

**Beiträge zur chemisch-biologischen
Oberflächenmodifikation von Nanodiamanten
aus der Detonationssynthese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

Vorgelegt an der Fakultät Maschinenwesen

der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biol. Andrea Pohl

geb. am 02.04.1964 in Elsterwerda

Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Bley – Technische Universität Dresden

Prof. Dr. rer. nat. Anke Krüger – Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Tag der Einreichung: 17.11.2016

Tag der Verteidigung: 04.08.2017

... Es ist nicht die Sonne, die ihn blendet. Es sind die Geheimnisse, die Rätsel, die Fragen.

Die uralte Weissagung fällt ihm ein: Irgendwo steht eine große eiserne Truhe, sieben Schlösser hat sie, ein riesiger Wolf bewacht sie. In der Truhe steckt das Wissen. Wer den Wolf überwindet, dem öffnen sich die Geheimnisse, lösen sich die Rätsel, der findet Antwort auf jede Frage. ...

Jurij Brězan
Die schwarze Mühle

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Oberflächenmodifikation von Nanodiamanten (ND) aus der Detonationssynthese und die anschließende Konjugation von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA an die zuvor eingeführten funktionellen Gruppen. Als Ausgangsmaterialien wurden zwei Nanodiamantpulver mit unbekannter Oberflächenbelegung eingesetzt, deren Charakterisierung durch elektronenmikroskopische Methoden erfolgte. Weiterhin wurden kommerziell modifizierte ND mit definierter Oberflächenbelegung (Amino- und Hydroxylgruppen) verwendet.

Für potenzielle Anwendungen von ND wird eine monofunktionale Oberfläche angestrebt, die u. a. über Oxidation oder Reduktion der durch den Herstellungsprozess eingeführten primären funktionellen Gruppen realisiert werden kann. Die dadurch erzeugten sekundären Funktionen ermöglichen die kovalente bzw. nichtkovalente Anbindung weiterer Substanzen, z. B. von Biomolekülen, an die Oberflächen der ND-Partikel. Die hier beschriebene Konjugation von DNA, an die mit Carboxyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen modifizierten Partikeloberflächen, erfolgte durch die Generierung von Amid-, Phosphodiester- und Isoharnstoffbindungen. Der Erfolg der Konjugation wurde mit Hilfe von Infrarotspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Fluoreszenz der Konjugate beruhte dabei auf Fluoreszenzfarbstoffen, die an die DNA-Moleküle gebunden waren.

Darüber hinaus wird die Herstellung einer kolloidalen ND-Suspension beschrieben, von der die Partikelgrößen und das Zeta-Potenzial bestimmt wurden. Kolloidale Suspensionen ermöglichen aufgrund der geringen Partikelgrößen diverse biologische und medizinische Anwendungen von ND.

Mit den hier präsentierten Ergebnissen erweitert sich der Kenntnisstand zur Konjugation von DNA an ND aus der Detonationssynthese. Die angewandte Methodik kann ebenso auf andere Substanzen wie Proteine oder Chemotherapeutika übertragen werden. Derart funktionalisierte Partikel besitzen ein großes Potenzial für die weitere Anwendung in der Biomedizin und Nanotechnologie.

Abstract

The present study deals with the surface modification of nanodiamonds (ND) from detonation synthesis and the subsequent conjugation of both single and double stranded DNA to previously introduced functional groups. As starting materials two kinds of nanodiamond powders with unknown surface configuration were used. Both types of ND were characterized by electron-microscopic methods. Furthermore, commercially modified ND with defined surface configuration (amino and hydroxyl groups) were applied.

Potential applications of ND require a mono-functional surface, that can be realized e. g. via oxidation or reduction of the primary functional groups introduced during the production process. The thereby generated secondary functions permit the covalent or non-covalent linking of further substances onto the surfaces of ND particles. Conjugation of DNA, as described here, onto the carboxyl-, hydroxyl- or aminommodified particle surfaces was accomplished by generating of amino, phosphodiester and isourea bonds. The success of conjugations has been examined by infrared spectroscopy and fluorescence microscopy. The fluorescence of conjugates based on fluorescent dyes bound to the DNA molecules.

Furthermore, the fabrication of a colloidal ND suspension is described, of which the particle sizes and the Zeta potential have been determined. Colloidal suspensions facilitate various biological and medical applications of ND on the basis of low particle sizes.

The presented results enlarge the state of knowledge about the conjugation of DNA on ND from detonation synthesis. The applied methodology may also be transferred to other substances like proteins or chemotherapeutics. In this way, functionalized particles have a big potential for further application in biomedicine and nanotechnology.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	6
2.1	Nanodiamant	7
2.1.1	Historische Betrachtungen zur Detonationssynthese	7
2.1.2	Herstellung von Diamant	8
2.1.3	Aufbereitung von Nanodiamanten aus der Detonationssynthese	11
2.1.4	Struktur und Eigenschaften von Diamant	12
2.1.5	Homogenisierung der Oberflächenbelegung	16
2.1.6	Aggregation und Deaggregation von Nanodiamant-Partikeln	20
2.1.7	Anwendungen von Nanodiamant-Partikeln	21
2.2	Aptamere	26
2.2.1	Strukturbildung und Bindungsmechanismen	26
2.2.2	Zielsubstanzen	28
2.2.3	Vergleich von Aptameren und Antikörpern	29
2.2.4	Herstellung von Aptameren – Der SELEX-Prozess	32
2.2.5	Anwendungsfelder für Aptamere	34
2.3	Konjugation von Nanopartikeln mit Biomolekülen	38
2.4	Herstellung und Charakterisierung von kolloidalen Nanodiamantsuspensionen	46
2.4.1	Herstellung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen	46
2.4.2	Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung durch dynamische Lichtstreuung (DLS)	47
2.4.3	Bestimmung des Zeta-Potenzials durch elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)	48
2.5	Methoden zur Materialcharakterisierung von Nanodiamantpulver	52
2.5.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	52
2.5.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	53
2.5.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	54

2.6	Nachweismethoden für Modifikation und Konjugatbildung	56
2.6.1	Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektroskopie	56
2.6.2	Fluoreszenzmikroskopie	60
3	Material und Methoden	62
3.1	Herstellung und Charakterisierung von kolloidalen Nanodiamantsuspensionen	62
3.1.1	Herstellung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen	62
3.1.2	Bestimmung von Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und Zeta-Potenzial	63
3.2	Materialcharakterisierung von Nanodiamantpulver	64
3.2.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	64
3.2.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	65
3.2.3	Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM)	65
3.3	Chemische Modifikation von Nanodiamanten	66
3.3.1	Verwendete Materialien und Geräte	67
3.3.2	Einführung von Carboxylgruppen	68
3.3.3	Einführung von Hydroxylgruppen	69
3.3.4	Einführung von Aminogruppen	70
3.4	Herstellung von Nanodiamant-Aptamer-Konjugaten	73
3.4.1	Verwendete Materialien und Geräte	73
3.4.2	Konjugation über Amidbindungen	77
3.4.3	Konjugation über Ester- und Phosphodiesterbindungen	81
3.4.4	Konjugation über Isoharnstoffbindungen	85
3.5	Nachweismethoden für Modifikation und Konjugatbildung	88
3.5.1	Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektroskopie	88
3.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	89
4	Ergebnisse und Diskussion	92
4.1	Charakterisierung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen	92
4.1.1	Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung	92
4.1.2	Bestimmung des Zeta-Potenzials	93
4.2	Materialcharakterisierung von Nanodiamantpulvern	98
4.2.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	98
4.2.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	101

4.2.3	Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM)	107
4.3	Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektroskopie	117
4.3.1	Nanodiamanten: Originalmaterial und modifizierte Nanodiamanten	118
4.3.1.1	Nanodiamanten – Originalmaterial	118
4.3.1.2	Modifikation mit Carboxylgruppen (ND-COOH)	122
4.3.1.3	Modifikation mit Hydroxylgruppen (ND-OH)	123
4.3.1.4	Modifikation mit Aminogruppen (ND-NH ₂)	128
4.3.2	Nanodiamant-DNA-Konjugate	138
4.3.2.1	Konjugation über Amidbindungen	140
4.3.2.2	Konjugation über Phosphodiesterbindungen	144
4.3.2.3	Konjugation über Isoharnstoffbindungen	150
4.4	Fluoreszenzmikroskopie an Nanodiamant-DNA-Konjugaten	154
4.4.1	Konjugation über Amidbindungen	154
4.4.2	Konjugation über Phosphodiesterbindungen	157
4.4.3	Konjugation über Isoharnstoffbindungen	161
5	Zusammenfassung und Ausblick	165
6	Literaturverzeichnis	170
	Anhang	I
A-1	Parameter der Partikelgrößen- und Zeta-Potenzial-Messungen	I
A-2	Nukleotidsequenz von EF1a	III
A-3	GFP-Filter-Spektrum	IV
A-4	FT-IR-Spektren von Nanodiamanten	V
A-5	FT-IR-Spektren von Nanodiamant-DNA-Konjugaten	X
	Verzeichnis der Formelzeichen	XIV
	Abkürzungsverzeichnis	XV
	Eigene wissenschaftliche Beiträge	XVIII
	Danksagung	
	Erklärung	

1 Einleitung

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung der Nanotechnologie – einer Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts – wird allgemein ein Vortrag des Physik-Nobelpreisträgers RICHARD FEYNMAN aus dem Jahr 1959 mit dem Titel „*There's plenty of room at the bottom*“ angesehen [Fey61]. FEYNMAN bezog sich damit auf die damals noch utopische Möglichkeit, Materie zielgerichtet Atom für Atom aufzubauen und auf diese Weise neue Funktionalitäten zu erschließen [001, Nie01].

Aus der Utopie ist inzwischen Wirklichkeit geworden: Die heutige Nanotechnologieforschung beschäftigt sich intensiv mit der Entwicklung sogenannter „Bottom-up“-Verfahren (Vergrößerungsverfahren), bei denen sich (makro)molekulare und kolloidale Komponenten durch Selbstorganisation zu größeren funktionalen Einheiten zusammenfügen [WMS91]. Die Grenzen von Bottom-up-Prozessen liegen im Allgemeinen im Bereich von 2-5 nm. Ein zweiter Ansatz zur Herstellung von Nanomaterialien sind die „Top-down“-Verfahren (Verkleinerungsverfahren), wie z. B. die Photolithographie, mit denen Submikrometerstrukturen erreichbar sind. Durch konventionelle Top-down-Prozesse lassen sich mit vertretbarem Aufwand Strukturgrößen bis hinunter auf etwa 200 nm realisieren. Zur Schließung der Lücke im Bereich zwischen 5 und 200 nm eignen sich, aufgrund ihrer Dimensionen, zwei Arten von Bausteinen [Nie01]. Das sind einerseits Biomoleküle wie Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren, andererseits kolloidale Nanopartikel die u. a. aus Metallen, Metalloxiden, Halbleitermaterialien oder auch Kohlenstoff bestehen können (Abb. 1.1). Die Abmessungen von Nanopartikeln lassen sich in der Regel im Bereich von etwa einem bis zu mehreren hundert Nanometern kontrolliert einstellen.

Als Nanomaterial wird eine Struktur bezeichnet, deren Abmessung in einer oder mehreren räumlichen Dimensionen zwischen 1 und 100 nm beträgt. Der Begriff schließt Nanopartikel, Nanofasern, Nanoröhren, Verbundmaterialien und nanostrukturierte Oberflächen ein [BRH+06].

Nanomaterialien weisen im Vergleich zu ihren makroskopischen Pendanten veränderte Merkmale auf. D. h., dass Partikel mit Größen im Nanometerbereich über andere chemische und physikalische Eigenschaften verfügen, als größere Volumina desselben Materials. Das ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass sich das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen mit abnehmender Partikelgröße immer mehr zugunsten der Oberfläche verschiebt. Bei Größenordnungen im Nanometerbereich führt dies zur Dominanz der Oberflächen- gegenüber den Volumeneigenschaften.

Nanoskalige Materialien besitzen eine erhöhte Oberflächenenergie, die zusammen mit einer größeren Anzahl von Oberflächenatomen eine erhöhte Reaktivität der Teilchen bedingt [BRH+06, Krü07]. Diese Reaktionsfreudigkeit ermöglicht nicht nur die Immobilisierung diverser Substanzen an den Oberflächen der Nanopartikel, sondern führt auch zu einer unerwünschten Aggregation der Primärteilchen untereinander. In diesem Fall gehen die besonderen oberflächen- und größenabhängigen Eigenschaften verloren. Für Anwendungen von Nanopartikeln ist die Kontrolle des Aggregationsverhaltens von entscheidender Bedeutung. Um die Aggregation der Teilchen zu verhindern bzw. ihre Deaggregation zu stimulieren, werden verschiedene Strategien angewandt, die vor allem mechanische Mahlprozesse oder die Zugabe von dispergierenden Additiven umfassen [BRH+06].

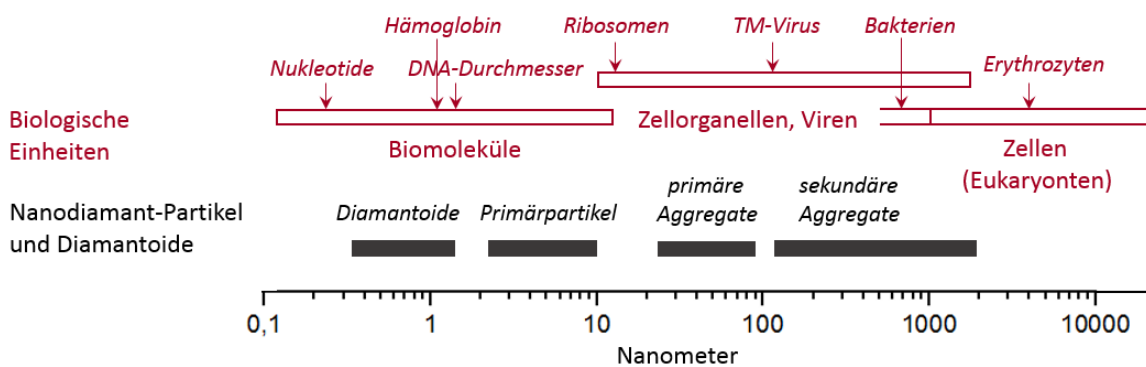


Abb. 1.1: Kohlenstoff-Nanomaterialien (hier nur anhand von Nanodiamant-Partikeln und Diamantoiden dargestellt) umfassen den gleichen Bereich der Längenskala wie Biomoleküle, Zellorganellen und Viren (Schema gezeichnet nach [GS06], verändert).

Kohlenstoff(nano)materialien gewinnen aufgrund ihrer außergewöhnlichen Eigenschaften, Diversität und Vielseitigkeit in der Anwendung seit über einem halben Jahrhundert immer mehr an Bedeutung. Lange Zeit wurde angenommen, dass Kohlenstoff ausschließlich in drei verschiedenen Allotropen existiert: Amorpher Kohlenstoff, Graphit und Diamant [Dai06]. Nachdem die Existenz einer weiteren Kohlenstoffform, der Fullerene, bereits 1970 von OSAWA [Osa1970] vorhergesagt worden war, gelang schließlich 1985 auch der Nachweis dieser Strukturen [KHO+85]. Noch früher beginnt die Geschichte der Kohlenstoffnanoröhren: 1952 veröffentlichten RADUSHKEVICH & LUKYANOVICH [RL52] erstmals Aufnahmen von hohlen Kohlenstofffasern mit einem Durchmesser von etwa 50 nm. 1976 wurden konzentrische, röhrenförmige Strukturen, die parallel zur Faserachse angeordnet waren, im Inneren von Kohlenstofffasern beschrieben [OEK76]. Diese und andere Arbeiten fanden jedoch erst wieder Beachtung, nachdem mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (MWCNTs) bei der Untersuchung von Rußen aus Funkentladungsexperimenten beobachtet und beschrieben wurden [Iij91]. Die Entdeckung einwandiger Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs) erfolgte 1993 unabhängig voneinander durch IJIMA & ICHIHASHI [IJ93] und BETHUNE *et al.* [BKV+93]. 1992 berichteten UGARTE *et al.* über die Synthese mehrwandiger Fullerene (Kohlenstoffzwiebeln) [Uga92].

Im Jahr 1961 wurde von DE CARLI & JAMIESON eine Methode zur Synthese von nanoskaligem Diamant beschrieben [DJ61], woraus bereits wenig später ein Verfahren zur großtechnischen Herstellung entwickelt wurde (*DuPont*-Prozess). Dabei handelte es sich um ein als Schockwellensynthese bezeichnetes Hochdruck-Hochtemperatur-Verfahren, bei dem Graphit durch die Einwirkung einer externen Schockwelle in Diamant umgewandelt wird. Erzeugt werden dabei 10-20 nm große Diamant-Kristallite, die sich aufgrund der hohen Druckeinwirkung zu mikroskaligen Strukturen verdichten. Das Endprodukt besteht aus 1-60 µm großen Diamantpartikeln [Krü07].

1963 konnten erstmals, in einem als Detonationssynthese bezeichneten Prozess, Diamantpartikel im Nanometermaßstab (nachfolgend als Nanodiamanten, ND, bezeichnet) erzeugt werden. Dieses Material entsteht durch die Einwirkung einer Detonationswelle, wobei Sprengstoffe als Kohlenstoffquelle dienen [VDE90] (Abschnitt 2.1).

Seit den 1950er Jahren können über Verfahren der chemischen Gasphasenabscheidung (CVD) auch Diamantfilme hergestellt werden. Diese bestehen aus mono- oder polykristallinen Schichten, deren Filmdicken überwiegend im Mikrometerbereich liegen [Krü07]. Während die Korngrößen anfänglich höhere Werte aufwiesen, wurden mit dem Aufkommen der Nanotechnologie auch Methoden für die Erzeugung nano- und ultrananokristalliner [Gru99] Diamantfilme entwickelt.

Zahlreiche weitere Entdeckungen im Bereich der Kohlenstoffmaterialien haben dazu geführt, dass sich das Phasendiagramm des Kohlenstoffes zu einem äußerst komplexen Gebilde mit einer Vielzahl allotroper Modifikationen entwickelt hat [Krü07]. Jede davon lässt sich auf eine der beiden Grundformen Diamant oder Graphit zurückführen. Der amorphe Kohlenstoff wird heute dem Graphit zugeordnet [SZB02].

Diamantpartikel aus der Detonationssynthese verfügen über einige außergewöhnliche Eigenschaften, zu denen eine geringe Zytotoxizität, eine hohe Biokompatibilität und nützliche Fluoreszenzeigenschaften, wie z. B. eine hohe Fluoreszenzstabilität, gehören. Die Größe der Partikel liegt im Durchschnitt bei 4-5 nm. Nach Abschluss des Herstellungsprozesses weisen die Partikeloberflächen bereits eine uneinheitliche primäre Funktionalisierung auf (Abb. 2.3). Diese kann durch diverse (bio)chemische Methoden modifiziert und damit dem späteren Verwendungszweck angepasst werden. Insbesondere wird hierbei eine Vereinheitlichung der Oberflächenbelegung, bis hin zur Monofunktionalität, angestrebt. Auf dieser Grundlage sind bereits einige Anwendungen von Diamantpartikeln, wie z. B. als Adsorbentien [PBP+07] oder Additive in Polymeren [MNE+11], möglich. Die sekundären Oberflächenmodifikationen eignen sich hervorragend zur Anbindung von weiteren Substanzen wie Proteinen [HC04, MPG+09], Aminosäuren und Peptiden [KLJS06, VMS+08] oder Vitaminen [Kru8a]. Eine bedeutende Rolle spielt die Konjugation mit Chemotherapeutika

[BYS09, LZL+10], die letztendlich darauf abzielt, ND als Träger für den intrazellulären Wirkstofftransport in der Tumorthherapie einzusetzen.

Die Konjugation von Nukleinsäuren an Diamantpartikel wurde bisher, im Gegensatz zu Diamantfilmen und Kohlenstoffnanoröhren, kaum in der Fachpresse thematisiert. Beispiele dafür sind die Ligation von doppelsträngiger DNA (dsDNA) an 1-2 μm große Diamantpartikel [USM+02] oder der Einsatz polymerfunktionalisierter ND als Vektoren für den Gentransport im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen [ZCL+09]. Ein neuer Ansatz wurde mit der Verbindung zwischen DNA-Origami-Strukturen [Som09] und fluoreszierenden ND verwirklicht, die eine definierte räumliche Positionierung der Partikel im Nanometermaßstab ermöglicht. Diese Vorgehensweise stellt einen Schritt zur Realisierung skalierbarer Quantenprozessoren und Stimulatoren dar [WJPW16].

Die Immobilisierung von DNA an Diamantfilme [KR11, YAB+02, WVV+09] oder Kohlenstoffnanoröhren ist hauptsächlich mit einer Anwendung in der Biosensorik verbunden. Dabei werden, oftmals unter Einsatz photochemischer Prozesse, DNA-Einzelstränge über Linkermoleküle an die Substrate konjugiert. In einem weiteren Schritt kann die Anlagerung der entsprechenden Komplementärstränge erfolgen. Die Verwendung von Aptameren – synthetisch erzeugten einzelsträngigen DNA-Sequenzen – eröffnet zudem die Möglichkeit zur selektiven Bindung der jeweiligen Zielsubstanz des Aptamers (Abschnitt 2.2). Konjugate aus Kohlenstoffnanoröhren und Aptameren wurden bisher beispielsweise zur Detektion von Thrombin [SWK+05] und Bakterien [ZGSAB+12, ZGTKN+13] eingesetzt.

Die Methoden zur Konjugation von Biomolekülen an Nanopartikel aus Kohlenstoff oder anderen Materialien, wie z. B. Metallen, sind sehr vielfältig (Abschnitt 2.3). Häufig verwendet man sogenannte Crosslinker, die eine komfortable Kopplung unter milden Reaktionsbedingungen gewährleisten. Experimentell am einfachsten umzusetzen ist die Adsorption der jeweiligen Substanz an die Nanopartikel. Stabiler sind jedoch kovalente Bindungen, die oftmals durch die Generierung von Amidbindungen eingeführt werden.

Zur Charakterisierung von ND werden beispielsweise die Infrarot- und Raman-Spektroskopie [MG09, PNJ+00], Röntgendiffraktometrie [LGMK04], Elektronenmikroskopie [LMJ+11, TLS+09], Thermogravimetrie [JHM+14, LMJ+11] sowie Verfahren der Elementanalyse [JHM+14, JX95] eingesetzt. Für dispergierte Partikel sind vor allem die Bestimmung der Partikelgröße und des Zeta-Potenzials von Bedeutung [SRL+09, OIM+07].

Der Nachweis der Konjugation von Proteinen, Nukleinsäuren, Chemotherapeutika u. a. Substanzen an die Nanopartikel wird überwiegend durch Infrarot-Spektroskopie (Abschnitt 4.3), aber auch UV-VIS-Spektroskopie [CPT+06] geführt. Hervorragend geeignet ist weiterhin die Fluoreszenzmikroskopie: Hierbei können die beteiligten Biomoleküle mit fluoreszierenden Proteinen oder Fluores-

zenzfarbstoffen [VMS+08] markiert werden und zeigen auf diese Weise ihre Präsenz bei der Einstrahlung von Licht auf die Proben an (Abschnitt 4.4).

Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag dazu geleistet werden, Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Nukleinsäuren an Diamantpartikel aus der Detonationssynthese zu etablieren. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Kontrolle des Konjugationserfolges, die anhand von Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektren und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte. Die erzielten Ergebnisse können als Grundlage für weiterführende Anwendungen funktionalisierter ND genutzt werden. Die Aufgabenstellung wird wie folgt formuliert:

1. Homogenisierung der Oberflächenbelegung von ND-Partikeln durch die gezielte Einführung funktioneller Gruppen und Überprüfung des Reaktionserfolges anhand von FT-IR-Spektren.
2. Immobilisierung von DNA-Molekülen auf den Partikeloberflächen durch Konjugation an die zuvor eingeführten funktionellen Gruppen und Überprüfung des Reaktionserfolges anhand von FT-IR-Spektren und Fluoreszenzaufnahmen.

Darüber hinaus wird eine Methode zur Herstellung einer kolloidalen ND-Suspension beschrieben, die anhand der Bestimmung von Partikelgrößen und Zeta-Potenzial charakterisiert wird. Weiterhin werden einige Untersuchungen durchgeführt, die der Materialcharakterisierung der Diamantpulver dienen.

Die Arbeit ist folgendermaßen gegliedert: Im ersten Kapitel erfolgt die Einleitung in die Thematik mit Nennung der Aufgabenstellung. In Kapitel 2 werden die theoretischen Grundlagen zu ND und Aptameren sowie die Konjugation zwischen Nanopartikeln und Biomolekülen vermittelt. Weiterhin werden die Funktionsprinzipien der angewandten Verfahren erklärt. Kapitel 3 beinhaltet eine Zusammenfassung der eingesetzten Materialien, Geräte und Methoden. In Kapitel 4 werden die Versuchsergebnisse präsentiert und unter Einbeziehung der Fachliteratur diskutiert. Die Arbeit schließt mit der Zusammenfassung der Ergebnisse in Kapitel 5 ab. Dieses beinhaltet weiterhin einen Ausblick mit Vorschlägen zur Verbesserung bzw. Ergänzung der angewandten Methoden und Anregungen zur weiterführenden Bearbeitung des Themas.

2 Theoretische Grundlagen

In den ersten drei Abschnitten des Kapitels werden die theoretischen Grundlagen zu den in dieser Arbeit verwendeten Materialien vermittelt. Dabei handelt es sich zum Ersten um Diamantpartikel im Nanometermaßstab und zum Zweiten um Aptamere, also einzelsträngige, synthetisch erzeugte DNA-Moleküle. In einem weiteren Abschnitt wird die Konjugation von Biomolekülen an Diamantpartikel und andere Substrate behandelt. Im Mittelpunkt stehen dabei die Methoden zur Konjugation, d. h. zur Kopplung der Reaktionspartner, die hauptsächlich über kovalente Bindungen oder durch Adsorption der Biomoleküle an das Substrat zustande kommt. Der Begriff Konjugation ist im hier verwendeten Zusammenhang nicht gleichzusetzen mit der biologisch oder chemisch definierten Konjugation. Es handelt sich vielmehr um eine Abwandlung des lateinischen Verbs coniugare, was so viel wie verbinden, zusammenschließen oder verheiraten bedeutet.

Als Ausgangsmaterialien für die Modifikation der Partikeloberflächen wurden zwei verschiedene Arten von Detonationsdiamanten verwendet (Abschnitt 3.3). Während es sich dabei einerseits um typische ND mit einem Partikeldurchmesser um 5 nm handelt, besteht das zweite Material aus polykristallinen Diamantpartikeln mit Durchmessern im dreistelligen Nanometerbereich. Nach Angaben des Herstellers Sinta (Minsk, Belarus) handelt es sich bei der Produktion des Materials um ein weiteres, spezielles Verfahren der Detonationssynthese, bei dem dem Sprengstoffgemisch dispergierter Graphit zugesetzt wird. Den jeweiligen Reaktionsbedingungen entsprechend, entstehen Partikel mit Größen im Nano- bis Mikrometerbereich. Folgt man der Nanopartikeldefinition in der Einleitung, handelt es sich bei diesem Material also nicht um Nanopartikel im engeren Sinn. Der Vereinfachung halber werden auch diese Diamanten in der Arbeit weiterhin als ND oder ND-Partikel bezeichnet.

Für die Konjugation von DNA wurde noch eine weitere Art von Detonationsdiamanten verwendet, bei dem die Partikel bereits mit definierten Oberflächenfunktionen ($-NH_2$ und $-OH$) versehen waren (Abschnitt 3.4). Das eingesetzte Thrombin-Aptamer (TBA) ist ein häufig in der Forschung verwendetes Modellaptamer über das bereits umfangreich publiziert wurde [BGL+92, BO05, MSS+93, VG03].

In den Abschnitten 2.4 bis 2.6 werden die Funktionsprinzipien der für diese Arbeit angewandten Methoden beschrieben.

2.1 Nanodiamant

Der Begriff Nanodiamant wird allgemein für unterschiedliche diamantbasierte Materialien im Nanometermaßstab, d. h. einer Größenskala von ungefähr 1-100 nm, verwendet. Darunter sind sowohl Diamantfilme, Diamantpartikel und ihre strukturellen Verbindungen als auch in Matrizen aus anderen Materialien eingelagerte Partikel zu verstehen. Eine spezielle Kategorie stellen die sogenannten ultrananokristallinen Diamanten (UNCD) dar, deren Größe lediglich im einstelligen Nanometerbereich liegt [SM06]. Diese Bezeichnung hat sich inzwischen für Diamantfilme mit Korngrößen im einstelligen Nanometerbereich etabliert und wird auch nicht in der vorliegenden Arbeit verwendet. Nach SHENDEROVA & MCGUIRE [SM06] weisen nanokristalline Diamantpartikel charakteristische Abmessungen im zweistelligen Nanometerbereich auf. Sie sind monokristallin – wie natürlicher Diamant oder synthetischer HPHT-Diamant – oder polykristallin wie Diamant aus der Schockwellensynthese (*DuPont*-Prozess). UNCD-Partikel sind 2-10 nm groß, ihre Durchschnittsgröße beträgt 4-5 nm. Die zu dieser Gruppe gehörenden Produkte aus der Detonationssynthese und der Ionenbestrahlung von Graphit besitzen im Wesentlichen eine monokristalline, stark defekthaltige Struktur und tendieren dazu Agglomerate zu bilden. Polykristalline Detonationsdiamanten mit Fraktionen im zwei- bis dreistelligen Mikrometerbereich entstehen durch Sintern von UNCD-Partikeln im Verlauf der Detonation. Zu den Diamantpartikeln gehören außerdem die sogenannten Diamantoide, die eine Größe von nur 1-2 nm aufweisen.

2.1.1 Historische Betrachtungen zur Detonationssynthese

Infolge der Veröffentlichung von DECARLI & JAMIESON [DJ61] waren am Beginn der 1960er Jahre einige Forschungsgruppen in der Sowjetunion unabhängig voneinander damit beschäftigt, die Herstellung von Diamant durch Schockwellensynthese zu etablieren. Im Jahr 1963 gelang VOLKOV, DANILENKO und ELIN die Beobachtung, dass ein militärisch genutztes Sprengstoffgemisch bei der Detonation in einem inerten Medium wie Argon oder in Wasser, einen diamanthaltigen Ruß hinterlässt. Der Anteil des Diamant-Kohlenstoffs im Ruß betrug dabei bis zu 75 %. Als Ausgangsmaterial wurde hierbei – neben dem zum Auslösen der Schockwelle verwendeten Sprengstoffgemisch – Graphit eingesetzt, der im Verlauf der Detonation durch einen Phasenübergang in Diamant umgewandelt wird. Unerklärlich aber war das Ergebnis der Reaktionen, denn die produzierte Diamantmenge war größer als die anfänglich eingesetzte Graphitmenge. Nach der Zugabe von immer weniger Graphit wurde zuletzt ausschließlich der Sprengstoff zur Detonation gebracht, und hinterließ immer noch diamanthaltigen Ruß. Dieses Ergebnis offenbarte, dass die im Sprengstoff enthaltenen Kohlenstoffatome zu Diamant kristallisieren. In späteren Jahren wurde diese Beobachtung

auch durch andere der involvierten Forschungsgruppen wiederholt. Das Prinzip der Detonations-synthese blieb jedoch im Wesentlichen geheim und gelangte aufgrund der militärischen Relevanz auch nicht in die Fachpresse und damit in das Ausland. Die weitere Erforschung des Verfahrens und seiner Reaktionsprodukte stagnierte und wurde in der Sowjetunion bzw. deren Nachfolgestaaten erst in der Zeit der politischen Umwälzungen nach 1990 wiederaufgenommen [Osa08]. Erst Jahrzehnte später wurde die Entdeckung von 1963 veröffentlicht [VDE90, Dan04].

Das Potenzial von ND aus der Detonationssynthese wurde erst mit der Entwicklung der Nanotechnologie am Beginn dieses Jahrhunderts erkannt. Durch internationale Fachtagungen bzw. Workshops in Kiew und Sankt Petersburg in den Jahren 2002 bis 2004 gelangte das Kohlenstoffmaterial erneut und verstärkt in den Fokus der Wissenschaften. Mit der stetigen Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten erhöhten sich auch die Produktionskapazitäten. Heute werden Detonationsdiamanten in mehreren Ländern wie Russland, Weißrussland, der Ukraine, Japan und China [SZB02] kommerziell hergestellt und sind zu niedrigen Preisen und in jeder gewünschten Menge erhältlich, was einen wesentlichen Vorteil des Materials darstellt.

2.1.2 Herstellung von Diamant

Aus dem Phasendiagramm des Kohlenstoffs kann abgeleitet werden, dass die thermodynamische Stabilität von Diamant nur bei sehr hohen Temperaturen und Drücken gewährleistet ist [Krü07]. Bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck ist Graphit die stabilste Form des Kohlenstoffs, wogegen Diamant metastabil ist [MSHG12]. Für die Herstellung von Diamant ist es daher in der Regel erforderlich, die seinem Stabilitätsbereich entsprechenden Bedingungen zu schaffen [Krü07].

Für die Erzeugung von Nano- und Mikrodiamanten existiert eine Reihe von Verfahren, die auf sehr verschiedenen Prinzipien basieren. MOCHALIN *et al.* [MSHG12] führen neben der Detonationssynthese u. a. auch die hochenergetische Vermahlung von HPHT-Diamant zu Mikrokristallen [BCJ+09], die plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (CVD) [FHH+91], die Chlorierung von Carbiden [WGM03], die Ionenbestrahlung von Graphit [DKLR01] und die Elektronenbestrahlung von Kohlenstoffzwiebeln [BA96] als Herstellungsverfahren auf. Außerdem kann auf natürliche Weise entstandener Diamant gewonnen werden. Das geschieht durch Extraktion von Diamantoiden aus Rohöl [DLC03] oder der Gewinnung von Diamant aus Meteoriten, die das Material aus dem Weltall mitbringen [LMWS87].

Ein für technische Anwendungen als auch Forschungszwecke bedeutendes Kohlenstoffmaterial stellen Diamantfilme dar, deren Erzeugung hauptsächlich durch Abscheidung von Kohlenstoff aus der Gasphase (CVD) realisiert wird [Gru99, WN06]. Die Prozessgase bestehen zum weit überwiegenden Teil aus Wasserstoff, dem Methan (CH_4) oder Acetylen (C_2H_2) als Kohlenstoffquelle

zugesetzt wird. Auf entsprechend temperierten Substratschichten scheidet sich daraus die Diamantphase ab. Der hohe Wasserstoffanteil dient zur Verhinderung der gleichzeitigen Entstehung von sp^2 -hybridisiertem Kohlenstoff. Im Gegensatz zu den HPHT-Verfahren, zu denen auch die Detonationssynthese gehört, handelt es sich bei der Gasphasenabscheidung um ein Niederdruckverfahren [KK13, Krü07].

Bei der Detonationssynthese, die in einer geschlossenen Reaktorkammer abläuft, werden Sprengstoffgemische zur Detonation gebracht, die zugleich als Kohlenstoffquelle und Energielieferant für die Entstehung von ND fungieren [MSHG12]. Die spezifischen Reaktionsbedingungen – hohe Temperatur, hoher Druck und negative Sauerstoffbilanz – werden durch Einhaltung bestimmter Parameter so gewählt, dass die Explosion zu einer unvollständigen Verbrennung des eingesetzten Sprengstoffes führt. Infolgedessen entsteht ein diamanthaltiger Ruß, der sich an den Reaktorwänden ablagert. Die im Ruß verteilten ND-Agglomerate müssen nach der Detonation aus diesem isoliert und verschiedenen Reinigungsprozeduren unterzogen werden [Krü07, SM06] (Abb. 2.1).

Für den erfolgreichen Ablauf einer Detonationssynthese müssen zwei technische Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen muss die Zusammensetzung des Sprengstoffes die erforderlichen thermodynamischen Bedingungen zur Bildung von Diamant gewährleisten, zum anderen muss ein Kühlmedium im Reaktor eine schnelle Temperaturabsenkung nach der Detonation bewirken, um die Transformation von Diamantkohlenstoff in Graphit zu verhindern [Do10].

Um eine effiziente Kühlung zu gewährleisten, wird die Reaktorkammer vor dem Einleiten der Detonation mit einem Kühlmittel versehen, das aus einem inerten Gas („*dry synthesis*“) oder Wasser bzw. Eis („*wet synthesis*“) besteht [MSHG12]. Ein schnellerer Temperaturrückgang wird generell bei der *wet synthesis* erreicht, so dass der Anteil der Diamantphase im Detonationsruß in der Kühlmittel-Reihenfolge Gas-Wasser-Eis, mit Ausbeuten von bis zu 40, 63 bzw. 75 %, ansteigt [ABOV10]. Der Vorteil der trockenen Synthese besteht darin, dass nur wenige Nebenreaktionen an den Partikeloberflächen stattfinden. Nachteilig ist dagegen das größere Wärmespeichervermögen, durch das sich der Anteil des graphitischen Kohlenstoffs im Produkt erhöht [Krü07].

Zur Erzeugung von ND werden unterschiedliche Sprengstoffe genutzt. Diese können sowohl unmittelbar aus der industriellen Produktion, als auch aus militärischen Beständen stammen. Letzteres stellt eine umweltfreundliche Methode zum Abbau nicht mehr benötigter Munitionsbestände dar [MSHG12], gibt jedoch bereits die Sprengstoffzusammensetzung vor. Zu den bekanntesten und am häufigsten für die Detonationssynthese eingesetzten Sprengstoffen gehören 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), Cyclo-1,3,5,-trimethylen-2,4,6-trinitramin (Hexogen, auch als RDX bezeichnet) und Triaminotrinitrobenzol (TATB). Die Wahl eines Sprengstoffes für die Synthese von ND hängt von seinem Energiegehalt und seiner chemischen Struktur, insbesondere vom Verhältnis von Kohlenstoff zu Sauerstoff ab. Diese Eigenschaften beeinflussen die Reaktionsbedingungen Druck

und Temperatur sowie die Ausbeute an Diamant. Da ein einzelner Sprengstoff oftmals nicht alle Anforderungen in sich vereint, wird auf Sprengstoffgemische zurückgegriffen, die sowohl einen höheren Energiegehalt aufweisen, als auch eine höhere Rußmenge hervorbringen können. Häufig wird Hexolit, ein Gemisch aus 40 % TNT und 60 % Hexogen, verwendet [Krü07].

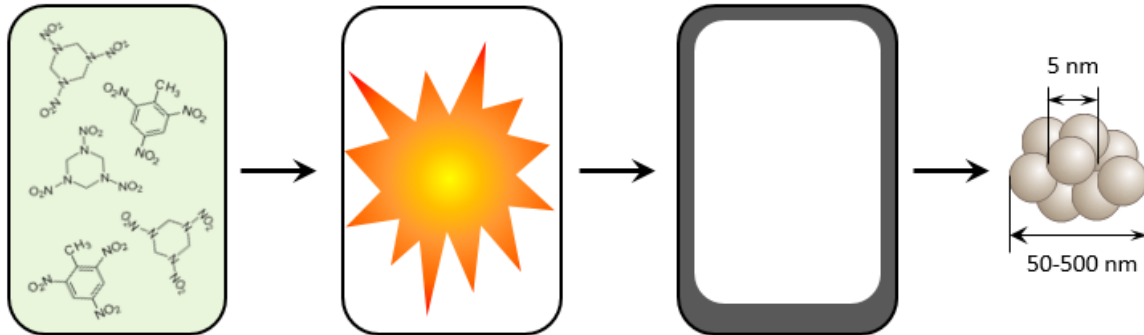


Abb. 2.1: Funktionsprinzip der Detonationssynthese. Sprengstoffgemische, wie z. B. Hexolit, werden in einem Kühlmedium (links) unter hohem Druck, hoher Temperatur und Sauerstoffmangel zur Explosion gebracht (Mitte). Der an den Reaktorwänden abgelagerte Detonationsruß (rechts) enthält einen gewissen Prozentsatz an Nanodiamant (ND). Rechts außen: Die synthetisierten ND-Primärpartikel vereinigen sich zu Agglomeraten unterschiedlicher Größe (Schema gezeichnet nach [Krü07, MSHG12]).

Unter dem Begriff Detonationssynthese werden zwei Verfahren zusammengefasst, die sich in der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials und der Partikelgröße des Endproduktes unterscheiden. Neben der Herstellung von ND mit einer Primärpartikelgröße von etwa 4-10 nm, die die Explosion eines Sprengstoffgemisches vorausgeht, werden in einem weiteren Verfahren Partikel mit einer Größe von 10-160 nm produziert. Als Kohlenstoffquelle wird hierbei ein Gemisch aus 30-90 % Hexogen verwendet, dem Ruß oder Graphit zugesetzt wird. Als Reaktionsprodukt bildet sich polykristalliner Diamant, der – ähnlich wie bei der Schockwellensynthese – durch das Zusammensintern von Primärpartikeln entsteht. Beim zuerst genannten Verfahren der Herstellung von ND wird ausschließlich der Sprengstoff als Kohlenstoffquelle genutzt, wobei sich im Wesentlichen monokristalliner Diamant bildet. Das Ausgangsmaterial muss, als Voraussetzung für eine unvollständige Oxidation des vorhandenen Kohlenstoffs, eine negative Sauerstoffbilanz aufweisen. Nur dann kann Diamant entstehen [Krü07, SM06].

Mit der Ausbreitung der Detonationswelle laufen mehrere Prozesse ab: Die Moleküle des Sprengstoffes werden zersetzt und bilden Kohlenstoff-Nanocluster, die in kleinen Flüssigkeitströpfchen koagulieren. Es kristallisieren sich Diamantkerne heraus, die bis zu einer bestimmten Größe heranwachsen [MSHG12]. Das Wachstum endet, wenn durch das Abklingen der Detonationswelle ein bestimmter Druck in der Reaktorkammer unterschritten wird. Die erreichbare Partikelgröße ist damit abhängig von der Zeitdauer des Vorherrschens eines genügend großen Druckes, die bei einer

Detonation naturgemäß nur sehr kurz ist [Krü07]. An der Front der Detonationswelle wird ein Druck von 20-30 GPa und eine Temperatur von 3000-4000 K erreicht. Diese Reaktionsbedingungen korrespondieren mit dem Bereich der thermodynamischen Stabilität von Diamant im Phasendiagramm von Kohlenstoff [ABOV10, Vul06].

Das Reaktionsprodukt, der Detonationsruß, enthält neben der Diamantphase 25-85 % graphitischen Kohlenstoff und 1-8 % nicht brennbare Verunreinigungen, wie Metalle und ihre Oxide [Dol01]. Um diese vollständig entfernen zu können, müssen die ND-Aggregate zerstört und damit die Primärpartikel freigelegt werden [MSHG12].

