Sensoren für den DNA-Bindungszustand einzusetzen. Seit etwa zehn Jahren werden die Einsatzmöglichkeiten von Gold-Nanopartikeln für die DNA-Schmelzanalyse untersucht. Hier trugen insbesondere die experimentellen und theoretischen Arbeiten der Mirkin-Gruppe zum tieferen Verständnis des Hybridsystems DNA/Gold-Nanopartikel bei.[14, 15]

Verbindet man Gold-Nanopartikel mit einzelsträngiger DNA, so können zwei Partikel durch Bildung eines DNA-Doppelstranges miteinander verbunden werden. Da jedes Partikel nicht nur einen DNA-Strang trägt, sondern viele DNA-Stränge als Bindungstellen zur Verfügung stellt, können sich Aggregate aus mehreren tausend Gold-Nanopartikeln bilden. Als Folge der DNA-Bindung reduzieren sich die Abstände zwischen den Partikeln. Hierdurch ändert sich die Plasmonresonanz, was im Extinktionsspektrum der Nanopartikel beobachtet werden kann. Erhöht man nun schrittweise die Temperatur und beobachtet dabei die Partikelextinktion, so wird bei Erreichen der DNA-Schmelztemperatur die DNA-Bindung zwischen den Partikeln aufgebrochen, was zur Abstandsänderung und somit zur Extinktionsänderung führt. Dies ist das Grundprinzip der „klassischen DNA-Schmelzanalyse“ mit Gold-Nanopartikeln.[16]

Alle „klassischen Schmelzanalysen“ von DNA beruhen auf langsamer, schrittweiser Temperaturerhöhung und regelmäßiger, optischer Bestimmung des DNA-Zustandes. Hierfür heizt ein Heizelement den Probenbehälter, die Pufferlösung und schließlich die DNA. Da sich das Gesamtsystem im thermischen Gleichgewichtszustand befinden muss, dauert eine „klassische DNA-Schmelzanalyse“ typischerweise 15-60 Minuten.

In dieser Arbeit werden Gold-Nanopartikel nicht nur als Sensoren für die DNA-Bindung genutzt, sondern dienen gleichzeitig als optisch aktivierte Heizelemente oder „Nanoheizplatten“. Sie ermöglichen eine lokale Erwärmung der DNA und optothermisches DNA-Schmelzen. Die Plasmonresonanz der Gold-Nanopartikel ermöglicht hierbei die effiziente Umwandlung von absorbiertem Licht in Wärme. Diese optothermische Wärme wird genutzt, um die DNA in Nanopartikel-Aggregaten kontrolliert zu erwärmen und bei ausreichend optisch induzierter Temperaturerhöhung zu schmelzen. Die Pufferlösung ist im sichtbaren Spektralbereich transparent, so dass nur die Gold-Nanopartikel das Licht des grünen Anregelasers absorbieren und in Wärme umwandeln. Erfolgt die optische Anregung gepulst mit ~ 100 ns Pulsdauer, so bleibt während des Pulses keine Zeit für Wärmetransfer vom Aggregat in die Umgebung. Unter diesen Umständen erfolgt eine lokale Erwärmung der Aggregate, ohne dabei die Gesamtflüssigkeit nennenswert zu erhitzen. Die zu untersuchende DNA ist zwischen den Nanopartikeln gebunden, die die Aggregate bilden, und wird somit von allen Seiten homogen geheizt.

In zeitaufgelösten Extinktionsmessungen werden die einzelnen Prozesse aufgelöst, die durch den Anregelaser in den Aggregaten induziert werden. Auf der Mikrosekunden-Zeitskala wird das Aufheizen und Abkühlen optisch geheizter Aggregate beobachtet. Das Schmelzen der DNA entlässt die Nanopartikel aus dem fest gebundenen Aggregatsverband, woraufhin diese auf der Millisekunden-Zeitskala auseinander diffundieren. Diese Zunahme des Partikelabstandes führt zu einer messbaren, langanhaltenden Extinktionsänderung.

Es wird eine auf den Messdaten dieser Arbeit basierende Modellrechnung vorgestellt, die ergibt, dass die DNA bis zu 46 °C über ihre „klassische Schmelztemperatur“ erhitzt werden kann ohne zu Schmelzen, wenn die Temperaturerhöhung nur für etwa 1 μ s anhält. Ähnliche Effekte zeitabhängiger Denaturierungstemperaturen sind für Proteine bekannt, wurden bisher jedoch nie an DNA gezeigt. Die DNA-Überhitzung wird in Kapitel 6.3 diskutiert und auf die limitierte Reaktionszeit des DNA-Schmelzens zurückgeführt.

Zum Abschluss der Arbeit wird eine erste Anwendung der Methode optothermisch geheizter Gold-Nanopartikel-Aggregate auf die SNP-Analyse vorgestellt. Hier zeigen erste Experimente, dass DNA mit und ohne SNP mit einem einzigen Laserpuls unterschieden werden können. Anstelle einer „klassischen DNA-Schmelzanalyse“ mit einer Dauer von

15-60 Minuten genügt ein Messfenster von weniger als 1 ms. Dies zeigt, dass optothermisches DNA-Schmelzen durch optisch geheizte Gold-Nanopartikel großes Anwendungspotential für ultraschnelle DNA-Analysen besitzt.

2 Grundlagen

Die in dieser Arbeit vorgestellte, ultraschnelle DNA-Analyse basiert auf den plasmonischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln. Diese werden in zweierlei Hinsicht ausgenutzt: zum Einen wird hierdurch die starke, optisch induzierte, lokale Erwärmung der DNA ermöglicht und zum Anderen erlauben sie, durch Kopplung mehrerer Partikelplasmonen, die Detektion des Bindungszustandes der DNA. Die zum Verständnis dieser Vorgänge relevanten, plasmonischen Grundlagen werden in diesem Kapitel zusammenfassend behandelt. Hierbei wird zunächst die Entstehung der Plasmonresonanz in freien, ungebundenen Gold-Nanopartikeln erläutert. Deutlich umfassendere Darstellungen hierzu findet man z.B. in den Arbeiten von Kreibitz/Vollmer [9] und Bohren/Huffmann [10]. Welche Änderungen sich ergeben, wenn der Partikelabstand durch Aggregation deutlich vermindert wird und somit die beteiligten Partikelplasmonen koppeln können, wird in Abschnitt 2.2 behandelt.

Auf das nötige biochemische und diagnostische Basiswissen zur DNA wird in Kapitel 2.3.1 eingegangen. Schließlich wird in 2.3.3 gezeigt, welche optischen und optothermischen Effekte sich aus der Kombination der beiden Systeme Gold-Nanopartikel und DNA ergeben.

2.1 Freie Gold-Nanopartikel

Die optischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln werden im Wesentlichen durch kollektive Elektronenschwingungen im Nanopartikel hervorgerufen. In diesem Unterkapitel werden dieser Prozess und die hierdurch entstehende Plasmonresonanz in freien Gold-Nanopartikeln betrachtet. Anschließend werden in Abschnitt 2.1.2 die unterschiedlichen Dämpfungsmechanismen für die kollektive Oszillation behandelt. Diese sind sowohl für das Verständnis der optothermischen Eigenschaften der Nanopartikel in Abschnitt 2.1.5, als auch für die spätere Behandlung gekoppelter Plasmonen bei geringem Partikelabstand in Nanopartikel-Aggregaten in Abschnitt 2.2 von großer Bedeutung.

2.1.1 Optische Anregung von Nanopartikeln

Die erste Verwendung von Metall-Nanopartikeln reicht bis in die Antike zurück. Frühzeitig wurde erkannt, dass durch Beimischung von Stäuben aus Edelmetallen bei der Glasherstellung intensive Farberscheinungen erzielt werden können.[17] Dies wurde vor allem zur Färbung von Kirchenfenstern auf beeindruckende Weise ausgenutzt. 1857 beobachteten Faraday[18] und später Kirchner und Zsigmondy[19] eine rötlich-bläuliche Färbung von Goldlösungen. Gustav Mie konnte für diese Erscheinung 1908 eine Erklärung finden [20]. Er machte als Ursache eine resonante Polarisierbarkeit der Partikel verantwortlich, die mit einer kollektiven Schwingung der Leitungsbandelektronen zusammenhängt.

Das Grundprinzip, das den Farberscheinungen zugrunde liegt, ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Eine einfallende elektromagnetische Welle kann das Nanopartikel annähernd komplett durchdringen, da die Eindringtiefe im sichtbaren Spektralbereich in der gleichen Größenordnung liegt, wie die Partikelgröße[9]. Durch das elektrische Wechselfeld werden die Leitungsbandelektronen gegenüber dem Gitter der positiv geladenen Atomrümpfe periodisch mit der Frequenz der einfallenden Welle ausgelenkt. Es entstehen Polarisationsladungen auf der Partikeloberfläche, die eine rückstellende Coulombkraft zwischen den entgegengesetzten Ladungen bewirkt. Diese Kraft kann in guter Näherung als

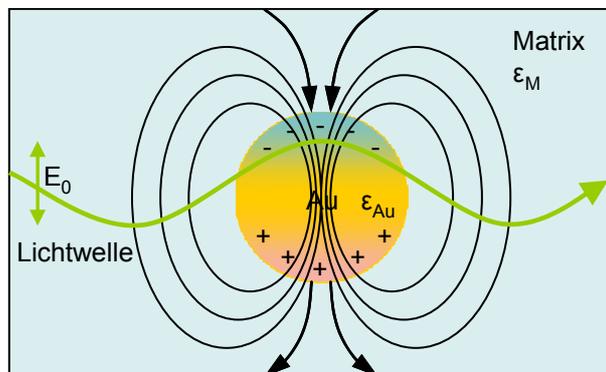


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung zur Entstehung des Partikelplasmons. Eine elektromagnetische Welle trifft auf das Nanopartikel, durchdringt dieses vollständig und regt die Leitungselektronen zu kollektiven Schwingungen an.

harmonisch angesehen werden.[21, 22] Das gesamte Nanopartikel lässt sich also wie ein harmonischer Oszillator aus kollektiv schwingenden Elektronen behandeln, der durch die einfallende elektromagnetische Welle getrieben wird. Die beteiligten Dämpfungsmechanismen dieses Oszillators werden in Abschnitt 2.1.2 behandelt. Bei der Eigenfrequenz des Oszillators tritt eine Resonanz in den optischen Spektren auf, die auch als Partikelplasmonresonanz bezeichnet wird. Das zugehörige Quasiteilchen bezeichnet man als Partikelplasmon, Plasmon-Polariton oder kurz Plasmon.

Die spektrale Lage der Plasmonresonanz hängt neben dem Material des Nanopartikels insbesondere von dessen Größe und Form ab. Da das Coulomb-Feld des polarisierten Nanopartikels teilweise außerhalb des Nanopartikels verläuft, spielt jedoch auch das umgebende Medium eine wichtige Rolle für die spektrale Lage der Plasmonresonanz. Das Coulomb-Feld im Außenraum kann in Abhängigkeit der Polarisierbarkeit des umgebenden Mediums abgeschirmt werden und die Rückstellkraft abschwächen. Hierbei ist die externe Abschirmung umso stärker, und somit die spektrale Rotverschiebung umso größer, je größer der Brechungsindex des umgebenden Mediums ist. [9] Auf die spektrale Abhängigkeit des Plasmons vom umgebenden Medium wird in den folgenden Kapiteln noch näher eingegangen werden.

Eine gleichzeitige, phasengleiche Auslenkung der Elektronen durch das elektrische Wechselfeld setzt voraus, dass die Phase der durchdringenden Lichtwelle im Partikel zu einem gegebenen Zeitpunkt nur sehr geringfügig variiert. Diese Näherung gilt jedoch nur für sehr kleine Partikel. Mit zunehmender Größe der Nanopartikel spielt die Phasenverschiebung der antreibenden Welle im Partikelinneren eine immer wichtigere Rolle, da das Feld nicht mehr homogen über die gesamte Partikeltiefe verteilt ist. Die Elektronen im Partikel schwingen an der Einfallsseite des Lichts dann in einer anderen Phase als Elek-

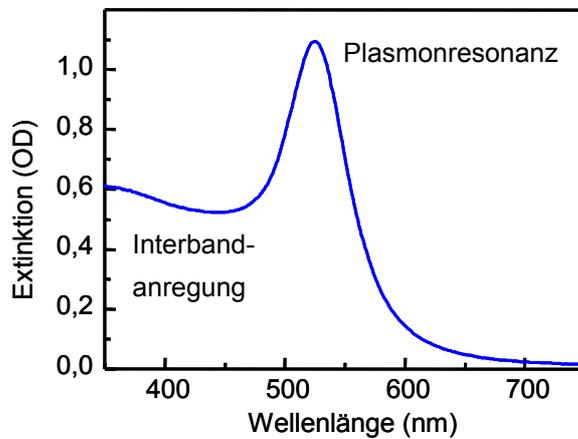


Abbildung 2.2: Extinktionsspektrum einer wässrigen Lösung von Gold-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 40 nm. Die Plasmonresonanz liegt bei einer Wellenlänge von etwa 520 nm

tronen an der Ausfallsseite. Dieser Retardierungseffekt führt zu einer Rotverschiebung sowie zu einer Verbreiterung der Plasmonresonanz, die mit der Partikelgröße zunimmt. [9, 23-25]

Wie in Abbildung 2.2 gezeigt, liegt die Plasmonresonanz für Gold-Nanopartikel mit Durchmessern von bis zu 40 nm in wässriger Umgebung bei einer Wellenlänge von etwa 520 nm. Sie ist sowohl in Streu- wie auch in Absorptionsspektren von Gold-Nanopartikeln beobachtbar. Für die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel-Größen spielt jedoch der streuende Anteil kaum eine Rolle.

Gold ist ein Edelmetall der ersten Nebengruppe und seine 5d-Schale ist mit 10 Elektronen komplett besetzt. Seine metallischen Eigenschaften erhält Gold aufgrund der halbbesetzten 6s-Schale. Bei der plasmonischen Anregung werden Leitungsbandelektronen des sp-Bandes kollektiv zum Schwingen angeregt. Eine zweite Art der optischen Anregung in Gold-Nanopartikeln ist die sog. Interbandanregung. Hierbei werden einzelne 5d-Elektronen in unbesetzte Zustände des 6sp-Bandes angeregt. In Extinktionsspektren von Gold-Nanopartikeln ist die Interbandanregung im kurzwelligen Spektralbereich bei Wellenlängen kleiner als 520 nm sichtbar.

2.1.2 Dämpfungsmechanismen der Plasmonoszillation

Der kollektiven Elektronenschwingung wird, wie bereits in Abschnitt 2.1.1 eingeführt, das bosonische Quasiteilchen Plasmon zugeordnet. Ein angeregtes Plasmon kann durch unterschiedliche Prozesse zerfallen. Man unterscheidet hierbei strahlende und nicht-strahlende Zerfallsprozesse. Einen Überblick über die möglichen Zerfallskanäle eines Partikelplasmons zeigt Abbildung 2.3.

Der strahlende Zerfall eines Plasmons erfolgt durch Reemission von Photonen. Diese können im Fernfeld des Partikels als gestreutes Licht beobachtet werden. Im klassischen Bild des hertzischen Dipols wird dies durch die periodische Beschleunigung der Elektronen aus ihrer Gleichgewichtslage heraus beschrieben. Diese führt dazu, dass das Nanopartikel Energie in Form einer elektromagnetischen Welle abstrahlt. Auch das Streuspektrum weist eine deutliche Plasmonresonanz auf, wobei der Wirkungsquerschnitt für die Streuung σ_{Streu} derart groß ist, dass einzelne Gold-Nanopartikel ab einem Durchmesser von 40 nm unter einem geeigneten Streulicht-Mikroskop sichtbar gemacht und spektroskopiert werden können [26-29].

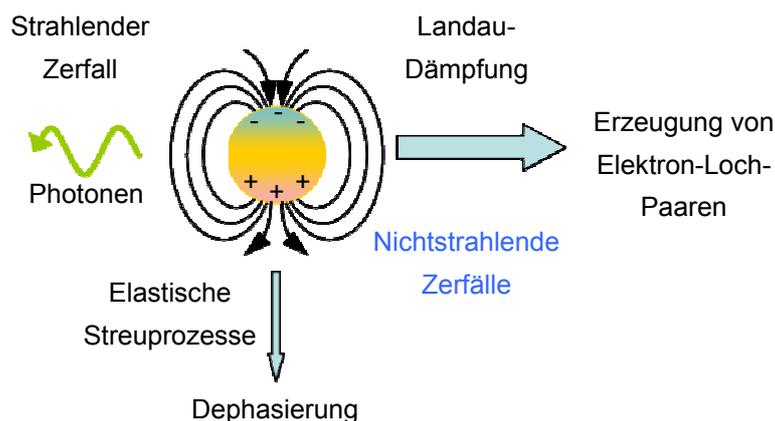


Abbildung 2.3: Zerfallskanäle des Partikelplasmons. Der strahlende Zerfall unter Aussendung von Photonen entspricht der Streuung des eingestrahlten Lichts. Die nichtstrahlenden Zerfälle haben eine Absorption des Lichts zur Folge.

Während der strahlende Zerfall des Plasmons zur Streuung des einfallenden Lichts führt, absorbiert das Nanopartikel das eingestrahlte Licht beim nichtstrahlenden Zerfall des Plasmons. Das absorbierte Licht wird anschließend in Wärme umgewandelt. Diese effiziente Umwandlung von Licht in Wärme ist ein für diese Arbeit essentieller Prozess, der in Abschnitt 2.1.5 noch detaillierter vorgestellt wird. Zunächst werden hier jedoch die unterschiedlichen Dämpfungsprozesse behandelt, die den nichtstrahlenden Zerfall des Plasmons zur Folge haben.

Der für die optothermischen Eigenschaften der Gold-Nanopartikel entscheidende Dämpfungsmechanismus ist die Landau-Dämpfung. Hierbei zerfällt das Plasmon nichtstrahlend unter Erzeugung von Elektron-Loch-Paaren, wobei man zwischen Intraband- und Interbandanregung unterscheidet. Durch Intrabandanregung werden Elektron-Loch-Paare innerhalb des sp-Bandes erzeugt. Eine Interbandanregung regt Elektronen aus dem energetisch tieferen d-Band in das sp-Band an und spielt bei Gold deswegen eine große Rolle, da es bei diesem Material einen energetischen Überlapp von Plasmonresonanz und Interband-Absorptionskante gibt (vgl. Abschnitt 2.1.1)[30].

Neben der Erzeugung von Elektron-Loch-Paaren, die gemeinsam mit dem strahlenden Zerfall die dominanten Zerfallskanäle in Nanopartikeln sind [29], kann es aber auch zu unterschiedlichen elastischen Streuprozessen der oszillierenden Elektronen kommen. Diese können untereinander streuen und somit aus dem Gleichtakt kommen. Eine Dephasierung der Kollektivbewegung ist aber auch durch Streuung mit Phononen, mit Fehlstellen im Gitter, mit Verunreinigungen oder der Partikeloberfläche möglich. Die Oberflächenstreuung wird erst bei Partikeln mit Durchmessern kleiner als etwa 10 nm relevant und wird im Rahmen der dielektrischen Eigenschaften der Nanopartikel in Abschnitt 2.1.3 genauer behandelt.

Alle hier vorgestellten Streu- und Dämpfungsmechanismen, ob strahlend oder nichtstrahlend, bestimmen gemeinsam mit dem Retardierungseffekt die Linienbreite der Plasmonresonanz, da hierdurch die kollektive Schwingung der Elektronen im Partikel gestört wird und somit die Güte des Oszillators herabgesetzt wird. [23-25] Die Streu- und Dämpfungsprozesse sorgen dafür, dass nach 8-30 fs nichtkohärent angeregte Elektronen im Nanopartikel vorliegen[27, 31, 32]. Wie diese zur Erwärmung des Partikels und schließlich zur Erwärmung der Partikel-Umgebung beitragen, wird detailliert in Abschnitt 2.1.5 erläutert.

2.1.3 Dielektrische Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln

Im Folgekapitel wird mit der Mie-Theorie eine analytische Möglichkeit vorgestellt, um exakte Lösungen für den Extinktions- und Streuquerschnitt von Gold-Nanopartikeln zu ermitteln. Neben geometrischen Eigenschaften wie Partikelgröße oder -form müssen dort insbesondere die dielektrischen Eigenschaften des Nanopartikels exakt bekannt sein.

Hierzu wird zunächst die dielektrische Funktion von massivem Volumengold bestimmt. Gold besitzt wie andere Edelmetalle eine hohe Ladungsträgerbeweglichkeit der quasi-freien Leitungsbandelektronen. Diese wird makroskopisch insbesondere in der großen elektrischen und thermischen Leitfähigkeit von Gold messbar. Aufgrund der hohen Ladungsträgerbeweglichkeit können die dielektrischen Eigenschaften gut mit den Eigenschaften eines freien Elektronengases angenähert werden. Dies geschieht im klassischen Drude-Sommerfeld Modell [9]. Es beschreibt ein Gas unabhängiger quasifreier Elektronen, die unter Einfluss eines externen elektrischen Feldes beschleunigt werden und nach einer mittleren Stoßzeit $\tau=1/\Gamma$ durch Stöße abgebremst werden. Betrachtet man zunächst ein einzelnes freies Elektron der Masse m_e und der Ladung e im äußeren elektrischen Feld $\mathbf{E}=\mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}$, so ergibt sich als Bewegungsgleichung:

$$m_e \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} + m_e \Gamma \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} = e \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t} \quad (2.1)$$

Hier berücksichtigt die Dämpfungskonstante Γ ursprünglich nur Stöße der Elektronen untereinander, nicht jedoch die Streuung mit Verunreinigungen oder Phononen. Γ kann unter Anwendung der Matthiesen Regel als Summe aller voneinander unabhängigen Relaxationsprozesse ausgedrückt werden:

$$\Gamma_\infty = \sum_i \Gamma_i = \Gamma_{\text{Verunreinigungen}} + \Gamma_{e\text{-phonon}} + \Gamma_{e\text{-e}} \quad (2.2)$$

Experimentell wird Γ_∞ durch den makroskopisch zugänglichen elektrischen Widerstand ρ über $\Gamma_\infty = \rho n e^2 / m^*$ bestimmt. Hierbei wurde bereits die effektive Elektronenmasse m^* anstelle von m_e eingeführt. Diese ist nötig, da die Elektronen im realen Metallgitter aufgrund des Einflusses der Gitterperiodizität nur quasifrei sind.

Die stationäre Lösung von (2.1) ist die Auslenkung \mathbf{r} des einzelnen Elektrons aus seiner Ruhelage. Das einzelne Elektron induziert das Dipolmoment $\mathbf{p} = e\mathbf{r}$. Die makroskopische Polarisation \mathbf{P} ergibt sich hieraus durch Multiplikation mit der Dichte n der an der Kol-

ektivbewegung beteiligten freien Elektronen. Die dielektrische Funktion aus dem Drude-Sommerfeld Modell erhält man schließlich über die Beziehung

$$\varepsilon = 1 + \frac{P}{\varepsilon_0 E} \quad (2.3)$$

zu

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\omega\Gamma_\infty} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma_\infty}{\omega(\omega^2 + \Gamma_\infty^2)} \quad (2.4)$$

In (2.4) wurde unter Verwendung der Permittivität des Vakuums ε_0 die Drude-Plasma-Frequenz ω_p eingeführt, mit

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\varepsilon_0 m^*}} \quad (2.5)$$

Die so gewonnene dielektrische Funktion des Volumengoldes zeigt jedoch bei Vergleich mit experimentell gefundenen Werten gerade im Bereich der Interband-Absorption deutliche Abweichungen[33, 34]. Der Grund hierfür liegt in der Vernachlässigung der d-Bandelektronen im verwendeten Modell. In der Praxis greift man darum meist auf experimentell bestimmte Daten für $\varepsilon(\omega)$ zurück. Als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Werte für $\varepsilon(\omega)$ dienen die Werte von Johnson und Christy [35]. Selbst diese müssen jedoch, wie im Folgenden gezeigt, noch modifiziert werden[36], da Johnson und Christy ihre Experimente an dünnen Filmen und nicht an Nanopartikeln durchgeführt haben.

Bei allen bisherigen Annahmen wurde von massivem Volumengold ausgegangen, d.h. möglichen Streuprozessen der Elektronen an der Partikeloberfläche wurde nicht Rechnung getragen. Für Volumengold erhält man aus der Fermi-Geschwindigkeit $v_F = 1,4 \text{ nm/fs}$ und der mittleren Relaxationszeit $\tau = 29 \text{ fs}$ eine mittlere freie Weglänge der Elektronen von $l = v_F \tau = 42 \text{ nm}$ [31]. In Partikeln, deren Durchmesser deutlich kleiner als l ist, können Elektronen diesen Weg nicht ungestört zurücklegen, ohne zuvor an die Partikeloberfläche zu stoßen[9]. Diese limitierte freie Weglänge und die somit erzeugte zusätzliche Oberflächendämpfung wurden sowohl theoretisch [37, 38] als auch experimentell bestätigt [39-41]. Aufgrund der Oberflächendämpfung weicht also die dielektrische Funktion eines Gold-Nanopartikels von der des Volumenmaterials ab. Als Folge steigt die homogene Linienbreite der Plasmonresonanz für Nanopartikel mit einem Durchmesser unter 10 nm merklich an.

Formal bedeutet die Berücksichtigung der Oberflächendämpfung eine Erweiterung der Dämpfungskonstante Γ_∞ in (2.4) durch einen zusätzlichen größenabhängigen Dämpfungsterm $\Gamma_{\text{Oberfläche}}(r)$. Somit ergibt sich die gesamte Dämpfung zu

$$\Gamma(r) = \Gamma_\infty + \Gamma_{\text{Oberfläche}}(r) = \Gamma_\infty + A \frac{v_F}{r} \quad (2.6)$$

Die hierbei auftretende charakteristische Länge r entspricht bei sphärischen Nanopartikeln dem Partikelradius. Die $1/r$ -Abhängigkeit resultiert aus dem Verhältnis oberflächennaher Elektronen (proportional zu r^2) zur Gesamtzahl der Elektronen im Partikel (proportional zu r^3). Die $1/r$ -Abhängigkeit der Oberflächendämpfung und somit der dielektrischen Funktion scheint eine fundamentale Eigenschaft zu sein, auch wenn es für die Oberflächendämpfung an sich unterschiedliche Erklärungsansätze gibt: Neben dem bereits erläuterten Effekt der eingeschränkten mittleren freien Weglänge beruht eine andere klassische Erklärung der $1/r$ -Abhängigkeit auf dem Impulsverlust der Elektronen bei Stößen an der Oberfläche. [42] Zudem existieren einige quantenmechanische Ansätze zur Größenabhängigkeit der Plasmondämpfung [43-46]. Der Korrekturfaktor A beschreibt den Kohärenzverlust durch Streuprozesse an der Oberfläche und besitzt Werte in der Größenordnung von 1.[9] Die Werte des A -Parameters können je nach angewandtem Modell variieren, insbesondere gibt es Ansätze, den A -Parameter abhängig von der Wellenlänge zu variieren. [47, 48]

Durch einen wellenlängenabhängigen A -Parameter $A(\omega)$ besteht die Möglichkeit, auch chemische Effekte an der Oberfläche der Nanopartikel hinreichend genau zu berücksichtigen. Denn nicht nur die abrupt endende Periodizität des Atomgitters an der Oberfläche sondern auch chemische Modifikationen der Oberfläche – im konkreten Beispiel dieser Arbeit thiolgebundene DNA-Stränge an der Goldoberfläche – können die Dämpfung der oszillierenden Elektronen drastisch beeinflussen. Befindet sich eine Schicht aus Adsorbatmolekülen auf der Oberfläche, so verschiebt und verbreitert sich die Plasmonresonanz im Vergleich zu Partikeln ohne Adsorbathülle aufgrund der sog. chemischen Dämpfung. [49] Eine besonders ausgeprägte Änderung der dielektrischen Eigenschaften tritt für Nanopartikel auf, an deren Oberfläche sich Adsorbatmoleküle befinden, deren Molekülorbitale für die Partikelelektronen energetisch zugänglich sind. [50, 51] Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Ausweitung der elektronischen Wellenfunktionen über die Partikeloberfläche hinaus, was Kohärenzverlust der Kollektivschwingung und somit eine Re-

sonanzverbreiterung zur Folge hat. Vereinfacht kann man von einem temporären Elektronentransfer zwischen Partikel und Adsorbatmolekülen sprechen. Hierbei kommt es zu inelastischer Streuung der Elektronen an der Grenzfläche, wodurch es zur Störung der Phasenkohärenz der Kollektivschwingung kommt.[49] Auch die chemische Dämpfung zeigt, wie die rein größenabhängige Oberflächendämpfung, eine $1/r$ -Abhängigkeit, da auch die Anzahl der Adsorbatmoleküle mit der Oberfläche zunimmt.

Somit können durch einen wellenlängenabhängigen A-Parameter die individuellen experimentellen Gegebenheiten wie größenabhängige Effekte und chemische Effekte an der Oberfläche in der dielektrischen Funktion berücksichtigt werden. Die korrigierte dielektrische Funktion aus (2.4) lautet schließlich

$$\varepsilon(r, \omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\omega\Gamma(r, \omega)} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega(\Gamma_\infty + A(\omega)\frac{v_F}{r})} \quad (2.7)$$

Auf Grundlage der Literaturwerte der dielektrischen Funktion ε_{JC} von Volumengold von Johnson und Cristy lautet die Korrektur der dielektrischen Funktion für Gold-Nanopartikel mit Radius r und dem wellenlängenabhängigen A-Parameter A :

$$\varepsilon(r, \omega) = \varepsilon_{JC}(\omega) + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\omega\Gamma_\infty} - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega(\Gamma_\infty + A(\omega)\frac{v_F}{r})} \quad (2.8)$$

In dieser Arbeit wird in Kapitel 6.2 für Gold-Nanopartikel mit 10 nm Durchmesser und die dort gegebene DNA-Funktionalisierung der in Abbildung 2.4 dargestellte komplexe Brechungsindex $n = \sqrt{\varepsilon(r, \omega)}$ verwendet, der nach (2.8) den experimentell gegebenen Bedingungen angepasst wurde.

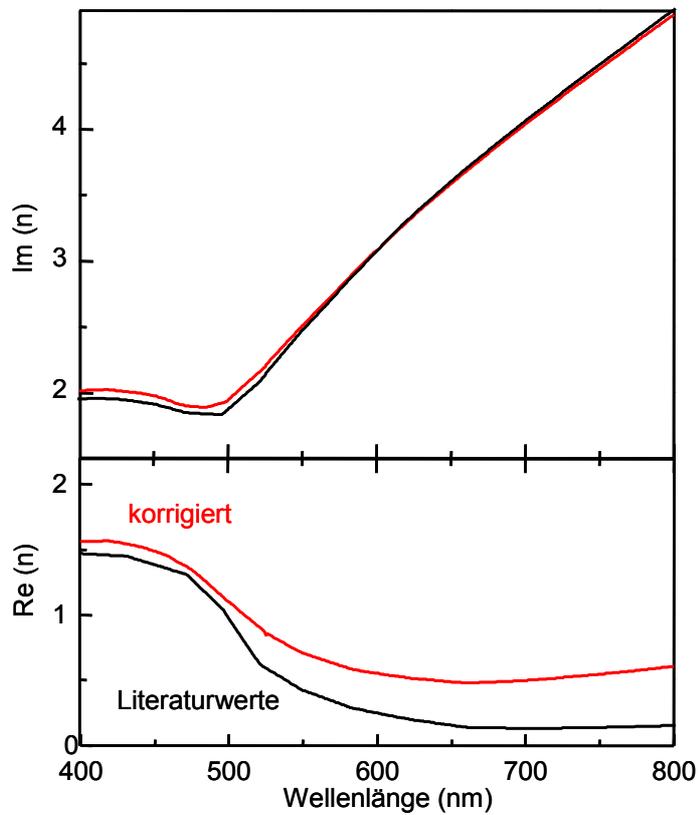


Abbildung 2.4: Der komplexe Brechungsindex von Gold. Die Literaturwerte nach Johnson und Christy (schwarz) wurden gemäß (2.8) entsprechend den experimentellen Gegebenheiten korrigiert (rot). Die Werte berücksichtigen sowohl den in Kapitel 6 verwendeten Partikeldurchmesser von 10 nm als auch die Funktionalisierung der Gold-Oberfläche mit DNA. Sie dienen in Kapitel 6 als Grundlage für die Berechnung des Extinktionsquerschnittes von Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln und der Ermittlung des Absorptionsanteiles.

2.1.4 Mie-Theorie

Aus der genauen Kenntnis der komplexen dielektrischen Funktion der Metall-Nanopartikel lassen sich nun unter Verwendung der Maxwell-Gleichungen die optischen Eigenschaften metallischer Nanopartikel bestimmen. Gustav Mie beschrieb 1908 als erster eine exakte Lösung für die Lichtabsorption und -streuung von kleinen sphärischen Metallpartikeln in einem homogenen Medium.[20] Seine Beschreibung der Wechselwirkung einer ebenen Welle mit Partikeln in der Größenordnung der Wellenlänge des einfallenden Lichts erlaubt die exakte Berechnung der elektromagnetischen Feldverteilung innerhalb und außerhalb des Partikels sowie die Bestimmung der Absorptions- und Streuquerschnitte. Neben der dielektrischen Funktion des Metall-Partikels sind hierzu lediglich die dielektrische Funktion des umgebenden Mediums sowie der Partikelradius notwendig.

Die Mie-Theorie beruht auf der Lösung der Maxwell-Gleichungen in sphärischen Koordinaten unter geeigneten Randbedingungen. Das Nanopartikel befindet sich als idealisierte homogene Kugel im Koordinaten-Ursprung und die elektromagnetischen Felder im Innen- und Außenraum des Partikels werden mit Hilfe von Kugelflächenfunktionen nach Multipolen entwickelt. Als Randbedingung für die Maxwell-Gleichungen müssen die tangentialen Feldkomponenten des elektrischen und des magnetischen Feldes an der Partikeloberfläche stetig sein.[10] Die bei der Multipolentwicklung auftretenden Entwicklungskoeffizienten lauten außerhalb des Partikels:

$$a_L = \frac{m\Psi_L(mx)\Psi_L'(x) - \Psi_L(x)\Psi_L'(mx)}{m\Psi_L(mx)\eta_L'(x) - \eta_L(x)\Psi_L'(mx)} \quad (2.9),$$

$$b_L = \frac{\Psi_L(mx)\Psi_L'(x) - m\Psi_L(x)\Psi_L'(mx)}{\Psi_L(mx)\eta_L'(x) - m\eta_L(x)\Psi_L'(mx)} \quad (2.10).$$

Hierbei gibt der Index L die Multipolordnung an und $m = n_{\text{Partikel}} / n_{\text{Medium}}$ das Verhältnis der komplexen Brechungsindizes von Partikel und umgebendem Medium. Ψ_L und η_L sind die Riccati-Bessel-Zylinderfunktionen und Ψ_L' und η_L' deren Ableitungen nach den Argumenten in den Klammern. Der Größenparameter $x = 2\pi r / \lambda$ gibt das Verhältnis von Partikelradius zur Wellenlänge des einfallenden Lichts an. Aus diesen Entwicklungskoeffizienten lassen sich die experimentell zugänglichen Streu- und Extinktionsquerschnitte

σ_{Streu} und σ_{Ext} berechnen. Der Streuquerschnitt ist das Verhältnis von gestreuter Leistung W_{Streu} zur Bestrahlungsstärke I :

$$\sigma_{Streu} = \frac{W_{Streu}}{I} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1)(|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (2.11).$$

Analog ergeben sich der Extinktionsquerschnitt und daraus der Absorptionsquerschnitt:

$$\sigma_{Ext} = \frac{W_{Ext}}{I} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \operatorname{Re}(a_L + b_L) \quad (2.12),$$

$$\sigma_{Abs} = \sigma_{Ext} - \sigma_{Streu} \quad (2.13).$$

Hierbei ist k der Wellenvektor der einfallenden elektromagnetischen Welle.

In die Berechnung der Wirkungsquerschnitte durch (2.9) bis (2.13) gehen die experimentell vorliegenden Eigenschaften wie dielektrische Funktionen von Partikel und Umgebung sowie der Partikelradius über die Größen x und m ein, wobei $\varepsilon(\omega) = n(\omega)^2$ gilt. Die für diese Arbeit berechneten Extinktions- und Absorptionsspektren für ungebundene Goldpartikel werden mit dem Programm MQMie durchgeführt.[52]

Eine Veranschaulichung des von Mie beschriebenen Resonanzcharakters in den Extinktions- und Streuspektren kleiner sphärischer Partikel gelingt am einfachsten in der sog. quasistatischen Näherung. Hierbei nimmt man an, dass das streuende Partikel deutlich kleiner ist, als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts, also $2r \ll \lambda$. Somit können die Phase und die Amplitude des auslenkenden Feldes im gesamten Partikel als konstant angenommen werden, also retardierende Effekte vernachlässigt werden. In dieser Näherung können höhere Multipolordnungen vernachlässigt werden und es wird allein die Dipolordnung $L = 1$ berücksichtigt. Der Extinktionsquerschnitt vereinfacht sich in der Dipolnäherung gravierend und zeigt dennoch für kleine Nanopartikel bis zu 10 nm Durchmesser gute Ergebnisse[49]:

$$\sigma_{Ext}(\omega)|_{L=1} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_{Medium}^{3/2} V_{Partikel} \frac{\varepsilon_2(\omega)}{(\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_{Medium})^2 + (\varepsilon_2(\omega))^2} \quad (2.14)$$

Hier wurde die komplexe dielektrische Funktion des Nanopartikels $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$, das Partikelvolumen $V_{Partikel} = 4/3 r^3 \pi$, sowie $k = \omega/c$ verwendet. Aus (2.14) wird nun die Resonanzbedingung ersichtlich, denn hierfür muss der Nenner minimal werden. Für kleines $\varepsilon_2(\omega)$ und eine geringe Wellenlängenabhängigkeit von $\varepsilon_2(\omega)$ vereinfacht sich die Resonanzbedingung für die Extinktion in der Dipolnäherung zu: [9, 49]

$$|\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_{Medium}| = \min \Leftrightarrow \varepsilon_1(\omega_{Resonanz}) = -2\varepsilon_{Medium} \quad (2.15)$$

Dies zeigt, dass die spektrale Lage der Resonanz von der dielektrischen Funktion der Umgebung und des Partikels abhängig ist. (2.14) zeigt auch, dass der Imaginärteil $\varepsilon_2(\omega)$ der komplexen dielektrischen Funktion die für die Resonanzbreite verantwortliche Größe ist. Dies wird deutlich durch einen formalen Vergleich mit der Lorentzfunktion und erklärt sich durch die physikalische Bedeutung von ε_2 . Denn die dielektrische Funktion $\varepsilon(\omega)$ beschreibt die Antwort eines Materials auf ein externes elektrisches Feld, wobei der Realteil $\varepsilon_1(\omega)$ ein Maß für die Polarisation des Materials ist und der Imaginärteil $\varepsilon_2(\omega)$ die relative Phase der Antwort zum anregenden Feld beschreibt. Somit erhöhen dephasierende Dämpfungsmechanismen wie Streuung der Elektronen $\varepsilon_2(\omega)$ und somit folglich die Halbwertsbreite der Resonanz.[49]

Die in Kapitel 6.2 benötigte quasistatische Polarisierbarkeit eines Nanopartikels erhält man aus den dielektrischen Funktionen über die Clausius-Mossotti-Beziehung:[9, 10, 53]

$$\alpha = 4\pi\varepsilon_0 r^3 \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_{Medium}}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_{Medium}} \quad (2.16)$$

Diese kann entweder in Dipolnäherung ($L=1$) aus dem Streuquerschnitt (2.11) gewonnen werden, oder aus einem elektrostatischen Ansatz. Beide Methoden sind ausführlich in Ref. [10] hergeleitet.

Mit der Mie-Theorie steht eine analytische Methode zur Verfügung, die es erlaubt, Extinktionsquerschnitte und -spektren für sphärische Nanopartikel zu berechnen. Komplexere Probleme, wie die Situation mehrerer Nanopartikel in geringem Abstand zueinander, benötigen aufwändigere Methoden, die an gegebener Stelle in Kapitel 2.2.1 vorgestellt werden.

2.1.5 Optothermische Eigenschaften freier Gold-Nanopartikel

Gold-Nanopartikel sind hervorragend geeignet, um Licht effizient in Wärme umzuwandeln. Diese hohe optothermische Aktivität beruht auf zwei bereits vorgestellten intrinsischen Eigenschaften der Gold-Nanopartikel:

- Erstens ermöglicht die **Plasmonresonanz** eine extrem hohe Wechselwirkung der Partikel mit Licht. Für die optothermischen Eigenschaften sind insbesondere die sehr **großen Absorptionsquerschnitte** von Bedeutung und die daraus resultierende **hohe lokale Absorption** von Photonen.
- Zweitens wird einmal absorbiertes Licht nicht – oder nur in vernachlässigbarem Maße [54] – wieder als Photolumineszenz abgestrahlt, sondern nahezu **komplett in Wärme umgewandelt**.

Die Plasmonresonanz sorgt dafür, dass der Absorptionsquerschnitt eines Gold-Nanopartikels den geometrischen Querschnitt um ein Vielfaches übersteigen kann. Anschaulich bedeutet dies, dass das Nanopartikel aufgrund seiner Abmessungen dem Lichtfluss zwar mit seiner geometrischen Querschnittsfläche ausgesetzt ist, das Licht jedoch aus einer

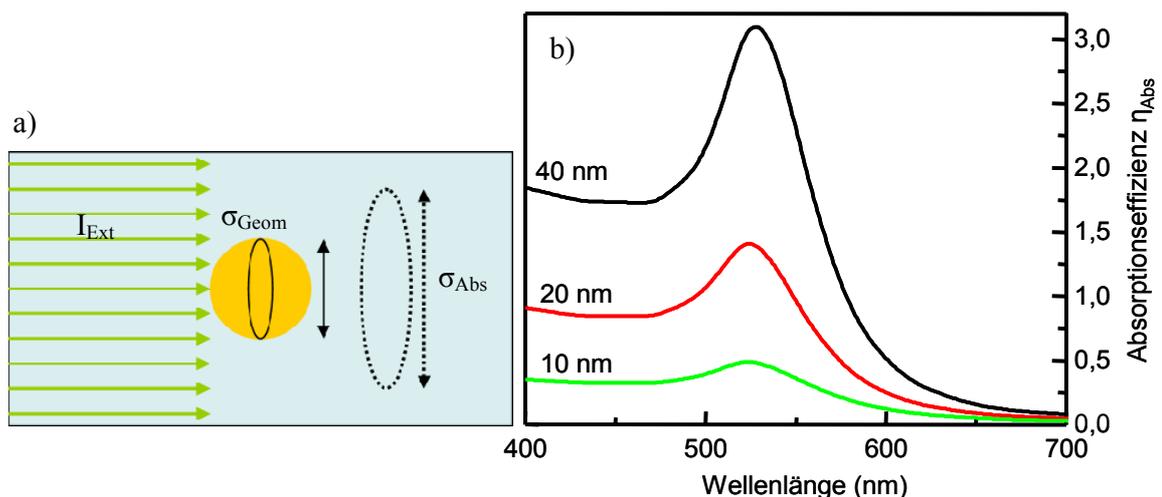


Abbildung 2.5: a) Schematische Darstellung des geometrischen und des Absorptionsquerschnittes. b) die Absorptions-Effizienz, also das Verhältnis von Absorptionsquerschnitt zu geometrischem Querschnitt, für Gold-Nanopartikel mit unterschiedlichen Durchmessern.

deutlich größeren Fläche eingesammelt wird. Dies ist in Abbildung 2.5 a) illustriert. Die Absorptions-Effizienz $\eta_{Abs} = \sigma_{Abs} / \sigma_{Geom}$, also das Verhältnis des Absorptionsquerschnittes aus der Mie-Theorie zum geometrischen Querschnitt ist hierbei von der Partikelgröße abhängig. η_{Abs} ist in Abbildung 2.5 für unterschiedliche Partikelgrößen gezeigt. Für Nanopartikel mit Durchmessern zwischen 10 und 60 nm steigt η_{Abs} linear mit der Partikelgröße.[55, 56]

Um die extrem hohe Lokalisierung der Lichtabsorption durch Gold-Nanopartikel zu verdeutlichen, wird im Folgenden ein Vergleich mit der Absorption durch Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle angestellt:

Bei den gegebenen experimentellen Bedingungen dieser Arbeit liegen Konzentrationen vor, die für freie Gold-Nanopartikel zu Abständen zwischen einzelnen Partikeln von mehr als 1 μm führen. Die durch ein Nanopartikel absorbierten Photonen N werden jedoch auf das Partikelvolumen, also ein Kugelvolumen mit typischem Durchmesser von 20 nm gebündelt. Der Absorptionsquerschnitt eines Fluorescein-Moleküls, also eines typischen Fluoreszenzfarbstoffes, ist etwa 10^6 -fach geringer als der eines Gold-Nanopartikels in der Plasmonresonanz. [57] Die gleiche Anzahl N absorbierter Photonen wird nun selbst bei 10^6 -fach höherer Konzentration von Farbstoff-Molekülen auf ein Kugelvolumen von 1,5 μm Durchmesser homogen verteilt. Der somit erzeugbare Wärmebeitrag eines einzelnen Moleküls ist lokal vernachlässigbar und nur eine homogene, nichtlokale Erwärmung des Mediums ist möglich.