2.1.3 Aufbereitung von Nanodiamanten aus der Detonationssynthese

Der Herstellungsprozess von Detonationsdiamant umfasst neben der eigentlichen Synthese auch die Aufbereitung und Modifikation der Reaktionsprodukte. Darunter sind Maßnahmen zu verstehen, die die Reinheit der produzierten Diamanten gewährleisten sollen. Diese unterscheiden sich von Hersteller zu Hersteller, sodass letztendlich jedes Diamantprodukt spezifische Eigenschaften aufweist [SH10].

Die Aufbereitung des Detonationsrußes beginnt mit der mechanischen Abtrennung grober Verunreinigungen, wie z. B. dem Aussieben und der Magnetseparation metallischer Bestandteile. Durch diese Bearbeitungsschritte erhöht sich der Kohlenstoffanteil im Rohmaterial, der aber immer noch größere amorphe bzw. graphitische Anteile enthält [Krü07]. Der nächste Reinigungsschritt besteht in der Oxidation des Detonationsrußes. Eine klassische Methode stellt dabei die Anwendung konzentrierter Mineralsäuren als Oxidationsmittel bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur dar [SH10]. Hierbei wird sowohl der Anteil von metallischen Verunreinigungen wie auch von sp^2 -hybridisiertem Kohlenstoff reduziert. Während Metalle und Metalloxide gelöst werden, wird amorpher und graphitischer Kohlenstoff zu CO_2 oxidiert. sp^3 -hybridisierter Diamantkohlenstoff bleibt dagegen aufgrund seiner geringen Reaktivität gegenüber Säuren erhalten [Krü07].

Für den Oxidationsprozess kommen verschiedene Säuren und Säuregemische in Frage. Häufig werden konzentrierte Schwefelsäure (H_2SO_4), Salpetersäure (HNO_3), Perchlorsäure ($HClO_4$) oder ein Gemisch aus H_2SO_4 mit HNO_3 , Salzsäure (HCl), Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwendet. Weiterhin haben sich Natriumperoxid (Na_2O_2) sowie Gemische aus Kaliumhydroxid (KOH) und Kaliumnitrat (KNO_3) oder HNO_3 und H_2O_2 als geeignete Oxidationsmittel erwiesen [Dol01, Krü07, MSHG12, SH10].

Alternativ oder zusätzlich zur Behandlung mit flüssigen Oxidationsmitteln kann sp^2 -hybridisierter Kohlenstoff bei erhöhten Temperaturen in der Gasphase entfernt werden. So bewirkt z. B. die Reaktion mit Ozon eine Umwandlung von graphitischem Kohlenstoff in CO_2 oder CO . Dabei werden auch

gleichzeitig die Oberflächen der neugebildeten Diamantpartikel von angelagertem Graphit befreit und mit sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen angereichert [PSG+07, SH10]. Die thermische Nachbehandlung kann aber auch in anderen Gasen wie z. B. Luft [OYM+06] oder Argon erfolgen. Gereinigte Diamantproben weisen eine typische Zusammensetzung auf. Der Kohlenstoffgehalt von Detonationsdiamanten beträgt dabei 80-90 %, wovon wiederum 90-97 % aus Diamantkohlenstoff bestehen. Dazu kommen etwa 0,5-8 % Sauerstoff, 0,5-1,5 % Wasserstoff, 2-3 % Stickstoff und 0,5-5 % Rückstände aus der Synthese und Reinigung. Diese Elementarzusammensetzung deutet eine dichte Belegung der Partikeloberflächen mit funktionellen Gruppen an [Krü07].

2.1.4 Struktur und Eigenschaften von Diamant

Kohlenstoff (C) ist ein Element der vierten Hauptgruppe des Periodensystems mit der Elektronenkonfiguration $1s^2 2s^2 2p^2$. Im Grundzustand enthält das 2p-Orbital nur zwei ungepaarte Elektronen. Der Energieunterschied zwischen dem 2s- und 2p-Orbital ist relativ klein, weshalb unter dem Einfluss eines Bindungspartners durch das Anheben eines 2s-Elektrons auf das freie 2p-Orbital ein angeregter Zustand entstehen kann. Dann ordnen sich die vier zunächst unterschiedlichen Atomorbitale ($2s^1 2p^3$) zu vier neuen, energetisch gleichwertigen Orbitalen ($2sp^3$) an. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Es entstehen sp^3 -Hybridorbitale, in denen das Kohlenstoffatom sp^3 -hybridisiert ist (Diamantstruktur). Im angeregten Zustand kann das Kohlenstoffatom auch eine sp^2 -Hybridisierung eingehen. Dabei hybridisiert das 2s-Atomorbital nur mit zwei von drei 2p-Atomorbitalen, wobei drei energetisch gleichwertige sp^2 -Hybridorbitale entstehen, die mit jeweils einem Elektron besetzt sind. Es verbleibt ein einfach besetztes p-Orbital [ZEKS92].

Die Hybridisierung bestimmt die Raumstruktur der Moleküle: sp -hybridisierte C-Atome bilden lineare Ketten, sp^2 -hybridisierte planare zweidimensionale Strukturen und sp^3 -hybridisierte C-Atome tetraedrisch angeordnete dreidimensionale Strukturen aus [Krü07]. Die Diamantstruktur besteht in der Regel aus einem kubisch flächenzentrierten (kfz) – der seltener vorkommende hexagonale Diamant (Lonsdaleit) [Krü07] aus einem hexagonal primitiven (hp) – Bravais-Gitter. Aufgrund der vergleichsweise geringen Packungsdichte von $P = 0,34$ (nur 34 % des Gittervolumens sind belegt) können kleine Atome leicht in die Lücken der Elementarzellen, die jeweils acht C-Atome enthalten, eingebaut werden [Zsc13].

Diamant besitzt eine charakteristische kristalline Struktur, in der jedes C-Atom tetraedrisch von vier weiteren C-Atomen umgeben und durch vier σ -Bindungen an seine Nachbaratome gebunden ist. Die C-Atome des Tetraeders sind in dessen Ecken lokalisiert, in die auch die sp^3 -Hybridorbitale weisen, wobei diese im größtmöglichen Winkel von $109,5^\circ$ zueinander angeordnet sind. Aus der hohen C–C-Bindungsenergie von 348 kJ/mol ergibt sich die große Härte von Diamant [Rie94].

Graphit kristallisiert in Schichtstrukturen. Innerhalb der einzelnen Schichten ist jedes C-Atom von drei Nachbaratomen in Form eines Dreiecks umgeben. Die C-Atome des Graphits sind sp^2 -hybridisiert und bilden mit jedem Nachbaratom eine σ -Bindung aus. Das jeweils vierte Elektron hält sich in einem p-Orbital auf, dessen Achse senkrecht zur Ebene der Schicht angeordnet ist [Rie94].

ND besitzt die gleiche kristalline Struktur wie makroskopischer Diamant, ist aber darüber hinaus durch seine geringe Partikelgröße gekennzeichnet [Krü07]. Durch Röntgenbeugungsexperimente wurde festgestellt, dass Detonationsdiamanten grundsätzlich nur kubische Gitterstrukturen aufweisen, während aus Graphit synthetisierter Diamant auch hexagonale Gitterstrukturen enthält [SZB02]. Ultradisperse ND-Partikel bestehen aus einem Kern aus sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff, der mit einer sp^2 -hybridisierten Graphithülle bzw. einer Schicht amorphen Kohlenstoffs bedeckt ist. Diese äußeren Schichten weisen ungesättigte Bindungen und terminale funktionelle Gruppen auf, die den Partikeln spezifische Oberflächeneigenschaften verleihen [SRH+14, Krü07] (Abb.2.2).

Während die Materialeigenschaften von makroskopischem Diamant hauptsächlich auf dessen Gitterstruktur zurückzuführen sind, kommt bei nanoskaligem Diamant der Beschaffenheit der Oberfläche eine größere Bedeutung zu [Mei11], da sich mit abnehmendem Durchmesser der Anteil der Oberflächenatome stark erhöht. Bei Detonationsdiamanten mit einer Größe von 3-5 nm befinden sich etwa 20-30 % der Atome an der Oberfläche [Krü07].

Ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung eines ND-Pulvers ist die spezifische Oberfläche. Man findet hierzu etwas voneinander abweichende Angaben vor: 250-300 [MKP02], 250-350 [KBSY09], 200-300 [Vul06], 250-270 [JX95] oder 250-420 m^2/g [KB06], wobei die Werte von der jeweiligen Partikelgröße, der Reinheit des Materials u. a. Parametern abhängen.

Diamant ist chemisch nahezu inert, kann aber von oxidierenden Substanzen angegriffen werden. In Gegenwart von reinem Sauerstoff verbrennt Diamant bei 720 °C, in Luft bei 800 °C zu Kohlendioxid. Eine Umwandlung von metastabilem Diamant in die thermodynamisch stabilere Kohlenstoffmodifikation Graphit erfolgt erst bei etwa 1500 °C unter Luftabschluss in einer exothermen Reaktion [002, Rie94].

Nanoskalige Diamantpartikel weisen im Vergleich zu *bulk*-Diamant eine deutlich erhöhte Reaktivität auf. Als Ursachen dafür sind Strukturdefekte und die stark vergrößerte Oberfläche in Bezug auf das Volumen der Partikel zu nennen [Krü07]. Während der aus sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff bestehende Kern sich chemisch inert verhält, können die ihn umgebenden Schichten aus graphitischem oder amorphem Kohlenstoff Bindungen mit anderen Atomen oder Molekülen eingehen. Bei Detonationsdiamanten läuft die primäre Funktionalisierung bereits während der Synthese und der anschließenden Aufbereitung ab.

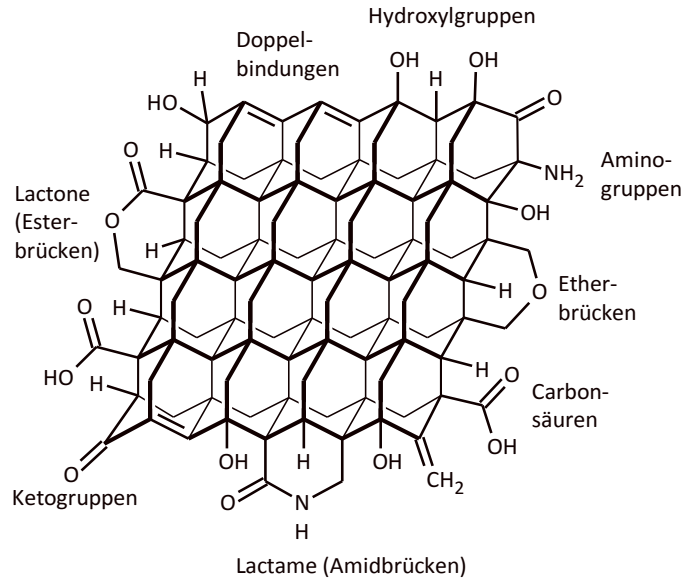


Abb. 2.2: Gitterstruktur von (Nano)Diamant. Die Oberflächenatome von ND-Partikeln sind mit funktionellen Gruppen assoziiert (Schema gezeichnet von J. Michael, verändert).

Als bedeutendste mechanische Eigenschaft von Diamant – auch im Nanometermaßstab – ist seine außergewöhnliche Härte hervorzuheben: Er ist das härteste natürlich vorkommende Mineral mit einem Wert von 10 auf der Mohs-Skala. Diamant besitzt einen geringen Reibungskoeffizienten von $\mu = 0,03$, eine hohe Dichte von $\rho \sim 3,52 \text{ g/cm}^3$ und eine hohe Wärmeleitfähigkeit von $\kappa = 2300 \text{ W/mK}$. Darüber hinaus ist Diamant mit seinem hohen spezifischen (elektrischen) Widerstand von $\rho > 10^{14} \Omega\text{m}$ ein hervorragender Isolator. Die Wärmebeständigkeit ist dagegen gering und führt bereits bei Temperaturen ab $700 \text{ }^\circ\text{C}$ zur Phasenumwandlung in Graphit [003]. Die elektrische Leitfähigkeit ist abhängig von der Struktur des Kohlenstoffs. Während Diamant als hervorragender Isolator gilt, erhöht sich die Leitfähigkeit von ND mit steigendem Graphitanteil beträchtlich [Krü07]. Aus physikalischer Sicht sind besonders die optische Transparenz [SB08], die hohe Dispersion sowie der hohe Brechungsindex von Diamant ($n \sim 2,43$) [003, SNPZ07] hervorzuheben. Aufgrund intrinsischer Gitterdefekte und Verunreinigungen können ND Fluoreszenzlicht emittieren. Von allen Defekten im Diamant-Gitter ist das negativ geladene (N–V)⁻-Zentrum das bedeutendste [GDC+97]. Es absorbiert bei 560 nm und emittiert Fluoreszenzlicht bei ungefähr 700 nm [DH76].

Die Präsenz von N–V-Zentren – ein N-Atom neben einer Fehlstelle im Diamantgitter – verleiht Diamantpartikeln nützliche Fluoreszenzeigenschaften. N–V-Zentren können durch die Bestrahlung mit hochenergetischen Partikeln (Elektronen, Protonen, He-Ionen), gefolgt vom Ausglühen (Tempern) in Vakuum bei $600\text{-}800 \text{ }^\circ\text{C}$, induziert werden [CLC+08, RDS+10]. Die Bestrahlung verursacht Fehlstellen im Diamantgitter, die während des Temperns umherwandern und von ansässigen N-Atomen eingefangen werden [MSHG12].

ND zeigen eine hohe Fluoreszenzintensität und Photostabilität: Durch die Bestrahlung mit Protonen erzeugten Yu *et al.* [YKC+05] fluoreszente ND (100 nm) mit einer hohen Konzentration von (N–V)⁻Zentren. Während der mehrstündigen Bestrahlung mit einer Quecksilberdampfampe wurde eine 100fach erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer nichtbestrahlten Kontrollprobe festgestellt. Die Fluoreszenzintensität der Partikel mit (N–V)⁻Zentren blieb indessen konstant, d. h. es waren keine Anzeichen von Photobleaching zu beobachten. Andere Quellen nennen jedoch eine geringe Fluoreszenzintensität als Nachteil von N–V-Zentren [SRH+14]. Eine hohe Intensität ist damit nicht automatisch gegeben, sondern von verschiedenen Faktoren, wie z. B. der Größe der Partikel, abhängig.

Fluoreszierende ND können weiterhin auch durch die Ankopplung verschiedener Substanzen mit Fluorophoren erzeugt werden. Ein Beispiel dafür sind die von VIAL *et al.* [VMS+08] erzeugten Konjugate aus ND und Fluorescein-gelabelten Peptiden.

Umfangreiche Ergebnisse aus Experimenten zur Charakterisierung der Struktur und des Oberflächenzustandes von ND aus der Detonationssynthese wurden von ZOU *et al.* [ZLZW09] präsentiert. Unter den Reaktionsbedingungen einer trockenen Synthese wurde ein Sprengstoffgemisch von 60 % TNT und 40 % Hexogen zur Detonation gebracht. Die daraus resultierenden Diamantpartikel wiesen eine kubische Gitterstruktur sowie eine sphärische oder elliptische Form bei einer Größe von 2-12 nm auf. Die durchschnittliche Korngröße lag bei 5 nm. Es wurde eine Gitterkonstante von $\alpha_0 = 3,5923$ ermittelt, die damit geringfügig über derjenigen von *bulk*-Diamant ($\alpha_0 = 3,5667$) lag. Das Beugungsmuster ergab drei Peaks bei $2\theta = 43,8; 75,2$ und $91,1$ °C, die mit den Diamant-Ebenen (111), (220) und (311) korrespondierten und damit den Nachweis für einen kubischen Gitteraufbau lieferten. Außerdem trat eine breite Bande im Bereich von $2\theta = 20-30$ ° auf, die mit der Graphit-Ebene (002) korrespondierte. Für die spezifische Oberfläche wurden Werte von 278-335 g/m² ermittelt, die Dichte betrug 3,3 g/cm³. Der Kohlenstoffgehalt der zwei untersuchten Proben (mit geringfügigen Abweichungen im Reinigungsverfahren) lag bei 83,3 bzw. 87,0 %. Außer Kohlenstoff konnten lediglich die Elemente Sauerstoff und Schwefel nachgewiesen werden, woraus sich ein hoher Reinheitsgrad der Proben ableiten ließ. Die Auswertung der FT-IR- und Raman-Spektren deutete darauf hin, dass die Partikeloberflächen hauptsächlich mit –OH, –CH₃, –CH₂, –C=O, –COOH und –C–O–C-Gruppen belegt waren.

ND-Partikel besitzen verschiedene Eigenschaften, die sie für biologische und medizinische Anwendungen prädestinieren. Neben der bereits erwähnten Fluoreszenz und der leichten Modifizierbarkeit der Oberflächen, gehören hierzu vor allem eine hohe Biokompatibilität und geringe bzw. nicht nachweisbare Zytotoxizität. SCHRAND *et al.* [SHC+07] konnten zeigen, dass sich Detonations-

diamanten gegenüber verschiedenen Zelltypen als nicht toxisch erwiesen und keine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Sauerstoffradikalen) induzierten. Auf ND-beschichteten Substraten wuchsen Zellen ohne morphologische Veränderungen heran. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen an Neuroblastom-Zellen wurde beobachtet, dass gemeinsam mit ND inkubierte Zellen intakte Mitochondrienmembranen behielten, wogegen die Membranen mit Kohlenstoffruß oder Cadmiumoxid inkubierter Zellen Beschädigungen aufwiesen. In weiteren Untersuchungen mit Zelllinien von Alveolarmakrophagen und Neuroblastom-Zellen wurde festgestellt, dass die Biokompatibilität von ND höher als diejenige von anderen Kohlenstoff-Nanomaterialien ist. Der Trend ging dabei von ND über Rußpartikel und MWCNT bis zu SWCNT, die die geringste Biokompatibilität zeigten [SDS+07].

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen LIU *et al.* [Liu2007], die 5 und 100 nm große ND-Partikel hinsichtlich ihrer Biokompatibilität gegenüber humanen Lungenfibroblasten und -epithelzellen untersuchten. Dabei wurde festgestellt, dass ND weder zytotoxisch sind noch Apoptose induzieren. Die Partikel beider Größenklassen wurden in das Zytoplasma der Lungenzellen aufgenommen. Bei Anregung mit Laserlicht zeigten sie innerhalb der Zellen eine grüne Fluoreszenz und konnten daher mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie detektiert werden.

Weitere Beiträge zu den Themen Biokompatibilität und Cytotoxizität von ND liefern die Arbeiten von VAIAJAYANTHIMALA *et al.* [VTCL09], VIAL *et al.* [VMS+08] und FU *et al.* [FLC+07]. Nicht immer jedoch werden positive Resultate im Hinblick auf die beiden genannten Eigenschaften erzielt. Über nachteilige Effekte von ND wurde erstmals 2004 von PUZYR *et al.* [PNT+04] berichtet. Anhand von *in vitro*-Experimenten mit Humanblut wurde gezeigt, dass ND-Partikel die Hämolyse von Leukozyten und Erythrozyten verursachen. XING *et al.* [XXZ+11] beobachteten bei der Inkubation embryonaler Stammzellen von Mäusen mit ND eine leicht erhöhte Expression von DNA-Reparaturproteinen. In den Tests wurden ND als Rohmaterial sowie mit oxidierten (carboxylierten) Oberflächen eingesetzt, wobei sich für die Inkubation mit oxidierten Partikeln mehr DNA-Defekte in den Stammzellen nachweisen ließen. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die Toxizität der Partikel von der Art ihrer Oberflächenmodifikation abhängig ist.

2.1.5 Homogenisierung der Oberflächenbelegung

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Oberflächen von ND-Partikeln aus der Detonations-synthese nach abgeschlossener Aufbereitung verschiedene funktionelle Gruppen tragen, deren Art und Belegungsdichte von den spezifischen Reinigungsprozeduren abhängig sind (Abb. 2.2 und 2.3). Bei den bereits oben erwähnten Oxidationsvorgängen werden neben der Entfernung von sp²-hybridisiertem Kohlenstoff auch ursprünglich vorhandene Funktionen von den Oberflächen verdrängt

und stattdessen durch sauerstoffhaltige Gruppen wie Anhydride und Carboxylgruppen ersetzt [MSHG12]. Untersuchungen zur Elementarzusammensetzung von ND-Pulvern deuten generell eine dichte Belegung mit sauerstoffhaltigen Gruppen an. Stickstoffatome befinden sich dagegen größtenteils im Inneren des Diamantgitters, woraus sich die weitgehende Abwesenheit von Amid-, Amino-, Nitro- und Cyanogruppen ableitet [Krü07].

JIANG & XU [JX95] untersuchten Detonationsdiamanten mittels FT-IR-Spektroskopie und registrierten Schwingungen, die sich Alkoholen, Methyl- und Methylengruppen, Lactamen, cyclischen Ketonen, Estern, Ethern, Amiden und Epoxiden zuordnen ließen. An anderer Stelle wird auf die Präsenz von Ketonen, Laktone, Iminen, Alkenen, (Hydro)Peroxiden, Ester-, Amino-, Carbonyl-, Hydroxyl-, Aldehyd-, Carboxyl- und Ether-ähnlichen Gruppen verwiesen [KBSY09, SDG+06, SH10, ZGAV10].

Die Ausgangssituation für alle weiteren Funktionalisierungsschritte ist also eine primäre heterogene Oberflächenbelegung. Um Partikel mit bestimmten Eigenschaften zu erhalten, wird im Allgemeinen eine homogene Belegung mit einem möglichst hohen Anteil nur einer Gruppe, d.h. eine monofunktionale Oberflächenterminierung angestrebt [SH10]. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine Vielzahl chemischer, photochemischer und elektrochemischer Strategien entwickelt [SB08].

Nach KRÜGER [Krü07] kann die weitgehende Homogenisierung der Oberflächen durch Verfahren der Oxidation, Reduktion, Hydrierung und Graphitisierung erfolgen (Abb.2.3).

Graphitisierungen werden durch die thermische Behandlung des Materials bei Temperaturen von zumeist über 900 °C durchgeführt. Dabei geht die bereits vorhandene Funktionalisierung verloren und die äußere Schicht der ND-Partikel wird graphitisiert. Der Nachteil besteht in einer verstärkten Agglomeration der so behandelten Partikel, wodurch große Bereiche der Oberflächen nicht für erneute Modifikationen zugänglich sind [Krü07]. Graphitisierte ND wurden beispielsweise von KRÜGER & LANG [LK11] als Ausgangsmaterialien für die Modifikation der Oberflächen mit Pyrrolidinringen (Prato-Reaktion) eingesetzt.

Die einfachste Modifikation an Diamantoberflächen ist die Hydrierung, die besonders bei Diamantfilmen vorherrscht [Krü07]. Über die weitere Funktionalisierung von hydrierten Diamantfilmen wird z. B. von SZUNERITS & BOUKHERROUB [SB08], YANG *et al.* [YAB+02] und WENMACKERS *et al.* [WVV+09] berichtet, wobei in den beiden letztgenannten Arbeiten die Anbindung von DNA beschrieben wird. Möglich, wenn auch technisch schwerer umsetzbar, ist ebenso die Hydrierung von Diamantpartikeln. ANDO *et al.* [AYI+93] berichten über die Hydrierung von Mikrodiamantpulver in einem Plasmareaktor mit reinem Wasserstoff (ähnlich wie bei der Abscheidung von Diamant aus der Gasphase). Im Zuge der Hydrierung werden Carbonylgruppen auf den Partikeloberflächen reduziert, indem C-Atome statt einer Doppelbindung zu einem Sauerstoffatom zwei Einfachbindungen zu je zwei H-Atomen eingehen.

Chemische Methoden zur Funktionalisierung werden generell in reduktive und oxidative Methoden eingeteilt. Die Oxidation von ND basiert auf der unterschiedlichen Reaktivität von graphitischem und Diamantkohlenstoff. Während graphitische Strukturen zuerst oxidiert und als Gase entfernt werden, wird der Diamantkern lediglich an der Oberfläche modifiziert. Zur Oxidation werden konzentrierte Mineralsäuren und deren Gemische, Wasserstoffperoxid, Ozon oder Halogene – zumeist Fluor oder Chlor, seltener auch Brom – verwendet [Krü07].

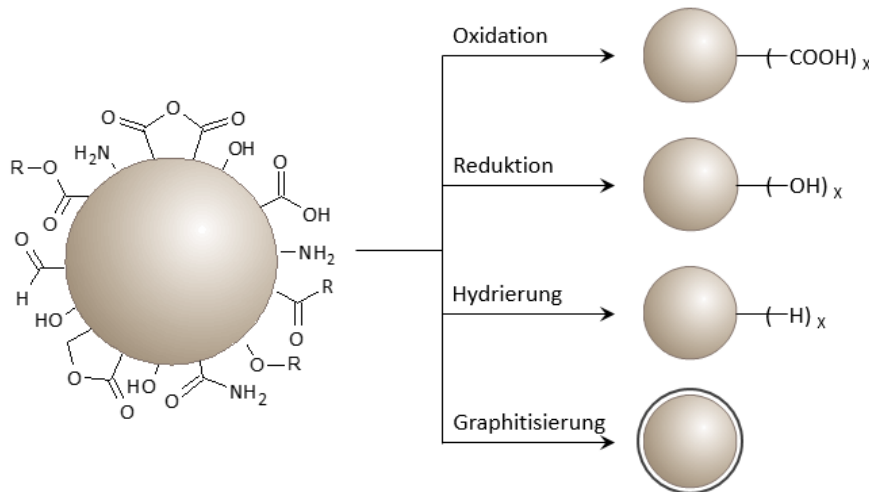


Abb. 2.3: Strategien zur Homogenisierung von ND-Oberflächen (Schema gezeichnet nach [Krü07]).

Reaktionen mit oxidierenden Mineralsäuren erfolgen bei erhöhten Temperaturen und führen zur Umwandlung bestehender Oberflächengruppen wie z. B. Methyl- oder Ketogruppen in Carboxylgruppen [Krü07]. Letztere können wiederum als Ausgangsmodifikation für verschiedene weitere Funktionalisierungen dienen [MSHG12]. Als Beispiel dafür soll die Arbeit von USHIZAWA *et al.* [USM+02] genannt werden, die Carboxylgruppen durch Oxidation mit einem Gemisch aus Schwefel- und Salpetersäure an den Oberflächen von 1-2 μm großen Diamantpartikeln einführen.

Bei der Fluorierung von Oberflächen bilden sich C–F-Bindungen heraus, die eine Vielzahl weiterer Reaktionen erlauben [Krü07]. So benutzten etwa LIU *et al.* [LGMK04] fluorierte ND als Ausgangsprodukte für die Erzeugung von alkylierten, aminierten und der Aminosäure Glycin modifizierten ND. Die Reaktionsprodukte zeigten eine zunehmende Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln und eine reduzierte Agglomeration der Partikel.

Durch nukleophile Substitution kann ein Austausch von Halogenatomen an Diamantoberflächen erfolgen, der zur Modifikation mit Substanzen wie Alkoholen, Aminen oder Ammoniak genutzt wird. So können sich z. B. an chlorierten Oberflächen durch Reaktionen mit einem Alkohol Etherstrukturen, durch Reaktionen mit Aminen oder Ammoniak Amine ausbilden [Krü07].

Die bereits erwähnte Hydrierung stellt auch die einfachste Form der Reduktion dar. Darüber hinaus können Reagenzien wie Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) oder Boran (als Boran-Tetrahydrofuran-Komplex) eingesetzt werden, die die Umwandlung von Carbonylfunktionen in Hydroxylgruppen bewirken [Krü07, Kru8a, KLJS06]. Die Reduktion von C=O-haltigen Gruppen durch LiAlH_4 wurde u. a. von HENS *et al.* [HCT+08] beschrieben. Hydroxylgruppen können weiterhin auch auf mechanischem Wege über Mahlverfahren (*stirred media milling*, [KKO+05]) oder die Mahlkörper-unterstützte Zerkleinerung durch Ultraschalleinwirkung (BASD, [OIM+07]) eingeführt werden. Die Partikeloberflächen werden durch diese Behandlungen deutlich hydrophiler und es entstehen stabile kolloidale Suspensionen, was sich auch im Anstieg der Zeta-Potenzial-Werte niederschlägt [KL12].

Die Silanisierung von Diamant nimmt ihren Ausgang an hydroxylierten Oberflächen. Durch Kondensreaktionen von Hydroxylgruppen mit Alkoxysilanen bilden sich C–O–Si-Bindungen aus, die aufgrund der Vielzahl von modifizierten Silanen eine hohe Variabilität von Oberflächenfunktionen ermöglichen [Krü07]. So verwendeten z. B. KRÜGER *et al.* [KLJS06] hydroxylierte Diamantpartikel zur Anbindung von (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES), an dessen freie Aminogruppen schließlich Peptide konjugiert wurden.

FESTAG *et al.* [FSW+05] schildern zwei Möglichkeiten zur Modifikation von Glassubstraten mittels Silanen. Dabei reagieren die Hydroxylgruppen an der Glasoberfläche mit 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) bzw. APTES unter Ausbildung von C–O–Si-Bindungen. Durch die Einführung von GOPS und APTES werden freie Epoxy- bzw. Aminogruppen für die weitere Funktionalisierung bereitgestellt. Allerdings sind die Bindungen zwischen Silanen und Hydroxylgruppen empfindlich gegenüber Hydrolyse und daher nicht für Anwendungen geeignet, die eine hohe Stabilität der Bindungen erfordern [Krü07].

Nach abgeschlossener Homogenisierung der Oberflächenbelegung können die nun dominierenden funktionellen Gruppen als Ausgangsbasis für weiterführende Modifikationen genutzt werden. Die Oberflächen von ND weisen, insbesondere nach einer gezielten chemischen Vorbehandlung, eine außerordentlich hohe Affinität für die Immobilisierung von Biomolekülen auf [HC04, KHH+05]. Diese kann kovalent (über Atombindungen) oder auch nichtkovalent (durch Adsorption) erfolgen. Als Beispiele sollen hier die Ausbildung von ND-Insulin-Komplexen über physikalische Adsorption [SRL+09] und die kovalente Immobilisierung von Antikörpern an ND über Amidbindungen [MPG+09] genannt werden. Da sich die vorliegende Arbeit schwerpunktmäßig mit der Konjugation von Biomolekülen – insbesondere DNA – an Detonationsdiamanten befasst, wird dieser Thematik ein gesonderter Abschnitt (2.3) gewidmet.

2.1.6 Aggregation und Deaggregation von Nanodiamantpartikeln

ND-Partikel tendieren – nicht zuletzt aufgrund ihrer funktionellen Gruppen – zu Aggregation und Agglomeration. Unter Beteiligung von Hydroxylgruppen verschiedener Partikel können sich z. B. Wasserstoffbrückenbindungen, Carbonsäureanhydride oder Etherbindungen zwischen diesen ausbilden [Krü07]. Werden die entstandenen Aggregate bzw. Agglomerate nicht zerkleinert, sind große Teile der Partikeloberflächen unzugänglich für oxidierende oder reduzierende Substanzen. Daher mussten Methoden entwickelt werden, die eine Zerkleinerung von Aggregaten bis auf das Niveau von Primärpartikeln erlauben.

Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von ND durch Ōsawa *et al.* [Osa08] führten zu dem Ergebnis, dass Diamantpartikel einer hierarchischen Agglomeration in drei Größenklassen unterliegen, die jeweils auf unterschiedlichen Bindungskräften beruhen:

- Primärpartikel mit einer Durchschnittsgröße von 4-5 nm lagern sich zu Primäraggregaten mit einer Größe von 100-200 nm zusammen, die nicht durch Ultraschallbehandlungen aufgeschlossen werden können.
- Sekundäraggregate aus Primäraggregaten sind etwa 2-3 µm groß und können durch Ultraschallbehandlung voneinander getrennt werden.
- Die Sekundäraggregate schließen sich zu lose zusammenhängenden Agglomeraten zusammen, die eine Größe von 20-50 µm aufweisen.

Innerhalb der Primäraggregate liegen besonders feste Bindungen vor, die mit kovalenten C–C-Bindungen zwischen den Primärpartikeln assoziiert werden. Es wird angenommen, dass sich dabei eine polykristalline Struktur ausbildet [Osa08].

Eine effiziente Deaggregation der Partikel kann mit verschiedenen Methoden erreicht werden, die im Allgemeinen mit einer Dispersion in Wasser, Alkoholen oder organischen Lösungsmitteln einhergehen [OIM+07, KSL+08]. Zur Herstellung kolloidaler Suspensionen mit stark reduzierten Teilchengrößen, können verschiedene Mahlwerkzeuge wie etwa Kugelmühlen (eng. *ball mill*), Planetenmühlen (eng. *planetary mill*), Planetenkugelmühlen (eng. *planetary ball mill*) oder Reibungsmühlen (eng. *attrition mill*) als auch Ultraschallbehandlungen (eng. *sonication*) eingesetzt werden. Bei beiden Verfahren kann die mechanische Intensität durch die Zugabe von Mahlkörpern zum Medium erhöht werden. Ein Beispiel dafür ist die bereits erwähnte BASD-Methode [KOJ+07, KSL+08, LOK09, OIM+07], bei der die ultraschallbedingte Kavitation durch Mahlkörper-induzierte Scherkräfte verstärkt wird. Beiden Verfahren ist gemeinsam, dass die Stabilität der kolloidalen Suspensionen von den Eigenschaften des Lösungsmittels abhängt, wobei die besten Ergebnisse mit Wasser und Dimethylsulfoxid (DMSO) erzielt wurden.

2.1.7 Anwendungen von Nanodiamantpartikeln

Nach MOCHALIN *et al.* [MSHG12] kam es bereits ab dem Ende der 1990er Jahre zu einigen bedeutenden Durchbrüchen, die neue Anwendungsfelder für ND eröffneten. Dazu gehörten die Möglichkeit der Herstellung kolloidaler ND-Suspensionen, der Einsatz fluoreszierender ND als nicht toxische Alternative zu Halbleiter-Quantenpunkten (eng. *quantum dots*) für Bildgebungsverfahren in der Biomedizin, die Entwicklung neuer umweltfreundlicher Reinigungstechniken für das Diamantpulver nach dem Herstellungsprozess und von Techniken zur Oberflächenmodifikation der Partikel. Außerdem wurde erkannt, dass ND weniger toxisch als andere Kohlenstoff-Nanopartikel sind und sich daher für bestimmte medizinische Anwendungen, wie z. B. dem Wirkstofftransport, empfehlen.

ND eignen sich hervorragend als Additive für Verbundwerkstoffe. Die (kovalente) Verbindung von ND-Partikeln mit Keramiken, Metallen oder Polymermatrizen, führt zu Verbesserungen ausgewählter Materialeigenschaften. Darüber hinaus gewährleisten die chemische Stabilität des Diamantkerns und die Biokompatibilität der Partikel die Eignung der Verbundwerkstoffe für biomedizinische Anwendungen [MNE+11, MSHG12]. Beispielsweise kann bei Polymeren durch den Zusatz von ND eine Erhöhung der mechanischen Festigkeit, Verschleißbeständigkeit und Wärmeleitfähigkeit beobachtet werden. Die Interaktionen an den Grenzflächen zwischen Diamantpartikeln und Matrix können über die Oberflächenchemie der Partikel kontrolliert werden. So sind z. B. hydrophobe Komplexe aus ND und Octadecylamin (ODA) sehr gut in hydrophoben Polymeren wie Poly-L-Milchsäure (PLLA) dispergierbar.

ND als Adsorbens

Die adsorptiven Eigenschaften von ND-Partikeln werden sowohl durch die große Oberfläche als auch von der jeweiligen Oberflächenmodifikation bestimmt, wobei sowohl die Art als auch die Anzahl der funktionellen Gruppen entscheidend sind. Das Vorhandensein funktioneller Gruppen an den Partikeloberflächen ermöglicht wiederum die Anbindung von weiteren Molekülen, wie z. B. Proteinen und Farbstoffen.

Die Funktionalisierung von ND-Partikeln mit DNA-Oligonukleotiden erlaubt die Separation von komplementären DNA-Sequenzen aus Lösungen. Wird der Komplementärstrang mit Biotin markiert, kann die Konjugatbildung zwischen ND und DNA mithilfe von fluoreszierendem Streptavidin detektiert werden [SH10]. KONG *et al.* [KHH+05] berichteten über die Eignung von 100 nm großen ND-Partikeln zur Separation von Proteinen aus stark verdünnten und kontaminierten Lösungen. Die überwiegend carboxylierten Oberflächen zeigten eine außerordentlich hohe Affinität gegenüber

Myoglobin, Cytochrom C und Albumin wodurch diese leicht aus der Lösung entfernt und durch Massenspektrometrie analysiert werden konnten.

In der Protein-Chemie können ND als Adsorbens für die Extraktion und Reinigung von Proteinen genutzt werden [PBP+07]. BONDAR *et al.* [BPP04] gelang mit Hilfe von ND die Separation rekombinanter Proteine aus Bakterienzellen, wobei sowohl die Reinigungsprozedur vereinfacht, als auch die Zeitdauer der Separation gesenkt werden konnte. Des Weiteren können ND als stationäre Phase in der Flüssigkeits-Chromatographie eingesetzt werden [NFV07]. Entscheidend für diese Anwendung ist ihre mechanische Stabilität, die den Einsatz im Hochdruckbereich ermöglicht [Kru11].

Biologische und medizinische Anwendungen – Aufnahme von ND in Zellen

Aufgrund ihrer Stabilität gegenüber korrosiven Medien, geringen Größe, chemisch reaktiven und leicht zu modifizierenden Oberflächen, Biokompatibilität und geringen Zytotoxizität, stellen ND ein vielversprechendes Material für biologische und medizinische Anwendungen dar. Diese beziehen sich z. B. auf die Untersuchung intrazellulärer Prozesse, therapeutische Anwendungen wie den Wirkstoff- und Gentransport oder das Tissue Engineering. Eine besondere Rolle spielt dabei der Einsatz von ND als Fluoreszenzlabel. Die Fluoreszenz der Partikel beruht entweder auf intrinsischen Gitterdefekten oder wird über die Anbindung fluoreszierender, mit organischen Farbstoffen markierter Biomoleküle realisiert. Darüber hinaus dienen die Partikel vor allem als Trägermaterialien für Substanzen wie Chemotherapeutika oder Biomoleküle.

Für Anwendungen von ND im Bereich der Lebenswissenschaften ist das Verständnis über den Prozess der Aufnahme in Zellen von essenzieller Bedeutung. Obwohl zahlreiche *in vitro*-Studien eine schnelle Überwindung der Eintrittsbarrieren, d. h. der Zellmembranen, bestätigen, ist wenig über den genauen Mechanismus bekannt. Am häufigsten wird eine Aufnahme über Endocytose beschrieben. Dabei wird der von der Zellmembran eingeschlossene Nanopartikel abgeschnürt und innerhalb eines Endosoms in das Innere der Zelle transportiert.

Untersuchungen von VAIJAYANTHIMALA *et al.* [VTCL09] mit Tumorzellen (HeLa) und Prä-Adipozyten (3T3-L1) deuten darauf hin, dass die Aufnahme der ND in die Zellen über den Prozess der Clathrin-vermittelten Endocytose verläuft. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Aufnahme von ND-Partikeln durch Endocytose auch durch die unspezifische Anlagerung an Zelloberflächen induziert werden kann [YKC+05]. Hierbei besteht jedoch die Möglichkeit, dass die ND in den gebildeten Vesikeln eingeschlossen bleiben. Eine effizientere Einschleusung kann z. B. über Elektroporation, Mikroinjektion oder Transfektion erfolgen [DCB04, MPG+09, SNPZ07].

Bioimaging: ND als Fluoreszenzlabel

Als Fluoreszenzlabel, die eine Untersuchung verschiedener biologischer Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie ermöglichen, werden bisher am häufigsten fluoreszente Proteine, organische Farbstoffe und Halbleiter-Quantenpunkte genutzt [SRH+14].

ND stellen eine vielversprechende Alternative zu den genannten Materialien dar. Als bedeutendste optische Eigenschaft von ND im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen ist ihre intrinsische Fluoreszenz zu nennen, die den Partikeln eine hohe Photostabilität mit langer Fluoreszenzlebensdauer verleiht [YKC+05]. Aufgrund dieser stabilen Fluoreszenz eignen sich ND für Langzeitbeobachtungen in komplexen zellulären Umgebungen. Die Wellenlänge und damit Farbe des emittierten Lichtes (rot, grün oder blau) ist dabei von der Partikelgröße, der Lichtquelle und den Materialeigenschaften der Partikel abhängig [Hui10]. Als Nachteil der durch Gitterdefekte verursachten Fluoreszenz ist dagegen die geringe Intensität im Vergleich zu organischen Farbstoffen bei gleicher Konzentration zu nennen, die auch zu Limitationen in der Anwendung führen kann [SRH+14].

Fluoreszierende ND wurden bereits mehrfach als Biolabel in Zellkulturen oder auch ganzen Organismen eingesetzt. Die Fluoreszenzfunktion dient dabei zur Lokalisierung der Partikel oder auch zur Verfolgung ihrer Bewegungen in den Zellen. In den nachfolgend genannten Beispielen wurde sowohl die intrinsische Fluoreszenz der Gitterdefekte [MCH+10, MPG+09, YKC+05] als auch die Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen [CZC+11, VMS+08] zur Visualisierung der ND genutzt.

MOHAN *et al.* [MCH+10] konnten anhand des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass eine Langzeitbeobachtung von ND-Fluoreszenz auch unter *in vivo*-Bedingungen möglich ist. Durch Mikroinjektion wurden ND in die Oozyten von *C. elegans* eingebracht, deren Fluoreszenzsignale während der gesamten Embryogenese zu beobachten waren. MKANDAWIRE *et al.* [MPG+09] demonstrierten die Möglichkeit des Einsatzes grün fluoreszierender ND als Biomarker in HeLa-Zellen, und zeigten dabei, dass ND durch Adressierung über Antikörper selektiv an intrazelluläre Strukturen (Mitochondrien und Aktinfilamente) binden können. Nach YU *et al.* [YKC+05] stellen fluoreszente ND eine interessante Alternative zu den toxisch wirkenden Halbleiter-Quantenpunkten für den Einsatz als Fluoreszenzsonden zur Beobachtung intrazellulärer Vorgänge dar.

VIAL *et al.* [VMS+08] berichteten über *in vivo*-Untersuchungen zur Aufnahme und cytotoxischen Wirkung von ND-Partikeln in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters. Die ND wurden vor der Aufnahme in die Zellen mit einem Fluorescein-markierten Tripeptid konjugiert. Eine zytotoxische Wirkung der ND, die anhand der Dehydrogenaseaktivität in den Zellen geprüft wurde, war nicht nachweisbar. Die fluoreszierenden ND-Peptid-Konjugate konnten innerhalb der Zellen an den Aktinfilamenten des Zytoskeletts lokalisiert werden.

ND als Träger für den Transport von Wirkstoffen und Genen

Beim gesteuerten Transport von Wirkstoffen oder Genen (eng. *drug or gene delivery*) fungieren verschiedenartige Nanopartikel als Träger diverser Therapeutika in das Innere von Zellen.

Geeignete Träger für den intrazellulären Transport therapeutischer Substanzen sollten über eine ausreichende Ladekapazität im Verhältnis zum Eigengewicht, eine ausreichende Bindungsstärke zu den transportierten Molekülen und einen Mechanismus zur Abgabe derselben am Bestimmungsort verfügen. ND-Partikel entsprechen diesen Anforderungen infolge ihrer großen, leicht zu funktionalisierenden Oberflächen [SRH+14]. Eine entscheidende Rolle für den Wirkstofftransport spielt auch die geringe Partikelgröße, welche ND befähigt, biologische Membranen zu passieren. Das geschieht sowohl bei der Aufnahme in die Zellen, aber auch bei der Überwindung weiterer Membranen, wie der des Zellkerns. Weitere Anforderungen die an Trägermaterialien gestellt werden, sind Biokompatibilität und Dispergierbarkeit in Wasser – idealerweise ist auch eine Detektion am Bestimmungsort, etwa durch Fluoreszenz, gegeben [MSHG12].

Bereits in der Mitte der 1990er Jahre wurde die Möglichkeit getestet, ND als Transportvektoren für Antigene zu verwenden [KGH+95]. Es folgten zahlreiche weitere Untersuchungen, die sich auf den Transport von kleinen Molekülen, wie Chemotherapeutika, oder Proteinen [SRL+09] bezogen. ZHANG *et al.* [ZCL+09] untersuchten mit Polyethylenimin 800 (PEI800) beschichtete ND auf ihre Eignung zum Transport von DNA für gentherapeutische Anwendungen. Bei der Gentherapie werden Gene zum Zellkern transportiert, die es den Zellen erlauben, therapeutische Proteine zu synthetisieren. Der Gentransfer kann dabei über virale oder nicht-virale Vektoren, zu denen auch Nanopartikel gehören, erfolgen.

Ebenso kann zu therapeutischen Zwecken der Weg der Abschaltung von Genen gewählt werden, wodurch die Expression bestimmter Proteine verhindert wird. Die RNA-Interferenz ist ein Mechanismus, bei dem – unter Beteiligung von *small interfering RNA* (siRNA) – die zielgerichtete Abschaltung von Genen in den Zellen von Eukaryonten erfolgt. CHEN *et al.* [CZM+10] zeigten, dass ND als biokompatible Vektoren für den Transport von siRNA in Zellen geeignet sind, womit sich Möglichkeiten für gentherapeutische Anwendungen eröffnen.

Entsprechend ihrer medizinischen Relevanz, nehmen Untersuchungen zum Wirkstofftransport von Chemotherapeutika einen hohen Stellenwert ein. Über die kovalente Anbindung des therapeutischen Wirkstoffes Paclitaxel an ND-Partikel berichteten erstmals LIU *et al.* [LZW+10]. Durch die Behandlung mit ND-Paclitaxel wurde die Überlebensrate humaner Lungenkrebszellen durch Mitosehemmung und Induktion von Apoptose signifikant gesenkt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die modifizierten ND-Paclitaxel-Komplexe in den Mikrotubuli und im Zytoplasma der Zellen lokalisiert waren.

CHOW *et al.* [CZC+11] belegten die Eignung von ND für den therapeutischen Wirkstofftransport in Maus-Tumormodellen (Leber- und Brustkrebs). Dazu wurden silanisierte ND-Partikel mit dem Tumorthapeutikum Doxorubicin und einem Fluoreszenzfarbstoff (XenoFluor 750 bzw. Alexa Fluor 488) funktionalisiert. Es wurde nachgewiesen, dass die injizierten ND-Doxorubicin-Komplexe zu einem signifikanten Anstieg von Apoptose in Leberkrebs-Zellen führten, während sich Brustkrebs-Zellen resistenter verhielten. Die ND-Doxorubicin-Komplexe konnten *in vivo* über ihre Fluoreszenz lokalisiert werden.

Tissue engineering/ Chirurgische Implantate

Auch die regenerative Medizin und das Tissue Engineering (Gewebezüchtung) stellen mögliche Anwendungsfelder für ND dar. Ähnlich wie mit Proteinen beschichtete Materialien können ND-Monolayer als Unterlage für die Ausbildung neuronaler Netzwerke fungieren. Durch ihre besonderen mechanischen Eigenschaften erweisen sich ND auch als hilfreich zur Verstärkung biologisch abbaubarer Polymere, was die Konstruktion multifunktionaler Gerüste für das Tissue Engineering ermöglicht. Insbesondere der Verbundstoff ND-ODA-PLLA wird in diesem Zusammenhang hinsichtlich seiner biomedizinischen Anwendung erforscht [MSHG12].

Das Polymer PLLA ist aufgrund seiner Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit als Gerüstmaterial (eng. *scaffold*) für Implantate geeignet, jedoch nicht ausreichend mechanisch belastbar. Die gleichmäßige Verteilung von ND im Polymermaterial verleiht diesem Verbundstoff eine signifikant erhöhte Festigkeit und Elastizität, die derjenigen von menschlichen Knochen nahekomen. Untersuchungen zur Zytotoxizität und Biokompatibilität ergaben, dass ND und ND-ODA nicht toxisch auf murine Osteoblasten wirkten und die Zellproliferation und -differenzierung *in vitro* unterstützten. Die Fluoreszenz von ND-ODA in der PLLA-Matrix diente zur Kontrolle des Knochenwachstums und des PLLA-Abbaus *in vivo*. Die Kombination dieser Eigenschaften, zusammen mit intrinsischer Fluoreszenz und regulierbarer biologischer Abbaubarkeit, macht den Verbund von ND-ODA und PLLA zu einem vielversprechenden Material für die Knochengewebezüchtung und regenerative Medizin [ZMN+11].

2.2 Aptamere

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Moleküle aus RNA oder ssDNA, die synthetisch in einem *in vitro*-Selektionsprozess erzeugt werden. Der Begriff Aptamer („passendes Teil“) setzt sich zusammen aus dem lateinischen *aptus* = passend und dem griechischen *meros* = Teil. Er wurde im Jahr 1990 von ELLINGTON & SZOSTAK [ES90] eingeführt, die an organische Farbstoffe bindende RNA-Sequenzen generierten. Im gleichen Jahr publizierten TUERK & GOLD [TG90] eine Arbeit über die Entwicklung von RNA-Liganden, denen es möglich war, an T4 DNA-Polymerase zu binden. Sie bezeichneten die Methode zur Gewinnung dieser Liganden als *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung, SELEX).

Als Liganden – im Sinne von Rezeptoren – werden hier Nukleinsäuresequenzen aus RNA oder ssDNA bezeichnet, die in der Lage sind, einen Analyten zu binden. Die Fähigkeit von Aptameren zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen, ermöglicht ihnen die selektive Bindung an verschiedenste Zielsubstanzen (Targets) mit hoher Affinität und Spezifität [Jay99, PMG+05]. Das wird erreicht, indem sich das Oligonukleotid um den Bindungspartner herum faltet, und mit diesem eine adaptive Bindung eingeht. Die Bindungsaffinitäten zwischen Aptameren und ihren Targets können mit denen von Antikörpern konkurrieren, die Nachweisgrenzen liegen jeweils im nano- bis pikomolaren Bereich. Aptamer-Target-Interaktionen sind hoch selektiv: Die Zielsubstanzen können auf der Grundlage kleinster Strukturdifferenzen, wie Chiralität oder dem Vorhandensein bzw. Fehlen einzelner Methyl- oder Hydroxylgruppen unterschieden werden [Jay99]. Aptamere haben sich deshalb als attraktive molekulare Erkennungselemente bei der Entwicklung von Diagnostika und Therapeutika erwiesen [004].

In den folgenden Abschnitten wird näher auf die Eigenschaften von Aptameren eingegangen. So werden die Strukturbildungs- und Bindungsmechanismen erläutert, Aptamere mit Antikörpern verglichen, eine Auswahl von Zielsubstanzen genannt, der SELEX-Prozess vorgestellt und Anwendungen diskutiert.

2.2.1 Strukturbildung und Bindungsmechanismen

Als stabilisierende Elemente der DNA-Doppelhelix reichen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der beiden Stränge allein nicht aus, obwohl ihre hohe Anzahl wesentlich zum Zusammenhalt beiträgt. Die Stabilität der DNA-Struktur wird überwiegend durch Kräfte im Inneren der Doppelhelix gewährleistet, die als Basen-Stapelung bzw. Basen-Stapelkräfte (eng. *stacking force*, *base stacking* oder auch *stacking interactions*) bezeichnet werden [005].

Auch die einzelsträngige RNA, kann durch intramolekulare Basenpaarungen doppelhelikale Bereiche ausbilden, die jedoch nur abschnittsweise auftreten [Poe13]. Das trifft ebenso für ssDNA zu: Einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen besitzen generell eine besondere Neigung zur Ausbildung sekundärer und tertiärer Strukturen unterschiedlicher Formen. Die enorme Vielfalt der Sequenzen einer Zufallsbibliothek ist die Basis für die Generierung von Aptameren gegen verschiedenste Targetmoleküle [Jay99].

Unter dem Begriff der dreidimensionalen Struktur sind Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nucleinsäuremolekülen zusammengefasst. Als Sekundärstrukturen sind z. B. Loops (Tetraloops [JP95], Stem- bzw. Hairpin-Loops, Bulge-Loops, Internal-Loops, Multibranch-Loops [TBDPM04, DL03]) und Pseudoknoten [TMG92, SB05], die sowohl Sekundär- auch als Tertiärelemente darstellen, zu verstehen. Die übergeordnete, noch komplexere Tertiärstruktur umfasst Motive wie G-Quadruplexe [HWH+14, GPS09], Pseudoknoten und Kissing-Loops (Kissing-Hairpins) [TB99, NT97]. Ein bekanntes Beispiel für die Ausbildung von G-Quadruplexstrukturen ist das von Bock *et al.* [BGL+92] isolierte und für Versuche in dieser Arbeit verwendete anti-Thrombin-Aptamer [BO05, MSS+93, VG03] mit Bindungsaffinitäten im Bereich von 25-200 nM. In Abbildung 2.4 sind einige der genannten Strukturen schematisch dargestellt.

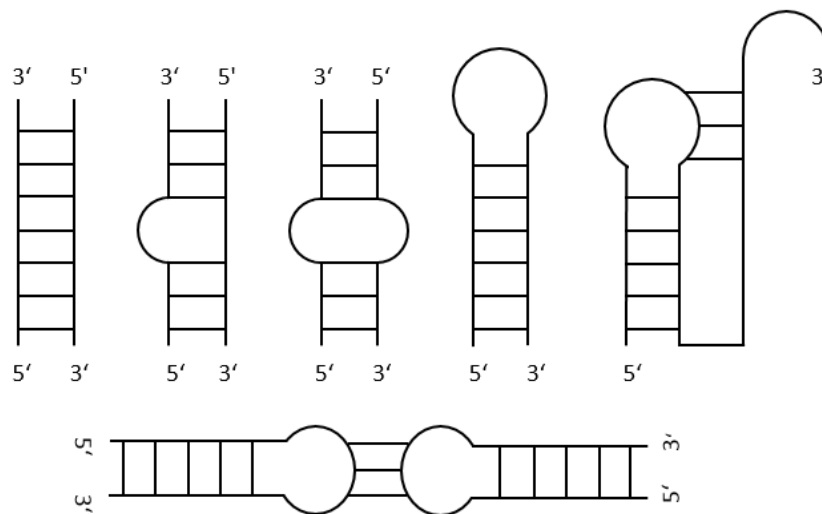


Abb. 2.4: 3D-Strukturen von Nucleinsäuren. Oben von links nach rechts: Helix, Bulge-Loop, Interior-Loop, Stem-Loop oder Hairpin, Pseudoknoten. Unten: Kissing-Loop (Schema gezeichnet nach [TBDPM04, DL03]).

3D-Strukturanalysen haben Einblicke in die molekularen Erkennungsmechanismen zwischen den Bindungspartnern geliefert. Überwiegend unstrukturiert in Lösung, falten sich Aptamere bei Verbindung mit ihrem Target in molekulare Strukturen, in denen das Zielmolekül zum Teil des Nucleinsäurekomplexes wird. Die Faltung der Liganden um die Zielmoleküle herum führt zum Einschluss großer Teile des Targets in die Nucleinsäurestruktur und unterstützt vielfältige intermolekulare

Kontakte. Aus zahlreichen weiteren Beispielen von Strukturaufklärungen lässt sich ableiten, dass die eigentlichen Bindungen zwischen Aptameren und ihren Targets auf elektrostatischen Interaktionen, Wasserstoffbrücken, Form-Komplementarität und Basen-Stapelungen beruhen [HP00]. Zur Strukturaufklärung von Nukleinsäuren werden vor allem die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) und die Röntgenkristallographie angewandt. So gelang es beispielsweise, die Struktur des Thrombin-bindenden Aptamers – sowohl ungebunden als auch im Komplex mit Thrombin – mittels Röntgenkristallographie zu ermitteln [FDS96].

2.2.2 Zielsubstanzen

Zu der großen Vielfalt an Substanzen, an die Aptamere binden können, gehören neben Antibiotika, Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Farbstoffen, Sacchariden und Viren auch Bakterien und Protozoen, die über bestimmte Zellbestandteile adressiert werden. Die Spanne der Targets reicht damit von kleinen Molekülen, oder sogar Ionen, bis hin zu komplexen Strukturen wie Zellen. In Tabelle 2.1 wird eine Auswahl an Targets aufgeführt, gegen die bisher Aptamere entwickelt wurden.

Bei bakteriellen und viralen Targets binden Aptamere überwiegend an bestimmte Teilstrukturen. Im Fall von *Escherichia coli* K88 handelt es sich dabei um ein Fimbrien-Protein, während das gegen *Staphylococcus aureus* gerichtete DNA-Aptamer an das bakterielle Enterotoxin B bindet. Die Art *Bacillus anthracis* wird über ihre Sporen detektiert. Bei der Erkennung von Viren passt sich die Aptamerstruktur z. B. an Enzyme (HIV-1) oder Glycoproteine (Humaner Influenzavirus) an.

Tab. 2.1: Übersicht über bisher entwickelte Aptamere (ausgewählte Beispiele, DNA = ssDNA).

Targetklasse	Target	RNA DNA	Referenz
Aminosäuren	Arginin	DNA	[HF95]
Antibiotika	Chloramphenicol	RNA	[BHB+97]
	Aminoglycoside Kanamycin A	RNA	[LBE95]
	Aminoglycoside Streptomycin	RNA	[WS98]
	Tetrazykline Tetracyclin	RNA	[BTS01]
Bakterien	Fimbrien-Protein <i>Escherichia coli</i> K88	DNA	[LDP+11]
	Enterotoxin B <i>Staphylococcus aureus</i>	DNA	[DeG12]
	Sporen <i>Bacillus anthracis</i>	DNA	[BK99]
Chemische Elemente (Atome, Ionen)	Arsen	DNA	[KUB+09]
	Zn ²⁺ (Zink-Ion)	DNA	[RE08]
Coenzyme (Cofaktoren)	Flavin-Mononukleotid (FMN)	RNA	[BF94]

		Biotin	RNA	[WNS98]
Farbstoffe	Fluoreszenz	Sulforhodamin	RNA	[HRSW98]
Hormone	Peptidhormon	Vasopressin	DNA	[WLS+97]
Kohlenhydrate	Monosaccharid	Galaktose	RNA	[KKS98]
	Disaccharid	Cellobiose	DNA	[YGME98]
	Polysaccharid	Chitin	DNA	[FKM+00]
Nukleotide		Adenosintriphosphat (ATP)	RNA DNA	[SS93] [HS95]
Proteine	Antikörper	IgE (human)	DNA	[WWD+96]
	Enzym	Thrombin (human)	DNA	[BGL+92]
	Wachstumsfaktor	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	RNA	[RGB+98]
Protozoen	Flagellata	<i>Trypanosoma brucei</i>	RNA	[HG99]
	Flagellata	<i>Leishmania infantum</i>	DNA	[RPS+07]
	Sporozoa	<i>Plasmodium falciparum</i>	RNA	[BPL09]
Toxine	Mykotoxin	Aflatoxin M1 und B1	DNA	[MPRS04]
	Glykoprotein	Rizin	DNA	[TXSY06]
Aminoalkohole		Ethanolamin	DNA	[MRSS05]
Viren bzw. Virenproteine		Rous Sarkoma Virus	RNA	[PCQ+95]
	Enzym	HIV-1 (Integrase)	RNA	[AWG95]
	Glycoprotein	Humaner Influenzavirus (Hämagglutinin)	RNA	[MK05]

2.2.3 Vergleich von Aptameren und Antikörpern

Grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Molekülen bestehen in der Art ihrer chemischen Zusammensetzung: Aptamere sind Nukleinsäuren, Antikörper jedoch Proteine. Weiterhin ist die Art der Erzeugung völlig verschieden: Der Herstellungsprozess von Aptameren läuft *in vitro* ab, erfolgt also synthetisch, während die Erzeugung von Antikörpern *in vivo*, in lebenden Tieren oder auch in Zellkulturen, stattfindet. Daraus resultiert, dass die im lebenden Organismus unter physiologischen Bedingungen erzeugten Antikörper auch bei ihren Anwendungen auf physiologische Bedingungen angewiesen sind, um ihre Aktivität beizubehalten [WS08].

Eine Gegenüberstellung wichtiger Eigenschaften von Aptameren und Antikörpern liefert eine Übersicht von LEE *et al.* [LSJ+08], die in Tabelle 2.2 mit geringen Änderungen und Erweiterungen wiedergegeben ist. Vorteile und Limitationen von Antikörpern und Aptameren werden weiterhin umfassend von KEEFE *et al.* [KPE10], JAYASENA [Jay99] und NIMJEE *et al.* [NRHS05] diskutiert.

Tab. 2.2: Gegenüberstellung der Eigenschaften von Aptameren und Antikörpern.

	Aptamere	Antikörper
Zusammensetzung	Nukleinsäuren	Proteine
Affinität	nano- bis pikomolarer Bereich	nano- bis pikomolarer Bereich
Spezifität	hoch	hoch
Herstellung	<i>in vitro</i> (synthetisch)	<i>in vivo</i> (im Tiermodell oder in Zellkultur)
Herstellungszeit	ca. vier Wochen	ca. sechs Monate
Target-Auswahl	sehr vielfältig: z. B. Ionen, kleine organische Moleküle, Proteine, ganze Zellen	begrenzt: nur immunogene Substanzen
Chargenvariation	keine oder gering	signifikant
Chemische Modifikation	vielfältig und unkompliziert	limitiert
thermische Denaturierung	reversibel	irreversibel
Haltbarkeitsdauer	ohne Limitationen	limitiert

Gegenwärtig sind Antikörper die erfolgreichsten Kandidaten in Grundlagen- und angewandter Forschung zur Erkennung molekularer Targets in diagnostischen und therapeutischen Anwendungen. Dennoch weisen sie einige Limitationen auf, zu denen hohe Herstellungskosten und eine geringe Stabilität gehören [RLE+11].

Tatsächlich stellen die in den letzten zwei Jahrzehnten entwickelten Aptamere in vielerlei Hinsicht echte Alternativen dar. Sie bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber der konventionellen Antikörpertechnologie:

- Die Herstellung erfolgt *in vitro* und kommt daher im Gegensatz zur Produktion von Antikörpern ohne Zellkulturen oder Tierversuche aus [Rei07]. Aus ethischer Sicht stellt dies eine Innovation gegenüber dem Einsatz von Antikörpern dar [MvDRM+11].
- Eine hohe Affinität und Spezifität, die es ihnen ermöglicht, auch zwischen sehr ähnlichen Targets, wie z. B. Enantiomeren, zu unterscheiden [GBvdE+96, Jay99, MJV+03, Rei07].
- Aptamere sind jederzeit reproduzierbar und mit einem hohen Grad an Genauigkeit chemisch synthetisierbar, wenn ihre Sequenz einmal bekannt ist [Jay99, KHKG10, Rei07, TCA09, WS08]. Es sind keine Unterschiede zwischen den Chargen zu erwarten [Jay99].
- Die chemische Modifikation der Moleküle durch den Einbau von funktionellen Gruppen oder Reportermolekülen, wie z. B. Fluorescein oder Biotin, ist an beliebigen definierten Positionen möglich [Jay99]. Dadurch kann sich die Stabilität gegenüber Nukleasen erhöhen, die Dauer der Aktivität in biologischen Fluiden verlängern oder eine Immobilisierung auf Oberflächen erfolgen [RS14].

- Reversible Denaturierung von Aptameren und Aptamer-Target-Bindungen ohne Funktionsverlust [Jay99], als wichtige Eigenschaft für den Einsatz in Biosensoren [Rei07].
- Eine hohe Stabilität in Bezug auf pH-Wert und Temperatur [KHKG10] (vor allem bei chemisch modifizierten Aptameren), selbst eine Lagerung bei Raumtemperatur wird toleriert [RS14]. Daraus resultiert eine über lange Zeiträume mögliche Aufbewahrung [Jay99].

Weitere Vorteile bestehen in der hohen Diversität der mit Standardtechniken herstellbaren Aptamerbibliotheken, die praktisch gegen fast jede Zielstruktur affine Liganden enthalten [Jay99, RS14] und in der geringen Größe der Moleküle, wodurch kaum sterische Limitationen zu erwarten sind. Darüber hinaus lassen sich Aptamere kostengünstig und in kurzen Zeiträumen produzieren.

Eine Verdrängung von Antikörpern, insbesondere aus etablierten Anwendungen, ist dennoch nicht zu erwarten [RS14]. Auch wäre es zu einseitig, ausschließlich Vorteile von Aptameren darzustellen und problematische Aspekte unerwähnt zu lassen. Zu den Limitationen, die Aptamere aufweisen, gehört vor allem eine ungenügende Stabilität in Bezug auf Nucleasen, die oft als der hauptsächliche Nachteil von Nucleinsäuren für einen Einsatz als Therapeutikum benannt wird. Allerdings kann diese Instabilität durch Modifikationen der Oligonucleotide mit bestimmten funktionellen Gruppen, wie 2'-Fluoro- oder 2'-Amino-2'-Desoxy-Pyrimidin umgangen werden [Rei07, FM99].

Nach SCHWARZ & FAMULOK [SF01], führt die chemische Modifikation oftmals zu drastisch erhöhter Stabilität gegenüber Nucleasen. Als effektiv bei der Reduktion von Degradationsraten haben sich Substitutionen an der 2'-Position von Pyrimidinen erwiesen. Die Generierung modifizierter Aptamere durch den Einsatz von Bibliotheken mit modifizierten Nucleotiden, wird durch eine Variante des SELEX-Verfahrens, die als Mod-SELEX bezeichnet wird, umgesetzt. Beispiele für Modifikationen, die mit diesem Verfahren eingeführt werden, sind 2'-O-Methyl-Nucleotide, 2'-Amino-, 2'-Fluoro- und 4'-Thio-Pyrimidine, als auch an 5'-Positionen modifizierte Pyrimidine [KC10].

Generell sind Wildtyp-RNA und -DNA zu empfänglich für Nuclease-vermittelte Degradation, um in therapeutischen Anwendungen einsetzbar zu sein. Dementsprechend werden in SELEX-Experimenten, in denen Aptamere zu therapeutischen Zwecken hergestellt werden, chemisch modifizierte Oligonucleotide verwendet. Ebenso können Phosphodiesterbindungen zwischen den Nucleotiden durch Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom modifiziert werden, wodurch ein Phosphothioat entsteht. Eine Erhöhung der molekularen Masse von Aptameren lässt sich z. B. durch die Konjugation von Polyethylenglykol (PEG) an den 5'-Terminus realisieren. Dabei handelt es sich um eine Möglichkeit zur Kompensation eines weiteren Nachteils von Aptameren in therapeutischen Anwendungen: Ihre geringe Größe macht sie anfällig gegenüber renaler Filtration, was kürzere Halbwertszeiten der funktionellen Moleküle bedingt [KPE10]. Vorteile von Antikörpern bestehen

demgegenüber in ihrer Größe, die eine Filtration in den Nieren von vornherein verhindert, und ihrer Unempfindlichkeit gegenüber Nuklease-Degradation.

Eine weitere Möglichkeit zum Schutz vor enzymatischem Abbau bietet die Spiegelmer-Technologie [KNBE96, KRW04]. Dabei werden Aptamere nicht aus natürlich vorkommenden D-RNA- oder D-DNA-Nukleotiden, sondern aus diesen spiegelbildlich entsprechenden L-RNA- oder L-DNA-Nukleotiden, sogenannten Spiegelmeren, erzeugt. Darunter versteht man Moleküle, in denen alle Zuckerbausteine stereochemische Enantiomere, also Spiegelbilder, derjenigen in natürlich vorkommenden Nukleinsäuren sind [KPE10]. Im Gegensatz zu D-Nukleinsäuren, kommen diese Spiegelbilder nicht in der Natur vor, weshalb auch keine Nucleasen für ihren Abbau existieren [KNBE96, Woc07].

2.2.4 Herstellung von Aptameren – Der SELEX-Prozess

Die Isolierung geeigneter Aptamere aus kombinatorischen Zufallsbibliotheken erfolgt durch das SELEX-Verfahren. Dabei werden in einem wiederholten Selektionsprozess die zum Target passenden Liganden ausgewählt und angereichert. Bevor der SELEX-Prozess starten kann, muss eine Aptamer- bzw. Oligonukleotidbibliothek erzeugt werden, die eine sehr hohe Anzahl unterschiedlicher Nukleinsäuresequenzen – angegeben werden Größenordnungen von etwa 10^{15} – enthält (10^{14} bis 10^{15} [Jay99], 10^{16} [MRSS05], 10^{13} bis 10^{15} [RS14], 10^{14} bis 10^{16} [FBH04], 10^{15} [KHKG10]). Die einzelnen ssDNA-Fragmente solch einer Bibliothek bestehen aus einer zentralen randomisierten Region mit 20 bis 80 Nukleotiden, die von zwei konstanten Regionen mit je 18 bis 21 Nukleotiden flankiert ist. Diese konstanten Sequenzen fungieren im SELEX-Prozess als Primer-Bindungsstellen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und enthalten außerdem die Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen, die für Klonierungen erforderlich sind [FBH04]. Aus diesem DNA-Pool erfolgt sodann in mehreren Runden eine schrittweise Selektion der gewünschten Sequenz, bis ein geeigneter Kandidat daraus isoliert ist (Abb. 2.5). Die Aptamerbibliothek wird hierzu gemeinsam mit dem zumeist an Trägermaterialien immobilisierten Target in einen Ansatz gebracht. Nach einer gewissen Inkubationszeit, erfolgt die Abtrennung nicht gebundener Aptamere, die damit aus dem Zyklus ausscheiden. Die gebundenen Sequenzen gelangen nach der Elution vom Trägermaterial in die nächste Selektionsrunde. Nach der letzten Runde werden die verbliebenen Liganden, d. h. die am stärksten an das Target bindenden Sequenzen, durch PCR vervielfältigt (amplifiziert) und weiteren Auswahlzyklen unterzogen. Wenn schließlich die funktionellen Sequenzen dominieren, werden diese wiederum amplifiziert, durch Klonierung vereinzelt und sequenziert. Es schließen sich Sequenzanalysen und Experimente zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften an, teilweise erfolgen Verkürzungen der Aptamersequenzen zur Ermittlung der minimalen Bindungsregion.

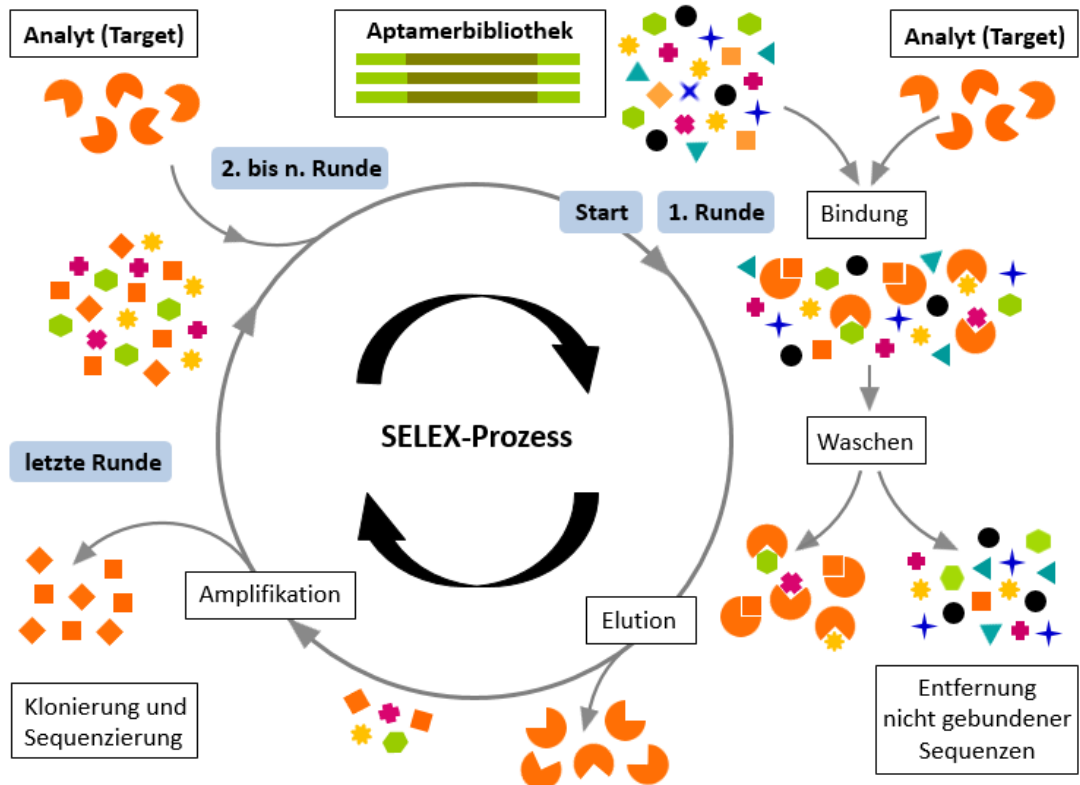


Abb. 2.5: Das SELEX-Verfahren – dargestellt ist die Selektion von DNA-Aptameren. Die randomisierten Oligonukleotidsequenzen der Aptamerbibliothek sind auf beiden Seiten von konstanten Primerregionen (hellgrün) flankiert. Die farbigen Strukturen unterschiedlicher Form repräsentieren Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenzen, die zum Teil an das Target binden. Mit jedem Durchlauf erhöht sich die Zahl der ausgeschiedenen Kandidaten. Die nach der letzten Runde verbliebenen – am besten bindenden – Liganden werden amplifiziert, kloniert und sequenziert (Schema gezeichnet nach [006, SRS07]).

Häufig werden die selektierten Aptamere danach modifiziert, um die Stabilität für nachfolgende Anwendungen zu erhöhen [SRS07]. Die Anzahl der Zyklen differiert in Abhängigkeit von den jeweiligen Selektionsbedingungen. JAYASENA [Jay99] nennt hierzu den Grad der Stringenz und die Beschaffenheit des Targets. Für die meisten Targets werden 8 bis 15 Zyklen durchlaufen, bis die selektierten Liganden die gewünschten Bindungseigenschaften besitzen [TCA09, WS08].

Der SELEX-Prozess weist einige Unterschiede zwischen der Generierung von ssDNA- und RNA-Aptameren auf. Während bei der Selektion von DNA-Aptameren die ssDNA-Oligonukleotidbibliothek direkt in den SELEX-Zyklus eingebracht wird, muss diese vor dem Start einer RNA-SELEX durch *in vitro*-Transkription in eine RNA-Bibliothek überführt werden [Rei07, RS14]. Dazu wird die ssDNA mittels PCR amplifiziert, wobei am 5'-Ende des randomisierten Bereiches eine Promotorstelle für die T7-RNA-Polymerase eingeführt wird. Dieser Schritt ermöglicht die anschließende *in vitro*-Transkription der amplifizierten dsDNA-Sequenzen in eine RNA-Bibliothek [SF01]. Am Ende jeder Runde werden die selektierten RNA-Aptamere mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) in cDNA transkribiert und anschließend durch PCR vervielfältigt. Die so erhaltene selektierte DNA

steht nun für den nächsten Zyklus zur Verfügung, welcher wiederum mit der *in vitro*-Transkription beginnt [Rei07, RS14].

Einer der entscheidenden Schritte im Selektionsprozess ist die Trennung der nichtbindenden Sequenzen von den Aptamer-Target-Komplexen, gefolgt von der Elution der gebundenen Aptamere. Eine konventionelle Methode zur Separation von bindenden und nichtbindenden Oligonukleotiden ist die Affinitätschromatographie. Dabei werden die Targetmoleküle in einer Säule mit einer Matrix aus Sepharose oder Agarose immobilisiert, wofür größere Mengen des Targets benötigt werden [SRS07]. Diese Methode eignet sich auch für die Selektion von Aptameren gegen sehr kleine Moleküle, die nicht durch Filtration zurückgehalten werden können [Woc07].

Bei der Filtration, einem für Protein-Targets genutzten Trennverfahren, wird auf die Immobilisierung des Targets verzichtet. Aptamere und Zielmoleküle befinden sich frei in Lösung und können in dieser miteinander interagieren [MPT12, SRS07]. Anschließend werden die Aptamer-Target-Komplexe mit Nitrozellulose-Filtern aus der Lösung zurückgewonnen. Während die affinen Oligonukleotide im Komplex mit dem Protein an der Filteroberfläche haften, verbleiben nichtbindende Sequenzen in der Lösung [Woc07]. Eine weitere Möglichkeit der Trennung stellt die Target-Immobilisierung auf magnetischen Partikeln (Magnetbeads) dar. Mit Hilfe verschiedener Funktionalisierungen der Magnetbeads kann das jeweilige Zielmolekül an die Partikeloberflächen gebunden werden [SRS07, Rei07]. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, können die mit dem Aptamer-Target-Komplex beladenen Beads aus der Reaktionslösung separiert werden [Woc07].

Der hier beschriebene SELEX-Prozess hat im Laufe der Zeit vielfältige Modifikationen erfahren. Mit der Spiegelmer-Technologie (Mirror-image SELEX) und der Mod-SELEX wurden bereits zwei dieser modifizierten Varianten erwähnt. Einen ausführlichen Überblick zu SELEX-Verfahren bieten u. a. die Arbeiten von STOLTENBURG *et al.* [SRS07] und MASCINI *et al.* [MPT12].

2.2.5 Anwendungsfelder für Aptamere

Für Aptamere haben sich inzwischen zahlreiche Anwendungsfelder eröffnet: Sie wirken durch selektive Bindung an Proteine als effektive Inhibitoren der Proteinfunktion [NSC+06], dienen zur Identifizierung niedermolekularer Verbindungen oder als Werkzeuge für die Charakterisierung von Biomolekülen (Target-Validierung) [BB05, PMG+05] und lassen sich universell für den Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen oder kleinen Molekülen einsetzen [MRSS05]. Aptamere stellen die biologisch aktive Komponente für Bindungsexperimente in Biosensoren dar [LSJ+08, TCA09] und finden Anwendung bei verschiedenen medizinischen Fragestellungen, wie z. B. zur Blockierung von Rezeptorbindungsstellen [WWD+96].

Medizinische Anwendungen

Bisher wurden Aptamere für eine Vielzahl medizinisch relevanter Targets entwickelt, so z. B. gegen humanes α -Thrombin, Adenosintriphosphat (ATP), Trypanosomen, *B. anthracis*-Sporen, verschiedene Antibiotika und pathogene Autoantikörper. Ein weiteres Anwendungsfeld ergibt sich aus der Nutzung von Aptameren als Antikoagulanzen [NRHS05].

Als erstes aptamerbasiertes Medikament wurde 2004 in den USA Pegaptanib Natrium (Macugen®) – ein gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ gerichtetes RNA-Aptamer – zur Behandlung der altersbedingten Maculadegeneration (AMD) zugelassen [NSC+06].

JELLINEK *et al.* [JGB+95] gelang die Isolation eines 2'-aminomodifizierten RNA-Inhibitors des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF). Die Funktion dieses Wachstumsfaktors besteht in der Initiierung der Angiogenese, seine Überexpression ist mit mehreren malignen Funktionsstörungen korreliert. Das selektierte Aptamer bindet an bFGF, womit die Menge des exprimierten Wachstumsfaktors reguliert werden kann.

HOMANN & GÖRINGER [HG99] berichteten über den Nachweis einer Infektion mit Protozoen der Gattung *Trypanosoma*, den Erregern der Schlafkrankheit. Die Übertragung der Trypanosomen, die sich im Blut von Säugetieren vermehren, erfolgt über Tsetse-Fliegen. Die Erreger umgehen das Immunsystem der Säuger durch ständige Veränderung ihrer Oberflächenstruktur, die aus einer Schicht variabler Glykoproteine besteht. Durch die Anwendung einer kombinatorischen Selektionsmethode in Verbindung mit lebenden Trypanosomen als Target, konnten kurze RNA-Liganden, die an konstante Oberflächenkomponenten binden, isoliert werden. Bei der Assoziation zwischen RNA und Zielprotein differenzierten die Liganden nicht zwischen verschiedenen *Trypanosoma*-Stämmen. Die Ergebnisse weisen die selektierten Aptamere als potenzielle Marker an der Oberfläche der extrazellulären Parasiten aus. Als solche könnten sie dahingehend modifiziert werden, dass ihr Einsatz als neuartiges Medikament gegen die Afrikanische Trypanosomiasis denkbar wäre.

Aptamere in der Biosensorik

In vielen Bereichen der Forschung und Entwicklung, der Medizin, im Umweltschutz und in verschiedenen Industriezweigen, wie z. B. der Lebensmittelindustrie, sind zeitsparende, selektive und sensitive Nachweismethoden für bestimmte Analyte von zentraler Bedeutung.

Für Aptamere eröffnet sich hiermit ein breites Anwendungsfeld durch ihren Einsatz als biologische Erkennungselemente in sogenannten Aptasensoren. Dabei handelt es sich um Biosensoren, in denen Aptamere, anstatt der sonst üblichen Antikörper, als Biokomponente zur Bindung des Analyten fungieren. Ein wesentlicher Vorteil von Aptameren in der Biosensorik besteht in der Regenerierbarkeit ihrer dreidimensionalen Struktur nach einer Entfaltung der Moleküle [WS08].

Der Biosensorik, und damit auch den Aptasensoren im engeren Sinn, liegen verschiedene Funktionsprinzipien zugrunde. Häufig werden optische Techniken angewandt, wobei zwischen fluoreszenzbasierten Systemen und solchen, die keiner Markierung bedürfen, unterschieden wird. Im ersten Fall setzt man Aptamere mit Fluoreszenzmarkierungen ein, wobei die Bindungsereignisse durch Fluoreszenzsignale angezeigt werden. Anderenfalls, wie bei der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), können Aptamere ohne Markierung verwendet werden [TM09].

In elektrochemischen Biosensoren können, neben der Verwendung von Enzymen, auch andere Marker, wie z. B. Methylenblau, eingesetzt werden. BANG *et al.* [BCK05] beschichteten zur Detektion von Thrombin die Elektrode eines Biosensors mit einem Aptamer, das eine Haarnadelstruktur besitzt. Dieses Aptamer kann Methylenblau durch Interkalation im doppelsträngigen Bereich nahe der Elektrode binden. Die Bindung des Thrombins bewirkt eine Öffnung der Haarnadelstruktur, wodurch das Methylenblau freigesetzt wird, was wiederum in einer Abnahme des Signals resultiert. Einhergehend mit der Entwicklung von Aptameren gegen Viren, Bakterien und Protozoen, können Aptasensoren auch zur Detektion viraler und mikrobieller Pathogene eingesetzt werden [TCA09].

Analytische Anwendungen

Analytische Applikationen von Aptameren bestehen, neben der Biosensorik, z. B. in der Chromatographie, der Kapillarelektrophorese und der Massenspektrometrie. Ein zunehmendes Interesse wird der Separation von Enantiomeren für die pharmazeutische Analytik entgegengebracht, deren Ziel in der Aufklärung des verschiedenen physiologischen Verhaltens zweier Enantiomere desselben chiralen Moleküls besteht. Eine der dabei am häufigsten angewandten Techniken ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Eigenschaften von Aptameren prädestinieren sie als Affinitätssonden in quantitativen Proteinassays, die auf der Methode der Kapillarelektrophorese basieren. Diese kann, aufgrund von Änderungen der elektrophoretischen Eigenschaften, zur effizienten Trennung freier Aptamere von Aptamer-Target-Komplexen eingesetzt werden. Weiterhin werden Aptamere auch zum Binden und zur Analyse von Proteinen in der Massenspektrometrie (MALDI-MS) verwendet. Ein Beispiel dafür ist der Einsatz eines Thrombin-bindenden DNA-Aptamers zur direkten Detektion von Thrombin, nach dessen kovalenter Bindung an eine Oberfläche aus Quarzglas [TMM05].

Konjugation von Aptameren mit Nanopartikeln

Die Entwicklung von Aptasensoren umfasst auch den Einsatz von Nanopartikeln, wobei insbesondere Gold, Kohlenstoffnanoröhren und Quantenpunkte eine Rolle als Transducer spielen.

Konjugate aus Nanopartikeln und Biomolekülen werden bereits umfangreich in bioanalytischen Assays zur Verstärkung der ursprünglichen Signale, und damit zur Erhöhung der Sensitivität,

eingesetzt [TM09]. Die optischen Eigenschaften von Goldnanopartikeln werden gewöhnlich für den colorimetrischen Nachweis von Bindungsereignissen genutzt. Ein Beispiel dafür ist die Entwicklung zweier colorimetrischer Testsysteme durch LIU & LU [LL05], in denen Konjugate von Goldnanopartikeln mit Aptameren gegen Adenosin und Kokain verwendet wurden.

FAROKHZAD *et al.* [FJK+04] berichteten über die Ergebnisse von Versuchen zur zielgerichteten Abgabe von Pharmazeutika durch Nanopartikel-Aptamer-Konjugate. Untersucht wurde die Wirksamkeit des Einbringens von Konjugaten aus RNA-Aptameren und Polymer-Nanopartikeln mit einem Modellpharmazeutikum in Prostata-Krebszellen. Dabei wurde eine signifikant erhöhte Aufnahme von Partikeln in die Zellen nachgewiesen, wenn diese mit Aptameren konjugiert waren, die gegen ein prostataspezifisches Membranantigen gerichtet sind.

IKANOVIC *et al.* [IRB+07] entwickelten ein Fluoreszenz-Assay zum Nachweis von *B. thuringiensis*-Sporen, das auf dem Einsatz von Quantenpunkt-Aptamer-Konjugaten basiert. Nach der Bindung der Konjugate an die Bakteriensporen, konnten diese durch Filtration separiert und über Fluoreszenzsignale detektiert werden.