Im eben genannten Beispiel würde im Fall der Farbstoff-Moleküle ein Großteil der absorbierten Photonen ohnehin keinen Beitrag zur Wärme-Erzeugung leisten, da die Energie mit teilweise sehr hoher Effizienz in Form von Photolumineszenz abgestrahlt wird. Dieser strahlende Kanal, der für die optothermischen Eigenschaften einen Verlustkanal darstellt, ist jedoch für Gold-Nanopartikel vernachlässigbar, wenn auch vorhanden. [54] Um ein detaillierteres Verständnis für die interne Umwandlung absorbierter Photonen in Wärme zu bekommen, werden noch einmal die nichtstrahlenden Dämpfungsmechanismen aus 2.1.2 betrachtet, da diese für die optothermischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln verantwortlich sind. Nichtstrahlende Prozesse überwiegen gegenüber dem strahlenden Prozess resonanter Photonenstreuung für Partikelgrößen unter 80 nm, wie ein Vergleich entsprechender Streu- und Absorptionsquerschnitte zeigt.[58]

Um die teilweise sehr schnellen, internen Prozesse zu untersuchen, die schließlich zur Erwärmung des Partikels führen, wurden zahlreiche Experimente mit intensiven Femtosekunden-Pulsen an dünnen Goldfilmen[59-63] und später an Gold-Nanopartikeln durchgeführt [30, 64-70]. Abbildung 2.6 zeigt eine Übersicht über die unterschiedlichen internen Prozesse, die auf einen kurzen Laserpuls folgen. Durch den kurzen Laserpuls wird ein Teil der Leitungsbandelektronen kohärent zum Schwingen angeregt und somit das Partikelplasmon angeregt. Innerhalb von 8-30 fs dephasiert die kollektive Elektronenschwingung. [27, 32] Diese Dephasierung wird durch zwei unterschiedliche Prozesse bestimmt. Der strahlende Zerfall des Plasmons führt Energie in Form reemittierter Photonen vom Partikel ab und trägt somit nicht zur Erwärmung des Partikels bei. Zerfällt das Plasmon nichtstrahlend, so verbleibt die Energie im Partikel. Wie bereits in Abbildung 2.3 gezeigt, stehen hierbei zwei Zerfallskanäle zur Verfügung. Entweder zerfällt das Plasmon unter Anregung von Elektron-Loch-Paaren (Landau-Dämpfung) oder die kollektive Elektronenoszillation wird durch elastische Streuung mit Elektronen, Phononen, Verunreinigungen oder der Partikeloberfläche gedämpft. [27, 31, 32] Durch

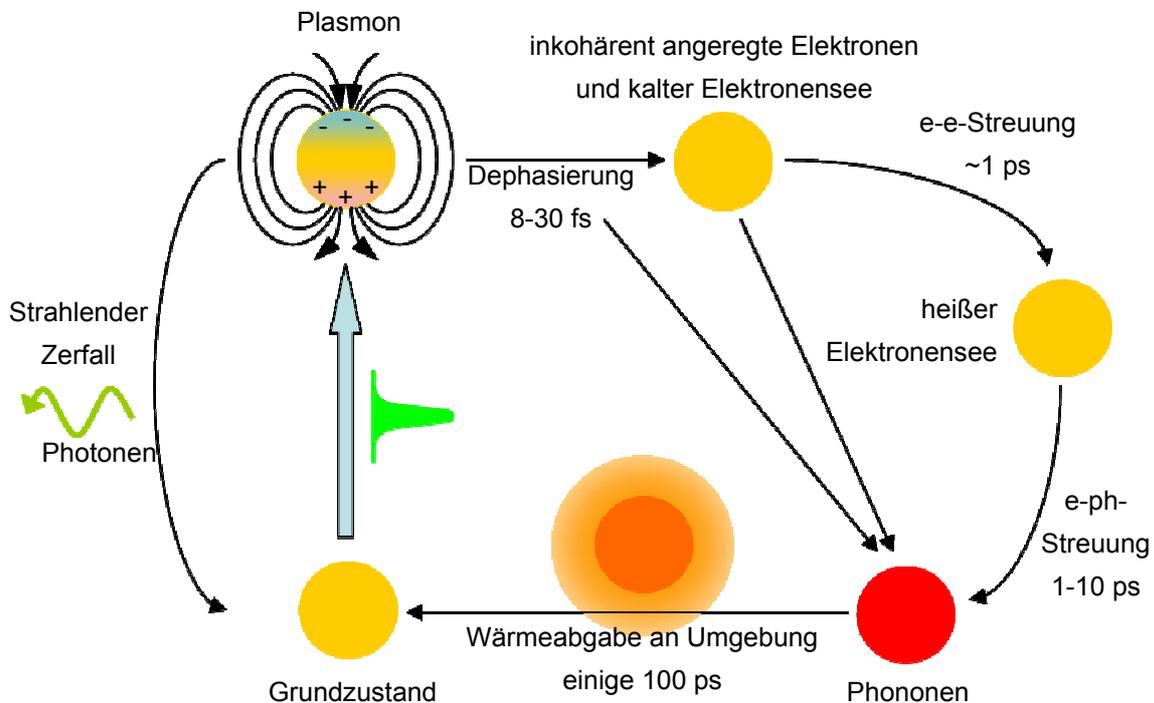


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Prozesse, die zur Erwärmung des Partikels und anschließend der Umgebung führen.

den nichtstrahlenden Zerfall des Plasmons geht die Kohärenz der Elektronenoszillation verloren und einen Bruchteil der Elektronen im Partikel wird über die Fermikante angeregt. Diese inkohärent angeregten Elektronen stehen nun im thermischen Nichtgleichgewicht mit dem übrigen „kalten“ Elektronensee, d.h. es gibt eine Abweichung von der Fermi-Verteilung. Durch Elektron-Elektron-Streuung thermalisieren im Folgenden thermische und nichtthermische Elektronen innerhalb von etwa 1 ps. [30, 61, 62]

Es liegt nun ein gleichmäßig heißes Elektronengas vor und die Elektronen bilden wieder eine Fermi-Verteilung, der eine Temperatur zugeordnet werden kann. Das Elektronengas kann hierbei Temperaturen von bis zu mehreren Tausend Grad Celsius erreichen. Zuvor wurde bereits durch Elektron-Phonon-Streuung ein geringer Bruchteil der Anregungsenergie von den nichtthermalisierten Elektronen an das Gitter abgegeben. Es liegt nach der Thermalisierung der Elektronen dennoch eine Situation vor, in der sich das heiße Elektronengas in einem noch kalten Gitter aus Ionenrümpfen befindet. Erst in den folgenden 0,5-10 ps wird dieses Nichtgleichgewicht durch Elektron-Phonon-Wechselwirkung ausgeglichen. [59, 60, 64, 68]

Diese Sequenz intern ablaufender Prozesse ist für Nanopartikel und Volumenmaterial identisch. Es liegt nun ein homogen erwärmtes Gold-Nanopartikel vor, das jedoch mit dessen Umgebung thermisch bisher noch nicht in Wechselwirkung trat. Je nach Partikelgröße und umgebendem Material kühlt nun das Nanopartikel in 10-400 ps ab und gibt so seine Wärme an die Umgebung ab. [30, 69]

Auf diese Weise erfolgt eine sehr stark lokalisierte Erwärmung des umgebenden Mediums, wobei Temperaturen von mehreren hundert Grad Celsius erreicht werden können. Nachdem das Partikel komplett abgekühlt ist, befindet es sich wieder im ursprünglichen Zustand.

Das lokale Aufheizen der Nanopartikel-Umgebung als Folge der Absorption eines Laserpulses ist einer der zentralen Punkte dieser Arbeit. Welche zusätzlichen Auswirkungen die starke optothermische Erhitzung auf ein Gold-Nanopartikel oder dessen Umgebung haben kann, wird im folgenden Abschnitt zusammenfassend dargestellt:

Wird das Nanopartikel von Laserpulsen erhitzt, die kürzer als die Relaxations- und Ausdehnungszeit des Ionengitters sind, können starke mechanische Partikelvibrationen angeregt werden.[67, 71-74] Bei den in dieser Arbeit verwendeten Laserpulsen von ~100 ns

Dauer ist dieser Effekt jedoch nicht zu erwarten. Eine weitere Besonderheit optisch stark geheizter Metall-Nanopartikel zeigt die Untersuchung von Schmelz- und Siedetemperaturen. Durch Anregung mit Femtosekunden-Pulsen konnte z.B. gezeigt werden, dass Wasser an der Grenzfläche zum Partikel deutlich über den eigentlichen Siedepunkt von 100 °C erhitzt werden kann, ohne zu siedeln oder Dampfblasen zu bilden. Erst bei etwa 280 °C verdampft das Wasser explosionsartig. [70, 75, 76]

Sowohl Experimente [77, 78] als auch Simulationen [79-81] zeigen, dass Metall-Nanopartikel bereits bei Temperaturen schmelzen, die bis zu 600 °C unter der Schmelztemperatur von 1064 °C des Volumenmaterials liegt.

Als Folge des Schmelzens kann es zu laserinduzierter Größenreduktion [82, 83], Formänderung [84, 85], Verschmelzen mehrerer Partikel [86, 87] oder zur Fragmentierung von Partikeln kommen [85, 88, 89].

Anwendung finden lasergeheizte Nanopartikel bisher im medizinischen und biologischen Bereich [90] z.B. zur lokalen thermischen Therapie von Tumorzellen [91, 92], zur Erhöhung der Durchlässigkeit von Zellwänden [93], zur selektiven Zerstörung von Zellen [94-96], zur Deaktivierung von Proteinen [97, 98], zur lokalen DNA-Zerstörung in Chromosomen [89, 99], oder zur gesteuerten Freigabe von Substanzen aus Polymerkapseln [100-103], wobei neben dem reinen Wärmeeffekt auch die explosive Verdampfung des umgebenden Wassers eine entscheidende Rolle spielt.

In der photothermischen Mikroskopie nutzt man die wärmeinduzierte Brechungsindexänderung im umgebenden Medium, um einzelne Metall-Partikel sichtbar zu machen. Hierdurch können deutlich kleinere Partikel detektiert werden, als mit klassischen Streumethoden. [104]

Einige dieser Experimente wurden mit unterschiedlich langen Laserpulsen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass es eine entscheidende Rolle spielt, ob das Nanopartikel während des Pulses genug Zeit hat, seine Wärme an die Umgebung abzugeben oder nicht. [88, 89, 98, 105, 106]

Befindet sich ein warmer Nanopartikel in einem homogenen Medium, so erfolgt der Wärmetransport vom warmen Partikel in die kältere Umgebung nach der kugelsymmetrischen Wärmeleitungsgleichung [107]

$$k\nabla^2 T(r,t) + Q(r,t) = c \frac{\partial T(r,t)}{\partial t} \quad (2.17)$$

Hierbei sind k die Wärmeleitfähigkeit und c die Wärmekapazität pro Einheitsvolumen. Die Temperatur $T(r,t)$ sowie die Dichte der Wärmeleistung $Q(r,t)$ sind Funktionen des Ortes r und der Zeit t . Im Folgenden wird der Fall eines Gold-Nanopartikels mit Radius R in einem unendlich ausgedehnten Wasserbad angenommen. Wie bereits erwähnt erfolgt die Wärmeabgabe an die Umgebung nach einem ultrakurzen Laserpuls in weniger als 1 ns. In dieser Arbeit werden jedoch Laserpulse mit einer Dauer von mehreren hundert Nanosekunden zum Aufheizen der Nanopartikel verwendet. Unter diesen Umständen kann vom Fall einer stationären Temperaturverteilung um das Nanopartikel ausgegangen werden. Die stationäre Lösung von (2.17) gibt unter den gegebenen Bedingungen für $r > R$ die Temperaturverteilung

$$\Delta T(r) = \frac{P_{Nano}}{4\pi k_{Wasser}} \frac{1}{r} \quad (2.18)$$

wobei P_{Nano} nun die zeitlich konstante Wärmeleistung ist, die vom Partikel aufgrund des Absorptionsquerschnittes σ_{Abs} bei der Anregewellenlänge aus dem Lichtfluss I_{In} des aufheizenden Lasers aufgenommen wird:

$$P_{Nano} = I_{In} \sigma_{Abs}(\lambda_{Ext}) = I_{In} \eta_{Abs}(\lambda_{Ext}) \pi R^2 \quad (2.19)$$

Die höchste Temperatur im Medium wird an der Partikeloberfläche erreicht. Dort ergibt (2.18) mit $r = R$ unter Verwendung von (2.19) die Maximaltemperatur in Abhängigkeit der Partikelgröße:

$$\Delta T_{Max}(R) = I_{In} \frac{1}{4k_{Wasser}} R \eta_{Abs} \quad (2.20)$$

Dies zeigt, dass die induzierte Temperaturerhöhung linear mit der Leistungsdichte des anregenden Lasers steigt. Da η_{Abs} bei Partikelradien zwischen 5 und 30 nm etwa linear mit zunehmendem Radius steigt[55, 56], steigt die erreichbare Maximaltemperatur an der Partikeloberfläche bei gleicher eingestrahelter optischer Leistungsdichte etwa mit $\sim R^2$. [4] Abbildung 2.7 zeigt das stationäre Temperaturprofil um heiße Gold-Nanopartikel unterschiedlicher Größe in Wasser. Die eingestrahelte Laserleistung ist hierbei jeweils die gleiche. Mit der Partikelgröße nimmt nicht nur die erreichte Temperatur, sondern auch die Reichweite der Temperaturerhöhung von der Partikeloberfläche zu.

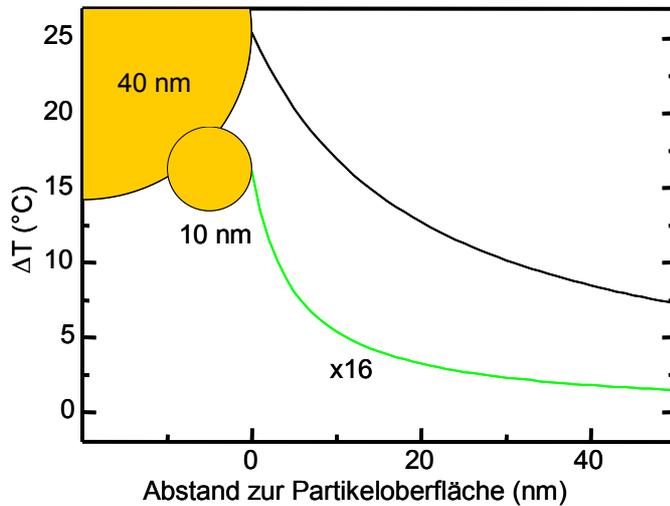


Abbildung 2.7: Temperaturverteilung um Goldpartikel mit 10 nm (grün) und 40 nm Durchmesser (schwarz) bei gleicher anregender Leistungsdichte $I_{in}=1 \text{ kW/mm}^2$. Die induzierte Temperaturerhöhung steigt quadratisch mit der Partikelgröße, der Temperaturgradient ist umso steiler, je kleiner das Partikel ist. Zur anschaulicheren Darstellung wurde die Temperaturerhöhung um das 10 nm Partikel um den Faktor 16 verstärkt.

Dieses Temperaturprofil ist im Gleichgewicht sowohl unabhängig von einem möglichen Wärmewiderstand an der Partikeloberfläche als auch von der Wärmekapazität des Partikels. Diese spielen nur zu Beginn der Aufheizphase eine geringe und meist vernachlässigbare Rolle.[107] Vernachlässigt man diese beiden Aspekte, so lässt sich (2.17) im Frequenzraum lösen und nach einer Laplace-Transformation erhält man als Näherung für die zeit- und ortsabhängige Temperaturverteilung im Außenraum des Partikels:

$$T(r,t) = T_{\infty} + \Delta T(r) \left[\operatorname{erfc} \left(\frac{r-R}{2\sqrt{Dt}} \right) - \exp \left(\frac{r-R}{R} + \frac{Dt}{R^2} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{r-R}{2\sqrt{Dt}} + \frac{\sqrt{Dt}}{R} \right) \right] \quad (2.21).$$

Hier ist T_{∞} die Temperatur in großer Entfernung zum Partikel, $D = k_{Wasser}/\rho c_P$ die thermische Diffusivität mit der Dichte ρ und der spezifischen Wärme c_P . erfc ist die komplementäre Fehlerfunktion. Die Lösung in (2.21) entspricht der Temperaturentwicklung bei kontinuierlichem Heizen, das zur Zeit $t=0$ beginnt, wobei die Ausgangstemperatur T_{∞} beträgt. [107] An der Partikeloberfläche, wo die höchste Temperatur im Medium herrscht, vereinfacht sich (2.21) mit $r = R$ zu:

$$T(R,t) = T_{\infty} + \Delta T(R) \left[1 - \exp \left(\frac{Dt}{R^2} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{\sqrt{Dt}}{R} \right) \right] \quad (2.22).$$

Die größenabhängige Abkühlzeit nach Femtosekunden-Laserpulsen [69] legt nahe, dass auch die Gleichgewichtsverteilung der Temperatur, abhängig von der Partikelgröße, nach unterschiedlichen Zeiten erreicht wird. Dieses Verhalten wird auch aus einer genaueren Analyse von (2.22) ersichtlich. Dort gibt

$$\tau = \frac{R^2}{D} \quad (2.23)$$

eine charakteristische Zeit für den Aufheizprozess an. τ ist ein Maß für die Zeit, nach der an der Partikeloberfläche die Gleichgewichtstemperatur erreicht ist, und wächst quadratisch mit der Partikelgröße. Mit der thermischen Diffusivität für Wasser $D = 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ ergibt sich für ein Partikel mit 10 nm Durchmesser $\tau = 250 \text{ ps}$ und für ein Partikel mit 40 nm Durchmesser $\tau = 4 \text{ ns}$.

2.2 Aggregate aus Gold-Nanopartikeln

Gold-Nanopartikel tragen auf ihrer Oberfläche meist stabilisierende Molekülschichten, wie z.B. Citrat-Ionen. Diese Stabilisatoren sorgen dafür, dass die Partikel im Regelfall negativ geladen sind. [108-110] Die abstoßende Coulomb-Kraft zwischen benachbarten Nanopartikeln übersteigt die anziehende Van der Waals Kraft, wodurch sich eine effektiv abstoßende Kraft zwischen den Partikeln ergibt. Die Nanopartikel sind somit vor Aggregation geschützt. Die Oberflächenladungen können jedoch durch Gegenionen in der Lösung abgeschirmt werden. So lässt sich z.B. durch Variation der Salzkonzentration in der Lösung die Abstoßungskraft zwischen den Partikeln einstellen. Als Folge erhöhter Salzkonzentration kommt es zur Annäherung der Partikel und schließlich zur Dominanz der anziehenden Van der Waals-Kraft. Die Folge ist eine unspezifische Bildung von Aggregaten.[12] Wie eine sehr ähnliche, jedoch spezifische und kontrollierte Aggregatsbildung mit Hilfe von Biomolekülen herbeigeführt werden kann, wird in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Zunächst werden jedoch allgemein die Eigenschaften von aggregierten Gold-Nanopartikeln beschrieben.

2.2.1 Optische Eigenschaften von Aggregaten

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 geschildert, verläuft das Coulomb-Feld eines Nanopartikels, das durch eine Lichtwelle von außen polarisiert wird, auch durch den Außenraum des Partikels. Bei experimentell handhabbaren Konzentrationen sind die Abstände zwischen einzelnen Partikeln ein Vielfaches der Partikeldurchmesser (vgl. 2.1.5), solange die elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln aufgrund niedriger Salzkonzentrationen hinreichend groß ist. Das elektromagnetische Feld im Außenraum eines Nanopartikels wird in diesem Fall nicht durch ein anderes Nanopartikel beeinflusst, so dass lediglich das einbettende Medium für die spektrale Lage und Breite der Plasmonresonanz eine Rolle spielt. Werden die abstoßenden Kräfte zwischen den Partikeln jedoch durch hohe Konzentrationen von Gegenionen in der Lösung abgeschirmt, so ziehen sich die Partikel aufgrund der Van der Waals-Kraft an.[13, 111] Wird nun der Partikelabstand vergleichbar zum Partikelradius, so befindet sich ein Nanopartikel im elektromagnetischen Außen-

feld eines anderen Partikels. Die Plasmon-Oszillationen beeinflussen sich nun gegenseitig, die Plasmonen koppeln. Diese Kopplung und ein externer Retardierungseffekt [13] führen im Allgemeinen zu einer Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz im Vergleich zu freien Nanopartikeln.[12] Diese spektrale Änderung durch salzinduzierte Aggregation von Gold-Nanopartikeln ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Beide Effekte, Rotverschiebung und spektrale Verbreiterung, sind umso deutlicher ausgeprägt, je mehr Partikel im Aggregat gebunden sind und je kleiner der Partikelabstand ist. Entscheidend ist hierbei das Verhältnis von Partikelradius zu Partikelabstand bzw. der Volumenanteil Gold am Gesamtvolumen der Aggregate. Aggregate aus größeren Partikeln zeigen also bei gleichem Partikelabstand eine deutlichere Veränderung der Extinktionsspektren als Aggregate aus kleinen Partikeln.[112, 113]

Durch die Aggregation und die hieraus resultierenden spektralen Änderungen kann es je nach Wellenlänge zu einer Zunahme oder einer Abnahme der Absorption pro Partikel kommen.[112] Sowohl Experimente an großen Aggregaten aus vielen hundert Gold-Nanopartikeln [114, 115] als auch numerisch bestimmte Absorptions- und Extinktionsspektren hierzu[112] zeigen neben der spektralen Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz auch eine deutliche Abnahme der Absorption und Extinktion im spektralen Bereich der Interbandanregung ($\lambda < 520$ nm). Dieser Effekt wird einem Abschirmungs- oder Abschattungseffekt aufgrund der großen Ausmaße der Aggregate zugeschrieben. [112] Die Eindringtiefe für sichtbares Licht in Volumengold ist etwa 35 nm. [9] Für sehr große Aggregate mit Durchmessern von einigen hundert oder tausend Nanometern ist die zu durchdringende Goldschicht trotz der mit Wasser gefüllten Zwischenräume ein Vielfaches der Eindringtiefe. Partikel, die tief im Inneren eines

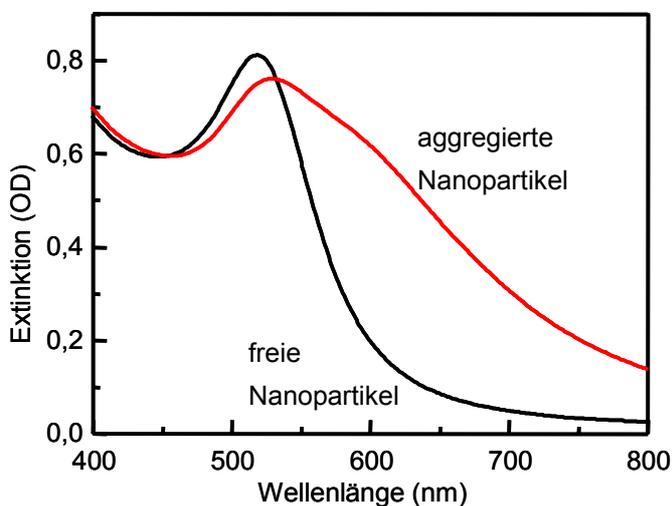


Abbildung 2.8: Extinktionsspektren einer wässrigen Lösung von Citrat-stabilisierten Gold-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 10 nm ohne Salz (schwarz) und nach Zugabe von 50 mM Natriumchlorid (rot). Durch die Salz-Zugabe kommt es zur Aggregation der Partikel und somit zur Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz.

Aggregates positioniert sind, oder solche, an der der Lichtquelle abgewandten Seite, sind somit durch die anderen Partikel von der optischen Anregung abgeschirmt und tragen somit auch nicht mehr zur Extinktion und Absorption bei. Hierdurch wird die beobachtete Abnahme der Extinktion und Absorption im spektralen Bereich der Gold-Interband-Absorption hervorgerufen. In Abbildung 2.8 reicht die Aggregatgröße nicht aus, um den Abschirmungseffekt zu zeigen. Dieser Effekt wird jedoch in Abschnitt 2.3.3 in großen DNA-gebundenen Aggregaten beobachtet werden und insbesondere in der Modellierung der Wärmeverteilung in großen Aggregaten in Abschnitt 6.2 eine große Rolle spielen.

Eine Möglichkeit, die elektrodynamische Wechselwirkung sphärischer Nanopartikel untereinander mathematisch zu beschreiben, ist die Erweiterung der Mie-Theorie auf viele Partikel. Das hierfür zugrunde liegende Modell ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Ein Partikel ist nun nicht mehr nur dem elektromagnetischen Feld der einfallenden ebenen Welle ausgesetzt, sondern auch den Feldern, die von den anderen Partikeln gestreut werden.[13, 116, 117] Die exakte Berechnung dieses Problems mit Hilfe der verallgemeinerten Mie-Theorie basiert nun auf der Lösung der Maxwellgleichungen durch die Entwicklung der einfallenden und gestreuten Felder sowie der Felder im Partikelinneren in sphärische Vektorwellenfunktionen. Somit ist es möglich, die tatsächlich im Innen- und Außenraum der Partikel herrschenden Gesamtfelder zu berechnen und hieraus wiederum die Streu-, Absorptions- und Extinktionsquerschnitte der Partikelgruppe. Auf eine detaillierte mathematische Ausführung wird in dieser Arbeit verzichtet. Hierfür wird auf die Referenzen [13, 116-118] verwiesen.

Die verallgemeinerte Mie-Theorie eignet sich insbesondere zur Berechnung von Spektren kleiner, wohldefinierter Aggregate aus wenigen Partikeln wie Dimeren, Trimeren, linear angeordneten Partikelketten[13, 119-121] oder zweidimensionalen Einzellagen von Partikeln[122]. Für sehr große dreidimensionale Aggregate aus vielen hundert oder tausend Partikeln ist diese Methode jedoch aufgrund hoher Anforderungen an die Rechenkapazität ungeeignet.

Ein alternativer Ansatz besteht in der numerischen Lösung des Vielteilchen-Problems mittels Diskreter Dipol-Approximation (DDA). [123-125] Diese Methode, die ursprünglich von Purcell und Pennypacker zur Lösung astrophysikalischer Probleme eingeführt worden ist [126], beruht auf der Zerlegung des absorbierenden und streuenden Objektes

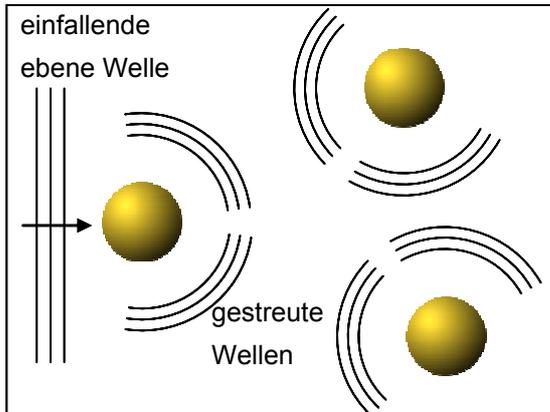


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der elektromagnetischen Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln. Jedes Partikel befindet sich im einfallenden Feld der ebenen Welle und in den von den anderen Partikeln gestreuten Feldern.

in viele kubische Einheits-elemente. Jedem Einheits-element wird ein Punktdipol mit Polarisierbarkeit α_p zugeordnet, und die durch einfallendes Feld und gestreutes Feld der anderen Punktdipole induzierte Dipol-Polarisation in den Einheits-elementen wird selbstkonsistent bestimmt.[112, 113, 127] Die DDA erlaubt, im Gegensatz zur Mie-Theorie, auch die Berechnung von Streu- und Absorptionsquerschnitten für nicht-sphärische Objekte.[128, 129] Die DDA ist allerdings nur dann eine gute Approximation, solange

$$\left| \sqrt{\epsilon_{\text{Streukörper}}} / \sqrt{\epsilon_{\text{Medium}}} - 1 \right| < 1 \quad (2.24)$$

gilt.[130] Dies ist für einzelne Gold-Nanopartikel in wässriger Umgebung nicht gegeben, und somit eignet sich diese Methode nicht, um einzelne Goldpartikel oder kleine Gruppen von Goldpartikeln in diskrete Dipole zu zerlegen und hieraus die optischen Eigenschaften der Goldpartikel zu berechnen. Zur Berechnung der optischen Wirkungsquerschnitte von sehr großen Aggregaten aus mehreren hundert oder tausend Partikeln ist die DDA jedoch sehr gut geeignet. Hier wird nicht mehr jedes einzelne Partikel in Dipole zerlegt, sondern jeder Einheitszelle, in der sich je ein Nanopartikel befindet, ein einziger Dipol zugewiesen.[112, 113, 131] Der Streukörper in (2.24) ist nun das gesamte Aggregat, das zu Teilen aus Gold und zu Teilen aus zwischenraumfüllendem Wasser besteht. $\epsilon_{\text{Streukörper}}$ ist nun eine effektive dielektrische Funktion, die die Bedingung (2.24) erfüllt. Details zur Berechnung der effektiven dielektrischen Funktion sowie zur numerischen Lösung der DDA werden in den Kapiteln 3.4 und 6.2 dargestellt.

Der Vollständigkeit halber seien an dieser Stelle auch die weiteren numerischen Methoden zur Lösung allgemeiner Streuprobleme an Nanopartikeln genannt: die Multiple Multipol-Methode (MMP) [132, 133] sowie die Methode der Finiten-Differenzen im Zeitbereich (FDTD)[134].

2.2.2 Optothermische Eigenschaften von Aggregaten

Wie bereits in Abschnitt 2.1.5 gezeigt, spielt der Abstand zwischen den einzelnen Nanopartikeln eine wichtige Rolle für die Temperaturentwicklung in und zwischen den Nanopartikeln. Für große Partikelabstände tritt erst nach mehreren Mikrosekunden bis Millisekunden eine thermische Interaktion zwischen den Partikeln auf. Ist jedoch der Partikelabstand vergleichbar zum Partikelradius, so heizen sich die Partikel schon innerhalb weniger Nanosekunden gegenseitig auf. Als Folge kommt es zur Akkumulation der Wärmebeiträge der einzelnen Partikel im Volumen der dichten Partikelansammlung. Bei gleicher eingestrahelter optischer Leistungsdichte werden somit für dichte Partikelansammlungen deutlich höhere lokale Temperaturen erreicht, als für vereinzelte Nanopartikel mit großem Abstand. Govorov zeigte in Ref. [4], dass die hierbei erreichbare Temperatur stark von der Anordnung der Partikel abhängt. Für die in dieser Arbeit relevanten dreidimensionalen Aggregate aus Gold-Nanopartikeln gibt Govorov die Erhöhung der Gesamttemperatur ΔT_{Tot} an, mit:

$$\Delta T_{Tot} \approx \Delta T_{Max} (R) \frac{R}{a} N^{2/3} \quad (2.25)$$

Hier sind a der Abstand der Partikel untereinander, N die Anzahl der im Aggregat vorhandenen Partikel und ΔT_{Max} die Temperatur an der Oberfläche eines einzelnen Partikels im stationären Zustand aus (2.20). (2.25) ist gültig für $N^{1/3} \gg 1$. Abbildung 2.10 zeigt die nach Govorov angegebene Zunahme der Gesamttemperatur mit zunehmender Partikelanzahl N im Aggregat. Dargestellt ist die Gesamttemperatur als Vielfaches von ΔT_{Max} . Hierbei ist jedoch angenommen worden, dass sich die Absorption pro Partikel mit zunehmender Partikelzahl nicht ändert. Wie in 2.2.1 erläutert, kann eine Änderung der Absorption pro Partikel jedoch sowohl aufgrund der spektralen Rotverschiebung und der Verbreiterung der Plasmonresonanz hervorgerufen werden, als auch durch den Abschirmungseffekt bei besonders großen Aggregaten. Dies ist in den Berechnungen von Govorov nicht berücksichtigt worden. In dieser Arbeit wird diesen Effekten in 6.2 sowohl bei der Berechnung der aufgenommenen Laserleistung als auch bei der Modellierung der inhomogenen Verteilung der Wärme im Aggregat Rechnung getragen.

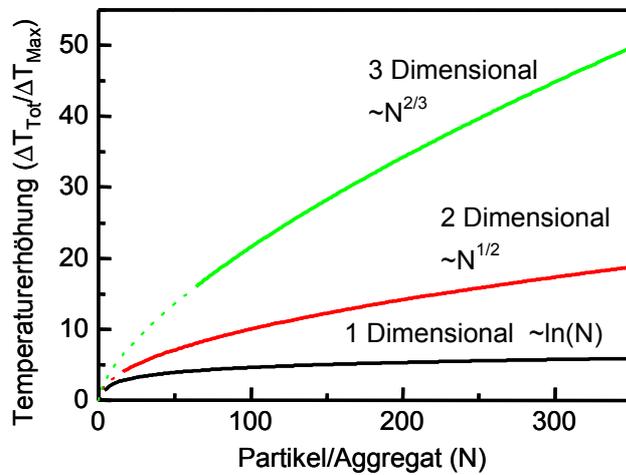


Abbildung 2.10: Je nach Anordnung der Nanopartikel in einem Aggregat erhöht sich die erzielbare Gesamttemperatur auf ein Vielfaches der Temperatur, die ein einzelnes Partikel erreichen würde. Hierfür ist angenommen worden, dass der Partikelabstand gleich dem Partikelradius ist. Im gestrichelt angegebenen Bereich sind die Annahmen, die in Ref. [4] gemacht worden sind, nicht gültig.

Die Zunahme der lokalen Temperatur mit zunehmender Partikeldichte ist experimentell an Gold-Nanopartikel-Einschlüssen in Eis für Aggregate aus bis zu 10 Nanopartikeln bestätigt worden. [135] Dort hat sich gezeigt, dass die zum Schmelzen von Eis benötigte Laserleistung sinkt, wenn die lokale Dichte der Nanopartikel steigt.

2.3 Hybridsystem DNA/Gold-Nanopartikel

Die Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid, DNA) ist ein Makromolekül, das in fast jeder Zelle eines Lebewesens dessen genetische Informationen und somit dessen biologischen Bauplan trägt. Obwohl sich die DNA aus nur wenigen Grundelementen zusammensetzt, erlaubt sie dennoch nahezu unendliche Variationsmöglichkeiten in ihrer Zusammensetzung, und somit ihrem Informationsgehalt. Diese Vielfalt und die Möglichkeit, durch synthetische Herstellung beliebige Erkennungssequenzen zu erzeugen, führten dazu, dass DNA inzwischen auch in der Nanotechnologie eine wichtige Rolle spielt. Dort wird sie als individuell programmierbares, hochspezifisch bindendes Bauelement zur Verknüpfung von Nanostrukturen[8, 136], zur Erzeugung selbstorganisierender Strukturen[137, 138] und sogar zum Rechnen[139] eingesetzt. In dieser Arbeit dient die DNA zunächst als Verbindungselement zwischen Nanopartikeln. Gleichzeitig zeigen Experimente in Kapitel 7, dass das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren großes Anwendungspotential in der Biotechnologie oder der molekularen Diagnostik hat. Dort kann es dazu genutzt werden, um Aussagen über die genetische Funktion der DNA zu treffen. Aus diesem Grund werden im folgenden Abschnitt nicht nur der Aufbau der DNA sowie ihre grundlegenden Eigenschaften vorgestellt, sondern auch eine kurze Einführung zum diagnostischen Hintergrund von DNA-Analysen gegeben. In den Folgekapiteln wird gezeigt, wie die DNA mit Nanopartikeln verbunden werden kann und wie dieses so gewonnene Hybridsystem DNA/Gold-Nanopartikel schließlich zu großen Netzwerken verbunden werden kann.

2.3.1 DNA

Die DNA ist aus einer Kette von sog. Nukleotiden aufgebaut, die ihrerseits jeweils aus dem Fünf-Kohlenstoff-Zucker Desoxyribose, einem Phosphatrest und einer der stickstoffhaltigen Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) bestehen. Die Enden jedes Nukleotides sind unterschiedlich und werden mit 3' und 5' bezeichnet. Diese Nomenklatur stammt von der Durchnummerierung der Kohlenstoff-Atome im Zucker.

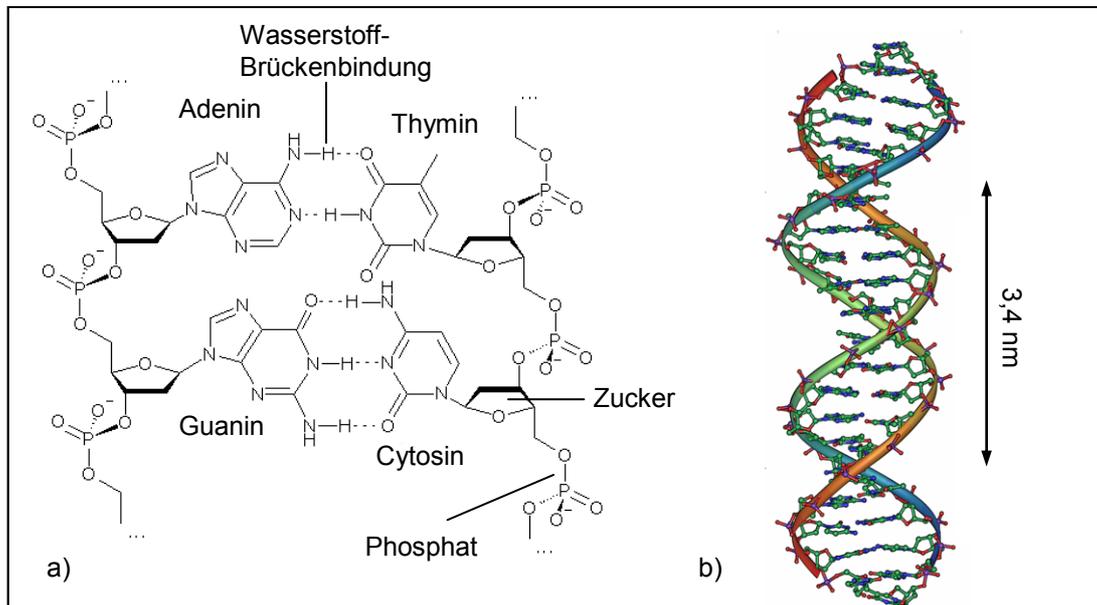


Abbildung 2.11: Grundstruktur der DNA: **a)** planarisierte Darstellung der DNA-Grundelemente: Zucker und Phosphat bilden das DNA-Rückgrat, Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Basen binden zwei DNA-Einzelstränge zusammen. **b)** Der DNA-Doppelstrang windet sich zur Doppel-Helix. (a) nach Ref. [1], verändert; b) nach Ref. [3], verändert)

Am 3'-C-Atom befindet sich eine OH-Gruppe und am 5'-C-Atom die Phosphatgruppe. [140, 141]

Durch die kovalente Verbindung der OH-Gruppe mit dem Phosphatrest des nächsten Nucleotides bilden sich Ketten, die aufgrund dieser orientierten Zusammensetzung wieder ein 3'- und ein 5'-Ende besitzen. Kurze DNA-Sequenzen werden auch Oligonucleotide genannt. Die Phosphat-Zucker-Ketten bezeichnet man auch als Rückgrat der DNA, da sie für die Längsverbindung der DNA im Einzelstrang verantwortlich sind. Die Basen hingegen tragen zur Längsverbindung der Nucleotidkette nicht bei. Sie können jedoch durch Wasserstoff-Brückenbindungen zwei Nucleotidketten miteinander verbinden. Wie in Abbildung 2.11 a) gezeigt, müssen die beiden Einzelstränge antiparallel zueinander liegen, d.h. jeweils 3' und 5' Enden der beiden DNA-Einzelstränge liegen aneinander. Zwei so verbundene DNA-Einzelstränge winden sich ineinander zu der in Abbildung 2.11 b) dargestellten Doppel-Helix. Diese von Watson und Crick 1953 entdeckte Struktur des DNA-Doppelstranges hat einen Durchmesser von etwa 2 nm und windet sich etwa alle zehn Basenpaare um sich selbst. Die Distanz für eine komplette Windung entspricht

einer Distanz von 3,4 nm. [140, 141] Während einzelsträngige DNA als sehr flexibel gilt[142], ist doppelsträngige DNA bis zu einer Länge von 50 nm steif[143].

Die Entdecker der DNA-Struktur fanden ebenfalls heraus, dass sich fast ausschließlich entweder Paare aus Adenin und Thymin (AT-Paare) oder Paare aus Cytosin und Guanin (CG-Paare) bilden.[140] Diese Basenpaarungen bezeichnet man auch als komplementäre Basenpaare oder Watson-Crick-Basenpaare. Wie in Abbildung 2.11 a) dargestellt, unterscheiden sich die Basenpaare durch die Anzahl ihrer Wasserstoff-Brückenbindungen: AT-Paare gehen zwei, CG-Paare hingegen drei Wasserstoff-Brückenbindungen ein. Aus diesem Grund sind CG-Paare auch stabiler als AT-Paare. Dies zeigt sich bei der Trennung des Doppelstranges durch Temperaturerhöhung.

Erhöht man nämlich die Temperatur der DNA über einen bestimmten Wert hinaus, so führt dies zu einer thermischen Denaturierung der DNA, d.h. der DNA-Doppelstrang trennt sich wieder in zwei DNA-Einzelstränge. [144-147] Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Dehybridisierung oder Schmelzen der DNA. Das Rückgrat der DNA und somit die Einzelstränge bleiben hierbei intakt. Typischerweise findet der Übergang vom doppel- zum einzelsträngigen Zustand über eine Temperaturspanne von etwa 8-12 °C statt (siehe auch Abbildung 2.14 in Abschnitt 2.3.3). Als Schmelztemperatur T_M der DNA bezeichnet man die Temperatur, bei der sich eine Hälfte aller DNA-Stänge eines Ensembles im doppelsträngigen und eine Hälfte im einzelsträngigen Zustand befindet. Der entgegengesetzte Prozess, Einzelstränge zu Doppelsträngen zu vereinen, bezeichnet man als Hybridisierung der DNA. Je länger die DNA, desto höher ist die Schmelztemperatur, da mehr Basenpaar-Bindungen zur Stabilität des Doppelstranges beitragen. Aus oben genanntem Grund ist aber auch bei gleicher Länge der DNA die Schmelztemperatur umso höher, je höher der Anteil von CG-Paaren in der DNA ist. [6, 148-150]

Das DNA-Schmelzen und Hybridisieren wird häufig als Zwei-Zustands-Modell beschrieben.[6, 145, 147, 151] Die beiden Zustände einzelsträngig und doppelsträngig gehen durch Öffnung (oder Schmelzen) und Schließen (oder Hybridisieren) der DNA ineinander über. Ein Ensemble unterliegt dynamisch ständigen Öffnungs- und Bindungsprozessen. Das Schmelzen und Hybridisieren der DNA-Doppelhelix ist das Resultat dieser konkurrierenden, dynamischen Ereignisse. Die Öffnungsrate der DNA ist k_- und die Schließrate k_+ . Beide Raten wachsen mit steigender Temperatur T an, wobei k_- stärker mit T ansteigt als k_+ . Die Schmelztemperatur T_M ist die Temperatur, bei der beide Raten gleich

groß sind. Für $T < T_M$ überwiegen die Schließereignisse und der Großteil des Ensembles liegt im doppelsträngigen Zustand vor. Ist $T > T_M$, so überwiegen die Öffnungereignisse und der vorherrschende Zustand im DNA-Ensemble ist der einzelsträngige.

Aufgrund der elektrischen Ladungen der Phosphatgruppen in ihren Nukleotiden ist die DNA negativ geladen. Um die elektrostatische Abstoßung zwischen zwei Einzelsträngen zu reduzieren und somit Hybridisierung zu ermöglichen, müssen Gegenionen in der Lösung die negativen Ladungen der Phosphatreste abschirmen. Dies wird durch die Anwesenheit von Salzen realisiert, ohne die keine Hybridisierung stattfindet. Je höher die Salzkonzentration, umso besser wird die Doppelhelix durch eine Ionenwolke stabilisiert und umso höher ist folglich die Schmelztemperatur. [152, 153]

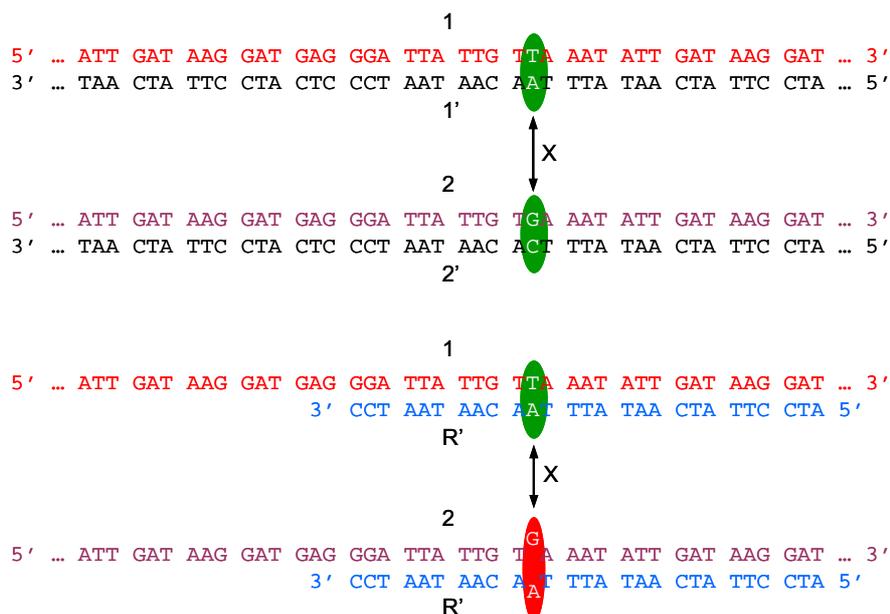
Bisher wurden nur Watson-Crick-Paare und daraus resultierende, komplementäre Doppelstränge vorgestellt. Sind zwei Einzelstränge zueinander an einigen wenigen Basen nicht komplementär, so können sie dennoch eine Bindung zum Doppelstrang eingehen. Im Doppelstrang entstehen dann jedoch sehr schwach gebundene Abschnitte oder Basenfehlstellen. Analog zum unterschiedlichen Beitrag zur Schmelztemperatur von AT- und CG-Paaren sind nicht vollkommen komplementäre Doppelstränge weniger stabil und haben somit eine niedrigere Schmelztemperatur als vergleichbare komplementäre Doppelstränge. [154, 155]

Diagnostischer Hintergrund

Die Untersuchung von Basenfehlstellen zwischen zwei DNA-Strängen hat in der Biotechnologie, Diagnostik und Medizin einen besonders hohen Stellenwert. Vergleicht man die DNA von zwei Individuen, beispielsweise zwei Menschen, so stellt man fest, dass sie nahezu identisch sind. Man entdeckt jedoch auch Regionen, in denen einzelne Basenpaare ausgetauscht, nicht vorhanden oder eingesetzt sein können. Derartige Änderungen nur eines Basenpaares werden auch SNP (Single Nucleotide Polymorphism) genannt. Je nachdem, wo dieser SNP auftritt, kann er unterschiedlichste Auswirkungen auf das Individuum haben[5]: z.B. ein erhöhtes Risiko für Krebs, Alzheimer[156], Herzinfarkt, Trombose[157] oder Diabetes, die Verträglichkeit bestimmter Medikamentengruppen oder die Anfälligkeit auf medikamentöse Nebenwirkungen[158]. Andere SNPs bestimmen Größe, Augen- oder Haarfarbe eines Menschen. Das menschliche Genom hat $3 \cdot 10^9$

Basenpaare. Etwa 6 Mio. SNPs sind bekannt und in einem kleinen Bruchteil kennt man auch die genetische Funktion oder Auswirkung auf das Individuum.[7]

In der Natur auftretende SNPs bedeuten jedoch noch keine Basenfehlstelle in der DNA, da lediglich ein Watson-Crick-Basenpaar gegen ein anderes ausgetauscht wurde. Aufgrund der enormen Länge der Gesamt-DNA würde sich die Schmelztemperatur der beiden Stränge durch einen einzelnen SNP nicht unterscheiden, selbst wenn ein AT-Paar durch ein CG-Paar ersetzt würde. Wie ein SNP jedoch dennoch unterschiedliche Schmelztemperaturen erzeugen kann, wird im folgenden Beispiel erläutert. Betrachtet wird die menschliche DNA 1 und deren komplementärer Gegenstrang 1'. Die DNA 2 und deren komplementärer Gegenstrang 2' sind mit Ausnahme eines Basenpaares an der Stelle X jeweils identisch zu 1 und 1'. Ein synthetisch hergestellter Referenzstrang R' ist komplementär zu 1 und beinhaltet die Stelle X, ist jedoch nur wenige zehn Basenpaare lang. Wird nun also R' mit DNA 1 hybridisiert, so entsteht keine Basenfehlstelle im so gewonnenen Doppelstrang. Hybridisiert jedoch R' mit DNA 2, so entsteht eine Basenfehlstelle und die Schmelztemperatur dieses Doppelstranges liegt unter der von R'-1. Durch Messung der Schmelztemperatur könnten also DNA 1 und 2 unterschieden werden und somit der SNP in DNA 2 nachgewiesen werden. [155] War z.B. bekannt, dass dieses SNP an der Stelle X als genetische Auswirkung ein erhöhtes Trombose-Risiko hervorruft, so kann dem Spender von DNA 2 dieses erhöhte Risiko zugewiesen werden, dem Spender von DNA 1 jedoch nicht.