ZELADA-GUILLÉN *et al.* [ZGTKN+13] demonstrierten den Einsatz von RNA-Aptameren als molekulare Erkennungselemente in einem potenziometrischen Biosensor mit SWCNTs als Transducer. Als Modellsystem dienten variable Glycoproteine an den Oberflächen von Trypanosomen, deren Nachweis in verdünnten Blutproben erfolgte. Mit dieser Arbeit wurden künftige Möglichkeiten für diagnostische Assays in Echtzeit aufgezeigt.

Auf die Komplexbildung zwischen Nanopartikeln und Biomolekülen wird ausführlicher im folgenden Abschnitt eingegangen.

2.3 Konjugation von Nanopartikeln mit Biomolekülen

Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen – zumeist Proteinen – an verschiedenartige Oberflächen werden bereits seit Jahrzehnten angewandt. Die zentrale Rolle in diesen Prozessen nehmen dabei die funktionellen Gruppen auf den Oberflächen von Trägermaterialien, bzw. in der Struktur der Biomoleküle ein, die miteinander reagieren und Bindungen ausbilden können. Während im Fall von Proteinen auf die natürlicherweise in den Aminosäuren enthaltenen funktionellen Gruppen (–COOH, –NH₂, –OH, –SH) zurückgegriffen wird, müssen diese bei der Synthese von Aptameren gezielt in die gewünschten Positionen der Oligonukleotide integriert werden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Methoden, die z. B. zur Kopplung über Isoharnstoff- oder Amidbindungen führen, wurden also nicht explizit für die Konjugation von DNA an Nanopartikel entwickelt. Vielmehr werden stattdessen bekannte chemische Reaktionen durch Anpassung der Protokolle auf die jeweilige Anwendung übertragen. Die im Folgenden zur Einführung in die Thematik genannten Beispiele beziehen sich daher auf unterschiedliche Moleküle und Materialien, die durch Ausnutzung der gleichen Prinzipien miteinander verbunden werden können.

BICKERSTAFF [Bic97] teilt die Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen und Zellen in Adsorption, kovalente Bindung, Crosslinking, Einkapselung und Einbau bzw. Einschluss ein. Für das in dieser Arbeit behandelte Thema sind die drei zuerst genannten Möglichkeiten von Interesse. Zu beachten sind dabei die jeweiligen Besonderheiten der Immobilisierungsstrategien: So sind die Verbindungen zwischen adsorptiv angelagerten Molekülen und ihrem Trägermaterial deutlich schwächer, als es bei kovalenten Bindungen der Fall ist. Sie sind daher reversibel und können im Bedarfsfall wieder getrennt werden. Diese einfachste Methode zur Immobilisierung basiert zumeist auf elektrostatischen Kräften, Van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen. Atom- bzw. kovalente Bindungen, entstehen dagegen durch die Ausbildung eines oder mehrerer gemeinsamer Elektronenpaare zwischen den jeweils beteiligten funktionellen Gruppen. Bei der Immobilisierung von Enzymen finden am häufigsten Reaktionen statt, die in Isoharnstoff-, Diazo- oder Peptidbindungen resultieren, ebenso wird auf Alkylierungsreaktionen (Transfer von Alkylgruppen) zurückgegriffen. Die Ausbildung kovalenter Bindungen läuft in aller Regel in zwei Schritten ab: Zuerst werden die funktionellen Gruppen des Substrates unter Ausbildung von Intermediaten mit geeigneten Reagenzien aktiviert, worauf die eigentliche Kopplungsreaktion erfolgt. Als Trägermaterialien bzw. Substrate für die Immobilisierung von Enzymen werden z. B. Zellulose, Dextran (Sephadex), Stärke oder Agarose (Sepharose) verwendet, weiterhin werden häufig poröses Glas oder Siliziumdioxid eingesetzt [Bic97].

Für die hier behandelte Thematik sind dagegen vordergründig Nanopartikel als Träger der Biomoleküle interessant. Da andere Mikro- und Nanopartikel, wie z. B. Magnetbeads, in dieser Hinsicht bereits besser als ND untersucht sind, werden diese Erfahrungen gezielt für die Erstellung von Protokollen zur Konjugation von ND mit DNA eingesetzt. Nachfolgend wird eine Reihe von Untersuchungen vorgestellt, die entweder die Kopplung von ND mit DNA, oder zumindest von einem dieser Reaktionspartner in Kombination mit einem anderen Substrat oder Molekül, thematisieren.

Funktionalisierung von Diamantoberflächen mit Biomolekülen

Verfahren zur Funktionalisierung von Diamantoberflächen, sowohl von Filmen als auch von Partikeln, wurden bereits in einer Vielzahl von Publikationen diskutiert. Häufiger beziehen sich die beschriebenen Strategien jedoch auf Diamantfilme, für die bereits ein breiteres Anwendungsspektrum existiert. Grundsätzlich können die Verfahren auch auf ND-Pulver übertragen werden.

Umfassend wird die Thematik CVD-Diamant von WENMACKERS *et al.* [WVV+09] behandelt. Die Arbeit beinhaltet neben der Beschreibung theoretischer Grundlagen, auch praktische Beispiele für Immobilisierungsstrategien von Biomolekülen auf Diamantfilmen. Diesen gehen chemische Behandlungen zur Einführung verschiedener funktioneller Gruppen auf dem Substrat voraus: Sowohl die Terminierung mit Wasserstoff, die Oxidation mittels Säure- oder Plasmabehandlung, als auch die Halogenierung durch Fluor oder Chlor, bilden die Grundlagen weiterer Funktionalisierungsschritte. Ausgehend von hydrierten Diamantoberflächen entwickelten die Autoren eine Methode zur Immobilisierung von DNA, wobei ein bereits von YANG *et al.* [YAB+02] angewandtes Verfahren vereinfacht wurde. Demnach führt die photochemische Anbindung von 10-Undecensäure an Wasserstoffatome zur Präsenz von Carboxylgruppen auf den Diamantoberflächen, an die nach Aktivierung mit EDC aminomodifizierte ssDNA konjugiert wurde. Eine weitere Möglichkeit zur Modifikation hydrierter Oberflächen besteht in der elektrochemischen Reduktion von gebundenem Phenyldiazonium-Salz. Die damit eingeführten $-\text{NO}_2$ -Gruppen können in einem weiteren Schritt zu $-\text{NH}_2$ reduziert werden. Dessen Vorhandensein eröffnet die Möglichkeit der Konjugation von Thiol-modifizierter ssDNA mit Hilfe des Crosslinkers Sulfo-SMCC [WVV+09] (Abb. 2.6).

WANG & CARLISLE [WC06] beschreiben eine Methode zur Einführung primärer Aminogruppen an ultrananokristalline Diamantfilme durch Immobilisierung des aromatischen Amins Anilin. In einer Zweischritt-Reaktion reagieren die Amine zuerst mit Bernsteinsäureanhydrid, wobei sich dessen heterozyklische Struktur öffnet. Damit liegen freie Carboxylgruppen vor, die im zweiten Schritt mittels EDC und Sulfo-NHS aktiviert und über Amidbindungen mit dem Enzym Glukose-Oxidase konjugiert werden. Auf die gleiche Weise etablierte Aminogruppen können zur Konjugation mit Thiol-modifizierter DNA über den Crosslinker Sulfo-SMCC eingesetzt werden [SB08].

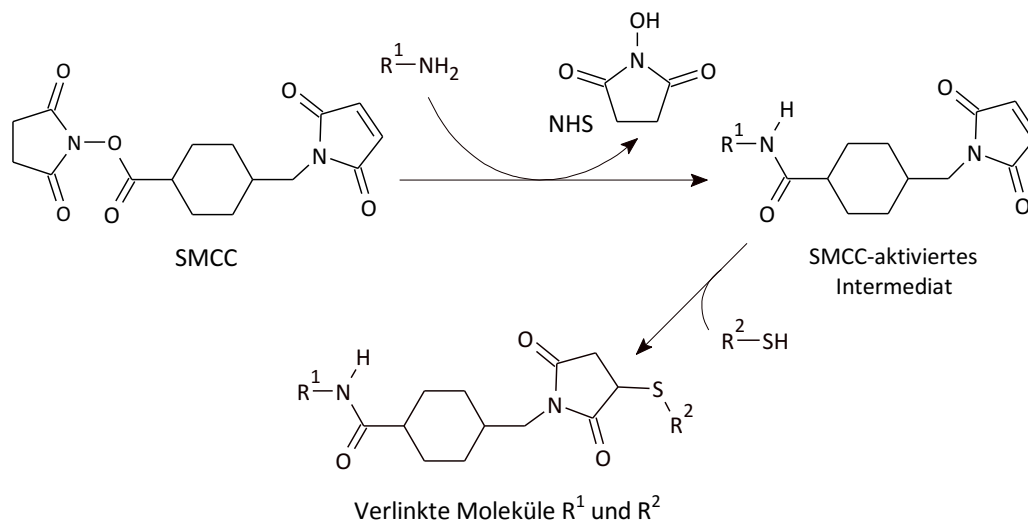


Abb. 2.6: Crosslinking mit SMCC: Häufig eingesetztes Verfahren zur Konjugation zwischen Reaktionspartnern mit Amino- und Sulfhydryl-/Thiolgruppen (Schema gezeichnet nach [Her08]).

DELABOUGLISE *et al.* [DMM+03] berichten über den Einsatz von DCC zur Aktivierung der Carboxylgruppen von Biotin. Beide Substanzen werden zusammen in Dichlormethan gelöst und zu hydroxylierten Diamantfilmen gegeben. Dabei findet eine Veresterung der aktivierten Carboxylgruppen des Biotins mit den Hydroxylgruppen auf der Diamantoberfläche statt und die Biotinmoleküle werden kovalent über Esterbindungen immobilisiert. Im Gegensatz zur Aktivierung von Carboxylgruppen mit EDC und NHS, erfolgt die Reaktion mit DCC in organischen Lösungsmitteln, wodurch das Problem der Hydrolyse der Ester entfällt [Her08].

Für eine erfolgreiche Konjugation mit ND ist es vorteilhaft, über eine möglichst genaue Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der Partikeloberflächen zu verfügen. Das trifft besonders für Detonationsdiamanten zu, da ihnen die Vielfalt von Sprengstoffgemischen und Reinigungsmethoden unterschiedliche Oberflächeneigenschaften verleiht [SPC+12]. Hierbei stellt sich die Frage, welche Methoden geeignet sind, um die Präsenz bestimmter funktioneller Gruppen zu bestätigen und/oder zu quantifizieren. SCHMIDLIN *et al.* [SPC+12] gehen dabei von den bisher publizierten Erkenntnissen zur Oberflächenbelegung von ND aus, wonach vor allem Alkohole, Amine, Amide, Carbonylgruppen und Carbonsäuren vorliegen. Ein Nachweis von Carboxylgruppen kann mit Hilfe der Boehm-Titration (Säure-Base-Titration) erbracht werden, darüber hinaus erlaubt die Methode auch deren Quantifizierung. Gewöhnlich zum Nachweis sauerstoffhaltiger Gruppen wie Carbonsäuren, Laktone, Phenole und Hydroxylgruppen eingesetzt, wurde die Boehm-Titration noch nicht bei ND angewandt. Die Autoren berichten erstmals über den erfolgreichen quantitativen Nachweis von Carboxylgruppen mit Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) und Laktone mit Natriumcarbonat (Na_2CO_3) auf den Oberflächen von ND.

Eine Methode zur Immobilisierung von dsDNA an Diamantpartikel mit einer Größe von 1-2 μm wird von USHIZAWA *et al.* [USM+02] beschrieben. Im ersten Schritt erfolgt dabei die Oxidation der Partikeloberflächen mit einem Gemisch aus H_2SO_4 und HNO_3 , aus der eine Homogenisierung der Oberflächen durch Belegung mit Carboxylgruppen resultiert. Die nachfolgende Reaktion mit Thionylchlorid führt zu einem chlorierten Intermediat, das über Esterbindungen kovalent mit der Desoxyribose des Thymidins verbunden wird. Anschließend dienen die freien 3'-OH-Gruppen der Thymidin-Moleküle jeweils zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit dem 5'-Phosphat eines DNA-Stranges, während die letzte Base des zweiten Stranges Wasserstoffbrücken zum Thymidinrest ausbildet. Diese Methode der Anbindung von dsDNA über Thymidin wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt und ist im Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Neben weiteren Autoren nutzten auch WENMACKERS *et al.* [WHN+03] das Verfahren, um dsDNA kovalent auf Diamantfilmen zu immobilisieren.

HUANG & CHANG [HC04] beschreiben ein Verfahren zur Adsorption von Cytochrom C an ND mit einer Primärpartikelgröße von etwa 5 nm. Am Beginn der Reaktion steht die Oxidation der ND-Oberflächen, an die anschließend Poly-L-Lysin (PLL) adsorbiert wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Konjugation von Cytochrom C an die Aminogruppen des PLLs unter Einsatz des amin- und sulfhydrylreaktiven Crosslinkers Sulfo-SMCC. Cytochrom C ist an der Reaktion mit den -SH-Gruppen seiner Cysteine beteiligt. PLL wurde später von FU *et al.* [FLC+07] auch kovalent an Diamantpartikel mit Größen von 35 und 100 nm gebunden. Die Autoren setzen dafür carboxylierte Partikel ein, die durch EDC und NHS aktiviert und mit dem Biopolymer über dessen Aminogruppen konjugiert werden. Beide Methoden finden in der vorliegenden Arbeit Anwendung und werden im Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

Wesentliche methodische Impulse zur Funktionalisierung von ND-Oberflächen liefern die bereits unter 2.1 erwähnten Arbeiten von KRÜGER *et al.*. Neben der chemischen Modifikation von ND [LMJ+11, KOJ+07] wird auch die nachfolgende Anbindung von Biomolekülen thematisiert [KOJ+07, KL12, KSL+08, Kru8a, KLJS06]. Ein Beispiel dafür ist der schrittweise Aufbau kurzer Peptide an zuvor silanisierte ND-Partikel [KLJS06]. Ausgehend von Hydroxylgruppen, die durch Reduktion mit einem Komplex aus Boran-Tetrahydrofuran ($\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$) an den Partikeloberflächen eingeführt wurden, erfolgt die Silanisierung mit (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS). Die damit etablierten freien Aminogruppen bilden die Ausgangsbasis zur Anbindung von Aminosäuren. Sowohl die Reduktion mittels $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, als auch die Aminierung mit APTMS werden in dieser Arbeit angewandt und in den Abschnitten 3.3.3 und 3.3.4 ausführlicher beschrieben.

Eine häufig genutzte Methode zur Immobilisierung von Proteinen ist die Kopplung an carboxylierte Substrate unter Ausbildung von Amidbindungen. Die Reaktionen der Carboxylgruppen mit den

Aminogruppen der Proteine werden durch -COOH -aktivierende Reagenzien gefördert. Bei der Aktivierung der Carboxylgruppen entstehen Säurechloride, die mit Aminen reagieren und dabei Amidbindungen ausbilden. Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist die Aktivierung oxidierter ND mit Thionylchlorid. Die dabei entstehenden Säurechloride können mit Aminen, wie Dodecylamin [ZMN+11, MG09] oder Ethylendiamin [MNE+11] reagieren. Neben der Ausbildung von Amididen, sind Carboxylgruppen auch an der Generierung von Esterbindungen beteiligt, wenn geeignete Alkohole als Reaktionspartner zur Verfügung stehen. Auch in diesem Fall kann die Reaktion über Säurechlorid-Intermediate ablaufen. Im Vergleich zu Amidbindungen sind Esterbindungen jedoch weniger stabil, weshalb derart erzeugte Konjugate empfindlich gegenüber Hydrolyse in wässrigen Medien sind [KL12].

Weitere Konjugationsmöglichkeiten eröffnen sich ausgehend von reduzierten Partikeloberflächen. Die OH-Gruppen hydroxylierter ND können mit Trialkoxysilanen, wie APTMS, reagieren. Damit stehen freie Aminogruppen für weitere Reaktionen, wie z. B. mit Carboxylgruppen von Peptiden oder Proteinen, an den Partikeloberflächen zur Verfügung. Allerdings sind die ND–O–Si-Bindungen sensitiv gegenüber Hydrolyse, was zu Limitationen bei der Immobilisierung von Proteinen für biologische Anwendungen führt [KL12]. Basierend auf der Reduktion von ND-Oberflächen mit nachfolgender Silanisierung, wie bereits in [KLJS06] beschrieben, wird eine effiziente Methode zur kovalenten Immobilisierung von Biotin vorgestellt [Kru8a]. Dabei verbinden sich, unter Zugabe von EDC, die Aminogruppen der Silane mit den Carboxylgruppen des Biotins über Amidbindungen.

Anbindung von Aptameren und Proteinen an andere Substrate

BALAMURUGAN *et al.* [BOSS08] diskutieren Methoden zur Immobilisierung von Aptameren mit Biotin-, Amino- und Thiol-Modifikationen an Materialien wie Gold, Silizium, Silikate, Quantenpunkte oder Kohlenstoffnanoröhren. An erster Stelle wird dabei die Anlagerung Thiol-terminierter Aptamere an planare Goldoberflächen und Goldnanopartikel genannt. Biotinylierte Aptamere können an Avidin oder eines seiner Derivate binden. Die am häufigsten zur Anbindung von Aptameren verwendeten Substratmodifikationen sind Hydroxyl-, Amino- und Carboxylgruppen. Hydroxylierte Oberflächen können mit CDI aktiviert und mit -NH_2 -Aptameren konjugiert werden. Für aminomodifizierte Substrate werden zwei Möglichkeiten zur Anbindung von -NH_2 -Aptameren beschrieben. Im ersten Fall reagieren die Aminogruppen auf einer Substratoberfläche mit Glutaraldehyd, einem homobifunktionellen Crosslinker mit zwei Aldehydgruppen, zu einem Intermediat. Dieses reagiert anschließend, unter Ausbildung sekundärer Amidbindungen, mit dem Aptamer. Außerdem besteht die Möglichkeit der Reaktion von Aminogruppen mit Diisothiocyanat – das daraus entstehende Intermediat kann sowohl mit Amino- als auch mit Thiol-Aptameren reagieren. Weiterhin können Aptamere mit Thiolgruppen an aminomodifizierte Oberflächen binden, wenn

diese zuvor mit dem Crosslinker Sulfo-SMCC aktiviert werden. Der Linker bindet dabei im ersten Schritt über seinen aminreaktiven NHS-Ester an -NH_2 , das Intermediat bleibt im Besitz der Maleimidgruppe, die für die Konjugation des Aptamers an Thiolgruppen zur Verfügung steht. Schließlich wird auch eine Variante für die Anbindung von -NH_2 -Aptameren an Carboxylgruppen erwähnt, die hier im Abschnitt 3.4.2 ausführlicher beschrieben wird. Bei dieser Reaktion werden die Carboxylgruppen durch ein Carbodiimid (zumeist EDC) aktiviert, das die Bildung von Amidbindungen katalysiert. Durch alternative Zugabe des Crosslinkers NHS bzw. Sulfo-NHS entsteht ein weiteres, stabileres Intermediat. Am Ende der Reaktion sind beide Partner kovalent über Amidbindungen konjugiert [BOSS08].

Eine Methode zur kovalenten Bindung aminomodifizierter ssDNA an die Siliziumdioxidschicht des Transistor-Gates eines Feldeffekttransistors wird von INGEBRANDT & OFFENHÄUSSER [IO06] vorgestellt. Die auf der Oxidschicht präsenten Hydroxylgruppen werden mit APTMS silanisiert, wodurch die Einführung freier Aminogruppen erfolgt. Nach einer Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid stehen Carboxylgruppen für die Konjugation mit den Aminogruppen der Oligonukleotide zur Verfügung. Die Oligos werden somit über Amidbindungen an der Gate-Oberfläche immobilisiert und fungieren als Basis für die Hybridisierung mit komplementärer DNA. Die Bindungsereignisse zwischen den komplementären Strängen werden im Biosensor registriert, womit eine markierungsfreie Detektion von DNA ermöglicht wird. Außerdem beschreiben die Autoren die elektrostatische Immobilisierung der negativ geladenen ssDNA an die silanisierte, positiv geladene Oxidoberfläche [IO06]. Neben Bernsteinsäureanhydrid kann die Einführung reaktiver Carboxylgruppen auch durch Glutar- oder Maleinsäureanhydrid erfolgen. In jedem Fall kommt es zu einer Ringöffnung des Anhydrids, die zur Präsenz freier Carboxylgruppen führt und die Anbindung von Aminen ermöglicht [Her08].

Die Einführung von Aminogruppen durch Modifikation mit Silanen wird auch von FESTAG *et al.* [FSW+05] zur Konjugation von Oligonukleotiden an Objektträger aus Glas genutzt. Dabei wurden zwei Möglichkeiten zur Immobilisierung aminomodifizierter DNA-Moleküle demonstriert: Die Hydroxylgruppen auf der Glasoberfläche reagieren mit (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilan (GOPS) bzw. (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES), wodurch Epoxid- bzw. Aminogruppen eingeführt werden. Dabei können die -NH_2 -Oligonukleotide direkt an die Epoxidgruppen von GOPS binden, während die Kopplung an die Aminogruppen von APTES über den homobifunktionellen Crosslinker P-Phenylen-Diisothiocyanat (PDITC) mit zwei Isothiocyanatgruppen erfolgt.

Beispiele für Möglichkeiten zur Konjugation

In Tabelle 2.3 werden einige Beispiele für Konjugationsmöglichkeiten zwischen funktionellen Gruppen zusammengefasst, die zum überwiegenden Teil durch Crosslinker vermittelt sind. Hierbei

erfolgt eine Beschränkung auf $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ und $-\text{SH}$ -Gruppen. Die angeführten Beispiele sind den im Text genannten Referenzen entnommen. Besonders hervorzuheben ist dabei die Arbeit von HERMANSON [Her08], die neben theoretischen Hintergründen zur Biokonjugation auch zahlreiche Protokolle für die praktische Umsetzung enthält. Wie aus Tabelle 2.3 ersichtlich, können an Stelle von EDC auch weitere Zero-Lenght Crosslinker wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Diisopropylcarbodiimid (DIC) zur Aktivierung von Carboxylgruppen verwendet werden. Sie führen ebenfalls zu *o*-Acylisoharnstoff-Intermediaten, die nicht nur mit Aminogruppen, sondern auch mit einer weiteren Carboxylgruppe reagieren können. Im Ergebnis der Reaktion entstehen Anhydride.

Tab. 2.3: Möglichkeiten zur Konjugation an carboxylierte, hydroxylierte und aminomodifizierte Oberflächen.

Funktionelle Gruppe an Substrat	Aktivierungsreagenz bzw. Crosslinker	Intermediat	Funktionelle Gruppe an Ligand	Art der Bindung
R-COOH	+ EDC	<i>o</i> -Acylisoharnstoff	R-NH₂	Amid
	+ EDC + NHS	<i>o</i> -Acylisoharnstoff, NHS-Ester	R-NH₂	Amid
	+ DCC oder DIC	<i>o</i> -Acylisoharnstoff	R-NH₂	Amid
	+ DCC oder DIC	<i>o</i> -Acylisoharnstoff	R-COOH	Anhydrid
	+ DCC + NHS	<i>o</i> -Acylisoharnstoff, NHS-Ester	R-NH₂	Amid
	+ CDI	Acylimidazol	R-NH₂	Amid
	+ SOCl ₂	Carbonsäurechlorid	R-NH₂	Amid
R-OH	+ CNBr	Cyanatester	R-NH₂	Isoharnstoff
	+ CDI	Imidazolcarbammat	R-NH₂	Carbammat
	+ DSC	NHS-/ Succinimidyl-carbonat	R-NH₂	Carbammat
R-NH₂	+ SPDP	Pyridyldithiolgruppen	R-SH	Disulfidbrücken
	+ NHS-PEG ₄ -Maleimid	Thiolreaktive PEG-Maleimide	R-SH	Thioether
	+ SSMCC / SMCC u. a. heterobifunktionelle Crosslinker	(S)SMCC-aktiviert	R-SH	Thioether
	+ DSP / DTSSP u. a. homobifunktionelle Crosslinker	D(TS)SP-aktiviert	R-NH₂	Amid
	+ Säureanhydrid	Reaktive Carboxylgruppen	R-NH₂	Amid
	+ Formaldehyd	Quartäres Ammoniumsalz	R-NH₂	Sekundäres Amin

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Ausbildung kovalenter Bindungen, das im Methodenteil unter 3.4.4 näher beschrieben wird, ist der Einsatz von Bromcyan (BrCN) zur Aktivierung von Hydroxylgruppen, die anschließend mit Aminogruppen zu Isoharnstoffbindungen reagieren. Alternativ zu BrCN kann die Aktivierung der Hydroxylgruppen mittels Carbonylimidazol (CDI) erfolgen, wobei Urethanbindungen (Carbamate) entstehen [PK97]. HERMANSON [Her08] gibt neben BrCN und CDI noch eine dritte Möglichkeit an: Die Aktivierung von Hydroxylgruppen kann auch mittels Disuccinimidylkarbonat (DSC) erfolgen – das daraus entstehende NHS-Karbonat reagiert mit Aminogruppen ebenfalls unter Ausbildung von Carbamatbindungen.

Aminomodifizierte Oberflächen bieten insbesondere Möglichkeiten zur Kopplung mit Thiolgruppen oder einem weiteren Amin, wofür eine Reihe von Crosslinkern zur Verfügung steht. Beispiele dafür werden in den Referenzen [BOSS08, FSW+05, SB08, WV+09] genannt.

Weitere funktionelle Gruppen, die häufig für Konjugationen eingesetzt werden, sind Epoxid- und Aldehydgruppen. So können z. B. Partikel mit Aldehydgruppen und aminomodifizierte Liganden über ein Schiff-Base-Intermediat reagieren, wobei letztlich eine Kopplung über sekundäre Aminbindungen erfolgt. Schiff'sche Basen entstehen durch die Kondensation von Aldehyden oder Ketonen mit primären Aminen. Epoxide bzw. Epoxid-Partikel können mit Aminogruppen über sekundäre Aminbindungen oder mit Hydroxylgruppen über Etherbindungen konjugiert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit der Reaktion mit Thiolgruppen, wobei sich Thioetherbindungen zwischen den Reaktionspartnern ausbilden [Her08].

Eine andere Variante zur Verbindung zweier Moleküle stellt der Einsatz photoreaktiver Crosslinker dar, die unter Einwirkung von UV-Licht hochreaktive Verbindungen erzeugen. Das betrifft z. B. die Reaktion zwischen Molekülen mit –SH-Gruppen und Benzophenon-4-Iodoacetamid, bei der ein Intermediat mit Thioetherbindung entsteht [Her08]. Mittels UV-Bestrahlung wird der Benzophenonrest durch Photolyse aktiviert, und damit in die Lage versetzt, mit wasserstoffhaltigen Verbindungen zu reagieren, wie sie z. B. hydrierte Nanopartikel darstellen.

Mit dieser Aufzählung wurden Beispiele für die eingangs erwähnten Verfahren zur Immobilisierung ausgewählter Moleküle an unterschiedliche Substrate dargelegt. Adsorption, kovalente Bindung und Crosslinking stellen die Basis zur Schaffung verschiedenartiger Verbindungen – auch zwischen ND-Partikeln und Biomolekülen – dar. Die in dieser Arbeit angewandten Verfahren zur Konjugation von DNA an ND basieren im Wesentlichen auf den hier genannten Beispielen und sind im Abschnitt 3.4 beschrieben. Diesen Prozessen gehen Modifikationen der ND-Oberflächen voraus, die im Abschnitt 3.3 zusammengefasst sind.

2.4 Herstellung und Charakterisierung von kolloidalen Nanodiamant-suspensionen

2.4.1 Herstellung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen

Die für die nassmechanische Zerkleinerung von ND-Aggregaten eingesetzte Planetenmühle ist eine Variante der Kugelmühlen, bei denen Mahlkörper (in der Regel Kugeln) zur Zerkleinerung des Mahlgutes eingesetzt werden. Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip eines rotierenden Mahltopfes und entgegengesetzt rotierender Gefäße, in denen sich das Mahlgut und die Mahlkugeln befinden. Das Mahlgut wird vorwiegend durch hochenergetischen Schlag der Mahlkugeln, zum Teil aber auch durch Reibung zwischen den Kugeln bzw. zwischen Kugeln und Mahlbecherwand zerkleinert, wobei Prall-, Scher- und Reibkräfte wirken [007].

Wesentliche Bauteile der Planeten(kugel)mühlen sind die Sonnen- und die Planetenscheibe, die auch als Sonnen- oder Planetenrad bezeichnet werden. Die Mahlbecher („Planeten“) mit den Mahlkugeln und dem dispergierten Mahlgut sind auf der Planetenscheibe gelagert und rotieren beim Mahlvorgang um ihre eigene Achse. Gleichzeitig bewegt sich die auf der Sonnenscheibe befestigte Planetenscheibe auf einer entgegengesetzt kreisförmigen Bahn um deren Mittelpunkt (Abb. 2.7).

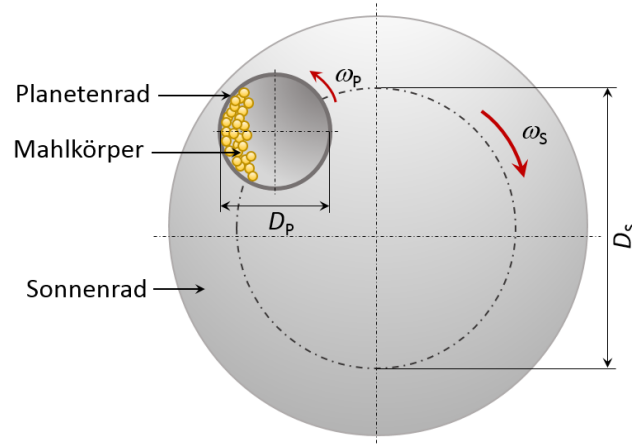


Abb. 2.7: Funktionsprinzip von Planeten(kugel)mühlen. Der oder die Mahlbecher mit den Mahlkörpern bewegen sich mit der Winkelgeschwindigkeit ω_S auf einer kreisförmigen Bahn um den Mittelpunkt des Sonnenrades mit dem Durchmesser D_S . Dabei rotieren sie mit der Winkelgeschwindigkeit ω_P in entgegengesetzter Richtung auf dem Planetenrad mit dem Durchmesser D_P (Schema gezeichnet nach [Rud08]).

Der Erfolg einer Kolloidvermahlung hängt wesentlich von den gewählten Parametern wie Mahlkörpergröße, Mahlkörperfüllungsgrad, Mahldauer, Drehzahl, Suspensionsfüllungsgrad und dem Mengenverhältnis von Mahlgut zu Mahlkörpern und Flüssigkeit ab [Bat05, Rud08].

Üblicherweise werden Vermahlungen in Planetenkugelmühlen trocken durchgeführt. Sollen jedoch Partikelgrößen im Submikrometerbereich erzielt werden, muss die Vermahlung in einem flüssigen

Medium stattfinden. Häufig wird dafür ein Alkohol oder auch Wasser eingesetzt. Mahlbecher und Mahlkörper werden aus verschiedenen Materialien, wie z. B. gehärtetem Stahl, Sinterkorund, Zirkonoxid, Wolframkarbid oder Achat angeboten. Für Nassvermahlungen sind Becher und Mahlkugeln aus Zirkonoxid (ZrO_2) am besten geeignet. Dieser Werkstoff ist sehr hart, verschleißfest und korrosionsbeständig und verunreinigt das Mahlgut nur minimal [Bat05].

2.4.2 Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung durch dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) bezeichnet eine Technik zum Messen der Größe und Größenverteilung von Partikeln, die in einer Flüssigkeit dispergiert sind [008]. In dieser unterliegen die Teilchen – durch zufällige Kollisionen mit den Molekülen des Lösungsmittels – der Brownschen (Molekular)Bewegung und diffundieren infolgedessen durch das Medium. Der Prozess der Diffusion wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung, über die sich der Diffusionskoeffizient D in Flüssigkeiten ermitteln lässt, beschrieben:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta_0 \cdot d} \quad (2.1)$$

Wie aus der Gleichung ersichtlich, werden in die Berechnung von D die Boltzmann-Konstante k_B , die absolute Temperatur T , die dynamische Viskosität des Lösungsmittels η_0 und der hydrodynamische Durchmesser d der diffundierenden Teilchen einbezogen. Der Diffusionskoeffizient D verhält sich umgekehrt proportional zur Partikelgröße: Er ist für große, sich langsamer bewegendes Partikel relativ klein, und wird größer für kleine Partikel, die sich schneller bewegen [009].

Das Verfahren der DLS basiert auf der Messung zeitabhängiger Fluktuationen (Schwankungen) in der Intensität des Streulichtes. Dieses wird durch die Einstrahlung von Laserlicht auf eine Probe erzeugt, in der sich Teilchen in Brownscher Bewegung befinden. An den Teilchen wird das eingestrahlte Laserlicht in alle Richtungen gestreut, wobei das Streulicht der verschiedenen Streuzentren miteinander interferiert. Aufgrund der veränderlichen Positionen der Streuzentren – verbunden mit einer ständig wechselnden Partikelanzahl im Messvolumen – entstehen zeitabhängige Fluktuationen in der Intensität des Streulichtes, die in einer Intensitäts-Zeit-Kurve erfasst werden. Aus dieser wird eine Autokorrelationsfunktion erstellt, mit der die Fluktuationen analysiert werden. Im Fall von Partikeln in Brownscher Bewegung ergibt sich eine exponentiell abklingende Funktion. In der grafischen Darstellung zeigen sich partikelgrößenabhängige Unterschiede in der Geschwindigkeit des Abklingens, die bei kleinen Partikeln schneller vonstattengeht als bei großen. Durch weitere Berechnungsschritte wird unter Einbeziehung der Stokes-Einstein-Gleichung der hydro-

dynamische Durchmesser der Teilchen sowie die Partikelgrößenverteilung ermittelt. Diese Ergebnisse werden grafisch in Histogrammen dargestellt, wobei kleinere Werte für den Partikeldurchmesser aus geringeren, und größere Werte aus höheren Abklingzeiten resultieren [009].

2.4.3 Bestimmung des Zeta-Potenzials durch elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)

Zeta-Potenzial und elektrische Doppelschicht

Teilchen, die in einer Flüssigkeit dispergiert sind, besitzen im Allgemeinen eine positive oder negative Ladung. An den Teilchenoberflächen lagern sich daher in einer ersten Schicht entgegengesetzt geladene Ionen aus dem Dispersionsmedium an, die wiederum Ionen anziehen, die die gleiche Ladung wie die Partikel aufweisen. Diese beiden Schichten aus unterschiedlich geladenen Ionen werden als elektrische oder auch elektrochemische Doppelschicht bezeichnet [010].

Im heute allgemein verbreiteten Modell besteht die elektrische Doppelschicht aus fest adsorbierten Ionen an der Oberfläche der geladenen Teilchen (Stern-Schicht), und einer diffusen Schicht aus beweglichen Ionen mit überwiegend entgegengesetzter Ladung (Gouy-Chapman-Schicht). In der elektrischen Doppelschicht fällt das elektrische Potenzial, ausgehend vom Oberflächenpotenzial Ψ_0 , mit zunehmender Entfernung von der Teilchenoberfläche bis zum Gleichgewichtswert in der flüssigen Phase ab. Innerhalb der starren Schicht ist der Potenzialverlauf linear, wogegen in der diffusen Schicht ein exponentieller Abfall vorliegt. Das Potenzial an der Grenze zwischen dem starren und dem diffusen Teil der Schicht wird als Stern-Potenzial Ψ_s bezeichnet (Abb. 2.8).

Von MÜLLER *et al.* [MHNP96] wird die Sternschicht in die innere und äußere Helmholtz-Schicht unterteilt. Demnach besteht die innere Helmholtz-Schicht aus dehydrierten negativ geladenen Ionen, die äußere aus hydratisierten positiven Ionen, die jeweils fest an der Teilchenoberfläche fixiert sind. Die diffuse Schicht besteht aus beweglichen, lose angelagerten Ionen und stellt somit kein starres Gebilde dar. Teilchen mit intakter diffuser Schicht sind nach außen hin neutral und erfahren keine Beschleunigung im elektrischen Feld. Bewegen sich die Teilchen bei Diffusionsvorgängen durch die Flüssigphase, kommt es aufgrund von Reibung zur teilweisen Abscherung der diffusen Schicht, wodurch positive Ladungen verlorengehen. Infolgedessen fehlen dem Teilchen Gegen-Ionen zur Kompensation der Ladungen von Teilchenoberfläche und innerer Helmholtz-Schicht, womit es nach außen hin seine Neutralität verliert. Durch diesen Prozess entsteht eine Potenzialdifferenz, die als Zeta-Potenzial (ZP) oder elektrokinetisches Potenzial bezeichnet wird. Das ZP ist somit definiert als das messbare elektrische Potenzial an der Scherebene der diffusen Schicht [MHNP96].

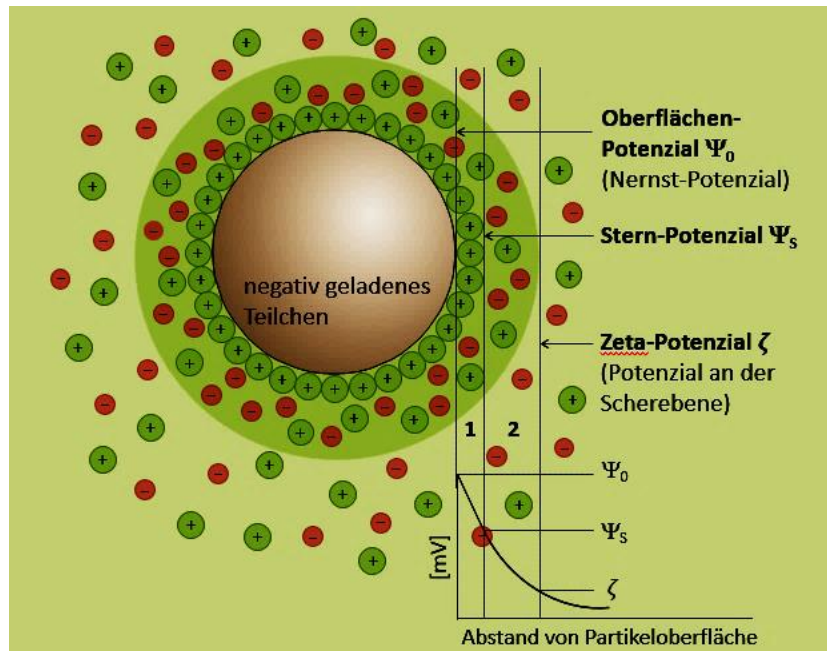


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht am Beispiel eines negativ geladenen Partikels in einer Flüssigphase (1 = Sternschicht, starre Schicht mit fest adsorbierten Ionen, 2 = Gouy-Chapman-Schicht, diffuse Schicht mit lose angelagerten Ionen, 1 + 2 = elektrische Doppelschicht).

Das ZP ist abhängig von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, in dem sich die dispergierten diffundierenden Teilchen bei Messvorgängen befinden. Entspricht der Wert der elektrischen Feldstärke null, ist also kein Feld angelegt, so entspricht der Wert des ZPs ebenfalls null. Nimmt die Feldstärke zu, werden die Teilchen stärker in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode beschleunigt und die Reibungskraft erhöht sich aufgrund der höheren Geschwindigkeit und ist damit der Kraft des elektrischen Feldes entgegengerichtet. Infolgedessen werden größere Teile der diffusen Schicht abgeschert und der Messwert des ZPs steigt an. Nach dem Stokes'schen Gesetz verhält sich die Reibungskraft proportional zur Geschwindigkeit:

$$F_R = 6\pi \cdot a \cdot \eta \cdot v. \quad (2.2)$$

Hierbei sind F_R die Reibungskraft, a der Teilchenradius, η die Viskosität des Mediums und v die Teilchengeschwindigkeit [MHNP96].

Zeta-Potenzial und Stabilität von Dispersionen

Das ZP ist ein entscheidender Parameter zur Beurteilung der Stabilität von Dispersionen. Partikel mit einem hohen ZP gleicher Ladung stoßen einander ab. Je größer der Wert im negativen oder positiven Sinne ist, desto stärker ist die (elektrostatische) Abstoßung zwischen den Teilchen und desto stabiler ist das System. Ein hohes ZP gewährleistet somit die Stabilität einer Dispersion und verhindert die Aggregation der dispergierten Teilchen [MHNP96].

Aus sterischen Gründen ist die mögliche Anzahl der Ladungen pro Flächeneinheit auf einer Teilchenoberfläche begrenzt. Demzufolge existiert, je nach Raumbedarf der adsorbierten Ladungsträger, ein Maximalwert für das Oberflächenpotenzial. Das Gleiche gilt für die Anzahl der Ionen in der inneren und äußeren Helmholtz-Schicht, sodass sich auch für das Stern-Potenzial und das ZP Maximalwerte ergeben. In Abhängigkeit vom Charakter der Oberflächenladungen der Teilchen sowie der adsorbierten Ladungsträger in der Stern-Schicht, kann das ZP Werte von etwa - 100 bis + 100 mV annehmen [MHNP96].

Der an dieser Stelle häufig verwendete Begriff Dispersion steht für ein heterogenes Gemisch aus zwei oder mehr Substanzen, die sich nicht bzw. nicht vollständig miteinander vermischen lassen. In Abhängigkeit von den Aggregatzuständen der dispersen Phase und des Dispersionsmediums (= kontinuierliche Phase) tragen diese Gemische verschiedene Bezeichnungen, wie z. B. Suspension, Emulsion oder Aerosol, für die Dispersion einen Oberbegriff darstellt. Sind feste Teilchen in einer flüssigen Phase dispergiert – wie z. B. ND-Partikel in Wasser – handelt es sich bei der Dispersion im engeren Sinn um eine Suspension.

Disperse Systeme werden in Abhängigkeit von der Teilchengröße der dispersen Phase unterteilt. Man spricht von einem kolloiddispersen System, wenn sich die Teilchengrößen im Bereich von ca. 10^{-9} bis 10^{-6} m bewegen. Sind die dispergierten Teilchen alle gleich groß, liegt ein monodisperses, bei unterschiedlichen Größen ein polydisperses System vor [011]. Diese Eigenschaft einer Dispersion lässt sich, wie unter 2.4.2 beschrieben, durch die Untersuchung der Partikelgrößenverteilung ermitteln und durch den Polydispersitätsindex (PDI) beschreiben.

Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)

Die elektrophoretische Lichtstreuung ist die am häufigsten angewandte Methode zur Messung der elektrophoretischen Mobilität von Partikeln in Dispersion. Das grundlegende physikalische Prinzip ist die Elektrophorese: Wird an eine Dispersion, in der sich diffundierende geladene Teilchen befinden, ein elektrisches Feld angelegt, bewegen sich die Teilchen in Richtung der Elektrode mit gegensätzlicher Ladung. Dieser Vorgang wird als elektrophoretische Mobilität oder auch Beweglichkeit bezeichnet und ist abhängig von der Höhe des ZPs [010, 012].

Weil die Geschwindigkeit der Partikelbewegung proportional zur Höhe der Ladung ist, kann das ZP durch die Messung der Geschwindigkeit kalkuliert werden. Dazu wird die Dispersion bzw. Lösung mit Laserlicht bestrahlt und das gestreute, von den Partikeln emittierte Licht detektiert. Da die Frequenz des Streulichtes phasenverschoben zu der des einfallenden Lichtes und proportional zur Geschwindigkeit der Partikel ist, kann die elektrophoretische Mobilität der Partikel aus der

Frequenzverschiebung des Streulichtes ermittelt werden. Die Höhe der Frequenzverschiebung ν_D des Streulichtes entspricht der Mobilität der Partikel:

$$\nu_D = \frac{U \cdot q}{2\pi} \cdot \frac{\cos\theta}{2} = \frac{U \cdot n}{\lambda} \cdot \sin\theta \quad \text{mit} \quad q = \frac{4\pi \cdot n \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} . \quad (2.3) \text{ und } (2.4)$$

In den Gleichungen bezeichnet U die elektrophoretische Mobilität der Partikel, q den Streuvektor, θ den Streuwinkel, n den Brechungsindex des Mediums und λ die Wellenlänge des einfallenden Lichtes [010]. Die elektrophoretische Mobilität entspricht der Teilchengeschwindigkeit v , gemessen in $\mu\text{m/s}$ bezogen auf eine Feldstärke E von 1 V/cm:

$$U = v/E . \quad (2.5)$$

Für viele Fragestellungen reicht die Quantifizierung der Partikelladung über die elektrophoretische Mobilität vollkommen aus. Zur Beurteilung der Stabilität von Dispersionen ist jedoch eine Berechnung des ZPs in mV erforderlich. In Abhängigkeit von der Teilchengröße und der Elektrolytkonzentration des Dispersionsmediums sind unterschiedliche Berechnungsformeln einzusetzen, wobei zumeist vereinfachend die Gleichung nach Helmholtz-Smoluchowski verwendet wird:

$$ZP = U \cdot \frac{4\pi \cdot \eta}{\varepsilon} . \quad (2.6)$$

Die Berechnung erfolgt anhand der elektrophoretischen Mobilität U , der Konstante 4π , der Viskosität des Dispersionsmediums η und der Dielektrizitätskonstanten ε [MHNP96].

Hierbei ist zu beachten, dass die Gleichungen nicht für SI-Einheiten gelten. So werden die Viskosität in Poise und die Spannung sowie das berechnete ZP in esu Volt angegeben. Werden SI-Einheiten verwendet, so kann bei Messungen in Wasser mit einer Temperatur von 25,0 °C die gemessene elektrophoretische Mobilität (in $[\mu\text{m/s}]/[\text{V/cm}]$) durch Multiplikation mit dem Faktor 12,85 in das entsprechende ZP überführt werden. Der konstante Faktor 12,85 ergibt sich aus einer Wasserviskosität η von 0,89 mPas und einer Dielektrizitätskonstante ε von 78,54 wie sie bei 25,0 °C Wassertemperatur vorliegen [MHNP96]. Auf diese Zusammenhänge lässt sich die Auswahl der Messparameter zur Bestimmung der Partikelgrößen und des ZPs zurückführen (Anhang 1, Tab. A-1.1 bis A-1.4).

2.5 Methoden zur Materialcharakterisierung von Nanodiamantpulver

2.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit Rasterelektronenmikroskopen (REM) können die Oberflächen von Objekten mit einer 10- bis 150.000-fachen Vergrößerung abgebildet werden [Sch94]. Die Elektronenquelle (Elektronenkanone) des Mikroskops erzeugt einen Primärelektronenstrahl, der als sehr kleiner Punkt auf die Probenoberfläche fokussiert wird. Ablenkspulen innerhalb der Objektivlinsen erzeugen ein Magnetfeld, das den Elektronenstrahl in einem kontrollierten Raster über die Probenoberfläche führt. Treffen beschleunigte Elektronen aus dem Primärelektronenstrahl (Primärelektronen) auf die Probe, gehen sie komplexe Wechselwirkungen mit dem Kern und den Elektronen der Probenatome ein. Dabei wird eine Vielzahl von Sekundärprodukten, wie Elektronen mit unterschiedlicher Energie, Röntgenstrahlen (charakteristische Röntgenstrahlung, Röntgenbremsstrahlung), Wärme und Licht erzeugt. Einige dieser Sekundärprodukte werden zur Bilderzeugung genutzt [FHK95].

Beim Eindringen in die Probe werden die Primärelektronen elastisch oder inelastisch gestreut. Bei der elastischen Streuung werden sie durch die positiv geladenen Atomkerne abgelenkt und ändern ihre Bewegungsrichtung, verlieren dabei aber keine Energie. Durch Streuung können Primärelektronen die Probe wieder verlassen und werden dann als Rückstreuielektronen bezeichnet [Sch94]. Rückstreuielektronen besitzen eine Energie von mehr als 50 eV und werden in einem tiefen Bereich des Anregungsvolumens in der Probe (0,05-6 μm) erzeugt [Ack04]. Bei der inelastischen Streuung geben die Primärelektronen durch Wechselwirkungen mit den Atomkernen oder Hüllenelektronen des Probenmaterials einen Teil ihrer Energie ab, was zur Entstehung von Sekundärelektronen führt. Diese niederenergetischen Teilchen verfügen über eine Energie von weniger als 50 eV und werden in den oberflächennahen Bereichen (5-50 nm) der Proben erzeugt [Sch94].

Den verschiedenen Sekundärprodukten Rechnung tragend, verfügen REM über verschiedene Detektoren. Für den Nachweis von Sekundärelektronen werden Everhart-Thornley- oder Inlens-Detektoren verwendet. Detektoren für die Erfassung von Rückstreuielektronen (eng. *backscattered electrons*, *BSE*) werden dann eingesetzt, wenn neben der reinen Oberflächeninformation auch Materialkontraste dargestellt werden sollen. Für die Darstellung von Materialkontrasten im Nanometerbereich bei sehr niedrigen Anregungsspannungen eignen sich insbesondere EsB-Detektoren (EsB = *Energy and angle selective BSE*) [Ack04].

Im Detektor werden die registrierten Signale nach entsprechender Verstärkung zur Helligkeitsmodulation der Bildschirmröhre verwendet. Probenstellen mit hoher Sekundärelektronen-Emission erscheinen auf dem Bildschirm hell, während solche mit geringer Sekundärelektronen-

Emission auf dem Bildschirm dunkel bleiben. Im REM können verschiedene dieser Hell-Dunkel-Unterschiede (Kontraste) erzeugt werden. Neben dem Topographiekontrast (Sekundär- und Rückstreuелеktronen) ist das z. B. der durch Rückstreuелеktronen erzeugte Material- oder Z-Kontrast, durch den Unterschiede in der Materialzusammensetzung von Objekten nachweisbar sind [Sch94].

2.5.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX), ist eine zur Röntgenspektroskopie gehörende Methode der Materialanalytik. Durch die Anregung mit einem Elektronenstrahl werden im Probenmaterial Elektronen aus den inneren Schalen von Atomen herausgeschlagen. Dabei entstehen Elektronenlücken, die sofort durch ein energiereicheres Elektron aus einem höheren Orbital aufgefüllt werden. Die elementspezifische Energiedifferenz wird als Röntgenquant emittiert. Diese Röntgenstrahlung ist spezifisch für das jeweilige Element und die Art des Überganges und wird daher als charakteristische Röntgenstrahlung bezeichnet. In den Röntgenspektren wird sie graphisch in Form von Linien dargestellt, wobei die meisten Elemente ihr Vorhandensein durch mehrere Linien im Spektrum anzeigen. Die Anzahl der Linien erhöht sich mit der Ordnungszahl und damit auch der Anzahl der Orbitale eines Elementes [013].

Für ein Element sind verschiedene Übergänge möglich – je nachdem welcher Schale das energiereichere Elektron entstammt und in welcher Schale die entstandene Lücke aufzufüllen ist (Abb. 2.9).

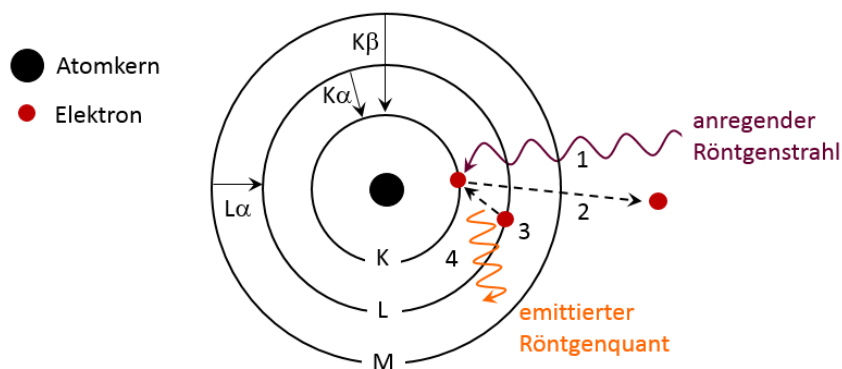


Abb. 2.9: Atommodell (unvollständig) mit Röntgenquantenemission am Beispiel eines $K\alpha$ -Überganges (Schema gezeichnet nach [013, Sch94]).

Es entstehen Röntgenquanten, die z. B. mit $K\alpha$, $K\beta$ oder $L\alpha$ bezeichnet werden. K, L oder M steht dabei für das Orbital, aus dem der Röntgenquant emittiert wird. Die griechischen Buchstaben bezeichnen, ob es sich um einen Elektronenübergang zwischen zwei benachbarten Schalen handelt (α , z. B. $L \rightarrow K$) oder ob dabei eine Schale übersprungen wird (β , z. B. $M \rightarrow K$). Ein Übergang von der

L- zur K-Schale erzeugt also einen als $K\alpha$, ein solcher von der M- zur K-Schale einen als $K\beta$ bezeichneten Röntgenquant. Die Lage einer Röntgenlinie im Spektrum, lässt Rückschlüsse darauf zu, um welches Element es sich handelt (qualitative Aussage). Die Höhe bzw. Länge der Linie ist abhängig von der jeweiligen Konzentration des Elementes in der Probe (quantitative Aussage) [013, FHK95].

Die in der vorliegenden Arbeit erstellten EDX-Spektren basieren auf der Methode der REM-EDX, die ein bildgebendes Rasterverfahren (REM) mit der Elementanalyse verbindet. Ein Vorteil der Methode ist die hohe Messgeschwindigkeit, die auf der simultanen Messung des gesamten Röntgenspektrums und damit der gleichzeitigen Analyse der in der Probe enthaltenen Elemente basiert [013].

2.5.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Transmissionselektronenmikroskope (TEM) erzeugen Durchlicht-Elektronenbilder mit einer 100- bis etwa 500.000-fachen Vergrößerung und einem Auflösungsvermögen von 0,2-0,1 nm. Die gewünschte Vergrößerung im TEM wird, wie auch bei der Lichtmikroskopie, durch eine mehrstufige Abbildung erreicht. Die Wellenlänge von Elektronenstrahlen ist etwa um den Faktor 100.000 niedriger als diejenige des sichtbaren Lichtes ($\sim 400-800$ nm). Theoretisch wäre damit ein Auflösungsvermögen von ca. 2-1 pm zu erwarten. Aufgrund von Einschränkungen durch Linsenfehler, insbesondere der sphärischen Aberration, liefert das Elektronenmikroskop jedoch nur eine 1000fache Verbesserung des Auflösungsvermögens im Vergleich zum Lichtmikroskop [FHK95, TG13].

Wie auch im REM, wird in der Elektronenkanone, die aus der Anode und dem Wehnelt-Zylinder besteht, ein Elektronenstrahl erzeugt. Durch die Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit einer Probe wird eine Vielzahl von Signalen generiert, die zur Bilderzeugung beitragen (Abb. 2.10). Das sind neben der elastischen und inelastischen Streuung auch Absorption und Beugung. Absorption von Elektronen findet vor allem in dicken oder stark gefärbten Bereichen der Proben statt oder auch dort, wo Atome mit hoher Ordnungszahl auftreten. Eine zu starke Absorption von Elektronen kann jedoch zur Aufheizung, bis hin zur Zerstörung der Probe führen, wobei Artefakte im Bild erzeugt werden [FHK95].

Elastisch gestreute Elektronen, die aus Wechselwirkungen zwischen Primärelektronen und Atomkernen der Probe resultieren, tragen zum Beugungs- und zum Amplitudenkontrast im Bild bei [FHK95]. Nach dem Zusammenstoß mit einem Atomkern bleiben der Betrag der Geschwindigkeit und die Energie der Elektronen gleich. Aufgrund der Stärke dieser Wechselwirkungen können Elektronen nur sehr dünne Proben durchdringen. Bei den im TEM üblichen Elektronenenergien von

60-300 keV sollten die Probendicken bei etwa 100 nm liegen. Objekte die aus Elementen mit niedrigen Kernladungszahlen bestehen, in denen die Elektronen nur wenig abgelenkt werden, können auch eine höhere Dicke aufweisen [TG13]. Inelastisch gestreute Elektronen entstehen durch Wechselwirkungen zwischen Strahlelektronen und Elektronen der Atomhüllen der Probenatome. Dabei tritt ein gewisser Energieverlust auf, der eine Änderung der Wellenlänge bewirkt. Infolgedessen verschiebt sich die Phase der inelastisch gestreuten Elektronen gegenüber den nicht gestreuten Primärelektronen, wodurch der Phasenkontrast im Bild aufgebaut wird [FHK95].

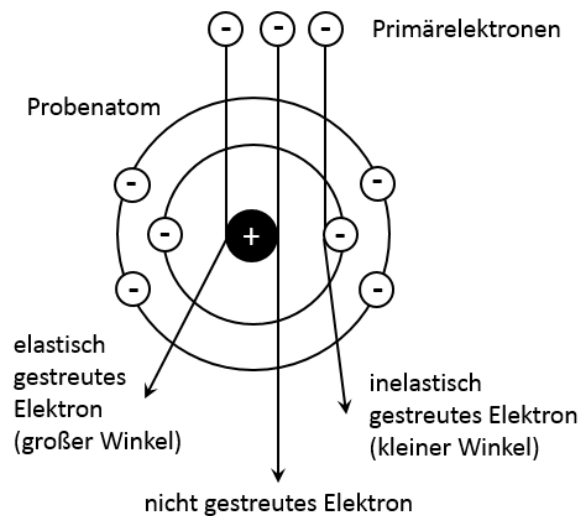


Abb. 2.10: Wechselwirkungen zwischen Elektronenstrahl (Primärelektronen) und Probe (Schema gezeichnet nach [FHK95]).

Wie stark die unterschiedlichen Wechselwirkungen zur Streuung und damit zur Bildentstehung beitragen, ist abhängig von der Dicke der Proben und ihren Unterschieden innerhalb des Probenmaterials. Weiterhin wird die Streuung der Elektronen auch durch die Ordnungszahl der Probenatome beeinflusst. Mit zunehmender Dicke und größerer Ordnungszahl tritt mehr Streuung auf, die jedoch schließlich zu chromatischen Aberrationen führt und die Auflösung verringert [FHK95].

2.6 Nachweismethoden für Modifikation und Konjugatbildung

2.6.1 Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektroskopie

Bei der IR-Spektroskopie wird die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung aus dem IR-Bereich mit den Schwingungen und Rotationen von Atomen im Molekülverband untersucht. Die resultierenden Spektren erlauben weitgehende Rückschlüsse auf die Molekülstruktur [014].

Das elektromagnetische Spektrum

Im elektromagnetischen Spektrum umfasst die IR-Strahlung den Bereich von 0,78 bis 1000 μm . In Wellenzahlen angegeben, entspricht das Werten von 12800 bis 10 cm^{-1} [GG03]. Der IR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums wird in das nahe (NIR), das mittlere (MIR) und das ferne (FIR) Infrarot unterteilt. Bei der Absorption von Strahlung werden in jedem dieser Spektralbereiche bestimmte Wirkungen auf die Moleküle beobachtet (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Spektralbereiche des IR-Spektrums [GG03].

Bereich	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]	λ [μm]	Wirkung auf Moleküle
NIR	12.800 – 4.000	0,78 – 2,5	Molekülschwingungen: Anregung von Ober- und Kombinationsschwingungen
MIR	4.000 – 400	2,5 – 25	Molekülschwingungen: Anregung von Valenz- und Deformationsschwingungen unter Beteiligung von leichten und schweren Atomen
FIR	400 – 10	25 – 1000	Molekülschwingungen: Anregung von Valenz- und Deformationsschwingungen unter Beteiligung von schweren Atomen, Molekülgerüstschwingungen; Molekülrotationen

Die bestimmenden Größen in der IR-Spektroskopie sind die Wellenlänge λ , die Frequenz ν und die Wellenzahl $\tilde{\nu}$. Für die Charakterisierung von Wellenbewegungen wird häufig die Schwingungsfrequenz ν genutzt. Sie ist definiert als die Anzahl der Schwingungen, die der oszillierende Vektor der Strahlung in einer Zeiteinheit ausführt. Die Beziehung zwischen Frequenz ν und Wellenlänge λ ist über die Lichtgeschwindigkeit c als Proportionalitätskonstante geregelt [GG03]:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \cdot \quad (2.7)$$

Eine herausragende Bedeutung innerhalb der IR-Spektroskopie nimmt die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ein. Sie entspricht dem reziproken Wert der Wellenlänge λ und wird in der Einheit cm^{-1} angegeben [GG03]. Die Umrechnung von Wellenzahlen in Wellenlängen erfolgt durch [HMZ11]:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda [\text{cm}]} = \frac{1 \cdot 10^4}{\lambda [\mu\text{m}]} . \quad (2.8)$$

Die Lage von Absorptionsbanden im IR-Spektrum kann mit der Wellenlänge λ (μm) des absorbierten Lichtes angegeben werden. Inzwischen hat sich jedoch die Angabe in reziproker Wellenlänge durchgesetzt [HMZ11]. Der Vorteil bei der Verwendung der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ als Messgröße besteht in ihrer Proportionalität zur Frequenz ν und damit auch zur Energie ΔE des elektromagnetischen Wechselfeldes, wobei gilt [GG03]:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} \text{ cm}^{-1} . \quad (2.9)$$

Molekülschwingungen

Die Atome eines Moleküls nehmen keine feste Position zueinander ein, sondern schwingen um einen Mittelwert des Atomabstandes. Durch die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge bzw. Energie wird das Molekül angeregt und auf einen höheren Schwingungs- bzw. Energiezustand gehoben, in dem die Schwingungen eine größere Amplitude aufweisen [SHK94]. Nicht jede Schwingung ist IR-aktiv: Eine Absorption von IR-Strahlung tritt nur dann auf, wenn sich das Dipolmoment eines Moleküls im Verlauf der Schwingung ändert [Gre02, KSS97]. Je größer die Änderung des Dipolmoments, desto intensiver ist die zugehörige Absorptionsbande. Schwingungen, bei denen keine Dipolmomentänderung stattfindet, können nicht angeregt werden und sind deshalb IR-inaktiv [Gre02, SHK94]. Zweiatomige Moleküle mit gleichen Atomen, wie z. B. H_2 oder N_2 , können durch IR-Strahlung nicht zur Schwingung angeregt werden, da sie kein Dipolmoment besitzen. Dagegen sind heteroatomare Moleküle stets in der Lage, mit IR-Strahlung in Wechselwirkung zu treten [GG03].

Schwingungsformen

Grundsätzlich wird bei den Schwingungsformen zwischen Valenz- und Deformationsschwingungen unterschieden, wobei erstere auch als Streckschwingungen bezeichnet werden [HMZ11, KSS97]. Streckschwingungen (Symbol ν) gehen mit einer Änderung von Bindungslängen durch Dehnung oder Stauchung einher, während sich bei Deformationsschwingungen (Symbol δ) die Bindungswinkel ändern [HMZ11]. Die Veränderung der Bindungswinkel kann zu Schwingungen in der Ebene, oder aus der Ebene heraus, führen (Abb. 2.12).

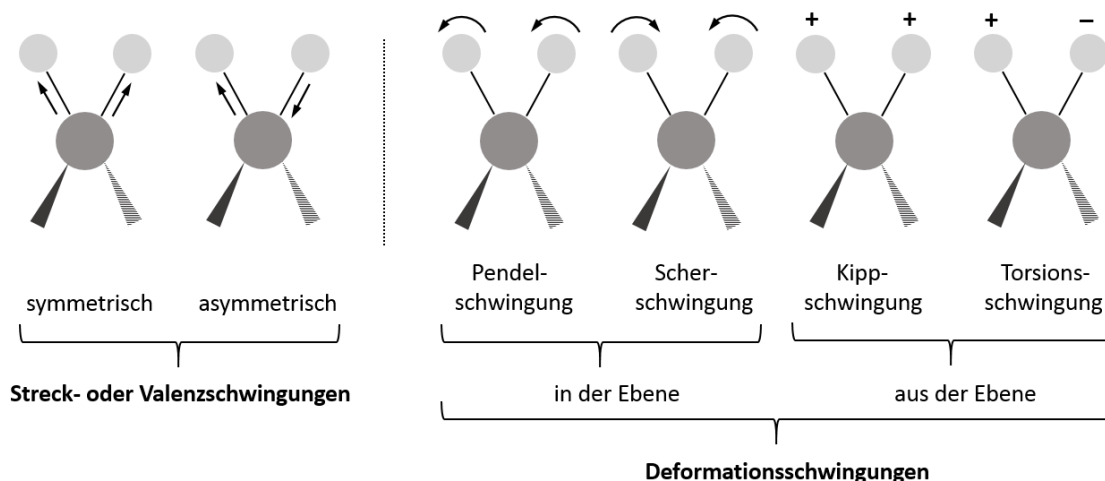


Abb. 2.12: Schwingungsformen am Beispiel der Methylengruppe (-CH₂) (C-Atome dunkelgrau, H-Atome hellgrau). Die Pfeile zeigen die Schwingungsrichtung der H-Atome in der Papierebene an. Schwingungsbewegungen hinter die Ebene sind mit einem Minus, aus der Ebene heraus mit einem Plus gekennzeichnet (Schema gezeichnet nach [SHK94, GG03]).

Spektreninterpretation

Als Grundlage für die qualitative Interpretation eines IR-Spektrums dient die Tatsache, dass bestimmte Strukturgruppen in Molekülen typische Absorptionsbanden innerhalb bestimmter Spektralbereiche (Gruppenfrequenzen) aufweisen. Generell kann ein IR-Spektrum, wie in Tabelle 2.5 gezeigt, in vier Bereiche gegliedert werden.

Tab. 2.5: Einteilung des mittleren Infrarots [HMZ11, Gre02].

4000 cm ⁻¹	2500 cm ⁻¹	2000 cm ⁻¹	1500 cm ⁻¹ - 400 cm ⁻¹
Streck-schwingungen	Streckschwingungen von Dreifach- und kumulierten Doppelbindungen	Streckschwingungen von Doppelbindungen, ausgewählte Deformationsschwingungen	Andere Deformations-, Kombinations- und Streckschwingungsbanden, „Fingerprint“-Bereich
O-H/ N-H/...	C≡N/ X=Y=Z/ N=C=O ...	C=O/ C=N/ δ(N-H) ...	

IR-Spektroskopie-Techniken – Abgeschwächte Totalreflexion

Von den zahlreichen technischen Möglichkeiten zur Aufnahme von IR-Spektren wird hier als Beispiel die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) vorgestellt, weil das für die vorliegende Arbeit genutzte FT-IR-Spektrometer auf diesem Funktionsprinzip basiert.

Bei der ATR handelt es sich um eine vielseitig einsetzbare zerstörungsfreie Messtechnik, die IR-Spektren von der Oberfläche eines zu untersuchenden Materials liefert. An der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, dringt die im Medium mit dem höheren Brechungsindex (optisch dichteres Medium) totalreflektierte Strahlung einige Wellenlängen tief in

das Untersuchungsmaterial (optisch dünneres Medium) ein. Dazu wird die jeweilige Probe in Kontakt mit einem Lichtwellenleiter, dem internen Reflexionselement (IRE) gebracht, und absorbiert daraufhin an jedem Reflexionspunkt IR-Strahlung (Abb. 2.13). Dabei entstehen optische Absorptionsspektren [HMZ11].

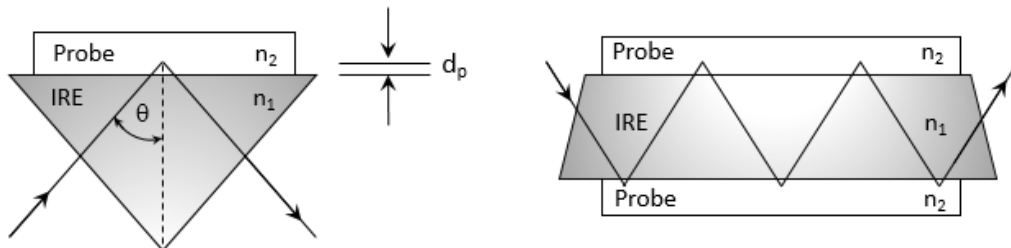


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der abgeschwächten Totalreflexion (ATR). Links: einfache Reflexion, rechts: mehrfache Reflexion (Schema gezeichnet nach [GG03]).

Der Lichtwellenleiter ist gewöhnlich ein Prisma, eine Faser oder ein spezieller ATR-Kristall, in dem Mehrfachreflexionen möglich sind. Für das IRE werden Materialien mit hohem Brechungsindex, wie Zinkselenid (ZnSe), Silizium, Germanium und Diamant, verwendet. Totalreflexion entsteht unter der Bedingung, dass der Einfallswinkel θ der auf die Grenzfläche treffenden Strahlung größer ist, als der kritische Winkel θ_c der Totalreflexion (Abb. 2.14). Dieser Winkel ist definiert durch:

$$\theta_c = \sin^{-1} \cdot \frac{n_2}{n_1} \quad (2.10)$$

mit n_1 als Brechungsindex des IRE und n_2 als Brechungsindex der Probe [HMZ11].

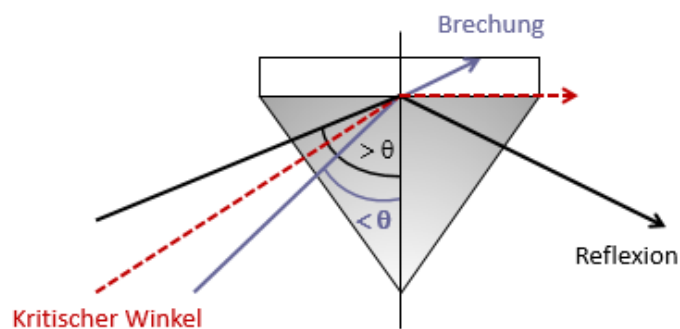


Abb. 2.14: Totalreflexion von Strahlung in Abhängigkeit vom Einfallswinkel. Ist der Winkel θ kleiner als der kritische Winkel θ_c , werden die Strahlen an der Grenzfläche gebrochen (blau); ist er größer, wird die gesamte Strahlung reflektiert (schwarz).

Bei der Totalreflexion entstehen hinter der reflektierenden Grenzfläche evaneszente (abklingende) Wellen, die in etwa die Reichweite einer Wellenlänge aufweisen. Dieser Bereich, dessen Amplitude

senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abklingt, wird auch als evaneszentes Feld bezeichnet. Befindet sich die Probe nahe der Oberfläche des Lichtwellenleiters, kann diese mit den evaneszenten Wellen in Wechselwirkung treten. Bestimmte Frequenzbereiche werden dabei von der Probe absorbiert und fehlen im Spektrum der reflektierten IR-Strahlung. Diese Strahlung, die zum Detektor gelangt, ist deshalb in ihrer Intensität abgeschwächt, woraus sich die Bezeichnung der Methode ableitet.

2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Durch die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (= Anregungswellenlänge) werden Elektronen in fluoreszierenden Molekülen angeregt und auf ein höheres, metastabiles Energieniveau gehoben. Von dort fallen sie innerhalb von Nanosekunden wieder auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Die dabei freiwerdende Energie wird teilweise als Wärme und teilweise als Licht emittiert. Diese spontane Lichtemission wird als Fluoreszenz bezeichnet. Weil die aufgenommene Energie nicht vollständig als Licht freigesetzt wird, ist das emittierte Licht energieärmer als das Anregungslicht und besitzt folglich eine größere Wellenlänge [015]. Die Verschiebung der Wellenlänge oder Frequenz des Lichts zwischen Absorption und Emission wird als Stokes'sche Regel bzw. Stokes-Verschiebung (eng. *Stokes shift*) bezeichnet (Abb. 2.15). Die Wellenlängendifferenz beträgt dabei in etwa 20 bis 50 nm.

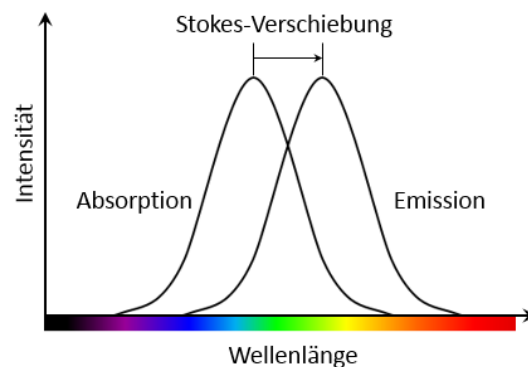


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Stokes-Verschiebung.

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine spezielle Form der Lichtmikroskopie dar, die auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz beruht [016]. Das von den Untersuchungsobjekten emittierte Fluoreszenzlicht ist im Allgemeinen nur sehr schwach und wird daher von der Beleuchtung des Mikroskops, dem Anregungslicht, überstrahlt. Damit die Fluoreszenz sichtbar wird, muss das Anregungslicht gefiltert werden (Abb. 2.16). Der Anregungsfilter lässt nur den Teil des Lichtes passieren, mit dessen Wellenlänge der Fluoreszenzfarbstoff im Untersuchungsobjekt angeregt wird [017].

Dagegen darf der Bereich des Spektrums, in dem der Farbstoff leuchtet, nicht durchgelassen werden. Nach dem Passieren des Filters wird das Anregungslicht mit der gewünschten Wellenlänge an einem Strahlteiler gespiegelt, worauf es zum Objektiv und von dort zum Präparat gelangt. Dahinter besteht das Licht aus dem nicht vom Präparat absorbierten Anregungslicht und dem emittierten Fluoreszenzlicht, welches, gemäß der Stokeschen Regel, längerwellig als das Anregungslicht ist [015]. Dieses Licht wird vom Objektiv gesammelt und zum Strahlteiler zurückgeleitet [016], der die Eigenschaft besitzt, das emittierte längerwellige Licht in Richtung Detektor passieren zu lassen. Vom Präparat reflektiertes Anregungslicht wird dagegen weitgehend wieder zurückgelenkt. Ein Teil davon gelangt dennoch auf den Weg zum Detektor, wird aber von einem in den Strahlengang integrierten Emissions- oder Sperrfilter absorbiert. Für das Emissionslicht ist der Sperrfilter dagegen durchlässig.

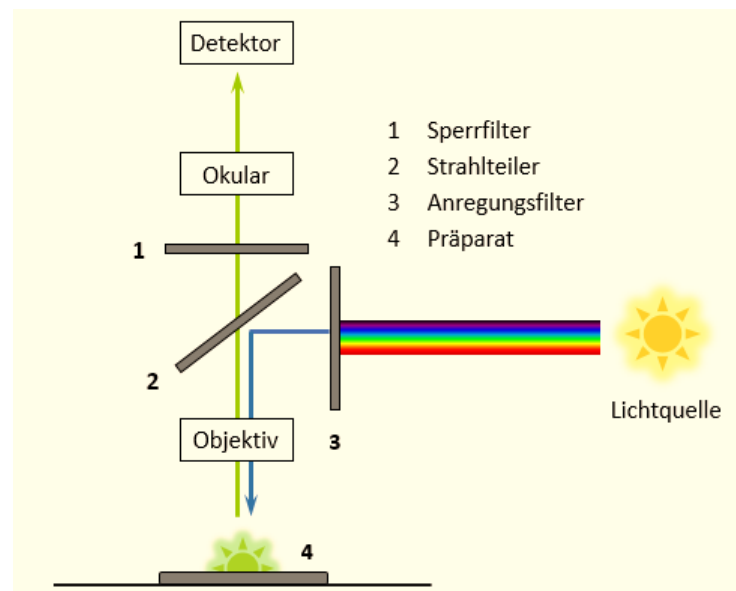


Abb. 2.16: Funktionsschema eines Fluoreszenzmikroskops.

Auch bei Anregung mit Licht in einem eng begrenzten Wellenlängenbereich wird das Fluoreszenzlicht in mehreren Farben emittiert. Daher ist eine nochmalige Filterung des Fluoreszenzlichtes erforderlich, um lediglich Fluoreszenz in der gewünschten Farbe zu erhalten. Diese Funktion wird ebenfalls vom Sperrfilter übernommen [015, 017], der nur die entsprechende Wellenlänge passieren lässt. An der Bildentstehung nimmt nur noch das vom Sperrfilter durchgelassene Fluoreszenzlicht teil [015]. Bei der Auswahl der Filter ist deshalb auf die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorochroms zu achten, bzw. umgekehrt. Weiterhin ist zu berücksichtigen, ob das Untersuchungsobjekt eine Eigenfluoreszenz aufweist, und bei welcher Anregungswellenlänge diese sichtbar ist [017].

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung und Charakterisierung kolloidaler Nanodiamant-suspensionen

3.1.1 Herstellung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen

Für die Herstellung von ND-Suspensionen werden die in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführten Materialien und Geräte benötigt.

Tab. 3.1: Zur Suspensionsherstellung eingesetzte Materialien und Zubehör.

Material/ Chemikalien	Herkunft und Artikelnummer
ND-Pulver, gereinigt	Plasmachem GmbH (Berlin), PL-D-G01
Mahlkörper (SiLibeads®), Typ ZY Premium Zirkonoxid-Kugeln, Yttrium stabilisiert, 0,1 – 0,2 µm	Sigmund Linder GmbH (Warmensteinach), 97015-41
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, 6771.1
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth, X944.1

Tab. 3.2: Zur Suspensionsherstellung eingesetzte Geräte.

Gerätebezeichnung	Typ und Hersteller
Heizplatte mit Magnetrührer	VMS-C7 (VWR)
pH-Meter	SevenEasy™ pH-Meter S20 (Mettler Toledo)
Planetenmühle	Pulverisette 7 (Fritsch)
Ultraschallsonotrode	Sonoplus Ultraschallhomogenisator HD 2200 mit Titan-Sonotrode VS 70 T (Bandelin)
Waage	Adventurer Pro (Ohaus)
Wasseraufbereitungssystem	Direct-Q3 UV System (Merck Millipore)

Bei dem in diesem und allen weiteren Versuchen verwendetem Wasser aus dem Direct-Q3 UV System handelt sich um Reinstwasser (Wasser vom Typ 1), das direkt aus Leitungswasser gewonnen wird.

Versuchsdurchführung

Die Herstellung einer ND-Suspension gliedert sich im Wesentlichen in die Schritte Mahlen, Auswaschen der Mahlkörper und Verdünnen der Suspension, Einstellung des pH-Wertes, Dispergieren und eine nochmalige abschließende Einstellung des pH-Wertes.

Zum Mahlen wird jeder der zwei Mahlbecher der Planetenmühle mit 0,75 g ND-Pulver, 7,5 g Mahlkörpern und 15 ml Reinstwasser befüllt. Der Mahlvorgang, an dessen Ende die Konzentration der Suspension 5 wt% beträgt, erstreckt sich über 60 min. Nach dem Abschluss des Mahlvorganges wird etwas Reinstwasser in die Mahlbecher gegeben und der Inhalt jeweils in ein 1000 ml Becherglas umgefüllt, wobei die Mahlkörper als Bodensatz zurückbleiben. Zur wiederholten Verwendung werden diese durch mehrmaliges Spülen gereinigt, gefiltert und getrocknet. Die ND-Suspension wird mit Reinstwasser auf 750 ml Volumen aufgefüllt und ist damit auf 0,1 wt% verdünnt. Der pH-Wert liegt nun im sauren Bereich und wird zur Erhöhung der Stabilität der Suspension durch Zugabe von NaOH auf 9 bis 10 eingestellt. Danach wird die Suspension in Mengen von jeweils 250 ml für 10 min im Ultraschallhomogenisator dispergiert. Nach zweimaliger Dispergierung liegt der pH-Wert bei ca. 8 bis 8,5 und wird durch Zugabe von H₂SO₄ auf einen Wert zwischen 7 und 7,4 eingestellt. In diesem Bereich ist die 0,1 %ige Suspension stabil und kann über lange Zeit ohne Ausfallen der Partikel gelagert werden.

3.1.2 Bestimmung von Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und Zeta-Potenzial

Die Messungen zur Bestimmung von Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und ZP wurden am Kurt-Schwabe-Institut (KSI) Meinsberg von Bettina Hahnebach durchgeführt. Der pH-Wert der untersuchten Suspension lag bei 7,3. Alle Werte wurden für die unter 3.1.1 beschriebene kolloidale ND-Suspension mit dem Particle Analyzer Delsa™ Nano Submicron (Beckman Coulter) ermittelt. Die zugehörigen Messparameter sind tabellarisch im Anhang 1 (Tab. A-1.1 und A-1.2) aufgeführt. Die Untersuchungsergebnisse werden in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 dargestellt und diskutiert.

Nach Angaben des Herstellers können mit dem Particle Analyzer Partikelgrößen im Bereich von 0,6 nm bis 7 µm gemessen werden, für die Ermittlung des ZPs eignen sich Partikelgrößen von 0,6 nm bis 30 µm. Das Gerät kann zur Analyse verschiedenster Nanopartikel eingesetzt werden, die Partikelkonzentration sollte dabei im Bereich von 1 ppm bis 40 % (w/v) liegen. Weitere Informationen zum Particle Analyzer können aus dem auch online verfügbaren Gerätehandbuch entnommen werden [018].

3.2 Materialcharakterisierung von Nanodiamantpulver

Die Materialcharakterisierung von ND-Pulver erfolgte durch die Verfahren REM, EDX und TEM. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden das in Tabelle 3.3 aufgeführte Material und die in Tabelle 3.4 aufgeführten Geräte verwendet. Im Fall der TEM-Untersuchungen wurden die Pulver als kolloidale Suspension (Plasmachem) bzw. in Wasser suspendiert (JSC Sinta) verwendet. Nachfolgend wird das ND-Pulver der Plasmachem GmbH mit ND (PC), dasjenige von JSC Sinta mit ND (S) bezeichnet. Nachdem letzteres als carboxyliertes Material erworben wurde, stellte sich später heraus, dass es sich dabei um eine Fehlinformation handelte. Laut Angaben des Herstellers JSC Sinta (auf Nachfrage) ist die Oberflächenbelegung der gelieferten Diamantpartikel unbekannt. Funktionelle Gruppen sollen sich aufgrund eines stabilen Oberflächenzustandes kaum einführen lassen. Genauere Informationen zur Beschaffenheit der Partikeloberflächen wurden vom Hersteller nicht bereitgestellt.

Tab. 3.3: Zur Elektronenmikroskopie und Röntgenspektroskopie eingesetzte ND.

Bezeichnung	Oberflächenbelegung	Herkunft
ND-Pulver, PL-D-G01	diverse funktionelle Gruppen	Plasmachem GmbH, Berlin
ND-Pulver, Марка УДА-ПП (UDA-PP)	unbekannt	JSC Sinta, Minsk, Belarus

Tab. 3.4: Zur Elektronenmikroskopie und Röntgenspektroskopie eingesetzte Geräte.

Methode	Gerätetyp und Hersteller
REM	NVision 40 (ZEISS)
EDX	Quantax 800 (Bruker)
TEM	LIBRA® 200 HR MC Cs STEM (ZEISS)

3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Probenpräparation und Versuchsdurchführung

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde das Diamantpulver jeweils auf ein Siliziumwafer-Bruchstück aufgestreut, das mit Silberleitlack auf einem Stiftprobenteller fixiert war. Die Untersuchungen wurden von Sven Niese (Fraunhofer-IKTS) durchgeführt. Die im Abschnitt 4.2.1 gezeigten Ergebnisse entstanden unter Verwendung des in Tabelle 3.4 genannten Gerätes bei 10- bis 50.000facher Vergrößerung und einer Beschleunigungsspannung von 1,5 kV.

3.2.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Probenpräparation und Versuchsdurchführung

Zur Präparation der Proben wurde das Material flächendeckend auf einem Blatt Papier ausgestreut und anschließend ein mit einem selbstklebenden Kohlenstoffpad versehener REM-Probenträger in das Pulver gepresst. Nicht fest am Pad anhaftendes Pulver wurde mit einem Luftstrahl aus der Druckluftpistole entfernt.

Die EDX-Untersuchungen wurden von Rüdiger Rosenkranz (Fraunhofer IKTS) mit dem in Tabelle 3.4 genannten Gerät durchgeführt. Im Abschnitt 4.2.2 werden die EDX-Spektren von ND (PC) und ND (S) dargestellt und ausgewertet.

3.2.3 Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM)

Probenpräparation

Für die TEM-Untersuchungen wurden die unter 3.1.1 beschriebene 0,1 %ige kolloidale Suspension aus ND (PC) sowie eine 0,5 %ige Suspension von ND (S) in Reinstwasser eingesetzt. Die Proben wurden tropfenförmig auf mit einem Kohle-Lochfilm beschichtete Cu-Netzchen (200 mesh, Plano, Artikel-Nr. S147-2) aufgetragen. Vor dem Aufbringen der Proben erfolgte die Reinigung der Kohle-Lochfilm-Netzchen in einem Plasmacleaner (Luftplasma), wobei das Plasma mit einer Leistung von 75 W für einen Zeitraum von 10 s anlag. Anschließend wurden jeweils 7-10 µl der ND-Suspension mit einer Pipette auf die gereinigten Netzchen aufgetragen. Nach dem Eintrocknen war die Probenpräparation abgeschlossen.

Versuchsdurchführung

Beide ND-Proben wurden im TEM-Modus (Hellfeldabbildung), ND (S) außerdem auch im STEM-Modus des Gerätes bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV mikroskopiert. Dabei wurde mit Übersichtsbildern bei niedrigen Vergrößerungen (20.000- bis 80.000fach) begonnen, bis schließlich 400.000fache Vergrößerungen erreicht waren. Die TEM-Untersuchungen wurden von Uwe Mühle (Fraunhofer IKTS) mit dem in Tabelle 3.4 genannten Gerät durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Abschnitt 4.2.3 vorgestellt.