Messung der Schmelztemperatur

Die Messung der Schmelztemperatur kann auf unterschiedliche Weisen geschehen. Die direkteste Methode ist die Messung der DNA-eigenen Absorption im ultravioletten Spektralbereich. Die DNA-Basen haben eine benzolähnliche Resonanzstruktur, wodurch auch ihre optische Absorption bei etwa 260 nm erklärt wird. Hierbei hängt das Ausmaß der UV-Absorption aber wesentlich von der Sekundärstruktur der DNA ab, d.h. die Absorption eines Doppelstranges ist geringer als die Absorption der gleichen DNA im geschmolzenen Zustand. Dieser Effekt wird auch als Hyperchromizität bezeichnet. [159]

Das Schmelzen der DNA kann aber auch über sog. interkalierende Farbstoffe nachgewiesen werden, die in die Doppelhelix der DNA eindringen. Dort ist ihre Quanteneffizienz bis zu zwei Größenordnungen höher als in Verbindung mit einzelsträngiger DNA.[160, 161]. Daneben ist die Messung des abstandsabhängigen Energietransfers zwischen zwei unterschiedlichen Farbstoffmolekülen, sog. FRET-Paaren, besonders verbreitet. Nur durch die zu untersuchende DNA werden die DNA-gebundenen FRET-Partner in kleinem Abstand zueinander gehalten, und es kommt zum detektierbaren Energietransfer zwischen den beiden Farbstoffen. Schmilzt die DNA, so vergrößert sich der Abstand und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden.[162, 163]

Wie bereits in 2.2.1 vorgestellt, sind auch die plasmonischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln stark abstandsabhängig. Wie auch sie zur Untersuchung der DNA-Schmelztemperatur genutzt werden können, wird in 2.3.3 gezeigt. Zunächst wird jedoch im Folgekapitel vorgestellt, wie eine Verbindung zwischen DNA und Gold-Partikeln hergestellt werden kann.

2.3.2 Freie DNA-funktionalisierte Gold-Nanopartikel

Die Kombination aus Nanopartikeln und Biomolekülen, die wie DNA sehr spezifische Bindungseigenschaften zeigen, führt zu Hybridystemen, die als Grundelemente zum Aufbau definierter Nanostrukturen dienen. Eine ausführliche Übersicht über unterschiedliche Hybridssysteme aus Nanopartikeln mit Biomolekülen und deren Assemblierung zu Nanostrukturen bietet Referenz [8]. Neben Gold-Nanopartikeln gibt es auch andere Metall-Nanopartikel, z.B. aus Silber, Platin oder Kupfer, fluoreszierende Halbleiter-Nanopartikel sowie magnetische Nanopartikel. Im Zusammenhang mit DNA spielen jedoch Gold-Nanopartikel eine besonders wichtige Rolle. Gründe hierfür sind neben ihren hervorragenden optischen Eigenschaften (siehe Kapitel 2.1.1) vor allem auch ihre chemischen Eigenschaften. Diese verleihen ihnen ihre hohe Stabilität, da Gold in Wasser nicht oxidiert und erlauben es, die Oberfläche der Nanopartikel gezielt zu modifizieren. Wie auch Nanopartikel aus anderen Materialien, gehen Gold-Nanopartikel durch elektrostatische Kräfte Bindungen mit Molekülen ein. [8] Zu dieser Bindungsart gehört auch die unspezifische DNA-Gold-Bindung, die zur Umwicklung der Nanopartikel mit DNA führt, die in Abbildung 2.12 a) dargestellt ist. [164, 165] Die Goldoberfläche bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit, die Nanopartikel gezielt mit Molekülen zu funktionalisieren, die Schwefel- oder Thiolgruppen tragen.[166] Die starke Affinität zwischen Gold und Schwefel kann z.B. dazu genutzt werden, auf Gold-Nanopartikel Proteine anzubringen, die entweder von Natur aus schwefelhaltig sind[167] oder durch chemische[168, 169] oder gentechnische[170-173] Modifikationen eine zugängliche Schwefelgruppe tragen.

Oligonukleotide können derart synthetisiert werden, dass sie an einem oder an beiden Enden eine Thiolgruppe tragen. Durch diese Modifikation wird eine spezifische Anbindung der Oligonukleotide an Gold-Nanopartikel möglich, bei der nur ein Ende an der Goldoberfläche befestigt ist. Im Gegensatz zur unspezifischen elektrostatischen Anbindung sind die Basen der DNA frei zugänglich und somit steht der Einzelstrang als funktionaler Bindungspartner für andere komplementäre Einzelstränge zur Verfügung.[114,

174] Die räumliche Anordnung der DNA-Moleküle auf der sphärischen Nanopartikeloberfläche hängt stark von der Länge der DNA und der Beladungsdichte der Oberfläche ab.[2, 174, 175] Während DNA-Moleküle bei kleinen Beladungsdichten dazu neigen, sich an die Oberfläche des Partikels zu legen (siehe Abbildung 2.12 b)), führen hohe Beladungsdichten zu senkrecht zur Oberfläche abstehenden DNA-Strängen (siehe Abbildung 2.12 c)).

Lange DNA-Stränge führen bei hoher Beladungsdichte dazu, dass an der Partikeloberfläche eine dichte ausgestreckte Struktur herrscht, wohingegen die äußeren Abschnitte der DNA frei zugänglich und flexibel sind.

Der Brechungsindex-Kontrast zwischen Wasser und DNA ist vernachlässigbar klein.[112, 176] Die Thiolgruppe, die DNA und Gold-Nanopartikel verbindet, ändert hingegen den Brechungsindex in der direkten Umgebung des Nanopartikels.[177] Hinzu kommen veränderte chemische Bedingungen an der Partikeloberfläche, die zu einer veränderten chemischen Dämpfung des Partikelplasmons führen. Beide Effekte bewirken eine Rotverschiebung und eine Verbreiterung der Plasmonresonanz. [178, 179] Derartige spektrale Veränderungen durch Oberflächenreaktionen finden Anwendung in der Messung ankoppelnder Analyt-Moleküle. [11, 179-181]

Wie in Abbildung 2.8 gezeigt, aggregieren citratstabilisierte Gold-Nanopartikel bereits

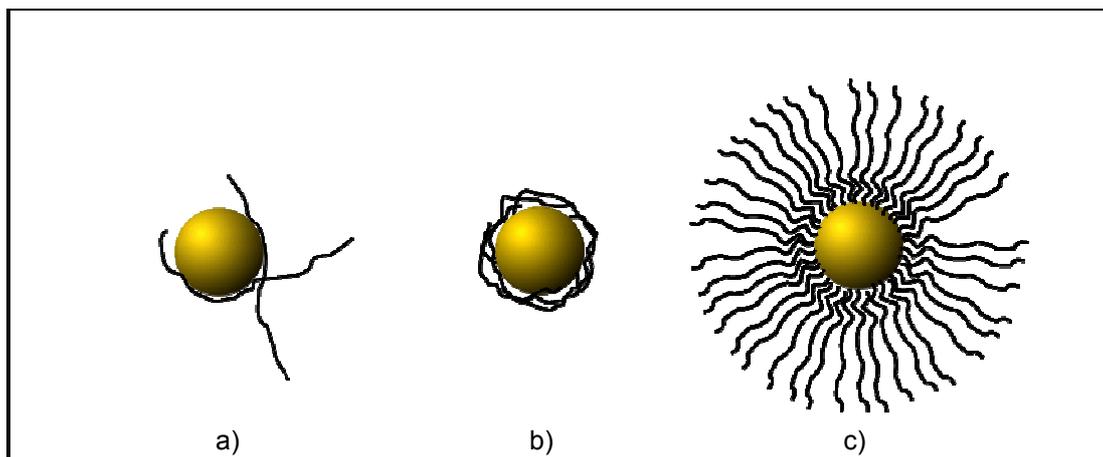


Abbildung 2.12: Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit DNA: **a)** Ohne Thiolgruppe kommt es zur unspezifischen Anbindung an die Goldoberfläche. **b)** Mit Thiolgruppe wird das Ende der DNA an das Gold gebunden, bei kleinen Bedeckungsdichten wickelt sich die DNA jedoch ebenfalls um das Partikel. **c)** Bei hohen Bedeckungsdichten stehen die DNA-Stränge aufrecht von der Oberfläche ab und sind im äußeren Bereich zugänglich. (b) und c) nach Ref. [2], verändert)

bei geringen Salzkonzentrationen von 10-50 mM. DNA-funktionalisierte Nanopartikel sind hingegen deutlich stabiler und zeigen auch bei Salzkonzentrationen von 100-300 mM keine unspezifische Aggregation. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die im Folgekapitel behandelte Hybridisierung der Nanopartikel-gebundenen DNA mit freier DNA. Denn wie bereits in 2.3.1 erläutert, müssen die negativen Ladungen der DNA-Einzelstränge durch Gegenionen in der Lösung abgeschirmt werden, um DNA-Hybridisierung zu ermöglichen.

In 2.1.5 ist bereits vorgestellt worden, dass zu hohe Laserleistungen Partikel zerstören können. Experimente an DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln haben gezeigt, dass die Gold-Schwefel-Bindung durch intensive Femtosekunden-Pulse aufgebrochen wird. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dies kein rein thermischer Effekt ist. Vielmehr brechen die in 2.1.5 vorgestellten heißen Elektronen die chemische Bindung auf. Als Folge verlieren die Nanopartikel ihre Stabilität in der salzhaltigen Lösung und aggregieren. Dieser Prozess geschieht jedoch bei optischen Leistungsdichten, die etwa sechs Größenordnungen höher sind, als die in dieser Arbeit verwendeten.[178, 182]

2.3.3 Aggregate aus DNA-gebundenen Gold-Nanopartikeln

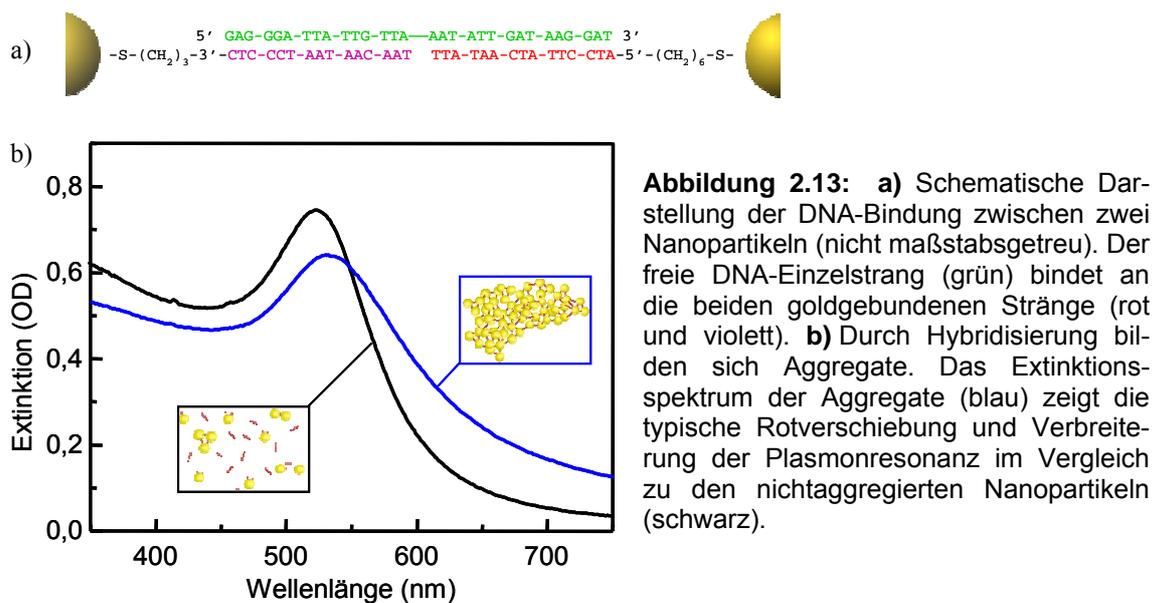
Die optischen und strukturellen Eigenschaften von DNA-gebundenen Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln, sowie deren Einsatzmöglichkeiten für diagnostische und nanotechnologische Anwendungen wurden in den letzten zwölf Jahren sehr intensiv vor allem in der Arbeitsgruppe von Chad Mirkin untersucht.

DNA ist aufgrund ihrer kontrollierbaren Länge und Zusammensetzung und den damit verbundenen unerschöpflichen Codierungsmöglichkeiten, das ideale Molekül, um Nanopartikel gezielt und kontrolliert zu Aggregaten zu verbinden.[114, 183-185] Der Einsatz von DNA hat gegenüber anderen Methoden den entscheidenden Vorteil, dass die Verbindung zwischen den Nanopartikeln durch Temperaturerhöhung wieder aufgebrochen werden kann.[114] Die Bildung von DNA-gebundenen Nanopartikel-Aggregaten und deren Dissoziation durch DNA-Schmelzen ist also reversibel. Dieses thermisch induzierte, kontrollierte Auflösen der Aggregate ist nicht möglich für Aggregate, die durch pure

Salzzugabe[12], durch beidseitige Thiolbindungen[186, 187] oder durch Proteine[188, 189] gebildet wurden.

Um DNA-funktionalisierte Gold-Nanopartikel gezielt zu Aggregaten zusammenzuführen, werden getrennt voneinander zwei Spezies von Gold-Nanopartikeln mit DNA-Einzelsträngen funktionalisiert: Eine Spezies mit Gold-Thiolbindung am 3'-Ende und die zweite Spezies mit Gold-Thiolbindung am 5'-Ende einer anderen, zur ersten nicht komplementären DNA. Die beiden Spezies werden gemischt und erst nach Zugabe von freier DNA, die zu den beiden goldgebundenen Strängen komplementär ist, entstehen Doppelstränge, die die Nanopartikel verbinden. Da jedes Partikel je nach Größe und Beladungsdichte zwischen 10 und 1000 DNA-Stränge auf der Oberfläche trägt [174, 175, 185, 190], entstehen große Netzwerke aus bis zu hunderttausenden Nanopartikeln. Jeweils zwei Partikel werden durch mehrere Doppelstränge miteinander verbunden.[16] Zur Entstehung der Aggregate gibt es verschiedene theoretische Modelle.[112, 191, 192]

Die Aggregation führt innerhalb von Minuten bis über Stunden zur Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz, wie sie bereits in 2.2.1 vorgestellt und in Abbildung 2.13 dargestellt ist. Bei hohen Goldkonzentrationen sind die spektralen Veränderungen in der Lösung mit bloßem Auge als Farbumschlag von rot nach blau zu sehen. [114, 115]



Da doppelsträngige DNA bei den verwendeten Längen steif ist, kann durch Variation der DNA-Länge der Abstand der Nanopartikel im Netzwerk eingestellt werden.[193] Hierdurch eignen sich DNA-gebundene Nanopartikel-Aggregate hervorragend als Modellstruktur zum Vergleich experimentell bestimmter Spektren mit numerischen Berechnungen von Aggregat-Spektren. [112, 113]

DNA-gebundene Aggregate aus Gold-Nanopartikeln wurden aus unterschiedlich großen Nanopartikeln[194], aus unterschiedlich geformten Nanopartikeln [195] und mit unterschiedlichen Orientierungen der Nanopartikel zur DNA [185] durchgeführt. Auch definierte, komplexe Strukturen aus Gold-Nanopartikeln sind auf diese Weise realisierbar. [136, 196-199]

Die optischen Eigenschaften der Aggregate hängen stark von der Aggregatsgröße ab[112, 184] und dienen somit als Messgröße für den Hybridisierungszustand der DNA. Bei langsamer Temperaturerhöhung führt das Schmelzen der DNA zu kleiner werdenden Aggregaten und somit zur Extinktionsänderung. [16, 185, 200, 201] Durch Messung der Extinktion bei langsam steigender Temperatur lässt sich hierdurch das Schmelzen der DNA in einer Schmelzkurve aufzeichnen. Eine derart gewonnene Schmelzkurve wird im folgenden dieser Arbeit als „klassische Schmelzkurve“ bezeichnet. Während DNA nur bei etwa 260 nm eine deutliche optische Absorption zeigt, kann die durch DNA-Schmelzen hervorgerufene Extinktionsänderung in Gold-Aggregaten bei nahezu jeder Wellenlänge im UV- und sichtbaren Spektralbereich beobachtet werden (siehe auch Abschnitt 5.2.2). In Abbildung 2.14 ist eine klassische DNA-Schmelzkurve für Aggregate aus 10 nm Gold-Partikeln im Vergleich zur UV-Absorption der freien DNA ohne Gold gezeigt. Der direkte Vergleich zeigt, dass die Schmelztemperatur der freien DNA niedri-

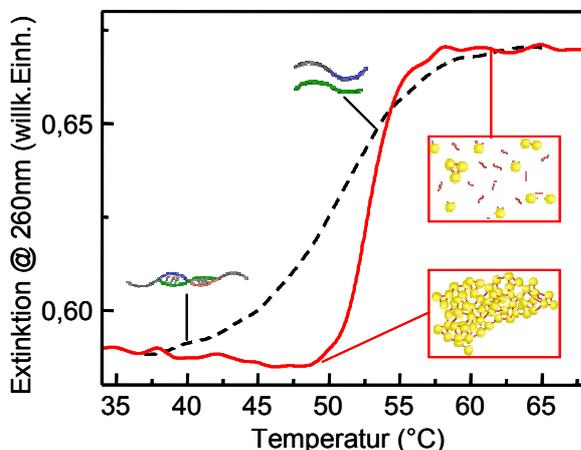


Abbildung 2.14: „Klassische Schmelzkurve“ von Aggregaten aus DNA-gebundenen 10 nm Gold-Nanopartikeln (rot). Die Änderung der Extinktion bei 260 nm dient als Indikator für DNA-Schmelzen, das die Nanopartikel voneinander löst. Die Breite des Übergangs ist mit 3 °C deutlich schärfer als die der nicht goldgebundenen DNA (schwarz), die eine Übergangsbreite von 9 °C besitzt. Die Schmelztemperatur der nicht goldgebundenen DNA ist zudem 2,5 °C niedriger als die der Aggregate.

ger ist als für DNA, die in Aggregaten gebunden ist. Bemerkenswert ist zudem der extrem scharfe Phasenübergang der Gold-Aggregate vom gebundenen in den gelösten Zustand. Dieser Übergang ist für goldgebundene DNA deutlich schärfer als für freie DNA. [16, 185, 190, 201, 202] Jin et al. zeigten, dass die Schärfe des Phasenüberganges stark von der Anzahl der DNA-Verbindungen zwischen den Nanopartikeln abhängt. [185] Der scharfe Schmelzübergang kann wie ein Lawineneffekt beschrieben werden. Da sich die Doppelstränge zwischen zwei Partikeln in sehr kleinem Abstand zueinander befinden, überlappen die Ionenwolken, die jede Doppelhelix umgeben.[203] Hierdurch wird jede einzelne Helix zusätzlich stabilisiert, was eine Erhöhung der Schmelztemperatur zur Folge hat.[16] Schmilzt ein Doppelstrang, so verringert sich die lokale Ionenkonzentration, was die Doppelstränge in der direkten Umgebung ebenfalls destabilisiert.[203] Diese schmelzen daraufhin ebenfalls und der lawinenartige Effekt, der zu einer steilen Schmelzkurve führt, ist losgetreten.

Je höher die Salzkonzentration, desto geringer ist die elektrostatische Abstoßung, sowohl zwischen Nanopartikeln, als auch zwischen den DNA-Strängen. Durch Erhöhung der Salzkonzentration erhöht sich die Anzahl der Hybridisierungsereignisse und somit die Menge der Verbindungen zwischen Nanopartikeln.[185] Wie bei freier DNA lässt sich folglich durch Erhöhung der Salzkonzentration die Schmelztemperatur erhöhen. Meist werden zwischen der Thiolgruppe und der Erkennungssequenz der DNA weitere Basen als Abstandshalter eingesetzt. Hierdurch werden zum Einen sterische Hinderung im Bereich der dicht gepackten DNA-Stränge an der Partikeloberfläche vermieden (siehe 2.3.2) und zum Anderen wird hierdurch die lokale Ionendichte zwischen den Partikeln erhöht, wodurch die Hybridisierungsrate steigt.[185]

Die Flexibilität der einzelsträngigen Abstandshalter hat auch Auswirkungen auf die Anordnung der Nanopartikel zueinander. Jüngste Arbeiten zur Kristallstruktur von DNA-gebundenen Nanopartikel-Aggregaten haben gezeigt, dass die Einfügung flexibler Elemente in der Doppelstrangmitte[204] oder zwischen Doppelstrang und Nanopartikel[205] zu einer besser geordneten Kristallstruktur im Aggregat führen. Diese Arbeiten haben auch gezeigt, dass es bei Temperaturen etwas unterhalb der Schmelztemperatur zu einer Umstrukturierung kommt, die zu einer höheren Ordnung im Aggregat führt. Numerische Berechnungen von Extinktionsspektren haben jedoch gezeigt, dass diese nicht von der Kristallstruktur oder der Ordnung im Aggregat abhängt.[112] Dennoch kommt es bei

Temperaturen etwas unterhalb der Schmelztemperatur häufig zu einer weiteren Zunahme der spektralen Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz. Dies wird auf eine Art Ostwald-Reifung zurückgeführt. [184] Bei diesen Temperaturen wachsen größere Aggregate mit einem kleinen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis auf Kosten von kleinen Aggregaten. Die Nanopartikel sind im Inneren der Aggregate durch mehr DNA-Stränge miteinander verbunden und somit stabiler als Nanopartikel an der Oberfläche. Der Phasenübergang findet daher an der Oberfläche, ähnlich wie bei freier DNA, über einen breiteren Temperaturbereich statt. Kleine Aggregate, deren Oberflächenanteil größer ist, lösen sich somit bereits bei geringeren Temperaturen auf. Die so freigesetzten Nanopartikel stehen nun als Bindungspartner zur Verfügung und lagern sich an die großen Aggregate an, wodurch diese weiter wachsen. Als Folge entstehen durch die Ostwald-Reifung Aggregate mit idealen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnissen und einer Größenverteilung mit geringerer Varianz.

Wie in 2.3.1 ausgeführt, ist eine diagnostisch hochrelevante Anwendung von DNA-Schmelzkurven die Unterscheidung von DNA mit und ohne Basenfehlstelle. Diese Unterscheidbarkeit wurde für DNA-gebundene Gold-Nanopartikel-Aggregate gezeigt. [16, 115, 202, 206] In diesem System können jedoch Basenfehlstellen in der DNA unter bestimmten Voraussetzungen auch zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur führen[202], ein Verhalten, das für freie DNA nicht beobachtet wird. Für die in Kapitel 7 untersuchte DNA mit Basenfehlstelle wird eine niedrigere Schmelztemperatur im Vergleich zur Basenfehlstellen-freien DNA gemessen. Die Methode der goldgebundenen DNA-Schmelzanalyse ist gerade aufgrund ihres sehr scharfen Schmelzübergangs höchst interessant für Hochdurchsatz-Messungen in der genetischen Biotechnologie.[207] Die schärferen Schmelzübergänge im Gegensatz zur freien DNA erlauben es, mehr unterschiedliche DNA-Stränge im experimentell zugänglichen Temperaturbereich zu unterscheiden und somit parallel in einer Lösung zu untersuchen.[206] Dieses Verfahren wird auch Multiplexing genannt.

DNA-gebundene Gold-Nanopartikel haben gut definierte Abstände zueinander[192] und durch die Ostwald-Reifung nahezu gleichmäßige Dichteverteilungen in Aggregaten gleicher Größe. Es handelt sich somit um ein gut definiertes System, dessen optische und optothermische Eigenschaften sich gut modellieren lassen.[4, 112, 113] Die größenabhängigen Extinktionsspektren sind bei nahezu jeder Wellenlänge Indikator für

den Hybridisierungszustand der DNA. In dieser Arbeit wird zudem die in 2.1.5 und 2.2.2 vorgestellte effiziente Umwandlung von optischer in thermische Energie durch die Nanopartikel genutzt, um Experimente zum optothermischen DNA-Schmelzen in Aggregaten durchzuführen.

3 Experimentelle und numerische Methoden

In diesem Kapitel werden die experimentellen Methoden beschrieben, die zur Herstellung von DNA-gebundenen Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln und deren zeitaufgelöster optischer Untersuchung nach heizenden Laserpulsen eingesetzt wurden.

Als Grundlage für die zu untersuchenden Aggregate dienen Gold-Nanopartikel, die auf ihrer Oberfläche DNA-Einzelstränge tragen. Die Funktionalisierung der Gold-Nanopartikel mit thiolmodifizierter DNA wird im ersten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben. Anschließend erfolgt eine Beschreibung der Aggregat-Bildung aus dem Hybridsystem DNA/Gold-Nanopartikel durch Zugabe von Verbindungs-DNA.

In dieser Arbeit werden die optischen Eigenschaften der DNA-gebundenen Aggregate nach kontinuierlicher und gepulster optothermischer Anregung untersucht. Hierzu wurde ein System aufgebaut, das die optothermisch induzierte Extinktionsänderung des Hybrid-systems entweder spektral oder zeitlich auflöst. Dieser optische Aufbau wird in Abschnitt 3.3 vorgestellt.

Schließlich werden in den Abschnitten 3.4 Details zur Anwendung der Diskreten Dipol Approximation und in 3.5 eine kurze Übersicht über das numerische Verfahren der finiten Elemente vorgestellt.

3.1 Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit DNA

Das im Folgenden beschriebene Verfahren zur DNA-Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln wurde in Zusammenarbeit mit Ralph Sperling und Wolfgang Parak im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 486 B3 durchgeführt.

Gold-Nanopartikel können heute in einer Größe von 1-100 nm in nahezu jedem Lösungsmittel in einer Vielzahl synthetischer Methoden hergestellt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Gold-Nanopartikel wurden von der Firma BBI [208] bezogen. Die Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm liegen Citrat-stabilisiert in wässriger Lösung vor, wobei die Citrationen an der Partikeloberfläche eine elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln hervorruft, die der Stabilisierung der Partikel dient (vgl. Kapitel 2.2). Durch Modifizierung der Partikeloberfläche mit Phosphin (engl: 4,4'-(phenylphosphinidene)-bis(benzenesulfonic acid) dipotassium salt hydrate) wird eine noch höhere Stabilität der Nanopartikel auch bei sehr hoher Partikelkonzentration erreicht. Hierbei werden 200 mL Gold-Nanopartikel-Lösung mit 150 mg Phosphin für mehrere Tage inkubiert. Da Phosphin im Vergleich zum Citrat eine erhöhte Affinität zur Gold-Oberfläche besitzt, kommt es zum Austausch der Oberflächenliganden. Die Gold-Lösung wird anschließend aufkonzentriert und mit PBS-Puffer (10 mM PBS, 10 mM NaCl, pH 7,8) gewaschen. Die Aufkonzentrierung erfolgt in Centricon Filtern (30 kDa) in einer Zentrifuge bei 1000 g Zentrifugalbeschleunigung für etwa 1 h.

Die Oberflächenfunktionalisierung mit DNA erfolgt bei hohen Konzentrationen der Gold-Nanopartikel (μM) als auch der DNA (mM), um eine hohe Anbindungseffizienz zu erlangen.[2] Die DNA wurde von Metabion[209] bezogen, wobei die Sequenzen je nach Hybridisierungsschema ausgewählt wurden (vgl. Abbildung 4.1 und Abbildung 5.2). Das Hybridisierungsschema gibt auch vor, ob die Thiolmodifikation am 3'- oder 5'-Ende der DNA sitzt. Die Thiolgruppe ist im Auslieferungszustand der DNA ihrerseits durch eine Di-Thiol-Gruppe geschützt. Das Entschützen der Thiolmodifikation erhöht die Bindungseffizienz an die Goldoberfläche und wird wenige Minuten vor Zugabe der DNA zur konzentrierten Gold-Nanopartikel-Lösung durchgeführt. Als entschützendes Reduktionsmittel

wird TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) verwendet. Die entschützte DNA wird im Verhältnis ~200 zu 1 mit der konzentrierten Gold-Nanopartikel-Lösung gemischt und für mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert. Die Thiolgruppen verdrängen das Phosphin von der Goldoberfläche und es entsteht eine kovalente Bindung zwischen thiolmodifizierter DNA und Gold-Nanopartikeln. Anschließend werden 3-5 Waschschriffe durchgeführt, um ungebundene DNA und verdrängtes Phosphin zu entfernen. Hierfür wird die Lösung mit PBS-Puffer in Centricon Filtern (100 kDa) zentrifugiert.

3.2 Herstellung von DNA-gebundenen Aggregaten

Je nach Hybridisierungsschema werden zwei Spezies der DNA-Gold-Konjugate in PBS-Puffer (10 mM PBS, 300 mM NaCl) im Verhältnis 1 zu 1 gemischt. Nach Zugabe der Verbindungs-DNA im molaren Verhältnis von ~30 DNA-Strängen pro Nanopartikel wird die Lösung für ca. 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, um die DNA auf der Nanopartikeloberfläche zu strecken und mögliche interne Selbsthybridisierungen oder unspezifische Hybridisierung sowohl der goldgebundenen DNA als auch der Verbindungs-DNA aufzuheben.[199] Anschließend wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Noch während der Abkühlphase setzt die Hybridisierung und somit die Aggregatbildung ein. Typischerweise beträgt die Hybridisierungszeit einige Stunden. Nach dieser Zeit ist das weitere Aggregatwachstum hinreichend langsam, um für den Zeitraum der optothermischen Experimente eine konstante Aggregatgröße zu gewährleisten.

3.3 Messung der optothermisch induzierten Extinktionsänderung

In dieser Arbeit werden Gold-Nanopartikel-Aggregate kontrolliert optothermisch erwärmt. Hierbei wird die Plasmonresonanz und der daraus resultierende hohe Absorptionsquerschnitt von Gold-Nanopartikeln im grünen Spektralbereich zur effizienten Umwandlung von Licht in Wärme genutzt (vgl. Kapitel 2.1.5 und 2.2.2). Je nach den experimentellen Anforderungen kommen zur optothermischen Anregung der Aggregate ein kontinuierlich emittierender Festkörperlaser (Spectra Physics Millennia Vs) mit einer Wellenlänge von 532 nm zum Einsatz (Kapitel 4.1), oder ein gepulst emittierender Nd:YLF-Festkörperlaser (Spectra Physics Merlin) mit einer Wellenlänge von 527 nm und Pulsdauern, die elektronisch kontrolliert zwischen 60 und 300 ns variiert werden können. Beide Laser werden im Folgenden als Heiz- oder Anregelaser bezeichnet.

Aggregate aus Gold-Nanopartikeln haben im Vergleich zu nichtaggregierten Nanopartikeln eine rotverschobene und verbreiterte Plasmonresonanz (vgl. auch Kapitel 2.2.1). Wie bereits in 2.3.3 vorgestellt, kann die Extinktion im roten Spektralbereich als Indikator für den Bindungszustand der Nanopartikel und somit als indirektes Messsignal für das Schmelzen der DNA dienen. Das Auflösen des Aggregatverbandes wird mit einem kontinuierlich emittierenden Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 650 nm beobachtet. Dieser Laser wird im Folgenden Abfragelaser genannt.

Der Messaufbau ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Abfrage- und Anregelaser werden fokussiert und die beiden Fokusflächen werden in einer Küvette mit 2 mm optischem Pfad zum Überlapp gebracht. Um zu gewährleisten, dass die Extinktionsänderung nur in vom Anregelaser bestrahlten Volumen gemessen wird, ist der Fokusedurchmesser des Abfragelasers ($D \approx 400 \mu\text{m}$) kleiner als der des Anregelasers ($D \approx 800 \mu\text{m}$).

Die Anregungsintensität wird mithilfe eines Graugradientenfilters im Strahlengang des Anregelasers eingestellt. Bei gepulster Anregung wird die Leistungsdichte jedes einzelnen Anregepulses bestimmt. Hierzu misst eine schnelle Photodiode (Thorlabs DET 110, minimale Anstiegs- bzw. Abfallzeit: 20 ns) hinter einem Strahlteiler die Anregungsintensität. Eine weitere schnelle Photodiode misst zeitaufgelöst die transmittierte Intensität des Abfragelasers. Hierdurch wird die optothermisch induzierte Extinktionsänderung in der Probe bestimmt. Mithilfe eines optischen Langpass-Filters wird Streulicht des Anregela-

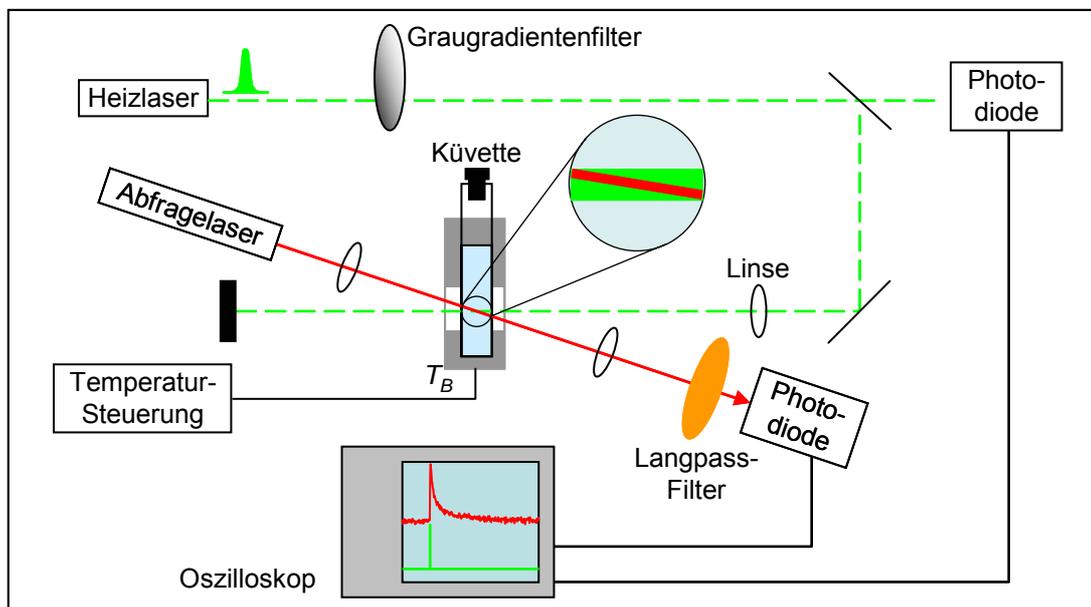


Abbildung 3.1: Experimenteller Aufbau zur zeitaufgelösten Messung der optisch induzierten Extinktionsänderung in Nanopartikel-Aggregaten. Die Aggregate befinden sich in einer Küvette, deren Badtemperatur T_B konstant gehalten wird. In der Küvette wird der Strahl des kontinuierlichen Abfragelasers mit kleinem Fokusbereich mit dem Strahl des gepulsten Heizlasers mit größerem Fokusbereich überlappt (Zoom in Einfügung). Mit jedem Laserpuls werden die Intensität des anregenden Pulses und die Intensität des transmittierten Lichtes des Abfragelasers aufgezeichnet. Dies geschieht mithilfe schneller Photodioden und eines Speicheroszilloskops. Alternativ kann als Heizlaser auch ein kontinuierlich emittierender Festkörperlaser verwendet werden.

sers vor der Abfrage-Photodiode geblockt. Die Diodensignale werden mit einem Speicheroszilloskop (LeCroy Waverunner LT584) aufgezeichnet. Der elektronische Speicher erlaubt die Aufzeichnung der Signale unmittelbar vor und nach dem Anregepuls und somit durch Vorher-Nachher-Messung die Bestimmung der optothermisch induzierten Extinktionsänderung.

Die Küvette enthält die Aggregate in wässriger Lösung und wird durch ein Peltier-Element auf konstanter Badtemperatur T_B gehalten.

Analog zum Prinzip des Abfragelasers mit 650 nm Wellenlänge wird in Kapitel 5.2.2 ein weiterer Abfragelaser mit einer Wellenlänge von 532 nm eingesetzt, um eine zweifarbige Abfrage der Extinktion zu ermöglichen. In diesem Fall werden die Strahlen von zwei Abfragelasern mit dem des Anregelasers in der Küvette überlappt (in Abbildung 3.1 nicht dargestellt).

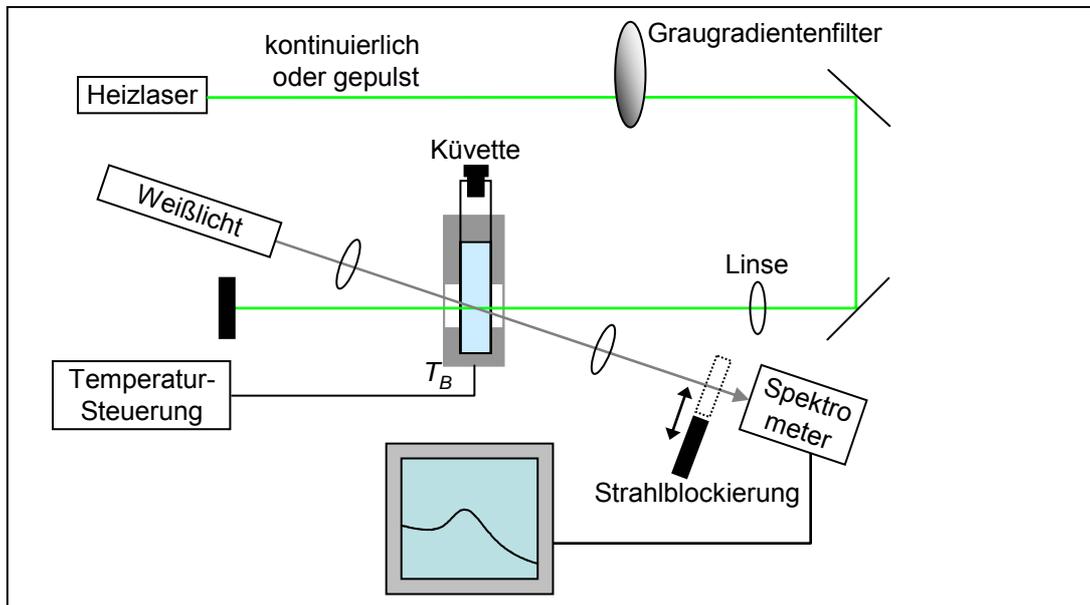


Abbildung 3.2: Mithilfe einer Weißlichtquelle und eines Spektrometers kann das gesamte Extinktionsspektrum vor und nach der Bestrahlung aufgezeichnet werden. Hierfür wird während der Bestrahlung der Eingang des Spektrometers blockiert, um Schäden an dem Detektor durch Streulicht des Heizlasers zu vermeiden.

In Kapitel 4 und 5.1 wird die optothermisch induzierte Extinktionsänderung spektral aufgelöst. Hierfür wird anstatt eines monochromatischen Abfragelasers eine breitbandige Weißlichtquelle (190-800 nm) zur Bestimmung der Extinktionsänderung eingesetzt. Deren Strahlengang wird in der Küvette mit dem Strahl des Anregelasers überlappt (vgl. Abbildung 3.2). Die transmittierte Intensität der Weißlichtquelle wird mithilfe eines Spektrometers bestimmt. Da die Anregungswellenlänge von 527-532 nm im Spektralbereich der Weißlichtquelle liegt und die Intensität des Anregelasers die der Weißlichtquelle weit übersteigt, ist es nicht möglich, während der Bestrahlung das Extinktionsspektrum im gesamten sichtbaren Spektralbereich aufzuzeichnen. Aus diesem Grund erfolgen die spektral aufgelösten Messungen der Extinktionsänderung in Kapitel 4 und 5.1 als Vorher-Nachher-Messung. Hierfür wird der Eingang des Spektrometers während der Laserbestrahlung blockiert, um die empfindlichen Detektoren vor schädigendem, intensivem Streulicht des Anregelasers zu schützen.

3.4 Diskrete Dipol Approximation

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 vorgestellt, ist die Diskrete Dipol Approximation (DDA) eine Methode, um Extinktions-, Absorptions- und Streuspektren von Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln zu berechnen. Implementiert ist die Methode der DDA in dem DDSCAT-Code von Draine und Flatau[124, 130], der auch in dieser Arbeit in Kapitel 6.2 zur Berechnung des Absorptionsquerschnittes von Nanopartikel-Aggregaten verwendet wird. Gewöhnlich wird DDSCAT eingesetzt, um ein homogenes Partikel beliebiger Form in N Punktdipole zu zerlegen, die periodisch in einer kubischen Gitterstruktur angeordnet sind und jeweils die Polarisierbarkeit α_i besitzen. [127, 210] Die Polarisierbarkeit α_i ist hierbei zunächst unbekannt und wird über die sog. Gitter-Dispersations-Relation[210] aus der Dielektrizitätsfunktion ε und N bestimmt, wobei die Anzahl N der Punktdipole im Partikel hierbei nicht strikt vorgegeben ist.

Dieses Vorgehen wird zur Berechnung der Absorptions- und Extinktionsspektren von Aggregaten invertiert: Hier wird N nicht frei gewählt, sondern durch die Anzahl der Partikel im Aggregat vorgegeben. Ein Aggregat aus N Nanopartikeln wird somit als periodisches Gitter aus N Punktdipolen mit der Polarisierbarkeit α_p angenähert. Hierbei wird angenommen, dass das Aggregat kugelförmig ist und die Nanopartikel in einer kubischen Gitterstruktur angeordnet sind. Jeder Einheitszelle wird die Polarisierbarkeit α_p zugeordnet (vgl. Abbildung 3.3). Diese wird nun mithilfe der Clausius-Mossotti-Beziehung (2.16) berechnet, wobei der in Abbildung 2.4 dargestellte korrigierte komplexe Brechungsindex der funktionalisierten Gold-Nanopartikel verwendet wird. Aus dieser Polarisierbarkeit α_p kann nun mithilfe der Gitter-Dispersations-Relation

$$\alpha_p = \frac{3d^3(\varepsilon_{eff} - 1)}{4\pi(\varepsilon_{eff} + 2)} \left[1 + \frac{3(\varepsilon_{eff} - 1)}{4\pi(\varepsilon_{eff} + 2)} \left[(b_1 + \varepsilon_{eff} b_2)(kd)^2 - \frac{2}{3}i(kd)^3 \right] \right] \quad (3.26)$$

eine effektive Dielektrizitätsfunktion ε_{eff} der aus Gold und Wasser zusammengesetzten Aggregate berechnet werden. Die Gitterkonstante d entspricht hierbei dem Abstand zwischen den Zentren zweier Nanopartikel im Aggregat, der durch die Länge der Verbindungs-DNA und die Größe der Nanopartikel bestimmt wird. k ist der Wellenvektor, $b_1 = -1,892$ und $b_2 = 0,165$ sind Konstanten.[127, 210]

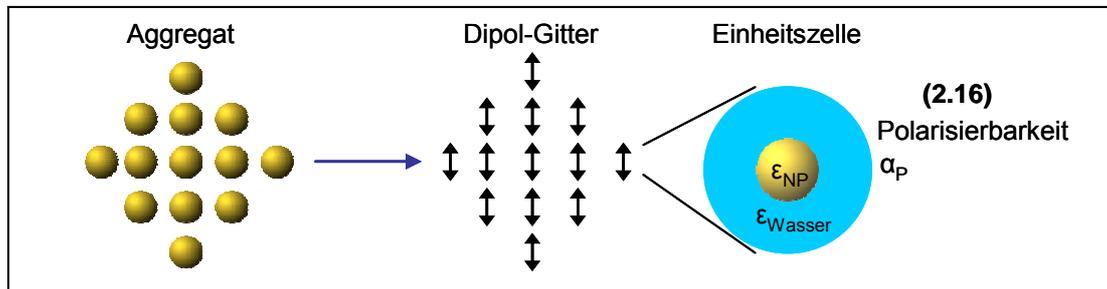


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Diskreten Dipol Approximation. Ein Aggregat aus Gold-Nanopartikeln wird als periodisches Gitter von Punktdipolen angenähert. Jeder Punktdipol hat die Polarisierbarkeit einer Einheitszelle, bestehend aus einem Nanopartikel umgeben von Wasser (berechnet nach (2.16)).

Die so gewonnene effektive Dielektrizitätsfunktion ϵ_{eff} dient schließlich als Grundlage für die Berechnung der Extinktions- und Absorptionsspektren von Aggregaten durch den DDSCAT-Code in Kapitel 6.2.

3.5 Finite Elemente

Die Methode der finiten Elemente (FEM) ist ein numerisches Verfahren zur Lösung von Differentialgleichungen. In dieser Arbeit wird die FEM eingesetzt, um die Wärmeleitungsgleichung zu lösen. Mithilfe des Programms Comsol Multiphysics [211] wird hierdurch in Kapitel 4.2 eine Abschätzung der optothermisch induzierten globalen Temperaturerhöhung im laserbestrahlten Volumen ermöglicht und in Kapitel 6.2 die lokale Wärme- und Temperaturverteilung in optothermisch geheizten Aggregaten berechnet.

An dieser Stelle sollen nur die Grundprinzipien der FEM vorgestellt werden. Für eine ausführliche Darstellung sei auf die Literatur verwiesen.[212]

Die Lösung einer Differentialgleichung - im hier vorliegenden Fall der Wärmeleitungsgleichung - mit gegebenen Randbedingungen erfolgt in der FEM nach dem folgenden Prinzip: Zunächst wird das Gebiet, in dem die Differentialgleichung gelöst werden soll, in endlich viele kleine Elemente unterteilt. In der Praxis bedeutet dies meist eine Triangulation, d.h. je nach Dimension eine Unterteilung in Dreiecke oder Tetraeder. Innerhalb dieser Teilgebiete werden Testfunktionen definiert, in der Praxis meist Polynome. Diese Testfunktionen werden in die zu lösende Differentialgleichung eingesetzt und man erhält zusammen mit den Randbedingungen ein Gleichungssystem, für dessen Lösung je nach Komplexität unterschiedliche Verfahren in Frage kommen. Durch die Lösung des Gleichungssystems wird letztendlich auch die betrachtete Differentialgleichung numerisch gelöst.

4 DNA-Schmelzen durch globales optothermisches Heizen

Das in diesem Kapitel beschriebene Experiment zeigt eine Blauverschiebung und Reduktion der Breite der Plasmonresonanz von DNA-gebundenen Gold-Nanopartikel-Aggregaten nach kontinuierlicher Laserbestrahlung. Der Vergleich mit Extinktionsspektren von nichtoptisch geheizten Gold-Nanopartikel-Aggregaten zeigt, dass dieser Effekt auf die Auflösung des DNA-Doppelstranges zwischen den Gold-Nanopartikeln und die daraus resultierende Freisetzung der Nanopartikel zurückzuführen ist. Durch Vergleichsmessungen mit DNA-Doppelsträngen, die nicht direkt an Gold-Nanopartikel gebunden sind, kann gezeigt werden, dass die optisch induzierte Temperaturerhöhung durch die hohe Absorption der Gold-Nanopartikel hervorgerufen wird. Die kontinuierliche Bestrahlung führt zu einer globalen Erwärmung des gesamten bestrahlten Volumens und nicht zu einer lokalen Erwärmung in der direkten Umgebung der Nanopartikel. Dies wird auch durch numerischen Simulationen der laserinduzierten Temperaturerhöhung bestätigt.