3.3 Chemische Modifikation von Nanodiamanten

Mit dem Ziel, die Oberflächenbelegung der ND-Partikel mit bestimmten funktionellen Gruppen zu homogenisieren, wurden mehrere Methoden zur Modifikation angewandt. Ausgehend vom Originalmaterial, erfolgte in den meisten Fällen zuerst eine Carboxylierung der Oberflächen. Anschließend konnten weitere funktionelle Gruppen bzw. Moleküle an den Oberflächen der Partikel angebunden werden. In Abbildung 3.1 sind alle Modifikationsschritte zusammengefasst und schematisch dargestellt.

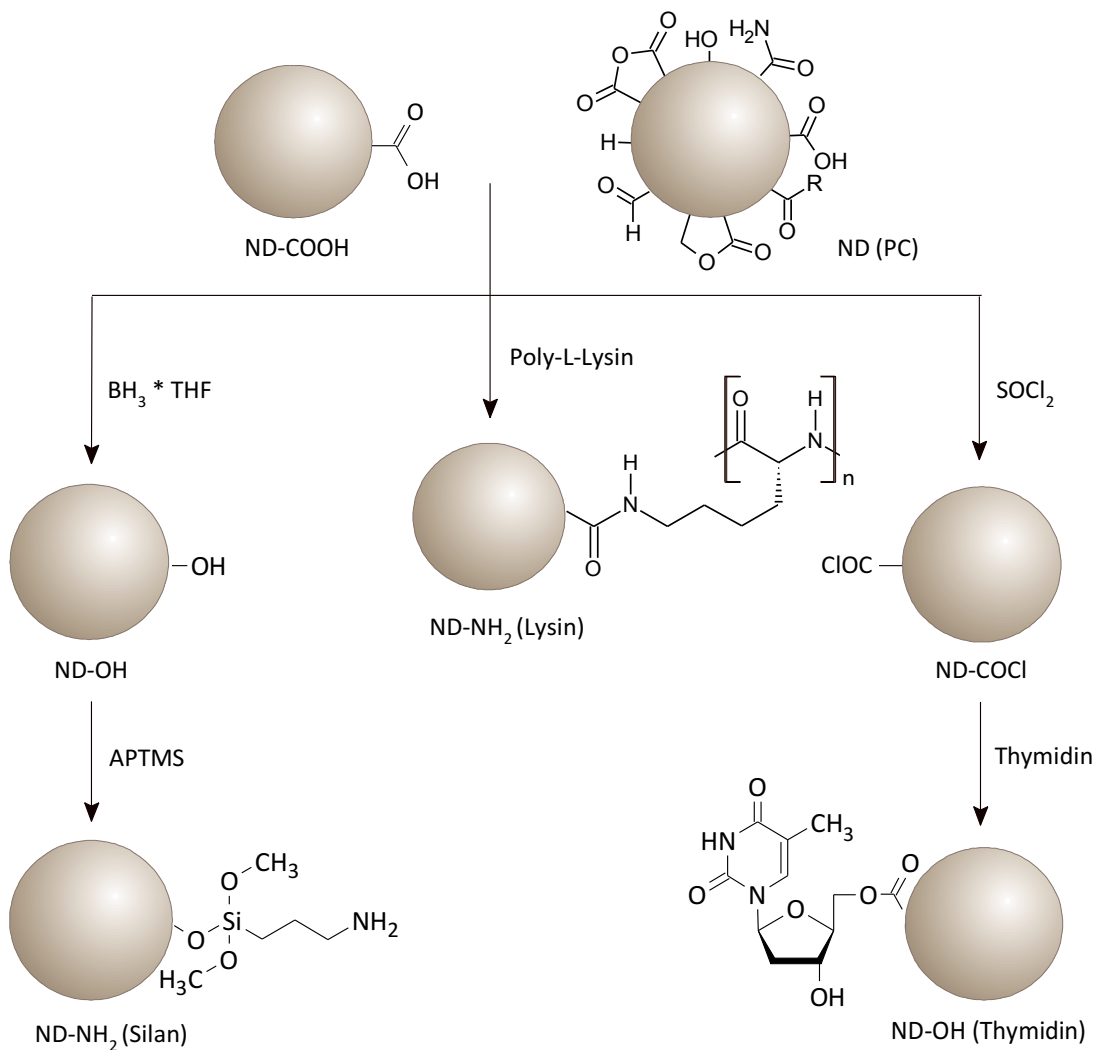


Abb. 3.1: Modifikation der Partikeloberflächen von ND (dargestellt für ND (PC)), ausgehend vom Originalmaterial bzw. von carboxyliertem ND-Pulver. Die Carboxylgruppen dienen als Grundlage für weitere Reaktionsschritte, wie die Anbindung von Thymidin (rechts) oder Poly-L-Lysin (Mitte). Durch einen Boran-Tetrahydrofuran-Komplex reduzierte ND werden durch die Reaktion mit APTMS silanisiert (links).

3.3.1 Verwendete Materialien und Geräte

Als Ausgangsmaterialien für die Oberflächenmodifikationen wurden ND (PC) und ND (S) verwendet (Tab. 3.3). Die eingesetzten Chemikalien und Geräte sind in den folgenden Tabellen aufgeführt (Tab. 3.5 und 3.6).

Tab. 3.5: Zur Oberflächenmodifikation eingesetzte Chemikalien.

Chemikalie	Summenformel	Herkunft und Artikelnummer	verwendet für
Aceton	C ₃ H ₆ O	Sigma-Aldrich, 34850	3.3.3
(3-Aminopropyl)-Trimethoxysilan (APTMS)	H ₂ N(CH ₂) ₃ Si(OCH ₃) ₃	Aldrich Chemistry, 281778	3.3.4
Boran-Tetrahydrofuran-Komplexlösung 1,0 M in THF	C ₄ H ₁₁ BO	Aldrich Chemistry, 176192	3.3.3
Borsäure	H ₃ BO ₃	Carl Roth, P010.2	3.3.4
(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) Hydrochlorid (EDC)	C ₈ H ₁₈ N ₃ Cl	Fluka, 03450	3.3.4
Molekularsieb 3 Å 0,3 nm, Typ 562c	-	Carl Roth, P729.2	3.3.3
Natriumhydroxid	NaOH	Carl Roth, 6771.1 / T196.1	3.3.2
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	C ₄ H ₅ NO ₃	Aldrich Chemistry, 130672	3.3.4
Ölbadfüllung (bis 250 °C)	-	Merck, 1.06900.1000	3.3.2, 3.3.3
Poly-L-Lysin	(C ₆ H ₁₂ N ₂ O) _n	Sigma-Aldrich, P2658	3.3.4
Salpetersäure, 65 %	HNO ₃	Carl Roth, X898.2	3.3.2
Salzsäure rauchend, 37 %	HCl	Carl Roth, X942.1	3.3.2, 3.3.3
Schwefelsäure, 95-98 %	H ₂ SO ₄	Carl Roth, X944.1	3.3.2
Silica Gel Orange	-	Carl Roth, T199.1	universal
Tetrahydrofuran (THF)	C ₄ H ₈ O	Carl Roth, 4745.2	3.3.3

Tab. 3.6: Zur Oberflächenmodifikation eingesetzte Geräte.

Gerätebezeichnung	Typ und Hersteller
Badaufsatz für 1 Liter Öl	HEID_Z0004 (Heidolph)
Heizplatte mit Magnetrührer	VMS-C7 (VWR), MR Hei-Standard (Heidolph)
Mikroliterpipetten	Eppendorf Research (VWR)
Kontaktthermometer	EKT Hei-Con (Heidolph)
Vortexer	Select (BioProducts)
Waage	Adventurer Pro (Ohaus)
Waage (Feinwaage)	Explorer Pro (Ohaus)
Wasseraufbereitung	Direct-Q 3 UV System (Millipore)
Wippschüttler	Nutating Mixer GyroMini (Labnet International)
Zentrifuge	Sigma 3-16PK (Sartorius)

In den folgenden Abschnitten wird die experimentelle Vorgehensweise für jede der Methoden mit Angabe der Referenz, dem Reaktionsschema und der Versuchsdurchführung beschrieben.

3.3.2 Einführung von Carboxylgruppen

Das Protokoll zu diesem Versuch basiert auf der 2002 von USHIZAWA *et al.* [USM+02] beschriebenen Methode zur Carboxylierung von ND, das Reaktionsprodukt wird als ND-COOH bezeichnet. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt.

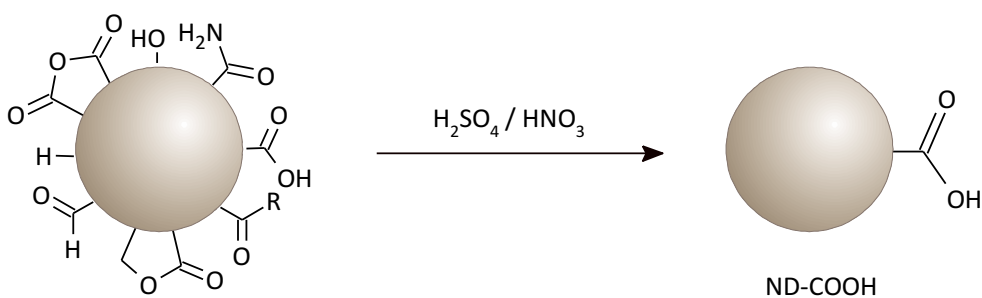


Abb. 3.2.: Carboxylierung (Oxidation) von ND zur Homogenisierung der Partikeloberflächen. Die Reaktion führt zur Oberflächenbelegung mit Carboxylgruppen.

Versuchsdurchführung

Jeweils 1 g ND-Pulver wird in einem Rundkolben in 50 ml H₂SO₄:HNO₃ im Verhältnis 9:1 suspendiert und unter Rühren für 24 h auf ca. 90 °C erhitzt. Nach dem Ende der Reaktionszeit wird das Gemisch zur Trennung von Säure und ND in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Die in

den Röhrcchen verbleibenden ND werden in 25 ml 0,1 M NaOH resuspendiert, in den Rundkolben überführt und unter Rühren für 2 h auf 90 °C erhitzt. Nach der anschließenden Zentrifugation wird der Überstand entfernt und die Partikel werden in 25 ml 0,1 M HCl resuspendiert. Es folgt ein weiteres Erhitzen unter Rühren auf 90 °C für eine Reaktionsdauer von 2 h. Alle bisher genannten Reaktionen laufen unter Rückflusskühlung ab. Anschließend werden die Partikel durch Zentrifugation von der Säure getrennt und in Reinstwasser resuspendiert. Es folgen drei Waschschrte mit Reinstwasser. Zum Trocknen werden die Zentrifugenröhrcchen mit den ND unter Vakuum in einem Exsikkator mit Silicagel gelagert.

3.3.3 Einführung von Hydroxylgruppen

Die Hydroxylierung von ND-Oberflächen erfolgte durch zwei unterschiedliche Verfahren, die nachfolgend unter a) und b) aufgeführt sind. Um Verwechslungen auszuschließen, werden die unter a) beschriebenen ND mit ND-OH, die unter b) beschriebenen mit ND-OH (Thymidin), kurz ND-OH (T), bezeichnet.

a) Hydroxylierung mit Boran-Tetrahydrofuran-Komplexlösung ($\text{BH}_3^* \text{THF}$) \rightarrow ND-OH

Zur Reduktion nach der Methode von KRÜGER *et al.* [KLJS06] wurden ND (PC) im Originalzustand verwendet. Es ist jedoch ebenso möglich, zuvor carboxyliertes Material einzusetzen. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt.

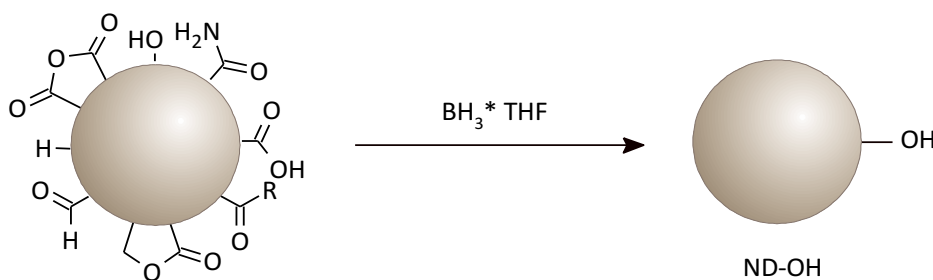


Abb. 3.3: Reduktion von ND-Oberflächen ausgehend vom Originalmaterial.

Versuchsdurchführung

Vor dem Beginn des Versuches wird THF zur Trocknung für mindestens einen Tag über einem Molekularsieb aufbewahrt. 0,5 g ND-Pulver werden in einem Rundkolben in 30 ml trockenem THF suspendiert und tropfenweise mit 5 ml 1 M $\text{BH}_3^* \text{THF}$ versetzt. Anschließend wird das Gemisch unter Rückflusskühlung für 24 h auf ca. 65 °C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 2 M HCl hydrolysiert. Die tropfenweise Zugabe von HCl erfolgt solange, bis keine Blasenbildung mehr zu beobachten ist.

Danach werden die ND durch Zentrifugation von der flüssigen Phase getrennt und abwechselnd mit Reinstwasser und Aceton gewaschen, bis der Überstand einen pH-Wert von 7 (Überprüfung mit pH-Indikatorpapier in Reinstwasser) aufweist. Dazu sind mehrere Waschgänge in jedem Medium erforderlich, wobei die ND für jeweils 5 min auf dem Wippschüttler bewegt werden. Zum Trocknen werden die Zentrifugenröhrchen mit den ND unter Vakuum in einem Exsikkator mit Silicagel gelagert.

b) Anbindung von Thymidin → ND-OH (T)

Diese Methode wird im Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Als Ergebnis der Reaktion liegen kovalent mit Thymidin verbundene ND vor, wobei jedes Thymidinmolekül über eine freie OH-Gruppe verfügt.

3.3.4 Einführung von Aminogruppen

Zur Aminomodifikation von ND wurden ebenfalls verschiedene Methoden angewandt. Unter a) sind die kovalente Anbindung bzw. die Adsorption von PLL, unter b) die Silanisierung der ND-Oberflächen beschrieben. Zur Unterscheidung werden diese als ND-NH₂ (Lysin) bzw. als ND-NH₂ (Silan) bezeichnet. In Abbildung 3.4 ist die Strukturformel von PLL dargestellt.

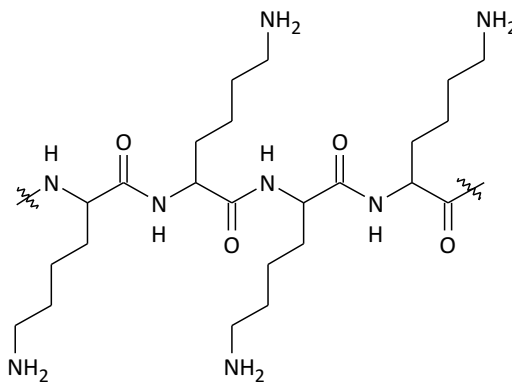


Abb. 3.4: Strukturformel von Poly-L-Lysin.

a) Aminomodifikation mit Poly-L-Lysin → ND-NH₂ (Lysin)

Als Ausgangsmaterialien für die Einführung von Aminogruppen wurden ND-COOH (PC) und ND (S) verwendet. Die Modifikation mit PLL erfolgte auf der Grundlage der von HUANG & CHANG [HC04] (ND-COOH (PC)) und Fu *et al.* [FLC+07] (ND (S)) (Abb. 3.5) publizierten Protokolle.

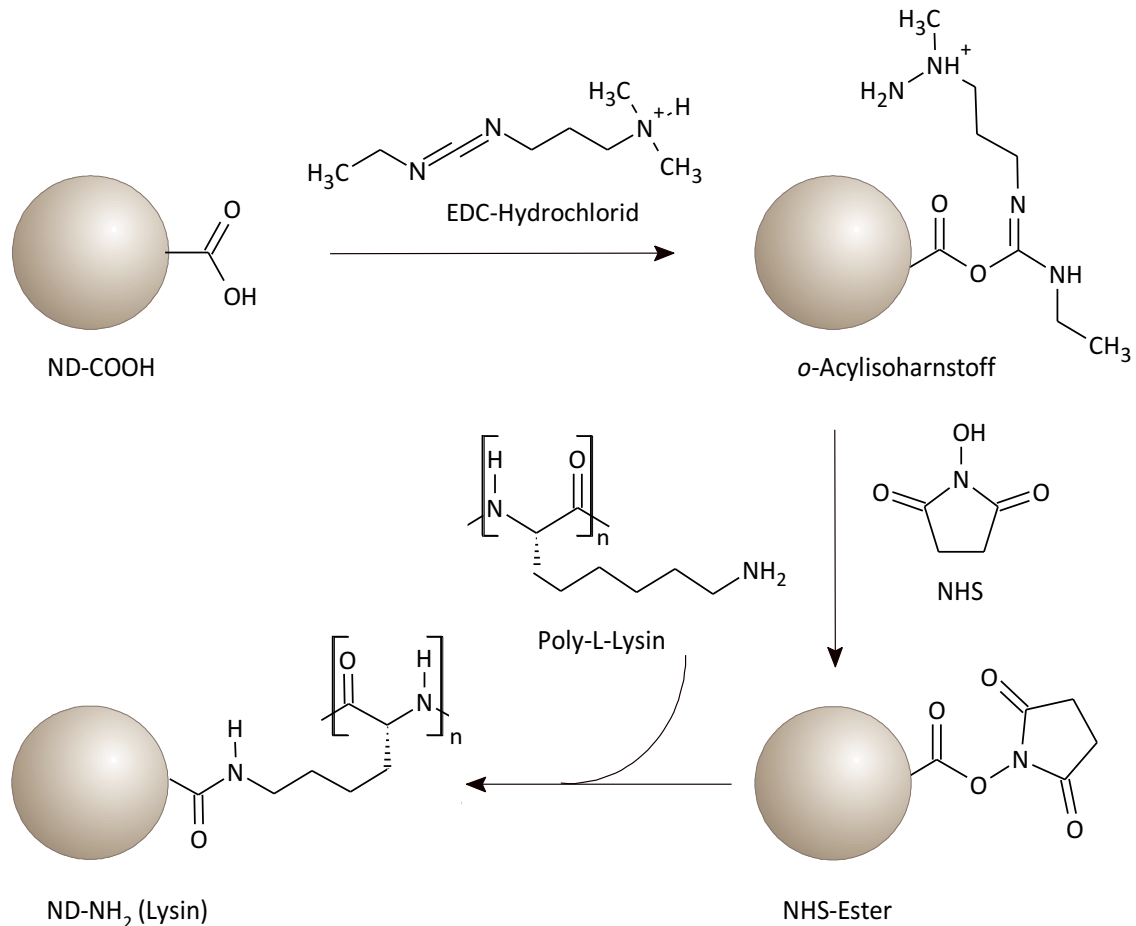


Abb. 3.5: Aminomodifikation carboxylierter Partikel mit Poly-L-Lysin (PLL). Während der Reaktion entsteht das Intermediat *o*-Acylisoharnstoff, welches mit NHS zu einem zweiten Intermediat, einem NHS-Ester, umgesetzt wird. Dieses reagiert unter Ausbildung kovalenter Bindungen mit PLL (Schema gezeichnet nach [Her08]).

Versuchsdurchführung nach HUANG & CHANG [HC04]

50 mg ND-COOH (PC) werden zusammen mit 25 mg PLL, gelöst in 5 ml 0,1 M H₃BO₃ (pH = 8,5), für 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend werden die Partikel dreimal mit Reinstwasser gewaschen, in Reinstwasser resuspendiert und im Kühlschrank gelagert.

Versuchsdurchführung nach Fu *et al.* [FLC+07]

Je Ansatz werden 18 mg ND (S) in 15 ml Reinstwasser suspendiert und mit 24 mg EDC und 18 mg NHS vermischt. Die Gesamtmenge des PLLs (25 mg) wird in 1 ml Reinstwasser gelöst und so aufgeteilt, dass jedem Ansatz eine Menge von 8 mg PLL zugegeben wird. Anschließend wird die Suspension für 24 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach werden die Partikel durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, dreimal mit Reinstwasser gewaschen, in Reinstwasser resuspendiert und im Kühlschrank gelagert.

b) Aminosilanisierung mit APTMS → ND-NH₂ (Silan)

Als Protokollvorlage für diesen Versuch dient das von KRÜGER *et al.* [KLJS06] beschriebene Verfahren zur Silanisierung von ND-Oberflächen. Als Ausgangsmaterial werden ND-OH, wie unter 3.3.3 a) beschrieben, verwendet. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt.

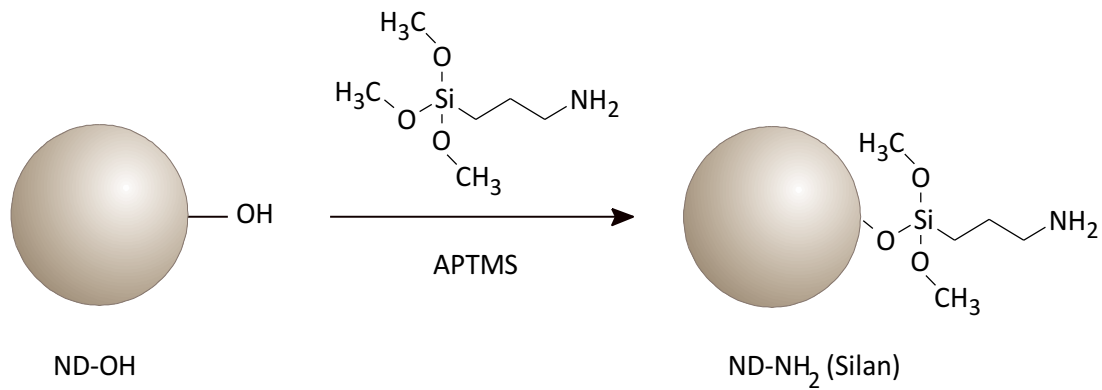


Abb. 3.6: Aminosilanisierung von ND-Oberflächen mit APTMS.

Versuchsdurchführung

1 g ND-OH wird in 5 % APTMS in trockenem Aceton suspendiert und 48 h unter Rühren bei RT inkubiert. Nach dem Abtrennen der Partikel durch Zentrifugation werden diese dreimal in Aceton gewaschen. Zum Trocknen werden die Zentrifugenröhrchen mit den ND unter Vakuum in einem Exsikkator mit Silicagel gelagert.

3.4 Herstellung von Nanodiamant-Aptamer-Konjugaten

Zur Herstellung von ND-Aptamer-Konjugaten wurden Methoden zur Konjugation über Amid-, Ester- bzw. Phosphodiester- und Isoharnstoffbindungen angewandt (Abb. 3.7, Phosphodiesterbindungen in Abb. 3.11). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Bindungen erläutert und die Durchführung der Experimente beschrieben. Vorangestellt wird eine Übersicht über die verwendeten ND, DNA-Moleküle, Chemikalien, Puffer und Geräte. Die Ergebnisse der Konjugationen wurden mittels FT-IR-Spektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie überprüft (Abschnitt 4.3 und 4.4).

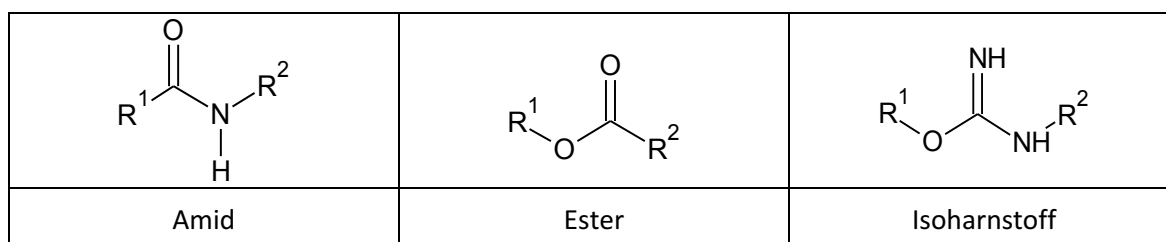


Abb. 3.7: Zwischen ND und DNA erzeugte Bindungen.

3.4.1 Verwendete Materialien und Geräte

Nanodiamanten

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden Diamant-Pulver von drei verschiedenen Herstellern bezogen (Tab. 3.7), die zum Teil bereits im Abschnitt 3.3 erwähnt sind. Dazu kommen mit Hydroxyl- und Aminogruppen modifizierte ND vom International Technology Center (ITC).

Tab. 3.7: Zur Konjugation eingesetzte ND.

Bezeichnung	Oberflächenbelegung	Herkunft
ND-Pulver, PL-D-G01	diverse funktionelle Gruppen	Plasmachem GmbH, Berlin
ND-Pulver, УДА-ПП (UDA-PP)	unbekannt	JSC Sinta, Minsk, Weißrussland
ND-OH, hydroxylated nano-diamond powder, 7105.10.0015	überwiegend Hydroxylgruppen (–OH)	International Technology Center (ITC)/ Adámas Nanotechnologies, Raleigh, North Carolina, USA
ND-NH ₂ , amine functionalized nanodiamond powder, 7105.10.0015	überwiegend Aminogruppen (–NH ₂)	International Technology Center (ITC)/ Adámas, Nanotechnologies, Raleigh, North Carolina, USA

Einzelsträngige DNA (ssDNA)

Es wurde grundsätzlich mit dem 15 Nukleotide umfassenden anti-Thrombin-Aptamer (TBA) mit der Sequenz 5'-GGT TGG TGT GGT TGG -3' gearbeitet.

Die jeweiligen Modifikationen an den 3'- und 5'- Enden sind in Tabelle 3.8 angegeben. Moleküle mit zusätzlichen Basenpaaren wurden für Versuche eingesetzt, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind. Hier dienen sie als Kontrollen, da sie keine Fluoreszenzmarkierungen tragen. Bei FAM bzw. 6-FAM handelt es sich um den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein. Das Material wurde von der IBA GmbH, Göttingen (www.iba-go.com) und der biomers.net GmbH, Ulm (www.biomers.net) bezogen. Jedes Aptamer ist durch eine vom Hersteller vergebene Nummer gekennzeichnet. Von biomers.net gelieferte Aptamere liegen als lyophilisiertes Pulver vor, während IBA die Moleküle in gelöstem Zustand liefert: nicht modifizierte Aptamere in Wasser, mit funktionellen Gruppen oder Fluoreszenzfarbstoffen modifizierte Aptamere in TE-Puffer. Um bei biomers-Aptameren Lösungen mit der gewünschten Konzentration zu erhalten, sind die Informationen auf dem jeweiligen Oligonukleotiddatenblatt zu beachten.

Tab. 3.8: Zur Konjugation eingesetzte ssDNA (Aptamere).

Bezeichnung und Nummer der Aptamere	5'-Modifikation	3'-Modifikation	Herkunft	verwendet für
5'-TBA-3' 127315	keine	keine	IBA	3.4.3
5'-C6NH ₂ -TBA-GACGTC-3' 127316	-C6NH ₂	keine, zusätzliche Basen GACGTC	IBA	3.4.2
5'-C6NH ₂ -TBA-GACGTC-3' 127317	-C6NH ₂	keine, zusätzliche Basen GCTAGC	IBA	3.4.4
5'-COOH-TBA-GACGTC-3' 127318	-COOH	keine, zusätzliche Basen GACGTC	IBA	3.4.2
5'-TBA-FAM-3' 134464	keine	FAM	IBA	3.4.4
5'-NH ₂ -TBA-FAM-3' 134465	-C6NH ₂	FAM 6-FAM	IBA	3.4.4
5'-TBA-FAM-3' 00151326_1	keine	6-FAM	biomers	3.4.2, 3.4.3
5'-NH ₂ -TBA-FAM-3' 00151326_2, 00160757_2	-C6NH ₂	6-FAM	biomers	3.4.2
5'-NH ₂ -TBA-ACGT-3' 00151326_3	-C6NH ₂	keine, zusätzliche Basen ACGT	biomers	3.4.2
5'-COOH-TBA-FAM-3' 00151326_4	-COOH	6-FAM	biomers	3.4.2

Doppelsträngige DNA (dsDNA)

Für die Konjugation über Esterbindungen wurde auch dsDNA eingesetzt (Tab. 3.9). Das dafür verwendete PCR-Produkt, dessen Sequenz im Anhang aufgeführt ist, weist eine Länge von 241 Basenpaaren auf. Zur Fluoreszenzmarkierung von dsDNA wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet.

Tab. 3.9: Zur Konjugation eingesetzte dsDNA.

Bezeichnung	Herkunft
EF-1a (Elongationsfaktor 1a), PCR-Produkt von gDNA aus <i>Oreochromis niloticus</i> , 241 Basenpaare	Institut für Genetik, Technische Universität Dresden

Puffer

Die für die Konjugationsversuche verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Die angegebenen Mengen an Chemikalien beziehen sich jeweils auf 100 ml. Einstellungen des erforderlichen pH-Wertes erfolgten mit NaOH bzw. HCl (Tab. 3.5).

Tab. 3.10: Zur Konjugation eingesetzte Puffer.

Bezeichnung des Puffers	Herstellung	verwendet für
1X PBS + 0,1% BSA (+ 0,05 % NaN ₃)	0,1 g BSA + 0,05 g NaN ₃ in 100 ml 1X PBS	3.4.2, 3.4.4
1X PBS + 0,1 % BSA + 0,1 % Tween 20	0,1 ml Tween 20 und 0,1 g BSA in 100 ml 1X PBS	3.4.2
0,2 M Borat-Puffer, pH 8,5	1,237 g Borsäure in 100 ml Reinstwasser	3.4.4
0,1 M MES, pH 5,0	2,13 g MES in 100 ml Reinstwasser	3.4.2
1X PBS, pH 7,4	fertig vom Hersteller GIBCO bezogen	3.4.4
10 mM TE-Puffer, pH 8,0	0,121 g Tris und 2,92 mg EDTA in 100 ml Reinstwasser	3.4.3
0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4	0,79 g Tris-HCl in 100 ml Reinstwasser	3.4.2

Chemikalien

In Tabelle 3.11 sind alle Chemikalien aufgelistet, die zur Konjugation von ND und DNA verwendet wurden. Zur eindeutigen Zuordnung werden die Lieferanten und die Artikelnummern angegeben.

Tab. 3.11: Zur Konjugation eingesetzte Chemikalien.

Chemikalie	Summenformel	Herkunft und Artikelnummer	verwendet für
Borsäure	H ₃ BO ₃	Carl Roth, P010.2	3.4.4
Bovine Serum Albumin (BSA)	-	Sigma, A2153	3.4.2
Bromcyan in Acetonitril	BrCN	Sigma-Aldrich, 261610-100ML	3.4.4
Dichlormethan	CH ₂ Cl	Carl Roth, AE03.1	3.4.3
4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP)	C ₇ H ₁₀ N ₂	Aldrich, 522805	3.4.3
(1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid) Hydrochlorid (EDC)	C ₈ H ₁₈ N ₃ Cl	Fluka, 03450	3.4.2
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Carl Roth, 8040.3	3.4.3
Hydroxylamin-Hydrochlorid	NH ₂ OH * HCl	Sigma-Aldrich, 255580	3.4.2
Lithiumhydroxid Monohydrat	LiOH * H ₂ O	Applichem, A2570	3.4.2
Natriumazid (als Pufferzusatz)	NaN ₃	Carl Roth, K305.1	3.4.2, 3.4.4
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	C ₄ H ₅ NO ₃	Aldrich Chemistry, 130672-25G	3.4.2
2-(N-morpholino)Ethan-sulfonsäure (MES)	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	Roth, 4256.2	3.4.2
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X	-	GIBCO, 10010-31	3.4.4
Pyridin	C ₅ H ₅ N	Carl Roth, CP07.1	3.4.3
Quick Ligation Kit (mit 1x Quick Ligation Reaction Buffer und Quick T4 DNA Ligase)	-	New England Biolabs (NEB), M2200S	3.4.3
SYBR [®] Green I 10.000x in DMSO	C ₃₂ H ₃₇ N ₄ S ⁺	Invitrogen, Molecular Probes, S7563	3.4.3
Thionylchlorid	SOCl ₂	Carl Roth, 4024.2	3.4.3
Thymidin	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	Aldrich, 85.500-6	3.4.3
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth, AE15.2	3.4.3
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	AppliChem, A4974	3.4.2

Geräte

In Tabelle 3.12 sind die für die Herstellung der Konjugate verwendeten Geräte aufgeführt.

Tab. 3.12: Zur Konjugation eingesetzte Geräte.

Gerätebezeichnung	Typ und Hersteller
Heizplatte mit Magnetrührer	VMS-C7 (VWR)
Mikroliterpipetten	Eppendorf Research (VWR)
pH-Meter	SevenEasy™ pH-Meter S20 (Mettler Toledo)
Vortexer	Select (BioProducts)
Waage (Feinwaage)	Explorer Pro (Ohaus)
Waage	Adventurer Pro (Ohaus)
Wasseraufbereitung	Direct-Q 3 UV System (Millipore)
Wippschüttler	Nutating Mixer GyroMini (Labnet International)
Zentrifuge	MIKRO 200R (HETTICH)
Zentrifuge	Sigma 3-16PK (Sartorius)

3.4.2 Konjugation über Amidbindungen

Die kovalente Kopplung von ND mit Biomolekülen über Amidbindungen kann sowohl über carboxylierte Partikel und aminomodifizierte Moleküle, als auch umgekehrt erfolgen.

Carboxylierte Partikel können durch verschiedene Strategien aktiviert werden [Her08], wobei reaktive Intermediate entstehen, die mit Proteinen und anderen Biomolekülen weiter reagieren. Die am häufigsten angewandte Methode zur Kopplung von Biomolekülen mit Aminogruppen an carboxylierte Partikel ist ein durch Carbodiimide vermittelter Prozess, der in wässriger Lösung abläuft. Dabei katalysieren die Carbodiimide, wie z. B. EDC, die Bildung von Amidbindungen zwischen Carboxyl- und Aminogruppen unter Bildung des reaktiven Esters *o*-Acylisoharnstoff (Abb.3.8). Dieses Intermediat reagiert direkt mit Aminogruppen. Wird lediglich EDC als aktivierende Substanz eingesetzt, läuft die Reaktion in einem Schritt ab. Alternativ kann in einem zweiten Schritt die Zugabe des Crosslinkers N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) bzw. Sulfo-NHS erfolgen. Daraus resultiert ein weiteres Intermediat, der NHS- bzw. Sulfo-NHS-Ester. Die Bildung dieses zweiten Esters ergibt ein stabileres Zwischenprodukt in wässriger Lösung, als es bei der Ein-Schritt-Reaktion der Fall ist. Die Zugabe von NHS kann also die Ausbeute der Reaktion erhöhen, indem es die Hydrolyse des Intermediates in der wässrigen Lösung reduziert [019]. Außerdem wird bei der Bildung des sekundären NHS-Esters der EDC-Überschuss an den Partikeloberflächen vor der Zugabe der Biomoleküle

entfernt. Dadurch wird einer Carbodiimid-vermittelten Polymerisation von Proteinen oder Nucleinsäuren durch die gemeinsame Präsenz von Carboxyl- und Aminogruppen in den Molekülen vorgebeugt [Her08]. Da Aptamere durch das Fehlen eines Komplementärstranges freie Aminogruppen an den Nucleinbasen tragen, trifft dies für sie zu, wenn sie an einem Ende mit Carboxylgruppen modifiziert sind.

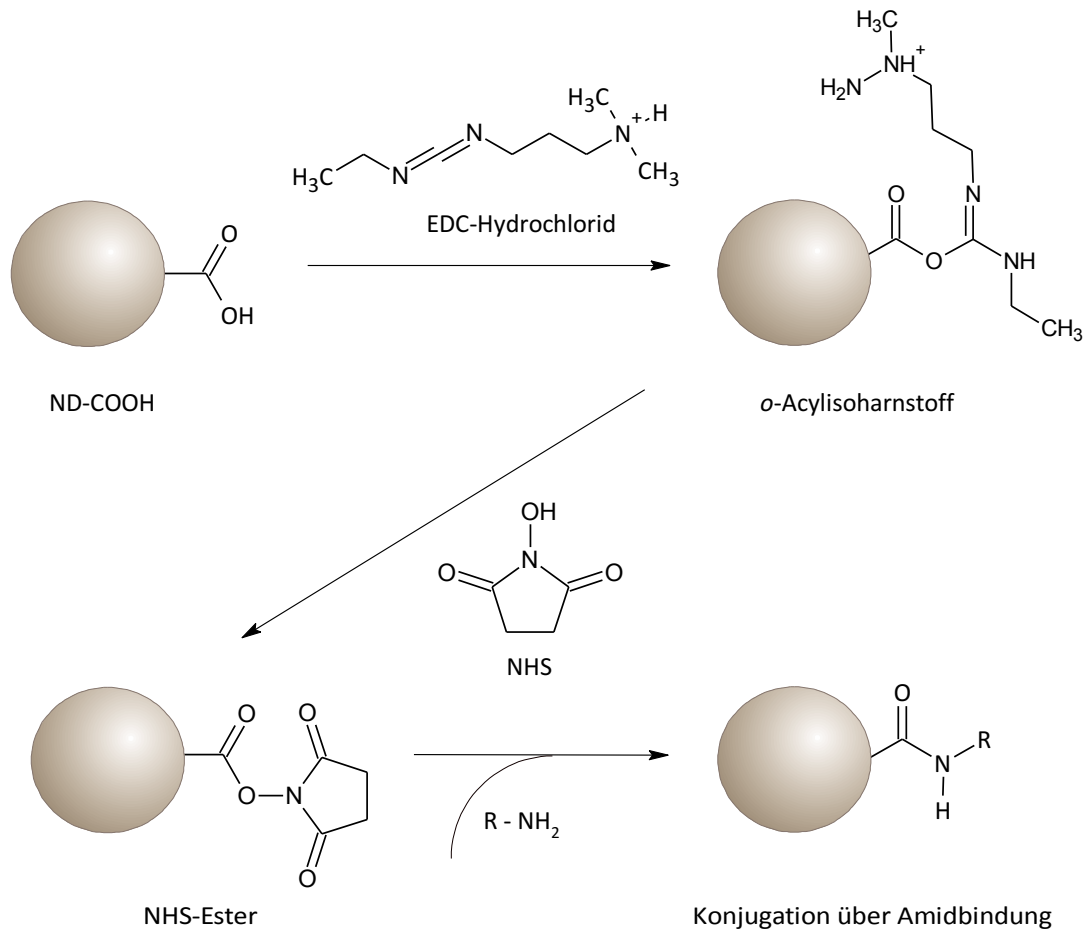


Abb. 3.8: Konjugation von carboxylierten Partikeln (ND-COOH) mit aminomodifizierten Aptameren (R-NH₂) über Amidbindungen. Im ersten Reaktionsschritt entsteht das Intermediat *o*-Acylisoharnstoff, das mit NHS zum zweiten Intermediat, einem NHS-Ester, weiterreagiert. Bei Zugabe des aminierten Reaktionspartners werden die ND-Partikel kovalent über Amidbindungen mit diesen konjugiert. Als Nebenprodukt entsteht eine Harnstoffverbindung (nicht eingezeichnet). Schema gezeichnet nach [Her08]).

Versuchsdurchführung ND-COOH + NH₂-TBA

Im folgenden Abschnitt wird die Versuchsdurchführung zur Generierung von Amidbindungen beschrieben. Vorangestellt wird eine Übersicht zu den Reaktionsansätzen (Tab. 3.13). Als Referenzprotokoll für die Konjugation carboxylierter ND mit aminomodifizierten Aptameren wurde das DYNAL-Protokoll für Dynabeads MyOne Carboxylic Acid der Firma invitrogen [020] verwendet und entsprechend den hier eingesetzten Reaktionspartnern angepasst.

Tab. 3.13: Reaktionsansätze für die Generierung von Amidbindungen (ND-COOH + NH₂-TBA).

ND-COOH (PC)	ND-COOH (PC)
+ 5'-NH ₂ -TBA-GACGTC-3' (127316)	+ 5'-NH ₂ -TBA-FAM-3' (00151326_2)
+ 5'-NH ₂ -TBA-GCTAGC-3' (127317)	+ 5'-NH ₂ -TBA-ACGT-3' (00151326_3)
+ 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1)	+ 5'-NH ₂ -TBA-FAM-3' (00160757_2)

I Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC und NHS

Je 100 ml benötigtem Volumen werden 50 mg/ml NHS in 0,1 M MES (pH 5,0) gelöst. EDC ist erst unmittelbar vor dem Gebrauch in kaltem 0,1 M MES mit einer Endkonzentration von 50 mg/ml zu lösen. Zu den carboxylierten ND (3 mg/Ansatz) werden je 100 µl EDC- und 100 µl NHS-Lösung gegeben, gemischt und 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation werden die ND-Partikel dreimal mit 300 ml 25 mM MES gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in jeweils 70 µl MES resuspendiert. Die Carboxylgruppen auf den Oberflächen der ND sind nun für die Anbindung der aminomodifizierten Liganden aktiviert.

II Immobilisierung der Liganden und Waschen der Partikel

Die Aptamere werden in sterilem Reinstwasser gelöst. 6 µl Aptamerlösung mit einer Konzentration von 1 nmol/µl, das entspricht 6 nmol für 3 mg ND, werden zu den aktivierten ND gegeben (Endvolumen 76 µl) und vermischt. Die Proben werden nun für 60 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend werden die ND-Partikel mit den Aptameren durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und für dreimal 5 min in 1X PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20 gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation werden die Konjugate für die Fluoreszenzmikroskopie und FT-IR-Spektroskopie in Reinstwasser bzw. in 1X PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % NaN₃ (Lagerpuffer) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

Versuchsdurchführung ND-NH₂ + COOH-TBA

Die Konjugation von aminomodifizierten Partikeln mit carboxylierten Aptameren erfolgte auf der Grundlage des invitrogen DYNAL-Protokolls für Dynabeads M-270 Amine [021]. Die Reaktionsansätze sind in Tabelle 3.14 aufgeführt.

Tab. 3.14: Reaktionsansätze für die Generierung von Amidbindungen (ND-NH₂ + COOH-TBA).

ND-NH ₂ (S)	ND-NH ₂ (PC)	ND-NH ₂ (ITC)
+ 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4)	+ 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4)	+ 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4)
+ 3'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318)	+ 3'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318)	+ 3'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318)

Laut Information des Herstellers IBA sind die Carboxylgruppen am 5'-Ende der Oligonukleotide mit jeweils einer Schutzgruppe (-CH₃) versehen, die vor deren Einsatz durch Reaktion mit LiOH entfernt werden muss. Die Carboxylmodifikation an den Aptameren von biomers.net ist anderen Ursprungs und trägt keine Schutzgruppe, weshalb auch keine Vorbehandlung nötig ist.