4.1 Optothermisches Schmelzen von DNA durch kontinuierliches, optisches Heizen von Gold-Nanopartikeln

Dieses Experiment dient dem Nachweis, dass mit Hilfe von Gold-Nanopartikeln Lichtenergie in Wärme umgewandelt werden kann, die schließlich zum optothermischen Schmelzen von DNA führt. Hierzu werden DNA-gebundene Gold-Nanopartikel-Aggregate bei Badtemperaturen etwas unterhalb der Schmelztemperatur beobachtet, die einem intensiven, kontinuierlichen Laser ausgesetzt sind.

Um geeignete Randbedingungen für die optothermischen Experimente wählen zu können, werden zunächst die verwendeten Nanopartikel-Aggregate charakterisiert. Die in diesem Versuch eingesetzten Nanopartikel wurden, wie in 3.1 beschrieben, mit DNA funktionalisiert. Zwei Chargen von Gold-Nanopartikeln wurden mit unterschiedlicher 3'-thiolmodifizierter DNA funktionalisiert. Die Hybridisierung mit freier Verbindungs-DNA erfolgt nach der in Abbildung 4.1 a) dargestellten Head-to-Tail-Konfiguration.[185] Wenige Minuten nach Zugabe der Verbindungs-DNA zur Nanopartikel-Lösung zeigt sich im Extinktionsspektrum eine deutliche Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz. Abbildung 4.1 b) zeigt diese, für Aggregat-Bildung typische, spektrale Veränderung. Die Extinktion der Nanopartikel ändert sich über den gesamten sichtbaren Spektralbereich. Diese Änderung ist Folge des abnehmenden Partikel-Abstandes und der daraus resultierenden Plasmonenkopplung. Durch die gewählte Head-to-Tail-Konfiguration beträgt der Abstand zwischen den Nanopartikeln nur wenige nm, was eine besonders effiziente Plasmonenkopplung zur Folge hat.[112, 113] Auffällig ist die große Extinktionsänderung bei 260 nm. Diese besteht nur zu einem kleinen Bruchteil aus der DNA-eigenen Hyperchromizität durch DNA-Hybridisierung (vgl. Kapitel 2.3.1). Wie bereits in Kapitel 2.2.1 eingeführt, verursacht die Bildung großer Aggregate einen Abschattungseffekt, so dass Gold-Nanopartikel und auch DNA im Inneren der Aggregate und an der lichtabgewandten Seite nicht zur Extinktion beitragen. Dieser Abschattungsef-

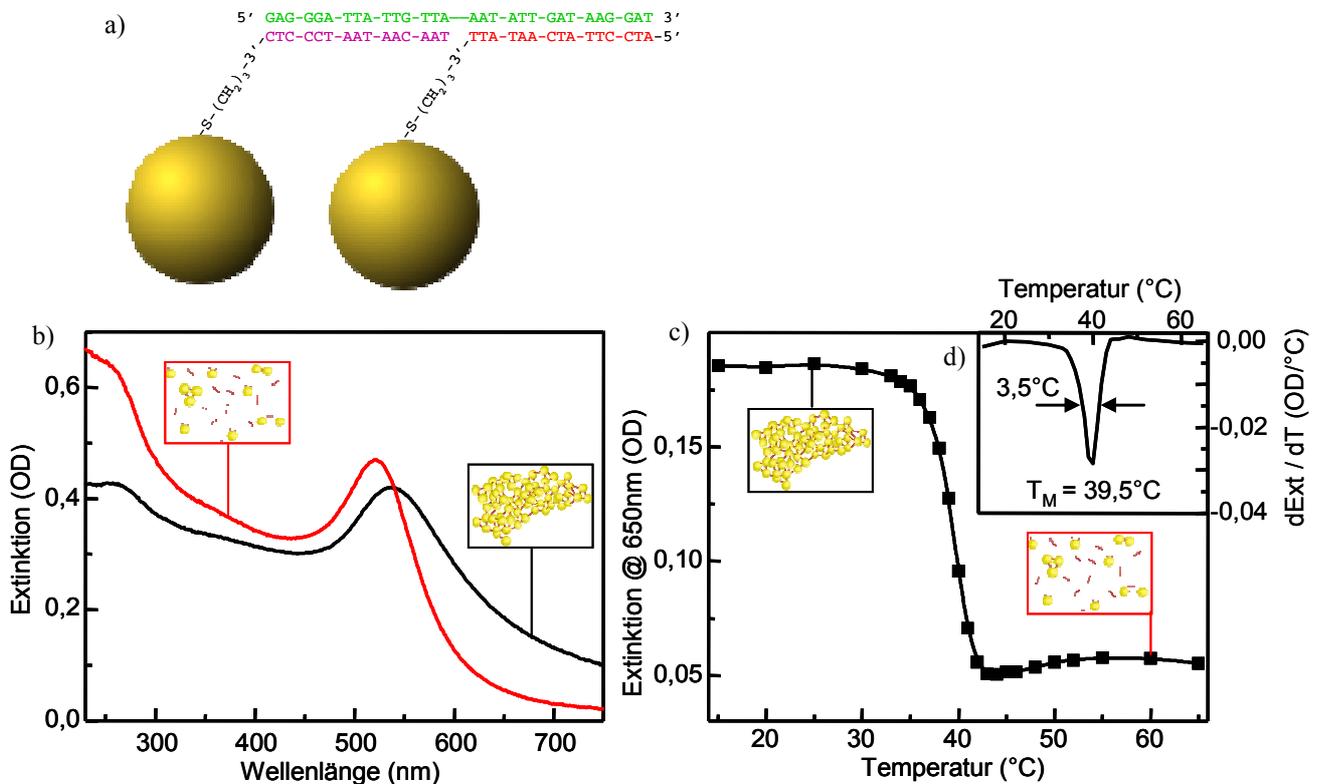


Abbildung 4.1: **a)** Head-to-Tail-Konfiguration von Gold-Nanopartikeln und verwendete DNA-Sequenzen der beiden 3'-goldgebundenen Erkennungssequenzen (rot und violett) und der Verbindungs-DNA (grün), nicht maßstabsgetreu. **b)** Extinktionsspektren von Gold-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 10 nm im aggregierten Zustand bei 25°C (schwarz) sowie nach Erhöhung der Badtemperatur auf 60°C (rot). Durch die Temperaturerhöhung schmilzt die DNA und die Nanopartikel liegen in frei gelöster Phase vor. **c)** Die klassische Schmelzkurve zeigt die Extinktion im roten Spektralbereich, die beim Phasenübergang von aggregierten zu gelösten Partikeln abnimmt. **d)** Das Minimum der Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur zeigt die exakte Schmelztemperatur T_M . Die Halbwertsbreite der Ableitungsfunktion gibt die Breite des Phasenübergangs an.

fekt verstärkt die Extinktionsänderung bei 260 nm um ein Vielfaches der DNA-eigenen Hyperchromizität. [112]

Um die Schmelztemperatur der, in den Aggregaten eingebetteten, DNA zu bestimmen, wird die Temperatur der Lösung langsam, schrittweise erhöht und die Extinktion im roten Spektralbereich beobachtet. Die Erhöhung der Badtemperatur erfolgt hierbei durch einen temperierbaren Metallblock, der die Küvette umschließt. In der so gewonnenen klassischen Schmelzkurve in Abbildung 4.1 c) ist ein scharfer Phasenübergang bei etwa 40 °C zu beobachten. Der rasche Abfall der Extinktion mit der Temperatur zeigt den Übergang vom aggregierten in den gelösten Zustand der Nanopartikel. An die Ableitung der

Schmelzkurve nach der Temperatur wird eine Gauß-Funktion angepasst. Deren Mittelpunkt gibt die exakte Schmelztemperatur an und die Halbwertsbreite der Gauß-Funktion entspricht der Breite des Phasen-Überganges. Wie aus Abbildung 4.1 d) abzulesen ist, besitzen die DNA-gebundenen Nanopartikel-Aggregate in der gewählten Head-to-Tail-Konfiguration eine Schmelztemperatur von $39,5\text{ °C}$ bei einer Übergangsbreite von $3,5\text{ °C}$.

Um zu überprüfen, ob eine für DNA-Schmelzen ausreichend große Temperaturerhöhung auch optisch induziert werden kann, wird eine Badtemperatur etwas unterhalb der DNA-Schmelztemperatur gewählt. Im vorliegenden Fall ist bei einer Temperatur von 35 °C die benötigte Temperaturdifferenz bis zur Schmelztemperatur minimiert und die Nanopartikel befinden sich noch im aggregierten Zustand. Bei dieser Temperatur wird das Extinktionsspektrum der Nanopartikel-Aggregate gemessen. Nach mehreren Stunden Hybridisierung ist das Aggregat-Wachstum zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen, so dass sich das Spektrum ohne weiteren Einfluss über den Zeitraum der folgenden Messungen nicht ändert. Die Nanopartikel-Aggregate werden nun für eine Minute einem fokussierten Laser mit einer Leistung von 500 mW und einer Wellenlänge von 532 nm ausgesetzt. Anschließend wird erneut die Extinktion der Lösung gemessen. Der Vergleich der Extinktion vor und nach der Laserbestrahlung ist in Abbildung 4.2 gezeigt. Die optisch induzierte Veränderung des Spektrums entspricht einer Blauverschiebung der Plasmonresonanz, einer Reduktion der Resonanzbreite sowie einer Zunahme der Extinktion bei

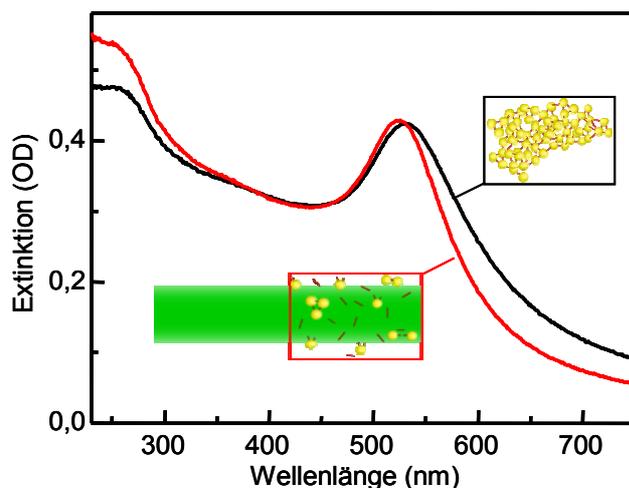


Abbildung 4.2: Das Extinktionsspektrum der Gold-Nanopartikel ändert sich durch einminütige Bestrahlung mit einem kontinuierlichen Laser mit 500 mW Leistung. Die Plasmonresonanz ist nach der Laserbestrahlung blauverschoben (rot) und hat eine geringere Resonanzbreite als vor der Bestrahlung (schwarz). Diese spektrale Veränderung zeigt, dass die DNA durch den Laser erhitzt wurde und zum Schmelzen gebracht wurde. Die Badtemperatur beträgt 35 °C und liegt somit unterhalb der Schmelztemperatur der DNA.

260 nm. Diese spektralen Veränderungen sind für die Auflösung der Aggregate durch DNA-Schmelzen typisch und zeigen, dass die Gold-Nanopartikel-Lösung durch Absorption optischer Energie und deren Umwandlung in thermische Energie derart aufgeheizt werden kann, dass die DNA in den Nanopartikel-Aggregaten schmilzt und die Nanopartikel freigesetzt werden.

Bei der Laserwellenlänge von 532 nm ist die Absorption der Nanopartikel-Aggregate aufgrund der Plasmonresonanz besonders hoch, während die Absorption des umgebenden Wassers in diesem Spektralbereich vernachlässigbar ist.[213] Wie in 2.1.5 beschrieben, ist die Absorption durch die Nanopartikel-Aggregate stark lokalisiert. Im Folgenden soll geklärt werden, ob die kontinuierliche, lokale Absorption von Licht auch zwangsläufig zu einer lokalen Erwärmung der Nanopartikel-Aggregate bei unveränderter Badtemperatur führt (Abbildung 4.3 a)) oder ob es hierdurch zu einer globalen Erwärmung des gesamten laserbestrahlten Volumens kommt (Abbildung 4.3 b)). Hierfür wird ein Kontroll-Experiment mit DNA durchgeführt, die nicht an Gold-Nanopartikel gebunden ist.

Für dieses Kontroll-Experiment werden zusätzlich zur oben genannten Probe zwei weitere, unterschiedliche Lösungen angesetzt: Eine Lösung enthält doppelsträngige DNA und Gold-Nanopartikel, die jedoch im Gegensatz zur ersten Probe nicht mit der DNA

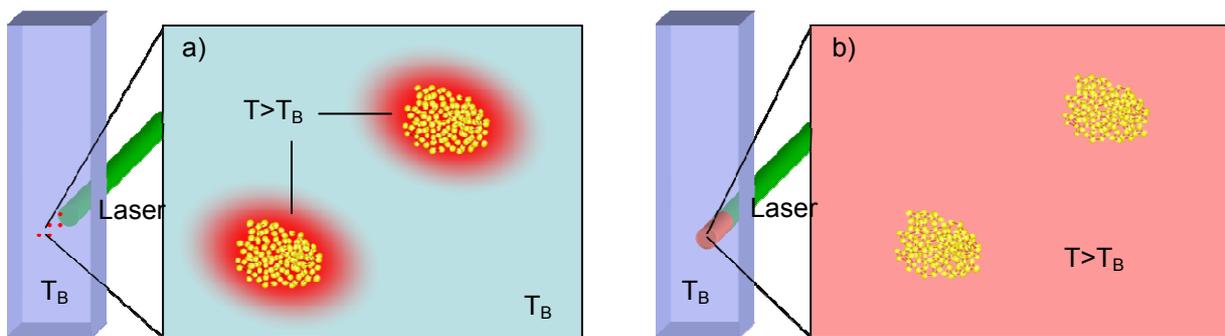


Abbildung 4.3 a) Lokale Erwärmung der Aggregate ist dadurch gekennzeichnet, dass nur die Aggregate und deren direkte Umgebung aufgeheizt werden ($T >$ Badtemperatur T_B). Das Volumen zwischen zwei Aggregaten und somit der Großteil des bestrahlten Volumens werden nicht erwärmt und verbleiben bei T_B . **b)** Im Fall globaler Erwärmung bleibt zwar das unbestrahlte Volumen in der Küvette kalt, jedoch wird das gesamte laserbestrahlte Volumen homogen auf $T > T_B$ aufgeheizt. Im bestrahlten Volumen ist auch der Zwischenraum zwischen zwei Aggregaten erwärmt, da es zum Wärmetransfer von den Aggregaten in die Umgebung kommt.

verbunden sind, die andere Lösung enthält nur doppelsträngige DNA ohne Gold-Nanopartikel. Da die DNA in diesen beiden Proben keine Verbindung zwischen Gold-Nanopartikeln herstellt, kann nicht die Verschiebung der Plasmonresonanz als Indikator für laserinduziertes DNA-Schmelzen benutzt werden. Alle drei Proben zeigen jedoch bei 260 nm die DNA-eigene Absorption. Diese ist, wie bereits in 2.3.1 eingeführt, im Indikator für den Hybridisierung-Zustand der DNA dienen. Die Gold-Nanopartikel-gebundene DNA benötigt einige Minuten zur Hybridisierung. Dies erlaubt die Vorher-Nachher-Messung im vorhergehenden Experiment, denn zwischen Bestrahlung und Messung liegen nur wenige Sekunden, in denen die Nanopartikel nicht wieder aggregieren können. Die freie DNA in den beiden Kontroll-Proben kann deutlich schneller hybridisieren. Um sicherzustellen, dass die freie DNA zwischen Bestrahlung und Extinktionsmessung nicht rehybridisiert, muss die Erfassung der Extinktionsänderung bereits während der Laserbestrahlung erfolgen. Hierfür wird der Laserstrahl in der Küvette räumlich mit dem Strahlengang der Weißlichtquelle überlappt. Durch Verwendung geeigneter optischer Bandpassfilter (Schott Glasfilter UG11) wird der störende Einfluss von Laserstreulicht auf den Detektor und die Messung verhindert (siehe auch Abschnitt 3.3). Da die freie und die goldgebundene DNA unterschiedliche Schmelztemperaturen haben, wurden jeweils Badtemperaturen gewählt, die 18 °C unterhalb der Schmelztemperatur des jeweiligen Systems liegen. Diese große Temperaturdifferenz zum Schmelzpunkt ist aufgrund des breiteren Phasenüberganges der freien DNA vom hybridisierten zum geschmolzenen Zustand nötig (vgl. 2.3.3). Abbildung 4.4 zeigt die Änderung der DNA-eigenen Extinktion bei 260 nm durch kontinuierliche Laserbestrahlung für die unterschiedlichen Systeme. Die Änderung ist als Bruchteil der maximal erreichbaren Änderung aufgetragen, welche in klassischen Schmelzkurven mit langsamer Temperaturerhöhung bestimmt wurde.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ wird die kontinuierliche Laserbestrahlung gestartet, was im System der goldgebundenen DNA zu einer stetigen Erhöhung der DNA-Extinktion führt. Dieses Anzeichen für laserinduziertes DNA-Schmelzen hält auch nach Abschalten des Lasers zunächst an, da die Nanopartikel einige Minuten benötigen, um sich wieder durch Hybridisierung mit der freien DNA zu Aggregaten zurückzuformen. Die Extinktionsänderung in diesem

Auch für die DNA, die sich nichtgoldgebunden mit Gold-Partikeln in einer Lösung befindet, erhöht sich nach Beginn der Laserbestrahlung die Extinktion der DNA. Hier wird nahezu die maximal mögliche Extinktionsänderung erreicht, die auch im Fall der klassischen Schmelzkurve mit langsamer Temperaturerhöhung erreicht wird. Das hohe Rauschen im Extinktionssignal wird wie folgt erklärt: Der Großteil der gemessenen Extinktion stammt von den Gold-Nanopartikeln. Dieser Extinktionsanteil wird durch das Schmelzen der DNA nicht beeinflusst, da die DNA nicht an das Gold gebunden ist. Nur ein sehr kleiner Bruchteil der gemessenen Extinktion bei 260 nm kann der DNA-eigenen Absorption zugeschrieben werden. Nur dieser kleine Extinktionsanteil wird durch das optothermische Schmelzen der DNA aufgrund der Hyperchromizität der DNA verändert. Man erhält somit eine sehr kleine absolute Extinktionsänderung bei großem Extinktionshintergrund der Gold-Nanopartikel.

Im Fall der goldgebundenen DNA existiert zwar ein gleichgroßer Extinktionshintergrund der Gold-Nanopartikel, jedoch führt hier das optothermische DNA-Schmelzen aufgrund des Abschattungseffektes zu einer deutlich ausgeprägteren Extinktionsänderung bei 260 nm, als dies die DNA-eigene Hyperchromizität hervorrufen würde. (vgl. Abbildung 4.1 b)).

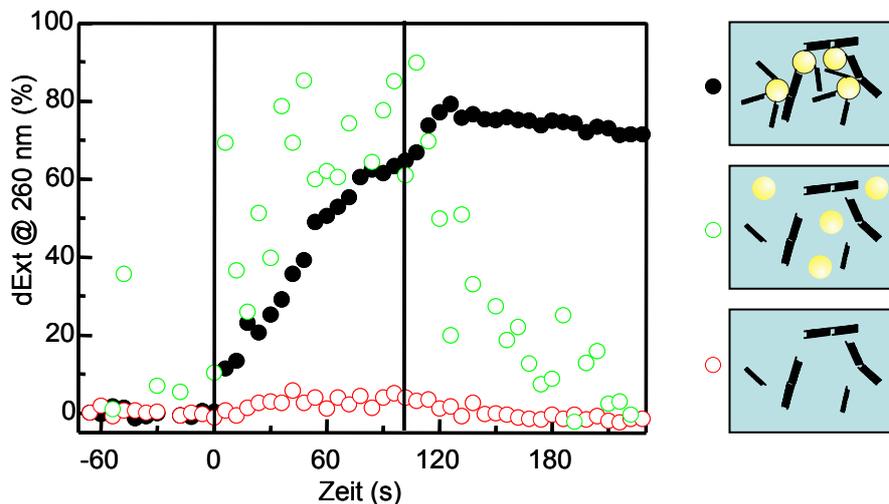


Abbildung 4.4: Relative Änderung der DNA-Extinktion bei 260 nm durch Laserbestrahlung mit 1 W Leistung. Die Badtemperatur ist jeweils 18 °C unterhalb der DNA-Schmelztemperatur. 100% Änderung entspricht der maximal möglichen Extinktionsänderung, wie sie aus der Schmelzkurve mit langsamer Temperaturerhöhung ermittelt wurde. Beide Systeme, die Nanopartikel enthalten – unabhängig ob DNA-gebunden (schwarz) oder nicht (grün) – zeigen eine Erhöhung der DNA-Extinktion aufgrund laserinduzierten DNA-Schmelzens. In Abwesenheit stark lichtabsorbierender Gold-Nanopartikeln ist kein signifikantes Schmelzen der DNA beobachtbar (rot).

Trotz des großen Hintergrundrauschens zeigt das Kontroll-Experiment mit nichtgoldgebundener DNA klar, dass die Anwesenheit von freien Gold-Nanopartikeln ausreicht, um die Temperatur der DNA bis zur Schmelztemperatur zu erhöhen. Die Nanopartikel, die im Wellenlängenbereich des eingestrahnten Lasers eine hohe Absorption haben, führen somit bei kontinuierlicher Bestrahlung nicht zu einer rein lokalen Erwärmung in der Nanopartikel-Umgebung, sondern erwärmen das gesamte Volumen, das vom Laser bestrahlt wird. Hierdurch schmelzen die DNA-Doppelstränge, obwohl sie nicht mit der Partikeloberfläche verbunden sind und sich somit in deutlich größerem Abstand zu den Nanopartikeln befinden. Nach Abschalten des Lasers nimmt die UV-Extinktion wieder rasch ab. Dies ist Folge des abkühlenden Wassers im bestrahlten Volumen, das eine Rehybridisierung der DNA erlaubt. Diese Rehybridisierung erfolgt für nichtgoldgebundene DNA deutlich schneller als für DNA.

Das dritte System, das nur aus DNA-Doppelsträngen besteht, zeigt keine signifikante Veränderung durch die Laserbestrahlung. Da in diesem System keine Nanopartikel vorhanden sind, wird kein Licht absorbiert und in Wärme umgewandelt. Wasser und Quarzküvette sind bei der Laserwellenlänge hinreichend transparent, um keine störende, optothermische Erwärmung des Systems hervorzurufen.

Der Vergleich des Schmelzverhaltens der drei unterschiedlich zusammengesetzten Systeme macht deutlich, dass während kontinuierlicher Laserbestrahlung im Wellenlängenbereich der Plasmonresonanz zwar die Anwesenheit von Gold-Nanopartikeln als stark lichtabsorbierende, optothermische Konverter nötig ist, die DNA aber hierbei nicht direkt mit den erhitzten Nanopartikeln verbunden sein muss, um die DNA zu schmelzen. Die optisch induzierte Wärme wird also nicht in der Nanopartikel-Umgebung lokalisiert, sondern verteilt sich global, homogen auf das gesamte, bestrahlte Volumen.

Die Gold-Nanopartikel, die sich gemeinsam mit der freien, doppelsträngigen DNA in einer der Kontroll-Lösungen befindet (grün markierte Probe in Abbildung 4.4) wurden ebenfalls mit DNA funktionalisiert, die jedoch zu keinem der beiden freien DNA-Stränge in der Lösung komplementär ist (zur Vereinfachung wurde dies in der schematischen Probendarstellung in Abbildung 4.4 nicht eingezeichnet). Dies ist nötig, um die Nanopartikel in der salzhaltigen Lösung zu stabilisieren (siehe auch 2.2.1) und dient zudem der Vermeidung unspezifischer Bindung von DNA an die Goldoberfläche (siehe auch 2.3.2). Hierdurch soll sichergestellt werden, dass sich die freie DNA nicht mit den

Nanopartikeln verbindet, sondern stattdessen in statistisch verteiltem Abstand zu den Nanopartikeln, frei in der Lösung vorliegt. Durch unvorhergesehene, unspezifische Bindung mit stabilisierender, goldgebundener DNA würde sich die freie DNA jedoch in direkter Umgebung der Nanopartikel aufhalten. Dies würde bedeuten, dass das angenommene Modell der freien DNA falsch ist, was zu einer Fehlinterpretation des vorhergehenden Experimentes führen würde. Aus diesem Grund wurde zur Absicherung der bereits gefundenen Erkenntnisse ein weiteres Experiment durchgeführt, das zwischen lokalem und globalem optothermischem Heizen unterscheidet.

4.2 Globales optothermisches Heizen durch lokal absorbierende Objekte

Im folgenden Experiment wird durch zeitliches Zerhacken des Laserstrahles gezeigt, dass das laserinduzierte Schmelzen der DNA bei den bisher verwendeten Leistungsdichten des kontinuierlichen Lasers von der durchschnittlich eingestrahnten Laserleistung abhängt, und nicht von der erreichten Spitzenleistung. Hierdurch kann, wie die Diskussion am Ende dieses Kapitels zeigt, zwischen lokalem und globalem optothermischem Heizeffekt unterschieden werden.

Für dieses Experiment wurden wie bereits in 4.1 DNA-gebundene Gold-Nanopartikel-Aggregate bei einer Badtemperatur von 25°C, somit deutlich unterhalb der DNA-Schmelztemperatur, mit einem Laser bestrahlt. Vor und nach der Bestrahlung wurden Extinktionsspektren aufgenommen, um die laserinduzierte Änderung der Extinktion und somit das Schmelzverhalten der DNA in den Aggregaten zu untersuchen. Durch Subtraktion der Extinktionsspektren vor und nach der Bestrahlung erhält man die laserinduzierte Änderung der Extinktion, die in Abbildung 4.5 dargestellt ist.

Durch kontinuierliche Bestrahlung für 90 s mit der Leistungsdichte $I_0 = 12 \text{ W/mm}^2$ nimmt die Extinktion für Wellenlängen kleiner als 570 nm zu und im roten Spektralbereich ab. Dieses Verhalten entspricht der Blauverschiebung der Plasmonresonanz und somit laserinduziertem DNA-Schmelzen. Durch Einsatz eines Graufilters wird nun eine reduzierte, kontinuierlich eingestrahnte Leistungsdichte von $I_0/4$ erreicht. Unter diesen Bedingungen wird keine Extinktionsänderung und somit kein DNA-Schmelzen induziert. Anstatt die durchschnittlich eingestrahnte Leistung dauerhaft mit Hilfe eines Graufilters zu reduzieren, wird der Laserstrahl nun mit Hilfe einer rotierenden, segmentweise transparenten Metallscheibe zeitlich zerhackt. Bei einer Zerhacker-Frequenz von 250 Hz und einem anaus-Verhältnis von 1 zu 3 werden hierdurch Pulse von 1 ms Dauer bei zeitlichen Pulsabständen von 3 ms erzeugt. Jeder einzelne Puls hat die Spitzenleistungsdichte von $I_{Puls} = I_0$, im zeitlichen Mittel wird jedoch wieder $I = I_0/4$ eingestrahlt. Auch in diesem Fall kommt es zu keiner Änderung der Extinktion. In beiden Fällen reduzierter mittlerer

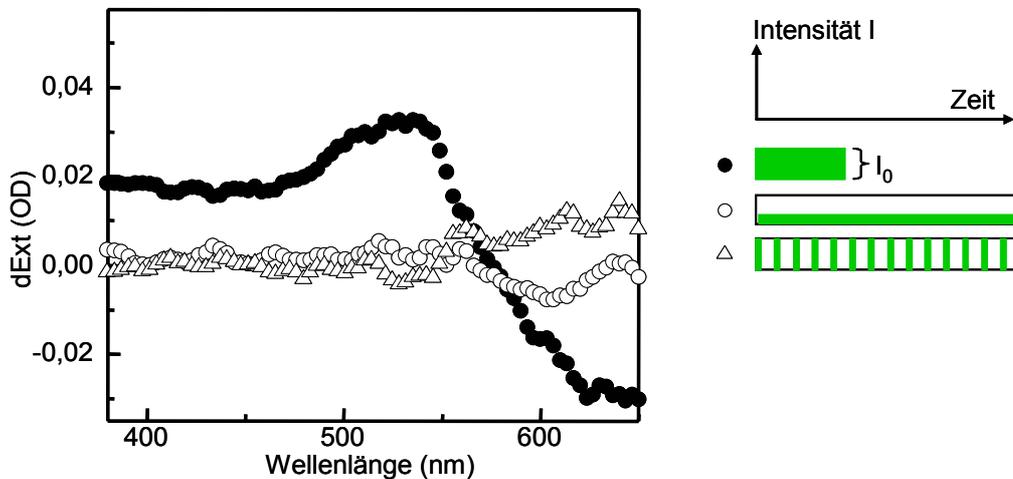


Abbildung 4.5: Extinktionsänderung DNA-gebundener Gold-Nanopartikel-Aggregate durch kontinuierliche (● und ○) und unterbrochene (Δ) Laser-Bestrahlung. Die Legende auf der rechten Seite verdeutlicht die zeitliche Verteilung der eingestrahlten Leistungsdichte. Bei einer kontinuierlichen Leistungsdichte $I_0 = 12 \text{ W/mm}^2$ wird eine deutliche Änderung der Extinktion beobachtet (●), die einer spektralen Blauverschiebung und somit Laser-induziertem DNA-Schmelzen entspricht. Wird die durchschnittliche Leistungsdichte auf $I_0/4$ reduziert, die Bestrahlungsdauer jedoch vervierfacht, so wird keine signifikante Extinktionsänderung beobachtet. Hierbei spielt es keine Rolle, ob die Leistung dauerhaft auf $I_0/4$ reduziert wird (○), oder zeitlich zerhackt wird bei einer Spitzen-Leistungsdichte von I_0 . Das Schmelzverhalten ist somit nur von der durchschnittlich eingestrahlten Leistung abhängig, nicht aber von der Spitzenleistungsdichte. Dieses Verhalten ist typisch für globales Heizen.

Leistungsdichte wurde die Bestrahlungszeit im Vergleich zum Experiment mit der vollen mittleren Leistungsdichte I_0 vervierfacht. Die gesamte eingestrahlte Energie ist somit in allen drei Experimenten gleich.

Dieser Vergleich zeigt, dass das Schmelzen der DNA und somit die in den Nanopartikel-Aggregaten erzeugte Temperatur nicht von der kurzzeitig deponierten Energie abhängt, sondern von der im zeitlichen Mittel eingestrahlten Energie. Dies bedeutet, wie im Folgenden diskutiert, dass bei den gegebenen Leistungsdichten keine lokale Wärme, sondern globale Wärme erzeugt wird, die sich auf das gesamte bestrahlte Volumen verteilt.

Mit der theoretischen Betrachtung des Überganges von lokalem zu globalem optothermischem Heizen durch lichtabsorbierende Gold-Nanopartikel befasst sich auch die nach Beginn dieser Arbeit veröffentlichte Arbeit von Koblinski et al. [107]. Hier wird beschrieben, unter welchen Bedingungen lokale Heizeffekte zu erwarten sind, und auf welcher Zeitskala globale, homogene Erwärmung trotz lokal absorbierender Nanopartikel erfolgt. Die dort für nichtaggregierte, freie Nanopartikel vorgestellten Ergebnisse werden im Folgenden auf den hier vorliegenden Fall aggregierter Nanopartikel übertragen.

Wie in Kapitel 2.1.5 eingeführt, stellt sich der Gleichgewichtszustand des lokalen Temperaturprofils um ein lasergeheiztes Gold-Nanopartikel innerhalb weniger Nanosekunden ein. Für Aggregate aus Gold-Nanopartikeln, die Durchmesser von mehr als einem μm erreichen können, verlängert sich diese Zeit τ entsprechend (2.23) auf ca. 5 μs . Nach der Pulsdauer von 1 ms ist somit die maximal erreichbare lokale Temperaturerhöhung im Aggregat längst erreicht. Die entsprechende Extinktionsmessung in Abbildung 4.5 zeigt jedoch, dass diese lokal erreichte Temperatur bei der gegebenen Leistungsdichte nicht ausreicht, um die DNA im Aggregat zu schmelzen. Somit ist es nicht die lokale Erwärmung, die bei kontinuierlicher Bestrahlung mit I_0 zum Schmelzen der DNA führt.

Eine der Randbedingungen, um das Temperaturprofil (2.18) und dessen zeitliche Entwicklung (2.21) aus Kapitel 2.1.5 zu erhalten, ist die Annahme eines unendlich ausgedehnten Wasserbades. Diese Annahme ist auch in einem ausreichend großen Wasservolumen nur solange gültig, bis die thermischen Felder der einzelnen Nanopartikel-Aggregate nach einer Zeit $\tau_{AA} = d_{AA}^2/D$ überlappen. Hierbei ist $D = 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ die thermische Diffusivität für Wasser aus Kapitel 2.1.5. und d_{AA} der mittlere Abstand zwischen einzelnen Aggregaten. Um diesen zu erhalten, benötigt man zunächst die Ausgangskonzentrationen der Nanopartikel, die in den gezeigten Experimenten bei etwa 1 nM liegt. Die hieraus zusammengesetzten Aggregate zeigen im Fall von 10 nm großen Partikeln erst bei typischerweise 10^4 verbundenen Partikeln die hier beobachtete, deutliche Resonanzverschiebung (siehe auch Kapitel 6.2 oder Ref. [112]). Hieraus ergibt sich eine Aggregatkonzentration von etwa 100 fM, was einem mittleren Aggregat-Abstand von $d_{AA} = 25 \mu\text{m}$ entspricht. Für die Zeit, nach der sich die Wärmefelder überlappen, erhält man somit $\tau_{AA} = 6 \text{ ms}$. Für Heizphasen, die länger als τ_{AA} dauern, heizen sich die Nanopartikel-Aggregate auch über die großen Abstände gegenseitig auf, so dass es zu einer globalen Erwärmung der Flüssigkeit kommt. Die Pulse mit Spitzenleistungsdichte I_0 und einer Pulsdauer

von 1 ms reichen im obigen Experiment nicht aus, um eine ausreichend hohe globale Erwärmung zu erzeugen, um DNA-Schmelzen zu induzieren. Je länger jedoch der Laserpuls andauert, umso wärmer wird die gesamte Flüssigkeit. Bei anhaltender Einstrahlung von I_0 kommt es daher zum Wärmetransfer zwischen den Aggregaten und somit zur Akkumulation von Wärme, die nun ausreicht, um die DNA zu schmelzen. Es gibt jedoch auch Grenzen für diese globale Erwärmung. Nimmt man typische Ausmaße L des geheizten Volumens von ca. 1 mm an, begrenzt durch Küvettenwände und Laserstrahl-Durchmesser im Fokus, so ist die typische Zeitkonstante, um das globale thermische Gleichgewicht zu erreichen $\tau_{global} = L^2/D = 10$ s. Eine länger anhaltende Einstrahlung als τ_{global} erhöht also die Temperatur im laserbestrahlten Volumen nicht mehr, da die Wärme nach außen hin abfließt.

Betrachtet man also zusammenfassend die Temperatur eines Nanopartikel-Aggregates von etwa 1 μm Radius, nachdem ein kontinuierlicher Laser zum Zeitpunkt $t = 0$ angeschaltet wird, beobachtet man Folgendes: In den ersten Mikrosekunden erzeugt der Laser nur eine lokale Erwärmung im Aggregat und in dessen nächster Umgebung. In der folgenden Zeit ändert sich die Temperatur kaum, bis nach $\tau_{AA} = 6$ ms das Wärmefeld des Nachbar-Aggregates beginnt, das betrachtete Aggregat zusätzlich aufzuheizen. Hierdurch kommt es in der Zeit zwischen τ_{AA} und τ_{global} zu einer globalen Erwärmung des gesamten laserbestrahlten Volumens. Erst nach τ_{global} gibt das gesamte System Wärme an die Umgebung außerhalb des bestrahlten Volumens ab und somit erwärmt sich das System nicht weiter.[107]

Die Länge des Pulses bestimmt, ob nur lokale Heizeffekte in der direkten Nanopartikel-Umgebung wirken, oder ob globale Heizeffekte hinzukommen und eine homogene Temperaturverteilung im aktiv geheizten Volumen vorliegen. Durch eine geeignete Wahl der Pulslänge kann somit eingestellt werden, dass eine hohe lokale Temperatur am Partikel erreicht wird und dennoch die insgesamt im System deponierte Wärmemenge minimiert wird. Diese Tatsache wird in Kapitel 5 ausgenutzt werden, um DNA lokal innerhalb der Nanopartikel-Aggregate zu heizen und zu schmelzen.

Durch die vorhergehenden Experimente ist sichergestellt und durch die Arbeit von Koblinski et al. [107] theoretisch bestätigt, dass optothermisches Heizen durch kontinuierliche Laserbestrahlung nicht zu lokaler, sondern zu globaler Erwärmung der Probe führt. Die Leistungsdichte, die für optisch induziertes DNA-Schmelzen nötig ist, beträgt im eben gezeigten Experiment 12 W/mm^2 . Ob bei dieser Leistungsdichte des Lasers tatsächlich die Schmelztemperatur der DNA überschritten wird, wird mit Hilfe einer einfachen numerischen Simulation überprüft.

Die gegebenen experimentellen Bedingungen wurden als dreidimensionales, thermodynamisches Modell in einer finite Elemente Simulation dargestellt. Die simulierte Wärmequelle entspricht dem Volumen, das ein Laser mit Gauß-förmigem Strahlprofil und konstanter Halbwertsbreite von $125 \mu\text{m}$ beim Durchgang durch die wassergefüllte Küvette mit 2 mm optischem Pfad bestrahlt. Die eingestrahelte Wärme wird obigen Ergebnissen folgend homogen auf das bestrahlte Volumen verteilt. Die Wärmemenge bestimmt sich aus der Laserleistungsdichte und der Annahme, dass die Absorption bei der Laserwellenlänge 50% der gemessenen Extinktion beträgt. Dies ist ein typischer Literatur-Wert für vergleichbare Aggregate (vgl. auch Modellrechnung in Kapitel 6.2).[112]

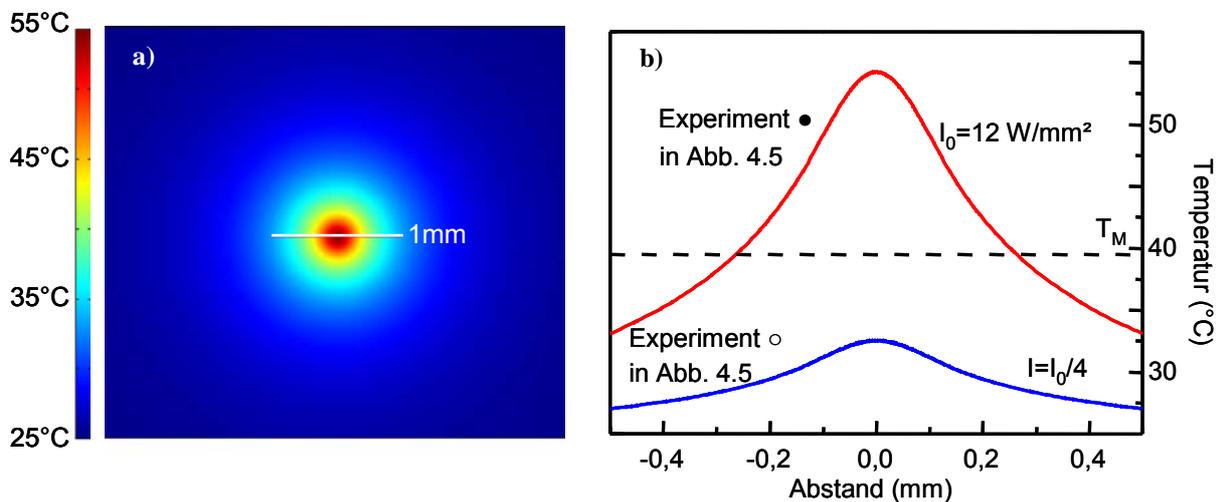


Abbildung 4.6: Finite Elemente Simulation der optothermischen globalen Erwärmung im Laser-bestrahlten Volumen. **a)** Bei $I_0 = 12 \text{ W/mm}^2$ wird im Zentrum des bestrahlten Volumens mit Gauß-förmigem Querschnitt und einer Halbwertsbreite von $125 \mu\text{m}$ eine Temperatur von $54 \text{ }^\circ\text{C}$ erzielt. Das Temperaturprofil im weiß dargestellten Schnitt durch das Zentrum ist in **b)** dargestellt. Die Überschreitung der Schmelztemperatur bei Einstrahlung von I_0 sowie die Unterschreitung bei $I_0/4$ bestätigen die experimentellen Befunde.

Das Ergebnis der Simulation ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Simulation des Szenarios mit Leistungsdichte = 12 W/mm^2 , das im Experiment zu DNA-Schmelzen führte, zeigt eine optothermisch induzierte Endtemperatur von $54 \text{ }^\circ\text{C}$. Dies liegt über der gemessenen Schmelztemperatur von $39,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Simulation des Experimentes mit $I = I_0/4$ ergibt hingegen $33 \text{ }^\circ\text{C}$ als höchste, erreichte Temperatur. Dies liegt unter der Schmelztemperatur und stimmt somit mit dem experimentellen Befund überein.

Die Übereinstimmung simulierter Temperaturen mit den Ergebnissen optischer Experimente zeigt, dass durch kontinuierliche Laserbestrahlung optothermisches Heizen und Schmelzen von DNA in Gold-Nanopartikel-Aggregaten möglich ist. Es handelt sich hierbei um einen kontrollierten, reversiblen Prozess, und nicht etwa um das irreversible Lösen der Thiolbindung von der Partikeloberfläche. Diese Auflösung der kovalenten Thiolbindung wurde von Jain et al. nach Bestrahlung mit Femtosekunden-Laserpulsen beobachtet, wurde jedoch nicht auf thermische Effekte zurückgeführt, sondern auf den erhöhten Druck der heißen Elektronen (vgl. auch 2.3.2).[178] Dort wurde zum Nachweis der gelösten Thiolbindung neben Anrege-Abfrage-Experimenten auch die Tatsache genutzt, dass durch das Aufbrechen der Thiolbindung die stabilisierenden DNA-Moleküle von der Goldoberfläche entfernt werden. Dies hat eine irreversible und unspezifische Aggregation der nun ungeschützten Nanopartikel zur Folge (siehe auch 2.2). Die dort eingesetzten Leistungsdichten sind jedoch acht Größenordnungen höher als die in Abbildung 4.6 verwendete Leistungsdichte. In unserem Fall des reversiblen, optothermischen DNA-Schmelzens durch kontinuierliche Laserbestrahlung wird keine unspezifische Aggregation beobachtet. Nach Beendigung der Laserbestrahlung formen sich die Aggregate zurück und zeigen bei erneuter, langsamer Temperaturerhöhung eine definierte klassische Schmelzkurve. Dies gilt auch für die Experimente mit Nanosekunden-Pulsen in den Kapiteln 5 bis 7. Die dort verwendeten Leistungsdichten liegen im Maximum noch immer fünf bis sechs Größenordnungen unter den Leistungsdichten, die in Ref. [178] zum irreversiblen Ablösen der Thiolbindung führt.

Auf die Reversibilität des Zykluses aus optothermischem Schmelzen und Rehybridisierung konzentriert sich auch eine kürzlich publizierte Arbeit von Reismann et al.. [214] Hier werden ähnliche Experimente mit DNA-gebundenen Gold-Nanopartikel-Aggregaten gezeigt, die durch kontinuierliche Laserbestrahlung zum optothermischen Schmelzen der DNA führten. Sie bestätigen die hier gefundenen Ergebnisse und zeigen laserinduziertes

DNA-Schmelzen bei vergleichbaren Laserleistungsdichten. Durch lokale, elektronische Temperaturmessungen im laserbestrahlten Volumen zeigen Reismann et al. eine vergleichbare, globale Temperaturerhöhung, wie die in Abbildung 4.6 numerisch bestimmte. Durch kontinuierliche Bestrahlung von Gold-Nanopartikel-Aggregaten wird qualitativ das gleiche Resultat erzielt, wie in Experimenten, die die hohe Infrarot-Absorption von Wasser zum optothermischen Heizen nutzen. Die Wärme wird hierbei ebenfalls homogen auf das laserbestrahlte Volumen verteilt und auch hierdurch kann optothermisches DNA-Schmelzen induziert werden. [215, 216]

5 DNA-Schmelzen durch lokales optothermisches Heizen

In Kapitel 4 ist gezeigt worden, dass DNA in Nanopartikel-Aggregaten durch Wärme geschmolzen werden kann, die von Gold-Nanopartikeln durch optothermische Umwandlung von Licht im sichtbaren Spektralbereich erzeugt worden ist. Die kontinuierliche Bestrahlung hat hier den Wärmetransfer von den Nanopartikel-Aggregaten in die Umgebung ermöglicht. Hierdurch ist es zur homogenen Erwärmung des gesamten bestrahlten Volumens zwischen den Nanopartikel-Aggregaten gekommen.

In diesem Kapitel wird durch die Verwendung von Laserpulsen, deren Dauer kürzer ist als die typische Wärmediffusionszeit zwischen benachbarten Aggregaten, eine Beschränkung der Erwärmung auf die direkte Umgebung der Aggregate erreicht. Spektral aufgelöste, zeitintegrierte Messungen zeigen in 5.1 dass durch Pulse mit einer Dauer von ~ 100 ns lokales Heizen von Gold-Nanopartikel-Aggregaten erreicht werden kann, das zum Schmelzen der DNA in den Aggregaten führt. In 5.2 wird mit Hilfe zeitaufgelöster Messungen der Extinktionsänderung nach einzelnen Nanosekunden-Pulsen das Aufheiz- und Abkühlverhalten der Nanopartikel-Aggregate ermittelt. Durch gepulstes, optisches Heizen und kontinuierliche optische Abfrage der Extinktion kann auch die Auflösung des Aggregat-Verbandes durch DNA-Schmelzen und der Diffusions-Prozess der freigesetzten Einzelpartikel beobachtet werden.

In Abschnitt 5.2.1 wird gezeigt, dass aus einer Sequenz von Einzelpulsen mit unterschiedlicher Leistungsdichte eine „optothermische Schmelzkurve“ der DNA erstellt werden kann. Diese wird mit der „klassischen Schmelzkurve“ aus 2.3.3 verglichen.

Nachdem der plasmonische Ursprung der beobachteten, optisch induzierten Extinktionsänderung in 5.2.2 geklärt wird, erfolgt in 5.2.3 eine detaillierte Untersuchung der Aufheiz- und Abkühlodynamik der lasergeheizten Aggregate.

5.1 Spektroskopie an lokal geheizten DNA-gebundenen Nanopartikel-Aggregaten

Werden Gold-Nanopartikel durch DNA-Doppelstränge miteinander zu Aggregaten verbunden, so kann im Extinktionsspektrum der Nanopartikel eine Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz beobachtet werden (siehe auch 2.3.3). Die Umkehrung dieser spektralen Veränderung, d.h. Blauverschiebung und Breitenreduktion der Plasmonresonanz, wurde bei der Bestimmung der Schmelztemperatur durch schrittweises, langsames Erhöhen der Badtemperatur in 4.1 als Indikator für das Schmelzen der DNA und die resultierende Dissoziation der Nanopartikel-Aggregate genutzt. Auch bei der optothermischen, globalen Erwärmung durch kontinuierliche Laserbestrahlung in Kapitel 4, wurde diese markante Veränderung der Extinktion beobachtet und diente dort indirekt als Indikator für die erreichte Temperaturerhöhung im bestrahlten Volumen.

Das nachfolgende Experiment nutzt die gleiche Methode wie in 4.2, um zwischen lokalem und globalem Heizen durch Laserbestrahlung zu unterscheiden. Als Quelle für die induzierte Wärme dient nun ein frequenzverdoppelter Nd-YLF-Festkörperlaser, der Laserpulse mit einer Dauer von 300 ns bei einer Wellenlänge von 527 nm liefert. Die beobachteten Nanopartikel-Aggregate sind die in 4.2 untersuchten Aggregate aus 10 nm-Partikeln, die in Head-to-Tail-Konfiguration durch DNA verbunden sind. Erneut wird das Extinktionsspektrum vor und nach 6minütiger Laserbestrahlung aufgezeichnet und verglichen. Die Badtemperatur von 25 °C liegt wie in 4.2 weit unter der DNA-Schmelztemperatur von 39,5 °C.

Die Änderung der Extinktion durch gepulste Laserbestrahlung ist in Abbildung 5.1 zu sehen. Bei einer Repetitionsrate von 250 Hz und einer Leistungsdichte, die im zeitlichen

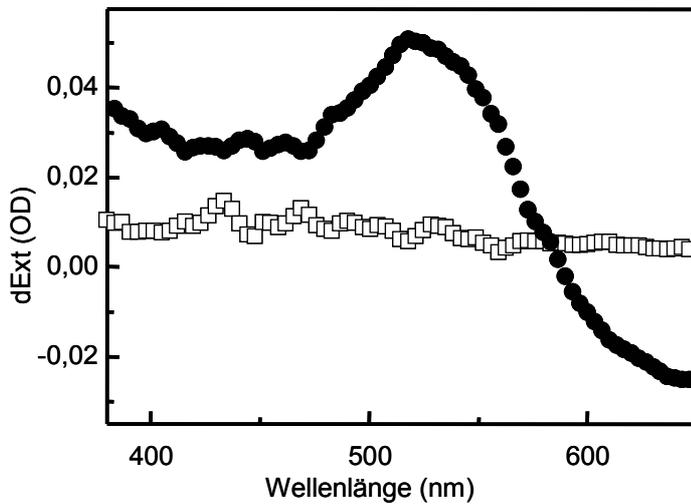


Abbildung 5.1: Extinktionsänderung DNA-gebundener Gold-Nanopartikel-Aggregate durch Bestrahlung mit Laserpulsen von 300 ns Dauer. Die Bestrahlung mit $I_{Puls} = 9,3 \text{ kW/mm}^2$ bei einer Repetitionsrate von 250 Hz (●) führt zu einer deutlichen Änderung der Extinktion, die einer spektralen Blauverschiebung und somit Laser-induziertem DNA-Schmelzen entspricht. Bei Reduktion auf $I_{Puls}/4$ wird trotz 4facher Repetitionsrate keine signifikante Extinktionsänderung beobachtet (□). Dieses Verhalten beweist lokales Heizen.

Mittel $0,7 \text{ W/mm}^2$ beträgt, ist die markante Extinktionsänderung zu beobachten, die einer Blauverschiebung und einer Breitenreduktion der Plasmonresonanz entspricht. Dies wurde schon in Kapitel 4.2 als Indikator für Aggregats-Dissoziation als Folge geschmolzener DNA genutzt. Auch unter den hier gegebenen Bedingungen wurde die DNA folglich über ihren Schmelzpunkt hinaus erhitzt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen kontinuierlicher Laserbestrahlung aus 4.2 zeigt jedoch, dass die im zeitlichen Mittel eingestrahelte Leistungsdichte im Fall gepulster Anregung um mehr als eine Größenordnung reduziert ist. Die in Abbildung 5.1 beobachtete Extinktionsänderung kann somit nicht auf globales Heizen zurückgeführt werden, da hierfür die im zeitlichen Mittel eingestrahelte Energie nicht ausreicht. Es handelt sich somit um eine lokale Erhöhung der Temperatur in den Aggregaten und deren nächster Umgebung. Diese reicht aus, um die Schmelztemperatur der DNA zu übersteigen. Die typische Zeitkonstante τ , um den Gleichgewichtszustand des Temperaturprofils um die Aggregate zu erreichen, wurde in 4.2 auf $5 \mu\text{s}$ abgeschätzt. Da die Pulsdauer und somit die Heizdauer mit 300 ns kürzer ist als τ , bleibt keine Zeit, um Wärme an die globale Umgebung abzugeben. Die Temperaturerhöhung bleibt also auf das geringe Volumen in den Aggregaten und deren direkter Umgebung beschränkt. Dieses, im Vergleich zum globalen Heizen deutlich kleinere Volumen kann mit deutlich weniger Energie aufgeheizt werden. Somit reduziert sich die geforderte, im zeitlichen Mittel eingestrahelte Leistungsdichte.

Da die Pulsdauer von 300 ns deutlich kürzer ist als $\tau_{AA} = 6 \text{ ms}$, fehlt der kontinuierliche Wärmetransfer zwischen benachbarten Aggregaten und es findet somit keine gegenseitige Erwärmung statt. Dies muss dadurch ausgeglichen werden, dass jedes einzelne Ag-

gregat einen größeren Beitrag zur eigenen Erwärmung leistet, also mehr Licht absorbiert und in Wärme umwandelt. Die maximale Leistungsdichte während der Pulse in Abbildung 5.1 beträgt $I_{Puls} = 9,3 \text{ kW/mm}^2$. Verglichen mit den Experimenten mit kontinuierlicher Laserbestrahlung in 4.2 ist dies eine um drei Größenordnungen erhöhte Leistungsdichte. Erst durch diese deutlich erhöhte Leistungsdichte während der Pulse kann die lokale Temperatur über die Schmelztemperatur der DNA erhöht werden. Reduziert man I_{Puls} auf $2,3 \text{ kW/mm}^2$, so wird kein DNA-Schmelzen beobachtet. Die Reduktion von I_{Puls} kann hierbei nicht durch Erhöhung der Puls-Repetitionsrate kompensiert werden, obwohl hierdurch die im zeitlichen Mittel eingebrachte Leistungsdichte I unverändert bleibt (vgl. Abbildung 5.1). Das Schmelzverhalten, und somit die optisch induzierte Temperaturerhöhung hängt im Fall gepulster Bestrahlung also nicht von I , sondern nur von I_{Puls} ab. Dies ist ein weiterer Beweis für laserinduziertes, lokales Heizen als Folge gepulster Anregung.

Durch spektrale Auflösung der laserinduzierten Extinktionsänderung kann diese eindeutig der Dissoziation der Nanopartikel-Aggregate und somit dem Schmelzen der DNA zugewiesen werden. Das Experiment beweist somit, dass die DNA im Inneren der Aggregate auch mit Laserpulsen von 300 ns Dauer derart aufgeheizt werden kann, dass sie schmilzt. Die deutliche Reduzierung der im zeitlichen Mittel eingestrahlten Leistung gegenüber kontinuierlicher Bestrahlung zeigt, dass lediglich ein kleines Volumen um die Aggregate herum aufgeheizt wird. Die Temperatur im Großteil des Zwischenraumes zwischen benachbarten Aggregaten bleibt nahezu unverändert.

Aus Abbildung 5.1 wird ersichtlich, dass sich die Extinktion das durch Schmelzen der DNA und der hieraus resultierender Auflösung der Aggregate über nahezu den ganzen sichtbaren Spektralbereich ändert. In den folgenden Kapiteln wird auf die spektrale Auflösung der Extinktionsänderung zugunsten der zeitlichen Auflösung verzichtet. Lediglich in Kapitel 5.2.2 wird die eindeutige Korrelation zwischen spektral aufgelösten und zeitlich aufgelösten Messungen durch zwei-Farben-Messungen bestätigt. Ansonsten beschränken sich die Messungen im Folgenden auf die Extinktionsänderung im roten Spektralbereich. Hierdurch wird eine zeitliche Auflösung der Aufheiz- und Abkühlprozesse in Lasergeheizten Nanopartikel-Aggregaten ermöglicht, sowie die direkte Beobachtung der Diffusion der aus den Aggregaten freigesetzten Einzelpartikel.

5.2 Zeitaufgelöste Messungen an lasergeheizten Gold-Nanopartikel-Aggregaten

In den Kapiteln 4 und 5.1 wurde bereits durch spektroskopische Untersuchung der optischen Extinktion von laserbestrahlten Gold-Nanopartikel-Aggregaten gezeigt, dass diese sowohl durch kontinuierliche, als auch durch gepulste Laserbestrahlung derart aufgeheizt werden können, dass die DNA im Inneren der Aggregate schmilzt. Als Folge des optothermischen Schmelzens löst sich die Bindung zwischen den Nanopartikeln und somit der Aggregats-Verbund auf und die Nanopartikel liegen schließlich im gelösten Zustand vor. In diesem Kapitel werden durch zeitaufgelöste Extinktionsmessungen die Prozesse aufgelöst, die als Folge der Laserbestrahlung in den Aggregaten ausgelöst werden.

Sowohl die Nanopartikel-internen Aufheizvorgänge auf der Femtosekunden- bis Pikosekunden- Zeitskala, als auch die Abkühlung einzelner Nanopartikel auf der Nanosekunden- Zeitskala können durch Anrege-Abfrage-Experimente untersucht werden, die auf dem Prinzip von Verzögerungsstrecken beruhen. [30, 65, 70] Hierbei trifft der Abfragepuls aufgrund der endlichen Lichtgeschwindigkeit nach Durchlaufen einer Verzögerungsstrecke zeitlich versetzt zum Anregepuls auf der Probe auf und misst dort die Änderung, die durch den Anregepuls kurz zuvor induziert wurde. Da Verzögerungsstrecken mit vertretbarem experimentellem Aufwand und ausreichender Genauigkeit jedoch nur wenige Meter lang sein können, ist die hierdurch erreichbare Verzögerung auf wenige Nanosekunden beschränkt. Bei den hier verwendeten Pulslängen von ~ 100 ns kann diese Methode somit nicht zum Einsatz kommen, zudem allein der Abkühlvorgang der untersuchten Aggregate auf der Mikrosekunden-Zeitskala erwartet wird (siehe Diskussion in 4.2). Alternativ zur Konfiguration gepulster Anregung und gepulster Abfrage ist für den zu untersuchenden Zeitbereich eine Konfiguration gepulster Anregung und kontinuierlicher Abfrage möglich. Änderungen transmittierter Lichtintensität können mit schnellen Photodioden und einem geeigneten Oszilloskop mit Zeitauflösungen von wenigen Nanosekunden direkt elektronisch detektiert werden. Der hierfür entwickelte Messaufbau ist in Kapitel 3.3 detailliert beschrieben.

Für die folgenden, zeitaufgelösten Untersuchungen kam das in Abbildung 5.2 a) dargestellte DNA-Gold-Hybridssystem in Tail-to-Tail-Konfiguration zum Einsatz. Wie aus der klassischen Schmelzkurve in Abbildung 5.2 c) erkennbar, hat das System in dieser

Konfiguration eine Schmelztemperatur von 54 °C. Aufgrund der geänderten Konfiguration der Nanopartikel liegt dies trotz identischer Erkennungssequenz 14,5 °C über der Schmelztemperatur, die in 4.1 für die Head-to-Tail-Konfiguration gemessen wurde [Jin]. Hierdurch bleibt in den folgenden Experimenten mehr experimenteller Spielraum zur Variation der Badtemperatur. Hinzu kommt, dass der Abstand in dieser Konfiguration genauer definiert ist und somit spätere Modellrechnungen erleichtert werden. In der klassischen Schmelzkurve in Abbildung 5.2 c) ist eine deutliche Zunahme der Extinktion erkennbar, bevor die Schmelztemperatur erreicht wird. Dies weist auf eine ausgeprägte Ostwald-Reifung hin, durch die in 5.2.1 gezielt die Größe der gebildeten Aggregate variiert werden kann. Die Tail-to-Tail-Konfiguration wird erreicht durch eine Gold-Charge mit 5'-thiolmodifizierter DNA und einer zweiten Charge mit 3'-thiolmodifizierter DNA. Zusätzlich wurden jeweils 15 Abstandshalter-Sequenzen zwischen Thiol und Erkennungssequenz eingesetzt, um eine bessere Hybridisierungseffizienz zu erlangen. Nach mehreren Stunden Hybridisierung befindet sich das System im aggregierten Zustand, deutlich gekennzeichnet durch die verbreiterte und rotverschobene Plasmonresonanz.

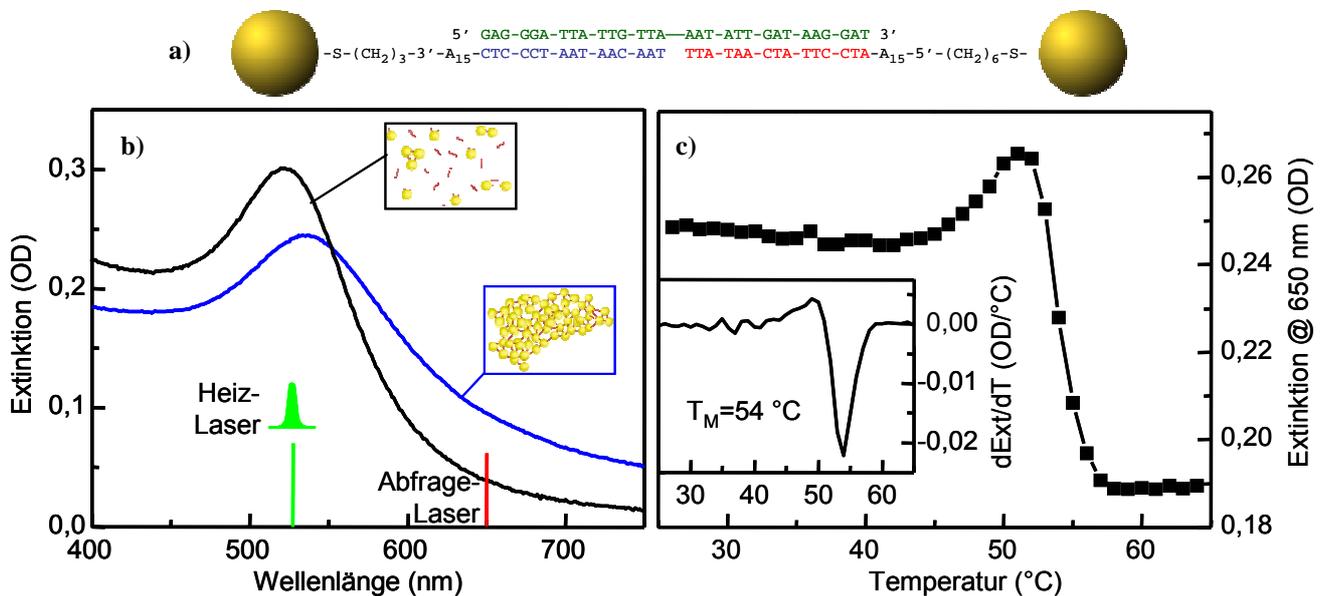


Abbildung 5.2: a) Tail-to-Tail-Konfiguration der DNA-gebundenen Gold-Nanopartikel (nicht maßstabgetreu). b) Bei der Wellenlänge des Abfragelasers von 650 nm ist die Extinktion von Aggregaten bei 20 °C (blau) höher als die der gelösten Nanopartikel bei 60 °C (schwarz). Der Anregelaser hat eine Wellenlänge von 527 nm und nutzt somit die hohe Absorption im Spektralbereich der Plasmonresonanz. c) Bei der Schmelztemperatur von 54 °C nimmt die Extinktion bei 650 nm rasch ab. Etwas unterhalb dieser Temperatur nimmt die Extinktion zu, ein deutliches Zeichen für Aggregatswachstum durch Ostwaldreifung.

nanz im Extinktionsspektrum (vgl. Abbildung 5.2 b)). Mit Hilfe eines kontinuierlichen Diodenlasers mit einer Wellenlänge von 650 nm wird nun die Extinktionsänderung im roten Spektralbereich beobachtet, die durch den gepulsten Heizlaser verursacht wird.

Abbildung 5.3 a) zeigt die Transiente der relativen Extinktionsänderung $\Delta\text{Ext}/\text{Ext}$ bei einer Badtemperatur von 25°C und einer Leistungsdichte $I_{\text{Puls}} = 2,4 \text{ kW/mm}^2$. Unmittelbar nach dem Laserpuls kann eine schnelle Abnahme der Extinktion beobachtet werden. Diese wird einer optothermisch induzierten Änderung der Dielektrizitätsfunktion der Gold-Nanopartikel[30], des Wassers und der DNA zugewiesen. Auch eine thermisch induzierte Ausdehnung der Aggregate und eine vorübergehende Zunahme der Nanopartikel-Abstände sind als Ursache für diese Extinktionsabnahme möglich.

Die Extinktion geht innerhalb weniger Mikrosekunden wieder vollständig auf den ursprünglichen Wert zurück und bleibt auch auf der Millisekunden-Zeitskala unverändert (Abbildung 5.3 b)). Der Rückgang der Extinktion folgt in den ersten 20 μs einer Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstante von $5,7 \pm 0,2 \mu\text{s}$. Auf längerer Zeitskala bis 250 μs kann der Rückgang der Extinktion auf den ursprünglichen Wert nur mit einer gestreckten Exponentialfunktion mit einem Streckungsexponenten von 0,5 beschrieben werden. Die Zeitkonstante für den Rückgang der Extinktionsänderung stimmt sehr gut mit der in 4.2 abgeschätzten Zeitkonstante $\tau = 5 \mu\text{s}$ überein. τ gibt die Zeit an, die für das Erreichen des Gleichgewichtes des Temperaturprofils um ein lokal geheiztes Aggregat erforderlich ist, und ist somit auch die typische Abkühlzeit des betrachteten Aggregates. Die beobachtete, kurzzeitige Abnahme der Extinktion auf der Mikrosekunden-Zeitskala wird somit der kurzzeitigen, lokalen Erwärmung der Aggregate zugeordnet. Die Abnahme der Extinktion entspricht hierbei dem Aufheizprozess und die Wiederherstellung der Extinktion dem Abkühlprozess. Dies erklärt auch, dass das Abklingverhalten der Extinktionsänderung einer gestreckten Exponentialfunktion folgt. Die treibende Ursache für den Wärmetransfer vom Aggregat an die Umgebung und somit für die Abkühlung eines Aggregates ist der Temperaturgradient zwischen lokal geheiztem Aggregat und dessen kalter Umgebung. Mit fortschreitender Zeit verursacht der Wärmetransfer einen zunehmenden Ausgleich der Temperaturen im Aggregat und in der Umgebung. Der Temperaturgradient nimmt hierdurch ab und somit auch die treibende Ursache für den Wärmetransfer.

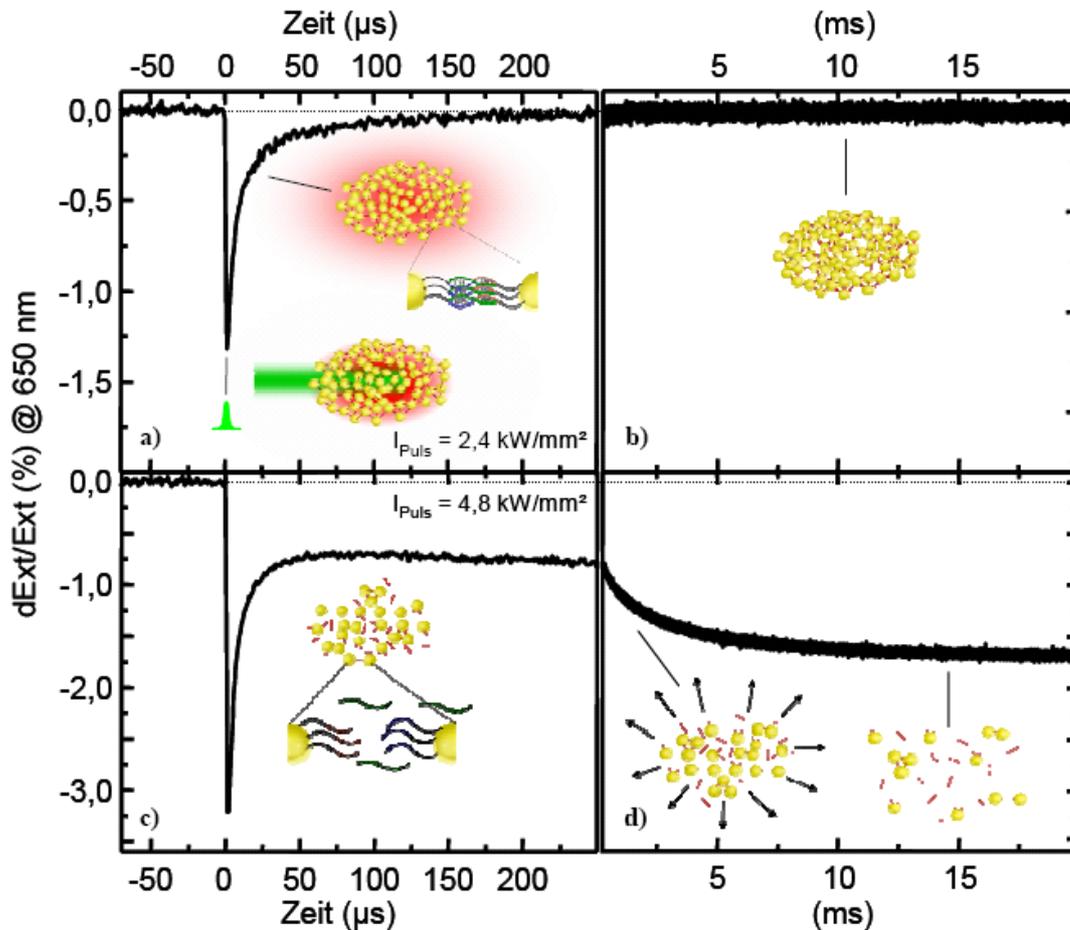


Abbildung 5.3: a) Die relative Extinktionsänderung bei 650 nm zeigt nach einem Laserpuls mit niedriger Leistungsdichte ($I_{Puls} = 2,4 \text{ kW/mm}^2$) eine rapide Abnahme der Extinktion und einen Rückgang dieses Signals innerhalb weniger Mikrosekunden. Dieses Verhalten wird der Aufheizung der Aggregate während des Laserpulses und dem darauf folgenden Abkühlen der Aggregate zugeschrieben. b) Nach der Abkühlung zeigt sich keine lang anhaltende Veränderung der Extinktion. c) Bei $I_{Puls} = 4,8 \text{ kW/mm}^2$ ist eine größere Amplitude des raschen Extinktionsabfalles zu beobachten, da die Temperatur in den Aggregaten aufgrund der höheren eingestrahelten Leistungsdichte höher ist. Die erreichte Temperatur reicht nun aus, um die DNA in den Aggregaten zu schmelzen. Als Folge bleibt die Extinktion auch nach der Abkühlphase auf einem herabgesetzten Niveau. d) Mit zunehmender Zeit nimmt die Extinktion sogar noch weiter ab, da die ungebundenen Nanopartikel nun auseinander diffundieren. Alle Daten in a) – d) wurden über 20 Einzelpulse gemittelt, um das Rauschen zu reduzieren.

Die Abkühlung der Aggregate wird folglich mit zunehmender Zeit immer langsamer und folgt darum einer gestreckten Exponentialfunktion. Auch bei der Abkühlung einzelner Gold-Nanopartikel folgt die Temperatur einer gestreckten Exponentialfunktion. [69] Detailliertere Untersuchungen der Aufheiz- und Abkühlprozesse und des plasmonischen Ursprungs der Extinktionsänderung werden in 5.2.2 und 5.2.3 folgen.

Erhöht man die eingestrahlte Leistungsdichte auf $I_{Puls} = 4,8 \text{ kW/mm}^2$, so erhöht sich auch die Amplitude der scharfen Extinktionsabnahme während des Pulses (Abbildung 5.3 c)). Dies ist konsistent mit der Interpretation, dass die kurzzeitige, scharfe Extinktionsabnahme auf die Erwärmung der Partikel zurückzuführen ist, denn nach (2.20) und (2.25) bedeutet eine höhere eingestrahlte Leistungsdichte eine höhere Temperatur im Aggregat und somit eine größere Amplitude der kurzzeitigen Extinktionsabnahme. Dieser Zusammenhang wird in 5.2.2 im Detail untersucht werden.

Die Zeitkonstante für die Abkühlung bleibt in den ersten 20 μs mit $5,1 \pm 0,1 \mu\text{s}$ im Vergleich zum vorherigen Experiment nahezu unverändert, da sich die Aggregatsgröße nicht geändert hat. Im Gegensatz zur Einstrahlung von $I_{Puls} = 2,4 \text{ kW/mm}^2$ geht das $\Delta\text{Ext}/\text{Ext}$ -Signal nun nicht mehr auf den ursprünglichen Wert zurück. Im weiteren Verlauf nimmt die Extinktion auf der Millisekunden-Zeitskala sogar weiter ab und geht schließlich nach einigen Millisekunden in Sättigung über (Abbildung 5.3 d)). In der Folge ändert sich die Extinktion kaum noch, so dass sie sich selbst nach mehreren Sekunden noch auf einem deutlich niedrigeren Niveau befindet als vor dem Puls (vgl. Abbildung 5.4). Die Erklärung für diese langfristige Abnahme der Extinktion ist die folgende:

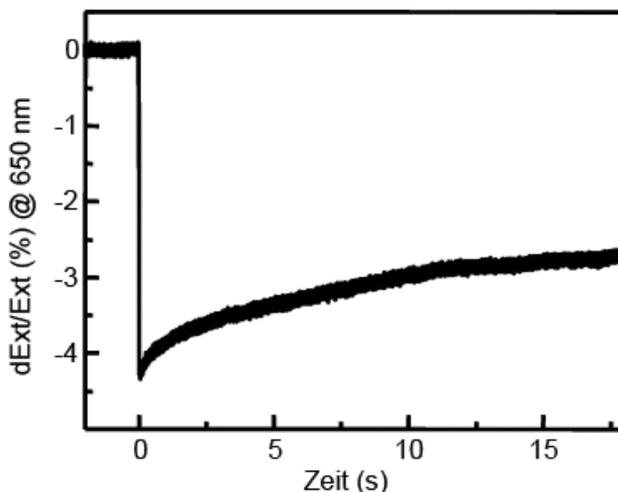


Abbildung 5.4: Die langfristige Extinktionsabnahme, die durch laserinduziertes DNA-Schmelzen und anschließende Auflösung des Aggregat-Verbandes verursacht wird, hält über mehrere Sekunden an. Erst durch Diffusion oder Konvektion ungeschmolzener Aggregate in das Abfrage-Volumen nimmt die Extinktion langsam wieder zu.

Aufgrund der Größe der Aggregate findet die Abkühlung trotz eines deutlich kürzeren Pulses innerhalb einiger Mikrosekunden statt. Die Wärme, die für einige Mikrosekunden im Aggregat herrscht, reicht aus, um die DNA zu schmelzen. Hierdurch werden die Verbindungen zwischen den Nanopartikeln gelöst und die Nanopartikel diffundieren nun auf der Millisekunden-Zeitskala auseinander. Die gemessene langfristige Abnahme der Extinktion ist eine Folge des zunehmenden Partikelabstandes. Dieser führt letzten Endes auch in der klassischen Schmelzkurve in Abbildung 5.2 c) zur Abnahme der Extinktion im untersuchten Spektralbereich. Nach etwa 10 ms ändert sich die Extinktion nicht mehr, da die Nanopartikel nun einen ausreichend großen Abstand zueinander haben, dass sich eine weitere Entfernung der Nanopartikel nicht mehr auf die Plasmonenkopplung und somit nicht mehr auf die Extinktion auswirken. Eine erneute Aggregats-Bildung dauert Minuten bis Stunden, so dass ein Rückgang der Extinktion auf den ursprünglichen Wert durch Reaggregation ausgeschlossen werden kann. Dies erklärt, warum das Signal wie in Abbildung 5.4 dargestellt, über mehrere Sekunden anhält. Erst die Diffusion oder Konvektion neuer, unbestrahlter Aggregate in das Abfrage-Volumen führt zur Wiederherstellung des ursprünglichen Extinktionsniveaus. Aufgrund dieser Langlebigkeit der Extinktionsänderung wurden die Transienten in Abbildung 5.3 im Einzelpuls-Verfahren aufgenommen. Nach jeder einzelnen Messung wurde die Küvette aufgeschüttelt, um für den nächsten Laserpuls neue, unbeeinflusste Aggregate im Abfrage-Volumen zu haben. Zur Reduktion des Rauschens wurde in Abbildung 5.3 jeweils über 20 Einzelmessungen gemittelt.

Während das Verhalten der Extinktionsänderung auf der Mikrosekunden- Zeitskala für schwache und starke Pulse sehr ähnlich ist, tritt eine langfristige Änderung der Extinktion nur auf, wenn der Heizpuls ausreichend intensiv war, um eine für DNA-Schmelzen ausreichend hohe Temperatur zu erzeugen. Ab welcher Laserleistungsdichte es zum Schmelzen der DNA kommt, wird im folgenden Kapitel durch systematische Erhöhung der eingestrahlten Leistungsdichte untersucht.

5.2.1 Die optothermische Schmelzkurve

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass es bei einer Leistungsdichte des Anregelasers von $I_{Puls} = 4,8 \text{ kW/mm}^2$ zu Auflösen der Aggregate durch optothermisches DNA-Schmelzen kommt. Indikator hierfür ist eine lang anhaltende Abnahme der Extinktion, die nach einigen ms ihren Sättigungswert erreicht hat. Um zu untersuchen, ab welcher Leistungsdichte dieses Phänomen beobachtet werden kann, wird diese lang anhaltende Extinktionsänderung bei schrittweise steigender Leistungsdichte aufgezeichnet. Die erhaltene Kurve wird im Folgenden „optothermische Schmelzkurve“ genannt. In Abbildung 5.5 ist die Änderung der Extinktion 20 ms nach dem Heizpuls für unterschiedliche Leistungsdichten bei einer Badtemperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgetragen. Jeder Messpunkt entspricht einem einzelnen Laserpuls. Hier sei darauf hingewiesen, dass pro Laserpuls weniger als 1% des gesamten Reservoirs an Aggregaten in der Lösung bestrahlt wird. Nach jedem Puls wird das angeregte und abgefragte Volumen durch Verschieben oder Schütteln der Küvette erneuert. In der optothermischen Schmelzkurve in Abbildung 5.5 kann ein klares Schwellenverhalten beobachtet werden. Unterhalb von $I_{Puls} = 3 \text{ kW/mm}^2$ ist trotz zunehmender Leistungsdichte keine lang anhaltende Extinktionsänderung zu beobachten, da die induzierte Temperaturerhöhung nicht ausreicht, um die DNA zu schmelzen. Bei der Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle} = 3,6 \text{ kW/mm}^2$ kommt es zu einem Übergang in einen zweiten Leistungsbereich, in dem die Amplitude der Extinktionsabnahme linear mit zunehmender Leistungsdichte wächst. $I_{Schwelle}$ wird hierbei

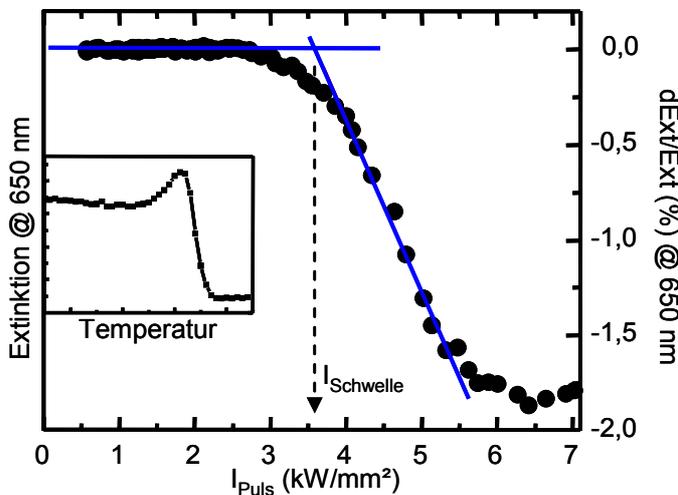


Abbildung 5.5: Die „optothermische Schmelzkurve“ zeigt die Extinktionsänderung 20 ms nach dem Laserpuls bei schrittweise steigender Leistungsdichte. Jeder Messpunkt entspricht dem Ergebnis einer Einzelpuls-Messung. Die Abnahme der Extinktion zeigt optothermisches DNA-Schmelzen, wenn die Schwellenleistungsdichte $I_{Schwelle}$ überschritten ist. Die Kurve zeigt große Ähnlichkeit zur klassischen Schmelzkurve (Einfügung).

aus dem Schnittpunkt zweier Ausgleichsgeraden zu den jeweiligen Leistungsbereichen bestimmt (vgl. Abbildung 5.5) Ab etwa $5,5 \text{ kW/mm}^2$ verlässt die Extinktionsänderung den linearen Bereich und geht in Sättigung. Der Verlauf dieser Kurve zeigt große Ähnlichkeiten mit der klassischen Schmelzkurve, die durch langsame Temperaturerhöhung gewonnen wurde. Diese Ähnlichkeit wird verständlich, wenn man die zu Grunde liegenden Mechanismen für die lang anhaltende Extinktionsänderung nach einem Laserpuls betrachtet. Bei der Badtemperatur von 25 °C muss eine bestimmte Mindestenergie optothermisch in das System eingebracht werden, um die Barriere des DNA-Schmelzens zu überwinden. Ab der Schwellen-Leistungsdichte I_{Schwelle} reicht die optothermisch induzierte Temperatur aus, um die DNA im Inneren der Aggregate zu schmelzen. Dies führt zur Auflösung der Aggregate und somit zur Extinktionsabnahme. Mit steigender Leistungsdichte wird ein immer größerer Anteil der Aggregate geschmolzen, die Amplitude der gemessenen Extinktionsänderung steigt. Schließlich sind alle im bestrahlten Volumen vorhandenen Aggregate vollständig aufgelöst. Die Extinktion kann trotz steigender Leistungsdichte nicht weiter abnehmen. Die Extinktionsänderung geht somit in Sättigung.

Im Gegensatz zur klassischen Schmelzkurve ist die Extinktionsänderung in der „Optothermischen Schmelzkurve“ nicht gegen die Temperatur aufgetragen, sondern gegen die eingestrahelte Leistungsdichte. Aus (2.20) ist jedoch bekannt, dass die induzierte Temperaturerhöhung direkt proportional zur eingestrahelten Leistungsdichte ist. Der direkte Vergleich mit der klassischen Schmelzkurve zeigt dennoch zwei Unterschiede:

Die Extinktionszunahme, die in der klassischen Schmelzkurve kurz vor Erreichen des Phasenübergangs zu beobachten ist, wird in der optothermischen Schmelzkurve nicht beobachtet. Die Ursache für die Extinktionszunahme in der klassischen Schmelzkurve ist die Größenzunahme durch Ostwald-Reifung (vgl. hierzu auch 2.3.3). Hierfür müssen zunächst kleine Aggregate aufgeschmolzen werden. Anschließend diffundieren die freigesetzten Nanopartikel zu großen, stabileren Aggregaten und vergrößern diese nach DNA-Hybridisierung.[184] Dieser Vorgang wird in der klassischen Schmelzkurve sichtbar, da hier der Temperaturbereich der Ostwaldreifung über mehrere Minuten hinweg durchlaufen wird. In der optothermischen Schmelzkurve steht jeder Datenpunkt für eine Einzelpuls-Messung. Zwischen Heiz- und Detektionszeitpunkt liegen nur 20 ms. Dies reicht nicht aus, um die genannten Prozess-Schritte zu durchlaufen, die zur Ostwaldreifung nötig sind. Die Ostwald-Reifung in der klassischen Schmelzkurve ist ein Nebenef-

fekt der inhomogenen Größenverteilung. Hier schmelzen kleine Aggregate zuerst, da sie weniger stabil gebunden sind. Auch die optothermische Schmelzkurve zeigt einen Nebeneffekt der inhomogenen Größenverteilung: der Übergangsbereich zwischen den beiden linearen Bereichen ist auf das Schmelzen unterschiedlich großer Aggregate zurückzuführen. Hier schmelzen jedoch die großen Aggregate zuerst.

Wie bereits in der theoretischen Betrachtung von optisch geheizten Nanopartikel-Aggregaten in 2.2.2 eingeführt worden ist, erwartet man mit wachsender Aggregatsgröße einen Anstieg der pro Laserleistung induzierten Temperatur im Aggregat. Um dies zu überprüfen, wurden die Aggregate während einer fünfminütigen Reifungsphase bei 50 °C vergrößert. Bei dieser Temperatur nimmt die durchschnittliche Größe der Aggregate aufgrund der sog. Ostwaldreifung deutlich zu und die Größen der Aggregate werden einheitlicher. Dieser Zustand bleibt erhalten, wenn die Lösung anschließend wieder auf 25 °C abgekühlt wird. Die Auswirkung dieser gezielten Größenänderung ist in der optothermischen Schmelzkurve in Abbildung 5.6 zu sehen. Die Schwelle für das DNA-Schmelzen ist durch die Ostwald-Reifung deutlich herabgesetzt, da die erforderliche DNA-Schmelztemperatur in größeren Aggregaten bereits bei geringerer Leistungsdichte erreicht wird. Vor der Ostwald-Reifung wurden zuerst große Aggregate und bei höherer Leistung auch kleinere Aggregate geschmolzen. Die Folge hieraus ist der breite Übergangsbereich in den linear ansteigenden Bereich der optothermischen Schmelzkurve in Abbildung 5.5. Nach der Ostwald-Reifung herrscht eine homogenere Größenverteilung. Dies führt zu einem deutlich schärferen Übergang zwischen den beiden linearen Bereichen.

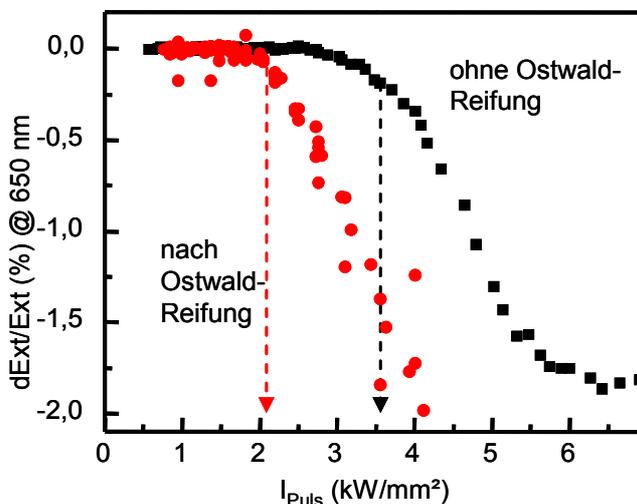


Abbildung 5.6: Durch die Ostwald-Reifung sinkt die Schwellen-Leistungsdichte aufgrund der Zunahme der durchschnittlichen Aggregatsgröße. Aufgrund der homogenen Größenverteilung wird der Übergang zwischen den linearen Bereichen deutlich schärfer.

Im Folgenden wird der Einfluss der Badtemperatur auf die Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle}$ untersucht. Hierfür wird bei unterschiedlichen Badtemperaturen eine optothermische Schmelzkurve aufgenommen und hieraus jeweils $I_{Schwelle}$ bestimmt. Um den oben beschriebenen Einfluss der Aggregatsgröße auf $I_{Schwelle}$ in diesem Experiment ausschließen zu können, muss eine konstante Größenverteilung über den gesamten Beobachtungs-Zeitraum garantiert sein. Nach einigen Stunden Hybridisierung erfolgt über den betrachteten Zeitraum kein weiteres Wachstum der Aggregate. Zudem werden Badtemperaturen gewählt, die unterhalb des Temperaturbereiches liegen, in dem ein Größenzuwachs der Aggregate durch Ostwald-Reifung erfolgt. Schließlich wird die Messung zunächst bei schrittweise ansteigender Badtemperatur durchgeführt und anschließend bei schrittweise abgesenkter Badtemperatur wiederholt.

In Abbildung 5.7 ist die Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle}$, die eingestrahlt werden muss, um DNA-Schmelzen zu beobachten, für Badtemperaturen zwischen 15 °C und 45 °C aufgetragen. Hier zeigt sich ein linearer Abfall von $I_{Schwelle}$ mit steigender Badtemperatur. Beim zweiten Durchlauf der Messung mit schrittweise abnehmender Badtemperatur ist innerhalb der Fehlertoleranzen keine Hysterese zum ersten Durchlauf zu erkennen. Dies bedeutet, dass sich die Aggregatsgrößen während der Messung nicht messbar verändert haben. Der lineare Abfall lässt sich wie folgt erklären: Mit steigender Badtemperatur sinkt die Temperaturdifferenz zwischen Ausgangstemperatur und der Schmelztemperatur der DNA. Somit muss ein kleinerer Temperaturhub optisch induziert werden. Nach (2.20)

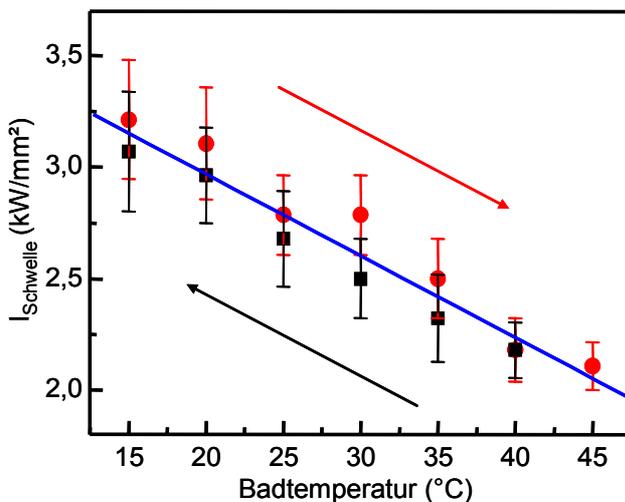


Abbildung 5.7: Die Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle}$, die benötigt wird um DNA-Schmelzen optisch zu induzieren, sinkt linear mit steigender Badtemperatur (blau: lineare Annäherung durch alle Messpunkte). Dies zeigt, dass bei höherer Badtemperatur ein kleinerer Temperatursprung induziert werden muss, um die Schmelztemperatur der DNA zu erreichen. Die Einzelmessungen wurden zunächst bei zunehmender (●) und anschließend bei abnehmender Badtemperatur (■) gemessen. Da sich keine Hysterese zeigt, kann eine Größenänderung der Aggregate während der Messung ausgeschlossen werden.

und (2.25) ist die optisch induzierte Temperaturerhöhung im Aggregat direkt proportional zu der eingestrahnten Laserleistungsdichte. Bei unveränderter Aggregats-Größe bedeutet dies in der Summe einen linearen Abfall der Schwellen-Leistungsdichte mit wachsender Badtemperatur.

Auf diesen Zusammenhang zwischen Badtemperatur und Schwellen-Leistungsdichte wird in Kapitel 6.1 noch einmal zurückgegriffen, wenn die Temperatur im Inneren der Aggregate bestimmt wird.

5.2.2 Der plasmonische Ursprung der optisch induzierten Extinktionsänderung

In 5.2.1 wurde gezeigt, dass die lang anhaltende Extinktionsabnahme nur bei Überschreiten der Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle}$ auftritt. Das Temperaturverhalten von $I_{Schwelle}$ und die Größenabhängigkeit der optothermischen Schmelzkurve zeigen klar, dass der Grund für diese Extinktionsänderung das optothermische Schmelzen der DNA in den Aggregaten ist. Das Schmelzen der DNA löst die Verbindungen zwischen den Nanopartikeln und diese beginnen auseinander zu diffundieren. Zunehmender Abstand zwischen Nanopartikeln ruft eine Abnahme der Plasmonenkopplung hervor und somit eine Reduktion der Breite sowie eine Blauverschiebung der Plasmonresonanz.[112, 113] Dies bewirkt die Abnahme der Extinktion im roten Spektralbereich, der zeitaufgelöst beobachtet wird. In Kapitel 5.1 wurde das Schmelzen der DNA und das hieraus resultierende Auflösen der Aggregate durch die hierfür typische und unverwechselbare Veränderung des Extinktionsspektrums klar identifiziert. Der Vorteil einer spektral aufgelösten Verschiebung der Extinktion gegenüber monochromer Extinktionsmessung liegt in der Eindeutigkeit des Messergebnisses. Eine monochrom gemessene Abnahme der Extinktion könnte auch ein Resultat abnehmender Konzentration sein. Letztere hätte im spektral aufgelösten Fall die Abnahme der Extinktion im gesamten Spektralbereich der Extinktion zur Folge. Hier gelingt eine Unterscheidung zwischen purer Konzentrationsänderung und der Extinktionsverschiebung, die in einem Wellenlängenbereich zur Abnahme, im anderen zur Zunahme der Extinktion führt. Das unverwechselbare Merkmal der Plasmonresonanzverschiebung soll auch im folgenden Experiment genutzt werden, um thermophoretisch be-

dingte Konzentrationsänderungen als Ursache für die lang anhaltende Extinktionsänderung auszuschließen.

Die spektrale Auflösung wird im folgenden zeitaufgelösten Experiment auf zwei Wellenlängen beschränkt. Die langwellige Flanke der Plasmonresonanz wird wie bisher bei 650 nm untersucht, die kurzwellige Flanke nahe der Plasmonresonanz von Aggregaten bei 532 nm (vgl. Abb. Abbildung 5.8 a) und b)). Hierfür wird der vorhandene Messaufbau wie in 3.3 beschrieben durch einen weiteren kontinuierlicher Abfragelaser mit einer Wellenlänge von 532 nm erweitert. Alle drei Laser werden am gleichen Ort in der Küvette räumlich überlappt. Hierdurch wird eine simultane Messung der Extinktionsänderung im roten und im grünen Spektralbereich ermöglicht

Das zwei-Farben-Abfrage-Experiment wird an zwei unterschiedlichen Probensystemen durchgeführt: Aggregate aus Nanopartikeln mit 20 nm Durchmesser, sowie Aggregate aus Nanopartikeln mit 40 nm Durchmesser. Die exakten Konfigurationen und Sequenzen sind im Anhang detailliert beschrieben. Diese Probensysteme wurden gewählt, da sie sich nach einstündiger Hybridisierung im Spektralbereich des Maximums der Plasmonresonanz unterscheiden. Hier zeigen die Aggregate aus 20 nm Gold-Partikeln eine leichte Erhöhung der Extinktion um 532 nm im Vergleich zu freien Nanopartikeln. Bei Aggregaten aus 40 nm Gold-Partikeln ist die Extinktion in diesem Bereich hingegen durch die Hybridisierung vermindert. Im roten Spektralbereich bewirkte die Hybridisierung in beiden Proben eine Zunahme der Extinktion (Abbildung 5.8 a) und b)). Dieses Detail wird nun in den zeitaufgelösten Messungen mit zweifarbiger Abfrage benutzt, um die Korrelation zwischen lang anhaltendem DNA-Schmelz-Signal und der spektralen Lage der Plasmonresonanz zu zeigen.