LiOH-Aktivierung

Der entsprechenden Aptamermenge (hier 6 nmol bzw. 30 µg) werden 90 µl 0,1 M LiOH x H₂O zugegeben und gemischt. Der Ansatz wird über 2 h bei RT inkubiert.

I Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC und NHS und Immobilisierung der Liganden

Vor dem Beginn der Reaktion werden die aminomodifizierten ND in 0,1 M MES (pH 5,0) gewaschen und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Die Aptamere (6 nmol bzw. 30 µg pro Ansatz) werden in 0,1 M MES (pH 5,0) gelöst, zu den ND-Partikeln gegeben und gemischt. (Bei den Aptameren ist zu berücksichtigen, dass sie zum Teil als lyophilisiertes Pulver und zum Teil bereits suspendiert in Reinstwasser und LiOH vorliegen.) Unmittelbar vor dem Gebrauch werden 15 mg NHS und 10 mg EDC in 1 ml eiskaltem 0,1 M MES-Puffer gelöst, zu den Aptameren gegeben und für 2 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Alternativ können die beiden Reagenzien auch getrennt gelöst und zu den Liganden gegeben werden. Hinsichtlich des Volumens ist auf die gleiche Konzentration in den Reaktionsansätzen zu achten. Nach 2 h wird die Reaktion durch Zugabe von Hydroxylamin in einer Endkonzentration von 10 mM beendet. Die Einwirkzeit beträgt 15 min.

II Waschen der beschichteten Partikel

Die Konjugate werden nun durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Um überschüssige Liganden zu entfernen und die Oberfläche zu blockieren, sind drei bis vier Waschschrte durchzuführen. Dazu werden die Konjugate jeweils 3 min unter Bewegung auf dem Wippschüttler in 1X PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % Tween 20 gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation werden die Konjugate für die Fluoreszenzmikroskopie und FT-IR-Spektroskopie in Reinstwasser bzw. in 1X PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % NaN₃ (Lagerpuffer) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. Die Ergebnisse zur Konjugation über Amidbindungen werden in den Abschnitten 4.3.2.1 und 4.4.1 gezeigt.

3.4.3 Konjugation über Ester- und Phosphodiesterbindungen

Esterbindungen entstehen durch die Reaktion eines Alkohols oder Phenols mit einer Carbonsäure. Eine weitere Möglichkeit für die Darstellung von Carbonsäureestern ist die Synthese von Carbonsäurechloriden aus Carbonsäuren mit Thionylchlorid. Diese Variante zur Erzeugung von Esterbindungen wird im hier vorgestellten Experiment angewandt. Das dem Versuch zugrundeliegende Verfahren ist der Arbeit von USHIZAWA *et al.* [USM+02] entnommen und schematisch in Abbildung 3.9 dargestellt. In einer Zweischnitt-Reaktion erfolgt die Anbindung von Thymidin an carboxylierte ND über Esterbindungen. Im ersten Schritt entstehen aus der Reaktion von Carboxylgruppen mit Thionylchlorid Carbonsäurechloride an den Partikeloberflächen. Im zweiten Teil der Reaktion wird Thymidin auf den Partikeloberflächen immobilisiert.

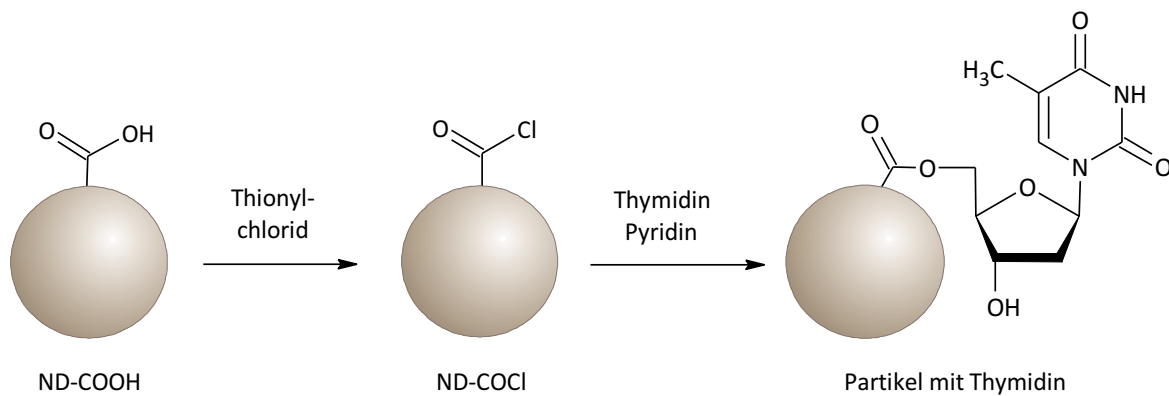


Abb. 3.9: Anbindung von Thymidin an ND-COOH. Im ersten Schritt entsteht durch Zugabe von Thionylchlorid (SOCl_2) ein Intermediat mit Carbonsäurechloriden an den Partikeloberflächen, dabei werden HCl und SO_2 freigesetzt. Durch die weitere Reaktion mit Thymidin und Pyridin binden Thymidinmoleküle über Esterbindungen an die ND-Partikel. Das Reaktionsprodukt trägt an jedem Thymidin eine freie OH-Gruppe (Schema gezeichnet nach [USM+02]).

Anschließend kann dsDNA über ihre 5'-Phosphatgruppen an die 3'-OH-Gruppen des Thymidins ligiert werden (Abb. 3.10 und 3.11). Der Komplementärstrang muss an der entsprechenden Stelle ein Adenosin-Nukleotid (dA, im Schema abgekürzt mit A) tragen, welches sich über Wasserstoffbrücken mit Thymidin (dT, im Schema abgekürzt mit T) verbinden kann [USM+02].

Phosphodiesterbrücken sind die natürlicherweise vorliegenden Verbindungen zwischen den einzelnen Nukleotiden im Zucker-Phosphat-Rückgrat von DNA- und RNA-Molekülen, und stellen somit eine spezifische Form der Esterbindung dar. Dabei sind jeweils eine OH-Gruppe des einen und eine Phosphatgruppe des nächsten Moleküls miteinander verbunden. Dieses Prinzip wird in den hier beschriebenen Versuchen für die Anbindung von DNA an Partikeloberflächen mit freien Hydroxylgruppen genutzt.

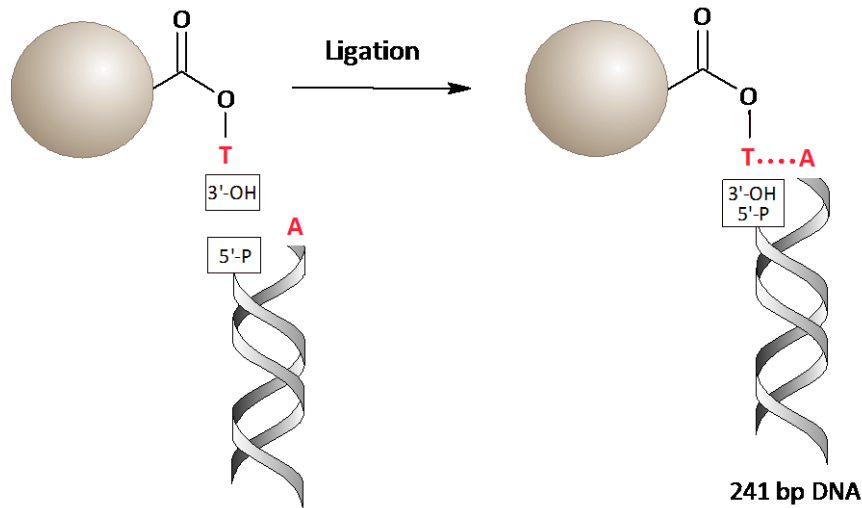


Abb. 3.10: Ligation von dsDNA an mit Thymidin (T) gekoppelte ND. Die 5'-Phosphatgruppen der DNA-Moleküle binden, durch Ligase katalysiert, an die freien 3'-OH-Gruppen des Thymidins – es entstehen kovalente Phosphodiesterbindungen. Der komplementäre DNA-Strang bildet Wasserstoffbrücken zwischen A und T aus. Im Fall der Ankopplung von ssDNA fehlt der Komplementärstrang und damit die zusätzliche Verbindung über Wasserstoffbrücken (bp = Basenpaare) (Schema gezeichnet nach [USM+02]).

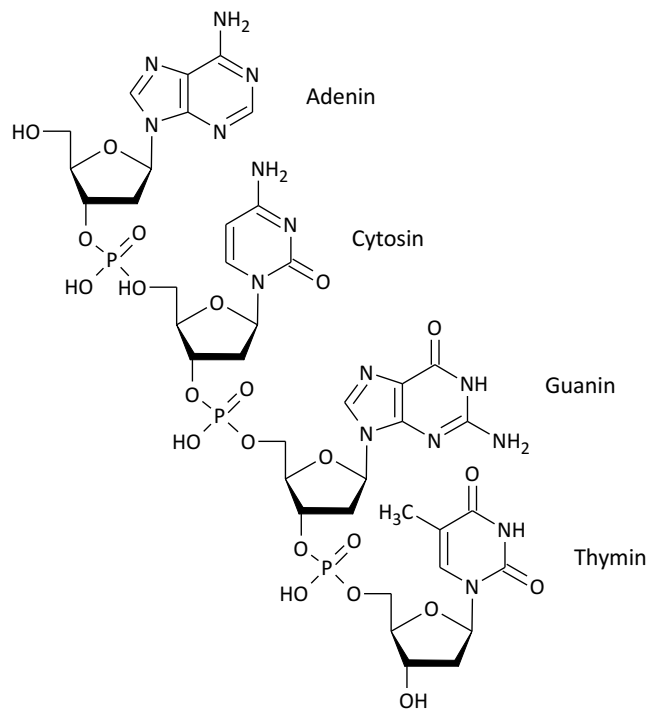


Abb. 3.11: Struktur eines DNA-Einzelstranges mit Phosphodiesterbindungen.

Unter dem Begriff Esterbindung werden in diesem Abschnitt mehrere verschiedene Reaktionen zusammengefasst. An erster Stelle ist hier die Konjugation zwischen ND-Partikeln und Thymidin über Esterbindungen zu nennen, wie sie in Abbildung 3.10 dargestellt ist. Weiterhin entstehen Phosphodiesterbindungen bei der Konjugation von DNA an die modifizierten Nanopartikel:

- a) An das auf den ND-Oberflächen immobilisierte Thymidin wird dsDNA, katalysiert durch DNA-Ligase, über die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen ligiert (Abb. 3.10).
- b) Parallel zur Konjugation von dsDNA an Thymidin wird diese Konjugationsvariante für Aptamere angewandt. Das Aptamer darf in diesem Fall keine 5'-Modifikation tragen, sondern muss über eine freie Phosphatgruppe verfügen.
- c) DsDNA wird mit kommerziell erworbenen ND-OH konjugiert. Hierbei entstehen Bindungen zwischen den Hydroxylgruppen an den Partikeloberflächen und den Phosphatgruppen der dsDNA.
- d) Aptamere werden mit kommerziell erworbenen ND-OH konjugiert. Hierbei entstehen Bindungen zwischen den Hydroxylgruppen an den Partikeloberflächen und den Phosphatgruppen der Aptamere.

Für die Kopplung über Esterbindungen wurden hydroxylierte ND (ITC) und mit Thymidin modifizierte ND (PC) und ND (S), wie im Abschnitt 3.3.3 beschrieben, eingesetzt.

Versuchsdurchführung

Wie bereits oben angegeben, wurde mit vier verschiedenen Ansätzen gearbeitet:

- a) ND-OH (T) + dsDNA
- b) ND-OH (T) + ssDNA (TBA)
- c) ND-OH + dsDNA
- d) ND-OH + ssDNA (TBA)

Die DNA-Moleküle tragen in allen Fällen keine Modifikationen und binden über ihre Phosphatgruppen an die Hydroxylgruppen auf den Partikeloberflächen. Die Reaktionsansätze sind, bezogen auf die verwendeten ND, in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tab. 3.15: Reaktionsansätze für die Generierung von Phosphodiesterbindungen.

ND-OH (T) (S)	ND-OH (T) (PC)	ND-OH (ITC)	ND-OH (ITC)
+ dsDNA (EF-1a)	+ ssDNA (127315)	+ dsDNA (EF-1a)	+ ssDNA (127315)
+ SYBR Green I	+ 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1)	+ SYBR Green I	+ 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1)

Zur Kontrolle wurden die Autofluoreszenz der Partikel und das Fluoreszenzverhalten von ND mit SYBR Green I (ohne DNA) untersucht. Im Fall von ND-Aptamer-Konjugaten erfolgten Kontrollen mit Aptameren ohne FAM-Modifikation. Den Versuchsansätzen mit ND und DNA wurde wahlweise Ligase hinzugefügt oder nicht hinzugefügt.

I Anbindung von Thymidin an ND-COOH über Esterbindungen (für a) und b))

1 g carboxylierte ND werden in einen Glaskolben mit 10 ml Thionylchlorid gegeben und 24 h bei 50 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Anschließend werden die Partikel gefiltert und mit Dichlormethan gewaschen. Die nun mit Carbonsäurechloriden modifizierten ND werden in einer Mischung aus 250 mg Thymidin und 40 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) in 10 ml Pyridin 24 h lang unter Rühren bis auf 50 °C erhitzt. Danach werden die Partikel erneut gefiltert, mit Reinstwasser gewaschen und unter Vakuum in einem Exsikkator mit Silicagel getrocknet.

II Ligation von DNA an ND-OH (T)

a) ND-OH (T) + dsDNA:

Pro Ansatz werden 1 mg ND in 8 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 300 ng DNA in 2 µl Reinstwasser gemischt. Den Kontrollen wird an Stelle der DNA-Lösung Reinstwasser hinzugefügt. Diesen Ansätzen werden jeweils 10 µl 2x Quick Ligation Reaction Buffer und wahlweise 1 µl Quick T4 DNA Ligase bzw. 1 µl Reinstwasser zugesetzt. Das Reaktionsvolumen für die Ligation umfasst damit 21 µl, die Reaktionszeit beträgt 5 min bei RT. Danach werden die Proben für 1 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C die Trennung der mit dsDNA ligierten ND-Partikel vom Überstand. Durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl Reinstwasser und Zentrifugation bei 4 °C werden die Partikel von nicht gebundener DNA und den Bestandteilen der Reaktionslösung getrennt. Danach wird jeder Reaktionsansatz in 20 µl Reinstwasser resuspendiert. Abschließend erfolgt die Färbung der gebundenen DNA mit SYBR Green I für 5 min bei RT. Dazu wird der Farbstoff in einem Verhältnis von 1:5000 mit der ND-Suspension gemischt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

b) ND-OH (T) + ssDNA (TBA):

An Stelle von dsDNA werden den Ansätzen je 2 µl Aptamerlösung mit 10 µg ssDNA hinzugefügt. Die Färbung mit SYBR Green I entfällt, da der Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM bereits an die Aptamere gebunden ist. Ansonsten wird genau wie unter a) beschrieben verfahren.

III Ligation von DNA an ND-OH (ITC)

c) ND-OH (ITC) + dsDNA:

Die Vorgehensweise entspricht dem unter a) beschriebenen Protokoll. Pro Ansatz werden 1 mg ND in 8 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 300 ng DNA in 2 µl Reinstwasser gemischt. Den Kontrollen wird an Stelle der DNA-Lösung Reinstwasser hinzugefügt. Diesen Ansätzen werden jeweils 10 µl 2x Quick Ligation Reaction Buffer und wahlweise 1 µl Quick T4 DNA Ligase bzw. 1 µl Reinstwasser

zugesetzt. Das Reaktionsvolumen für die Ligation umfasst damit 21 μl , die Reaktionszeit beträgt 5 min bei RT. Danach werden die Proben für 1 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C die Trennung der mit dsDNA ligierten ND-Partikel vom Überstand. Durch dreimaliges Waschen mit je 200 μl Reinstwasser und Zentrifugation bei 4 °C werden die Partikel von nicht gebundener DNA und den Bestandteilen der Reaktionslösung getrennt. Danach wird jeder Reaktionsansatz in 20 μl Reinstwasser resuspendiert. Abschließend erfolgt die Färbung der gebundenen DNA mit SYBR Green I für 5 min bei RT. Dazu wird der Farbstoff in einem Verhältnis von 1:5000 mit der ND-Suspension gemischt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

d) ND-OH (PC) + ssDNA (TBA):

An Stelle von dsDNA werden den Ansätzen je 2 μl Aptamerlösung mit 10 μg ssDNA hinzugefügt. Die Färbung mit SYBR Green I entfällt, da der Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM bereits an die Aptamere gebunden ist. Ansonsten wird genau wie unter c) beschrieben verfahren. Die Ergebnisse der Versuche zur Konjugation von ND mit Aptameren und dsDNA über Phosphodiesterbindung werden in den Abschnitten 4.3.2.2 und 4.4.2 gezeigt.

3.4.4 Konjugation über Isoharnstoffbindungen

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung von Hydroxylgruppen ist durch den Einsatz von Bromcyan (BrCN, auch als Bromcyanid oder Cyanogenbromid bezeichnet) gegeben. BrCN reagiert mit Hydroxylgruppen, wobei reaktive Cyanatester entstehen, die mit aminomodifizierten Liganden über Isoharnstoffbindungen gekoppelt werden können (Abb. 3.12). Im Unterschied zu anderen Aktivierungsmethoden wird die Reaktion mit BrCN vollständig unter wässrigen Bedingungen durchgeführt. Zu beachten ist, dass es sich bei BrCN um eine äußerst toxische Chemikalie handelt. Die Arbeit damit sollte nur in gut durchlüfteten Abzügen und mit geeigneter Schutzkleidung erfolgen [Her08].

Das folgende Protokoll für die Generierung von Isoharnstoffbindungen ist abgeleitet vom Protokoll A7 „Covalent coupling procedure on SiMAG-Hydroxyl and screenMAG-Hydroxyl by cyanogen bromide (CNBr) activation“ der Firma chemicell (Berlin) [022], in dem die Anbindung aminomodifizierter Liganden an hydroxylierte Magnetbeads beschrieben wird. Für die Bromcyanaktivierung wurden nach der Methodik von KRÜGER *et al.* [KLJS06] hydroxylierte ND (PC) sowie ND-OH (ITC) eingesetzt.

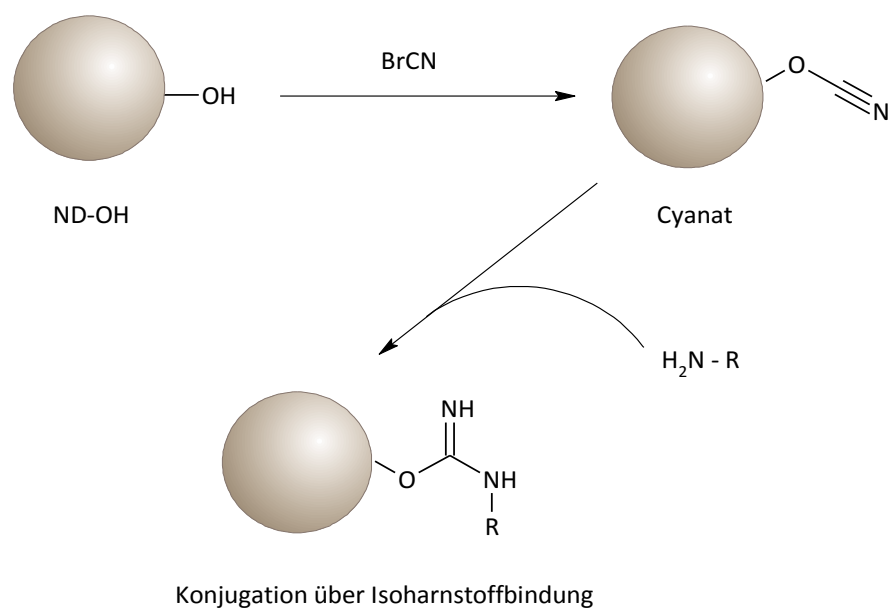


Abb. 3.12: Konjugation von hydroxylierten Partikeln (ND-OH) mit aminomodifizierten Aptameren (R-NH₂) über Isoharnstoffbindungen. Die Reaktion läuft vollständig unter wässrigen Bedingungen ab. Im ersten Schritt erfolgt die Aktivierung der Hydroxylpartikel durch Bromcyan. Unter Abgabe von Bromwasserstoff entstehen reaktive Cyanate, die mit Aminogruppen (-NH₂) reagieren. Am Ende der Reaktion sind beide Partner über Isoharnstoffbindungen kovalent verbunden (Schema gezeichnet nach [Bic97, Her08]).

Versuchsdurchführung

Im folgenden Abschnitt wird die Versuchsdurchführung zur Konjugation über Isoharnstoffbindungen beschrieben. Vorangestellt ist eine Übersicht zu den Reaktionsansätzen (Tab. 3.16).

Tab. 3.16: Reaktionsansätze für die Generierung von Isoharnstoffbindungen.

ND-OH (PC)	ND-OH (ITC)
5'-NH ₂ -TBA-GCTAGC-3' (127317)	5'-NH ₂ -TBA-GCTAGC-3' (127317)
5'-TBA-FAM-3' (134464)	5'-TBA-FAM-3' (134464)
5'-NH ₂ -TBA-FAM-3' (134465/ 00151326_2)	5'-NH ₂ -TBA-FAM-3' (134465/ 00151326_2)

I Aktivierung der Hydroxylgruppen mit BrCN

Pro Ansatz werden 10 mg ND einmal in jeweils 1 ml Borat-Puffer gewaschen und in 0,25 ml Borat-Puffer resuspendiert (wie im Protokoll für die Magnetbeads beschrieben, möglicherweise ist dieser Schritt bei ND nicht erforderlich). Anschließend erfolgt die Zugabe von 0,1 ml 5 M Bromcyan in Acetonitril zu jedem der Ansätze, die gemischt und 10 min auf Eis inkubiert werden. Sofort danach werden die ND dreimal mit 1 ml 1X PBS gewaschen und durch Zentrifugation separiert. Anschließend werden die aktivierten Partikel in 0,25 ml 1X PBS resuspendiert.

II Kopplung mit Aptameren

Die Aptamere werden zu den aktivierten Partikeln gegeben, mit diesen vermischt und für 2 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend werden die ND-Aptamer-Konjugate dreimal mit 1 ml 1X PBS gewaschen, wobei der Überstand mit den ungebundenen Aptameren entfernt wird. Nach der letzten Zentrifugation werden die Konjugate für die Fluoreszenzmikroskopie und FT-IR-Spektroskopie in Reinstwasser bzw. in 1X PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % NaN_3 (Lagerpuffer) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Ergebnisse werden in den Abschnitten 4.3.2.3 und 4.4.3 ausgewertet.

3.5 Nachweismethoden für Modifikation und Konjugatbildung

3.5.1 Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektroskopie

Für die FT-IR-Untersuchungen wurde das Alpha-FT-IR von Bruker Optik (Ettlingen) eingesetzt. In Tab. 3.17 sind einige technische Daten des Gerätes aufgeführt. Das Alpha-FT-IR ist mit der Software OPUS ausgestattet und arbeitet nach der Methode der abgeschwächten Totalreflexion. Als internes Reflexionselement dient ein Diamant-Kristall mit einer Reflexion, der in eine beheizbare Metallplatte eingebettet ist. Diese Vorrichtung erlaubt das Verdampfen von Wasserbestandteilen flüssiger Proben, die ansonsten ein erhebliches Hindernis für IR-Messungen darstellen. Die Messungen erfolgten im Bereich des mittleren Infrarots bei Wellenzahlen von 4000 bis 375 cm^{-1} im Transmissionsmodus.

Tab. 3.17: Technische Parameter des Alpha-FT-IR.

Spektralbereich	375 – 7.500 cm^{-1}
Messmethode	ATR, Diamant-Kristall, eine Reflexion
Auflösung	besser als 2 cm^{-1}
Wellenzahlgenauigkeit	0,01 cm^{-1}
Strahlquelle	SiC Globar
Interferometer	RockSolid, Goldspiegel, permanent justiert
Detektor	DTGS
Betriebssystem	Windows XP

Versuchsdurchführung

Es wurden jeweils wenige Mikroliter der in Reinstwasser suspendierten ND-DNA-Konjugate auf dem Diamantkristall aufgetragen. Die Temperatur der den Kristall umgebende Heizplatte war dabei zum Verdampfen des Reinstwassers auf 40 °C eingestellt. Auch für ND-Proben ohne DNA hat sich eine Suspendierung in Reinstwasser bewährt, weiterhin ist ein Anpressen der Pulver auf dem Diamantkristall mithilfe des dafür vorgesehenen Stempels möglich. Als Messparameter wurden gewählt: Auflösung 4 cm^{-1} , 32 Scans. In den im Abschnitt 4.3 vorgestellten Ergebnisse werden Mittelwertspektren aus je drei Messungen der Proben gezeigt.

3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Eingesetzte Fluorochrome

Für die Versuche zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Konjugatbildung wurden 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) für ssDNA und SYBR Green I für dsDNA verwendet. Die chemischen Strukturen der beiden Fluoreszenzfarbstoffe sind in den Abbildungen 3.13 und 3.14 dargestellt.

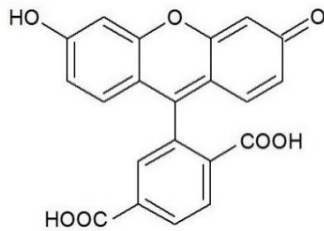


Abb. 3.13: Chemische Struktur von 6-FAM.

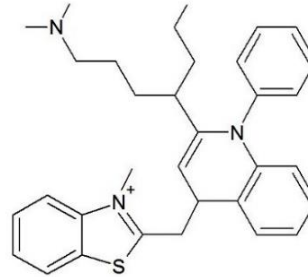


Abb. 3.14: Chemische Struktur von SYBR Green I.

Das Fluoresceinisothiocyanat-Derivat 6-FAM mit der Summenformel $C_{21}H_{12}O_7$ kann über seine Carboxylgruppen mit primären Aminen reagieren, wenn zuvor eine Aktivierung der Carboxylgruppen durch Carbodiimide erfolgt [023]. Anschließend kann das Amin durch weitere Reaktionen über einen Linker mit dem 5'- oder 3'-Ende von Oligonukleotiden verbunden werden. Ein Beispiel für die Molekülstruktur von Aptameren mit 3'-6-FAM zeigt die von biomers.net zur Verfügung gestellte Abbildung 3.15. Diese Darstellung gilt für alle von diesem Hersteller bezogenen Aptamere. Das Absorptions- bzw. Emissionsmaximum von FAM wird mit $\lambda_{\max} = 494$ bzw. 520 nm angegeben [024].

Die Fluoreszenzfärbung von dsDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Summenformel $C_{32}H_{37}N_4S^+$) wird im Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Erst nach der Komplexbildung zwischen DNA und Fluorochrom entstehen bei Anregung mit Licht Fluoreszenzsignale. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm. Weitere, jedoch schwächer ausgeprägte Absorptionsmaxima liegen bei 284 nm und 382 nm im UV-Bereich. SYBR Green I bindet auch an ssDNA und RNA, sendet dann aber deutlich schwächere Signale.

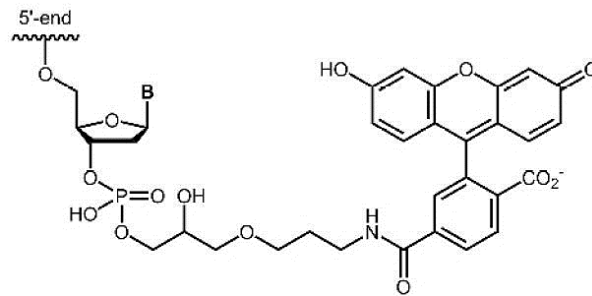


Abb. 3.15: Konjugation von 6-FAM an das 3'-Ende von Oligonukleotiden (Schema: biomers.net).

Aus den Abbildungen 3.16 und 3.17 ist ersichtlich, dass die Wellenlängen der Absorptions- und Emissionsmaxima beider Farbstoffe übereinstimmen. Das erleichterte die Versuchsplanung und -durchführung dahingehend, dass die gleichen Filter verwendet werden konnten.

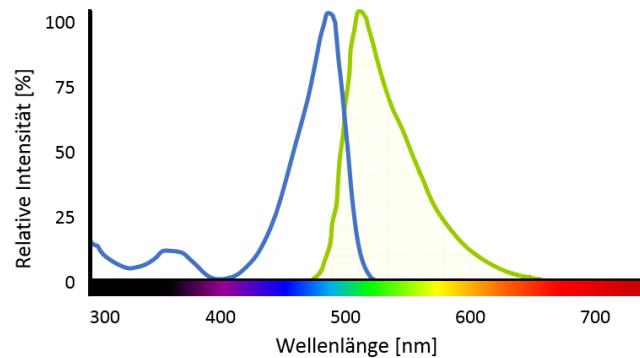


Abb. 3.16: Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffes SYBR Green I (Darstellung nach [025], verändert).

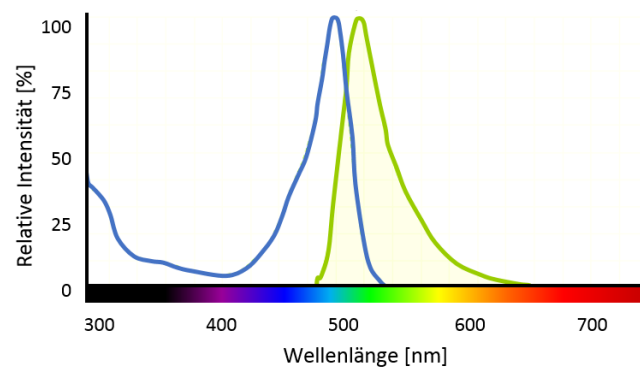


Abb. 3.17: Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffes FITC (Darstellung nach [026], verändert).

Gerätebeschreibung: Fluoreszenzmikroskop und eingesetzte Filter

Zur Untersuchung der ND-Aptamer-Konjugate wurde ein Zeiss Axio Observer mit Fluoreszenzeinheit genutzt. Dabei handelt es sich um ein inverses Mikroskop, bei dem die Proben mittels Auflicht durch eine Quecksilberdampfampe (HBO 100 Fluoreszenzilluminator) angeregt werden. Der

verwendete Filtersatz umfasst einen Anregungsfilter, der für Licht der Wellenlänge 450-490 nm, und einen Sperrfilter, der für Licht der Wellenlänge 500-550 nm durchlässig ist. Licht oberhalb der Wellenlänge von 495 nm kann den Strahlteiler passieren. Zur besseren Übersicht wird das Mikroskop einschließlich Zubehör noch einmal tabellarisch zusammengestellt (Tab. 3.18). Die zum Filtersatz gehörigen Spektren sind im Anhang 3 (Abb. A-3.1) aufgeführt.

Tab. 3.18: Fluoreszenzmikroskop und Zubehör.

Gerätebezeichnung	Typ und Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio Observer + Power Supply 231 + SC-2000 Shutter Controller
Kamera	Cascade II Photometrics
Software	MetaVue (Carl Zeiss)
Filtersatz	GFP Sputtered, Anregungsfilter ET470/40, Sperrfilter ET525/50

Versuchsdurchführung

Für die Fluoreszenzaufnahmen lagen die ND-Aptamer-Konjugate in Reinstwasser suspendiert vor. Jeweils 2 µl Probenvolumen wurden mit einer Mikroliterpipette (Eppendorf Research, VWR) auf ein Deckglas aufgetragen und dieses auf dem Mikroskop fixiert. Die Belichtungszeit betrug jeweils 50 ms, die durch die Kamera definierte Bildauflösung 512 x 512 Pixel. Bei den Aufnahmen wurde mit 20x- und 50x-Objektiven gearbeitet, die Größenverhältnisse sind mit Maßstabsbalken in jedem Bild dargestellt. Aufnahmen mit einem 100 µm-Maßstab wurden mit dem 20x-Objektiv, solche mit einem 50 µm-Maßstab mit einem 50x-Objektiv angefertigt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen

Die Charakterisierung der 0,1 %igen ND-Suspension, deren Herstellung unter 3.1.1 beschrieben ist, erfolgte durch Messungen der Partikelgröße und des ZPs. In Tabelle 4.1 sind alle Messergebnisse zusammengefasst.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Messwerte von Partikelgröße und Zeta-Potenzial.

Messung	Partikelgröße mit STABW	Mittelwert	Zeta-Potenzial	Mittelwert
1	79,8 nm ± 39,3 nm	78,85 nm	-40,80 mV	-40,2 mV
2	77,9 nm ± 37,9 nm		-39,61 mV	

4.1.1 Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung

Die Parameter der Partikelgrößen-Messungen sind tabellarisch im Anhang 1 aufgeführt (Tab. A-1.1 und A-1.2). In den Abbildungen 4.1 und 4.2 sind die Häufigkeitsverteilungen der Partikelgrößen dargestellt, wobei der Durchmesser der Partikelgröße gegen die Intensität aufgetragen ist.

Der Mittelwert beider Messungen ergab eine durchschnittliche Partikelgröße von 78,85 nm. Bei der ersten Messung wurde ein Wert von $79,8 \pm 39,3$ nm erreicht (Abb. 4.1). Aus den Originaldaten ist zu entnehmen, dass die kleinsten in der Suspension enthaltenen Partikel einen Durchmesser von 23 nm, die größten von 215 nm aufwiesen. Bei der zweiten Messung betrug die durchschnittliche Partikelgröße $77,9 \pm 37,9$ nm (Abb. 4.2), wobei Partikel im Größenbereich von 24 bis 216 nm auftraten.

Die hohen Standardabweichungen sind mit dem Vorhandensein von sehr verschiedenen großen Aggregaten in der Suspension zu begründen. Die Partikelgrößenverteilung entspricht einer Normalverteilung. Es liegt nur eine Partikelgrößenklasse und damit eine unimodale Häufigkeitsverteilung vor. Die Ergebnisse der Partikelgrößen- und der ZP-Messungen werden gemeinsam im folgenden Abschnitt diskutiert.

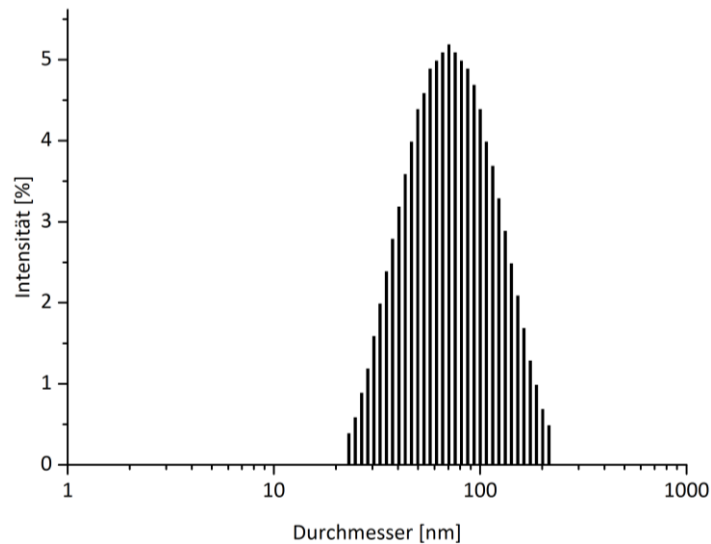


Abb. 4.1: Partikelgrößenverteilung einer kolloidalen 0,1 %igen ND-Suspension (erste Messung).

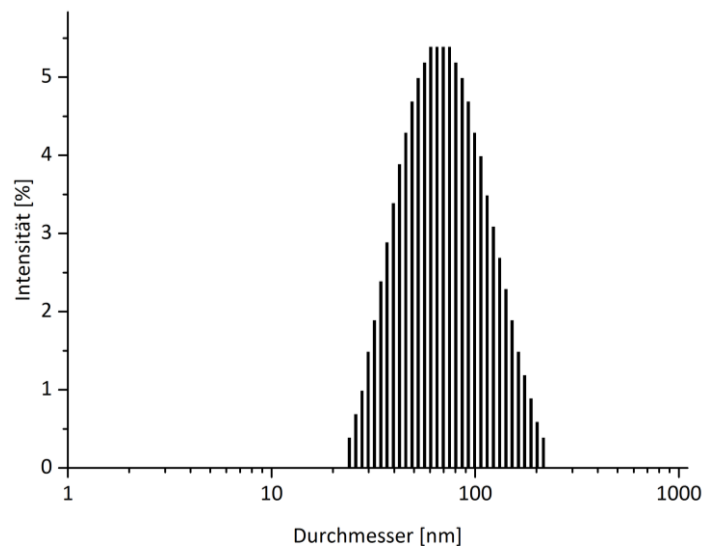


Abb. 4.2: Partikelgrößenverteilung einer 0,1 %igen kolloidalen ND-Suspension (zweite Messung).

4.1.2 Bestimmung des Zeta-Potenzials

Die Parameter der Messungen sind tabellarisch im Anhang 1 zusammengefasst (Tab. A-1.3 und A-1.4). In den Abbildungen 4.3 und 4.4 sind die Ergebnisse der ZP-Messungen dargestellt, wobei das ZP in mV gegen die Intensität aufgetragen ist. Auf einer zweiten X-Achse wird die Frequenz in Hz angezeigt. Der aus beiden Messungen ermittelte Durchschnittswert betrug $-40,2$ mV bei einem pH-Wert von 7,3 (Tab. 4.1). Die einzelnen Messungen ergaben ein ZP von $-40,80$ mV bzw. $-39,61$ mV (Abb. 4.3 und 4.4).

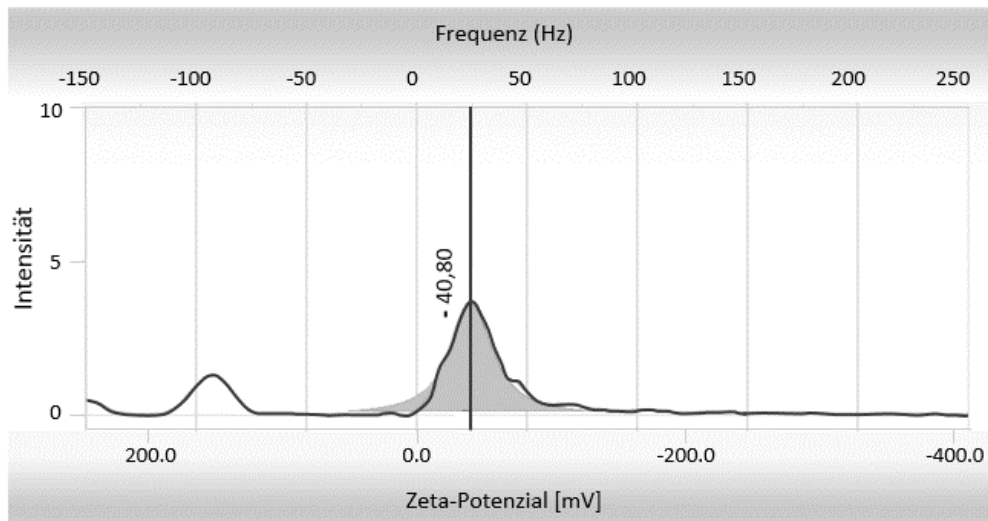


Abb. 4.3: Zeta-Potenzial einer 0,1 %igen kolloidalen ND-Suspension (erste Messung).

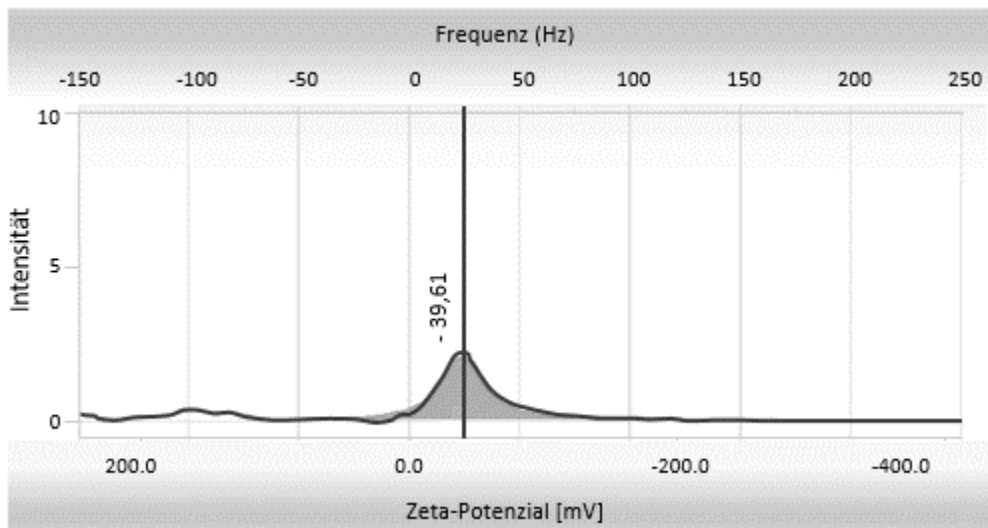


Abb. 4.4: Zeta-Potenzial einer 0,1 %igen kolloidalen ND-Suspension (zweite Messung).

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die untersuchte Suspension keine Primärpartikel, sondern ausschließlich Aggregate enthält. Die gemessenen Partikelgrößen entsprechen in etwa dem Durchmesser der von ŌSAWA *et al.* [Osa08] beschriebenen Primäraggregate (Abschnitt 2.1). Das bedeutet, dass durch das eingesetzte Zerkleinerungsverfahren die Primäraggregate nicht zerstört werden können, bzw. dass sich die Partikel nach der Trennung erneut fest zusammenlagern.

Beim ZP ergibt sich die Frage, wie die Messergebnisse zu bewerten sind. Nach der Einteilung von RIDDICK [Rid68] zeigen ZP-Werte zwischen -31 und -40 mV an, dass in der Suspension keine weitere Agglomeration zwischen den dispergierten Teilchen stattfindet. Werte von -41 bis -50 mV weisen auf eine gute Stabilität der jeweiligen Dispersion hin. Bezogen auf den Mittelwert von -40,2 mV, können der erzeugten Suspension beide Eigenschaften – wenn auch jeweils im Grenzbereich –

zugeordnet werden. Nach visueller Beurteilung war dieser Zustand über viele Monate stabil, wodurch die o. g. Einteilung bestätigt wird. Nach NEY [Ney73] entspricht der Bereich von -30 bis -60 mV jedoch lediglich einer mäßigen bis mittleren Stabilität.

Es erfolgten keine Partikelgrößen- und ZP-Messungen an bereits modifizierten Partikeln. Für die weitere Arbeit mit ND sind diese Untersuchungen jedoch zu empfehlen: Neben dem Ausgangsmaterial sollten alle weiteren Schritte der Oberflächenmodifikationen, wie z. B. ND-COOH, durch die Erfassung der Partikelgrößen und des ZPs charakterisiert werden.