Abbildung 5.8 c) zeigt die Ergebnisse der zeitaufgelösten Messungen der Aggregat-Dissoziation nach Heizpulsen mit Leistungsdichten größer als $I_{Schwelle}$ für 20 nm Partikel-Aggregate. Hier beobachtet man sowohl im roten, als auch im grünen Spektralbereich eine Abnahme der Extinktion auf langer Zeitskala. Dies ist konsistent mit der Resonanzverschiebung in Abbildung 5.8 a). Die kurzzeitige Extinktionsänderung auf der Mikrosekunden-Zeitskala wird in diesen Messungen zeitlich nicht aufgelöst.

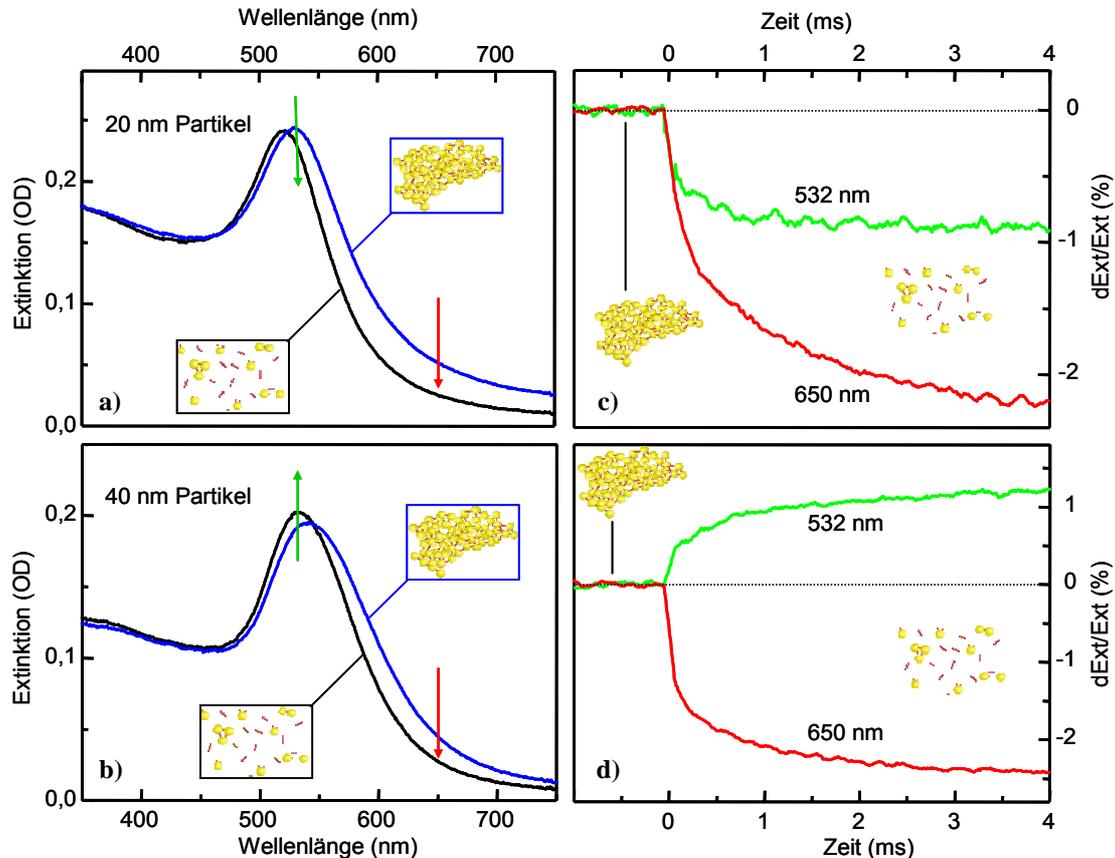


Abbildung 5.8: **a)** Die Extinktion freier Nanopartikel mit 20 nm Durchmesser (schwarz) ist sowohl bei 532 nm, als auch bei 650 nm geringer als im aggregierten Zustand (blau). **b)** 40 nm Partikel zeigen bei 532 nm ein entgegengesetztes Verhalten (gleiche Farben wie in a)). **c)** Die gleichzeitige Messung der Extinktionsänderung im grünen und roten Spektralbereich zeigt für Aggregate aus 20 nm Partikeln bei einer Leistungsdichte $I_{Puls} > I_{schwelle}$ eine Extinktionsabnahme in beiden Spektralbereichen. Dies stimmt mit den jeweiligen Extinktionsänderung in den Spektren in a) überein. **d)** Die Aggregate aus 40 nm Partikeln zeigen je nach Abfrage-Wellenlänge Extinktionsab- oder zunahme. Die Vorzeichen der Extinktionsänderungen entsprechen genau der spektralen Änderung der Extinktion, die aufgrund der Resonanzverschiebung in b) beobachtet wird.

In Aggregaten mit 40 nm Partikeln werden hingegen in den beiden Spektralbereichen optothermisch induzierte Extinktionsänderungen mit entgegengesetzten Vorzeichen gemessen (Abbildung 5.8 d)). Hier nimmt die Extinktion bei der Wellenlänge von 532 nm nach dem Heizpuls zu. Dies entspricht genau dem Verhalten, wie es aus den Extinktionsspektren in Abbildung 5.8 b) zu erwarten ist.

Dieses zwei-Farben-Abfrage-Experiment zeigt somit eindeutig die Korrelation zwischen der lang anhaltenden Extinktionsänderung und der spektralen Verschiebung der Plasmonresonanz aufgrund des Schmelzens der DNA. Durch zweifarbige zeitlich aufgelösten

Messung der optothermischen Aggregat-Dissoziation kann ausgeschlossen werden, dass die Abnahme der Extinktion im roten Spektralbereich ein reiner Effekt der lokalen Abnahme der Partikelkonzentration durch thermische oder optische Effekte ist.

Neben der lang anhaltenden Extinktionsänderung, die nur ab der Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle}$ auftritt, zeigt Abbildung 4.4 eine weitere Extinktionsänderung auf der Mikrosekunden-Zeitskala auch bei niedrigen Leistungsdichten. Im Folgenden soll gezeigt werden, dass diese rasche Extinktionsabnahme im roten Spektralbereich klar dem Aufheizen und dem Abkühlen der Aggregate zugeschrieben werden kann.

Wie bereits in 5.2 erwähnt, steigt die Amplitude der kurzlebigen Extinktionsänderung mit steigender Leistungsdichte an. In Abbildung 5.9 ist die maximale Amplitude der Extinktionsänderung auf der Mikrosekunden-Zeitskala gegen die eingestrahelte Leistungsdichte aufgetragen. Es zeigt sich ein linearer Anstieg der Amplitude, der aus dem linearen Zusammenhang zwischen optisch induziertem Temperaturanstieg und eingestrahelter Leistungsdichte aus (2.20) und (2.25) verständlich wird. Die Ursache dieser raschen Extinktionsänderung ist also eine Folge der Aggregat-Erwärmung. Insbesondere ändert sich hierdurch die Plasmonresonanz aufgrund der thermisch induzierten Veränderung der Dielektrizitätsfunktion von Gold[30], des Wassers und der im Aggregat eingeschlossenen DNA.

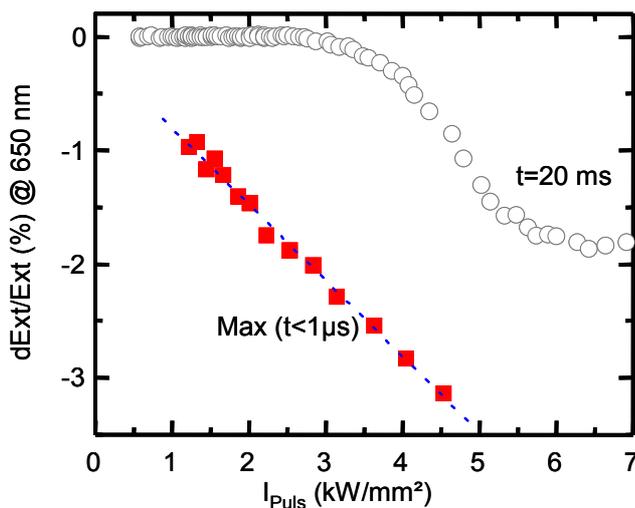


Abbildung 5.9: Anders als das lang anhaltende DNA-Schmelz-Signal bei 20 ms (○) hängt die maximale Amplitude der Extinktionsänderung auf der Mikrosekunden-Zeitskala linear von der Leistungsdichte I_{Puls} ab (■). Der Ursprung dieser Extinktionsänderung ist die Erwärmung des Aggregates.

Aus Anrege-Abfrage-Experimenten an ungebundenen Gold-Nanopartikeln, die durch Femtosekunden-Laserpulse geheizt worden sind, ist bekannt, dass es durch die Erhitzung der Nanopartikel zu einer Verbreiterung der Plasmonresonanz kommt. [30, 217, 218] Dies führt im betrachteten Spektralbereich jedoch zu einer thermisch induzierten Zunahme der Extinktion. Im hier vorliegenden Fall wird nach Heizen mit Nanosekunden-Pulsen ein anderes Vorzeichen der Extinktionsänderung bei 650 nm beobachtet.

Dieser Unterschied wird verständlich, wenn man die unterschiedlichen Zeitskalen der optischen Heizphasen näher betrachtet. In Femtosekunden-Experimenten ist die Heizphase deutlich kürzer als die Zeit, die der Wärmetransfer vom Nanopartikel in das umgebende Medium beansprucht. Abbildung 5.10 a) zeigt die Temperaturprofile in einem 40 nm Goldpartikel und in dessen wässriger Umgebung zu unterschiedlichen Zeiten nach einem Femtosekunden-Puls. Die Profile wurden mithilfe einer finite Elemente Simulation errechnet, wobei davon ausgegangen wird, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ ein homogen ge-

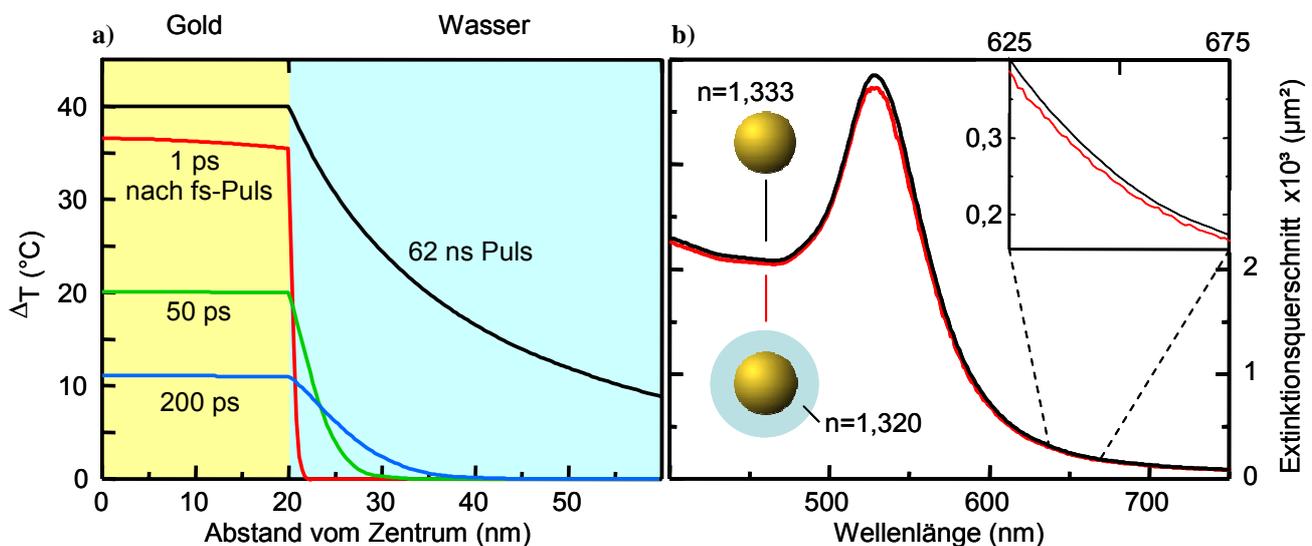


Abbildung 5.10: a) Die Temperaturprofile nach einem Femtosekunden-Laserpuls (farbig) zeigen nur eine geringe Erwärmung des umgebenden Wassers. Erst mehr als 100 ps nach dem Puls erfolgt eine nennenswerte Erwärmung der Umgebung. Anrege-Abfrage-Experimente zeigen zu diesem Zeitpunkt aufgrund der stark gesunkenen Partikeltemperatur jedoch keine Extinktionsänderung mehr im roten Spektralbereich (siehe Text). Während des gesamten Pulses mit der Dauer von 62 ns herrscht eine breite Temperaturverteilung um das Partikel. Der Einfluss der Erwärmung des umgebenden Wassers hat hier deutlich mehr Einfluss auf die plasmonischen Eigenschaften. Durch die Erwärmung des Wassers in der Partikelumgebung sinkt dessen Brechungsindex. Dies führt zu einer Abnahme der Extinktion im gesamten Spektralbereich, wie die Mie-Rechnung in b) zeigt. Hier wurde eine Brechungsindex-Abnahme von 1% für eine Schale von 15 nm Dicke um ein 40 nm Partikel angenommen.

heiztes Nanopartikel vorliegt, das 40 K wärmer ist als seine Umgebung. Dies ist eine idealisierte Beschreibung des Zustandes, der nach abgeschlossener Elektron-Phonon-Thermalisierung wenige Pikosekunden nach einem ~ 100 Femtosekunden-Puls herrscht (vgl. Kapitel 2.1.5). In diesem Zustand ist nur die thermische Änderung der Dielektrizitätsfunktion des Goldes entscheidend, die zu einer Resonanzverbreiterung durch Plasmondämpfung führt [30, 217]. Im roten Spektralbereich bedeutet dies eine Zunahme der Extinktion, die wenige Pikosekunden nach dem Laserpuls beobachtet wird [30, 217, 218]. Da die Heizphase bereits beendet ist, kann nur die im Nanopartikel vorhandene Wärme auf die Umgebung übertragen werden. Dies erzeugt zunächst eine dünne Schicht aus erwärmtem Wasser um das Partikel, die nur wenigen nm dick ist. Mit der Zeit wird die Temperaturverteilung deutlich breiter, wodurch jedoch auch die maximale Temperatur deutlich abnimmt. Die Umgebung wird somit in Femtosekunden-Experimenten thermisch kaum beeinflusst, und somit ist auch der Einfluss der thermisch induzierten Änderung der Dielektrizitätsfunktion der Umgebung sehr gering. Tatsächlich zeigt keine der genannten Arbeiten einige 10 ps nach einem Femtosekunden-Puls eine messbare, optisch induzierte Extinktionsänderung bei der in dieser Arbeit verwendeten Abfrage-Wellenlänge von 650 nm. [30, 217, 218]

Anders verhält es sich mit Nanosekunden-Heizphasen, wie sie in dieser Arbeit vorliegen. Während des Heizpulses bleibt ausreichend Zeit, um die Umgebung der einzelnen Partikel deutlich aufzuheizen. In Abbildung 5.10 a) ist das breite Temperaturprofil um ein 40 nm Partikel zum Zeitpunkt maximaler Bestrahlungsleistung während eines Gauß-förmigen Pulses mit einer Halbwertsbreite von 62 ns dargestellt. In diesem Szenario ist deutlich mehr Wasser in der Umgebung aufgeheizt. In Aggregaten kommt der Wärmestau durch nahe, benachbarte Nanopartikel hinzu, so dass ein großes Volumen um die Nanopartikel herum nahezu die gleiche Temperatur erreicht wie die Nanopartikel selbst. Somit ist der Einfluss der Umgebung auf die Änderung der Plasmonresonanz deutlich stärker als in Femtosekunden-Experimenten.

Der Brechungsindex von Wasser sinkt mit steigender Temperatur.[219, 220] Abbildung 5.10 b) zeigt zwei Extinktionsspektren von Gold-Nanopartikeln, die mit Hilfe der Mie-Theorie berechnet wurden. Für ein ungeheiztes Nanopartikel in kaltem Wasser wird hierbei ein Brechungsindex von 1,333 in der gesamten Partikelumgebung angenommen. Dem berechneten Temperaturprofil während eines Nanosekunden-Pulses aus Abbildung

5.10 a) folgend wird für ein geheiztes Partikel eine Schale aus erwärmtem Wasser mit einem Brechungsindex von 1,32 und einer Schichtdicke von 15 nm angenommen. Die berechnete Extinktion liegt für das geheizte Nanopartikel im gesamten Spektralbereich unter der Extinktion des kalten Nanopartikels. Diese Abnahme der Extinktion wird auch in Abbildung 5.3 und Abbildung 5.9 beobachtet. Hinzu kommt der Einfluss der aufgeheizten DNA, der jedoch nur schwer abgeschätzt werden kann. Ein weiterer Effekt, der zur Extinktionsabnahme beitragen kann, ist eine Ausdehnung der Aggregate. Diese könnte durch den Druck hervorgerufen werden, den das Wasser in den Partikel-Zwischenräumen im Aggregat verursacht, wenn es sich aufgrund der Erwärmung ausdehnt.

Die nähere Betrachtung der Aufheiz- und Abkühlodynamik im Folgekapitel wird einen weiteren Beweis dafür liefern, dass die kurzlebige Extinktionsänderung die Temperatur im Aggregat repräsentiert.

5.2.3 Die Aufheiz- und Abkühldynamik optothermisch geheizter Aggregate

In diesem Kapitel wird der zeitliche Verlauf der Extinktionsänderung genauer untersucht, der Rückschlüsse auf die Dynamik der Aufheiz- und Abkühlprozesse in den Aggregaten erlaubt. Zunächst wird das direkte Ansprechverhalten von Nanopartikel-Aggregaten auf einen erwärmenden Laserpuls mit einer Dauer von ~ 100 ns untersucht. Wie bereits in 2.1.5 vorgestellt, zeigen Heizexperimente mit Femtosekunden-Pulsen, dass einzelne Gold-Nanopartikel innerhalb weniger Pikosekunden aufgeheizt werden [30, 68]. Dies ist fünf Größenordnungen kürzer als die Dauer der Laserpulse, die in dieser Arbeit verwendet werden. Mit diesen Pulsen kann das Aufheizen der Nanopartikel zeitlich nicht aufgelöst werden, da die optothermisch induzierte Temperatur instantan dem zeitlichen Intensitätsverlauf des Pulses folgt.

Im Gegensatz zu frei gelösten, massiven Gold-Nanopartikeln sind DNA-gebundenen Aggregate aus Gold-Nanopartikeln wesentlich größer und bestehen in den Partikel-Zwischenräumen zu einem Großteil aus Wasser, das eine deutlich schlechtere Wärmeleitung besitzt als Gold. Wie diese aus Gold, Wasser und DNA zusammengesetzten Objekte auf die optothermische Anregung durch Nanosekunden-Laserpulse reagieren, soll im folgenden Experiment geklärt werden, besonders in Bezug auf die Geschwindigkeit der Aufheiz- und Abkühl-Prozesse.

Die Gold-Aggregate aus 10 nm Partikeln, die bereits in 5.2.1 Verwendung gefunden haben, werden mit Heizpulsen unterschiedlicher Dauer bestrahlt. Die Puls-Leistungsdichte liegt jeweils unterhalb der Schwellen-Leistungsdichte, um das kurzlebige Signal isoliert von Einflüssen des DNA-Schmelzens untersuchen zu können. Sowohl der gemessene Verlauf der Laserpulsleistung, als auch die hierdurch optothermisch induzierte Extinktionsänderung sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Die Extinktionsänderung wurde hierbei gegenüber bisherigen Darstellungen invertiert, um eine anschaulichere Gegenüberstellung mit der Leistungsdichte zu ermöglichen. Die Extinktionsänderung, die nach 5.2.2 die Temperatur im Aggregat repräsentiert, folgt nicht unmittelbar auf die eingestrahlte Leistung. Sowohl im Fall eines 62 ns-Laserpulses in Abbildung 5.11 a), als auch nach

dem längeren Laserpuls mit 226 ns Halbwertsbreite in Abbildung 5.11 b) kann eine rasche, aber verzögerte Extinktionsänderung beobachtet werden. Die verzögerte Antwort auf den Laserpuls bedeutet, dass das Aggregat-System während der Anstiegszeit der Laserleistung noch nicht ausreichend Wärme an die Umgebung abgeben kann, um den thermischen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Dies ist konsistent mit den Betrachtungen in 4.2. Dort wurde die typische Zeitkonstante τ , um das thermische Gleichgewicht zu erreichen, für typische Aggregatsgrößen von $1 \mu\text{m}$ auf ca. $5 \mu\text{s}$ abgeschätzt.

Zusätzlich zum zeitlichen Verlauf der eingestrahlichten Leistung ist in Abbildung 5.11 auch das zeitliche Integral über die Leistung aufgetragen. Dies entspricht der gesamten im System deponierten Energie. Der zeitliche Verlauf dieser Wärmemenge stimmt mit der zeitlichen Entwicklung der induzierten Extinktionsänderung sehr gut überein. Dies be-

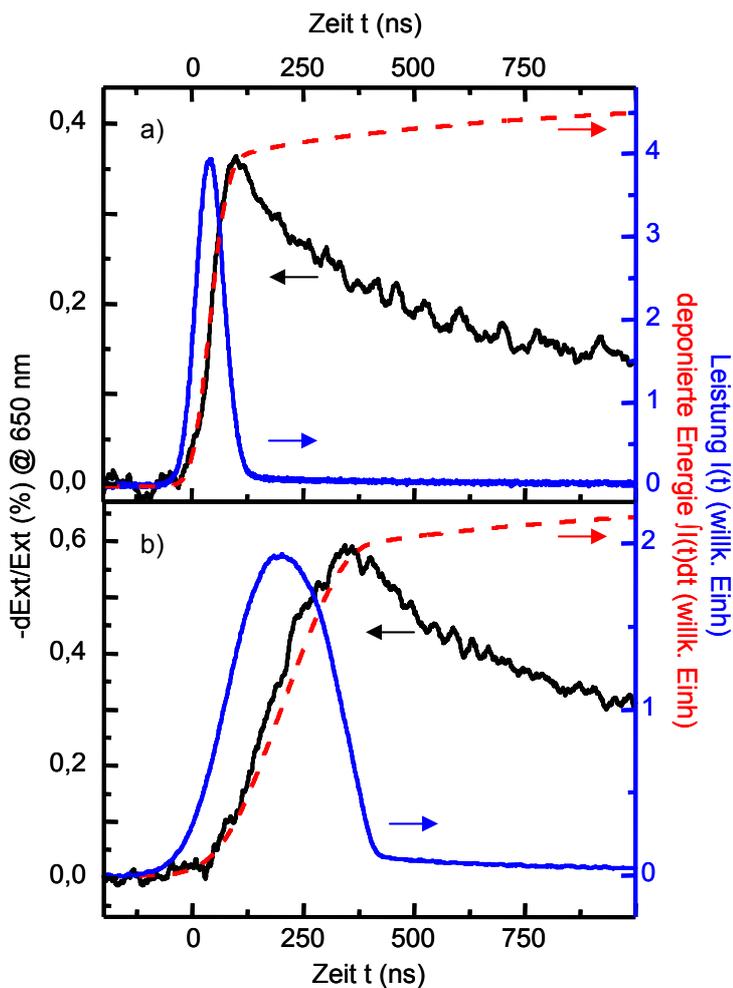


Abbildung 5.11: a) Der anregende Laserpuls mit einer Halbwertsbreite von 62 ns (blau: gemessene Leistungsdichte) induziert die Änderung der Extinktion der Nanopartikel-Aggregate (schwarz). Diese folgt jedoch nicht instantan dem Verlauf der eingestrahlichten Leistung, sondern dem Integral über die Leistung, also der insgesamt im Aggregat deponierten Energie (rot). Erst nach dem Ende des Laserpulses entweicht langsam Energie aus dem System in die Umgebung. b) Auch bei längeren Laserpulsen von 226 ns Dauer folgt die Extinktionsänderung und somit die Temperatur in den Aggregaten der deponierten Energie. Die Abkühlung nach Ende des Heizpulses dauert deutlich länger als der Aufheizvorgang und erfolgt mit der gleichen Zeitkonstante wie in a).

deutet, dass die Energie während der gesamten Laserpuls-Dauer in den Aggregaten akkumuliert wird und kaum Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Erst nach Ende des Laserpulses weicht die Extinktionsänderung vom Verlauf der deponierten Wärme ab, da nun langsam Wärme an die Umgebung abgegeben wird und die Aggregate abkühlen. Diese Abkühlung erfolgt deutlich langsamer als die Erhitzung des Systems und wird im Folgenden genauer untersucht.

In 2.1.5 wurde bereits vorgestellt, dass freie Nanopartikel je nach Größe innerhalb von 100 ps bis zu wenigen Nanosekunden abkühlen, wobei die Abkühldauer mit zunehmender Größe steigt. Der Verlauf der Abkühlung folgt hierbei einer gestreckten Exponentialfunktion. [69] Dieses Verhalten wurde in 5.2 auch für den Abkühlprozess lasergeheizter Nanopartikel-Aggregate beobachtet. Im folgenden Experiment soll nun untersucht werden, wie das Abkühlverhalten von der Aggregatgröße abhängt. Abbildung 5.12 a) zeigt die Extinktionsspektren der Gold-Nanopartikel-Aggregate, die jeweils kurz vor der zeit aufgelösten Messung aufgenommen wurden. Die Aggregate wurden jeweils nach ein- und mehr als 24stündiger Hybridisierung vermessen, wobei die verlängerte

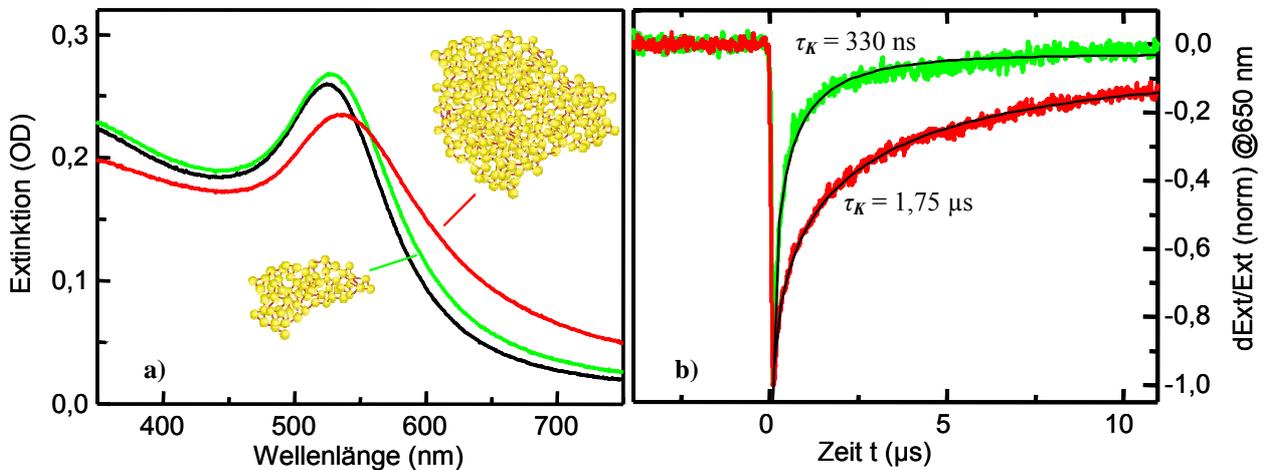


Abbildung 5.12: a) Das Extinktionsspektrum der Nanopartikel-Aggregate zeigt nach 24stündiger Hybridisierung (rot) eine ausgeprägtere Rotverschiebung und Verbreiterung der Plasmonresonanz als nach 1stündiger Hybridisierung (grün). Dies ist auf das Aggregatwachstum während der zusätzlichen Hybridisierungszeit zurückzuführen. Als Vergleich ist auch das Extinktionsspektrum der freien Nanopartikel vor Beginn der Hybridisierung dargestellt (schwarz). b) Die Extinktionsänderung der kleinen Aggregate (grün) klingt deutlich schneller ab, als die der großen Aggregate (rot). Dies zeigt, dass große Aggregate langsamer abkühlen als kleine. Die Anpassung einer gestreckten Exponentialfunktion an die gemessenen Transienten ergeben in beiden Fällen einen Streckungsexponenten $\beta = 0,5$ und die angegebenen Zeitkonstanten τ_K für die Kühldauer.

Hybridisierungszeit zu deutlich größeren Aggregaten führt. Dies ist auch aus der Rotverschiebung und Resonanzverbreiterung der zugehörigen Extinktionsspektren ersichtlich. Die optothermisch induzierte Extinktionsänderung der Aggregate ist in Abbildung 5.12 b) dargestellt. Zur anschaulicheren Gegenüberstellung wurden die Transienten auf die maximale Amplitude normiert. Die Extinktionsänderung im Fall der kleinen Aggregate nach kurzer Hybridisierungszeit geht deutlich schneller zurück als die der großen Aggregate nach langer Hybridisierung. Wie bereits für frei gelöste Nanopartikel, steigt auch bei Aggregaten die Abkühldauer mit wachsender Größe. Eine rein exponentielle Annäherung des Verlaufs in der Abkühlphase ist nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Hingegen führt die Annäherung mit einer gestreckten Exponentialfunktion

$$dExt / Ext = e^{-((t-t_0) / \tau_K)^\beta} \quad (5.27),$$

wie sie auch in Ref. [69] für einzelne Nanopartikel verwendet wird zu einer guten Beschreibung der Situation. Die Zeitkonstante für die Abkühlung τ_K beträgt hierbei für die kleinen Aggregate 330 ns und für die großen Aggregate 1,75 μ s. β beträgt in beiden Fällen 0,5. Die Beschreibung der Abkühlung durch eine gestreckte Exponentialfunktion ist plausibel, da sich während der Abkühlung ständig die Temperatur in der Umgebung verändert. Hierdurch sinkt der Temperaturgradient um das Partikel mit zunehmender Zeit immer mehr. Dieser Gradient ist jedoch die treibende Ursache für die Wärmediffusion in die Umgebung. Der Abkühl-Vorgang wird also mit der Zeit zunehmend langsamer.

Bisher wurde lediglich die zeitliche Entwicklung der Extinktionsänderung untersucht, um ein besseres Verständnis für die Aufheiz- und Abkühlprozesse in den Aggregaten zu erlangen. Im folgenden Kapitel soll nun auch die absolute Temperatur abgeschätzt werden, die durch den Heizpuls in den Aggregaten erzeugt wird.

6 Die optothermische Schmelztemperatur: Überhitzung der DNA

Die bisherigen Experimente konnten zeigen, dass die hohe lokale Absorption der DNA-gebundenen Gold-Nanopartikel-Aggregate ausgenutzt werden kann, um DNA im Inneren der Aggregate zu schmelzen. Die Aggregate werden hierbei lokal erwärmt und die Temperatur der Umgebung bleibt zunächst nahezu unverändert. Es wurde gezeigt, dass die Aggregate innerhalb der Pulsdauer von ~ 100 ns aufgeheizt werden und anschließend je nach Größe auf der Mikrosekunden-Zeitskala abkühlen.

Ein sehr ähnliches Verhalten wurde in Temperatursprung-Experimenten beobachtet, die die hohe Absorption von Wasser im infraroten Spektralbereich nutzen, um das Wasser und darin gelöste DNA oder Proteine schnell zu heizen. [106, 216, 221-223] Hier ist die Aufheizdynamik durch das Wasser auf wenige Pikosekunden limitiert[224], kühlt aber mit einigen $10 \mu\text{s}$ [106] bis 100ms [106] deutlich langsamer ab, als in den hier gezeigten Experimenten mit Gold-Aggregaten. Der Grund hierfür liegt in der globalen Erwärmung des bestrahlten Volumens (vgl. 4.2). Die Betrachtungen in 4.2 und Ref. [107] zeigen, dass eine schnelle Abkühlung nur nach lokalem Heizen kleiner Strukturen möglich ist. Die Experimente dieser Arbeit zeigen erstmals lokales Heizen von DNA durch optisch ge-

heizte Gold-Nanopartikel¹, die es erlauben, die DNA für einen deutlich kürzen Zeitraum zu erhitzen, als dies mit bisherigen Methoden möglich war.

Experimente an kurzzeitig bestrahlten und optothermisch geheizten Proteinen zeigen, dass die Schädigungs- oder Denaturierungstemperatur abhängig von der Bestrahlungsdauer ist. [106, 226] Je kürzer der Zeitraum erhöhter Temperatur ist, desto höher muss die optothermisch induzierte Endtemperatur sein, um Schäden oder Strukturänderungen im betreffenden Protein zu induzieren. In Arbeiten über schnelle Temperatursprung-Experimente an DNA wurde bisher kein vergleichbarer Effekt für DNA berichtet [216, 227]. In diesen Arbeiten limitiert jedoch das globale Heizen des bestrahlten Volumens die Abkühlzeit und somit sind die Phasen erhöhter Temperatur länger als einige 10 μ s. In diesem Kapitel soll geklärt werden, ob die Temperatur, bei der DNA-Schmelzen nach Nanosekunden-Pulsen beobachtet wird, der klassischen Schmelztemperatur entspricht, die aus der klassischen Schmelzkurve mit langsamer Temperaturerhöhung gewonnen wird.

Bisher wurde lediglich der zeitliche Verlauf der Aufheiz- und Abkühlprozesse untersucht, ohne dabei Informationen über absolut erreichte Temperaturen in den Aggregaten zu gewinnen. In den nachfolgenden Abschnitten soll eine Abschätzung der Temperatur erfolgen, ab der die DNA in den Aggregaten nach optothermischer Anregung schmilzt. Diese Temperatur wird im Folgenden „optothermische Schmelztemperatur“ der DNA genannt. Die Abschätzung der optothermischen Schmelztemperatur ist mit zwei voneinander unabhängigen Methoden möglich: zum Einen durch Extrapolation der von der Badtemperatur linear abhängigen Schwellen-Leistungsdichte aus 5.2.1, und zum Anderen durch Modellierung der Aggregat-Erwärmung, basierend auf einer Kombination aus elektrodynamischen Berechnungen der Absorption und der Lösung der zeitabhängigen Wärmeleitungsgleichung mit Methoden der finiten Elemente.

¹ In Ref. [225] wurden Ergebnisse aus Experimenten an Hybridsystemen aus DNA und Gold-Nanopartikeln, die mit Radiofrequenzen geheizt wurden, als lokales Heizen und Schmelzen der DNA interpretiert. Theoretische Berechnungen zu dieser Arbeit in Ref. [107] stellen jedoch unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in Ref. [225] einen lokalen Heizeffekt in Frage.

6.1 Extrapolation der optothermischen Schmelztemperatur

In 5.2.1 wurde gezeigt, dass die Schwellen-Leistungsdichte $I_{Schwelle}$, ab der optothermisches DNA-Schmelzen auftritt, mit zunehmender Badtemperatur linear abnimmt. Dies folgt aus dem linearen Zusammenhang zwischen eingestrahelter Leistungsdichte und induziertem Temperatursprung in den Aggregaten nach (2.20) und (2.25). Für das Schmelzen der DNA ist nur die kurzzeitig herrschende Endtemperatur während der optisch induzierten, heißen Phase entscheidend. Dies gilt, solange die Badtemperatur nicht die klassische Schmelztemperatur T_M^{kl} überschreitet. Die kurzzeitig herrschende Endtemperatur T ist die Summe aus der Badtemperatur T_B und dem optisch induzierten Temperatursprung ΔT

$$T = T_B + \Delta T \quad (6.28).$$

ΔT ist nach (2.20) direkt proportional zur eingestrahlenen Leistungsdichte I , also

$$\Delta T = u_{ot} I \quad (6.29),$$

wobei u_{ot} entsprechend (2.20) ein optothermischer Umwandlungsfaktor von eingestrahelter Leistungsdichte nach induziertem Temperatursprung ist. Sei $\Delta T_M(T_B)$ der Temperatursprung, der je nach Badtemperatur zum Schmelzen der DNA führt, so gilt

$$\Delta T_M(T_B) = u_{ot} I_{Schwelle}(T_B) \quad (6.30).$$

Die optothermische Schmelztemperatur T_M^{ot} ergibt sich somit zu

$$T_M^{ot} = T_B + u_{ot} I_{Schwelle}(T_B) \quad (6.31).$$

Dies entspricht dem Punkt der extrapolierten Ausgleichsgerade von $I_{Schwelle}(T_B)$, an dem $I_{Schwelle} = 0$. Abbildung 6.1 zeigt die Extrapolation zu den gemessenen Schwellen-Leistungsdichten bei unterschiedlichen Badtemperaturen aus Abbildung 5.7. Eine Bestimmung von $I_{Schwelle}(T_B)$ ist für $T_B > T_M^{kl}$ nicht möglich, da hier keine Aggregate mehr in der Lösung vorliegen. Die Extrapolation der linearen Annäherung der Messpunkte zeigt einen Schnittpunkt mit der T_B -Achse ($I_{Schwelle}(T_B) = 0$) bei 101 ± 21 °C. Dies ist die optothermische Schmelztemperatur T_M^{ot} . Es ist die Mindesttemperatur, die in den Aggregaten herrschen muss, um bei kurzzeitiger optothermischer Erwärmung DNA-Schmelzen beobachten zu können.

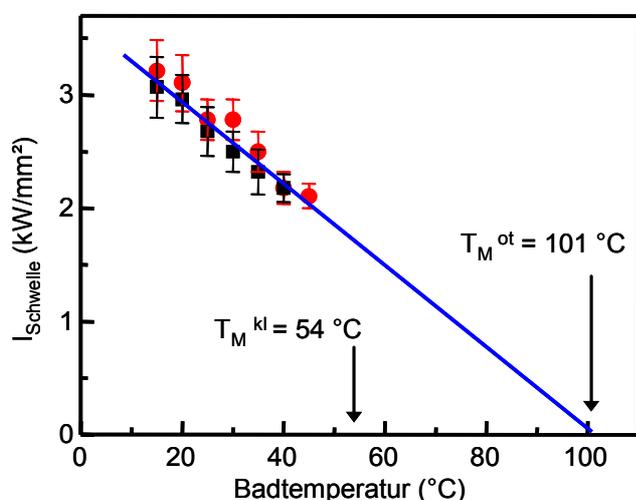


Abbildung 6.1: Die Schwellenleistungsdichte I_{schwelle} sinkt linear mit steigender Badtemperatur. Die Extrapolation bis zu der Temperatur, bei der keine Energie mehr von außen zugeführt werden muss, um die DNA zu schmelzen ($I_{\text{schwelle}} = 0$) führt jedoch nicht zur klassischen Schmelztemperatur T_M^{kl} . Stattdessen weist die Extrapolation darauf hin, dass die DNA bei kurzzeitiger, optothermischer Erhitzung erst bei einer wesentlich höheren „optothermischen Schmelztemperatur“ T_M^{ot} schmilzt. (Farbcodierung siehe TAbbildung 5.7)

T_M^{ot} ist 46 °C höher als die klassische Schmelztemperatur T_M^{kl} . Bei lang anhaltender Temperaturerhöhung schmilzt die DNA somit bei T_M^{kl} , herrscht die Temperatur hingegen nur über wenige Mikrosekunden, so kann die DNA bis auf 101 °C überhitzt werden, ohne zu schmelzen. Erst, wenn T_M^{ot} überstiegen wird, schmilzt die DNA auch bei kurzzeitigem Heizen. Wie diese Überhitzung der DNA erklärbar ist, wird in 6.3 diskutiert werden. An dieser Stelle sei noch einmal wiederholt, dass Wasser kurzzeitig auf bis zu 280 °C überhitzt werden kann, ohne zu sieden und Dampfblasen zu bilden (vgl. auch Kapitel 2.1.5). [70, 75, 76, 98, 226, 228, 229]

Diese Extrapolations-Methode kann ohne genaue Kenntnis des optothermischen Umwandlungsfaktors u_{ot} angewandt werden. Das bedeutet, dass weder Absorptionsquerschnitt der Aggregate noch deren Größe und Zusammensetzung exakt bekannt sein müssen, solange sie während allen Messungen unverändert bleiben. Die Konstanz dieser Größen wurde durch die Wiederholung des Experimentes bei zunehmender und anschließend abnehmender Badtemperatur sichergestellt (vgl. 5.2.1). Die ursprüngliche Messgröße für die Leistungsdichte ist die Spannung an einer Photodiode. Diese wird über eine Referenzmessung mit absoluter Leistungsbestimmung und die Bestimmung des Strahldurchmessers mittels Rasierklingenmethode in die Leistungsdichte umgerechnet. Die Extrapolations-Methode ist auch von diesem Umrechnungsfaktor unabhängig, und somit auch vom Strahldurchmesser oder der Diodenantwort, solange auch diese über alle Messungen gleich bleiben. Diese Größen sind extrem stabil und somit über den betrachteten Zeitraum der Messungen unverändert. Die Extrapolation der gemessenen Schwellenleis-

tungsdichten bei unterschiedlichen Badtemperaturen ist somit eine Methode, die viele Fehlerquellen ausschließt.

Um das Resultat der Extrapolation zu überprüfen, und somit die Beobachtung der kurzzeitigen DNA-Überhitzung zu stützen, soll im folgenden Kapitel eine Modellrechnung zur Aggregattemperatur während und nach entsprechenden Nanosekunden-Pulsen durchgeführt werden.

6.2 Modellrechnung zur Erwärmung von Gold-Aggregaten

In diesem Kapitel wird eine numerische Simulation vorgestellt, die es erlaubt, mithilfe elektrodynamischer Berechnungen und thermodynamischer Simulationen die optisch induzierte Temperaturänderung in Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln abzuschätzen. Hierdurch soll die optothermische Schmelztemperatur unter den gegebenen experimentellen Bedingungen theoretisch ermittelt werden. Das hier vorgestellte Modell zur Aggregatserwärmung wurde in Zusammenarbeit mit Calin Hrelescu im Rahmen seiner Diplomarbeit erstellt.[131] Es berücksichtigt im Gegensatz zu bisherigen theoretischen Modellen[4] explizit die Extinktions- und Absorptionsänderung aufgrund der Plasmonenkopplung, sowie Abschattungseffekte im Aggregat[230]. Letztere entstehen, wenn ein Aggregat deutlich größer ist, als die Eindringtiefe der einfallenden elektromagnetischen Welle im Aggregat.

Die Abschätzung der optothermisch induzierten Aggregattemperatur in Formel (2.25) basiert auf der vereinfachten Annahme, dass jedes einzelne Partikel eines Aggregates den gleichen Wärmebeitrag leistet wie ein vergleichbares, freies Nanopartikel.[4] Hier wird somit nicht berücksichtigt, dass sich die absorbierte Leistung pro Nanopartikel durch die Aggregation ändert. Die Änderung der aufgenommenen Lichtenergie muss jedoch auf doppelte Weise berücksichtigt werden:

- Durch die Aggregation kommt es zur Verschiebung der Plasmonresonanz aufgrund der Plasmonenkopplung. Diese Resonanz tritt nicht nur im Extinktionsquerschnitt, sondern auch im Absorptionsquerschnitt auf. Als Folge des geänderten Absorptionsquerschnittes ändert sich nach (2.19) die aufgenommene Leistung pro eingestrahelter Leistungsdichte. Dieser Einfluss der Plasmonenkopplung auf die aufgenommene Leistung kann nur durch die elektrodynamische Berechnung des Absorptionsquerschnittes der Nanopartikel-Aggregate berücksichtigt werden. Dies ist für die hier vorliegenden großen Aggregate mithilfe der Diskreten Dipol Approximation (DDA) möglich.
- Trifft das Licht von einer Seite auf ein Aggregat, so wird es beim Durchdringen des Aggregates aufgrund von Streuung und Absorption durch die einzelnen Nanopartikel abgeschwächt. Die Eindringtiefe in Gold beträgt für den heizenden Laserpuls im grünen Spektralbereich etwa 35 nm [9]. Für sehr große Aggregate mit Durchmessern von einigen hundert nm ist die zu durchdringende Goldschicht ein Vielfaches der Eindringtiefe, obwohl ein Großteil der Zwischenräume mit Wasser gefüllt ist. Partikel, die tief im Nanopartikel-Inneren positioniert sind, oder solche an der laserabgewandten Seite, sind somit durch die anderen Partikel von der optischen Anregung teilweise abgeschirmt. Sie sind somit einer kleineren optischen Leistungsdichte ausgesetzt als Partikel an der Oberfläche der bestrahlten Seite und wandeln somit weniger Licht in Wärme um. Dieser Abschattungseffekt wird als ortsabhängige Wärmeverteilung in der thermodynamischen Modellierung der finite Elemente Simulation berücksichtigt.

An dieser Stelle soll nur eine kurze Übersicht über die nötigen Schritte gegeben werden, die für die vollständige Beschreibung eines optothermisch geheizten Aggregates aus Gold-Nanopartikeln nötig ist. Für eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Berechnungs- und Modellierungsschritte sei auf die Diplomarbeit von Calin Hrelescu verwiesen.[131]

Extinktions- und Absorptionsquerschnitte werden durch Anwendung der DDA berechnet (vgl. auch Kapitel 2.2.1). Dies bedeutet, dass ein Aggregat als regelmäßiges Kristallgitter aus Gold-Nanopartikeln mit einheitlichem Abstand angenommen werden und jede Einheitszelle dieses Kristalls als ein Dipol angenähert wird.[112, 113] Die hierfür benötigte Polarisierbarkeit α_p eines einzelnen Dipols wird mithilfe der Clausius-Mossotti-Bezie-

hung (2.16) berechnet. Hierbei wird der korrigierte komplexe Brechungsindex der Gold-Nanopartikel aus Abbildung 2.4 verwendet, der unter Verwendung von (2.8) und der Mie-Theorie an die experimentellen Gegebenheiten angepasst wurde. Hierbei werden sowohl größenabhängige Dämpfungseffekte als auch die chemische Dämpfung durch die DNA-Funktionalisierung in einem wellenlängenabhängigen A-Parameter berücksichtigt (vgl. 2.1.3). Die Anordnung der einzelnen Partikel im Aggregat wird als einfach kubisch angenommen (wobei Ref. [112] zeigt, dass die Anordnung für das Ergebnis der Berechnung keine Rolle spielt). Für den Abstand der Nanopartikel zueinander wurde die Länge der gestreckten DNA angenommen, wobei ein Basenpaar 0,3 nm Länge entspricht. Die simulierte Tail-to-Tail-Konfiguration aus 5.2 ergibt somit 20 nm Abstand zwischen den Oberflächen der 10 nm großen Gold-Nanopartikel.

Die so berechneten Spektren für Aggregate mit unterschiedlichen Größen wurden in Ref. [131] mit experimentell bestimmten Extinktionsspektren verglichen, wobei die Größe der Aggregate durch dynamische Lichtstreuungs-Experimente bestätigt wurde.

Die Schar von Extinktionsspektren zu unterschiedlichen Größen erlaubt nun durch Vergleich mit den gemessenen Spektren dieser Arbeit die Größenbestimmung der vorliegenden Aggregate. Abbildung 6.2 a) zeigt Extinktionsspektren, die vor und nach der ersten Messreihe aufgenommen wurden, die als Grundlage zur Extrapolation in 6.1 diene. In der gleichen Abbildung ist auch das berechnete Extinktionsspektrum für ein Aggregat mit 800 nm Durchmesser dargestellt. Die gute Übereinstimmung zeigt, dass in der Messung Aggregate mit diesem Durchmesser vorliegen. Nach Ref. [131] berechnete Extinktions-, Absorptions- und Streuquerschnitte des Aggregates sind in Abbildung 6.2 b) zu sehen. Bei der Wellenlänge des Heizlasers macht die Absorption 65% der Extinktion aus. Der Streuanteil ist somit in einem Aggregat mit 800 nm Durchmesser nicht vernachlässigbar. Das Aggregat besteht aus Gold-Nanopartikeln mit 10 nm Durchmesser. Deren Streuanteil ist im nichtaggregierten Fall völlig vernachlässigbar [55], so dass Extinktion und Absorption nahezu identisch sind. Die absorbierte Leistung pro Nanopartikel ist somit aufgrund der Streuverluste im aggregierten Zustand geringer als im freien Zustand der Nanopartikel. Dies verdeutlicht, wie wichtig die Berücksichtigung der Plasmonenkopplung zur Berechnung der optothermischen Aggregatserwärmung ist.

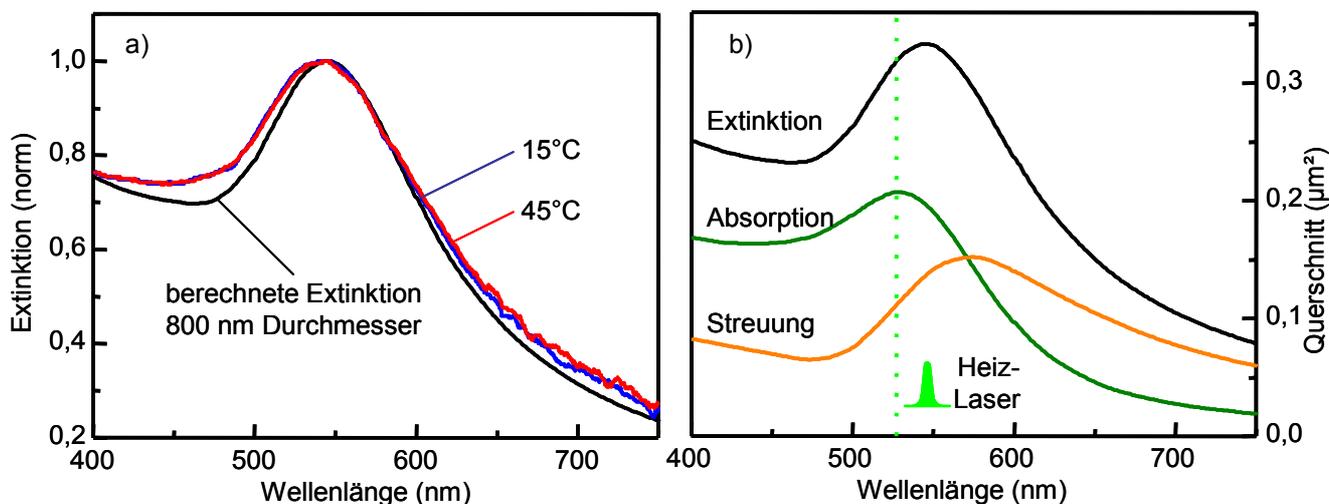


Abbildung 6.2: a) Die Extinktionsspektren der Messung aus TAbbildung 5.7 sind bei 15 °C (blau) und 45 °C (rot) nahezu unverändert. Dies zeigt, dass sich die Größe der Aggregate während der Messung nicht verändert hat. Der Verlauf des berechneten Extinktionsspektrums (schwarz) eines 800 nm Aggregates passt gut mit dem der gemessenen Spektren überein. Dies zeigt, dass während der Messung Aggregate mit 800 nm Durchmesser vorliegen. b) Der Absorptionsquerschnitt des Aggregates (dunkelgrün) ist eine wichtige Ausgangsgröße für die weiteren Simulationen. Er macht bei der Wellenlänge des Heizlasers 65% des Extinktionsquerschnittes (schwarz) aus.

Mit Absorptionsquerschnitt und Aggregatsgröße sind nun zwei wichtige Größen bekannt, die als Ausgangswerte für die thermodynamische Simulation dienen.

Diese thermodynamische Simulation des optothermisch geheizten Aggregates wird mit dem Programm Comsol Multiphysics durchgeführt. [211] Dieses löst die zeitabhängige Wärmeleitungsgleichung (2.17) mit Methoden der finiten Elemente und gibt somit Auskunft über die zeitliche Entwicklung der Temperaturverteilung innerhalb des Aggregats und in dessen Umgebung.

Ein Aggregat mit 800 nm Durchmesser besteht aus etwa 10.000 Einzelpartikeln mit jeweils 10 nm Durchmesser. Ein derart komplexes Objekt kann mit den verfügbaren Rechenkapazitäten nicht mehr als Ensemble diskreter Partikel gerechnet werden. Da die Nanopartikel im Aggregat homogen verteilt sind, kann das gesamte Aggregat als effektives Medium behandelt werden. Entsprechend den Anteilen von Gold und Wasser am Aggregatsvolumen werden effektive Materialgrößen angegeben, die die Materialmischung repräsentieren. Nach Ref. [131] und [231] erhält man somit für die gegebenen experimentellen Bedingungen die effektive Wärmeleitfähigkeit $k_{eff} = 0,636 \text{ W}/(\text{K m})$, die effektive Dichte $\rho_{eff} = 1355,3 \text{ kg}/\text{m}^3$ und die effektive Wärmekapazität $C_{eff} = 3065,2 \text{ J}/(\text{kg K})$.

Somit sind alle benötigten Größen bekannt, um die Wärmeleitungsgleichung (2.17) zu lösen. Zuvor müssen jedoch die Randbedingungen an die experimentellen Gegebenheiten angepasst werden.

In 4.2 wurde der Abstand zwischen zwei Aggregaten auf 25 μm abgeschätzt. Dort wurde auch erläutert, dass bis zu einem Zeitpunkt $\tau_{AA} = 6$ ms kein Wärmetransfer zwischen einzelnen Aggregaten stattfindet. Ein Aggregat kann folglich bis zum Zeitpunkt $\tau_{AA} = 6$ ms nach dem Heizpuls als isoliertes System in einem unendlich großen thermischen Reservoir behandelt werden. Die verfügbaren Rechenkapazitäten fordern auch hier eine Einschränkung, so dass das Wasserreservoir auf ein Kugelvolumen mit einem Durchmesser von 38 μm begrenzt wird. Im betrachteten Zeitraum einige Mikrosekunden nach dem Laserpuls ist dies eine hinreichend gute Annäherung des unendlich großen thermischen Reservoirs und lässt unverfälschte Berechnungen der Temperatur zu.

Das Modell des Aggregates in der wässrigen Lösung besteht somit aus zwei konzentrischen Kugeln. Die innere Kugel stellt das DNA-gebundene Aggregat dar, das die effektiven Materialeigenschaften k_{eff} , ρ_{eff} , C_{eff} hat und einen Durchmesser von 800 nm besitzt. Die äußere Kugel stellt das Wasserbad dar. Das gesamte System hat eine Anfangstemperatur, die der Badtemperatur im Experiment entspricht. Auf der Außenfläche der Wasserkugel herrscht konstant Badtemperatur. Eine weitere Randbedingung ist die Stetigkeit der Temperatur an der Grenzfläche Gold-Wasser.

Zuletzt fehlt noch die Wärmeverteilung im Aggregat bei Berücksichtigung des Abschattungseffektes. Aus (2.19) kann mit σ_{ABS} und I die gesamte Leistung berechnet werden, die vom Aggregat absorbiert wird: $P_{agg} = \sigma_{ABS}(527 \text{ nm}) I(527 \text{ nm})$. P_{agg} variiert mit Gaußförmigem zeitlichem Verlauf mit einer Halbwertsbreite von 260 ns und entspricht somit den experimentellen Bedingungen des eingestrahnten Pulses.

Unter Berücksichtigung des Abschattungseffektes wird diese Leistung jedoch nicht homogen auf das Aggregat verteilt. Stattdessen wird der effektive Absorptionskoeffizient $k_{ABS} = \sigma_{ABS}(527 \text{ nm})/V_{agg}$ eingeführt, der die inverse Eindringtiefe im Aggregat angibt. V_{agg} gibt hierbei das Volumen des Aggregates an. Die Leistung verteilt sich nun nach dem Lambert-Beer-Gesetz im Aggregat. Die Einfallsrichtung des Lasers verlaufe in x-Richtung und die Mittelachse durch das Aggregat in x-Richtung werde als Hauptachse bezeichnet. Von jedem beliebigen Punkt der bestrahlten Oberfläche, der sich in Entfernung r zur Hauptachse befindet, fällt die eingestrahelte absorbierte Volumenleistungs-

dichte in x-Richtung mit $Q(x_o, r) = Q_0 \exp(k_{ABS} x_o(r))$ ab. Hierbei ist x_o die Distanz, die der Strahl im Aggregat von der bestrahlten Oberfläche in x-Richtung zurückgelegt hat. Q_0 wird aus P_{Agg} und k_{ABS} durch Lösung des Integrals

$$P_{Agg} = \int_{Kugel} Q(x_o, r) dV \quad (6.32)$$

bestimmt. Für eine genauere Beschreibung der Parametrisierung der Oberfläche und die Berechnung der Leistungsverteilung sei noch einmal auf die Diplomarbeit von Calin Hrelescu verwiesen.[131] Dort wurde für die eingestrahle Leistung ein Puls in Rechteckform angenommen. In den hier folgenden Berechnungen wird dieses Modell erweitert, indem die tatsächliche Pulsform durch einen Gauß-förmigen zeitlichen Verlauf der eingestrahnten Intensität berücksichtigt wird.

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Simulation zweier experimenteller Situationen aus Abbildung 5.7, die auch als Grundlage für die Extrapolation in 6.1 dienen. Zunächst wird die Situation simuliert, die bei einer Badtemperatur von 45 °C und einer Schwellenleistungsdichte von 2,17 kW/mm² einsetzendes DNA-Schmelzen zeigt.

Abbildung 6.3 zeigt die ortsabhängige Verteilung der Wärmeleistung auf das Aggregatsvolumen unter Berücksichtigung des Abschattungseffektes zum Zeitpunkt maximaler Pulsleistung. Während die laserzugewandte Seite viel Licht absorbiert und in Wärme umwandelt, wird auf der laserabgewandten Seite aufgrund der limitierten Eindringtiefe des anregenden Lasers kaum optothermische Wärme induziert. Diese Wärme-

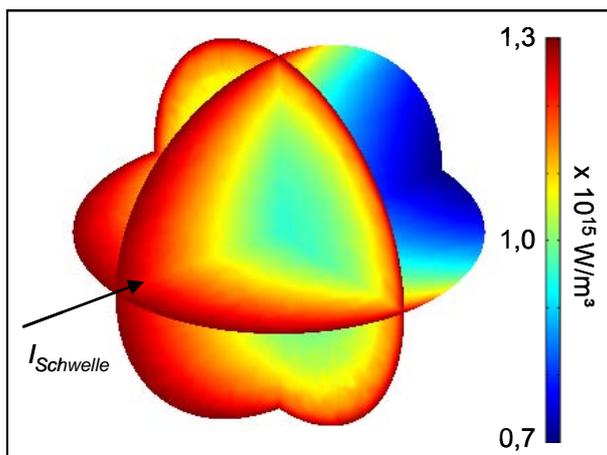


Abbildung 6.3: Die ortsabhängige Wärmeverteilung im Aggregat mit 800 nm Durchmesser ist aufgrund der limitierten Eindringtiefe des Lichts nicht homogen. Der Pfeil gibt die Einfallsrichtung des heizenden Lasers mit Leistungsdichte $I_{schwelle}$ an. Die größte Wärme wird an der bestrahlten Oberfläche induziert, die laserabgewandte Seite ist hingegen abgeschattet. Diese Wärmeverteilung dient als Grundlage zur Lösung der zeit aufgelösten Wärmeleitungsgleichung und somit zur Bestimmung der „optothermischen Schmelztemperatur“ T_M^{ot} .

verteilung dient nun als Grundlage für die Lösung der Wärmeleitungsgleichung. Diese Lösung liefert die transiente Temperaturverteilung im simulierten Volumen. Abbildung 6.4 a) zeigt einen Querschnitt durch die Hauptachse des Aggregates zum Zeitpunkt maximaler Temperatur, 150 ns nach der Pulsspitze. Die Lasereinfallsrichtung ist angegeben. Als Folge des Gradienten in der Wärmeverteilung ist der Ort maximaler Temperatur (P) nicht im Zentrum des Aggregates, sondern 70 nm zur bestrahlten Seite hin verschoben. In Abbildung 6.4 b) ist die Temperatur an diesem Ort als Funktion der Zeit zu sehen. Die maximale Temperatur, die im Aggregat erreicht wird, beträgt 90 °C. Die eingestrahelte Laserleistung war $I_{Schwelle}$, d.h. die Leistung, bei der gerade noch kein DNA-Schmelzen beobachtet wird. Dies bedeutet, dass auch die Simulation der optothermischen Schmelztemperatur eine deutliche Überhitzung der DNA ergibt. Die simulierte optothermische Schmelztemperatur stimmt zwar nicht exakt mit dem Ergebnis der Extrapolation aus 6.1 überein, jedoch wird der Trend bestätigt.

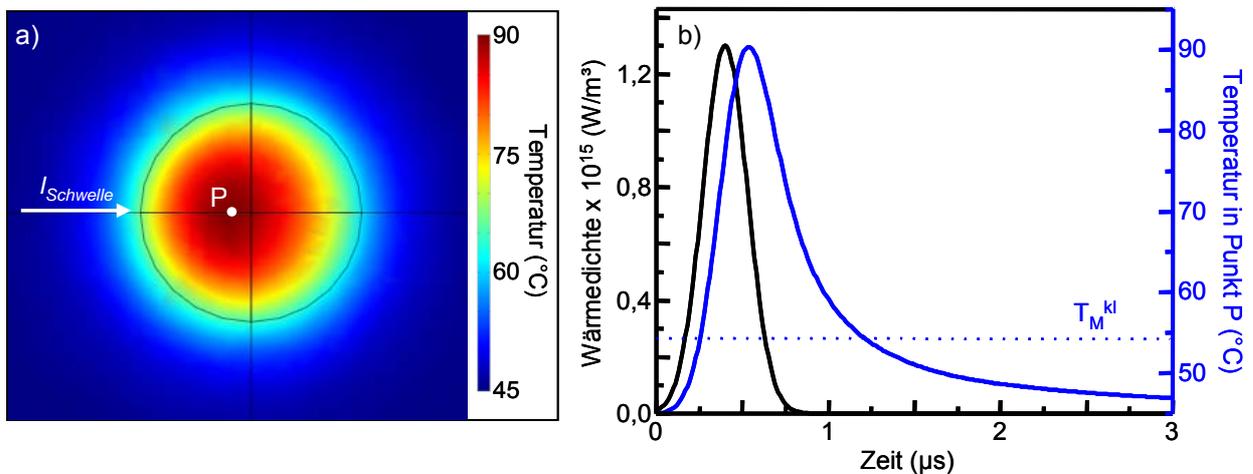


Abbildung 6.4: a) Die Temperaturverteilung im Aggregat mit 800 nm Durchmesser zum Zeitpunkt maximaler Temperatur. Als Folge des Abschattungseffektes ist das Temperaturprofil nicht symmetrisch und der Ort maximaler Temperatur (Punkt P) ist 70 nm zur bestrahlten Oberfläche verschoben. Der Pfeil gibt die Einfallsrichtung des heizenden Lasers mit Leistungsdichte $I_{Schwelle}$ an. Die Badtemperatur beträgt 45 °C, die maximale Endtemperatur, und somit die optothermische Schmelztemperatur T_M^{ot} beträgt 90 °C. b) Die Temperatur im Punkt P (blau) steigt während des Pulses mit Halbwertsbreite 260 ns (schwarz) rasch an. Der Puls wird repräsentiert durch die Wärmedichte an der bestrahlten Oberfläche. Die Badtemperatur von 45 °C liegt nahe an der klassischen Schmelztemperatur T_M^{kl} (gestrichelte, blaue Linie). Wenn DNA-Schmelzen beobachtet wird, herrschen im Inneren des Aggregates 90 °C. T_M^{kl} wird für etwa 1 μs um 36 °C überschritten.

Es wurde eine weitere Situation der Messreihe simuliert, die als Grundlage der Extrapolation in 6.1 diente. Die Aggregatsgröße ist bei $T_B = 15\text{ °C}$ im Vergleich zur vorherigen Situation mit $T_B = 45\text{ °C}$ unverändert (vgl. Abbildung 6.2 a)). Somit bleiben alle übrigen Parameter für die elektrodynamische und thermodynamische Simulation gleich. In 5.2.1 wurde bei der Badtemperatur von 15 °C eine Schwellen-Leistungsdichte von $3,2\text{ kW/mm}^2$ gemessen. Legt man der Simulation diese Werte zugrunde, so erreicht man eine Maximaltemperatur von 85 °C im Aggregat. Trotz 30 °C geringerer Badtemperatur ist die Endtemperatur vergleichbar mit dem Ergebnis der ersten Simulation. Dies bestätigt das Ergebnis der Extrapolations-Methode aus 6.1, wobei die Abweichungen aufgrund der Komplexität des zugrunde liegenden Modells sehr akzeptabel sind.

Beide Simulationen und die hiervon unabhängige Extrapolation im vorhergehenden Kapitel zeigen, dass die DNA erst bei $85\text{-}101\text{ °C}$ schmilzt, wenn die erwärmte Phase nur etwa $1\text{ }\mu\text{s}$ anhält. Im folgenden Kapitel soll eine Erklärung für die Ursachen der Überhöhung der optothermischen Schmelztemperatur gegenüber der klassischen Schmelztemperatur gegeben werden.

6.3 Limitierte Reaktionszeit der DNA als Ursache für die DNA-Überhitzung.

In den beiden vorhergehenden Abschnitten ist durch zwei unabhängige Methoden gezeigt worden, dass die DNA in Gold-Nanopartikel-Aggregaten bei kurzzeitiger Erhitzung Temperaturen von bis zu 85-101 °C ausgesetzt werden kann, ohne zu schmelzen. Dies entspricht der optothermischen Schmelztemperatur. Bei dauerhafter Erwärmung schmilzt die DNA hingegen bereits bei der klassischen Schmelztemperatur $T_M^{kl} = 54$ °C.

Die optothermische DNA-Überhitzung ist nicht das Ergebnis einer Einzelmessung, sondern konnte mehrfach an unterschiedlichen Systemen bestätigt werden. Schon die Diplomarbeit von Calin Hrelescu weist in unabhängigen Messungen auf diesen Trend hin[131] und an einem Hybridsystem aus 40 nm-Partikeln wurden Überhöhungen bis zu 200 °C gemessen. In diesem Abschnitt werden mögliche Gründe für die DNA-Überhitzung vorgestellt und diskutiert.

Wie bereits in 2.3.1 vorgestellt worden ist, wird ein Ensemble aus vielen DNA-Molekülen häufig als Zwei-Zustands-Modell beschrieben. [6, 145, 147, 151] Die beiden Zustände sind hierbei der einzelsträngige und der doppelsträngige Zustand. Der Übergang zwischen diesen Zuständen sind Öffnung (oder Schmelzen) und Schließen (oder Hybridisieren) der DNA. In den Experimenten dieser Arbeit werden Doppelstränge aus drei DNA-Einzelsträngen gebildet (vgl. Abbildung 5.2). Die Reaktion lautet somit:



Ein Ensemble unterliegt ständigen Öffnungs- und Bindungsprozessen. Das Schmelzen und Hybridisieren der DNA-Doppelhelix ist also ein Resultat dieser konkurrierenden, dynamischen Ereignisse. k ist die Öffnungsrate und k_+ die Schließrate der DNA. Beide Raten steigen, wie bereits in 2.3.1 eingeführt, mit zunehmender Temperatur T an, wobei k stärker mit T ansteigt als k_+ . Die klassische Schmelztemperatur T_M^{kl} ist die Temperatur, bei der beide Raten gleich groß sind. Für $T < T_M^{kl}$ überwiegen die Schließereignisse und der Großteil des Ensembles liegt im doppelsträngigen Zustand vor. Ist $T > T_M^{kl}$, so über-

wiegen die Öffnungsereignisse und der vorherrschende Zustand im DNA-Ensemble ist der einzelsträngige. In welche Richtung die Reaktion verläuft wird also durch das Verhältnis der beiden Raten festgelegt. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird durch die chemische Reaktionszeit τ_R ausgedrückt. τ_R ist die Zeit, die ein System benötigt, das sich in einem der Zustände befindet, um in den jeweils anderen Zustand überzugehen. τ_R ist das Inverse der Summe der beiden Raten[232, 233]:

$$\tau_R = \frac{1}{k_+ + k_-} \quad (6.33)$$

Da beide Raten k_+ und k_- mit zunehmender Temperatur T steigen, nimmt die Reaktionszeit τ_R mit steigender Temperatur ab. Werden DNA-Doppelstränge aus zwei oder mehr DNA-Einzelsträngen zusammengesetzt, so ist die Schließrate k_+ abhängig von der Konzentration der DNA. [6, 151] Dies erschwert die Abschätzung der chemischen Reaktionszeit für die in diesem Experiment vorliegende Situation.

Die Bildung der Aggregate beginnt im Zustand geringer Konzentrationen, da die Bindungspartner über das gesamte Volumen der Lösung verteilt sind. In diesem Zustand kommen selten Bindungsereignisse zustande, so dass die Bildung der Aggregate über mehrere Minuten bis zu Stunden erfolgt. Im aggregierten Zustand herrscht in den Aggregaten lokal eine sehr hohe Konzentration von DNA, da die Partikeloberflächen sehr dicht mit DNA funktionalisiert sind und je zwei Partikel durch mehrere DNA-Stränge verbunden werden.[16] Die zeitaufgelösten Messungen in 5.2 zeigen, dass sich diese hohe DNA-Konzentration in den Aggregaten während der erhitzten Phase nicht ändert, da die Partikel erst auf deutlich längerer Zeitskala auseinander diffundieren. Es stehen somit in der direkten Umgebung eines DNA-Stranges ständig ausreichend Bindungspartner zur Verfügung. Eine vergleichbare Situation liegt in DNA-Schleifen (engl. DNA-Hairpins) vor. Diese Schleifen bilden sich, indem sich zwei Enden eines DNA-Stranges miteinander zu einem DNA-Doppelstrang verbinden. Die beiden bindenden Sequenzen sind hierbei durch die einzelsträngige DNA in der Schleife miteinander verbunden. Hierdurch liegen die bindenden Sequenzen immer in hoher „lokaler Konzentration“ vor, unabhängig von der tatsächlichen „globalen Konzentration“ in der Lösung. Für eine Abschätzung der Reaktionszeit des DNA-Schmelzens scheint also ein Vergleich mit DNA-Schleifen plausibel. In DNA-Schleifen sind die Öffnungs- und Schließraten konzentrationsunabhängig. [232, 233] Dies erleichtert die Abschätzung der Zeitskala für DNA-Öffnungs- und

Schließprozesse. In der Literatur werden für DNA-Schleifen Reaktionszeiten zwischen 3 μs und 1 ms berichtet. [232, 233]

Vor diesem Hintergrund ist auch die Überhitzung der DNA zu erklären, die beobachtet wird, wenn die klassische Schmelztemperatur T_M^{kl} für nur 1 μs überschritten wird. Zwar ist die exakte Reaktionszeit τ_R für das hier untersuchte System nicht bekannt, jedoch kann aufgrund der Ergebnisse in 6.1 und 6.2 davon ausgegangen werden, dass diese bei der klassischen Schmelztemperatur $T_M^{kl} = 54\text{ }^\circ\text{C}$ größer als 1 μs ist. Dann nämlich reicht die optothermische Erhitzung für etwa 1 μs nicht aus, um den Übergang vom doppelsträngigen in den einzelsträngigen Übergang zu vollziehen. Mit steigender Temperatur sinkt jedoch die Reaktionszeit. Erst bei der optothermischen Schmelztemperatur T_M^{ot} ist die Reaktionszeit ausreichend kurz, dass der Zustandsübergang innerhalb 1 μs möglich ist. Die DNA kann nun in kürzerer Zeit schmelzen, als bei T_M^{kl} .

Eine Abnahme der Reaktionszeit mit der Temperatur konnte bereits experimentell nachgewiesen werden.[232, 233] Nach bisherigem Stand der Literaturrecherche war es bisher jedoch nicht möglich, die DNA für einen Zeitraum zu erhitzen, der kürzer als die chemische Reaktionszeit bei der klassischen Schmelztemperatur ist. Ein Überhitzen der DNA konnte somit bisher nicht beobachtet werden. Dies ist erst durch das lokale Heizen der DNA in den Nanopartikel-Aggregaten möglich.

Ein Aspekt, der im Zusammenhang mit der DNA-Überhitzung angesprochen werden muss, ist das Sieden von Wasser auf der Nanometer- und Mikrometer-Skala. Die Extrapolation in 6.1 ergab als optothermische Schmelztemperatur $T_M^{ot} = 101\text{ }^\circ\text{C}$. Da dies die Siedetemperatur von Wasser ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem gemessenen Effekt nicht um DNA-Schmelzen, sondern um Sieden von Wasser und damit verbundene Bildung von Dampfblasen handelt. Es gibt jedoch viele Hinweise, die gegen diese Interpretation sprechen:

- Wasser kann in der Umgebung von Nano- und Mikropartikeln auf bis zu $280\text{ }^\circ\text{C}$ überhitzt werden, ohne zu sieden.[70, 75, 76, 98, 226, 228, 229].
- An Dampfblasen würde das Licht stark gestreut werden, wodurch es zu einer Zunahme der Extinktion im gesamten Spektralbereich käme. Beobachtet wird jedoch eine Abnahme der Extinktion im roten Spektralbereich.

- Das lang anhaltende Signal, das Aggregats-Dissoziation als Folge von DNA-Schmelzen zugeschrieben wird, wurde in 5.2.2 bei zwei Wellenlängen untersucht. Dort zeigte es das gleiche spektrale Verhalten, wie die Resonanzverschiebung aufgrund von DNA-Schmelzen in den zeitintegrierten Messungen. Die beobachtete Extinktionsänderung kann also vollkommen ohne Dampfblasenbildung erklärt werden.
- Nachdem die Wärmezufuhr beendet wird, kollabiert eine Dampfblase rapide innerhalb weniger Nanosekunden. [75] Tatsächlich hält die lang anhaltende Extinktionsänderung jedoch für mehrere Sekunden an (vgl. 5.2).

Sollte das Sieden von Wasser - entgegen all dieser Hinweise - die Ursache für die lang anhaltende Extinktionsänderung sein, so wäre die DNA dennoch bis 101 °C überhitzt, ohne zu schmelzen.

7 Anwendung: Schnelle SNP-Detektion nach optothermischem Einzelpuls-Heizen

In diesem Kapitel werden optothermisch geheizte Gold-Nanopartikel-Aggregate eingesetzt, um eine ultraschnelle Untersuchung auf eine DNA-Mutation durchzuführen. Es wird gezeigt, dass mit einem einzigen Laserpuls zwischen mutierter und unmutierter DNA unterschieden werden kann, ohne eine langwierige, klassische Schmelzkurve aufzunehmen.

Wie bereits in 2.3.1 dargestellt wurde, kann bereits die Änderung eines einzelnen Basenpaares in der DNA, ein sog. SNP (Single Nucleotide Polymorphism), für genetische Merkmale eines Individuums ausschlaggebend sein. Die Untersuchung und der Nachweis von SNPs ist daher eine der Schlüsselaufgaben in der molekularen Diagnostik und der Biotechnologie. Diese Untersuchung ist auch eine der grundlegenden Anwendungen klassischer DNA-Schmelzkurven. Hierzu wird die Schmelztemperatur der zu untersuchenden DNA bestimmt und mit der Schmelztemperatur einer vergleichbaren DNA mit bekannter Sequenz verglichen. SNPs führen bei Hybridisierung mit einzelsträngiger Referenz-DNA zu Basenfehlstellen. Dies wurde ausführlich in Abschnitt 2.3.1 dargestellt. Da DNA Doppelstränge mit Basenfehlstelle eine niedrigere Schmelztemperatur besitzen als DNA-Doppelstränge ohne Basenfehlstelle, lässt der Schmelzkurven-Vergleich Aussagen über SNPs in der untersuchten DNA zu.

In diesem Kapitel werden Ergebnisse erster Versuche vorgestellt, Verbindungs-DNA mit und ohne Basenfehlstelle durch die Methode der optothermisch geheizten Gold-Nanopartikel-Aggregate zu unterscheiden.

Hierzu werden zwei Chargen von Aggregaten hergestellt und verglichen: die erste Charge besteht aus Aggregaten, deren Verbindungs-DNA A vollständig komplementär mit den Erkennungssequenzen der beiden goldgebundenen DNA-Stränge ist (vgl. Abbildung 7.1 a)). Die zweite Charge verwendet die gleichen goldgebundenen Sequenzen, diese binden nun jedoch an eine Verbindungs-Sequenz B, die sich in einer Base von der Verbindungs-DNA A unterscheidet (vgl. Abbildung 7.1 b)). Dies entspricht einem künstlich eingeführten SNP. Zur Vereinfachung wird die letzte Aggregat-Charge „Aggregat mit SNP“ genannt, die erste „Aggregat ohne SNP“. Um diese beiden Aggregat-Gruppen zunächst klassisch zu charakterisieren, wird jeweils langsam die Temperatur erhöht und dabei die Extinktion bei 650 nm aufgezeichnet. Die so entstehenden klassi-

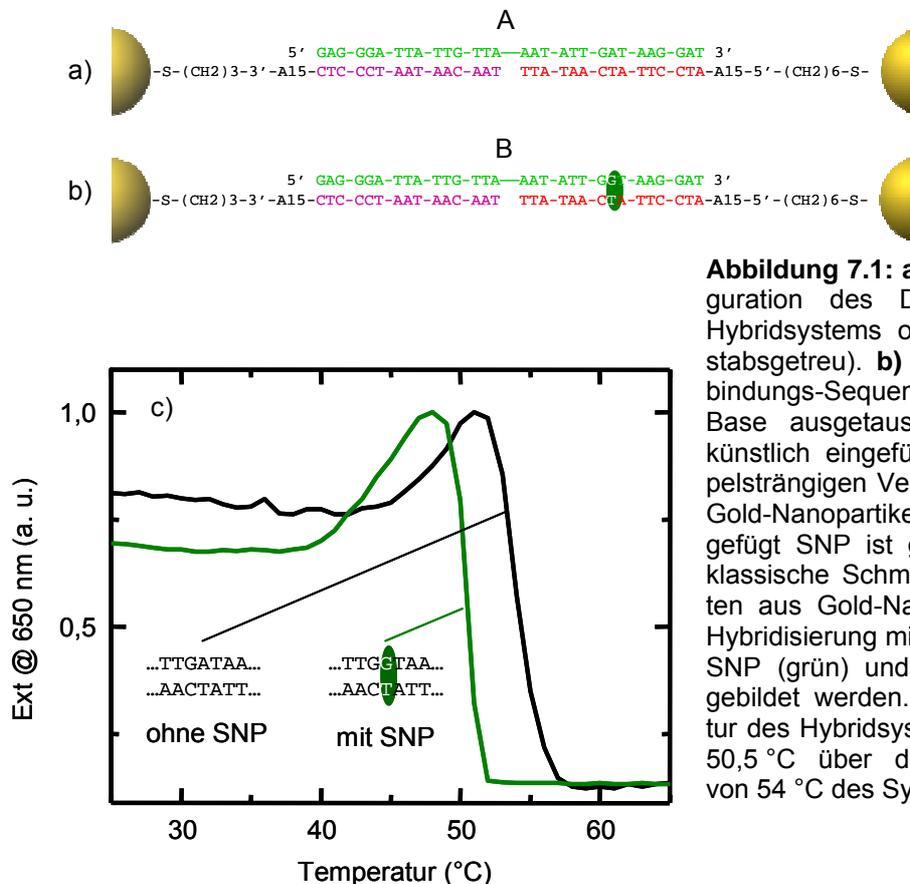


Abbildung 7.1: **a)** Die Tail-to-Tail-Konfiguration des DNA/Gold-Nanopartikel-Hybridsystems ohne SNP (nicht maßstabsgetreu). **b)** Eine A-Base der Verbindungs-Sequenz wurde gegen eine G-Base ausgetauscht. So entsteht ein künstlich eingefügter SNP in der doppelsträngigen Verbindung zwischen den Gold-Nanopartikeln. Der künstlich eingefügt SNP ist grün hinterlegt. **c)** Die klassische Schmelzkurve von Aggregaten aus Gold-Nanopartikeln, die durch Hybridisierung mit Verbindungs-DNA mit SNP (grün) und ohne SNP (schwarz) gebildet werden. Die Schmelztemperatur des Hybridsystems mit SNP liegt mit 50,5 °C über der Schmelztemperatur von 54 °C des Systems ohne SNP.

schen Schmelzkurven sind in Abbildung 7.1 c) zu sehen. Die Aggregate mit SNP haben eine um $3,5\text{ °C}$ geringere Schmelztemperatur als die Aggregate ohne SNP, da ein Watson-Crick-Paar weniger zur Bindung beiträgt (vgl. 2.3.1). Ein SNP kann in der klassischen Schmelzkurve somit nachgewiesen werden. Die Messung der hierfür notwendigen, klassischen Schmelzkurve dauert jedoch etwa eine Stunde, da die Temperatur schrittweise langsam erhöht wird, bis eine Abnahme der Extinktion das Schmelzen der DNA signalisiert. Nach den Beobachtungen in Kapitel 5.2 genügt beim optothermischen Schmelzen von DNA in Nanopartikel-Aggregaten jedoch bereits ein Laserpuls, um zu entscheiden, ob die DNA schmilzt oder nicht.

Als Badtemperatur wird 45 °C gewählt. Dies liegt etwas unterhalb der klassischen Schmelztemperatur der Aggregate mit SNP. Die eingestrahlte Leistungsdichte I liegt mit $2,9\text{ kW/mm}^2$ etwas unterhalb der Schwellenleistungsdichte $I_{\text{Schwelle}} = 3,1\text{ kW/mm}^2$ der Aggregate ohne SNP. Abbildung 7.2 a) zeigt die transienten Extinktionsänderungen der beiden unterschiedlichen Aggregatgruppen nach jeweils einem einzigen Laserpuls dieser Leistungsdichte mit einer Pulsdauer von 300 ns . Da hier im Gegensatz zu Abbildung 5.3 nicht über mehrere Einzelpulse gemittelt wird, sind die hier vorliegenden Einzeldaten verrauschter. Als Orientierungslinien sind daher biexponentielle Ausgleichskurven an die Einzeldaten eingezeichnet. Bei der gewählten Leistungsdichte I , die zu schwach ist, um die DNA ohne SNP zu schmelzen, wird keine lang anhaltende Extinktionsänderung für die Aggregate ohne SNP gemessen. Das Ergebnis der Extinktionsmessung ändert sich, wenn Aggregate mit SNP unter den gleichen Bedingungen mit einem einzigen Laserpuls bestrahlt werden. Nun zeigt eine lang anhaltende Extinktionsänderung, dass durch den Puls optothermisches DNA-Schmelzen induziert worden ist und Gold-Nanopartikel aus den Aggregaten freigesetzt worden sind (Abbildung 7.2 a), schwarze Linie). Dieses Experiment zeigt, dass mit einem einzigen Laserpuls zwischen Aggregaten mit und ohne SNP unterschieden werden kann, wobei das Messfenster nur 1 ms lang ist.

Diese schnelle Einzelpuls-Unterscheidung zwischen Aggregaten mit und ohne SNP zeigt bereits, dass die Methode lokal geheizter Gold-Aggregate großes Potential für die Anwendung in der Biotechnologie und der molekularen Diagnostik hat. Dort könnte das Verfahren für schnelle SNP-Analysen auf der Millisekunden-Zeitskala eingesetzt werden und würde somit klassische Schmelzkurven auf der Minuten- bis Stunden-Zeitskala überflüssig machen.

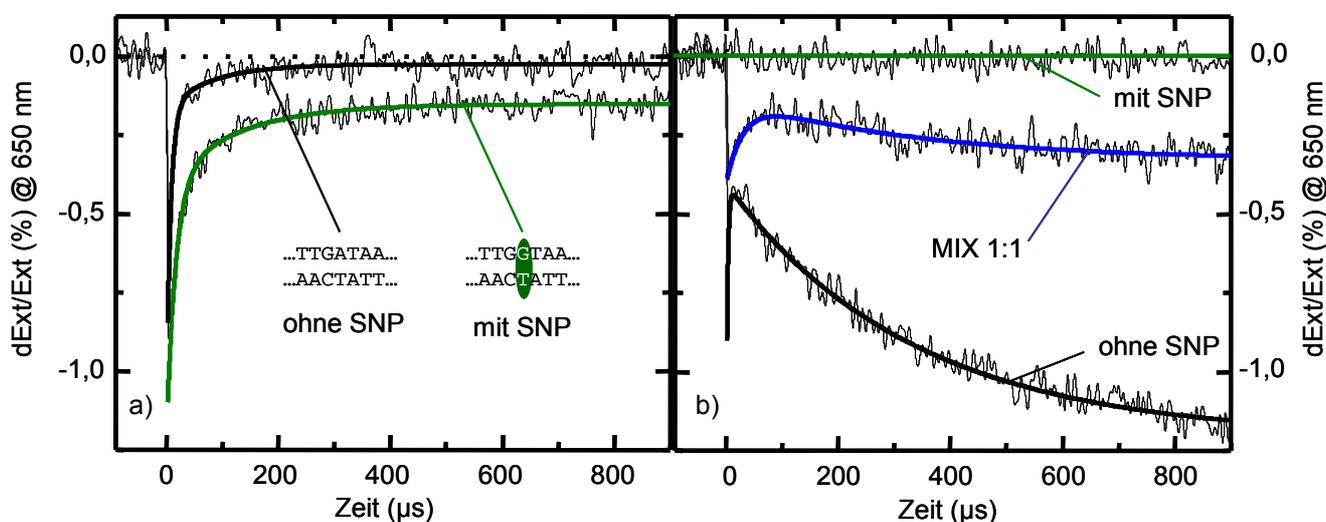


Abbildung 7.2: a) Extinktionsänderung nach einem einzelnen Laserpuls mit einer Leistungsdichte von $2,9 \text{ kW/mm}^2$ bei einer Badtemperatur von $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Biexponentielle Ausgleichskurven an die Einzelpuls-Transienten wurden zur besseren Orientierung eingezeichnet. Verbindungs-DNA mit SNP (grün) kann nach einem einzelnen Puls von Verbindungs-DNA ohne SNP (schwarz) unterschieden werden. Nur bei der DNA mit SNP kommt es zu einer langanhaltenden Extinktionsabnahme, die DNA-Schmelzen signalisiert. b) Die gleiche Messung bei einer Badtemperatur von $53 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Leistungsdichte von $3,8 \text{ kW/mm}^2$. Bei dieser Badtemperatur sind die Aggregate mit SNP (grün) komplett aufgelöst und zeigen keine optische Reaktion auf den Anregelaser. Für Aggregate mit SNP (schwarz) beobachtet man eine langanhaltende Extinktionsabnahme als Indikator für optothermisches DNA-Schmelzen. Auch eine 1:1-Mischung aus beiden Verbindungs-Sequenzen zeigt die langanhaltende Extinktionsänderung, jedoch mit kleinerer Amplitude als die Aggregate, die nur Verbindungs-DNA ohne SNP enthalten. Alle drei Fälle können nach einem Einzelpuls in einem Beobachtungsfenster von 1 ms unterschieden werden.

Im Folgenden soll geprüft werden, ob die Methode im Stande ist, DNA mit und ohne SNP in einer Lösung nachzuweisen. Diesen Ansatz der gleichzeitigen Analyse mehrerer Analyten in einem Volumen bezeichnet man auch als Multiplexing.

Um die Multiplexing-Fähigkeit der Methode zu untersuchen, wird eine dritte Charge von Aggregaten hergestellt, die mit einer 1:1 Mischung aus Verbindungs-DNA mit und ohne SNP angesetzt wird. Diese Charge heißt im Folgenden MIX. Abbildung 7.2 b) zeigt die Extinktionsänderung der drei unterschiedlichen Chargen bei einer Leistungsdichte von $3,8 \text{ kW/mm}^2$. Wählt man eine Badtemperatur von $53 \text{ }^\circ\text{C}$, so sind die Aggregate, die nur DNA mit SNP enthalten, komplett dissoziiert (vgl. Schmelzkurve in Abbildung 7.1 c)) und zeigen keine Antwort auf den Heizpuls. Beide Proben, die DNA ohne SNP enthalten, sind bei dieser Temperatur noch aggregiert. Die Probe, die nur DNA mit SNP enthält, zeigt eine klare, lang anhaltende Extinktionsänderung. Die MIX-Probe zeigt eine Transiente, die zwischen den Transienten der beiden reinen Proben liegt. Sie kann klar von den

beiden anderen Proben unterschieden werden und besteht bei 53 °C offensichtlich aus einer Mischung aus freien, ungebundenen Gold-Nanopartikeln und Aggregaten, die durch DNA ohne SNP gebunden werden.

Die Methode ist im Stande, zwischen Aggregaten zu unterscheiden, die nur aus DNA mit SNP, nur aus DNA ohne SNP oder aus einer Mischung der beiden gebunden werden. Diese ersten angewandten Experimente zeigen somit, dass optothermisches DNA-Schmelzen in Nanopartikel-Aggregaten großes Potential für die biotechnologische und diagnostische Anwendung in SNP-Analysen hat. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit ermöglicht es einen hohen Durchsatz von SNP-Analysen und bietet dabei die Option auf Multiplexing.

8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass optothermisches DNA-Schmelzen durch optisch geheizte Gold-Nanopartikel-Aggregate möglich ist. Hierbei konnte zunächst zwischen zwei Fällen der optothermischen Erwärmung unterschieden werden: kontinuierliche Bestrahlung führt zu globaler, homogener Erwärmung des gesamten laserbestrahlten Wasservolumens einschließlich der aggregatfreien Zwischenräume im Wasser; durch gepulste Bestrahlung wird eine lokale Erwärmung erreicht, die auf die Aggregate und deren nächste Umgebung begrenzt ist. In zeitaufgelösten Extinktionsmessungen wurde der Temperaturanstieg in den Aggregaten während des Laserpulses von ~ 100 ns Pulsdauer beobachtet. Die Abkühlung der Aggregate erfolgt innerhalb weniger Mikrosekunden, und ist somit etwa drei Größenordnungen langsamer als die Abkühlung einzelner Nanopartikel. Kleine Aggregate kühlen deutlich schneller ab als große. Überschreitet die eingestrahelte optische Leistungsdichte eine bestimmte Schwellen-Leistungsdichte, so wird eine mehrere Sekunden andauernde Extinktionsabnahme im roten Spektralbereich gemessen. Diese kann der Verschiebung und Breitenreduktion der Plasmonresonanz als Folge des optothermischen DNA-Schmelzens und dem daraus resultierenden Auflösen der Aggregate zugeordnet werden. Die Schwellen-Leistungsdichte für optothermisches DNA-Schmelzen sinkt mit steigender Aggregatgröße, da in großen Aggregaten bereits bei kleineren Leistungsdichten die Temperatur erreicht wird, bei der die DNA schmilzt. Auch durch steigende Badtemperatur wird die zum DNA-Schmelzen benötigte Leistungsdichte reduziert, da der benötigte Temperatursprung bis zum Schmelzen der DNA geringer wird. Die Extrapolation der linear mit der Badtemperatur sinkenden Schwellen-Leistungsdichte weist jedoch als „optothermische Schmelztemperatur“ nicht die „klassische Schmelztemperatur“ aus, die durch schrittweises, langsames Erhö-

hen der Temperatur gewonnen wird. Während die „klassische Schmelztemperatur“ bei 54 °C liegt, schmilzt die DNA erst bei etwa 100 °C, wenn sie nur für 1 μ s optothermisch erhitzt wird. Diese Überhitzung der DNA konnte auch durch eine numerische Modellrechnung mit den Methoden der Diskreten Dipol-Approximation und der finiten Elemente bestätigt werden. Das hier verwendete Modell berücksichtigt im Vergleich zu einem analytischen Modell zur optothermischen Erwärmung von Aggregaten aus Nanopartikeln[4], dass sich die Absorption pro Nanopartikel im aggregierten Zustand aufgrund der Plasmonenkopplung von der Absorption freier Nanopartikel unterscheidet. Zusätzlich berücksichtigt das Modell Abschattungseffekte, die aufgrund der limitierten Eindringtiefe des Anregelasers in großen Aggregaten auftreten. Die Überhitzung der DNA wird als Resultat der limitierten Reaktionszeit der DNA diskutiert, also der Zeit, welche die DNA benötigt, um vom doppelsträngigen in den einzelsträngigen Zustand überzugehen. Bei der klassischen Schmelztemperatur von 54 °C ist die Reaktionszeit der DNA offensichtlich länger als die Dauer des optothermisch erwärmten Zustands von etwa 1 μ s Dauer. Mit steigender Temperatur verkürzt sich die Reaktionszeit. Bei der optothermischen Schmelztemperatur von 101 °C ist die Reaktionszeit der DNA schließlich kürzer als die Dauer des erwärmten Zustands von 1 μ s, somit kann DNA-Schmelzen beobachtet werden. Ein ähnliches Verhalten ist bisher nur an Proteinen, nicht jedoch an DNA gezeigt worden. [106, 226] Dies ist erst durch die in dieser Arbeit vorgestellte lokale Erwärmung der DNA in den Gold-Aggregaten möglich, die neben der schnellen Erwärmung vor allem eine schnelle Abkühlung und somit kurze erwärmte Phasen ermöglicht.

Das optothermische DNA-Schmelzen führt zur Freisetzung der Gold-Nanopartikel aus den Aggregaten. Die freigesetzten Nanopartikel diffundieren innerhalb weniger ms auseinander und verursachen somit eine messbare Extinktionsänderung. Dieses schnelle Messverfahren für DNA-Schmelzen wurde in Kapitel 7 auf ein System angewandt, das einen künstlich eingeführten SNP, also eine Basenfehlstelle in der DNA-Doppelbindung enthält. Dieses DNA/Gold-Nanopartikel-Hybridssystem hat eine geringere klassische Schmelztemperatur als ein vergleichbares System ohne SNP. Erste Experimente zeigen, dass DNA mit und ohne SNP mit einem einzigen heizenden Laserpuls unterschieden werden können. Die Unterscheidung kann in einem Messfenster von 1 ms Dauer erfolgen. Eine langwierige klassische Schmelzanalyse mit 15-60 Minuten Dauer entfällt hier-

durch. Dies zeigt das große Anwendungspotential der vorgestellten Methode für ultraschnelle DNA-Analysen im biotechnologischen und molekulardiagnostischen Einsatz. Aufbauend auf diese Arbeit und der hieraus entstandenen internationalen Patentanmeldung[234, 235] konnte eine Drittmittelförderung eingeworben werden, die es erlaubt, in den folgenden 18 Monaten im Rahmen des Förderprogramms „EXIST Forschungstransfer – Existenzgründungen aus der Wissenschaft“ die Methode systematisch zur Marktreife weiterzuentwickeln. Dies soll insbesondere mit Spezialisierung auf SNP-Untersuchungen geschehen, um in Zukunft innerhalb weniger Millisekunden eine DNA-Schmelzanalyse durch optisch geheizte Nanoheizplatten auch im biotechnologischen Laboralltag ermöglichen.

Publikationen:

Stehr, J., Hrelescu, C., Sperling, R. A., Raschke, G., Wunderlich, M., Nichtl, A., Heindl, D., Kürzinger, K., Parak, W. J., Klar, T. A. and Feldmann, J., *Gold NanoStoves for microsecond DNA melting analysis*. Nano Letters, 2008. **8**(2): p. 619-623.

Stehr, J., Klar, T. A., Feldmann, J., Hrelescu, C., Parak, W., Raschke, G., Sperling, R., Wunderlich, M., Kürzinger, K., Heindl, D., Nichtl, A.,
Eingereichtes Patent: „*Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren*“, DE 10 2007 027 654.2, 2007

Stehr, J., Klar, T. A., Feldmann, J., Hrelescu, C., Parak, W., Raschke, G., Sperling, R., Wunderlich, M., Kürzinger, K., Heindl, D., Nichtl, A.,
Eingereichtes Patent: „*Process for detecting nucleic acids*“, PCT/EP2008/056505

Ringler, M., Klar, T. A., Schwemer, A., Susha, A. S., Stehr, J., Raschke, G., Funk, S., Borowski, M., Nichtl, A., Kürzinger, K., Phillips, R. T. and Feldmann, J., *Moving nanoparticles with Raman scattering*. Nano Letters, 2007. **7**(9): p. 2753-2757.

Hrelescu, C., Stehr, J., et al. in Vorbereitung

Präsentationen:

International:

Gold NanoStoves for Microsecond DNA Melting Analysis

J. Stehr, C. Hrelescu, R. A. Sperling, G. Raschke, M. Wunderlich, A. Nichtl, D. Heindl, K. Kürzinger, W. J. Parak, T. A. Klar and J. Feldmann. Annual Meeting of the Biophysical Society, Long Beach (USA), Februar 2008

Rapid DNA sensing by laser-induced gold-nanoparticle heating

J. Stehr, C. Hrelescu, R. A. Sperling, G. Raschke, D. Heindl, M. Wunderlich, A. Nichtl, K. Kürzinger, W. J. Parak, T. A. Klar and J. Feldmann. BIOS 2008, San Jose (USA), Januar 2008

NanoStoves for Microsecond DNA Melting Analysis – A future spin-off in Nano-Biotech

Aussteller-Stand der Nanosystems-Initiative Munich im Rahmen der Internationalisierungsstrategie der Bundesregierung „Research in Germany – Land of Ideas“ / „Welcome to Nanotech Germany“ auf der Messe zur NSTI Nanotechnology, Boston (USA), Juni 2008

National:*Projekt NANOSTOVE*

J. Stehr, F. Bürsgens, L. Ullerich

Vortrag vor Expertenjury, einberufen vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi): Entscheidung über Projektförderung im Rahmen des Programmes EXIST Forschungstransfer, Berlin (Deutschland), Mai 2008

Resultat: Eines von bundesweit 15 geförderten Drittmittelprojekten im Rahmen EXIST Forschungstransfer 2008, eingeworbene Fördersumme: 360.000 EUR

Jury-Präsentation

J. Stehr, F. Bürsgens, L. Ullerich

Münchener Businessplan Wettbewerb – „Excellence Stage“:

3. Platz , Kategorie Marathon, Preisgeld: 5000 EUR, Juli 2008

Jury-Präsentation

J. Stehr, F. Bürsgens, L. Ullerich

Münchener Businessplan Wettbewerb – „Development Stage“:

5. Platz, Preisgeld: 750 EUR, Mai 2008

Jury-Präsentation

J. Stehr, F. Bürsgens

Münchener Businessplan Wettbewerb – Ideas Stage:

1. Platz (LMU), Kategorie „Idee von wissenschaftlichen Mitarbeitern / Doktoranden“, Preisgeld: 500 EUR, Februar 2008

Nano-Heizplatten für ultraschnelle DNA-Analyse

Aussteller-Stand am NanoDay - Tag der Nanowissenschaften der Nanosystems-Initiative Munich, München (Deutschland), Oktober 2007

Time resolved temperature measurements using molecular thermometers

J. Stehr, J. M. Lupton, M. Reufer, G. Raschke, T. A. Klar and J. Feldmann. SFB 486
Workshop „Manipulation von Materie auf der Nanometerskala“, Ringberg (Deutschland),
März 2004

Literaturverzeichnis

1. Quelokey, *Wikipedia: Desoxyribonukleinsäure*. 2005, released into the public domain, aufgerufen am 19.09.2008: <http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäure>.
2. Parak, W.J., et al., *Conformation of Oligonucleotides Attached to Gold Nanocrystals Probed by Gel Electrophoresis*. *Nano Letters*, 2003. **3**: p. 33-36.
3. Ströck, M., *Wikipedia: Desoxyribonukleinsäure*. 2006, released under the GFDL, aufgerufen am 19.09.2008: <http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäure>.
4. Govorov, A.O., et al., *Gold nanoparticle ensembles as heaters and actuators: melting and collective plasmon resonances*. *Nanoscale Research Letters*, 2006. **1**(1): p. 84-90.
5. Cargill, M., et al., *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes*. *Nature Genetics*, 1999. **22**(3): p. 231-238.
6. Owczarzy, R., et al., *Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers*. *Biopolymers*, 1997. **44**(3): p. 217-239.
7. Syvanen, A.C., *Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms*. *Nature Reviews Genetics*, 2001. **2**(12): p. 930-942.
8. Katz, E. and I. Willner, *Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004. **43**(45): p. 6042-6108.

9. Kreibig, U. and M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer Series in Materials Science, ed. U. Gonser, et al. Vol. 25. 1995, Berlin: Springer-Verlag.
10. Bohren, C. and D. Huffmann, *Absorption and scattering of light by small particles*. 1983, New York: John Wiley & Sons.
11. Raschke, G., et al., *Biomolecular Recognition Based on Single Nanoparticle Light Scattering*. Nano Letters, 2003. **3**: p. 935-938.
12. Wilcoxon, J.P., J.E. Martin, and D.W. Schaefer, *Aggregation in Colloidal Gold*. Physical Review A, 1989. **39**(5): p. 2675-2688.
13. Quinten, M. and U. Kreibig, *Optical-Properties of Aggregates of Small Metal Particles*. Surface Science, 1986. **172**(3): p. 557-577.
14. Rosi, N.L. and C.A. Mirkin, *Nanostructures in biodiagnostics*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1547-1562.
15. *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*, ed. C.M. Niemeyer and C.A. Mirkin. 2004, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
16. Elghanian, R., et al., *Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles*. Science, 1997. **277**: p. 1078-1081.
17. Weyl, W.A., *Coloured Glasses*. 1959, London: Dawson's of Pall Mall.
18. Faraday, M., *The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 1857. **147**: p. 145-181.
19. Kirchner, F. and R. Zsigmondy, *The causes of the color changes of gold-gelatine compounds*. Annalen Der Physik, 1904. **15**(13): p. 573-595.
20. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. Annalen der Physik, 1908. **3**: p. 25.
21. Schlipper, R., et al., *Multiple excitation and lifetime of the sodium cluster plasmon resonance*. Physical Review Letters, 1998. **80**(6): p. 1194-7.
22. Hagino, K., *Anharmonicity of the dipole resonance of metal clusters*. Physical Review B, 1999. **60**(4): p. R2197-9.
23. Meier, M. and A. Wokaun, *Enhanced Fields on Large Metal Particles - Dynamic Depolarization*. Optics Letters, 1983. **8**(11): p. 581-583.
24. Sönnichsen, C., et al., *Plasmon resonances in large noble-metal clusters*. New Journal of Physics, 2002. **4**: p. 93.
25. Wang, S.Y. and L.C. Chu, *Radiation Damping In the Scattering Of Light By a Metal Sphere*. Physics Letters a, 1986. **115**(6): p. 297-300.
26. Siedentopf, H. and R. Zsigmondy, *Visualisation and determination of size of ultra microscopic particles, with special use of Goldrubin glasses*. Annalen Der Physik, 1902. **10**(1): p. 1-39.
27. Klar, T., et al., *Surface-plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles*. Physical Review Letters, 1998. **80**(19): p. 4249-4252.
28. Sönnichsen, C., et al., *Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy*. Appl. Phys. Lett., 2000. **77**(19): p. 2949-2951.
29. Sönnichsen, C., et al., *Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods*. Physical Review Letters, 2002. **88**: p. 077402.
30. Perner, M., et al., *Optically induced damping of the surface plasmon resonance in gold colloids*. Physical Review Letters, 1997. **78**: p. 2192-2195.

31. Ashcroft, N.W. and N.D. Mermin, *Solid State Physics*. 1976, Philadelphia: Saunders College.
32. Puech, K., et al., *Investigation of the ultrafast dephasing time of gold nanoparticles using incoherent light*. Chemical Physics Letters, 1995. **247**(1-2): p. 13-17.
33. Breit, M., *Nichtlineare optische Untersuchungen an metallischen Nanostrukturen*, in *Department für Physik - Lehrstuhl Feldmann*. 2002, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
34. Sönnichsen, C., *Plasmons in metal nanostructures*, in *Department für Physik - Lehrstuhl Feldmann*. 2001, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
35. Johnson, P.B. and R.W. Christy, *Optical Constants of Noble Metals*. Physical Review B, 1972. **6**: p. 4370-4379.
36. Haiss, W., et al., *Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(11): p. 4215-4221.
37. David, E., *Deutung der Anomalien der optischen Konstanten dünner Metallschichten*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1939. **114**(7): p. 389-406.
38. Euler, J., *Ultraoptische Eigenschaften Von Metallen Und Mittlere Freie Weglänge Der Leitungselektronen*. Zeitschrift Fur Physik, 1954. **137**(3): p. 318-332.
39. Römer, H. and C. von Fragstein, *Bestimmung Des Absorptionskoeffizienten Und Des Brechungsquotienten Von Kolloidalem Gold - Ein Beitrag Zur Anomalie Der Optischen Konstanten*. Zeitschrift Fur Physik, 1961. **163**(1): p. 27-&.
40. Dahl, H., Fragstei, C.v., and G. Schulz, *Influence of Surface-Roughness Upon Determination of Thickness of Thin Evaporated Films*. Zeitschrift Fur Physik, 1968. **217**(5): p. 409-&.
41. von Fragstein, C. and F.J. Schoenes, *Absorptionskoeffizient und Brechungsindex feinsten Goldkugeln im nahen Ultrarot*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1967. **198**(5): p. 477-493.
42. Yannouleas, C. and R.A. Broglia, *Landau Damping and Wall Dissipation In Large Metal-Clusters*. Annals Of Physics, 1992. **217**(1): p. 105-141.
43. Kawabata, A. and R. Kubo, *Electronic Properties of Fine Metallic Particles .2. Plasma Resonance Absorption*. Journal of the Physical Society of Japan, 1966. **21**(9): p. 1765-&.
44. Sander, L., *Quantum Theory of Perpendicular Electrical Conductivity in a Thin Metallic Film*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1968. **29**(2): p. 291-&.
45. Genzel, L. and U. Kreibig, *Dielectric Function and Infrared-Absorption of Small Metal Particles*. Zeitschrift Fur Physik B-Condensed Matter, 1980. **37**(2): p. 93-101.
46. Hache, F., D. Ricard, and C. Flytzanis, *Optical Nonlinearities Of Small Metal Particles - Surface-Mediated Resonance and Quantum Size Effects*. Journal Of the Optical Society Of America B-Optical Physics, 1986. **3**(12): p. 1647-1655.
47. Apell, P. and D.R. Penn, *Optical-Properties of Small Metal Spheres - Surface Effects*. Physical Review Letters, 1983. **50**(17): p. 1316-1319.
48. Apell, P., R. Monreal, and F. Flores, *Effective relaxation time in small spheres: Diffuse surface scattering*. Solid State Communications, 1984. **52**(12): p. 971-973.
49. Hövel, H., et al., *Width of cluster plasmon resonances: Bulk dielectric functions and chemical interface damping*. Physical Review B, 1993. **48**(24): p. 18178 LP - 18188.

50. Charle, K.P., F. Frank, and W. Schulze, *The Optical-Properties of Silver Microcrystallites in Dependence on Size and the Influence of the Matrix Environment*. Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 1984. **88**(4): p. 350-354.
51. Persson, B.N.J., *Polarizability of small spherical metal particles: influence of the matrix environment*. Surface Science, 1993. **281**(1-2): p. 153-162.
52. Quninten, M., *MQMIE 2.4*. 2004: Aldenhoven.
53. Nolting, W., *Theoretische Physik 3, Elektrodynamik*. 2007, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
54. Dulkeith, E., et al., *Plasmon emission in photoexcited gold nanoparticles*. Physical Review B, 2004. **70**: p. 205424.
55. Pustovalov, V.K. and V.A. Babenko, *Optical properties of gold nanoparticles at laser radiation wavelengths for laser applications in nanotechnology and medicine*. Laser Physics Letters, 2004. **1**(10): p. 516-520.
56. Harris, N., M.J. Ford, and M.B. Cortie, *Optimization of Plasmonic Heating by Gold Nanospheres and Nanoshells*. J. Phys. Chem. B, 2006. **110**(22): p. 10701-10707.
57. Yguerabide, J., et al., *Steady-State Fluorescence Method for Evaluating Excited-State Proton Reactions - Application to Fluorescein*. Photochemistry and Photobiology, 1994. **60**(5): p. 435-441.
58. Yguerabide, J. and E.E. Yguerabide, *Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications: I. Theory*. Analytical Biochemistry, 1998. **262**(2): p. 137-156.
59. Schoenlein, R.W., et al., *Femtosecond studies of nonequilibrium electronic processes in metals*. Physical Review Letters, 1987. **58**(16): p. 1680 LP - 1683.
60. Elsayed-Ali, H.E., et al., *Femtosecond thermorefectivity and thermotransmissivity of polycrystalline and single-crystalline gold films*. Physical Review B, 1991. **43**(5): p. 4488 LP - 4491.
61. Fann, W.S., et al., *Electron thermalization in gold*. Physical Review B, 1992. **46**(20): p. 13592 LP - 13595.
62. Sun, C.-K., et al., *Femtosecond-tunable measurement of electron thermalization in gold*. Physical Review B, 1994. **50**(20): p. 15337 LP - 15348.
63. Hibara, A., et al., *Direct measurements of femtosecond energy dissipation processes of hot electrons in a gold film*. Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers, 1999. **38**(5A): p. 2983-2987.
64. Ahmadi, T.S., S.L. Logunov, and M.A. Elsayed, *Picosecond Dynamics of Colloidal Gold Nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(20): p. 8053-8056.
65. Perner, M., *Optische Untersuchung der Elektronen- und Gitterdynamik in Edelmetall-Nanopartikeln*, in *Department für Physik - Lehrstuhl Feldmann*. 1999, Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 200.
66. Perner, M., et al., *Ultrafast line broadening of the surface plasmon in Au colloids embedded in a dielectric sol-gel matrix*, in *Ultrafast Phenomena X*, W. Knox, Editor. 1996, Springer: Berlin. p. 437.
67. Perner, M., et al., *Observation of hot-electron pressure in the vibration dynamics of metal nanoparticles*. Physical Review Letters, 2000. **85**(4): p. 792-795.

68. Hodak, J., I. Martini, and G.V. Hartland, *Ultrafast study of electron-phonon coupling in colloidal gold particles*. Chem. Phys. Lett., 1998. **284**: p. 135-141.
69. Hu, M. and G.V. Hartland, *Heat Dissipation for Au Particles in Aqueous Solution: Relaxation Time versus Size*. Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**: p. 7029-7033.
70. Hu, M., H. Petrova, and G.V. Hartland, *Investigation of the properties of gold nanoparticles in aqueous solution at extremely high lattice temperatures*. Chemical Physics Letters, 2004. **391**: p. 220-225.
71. Nisoli, M., et al., *Coherent acoustic oscillations in metallic nanoparticles generated with femtosecond optical pulses*. Physical Review B-Condensed Matter, 1997. **55**(20): p. 13424-13427.
72. Hodak, J.H., A. Henglein, and G.V. Hartland, *Size dependent properties of Au particles: Coherent excitation and dephasing of acoustic vibrational modes*. J. Chem. Phys., 1999. **111**(18): p. 8613-8621.
73. van Dijk, M.A., M. Lippitz, and M. Orrit, *Detection of acoustic oscillations of single gold nanospheres by time-resolved interferometry*. Physical Review Letters, 2005. **95**(26).
74. Hartland, G.V., M. Hu, and J.E. Sader, *Softening of the symmetric breathing mode in gold particles by laser-induced heating*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(30): p. 7472-7478.
75. Kotaidis, V. and A. Plech, *Cavitation dynamics on the nanoscale*. Applied Physics Letters, 2005. **87**(21).
76. Kotaidis, V., et al., *Excitation of nanoscale vapor bubbles at the surface of gold nanoparticles in water*. Journal of Chemical Physics, 2006. **124**(18).
77. Buffat, P. and J.-P. Borel, *Size effect on the melting temperature of gold particles*. Physical Review A, 1976. **13**(6): p. 2287 LP - 2298.
78. Plech, A., et al., *Laser-induced heating and melting of gold nanoparticles studied by time-resolved x-ray scattering*. Physical Review B, 2004. **70**(19).
79. Lewis, L.J., P. Jensen, and J.-L. Barrat, *Melting, freezing, and coalescence of gold nanoclusters*. Physical Review B, 1997. **56**(4): p. 2248 LP - 2257.
80. Cleveland, C.L., W.D. Luedtke, and U. Landman, *Melting of Gold Clusters: Icosahedral Precursors*. Phys. Rev. Lett., 1998. **81**(10): p. 2036-2039.
81. Sakai, H., *Surface-induced melting of small particles*. Surface Science, 1996. **351**(1-3): p. 285-291.
82. Kurita, H., A. Takami, and S. Koda, *Size reduction of gold particles in aqueous solution by pulsed laser irradiation*. Applied Physics Letters, 1998. **72**(7): p. 789-791.
83. Takami, A., H. Kurita, and S. Koda, *Laser-Induced Size Reduction of Noble Metal Particles*. J. Phys. Chem. B, 1999. **103**(8): p. 1226-1232.
84. Chang, S.-S., et al., *The Shape Transition of Gold Nanorods*. Langmuir, 1999. **15**(3): p. 701-709.
85. Link, S., et al., *Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses*. J. Phys. Chem. B, 2000. **104**(26): p. 6152-6163.
86. Kim, S.J. and D.J. Jang, *Laser-induced nanowelding of gold nanoparticles*. Applied Physics Letters, 2005. **86**(3).

87. Fujiwara, H., S. Yanagida, and P.V. Kamat, *Visible Laser Induced Fusion and Fragmentation of Thionicotinamide-Capped Gold Nanoparticles*. J. Phys. Chem. B, 1999. **103**(14): p. 2589-2591.
88. Link, S., et al., *Laser photothermal melting and fragmentation of gold nanorods: Energy and laser pulse-width dependence*. Journal of Physical Chemistry A, 1999. **103**(9): p. 1165-1170.
89. Garwe, F., et al., *Optically controlled thermal management on the nanometer length scale*. Nanotechnology, 2008. **19**(5).
90. Pissuwan, D., S.M. Valenzuela, and M.B. Cortie, *Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles*. Trends in Biotechnology, 2006. **24**(2): p. 62-67.
91. Hirsch, L.R., et al., *Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(23): p. 13549-13554.
92. O'Neal, D.P., et al., *Photo-Thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles*. Cancer Letters, 2004. **209**: p. 171-176.
93. Yao, C.P., et al., *Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles*. Journal of Biomedical Optics, 2005. **10**(6).
94. Pitsillides, C.M., et al., *Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles*. Biophysical Journal, 2003. **84**(6): p. 4023-4032.
95. Zharov, V.P., V. Galitovsky, and M. Viegas, *Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis*. Applied Physics Letters, 2003. **83**(24): p. 4897-4899.
96. Huang, X.H., et al., *Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(6): p. 2115-2120.
97. Huttmann, G. and R. Birngruber, *On the possibility of high-precision photothermal microeffects and the measurement of fast thermal denaturation of proteins*. Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 1999. **5**(4): p. 954-962.
98. Radt, B., *Inaktivierung von Proteinen und Zellen durch Laserbestrahlung von Mikropartikeln*, in *Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2002, Universität zu Lübeck: Lübeck.
99. Csaki, A., et al., *A Parallel Approach for Subwavelength Molecular Surgery Using Gene-Specific Positioned Metal Nanoparticles as Laser Light Antennas*. Nano Letters, 2007. **7**(2): p. 247-253.
100. Radt, B., T.A. Smith, and F. Caruso, *Optically addressable nanostructured capsules*. Advanced Materials, 2004. **16**(23-24): p. 2184-+.
101. Sukhorukov, G.B., et al., *Nanoengineered polymer capsules: Tools for detection, controlled delivery, and site-specific manipulation*. Small, 2005. **1**(2): p. 194-200.
102. Sershen, S.R., et al., *Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **51**(3): p. 293-298.
103. West, J.L. and N.J. Halas, *Applications of nanotechnology to biotechnology - Commentary*. Current Opinion in Biotechnology, 2000. **11**(2): p. 215-217.
104. Boyer, D., et al., *Photothermal Imaging of Nanometer-Sized Metal Particles Among Scatterers*. Science, 2002. **297**: p. 1160-1163.

105. Pustovalov, V.K., *Investigation of threshold laser intensities for melting and evaporation of spherical and spheroidal nanoparticles in media by short laser pulses*. Chemical Physics Letters, 2006. **421**(1-3): p. 142-147.
106. Hüttmann, G. and R. Birngruber, *On the Possibility of High-Precision Photothermal Microeffects and the Measurement of Fast Thermal Denaturation of Proteins*. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 1999. **5**: p. 954-962.
107. Koblinski, P., et al., *Limits of localized heating by electromagnetically excited nanoparticles*. Journal of Applied Physics, 2006. **100**(5): p. N.PAG.
108. Zsigmondy, R. and P.A. Thiessen, *Das kolloide Gold*. 1925, Leipzig: Deuticke.
109. Stauff, J., *Kolloidchemie*. 1960, Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer.
110. Edlmann, K., *Kolloidchemie*. 1975, Darmstadt: Steinkopff.
111. Karpov, S.V., et al., *Simulation of the growth of nanoparticle aggregates reproducing their natural structure in disperse systems*. Colloid Journal, 2006. **68**(4): p. 441-450.
112. Lazarides, A.A. and G.C. Schatz, *DNA-linked metal nanosphere materials: Structural basis for the optical properties*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(3): p. 460-467.
113. Lazarides, A.A. and G.C. Schatz, *DNA-linked metal nanosphere materials: Fourier-transform solutions for the optical response*. Journal of Chemical Physics, 2000. **112**(6): p. 2987-2993.
114. Mirkin, C.A., et al., *A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials*. Nature, 1996. **382**: p. 607-609.
115. Storhoff, J.J., et al., *One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**: p. 1959-1964.
116. Xu, Y.-l., *Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres*. Appl. Opt., 1995. **34**(21): p. 4573-4588.
117. Xu, Y.-l., *Electromagnetic Scattering by an Aggregate of Spheres: Errata*. Appl. Opt., 1998. **37**(27): p. 6494.
118. Ringler, M., *Plasmonische Nahfeldresonatoren aus zwei biokonjugierten Goldnanopartikeln*, in *Departmenr für Physik - Lehrstuhl Feldmann*. 2008, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
119. Quinten, M., et al., *Optical absorption spectra of pairs of small metal particles*. Surface Science, 1985. **156**: p. 741-750.
120. Ringler, M., et al., *Shaping emission spectra of fluorescent molecules with single plasmonic nanoresonators*. Physical Review Letters, 2008. **100**(20).
121. Ringler, M., et al., *Moving nanoparticles with Raman scattering*. Nano Letters, 2007. **7**(9): p. 2753-2757.
122. Khlebtsov, B.N., et al., *Coupled plasmon resonances in monolayers of metal nanoparticles and nanoshells*. Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics), 2008. **77**(3): p. 035440-14.
123. Jensen, T., et al., *Electrodynamics of noble metal nanoparticles and nanoparticle clusters*. Journal of Cluster Science, 1999. **10**(2): p. 295-317.
124. Draine, B.T. and P.J. Flatau, *Discrete-Dipole Approximation for Scattering Calculations*. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1994. **11**(4): p. 1491-1499.

125. Kelly, K.L., A.A. Lazarides, and G.C. Schatz, *Computational electromagnetics of metal nanoparticles and their aggregates*. Computing in Science & Engineering, 2001. **3**(4): p. 67-73.
126. Purcell, E.M. and Pennypacker, Cr, *Scattering and Absorption of Light by Nonspherical Dielectric Grains*. Astrophysical Journal, 1973. **186**(2): p. 705-714.
127. Schatz, G.C., *Electrodynamics of nonspherical noble metal nanoparticles and nanoparticle aggregates*. Journal of Molecular Structure-Theochem, 2001. **573**: p. 73-80.
128. Yang, W.H., G.C. Schatz, and R.P. Vanduyne, *Discrete Dipole Approximation for Calculating Extinction and Raman Intensities for Small Particles with Arbitrary Shapes*. Journal of Chemical Physics, 1995. **103**(3): p. 869-875.
129. Kelly, K.L., et al., *The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(3): p. 668-677.
130. Draine, B.T. and P.J. Flatau, *User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDSCAT.6.0*. 2003.
131. Hrelescu, C., *Opto-thermisches DNA-Schmelzen in Gold-Nanopartikel-Aggregaten - Diplomarbeit, in Department für Physik - Lehrstuhl Feldmann*. 2007, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
132. Moreno, E., et al., *Multiple multipole method with automatic multipole setting applied to the simulation of surface plasmons in metallic nanostructures*. J. Opt. Soc. Am. A, 2002. **19**(1): p. 101-111.
133. Novotny, L., D.W. Pohl, and B. Hecht, *Scanning Near-Field Optical Probe With Ultrasmall Spot Size*. Optics Letters, 1995. **20**(9): p. 970-972.
134. Farjadpour, A., et al., *Improving accuracy by subpixel smoothing in the finite-difference time domain*. Opt. Lett., 2006. **31**(20): p. 2972-2974.
135. Richardson, H.H., et al., *Thermo-optical responses of nanoparticles: Melting of ice and nanocalorimetry approach*. Journal of Electronic Materials, 2007. **36**(12): p. 1587-1593.
136. Zhang, J.P., et al., *Periodic square-like gold nanoparticle arrays templated by self-assembled 2D DNA nanogrids on a surface*. Nano Letters, 2006. **6**(2): p. 248-251.
137. Seeman, N.C., *Nucleic-Acid Junctions and Lattices*. Journal of Theoretical Biology, 1982. **99**(2): p. 237-247.
138. Chen, J.H. and N.C. Seeman, *Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube*. Nature, 1991. **350**: p. 6319.
139. Adleman, L.M., *Molecular Computation of Solutions to Combinatorial Problems*. Science, 1994. **266**(5187): p. 1021-1024.
140. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-738.
141. Crick, F.H.C. and J.D. Watson, *The Complementary Structure of Deoxyribonucleic Acid*. Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences, 1954. **223**(1152): p. 80-&.
142. Tinland, B., et al., *Persistence length of single-stranded DNA*. Macromolecules, 1997. **30**(19): p. 5763-5765.
143. Hagerman, P.J., *Investigation of the Flexibility of DNA Using Transient Electric Birefringence*. Biopolymers, 1981. **20**(7): p. 1503-1535.

144. Rice, S.A. and P. Doty, *The Thermal Denaturation of Desoxyribose Nucleic Acid*. Journal of the American Chemical Society, 1957. **79**(15): p. 3937-3947.
145. Wartell, R.M. and A.S. Benight, *Thermal-Denaturation of DNA-Molecules - a Comparison of Theory with Experiment*. Physics Reports-Review Section of Physics Letters, 1985. **126**(2): p. 67-107.
146. Thomas, R., **Recherches Sur La Denaturation Des Acides Desoxyribonucleiques*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1954. **14**(2): p. 231-240.
147. Marky, L.A. and K.J. Breslauer, *Calculating Thermodynamic Data for Transitions of Any Molecular Weight from Equilibrium Melting Curves*. Biopolymers, 1987. **26**(9): p. 1601-1620.
148. Crothers, D.M., *On Mechanism of Deoxyribonucleic Acid Unwinding*. Accounts of Chemical Research, 1969. **2**(8): p. 225-&.
149. Schaeffer, F., A. Kolb, and H. Buc, *Point Mutations Change the Thermal-Denaturation Profile of a Short DNA Fragment Containing the Lactose Control Elements - Comparison between Experiment and Theory*. Embo Journal, 1982. **1**(1): p. 99-105.
150. Benight, A.S. and R.M. Wartell, *Influence of Base-Pair Changes and Cooperativity Parameters on the Melting Curves of Short Dnas*. Biopolymers, 1983. **22**(5): p. 1409-1425.
151. Craig, M.E., D.M. Crothers, and P. Doty, *Relaxation Kinetics of Dimer Formation by Self Complementary Oligonucleotides*. Journal of Molecular Biology, 1971. **62**(2): p. 383-&.
152. Dieter W. Gruenwedel, C.-H.H., *Salt effects on the denaturation of DNA*. Biopolymers, 1969. **7**(4): p. 557-570.
153. Owczarzy, R., et al., *Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: Improved predictions of melting temperatures*. Biochemistry, 2004. **43**(12): p. 3537-3554.
154. Peyret, N., et al., *Nearest-Neighbor Thermodynamics and NMR of DNA Sequences with Internal A[#]A, C[#]C, G[#]G, and T[#]T Mismatches*. Biochemistry, 1999. **38**(12): p. 3468-3477.
155. Wallace, R.B., et al., *Hybridization of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides to Phi-Chi-174 DNA - Effect of Single Base Pair Mismatch*. Nucleic Acids Research, 1979. **6**(11): p. 3543-3557.
156. Saunders, A.M., et al., *Association of Apolipoprotein-E Allele Epsilon-4 with Late-Onset Familial and Sporadic Alzheimers-Disease*. Neurology, 1993. **43**(8): p. 1467-1472.
157. Bertina, R.M., et al., *Mutation in Blood-Coagulation Factor-V Associated with Resistance to Activated Protein-C*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 64-67.
158. Evans, W.E. and M.V. Relling, *Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics*. Science, 1999. **286**(5439): p. 487-491.
159. Hoppe, W., et al., *Biophysik*. 1982, Berlin: Springer.
160. Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer, *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. Analytical Biochemistry, 1997. **245**(2): p. 154-160.
161. Waring, M.J., *Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 269-&.

162. Tyagi, S. and F.R. Kramer, *Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. Nature Biotechnology, 1996. **14**: p. 303-308.
163. Wu, P.G. and L. Brand, *Resonance Energy-Transfer - Methods and Applications*. Analytical Biochemistry, 1994. **218**(1): p. 1-13.
164. Gearheart, L.A., H.J. Ploehn, and C.J. Murphy, *Oligonucleotide Adsorption to Gold Nanoparticles: A Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study of Intrinsically Bent DNA*. J. Phys. Chem. B, 2001. **105**(50): p. 12609-12615.
165. Demers, L.M., et al., *Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(38): p. 11248-11249.
166. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.
167. Hayat, M.A., *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. 1989, New York: Academic Press.
168. Droz, E., et al., *Covalent immobilization of immunoglobulins G and Fab' fragments on gold substrates for scanning force microscopy imaging in liquids*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 1996. **14**(2): p. 1422-1426.
169. Ghosh, S.S., et al., *Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes*. Bioconjugate Chem., 1990. **1**(1): p. 71-76.
170. Firestone, M.A., et al., *Film architecture in biomolecular assemblies. Effect of linker on the orientation of genetically engineered surface-bound proteins*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(38): p. 9033-9041.
171. Hong, H.G., P.W. Bohn, and S.G. Sligar, *Optical Determination of Surface-Density in Oriented Metalloprotein Nanostructures*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(11): p. 1635-1638.
172. Hong, R., et al., *Control of protein structure and function through surface recognition by tailored nanoparticle scaffolds*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(3): p. 739-743.
173. Kanno, S., et al., *Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization*. Journal of Biotechnology, 2000. **76**(2-3): p. 207-214.
174. Demers, L.M., et al., *A Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage and Hybridisation Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles*. Analytical Chemistry, 2000. **72**: p. 5535-5541.
175. Zanchet, D., et al., *Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates*. Nano Letters, 2001. **1**(1): p. 32-35.
176. Cohen, G. and Eisenber.H, *Deoxyribonucleate Solutions - Sedimentation in a Density Gradient Partial Specific Volumes Density and Refractive Index Increments and Preferential Interactions*. Biopolymers, 1968. **6**(8): p. 1077-&.
177. Ghosh, S.K., et al., *Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(37): p. 13963-13971.
178. Jain, P.K., W. Qian, and M.A. El-Sayed, *Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol bond*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(7): p. 2426-2433.

179. Liu, G.L., V.B. Rodriguez, and L.P. Lee, *Time-resolved optical sensing of oligonucleotide hybridization via Au colloidal nanoparticles*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2005. **5**(11): p. 1933-1937.
180. Englebienne, P., *Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes*. The Analyst, 1998. **123**: p. 1599-1603.
181. Klar, T.A., *Biosensing with plasmonic nanoparticles*, Nanophotonics with Surface Plasmons, V.M. Shalaev and S. Kawata, Editors. 2007, Elsevier: Amsterdam. p. 219-270.
182. Stehr, J., et al., *Gold NanoStoves for microsecond DNA melting analysis*. Nano Letters, 2008. **8**(2): p. 619-623.
183. Alivisatos, A.P., et al., *Organization Of Nanocrystal Molecules Using DNA*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 609-611.
184. Storhoff, J.J., et al., *What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?* Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(19): p. 4640-4650.
185. Jin, R., et al., *What controls the Melting Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**: p. 1643-1654.
186. Brust, M., et al., *Novel Gold-Dithiol Nano-Networks with Nonmetallic Electronic-Properties*. Advanced Materials, 1995. **7**(9): p. 795-&.
187. Andres, R.P., et al., *Self-assembly of a two-dimensional superlattice of molecularly linked metal clusters*. Science, 1996. **273**(5282): p. 1690-1693.
188. Cobbe, S., et al., *DNA-controlled assembly of protein-modified gold nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(2): p. 470-477.
189. Wayne Shenton, S.A.D., Stephen Mann,, *Directed Self-Assembly of Nanoparticles into Macroscopic Materials Using Antibody-Antigen Recognition*. Advanced Materials, 1999. **11**(6): p. 449-452.
190. Beermann, B., et al., *Association temperature governs structure and apparent thermodynamics of DNA-gold nanoparticles*. Biophysical Chemistry, 2007. **126**(1-3): p. 124-131.
191. Park, S.Y., et al., *Structures of DNA-linked nanoparticle aggregates*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(25): p. 12673-12681.
192. Park, S.Y. and D. Stroud, *Structure formation, melting, and optical properties of gold/DNA nanocomposites: Effects of relaxation time*. Physical Review B, 2003. **68**(22).
193. Park, S.J., et al., *The structural characterization of oligonucleotide-modified gold nanoparticle networks formed by DNA hybridization*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(33): p. 12375-12380.
194. Mucic, R.C., et al., *DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(48): p. 12674-12675.
195. Dujardin, E., et al., *DNA-driven self-assembly of gold nanorods*. Chemical Communications, 2001(14): p. 1264-1265.
196. Aldaye, F.A. and H.F. Sleiman, *Sequential self-assembly of a DNA hexagon as a template for the organization of gold nanoparticles*. Angewandte Chemie-International Edition, 2006. **45**(14): p. 2204-2209.

197. Ackerson, C.J., M.T. Sykes, and R.D. Kornberg, *Defined DNA/nanoparticle conjugates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(38): p. 13383-13385.
198. Aldaye, F.A. and H.F. Sleiman, *Dynamic DNA templates for discrete gold nanoparticle assemblies: Control of geometry, modularity, write/wrase and structural switching*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(14): p. 4130-+.
199. Qin, W.J. and L.Y.L. Yung, *Well-defined nanoassemblies using gold nanoparticles bearing specific number of DNA strands*. Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**(1): p. 385-390.
200. Kiang, C.H., *Phase transition of DNA-linked gold nanoparticles*. Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications, 2003. **321**(1-2): p. 164-169.
201. Sun, Y., N.C. Harris, and C.H. Kiang, *The reversible phase transition of DNA-linked colloidal gold assemblies*. Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications, 2005. **354**: p. 1-9.
202. Harris, N.C. and C.H. Kiang, *Defects can increase the melting temperature of DNA - Nanoparticle assemblies*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(33): p. 16393-16396.
203. Long, H., A. Kudlay, and G.C. Schatz, *Molecular dynamics studies of ion distributions for DNA duplexes and DNA clusters: Salt effects and connection to DNA melting*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(6): p. 2918-2926.
204. Park, S.Y., et al., *DNA-programmable nanoparticle crystallization*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 553-556.
205. Nykypanchuk, D., et al., *DNA-guided crystallization of colloidal nanoparticles*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 549-552.
206. Taton, T.A., C.A. Mirkin, and R.L. Letsinger, *Scannometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes*. Science, 2000. **289**: p. 1757-1760.
207. Gaspar, J.F., **P.V. Baptista**, and **J. Rueff**, *Gold Nanoparticle Based Systems in Genetics*. Current Pharmacogenomics, 2007. **5**: p. 39-47.
208. BBInternational, G.G., TY Glas Ave., Cardiff CF14 5DX, United and Kingdom. 2005.
209. metabion international AG, L.-C.-S.I., 82152 Martinsried, Germany.
210. Draine, B.T. and J. Goodman, *Beyond Clausius-Mossotti - Wave-Propagation on a Polarizable Point Lattice and the Discrete Dipole Approximation*. Astrophysical Journal, 1993. **405**(2): p. 685-697.
211. Comsol, *Multiphysics 3.4*. 2007, COMSOL AB: Göttingen.
212. Schwarz, H.R., *Methode der finiten Elemente*. 1991, Stuttgart: Teubner.
213. Sullivan, S.A., *Experimental Study of Absorption in Distilled Water, Artificial Sea Water, and Heavy Water in Visible Region of Spectrum*. Journal of the Optical Society of America, 1963. **53**(8): p. 962-&.
214. Reismann, M., et al., *Reversible photothermal melting of DNA in DNA-gold-nanoparticle networks*. Small, 2008. **4**(5): p. 607-610.
215. Baaske, P., S. Duhr, and D. Braun, *Melting curve analysis in a snapshot*. Applied Physics Letters, 2007. **91**(13).

216. Ma, H.R., et al., *DNA folding and melting observed in real time redefine the energy landscape*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(3): p. 712-716.
217. Hodak, J.H., I. Martini, and G.V. Hartland, *Spectroscopy and dynamics of nanometer-sized noble metal particles*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(36): p. 6958-6967.
218. Hartland, G.V., *Measurements of the material properties of metal nanoparticles by time-resolved spectroscopy*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. **6**(23): p. 5263-5274.
219. Schiebener, P., et al., *Refractive-Index of Water and Steam as Function of Wavelength, Temperature and Density*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1990. **19**(3): p. 677-717.
220. Cho, C.H., et al., *Mixture model description of the T-, P dependence of the refractive index of water*. Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(7): p. 3157-3162.
221. Callender, R. and R.B. Dyer, *Probing protein dynamics using temperature jump relaxation spectroscopy*. Current Opinion in Structural Biology, 2002. **12**(5): p. 628-633.
222. Phillips, C.M., Y. Mizutani, and R.M. Hochstrasser, *Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(16): p. 7292-7296.
223. Gruebele, M., et al., *Laser Temperature Jump Induced Protein Refolding*. Accounts of Chemical Research, 1998. **31**(11): p. 699-707.
224. Ma, H., C. Wan, and A.H. Zewail, *Ultrafast T-Jump in Water: Studies of Conformation and Reaction Dynamics at the Thermal Limit*. J. Am. Chem. Soc., 2006. **128**(19): p. 6338-6340.
225. Hamad-Schifferli, K., et al., *Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna*. Nature, 2002. **415**: p. 152-155.
226. Steel, B.C., et al., *Nanosecond Responses of Proteins to Ultra-High Temperature Pulses*. Biophys. J., 2006. **91**(6): p. L66-68.
227. Tibanyenda, N., et al., *The Effect of Single Base-Pair Mismatches on the Duplex Stability of D(T-a-T-T-a-a-T-a-T-C-a-a-G-T-T-G) . D(C-a-a-C-T-T-G-a-T-a-T-T-a-a-T-a)*. European Journal of Biochemistry, 1984. **139**(1): p. 19-27.
228. Vogel, A. and V. Venugopalan, *Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 577-644.
229. Neumann, J. and R. Brinkmann, *Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses*. Journal of Biomedical Optics, 2005. **10**(2).
230. Hrelescu, C. and J. Stehr, et al., in Vorbereitung.
231. Ryden, D.J., *Effects of Isolated Inclusions Upon Transport Properties of Semiconductors*. Journal of Physics C-Solid State Physics, 1974. **7**(15): p. 2655-2669.
232. Bonnet, G., O. Krichevsky, and A. Libchaber, *Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(15): p. 8602-8606.

233. Hilbers, C.W., et al., *Hairpin Formation in Synthetic Oligonucleotides*. *Biochimie*, 1985. **67**(7-8): p. 685-695.
234. Stehr, J., et al., *Eingereichtes Patent: "Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren"*. 2007: DE 10 2007 027 654.2.
235. Stehr, J., et al., *Eingereichtes Patent: "Process for detecting nucleic acids"*. 2008: PCT/EP2008/056505.

Anhang

In Kapitel 5.2.2 sind Experimente vorgestellt worden, in denen Aggregaten aus Gold Nanopartikeln mit 20 nm Partikeldurchmesser und Aggregate aus Partikeln mit 40 nm Partikeldurchmesser zum Einsatz gekommen sind. Diese Partikel sind mit den in Abbildung A1 gezeigten DNA-Sequenzen funktionalisiert worden, die mit der Verbindungs-DNA in Tail-to-Tail-Konfiguration hybridisieren. Die NaCl-Konzentration des verwendeten PBS-Puffers betrug in diesen Proben 100 mM.



Abbildung A1: Tail-to-Tail-Konfiguration und Sequenzen der in den Experimenten in Kapitel 5.2.2 verwendeten Proben (nicht maßstabsgetreu). Diese Konfiguration kommt jeweils mit Gold-Nanopartikeln mit 20 nm Durchmesser (a) und mit 40 nm Durchmesser (b) zum Einsatz.

Danksagung

Diese Arbeit entstand am Lehrstuhl für Photonik und Optoelektronik im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 486, Teilprojekt B3 „Manipulation molekularer Eigenschaften durch metallische Nanopartikel“ unter der Leitung von Professor Jochen Feldmann und Professor Thomas Klar. Eine Kooperation mit Professor Wolfgang Parak und Ralph Sperling im Rahmen des SFB und des Centers for NanoScience (CeNS) ermöglichte es, das Hybridsystem DNA/Gold-Nanopartikel vor Ort zusammenzufügen. Die technologische Relevanz der Experimente für die molekulare Diagnostik und die Biotechnologie wurden im Rahmen einer Industriekooperation mit der Firma Roche Diagnostics GmbH deutlich. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit in den letzten Jahren unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Jochen Feldmann, der mir diese spannende Arbeit auf einem interdisziplinären und aktuellen Forschungsgebiet ermöglicht hat und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt hat. Danke auch für das stete Interesse an meiner Arbeit, und das große Vertrauen, das er mir und meiner Arbeit entgegengebracht hat. Seinen bewundernswerten „Blick fürs Wesentliche“, bei wissenschaftlichen Diskussionen und Präsentationen und die richtigen Impulse in die richtige Richtung zur richtigen Zeit habe ich sehr zu schätzen gelernt. Vielen Dank für die Verantwortung, die mir auf vielfältige Weise übertragen wurde und für die Erfahrungen, die ich auf internationalen Konferenzen und Workshops, und während des Patentierungsverfahrens sammeln durfte.

Ein herzlicher Dank gilt dem ehemaligen Assistenten Professor Thomas Klar, der mich schon während meiner Diplomarbeit mit viel Geduld an dieses Thema herangeführt hat und mir viele Zusammenhänge klarmachte. Seine Ideen, kritischen Fragen und Hilfestellungen haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke auch für die stete und hilfreiche Unterstützung auch über weite Distanzen hinweg.

Ein besonderes Dankeschön verdient Calin Hrelescu, der während seiner Diplomarbeit viel bei der Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente mitgewirkt hat und mich bei der Erstellung der Modellrechnungen unterstützt hat. Vielen Dank auch an Haojin Ba, die ebenfalls an der Durchführung der hier vorgestellten Experimente mitgewirkt hat. Calin und Haojin während ihrer Diplom- bzw. Masterarbeiten betreuen zu dürfen, hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Vielen Dank an Dr. Konrad Kürzinger, Dr. Dieter Heindl, Dr. Alfons Nichtl, Dr. Michael Wunderlich und Dr. Yvonne Markert von Roche Diagnostics für die stete Unterstützung und die interessanten Einblicke in die Bereiche der Diagnostik, Biotechnologie und Pharmazie.

Vielen Dank an Professor Wolfgang Parak und Ralph Sperling für die großartige Unterstützung bei der DNA-Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln.

Vielen Dank an alle Miterfinder für die zuverlässige und unkomplizierte Kooperation während der Patentierungsphase.

Vielen Dank an Dr. Gunnar Raschke für die Interimsbetreuung, an Prof. John Lupton für die Ermutigung, überhaupt eine Doktorarbeit zu beginnen, Prof. Pavlos Lagoudakis, von dem ich viel im Labor gelernt habe. Vielen Dank an Robert Kraus für die Intensiven Diskussionen und so wichtigen wissenschaftlichen Exkurse und an Federico Bürsgens für die Durchhalteparolen in der Schlussphase dieser Arbeit. Mein Dank gilt Dr. Enrico Da Como, Dr. Fernando Stefani, Dr. Andrey Rogach, Dr. Andrei Sussha, Dr. Srujan Dondapati, Dr. Moritz Ringler, Alexander Urban, Stephan Haneder, Sergiy Mayilo, Lars Ullerich und Larissa Albantakis.

Danke für die Unterstützung an Werner Stadler, Stefan Niedermaier, Anna Helfrich, Christian Holopirek, Gerlinde Adam und Irmgard Beier, Frau Vrankovic und Herrn Bochner. Vielen Dank dem Admin-Team und dem gesamten Lehrstuhl über all die Jahre. Vielen Dank allen Mitarbeitern des CeNS, der NIM und der Kontaktstelle für Forschungs- und Technologietransfer der LMU.

Für Finanzielle Unterstützung und Förderung dieser Doktorarbeit danke ich der Deutschen Forschungsgesellschaft und der Bayerischen Forschungstiftung.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Kati. Danke für die Geduld, das Verständnis, die Unterstützung und die Durchhalteparolen.