Ergebnisse von Konjugationen dispergierter ND-Partikel mit DNA werden in dieser Arbeit nicht gezeigt, entsprechende Versuche wurden jedoch in geringem Umfang durchgeführt. Bei nachfolgenden Reaktionen ist durch Veränderung der Eigenschaften des Dispersionsmediums eine zunehmende Aggregation mit verringerter Stabilität der Suspension zu beobachten. Dennoch zeigen diese Partikel eine geringere Aggregation im Vergleich zu Versuchen mit ND-Pulver, was einen Einfluss der anfänglichen Partikelgrößen über den gesamten Reaktionsprozess nahelegt. Die unter 2.4.1 genannten Parameter, die Auswirkungen auf die Beschaffenheit von kolloidalen Suspensionen haben, wie z. B. die Mahldauer oder der Mahlkörperfüllungsgrad, können bei Bedarf zur weiteren Vermin- derung der Partikelgrößen, bis hin zu Suspensionen mit Primärpartikeln, variiert werden.

Für die Anwendbarkeit von ND ist die Möglichkeit der Erzeugung von kolloidalen Suspensionen mit Primärpartikeln oder zumindest sehr kleinen Aggregaten von entscheidender Bedeutung. Die Ursache, für die unter 2.1 erwähnte Stagnation in der weiteren Erforschung der Detonationssynthese und der Anwendung von ND lag, nach Ansicht von OSAWA [Osa08], darin begründet, dass lange nicht erkannt wurde, wie groß die hergestellten Partikel tatsächlich sind. Mit den zur Zeit der Entdeckung verfügbaren Methoden konnte zwar die Größe der Primärpartikel, nicht jedoch deren extrem starke Aggregation miteinander festgestellt werden, die zu insgesamt wesentlich größeren Partikeln führt. Ein technischer Durchbruch zur Lösung des Problems Aggregation wurde mit der Entwicklung von Verfahren erzielt, bei denen ND-Aggregate durch Mahlvorgänge unter Zugabe von Mahlkörpern (Mikrobeads) aus Zirkonoxid zerkleinert werden konnten. Die Annahme, dass herkömmliche Ultraschallbehandlungen zu Primärpartikeln führen, hatte sich dagegen nicht bestätigt. Von ursprünglich drei Partikelgrößenklassen lagen nach leichter Beschallung noch immer zwei vor, die als Primär- und Sekundäraggregate (100-200 nm bzw. 2-3 μm) beschrieben wurden. Primäraggregate konnten auch mit intensivster Ultraschallbehandlung nicht in Primärpartikel aufgetrennt werden. Erst durch den Einsatz von Mahlverfahren gelang die Erzeugung kolloidaler Suspensionen mit Primärpartikeln, die durch DLS-Messungen verifiziert wurden [Osa08, KKO+05].

Auch OZAWA *et al.* [OIM+07] berichten, dass die Anwendung von Mahlprozessen unter Beteiligung von Mahlkörpern (*wet-stirred-media-milling*) eine effektive Methode zum Aufbrechen der Aggregate und der Dispergierung der Teilchen darstellt. Zusätzliche Ultraschallbehandlungen unterstützen die Deaggregation, führen für sich allein jedoch nicht zur vollständigen Zerkleinerung bis hin zu Primärpartikeln. Der Einsatz von Mahlkörpern beeinflusst das Ergebnis entscheidend und kann eine anschließende Ultraschallbehandlung erübrigen. Die Autoren untersuchten weiterhin die Dispergierbarkeit von ND-Partikeln in einer Reihe von polaren Lösungsmitteln, wonach mit einer Dispersion in Wasser Primärpartikel erzeugt werden konnten. Als Ursache für die Aggregation zwischen den Primärpartikeln werden nicht ausschließlich Oberflächenkräfte, sondern auch chemische Bindungen zwischen funktionellen Gruppen angesehen.

Daten zu Partikelgrößen- und ZP-Messungen von ND werden u. a. von WENG *et al.* [WCC+12], SCHMIDLIN *et al.* [SPC+12] und MOCHALIN *et al.* [MNE+11] vorgestellt.

In der zuletzt genannten Arbeit wurden die Partikelgrößen und das ZP 0,1%iger Suspensionen von ND-COOH und ND-NH₂ bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt. In neutraler Umgebung, bei pH 7, erreichte das ZP von ND-COOH einen Wert von -30 mV und lag damit im Grenzbereich des für stabile Dispersionen erforderlichen Wertes. Mit dem Anstieg des pH-Wertes verringerten sich die Partikelgrößen und das ZP wurde negativer, wodurch sich die Stabilität der Suspension erhöhte. Das Verhalten von ND-NH₂ war genau umgekehrt: In neutraler Umgebung lag ein positiver ZP-Wert von $\ll 30$ mV vor, weshalb Dispersionen von ND-NH₂ bei pH 7 nicht stabil waren. Mit ansteigendem pH erhöhten sich die Partikelgrößen und das ZP nahm noch kleinere positive Werte an, womit sich die Stabilität der Suspension weiter verringerte [SPC+12]. Daten aus der Ermittlung von Partikelgrößen und ZP carboxylierter und aminomodifizierter ND können mit diesen Ergebnissen verglichen werden. Daraus sollten sich weitere Erkenntnisse zum Verhalten modifizierter ND in kolloidalen Suspensionen ableiten lassen, die möglicherweise auch zu einer erhöhten Effizienz von Mahlverfahren beitragen.

Im Rahmen von Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Konjugaten aus fluoreszierenden ND (FND) und dem Glykoprotein Transferrin (Tf) bestimmten WENG *et al.* [WCC+12] die Partikelgrößen und das ZP von FND-COOH, FND-NH₂ und FND-Tf. Dabei war ein Anstieg der Partikeldurchmesser von FND-COOH zu FND-NH₂ bzw. FND-Tf zu verzeichnen, der mit der Anlagerung von APTES bzw. Transferrin an die carboxylierten Partikeloberflächen einherging. Das ZP für die ND-Transferrin-Konjugate betrug -51,6 mV und zeigte damit Übereinstimmung zum ebenfalls negativen ZP von Transferrin in Lösung. Für FND-COOH wurde ein ZP von -48,3 mV ermittelt. Obwohl mit der Einführung von Aminogruppen durch die Silanisierung mit APTES ein positives ZP zu erwarten war, wurde ein negativer Wert von -25,4 mV für FND-NH₂ gemessen. Die Autoren zogen daraus die

Schlussfolgerung, dass nicht alle vorhandenen Carboxylgruppen mit Silanmolekülen reagiert hatten und somit deren negative Ladung überwog. Verwiesen wird dabei auf die Arbeit von VIAL *et al.* [VMS+08], die ebenfalls negative ZP für mit APTES silanisierte ND-NH₂-Oberflächen (-27 mV) feststellten. Allerdings verringerte sich auch in diesem Fall das ZP gegenüber dem Ausgangsmaterial (-40 mV), woraus die Präsenz von Carboxylgruppen abgeleitet wurde. Mit dem erreichten ZP war eine gute Stabilität der wässrigen Suspension gegeben, die jedoch bei pH-Werten unter 2 bzw. über 11 nicht aufrechterhalten werden konnte. Als Grenzwerte für die Stabilität von kolloidalen Suspensionen geben die Autoren ZP von +25 bzw. -25 mV an [WCC+12]. Solche Vergleichsdaten aus der Laborpraxis sind für die Beurteilung von ZP-Werten kolloidaler ND-Suspensionen von entscheidender Bedeutung.

SCHMIDLIN *et al.* [SPC+12] thematisierten die Identifikation und Quantifizierung von funktionellen Gruppen auf ND-Oberflächen. Bei drei ND-Proben, die unterschiedlichen Reinigungsprozeduren ausgesetzt waren, wurden stark voneinander abweichende ZP-Werte von -52, -22 bzw. -42 mV ermittelt, die jeweils mit einer entsprechenden Anzahl von 0,81, 0,15 bzw. 0,80 Carboxylgruppen pro nm² Partikeloberfläche korrespondierten. Die Anzahl dieser Funktionen wurde durch Anwendung der Boehm-Titration ermittelt. Mit diesen Untersuchungen wurde eindeutig belegt, dass die Höhe des ZPs von der Anzahl der negativen Ladungen – in diesem Fall durch dissoziierte Carboxylgruppen – abhängig ist.

4.2 Materialcharakterisierung von Nanodiamantpulvern

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Gewinnung von Informationen über die Morphologie der ND-Partikel und deren Größe wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Originalmaterialien durchgeführt. Die gezeigten Abbildungen enthalten Aufnahmen der ND-Pulver in verschiedenen Vergrößerungen. Auf der linken Seite ist jeweils das Material von Plasmachem (ND (PC)), auf der rechten Seite dasjenige von JSC Sinta (ND (S)) dargestellt.

Die Detektion von Sekundärelektronen durch den Inlens-Detektor (Abb. 4.5 bis 4.12) liefert Informationen zur Oberflächenbeschaffenheit und – bis zu einem gewissen Grad – zur Topographie der Proben. Übersichtsbilder mit 100facher Vergrößerung (Abb. 4.5 und 4.6) zeigen die Ausbildung von Aggregaten unterschiedlichster Größe bei ND (PC), während das ND (S)-Pulver scheinbar aus Partikeln mit geringeren Abmessungen besteht.

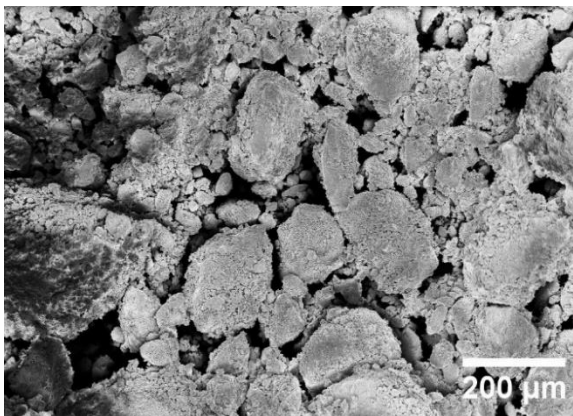


Abb. 4.5: ND (PC)-Pulver (100x).



Abb. 4.6: ND (S)-Pulver (100x).

Unmodifizierte ND (PC) weisen sehr heterogene Partikelgrößen auf. Neben Aggregaten und Agglomeraten, die sich im Bereich von wenigen bis zu weit über einhundert Mikrometern bewegen (Abb. 4.5), liegen auch sehr kleine Partikel im Nanometerbereich vor (Abb. 4.7 und 4.9). Dagegen besitzen ND (S) eine relativ homogene Partikelgröße im Bereich von mehreren hundert Nanometern (Abb. 4.8, 4.10, 4.12 und 4.15), wobei die Teilchen über eine unregelmäßige, kantige Form verfügen.

Einen interessanten Größenvergleich zeigen die Aufnahmen mit 50.000facher Vergrößerung. Hier stehen einem ND (PC)-Aggregat einige in etwa gleich große ND (S)-Partikel gegenüber (Abb. 4.11 und 4.12). Aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit ist gut erkennbar, dass es sich beim Erstgenannten um ein zusammengesetztes Gebilde handelt, während das kompakte Erscheinungsbild der ND (S)-Partikel auf zusammengesinterte, fest verbundene Teilchen schließen lässt.

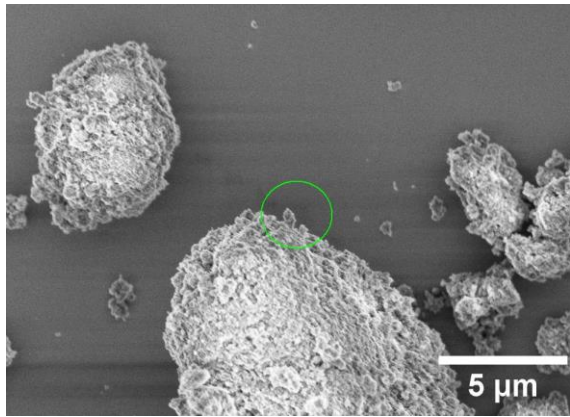


Abb. 4.7: ND (PC)-Aggregate mit heterogener Größenverteilung (5.000x).

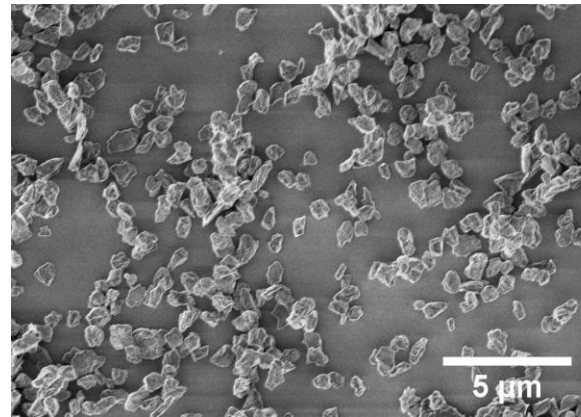


Abb. 4.8: ND (S)-Partikel mit homogener Größenverteilung (5.000x).

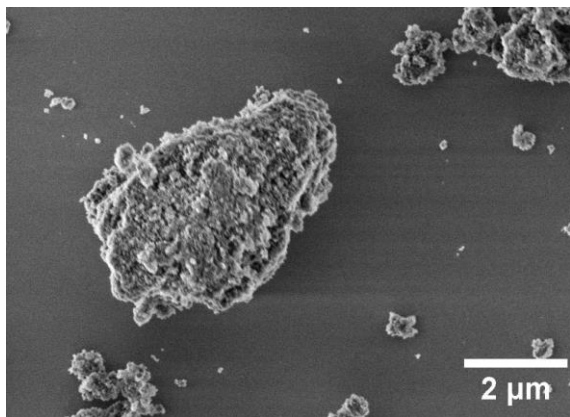


Abb. 4.9: ND (PC)-Aggregate mit heterogener Größenverteilung (10.000x).

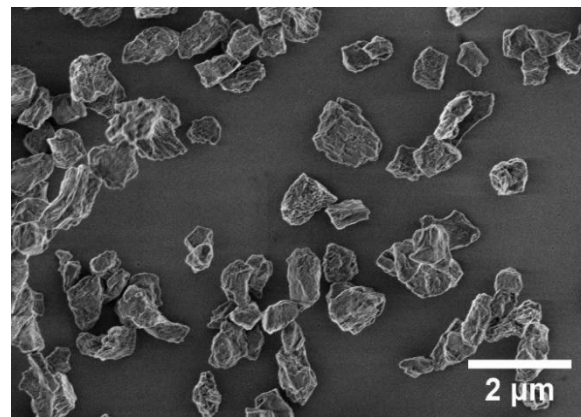


Abb. 4.10: ND (S)-Partikel mit homogener Größenverteilung (10.000x).

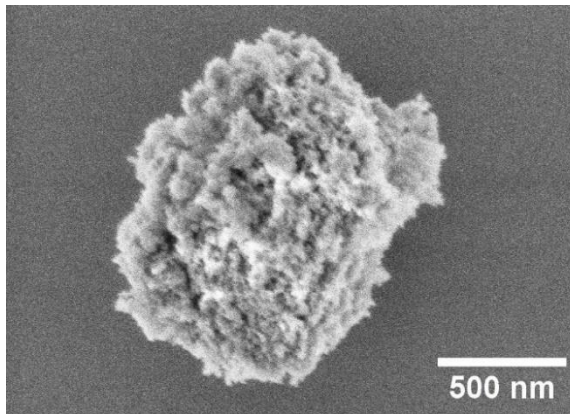


Abb. 4.11: ND (PC)-Aggregat (50.000x).

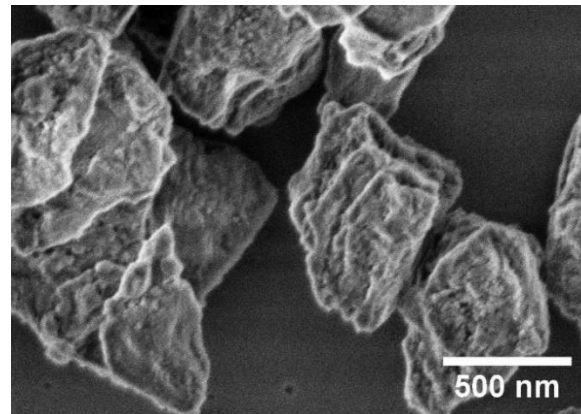


Abb. 4.12: ND (S)-Partikel (50.000x).

Die Aufnahmen zeigen deutlich, dass es sich bei diesem Material nicht um herkömmliche Detonationsdiamanten handelt: Aufgrund ihrer Größe, die sich überwiegend im dreistelligen Nanometerbereich bewegt, können ND (S) nicht mehr als ND im engeren Sinn bezeichnet werden. Neben der Größe ist auch die fehlende Aggregation ein Merkmal, welches sie von üblichen nanoskaligen Detonationsdiamanten, die nicht speziell gegen Aggregation modifiziert wurden, unterscheidet. Die Ergebnisse der FT-IR-Untersuchungen und Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 4.3 und 4.4) lassen

vermuten, dass dieses Material nicht der klassischen chemischen Aufbereitungsprozedur nach der Detonationssynthese unterzogen wurde und keine der üblicherweise vorhandenen funktionellen Gruppen trägt. Ob nur das allein zur Vermeidung der Aggregation der Partikel beiträgt, kann wegen fehlender Angaben des Herstellers nicht eindeutig geklärt werden.

Die Abbildungen 4.13 und 4.14 zeigen Materialkontrastaufnahmen, die durch Detektion von Rückstreuerelektronen aus tieferen Probenschichten im EsB-Modus erzeugt wurden. Aufnahmen mit dem EsB-Detektor liefern Informationen darüber, ob das Probenmaterial aus leichten oder schweren Elementen besteht. Schwerere Elemente mit höheren Ordnungszahlen werden heller als leichtere mit niedrigeren Ordnungszahlen abgebildet, da sie die Elektronen stärker reflektieren. Dieser Effekt wird als Ordnungszahl- oder Z-Kontrast bezeichnet. ND bestehen aus Kohlenstoff (Ordnungszahl 6) und werden im EsB-Modus deshalb dunkler als das Silizium-Substrat (Ordnungszahl 14) abgebildet.

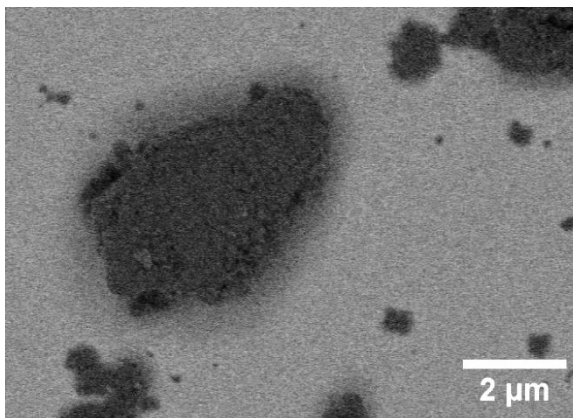


Abb. 4.13: ND (PC)-Aggregate im EsB-Modus (10.000x).

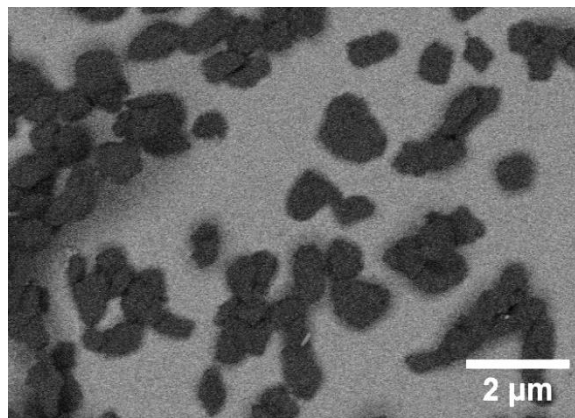


Abb. 4.14: ND (S)-Partikel im EsB-Modus (10.000x).

Bei Kohlenstoffmaterialien lässt sich mittels REM nicht feststellen, aus welchem Allotrop des Kohlenstoffs diese bestehen, d. h. ob es sich dabei um Diamant oder Graphit handelt. Um diese Frage zu klären, müssen andere Methoden, wie z. B. die Röntgendiffraktion oder TEM eingesetzt werden. Im Abschnitt 4.2.3 werden TEM-Aufnahmen beider Diamantpulver gezeigt, aus denen auch die Zusammensetzung der Proben aus verschiedenen Kohlenstoffallotropen ersichtlich ist.

Aufgrund der geringen Größe von ND aus der Detonationssynthese gehört die REM nicht zu den üblicherweise angewandten Untersuchungsmethoden für dieses Material. Für die außergewöhnlich großen ND (S)-Partikel können jedoch aufschlussreiche Informationen bereitgestellt werden. Neben der Form betrifft das vor allem die Größe, aber auch die Größenverteilung der Diamantpartikel. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die gesinterten Partikel keiner Aggregation unterliegen. In Abbildung 4.15 sind diese nochmals in höherer Vergrößerung dargestellt und drei Partikel ausgemessen, die eine Größe von etwa 689, 595 und 623 nm aufweisen.

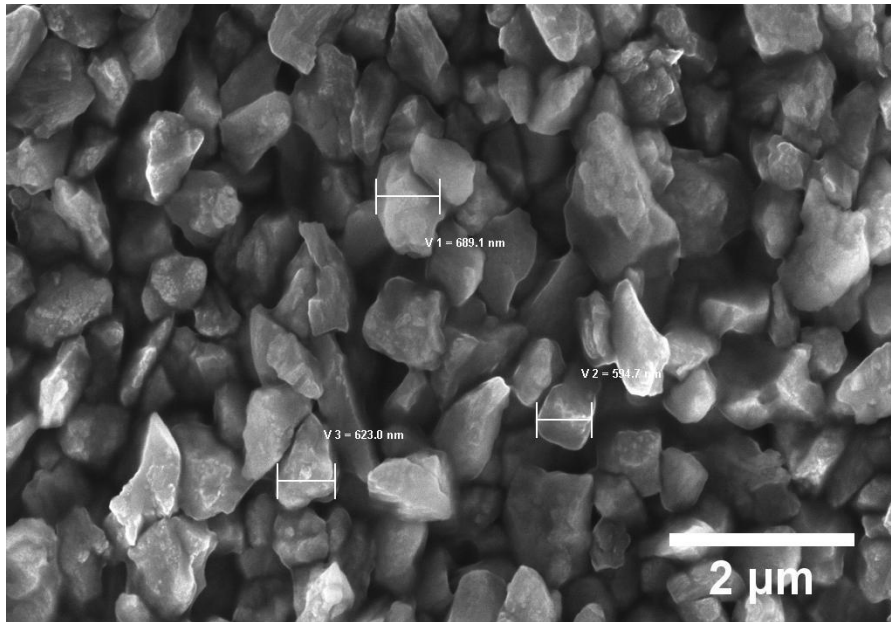


Abb. 4.15: REM-Aufnahme von ND (S) mit Größenangaben von drei Einzelpartikeln.

Von oben nach unten: 689,1 nm; 594,7 nm; 623,0 nm (12.000x).

4.2.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die nachfolgend gezeigten Ergebnisse stellen eine rein qualitative Analyse der Proben dar. Der in allen Spektren ursprünglich vorhandene Berylliumpeak bei 0,108 keV (in den gezeigten Darstellungen „abgeschnitten“), resultiert aus der Streuung von Elektronen am Berylliumfenster des Detektors. Derartige Peaks sind nicht probenspezifisch und treten in zahlreichen Untersuchungen auf. Die EDX-Spektren in den Abbildungen 4.16 bis 4.18 entsprechen den Originaldaten, weshalb im Hintergrund die Bremsstrahlung sichtbar ist. Neben den beiden Proben wurde auch das Substrat, eine Kohlenstofffolie, auf seine elementare Zusammensetzung untersucht (Abb. 4.16, Tab. 4.2). Wie aus dem Spektrum abgeleitet werden kann, enthält diese Folie außer Kohlenstoff (0,282 keV) auch die Elemente Sauerstoff (0,527 keV), Natrium (1,048 keV) und Schwefel (2,307).

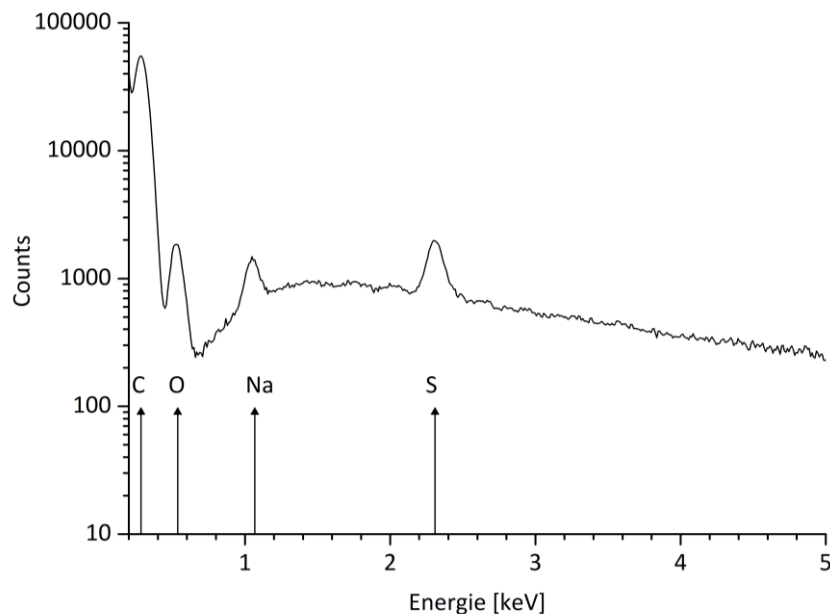


Abb. 4.16: EDX-Spektrum des Substrates Kohlenstoffolie.

Tab. 4.2: Photonenenergien von Elektronen: Vergleich der Messwerte vom Substrat Kohlenstoffolie mit Tabellenwerten aus [027].

Element	C	O	Na	S
Ordnungszahl	6	8	11	16
Photonenenergie [keV], Messwerte	$K\alpha_1 = 0,282$	$K\alpha_1 = 0,527$	$K\alpha_1/\alpha_2 = 1,048$	$K\alpha_1/\alpha_2 = 2,307$
Photonenenergie [keV], Tabellenwerte	$K\alpha_1 = 0,277$	$K\alpha_1 = 0,525$	$K\alpha_1 = 1,041$ $K\alpha_2 = 1,041$ $K\beta_1 = 1,071$	$K\alpha_1 = 2,308$ $K\alpha_2 = 2,307$ $K\beta_1 = 2,464$

Bei der Untersuchung von ND (PC) (Abb. 4.17, Tab. 4.3) wurden neben Kohlenstoff (0,285 keV) und Sauerstoff (0,526 keV) die Elemente Chlor und Silizium nachgewiesen. Der durch Chlor verursachte Peak bei 2,613 keV sowie der Siliziumpeak bei 1,743 keV sind $K\alpha$ -Übergängen zuzuordnen. Durch die Fixierung des Materials auf einer Kohlenstoffolie konnte – im Gegensatz zu einer früheren Untersuchung auf einem Siliziumsubstrat – nachgewiesen werden, dass ND (PC) auch Silizium enthalten. Diese Peaks waren vorher dem Substrat zugeordnet worden.

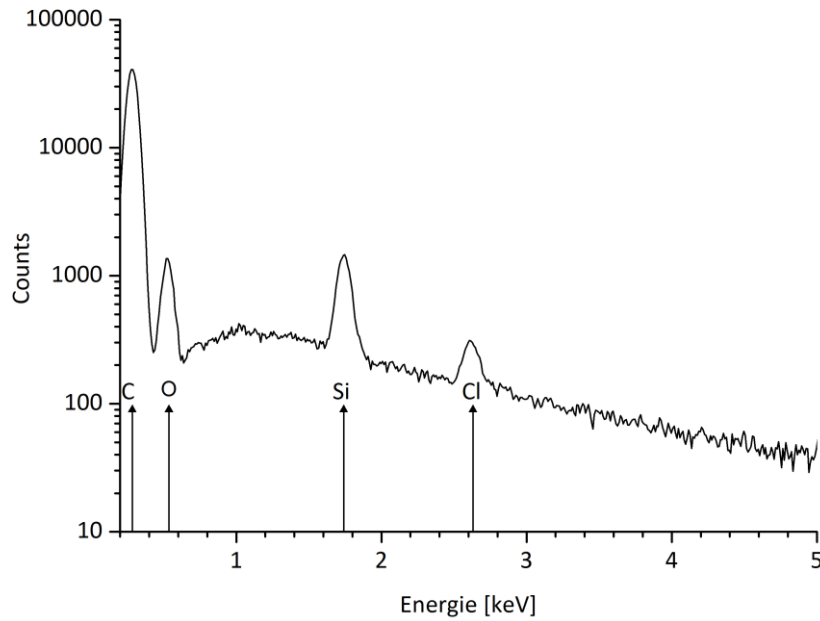


Abb. 4.17: EDX-Spektrum von ND (PC).

Tab. 4.3: Photonenenergien von Elektronen: Vergleich der Messwerte von ND (PC) mit Tabellenwerten aus [027].

Element	C	O	Si	Cl
Ordnungszahl	6	8	14	17
Photonenenergie [keV], Messwerte	$K\alpha_1 = 0,285$	$K\alpha_1 = 0,526$	$K\alpha_1/\alpha_2 = 1,743$	$K\alpha_1/\alpha_2 = 2,613$
Photonenenergie [keV], Tabellenwerte	$K\alpha_1 = 0,277$	$K\alpha_1 = 0,525$	$K\alpha_1 = 1,740$ $K\alpha_2 = 1,739$ $K\beta_1 = 1,836$	$K\alpha_1 = 2,622$ $K\alpha_2 = 2,621$ $K\beta_1 = 2,816$

Das Spektrum von ND (S) zeigt außer Kohlenstoff (0,290 keV) und Sauerstoff (0,534 keV) auch das Vorhandensein von Natrium und Schwefel an (Abb. 4.18, Tab. 4.4). Die Messwerte für die beiden letztgenannten Elemente liegen bei 1,056 keV und 2,303 keV, was den jeweiligen $K\alpha$ -Übergängen entspricht. Während Sauerstoff in geringen Prozentsätzen ein gewöhnlicher Bestandteil von ND-Pulvern ist, sind Schwefel und Natrium möglicherweise dem Substrat zuzuordnen. Wie aus der nachfolgenden Diskussion hervorgeht, können diese Elemente jedoch auch Kontaminationen aus der Isolation, Reinigung, Modifikation oder Lagerung des Materials darstellen. Aus dem Spektrum lässt sich weiterhin ableiten, dass die Probe keine metallischen Verunreinigungen enthält. Diese Aussage gilt mit der Einschränkung, dass der tatsächliche Anteil an metallischen Verunreinigungen nicht mehr als etwa zwei Gewichtsprozent beträgt. Dieser Wert ist auf die Empfindlichkeit der EDX-Methode zurückzuführen, mit der sich geringere Anteile in der Probe nicht nachweisen lassen.

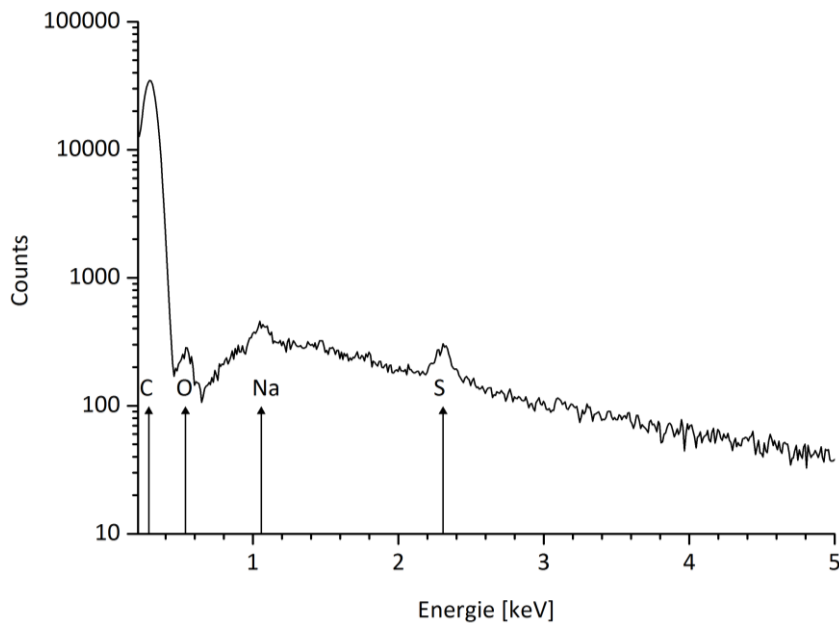


Abb. 4.18: EDX-Spektrum von ND (S).

Tab. 4.4: Photonenenergien von Elektronen: Vergleich der Messwerte von ND (S) mit Tabellenwerten aus [027].

Element	C	O	Na	S
Ordnungszahl	6	8	11	16
Photonenenergie [keV], Messwerte	$K\alpha_1 = 0,290$	$K\alpha_1 = 0,534$	$K\alpha_1/\alpha_2 = 1,056$	$K\alpha_1/\alpha_2 = 2,303$
Photonenenergie [keV], Tabellenwerte	$K\alpha_1 = 0,277$	$K\alpha_1 = 0,525$	$K\alpha_1 = 1,041$ $K\alpha_2 = 1,041$ $K\beta_1 = 1,071$	$K\alpha_1 = 2,308$ $K\alpha_2 = 2,307$ $K\beta_1 = 2,464$

Elemente aus den Substraten können unter bestimmten Umständen auch bei der Untersuchung von darauf fixierten Proben nachgewiesen werden. Ausschlaggebend dafür ist die Lage des Probenmaterials: Bedeckt es das Substrat vollständig, kann keine Anregung seiner Atome durch den Elektronenstrahl erfolgen. In diesem Fall werden keine Elemente aus dem Substrat nachgewiesen. Bei unvollständiger Abdeckung mit Probenmaterial können dagegen Elektronen bis zum Substrat vordringen und dessen Atome anregen. Infolgedessen werden auch Elemente aus dem Substrat angezeigt.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt auf der Grundlage des X-Ray Data Booklets [027], in dem die Photonenenergien der einzelnen Elemente mit der Art des Überganges angegeben sind. Nicht alle dieser Übergänge sind auch als Einzelpeaks sichtbar, wie z. B. die $K\beta_1$ -Übergänge des Natriums oder des Siliziums. Deren Werte liegen so nahe an den $K\alpha$ -Übergängen, dass eine getrennte Darstellung nicht möglich ist.

Die hier mit Hilfe der Röntgenspektroskopie durchgeführte Elementanalyse liefert Informationen zur Reinheit der Materialien. Wie unter 2.1 beschrieben, umfasst die Erzeugung von Detonationsdiamanten mehrere Prozessstufen, von denen jede den Eintrag weiterer Elemente in das ND-Pulver zur Folge haben kann. So ist z. B. nach Aussage von Dr. A. Antipov (Plasmachem Berlin) Silizium in ND-Pulvern aus der Detonationssynthese nicht ungewöhnlich, da das Element in den für die Herstellung verwendeten Sprengstoffen enthalten ist. Für die Erzeugung von ND-Pulver benutzte Sprengstoffe stammen zum großen Teil aus Munitionsrückständen, weshalb ihre Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Herkunft variiert.

Bereits bei der Entstehung der Diamantpartikel während der Detonationssynthese erweist sich das Material aus der Reaktionskammer, den Kühlmitteln, den Sprengstoffen und dem Zünder als Kontaminationsquelle. Während aus den Reaktorwänden Metalle wie Eisen, Mangan, Molybdän und Wolfram sowie Silizium abgetrennt werden, enthalten Kühlmittel wie Wasser und Eis die Elemente Kalzium und Magnesium. Den Zündern entstammen vor allem Blei, Barium, Antimon, Aluminium, Kupfer, Quecksilber und Silber. Im Isolations- und Reinigungsprozess werden einerseits bestehende Verunreinigungen, insbesondere Metalle, entfernt, andererseits jedoch weitere Elemente in das ND-Pulver eingebracht. Dazu gehören Chrom, Mangan und Schwefel aus den eingesetzten Oxidationsmitteln, Silber und Cer aus den Katalysatoren sowie Bor aus den Inhibitoren des Oxidationsprozesses. Der Aufbereitung werden Verunreinigungen durch Ultraschallbehandlung wie Titan, Vanadium, Aluminium, Molybdän und Wolfram bzw. durch Mahlkörper wie Zirkonium, Yttrium, Hafnium, Silizium, Aluminium und Magnesium zugeordnet. Bei dispergierten Partikeln werden zur Aufrechterhaltung der Stabilität von ND-Suspensionen Elektrolyte zugesetzt, die ihrerseits Chlor, Natrium und Kalium enthalten. Schließlich können sogar noch bei der Lagerung des Materials Verunreinigungen entstehen. Dabei kann es sich um Kontaminationen mit Zinn, Kupfer oder Zink handeln, aber auch um solche, die durch Lagerung in Glasgefäßen zustande kommen. Im Labor verwendete Glaswaren sind zum großen Teil aus Borosilikatglas hergestellt, das aus Oxiden von Kalium, Natrium, Bor und Silizium besteht [MTPN14].

Bisher erforderten die drei hauptsächlichen Anwendungen von ND im industriellen Maßstab – als Schleif- und Poliermittel, Beschichtung für Metalle und Additiv in Schmiermitteln – keine Beachtung der elementaren Zusammensetzung. Mit dem Einsatz von ND in weiteren Anwendungsfeldern wie z. B. als stationäre Phase in der HPLC, als Adsorbens für die Isolation von Biomolekülen, in der Biosensorik, als Komponenten in chirurgischen Implantaten oder Substrat für den Wirkstofftransport ändern sich die Anforderungen an die Reinheit des Materials. Für diese Applikationen können die Art der Kontamination und ihre Konzentration von entscheidender Bedeutung sein [MTPN14].

Zur Erhebung zuverlässiger Daten in Bezug auf Verunreinigungen untersuchten MITEV *et al.* [MTPN14] eine Reihe kommerzieller Proben von Detonationsdiamanten, HPHT-Diamanten und

Detonationsruß hinsichtlich ihres Reinheitsgrades. Zu dessen Beurteilung dienen üblicherweise zwei Parameter: Der Kohlenstoffgehalt und die Menge der nicht brennbaren Rückstände. Neben den Angaben der Hersteller zur elementaren Zusammensetzung sind zusätzliche eigene Untersuchungen von großem Wert zur Beurteilung der Qualität eines Materials. Die Autoren setzten dafür die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ein, womit in den untersuchten Proben 55 Elemente mit Konzentrationen über dem Hintergrundniveau detektiert wurden. Von diesen trugen 23 zu mehr als 99,8 % der Verunreinigungen bei und wurden als Marker für die Beurteilung der Reinheit der Proben bestimmt. Unter den analysierten Proben befand sich auch das in dieser Arbeit verwendete ND-Pulver PL-D-G01 von Plasmachem, in dem die Autoren Eisen, Natrium, Bor und Aluminium nachwiesen [MTPN14].

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden in ND (PC) außer Kohlenstoff und Sauerstoff lediglich Silizium und Chlor nachgewiesen. Mögliche Ursachen für die voneinander abweichenden Ergebnisse sind der unterschiedliche Reinheitsgrad der Chargen und eine geringere Nachweisempfindlichkeit des EDX-Verfahrens gegenüber der ICP-MS.

Im Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen sind ND (PC) mit Silizium und Chlor, ND (S) dagegen mit Natrium und Schwefel verunreinigt. Folgt man der Zuordnung von MITEV *et al.* [MTPN14], beruhen diese Kontaminationen auf dem Materialeintrag aus der Reaktionskammer während der Detonationssynthese (Silizium), aus der Reinigung mit Oxidationsmitteln (Schwefel), aus Modifikationsprozessen (Chlor, Natrium) oder aus der Lagerung in Aufbewahrungsgefäßen aus Boro-silikatglas (Silizium, Natrium). Silizium kann außerdem bereits im Sprengstoffmaterial für die Detonation enthalten sein.

4.2.3 Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM)

An dieser Stelle werden die Ergebnisse der TEM-Untersuchungen von ND (PC) (Abb. 4.19 bis 4.29) und ND (S) (Abb. 4.30 bis 4.44) vorgestellt.

ND (PC): Aus den Abbildungen 4.19 und 4.20 ist die Lage der ND-Partikel auf dem Substrat, einer perforierten Folie aus amorphem Kohlenstoff, ersichtlich. Um einen Hintergrund aus amorphem Kohlenstoff auszuschließen, wurden für weitere Aufnahmen Bereiche der Probe ausgewählt, die über die Folie hinausragen (Abb. 4.21 ff). In den Abbildungen 4.21 bis 4.23 werden Aufnahmen in 80.000- bzw. 125.000facher Vergrößerung gezeigt, aus denen bereits die Größe der Primärpartikel ersichtlich ist. Bei 400.000facher Vergrößerung (Abb. 4.24 bis 4.28) können außerdem Bereiche mit graphitischem bzw. amorphem und Diamantkohlenstoff unterschieden werden.

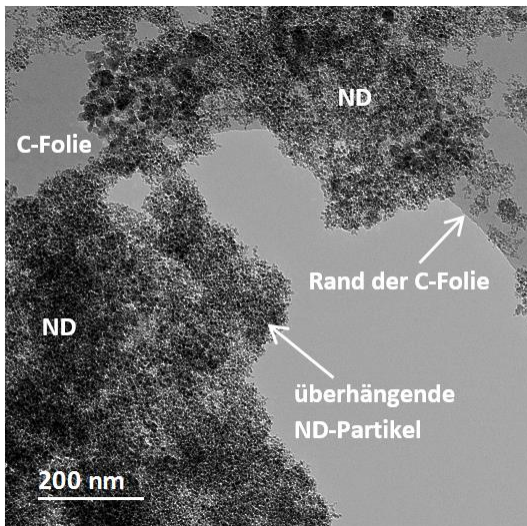


Abb. 4.19: ND (PC) auf C-Folie 20_1 (20.000x).

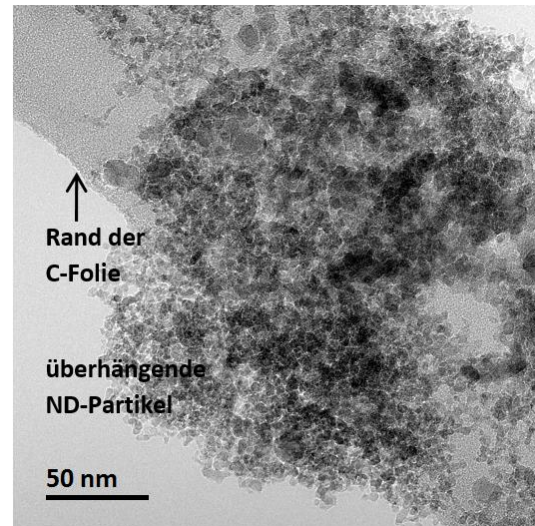


Abb. 4.20: ND (PC) auf C-Folie 80_1 (80.000x).

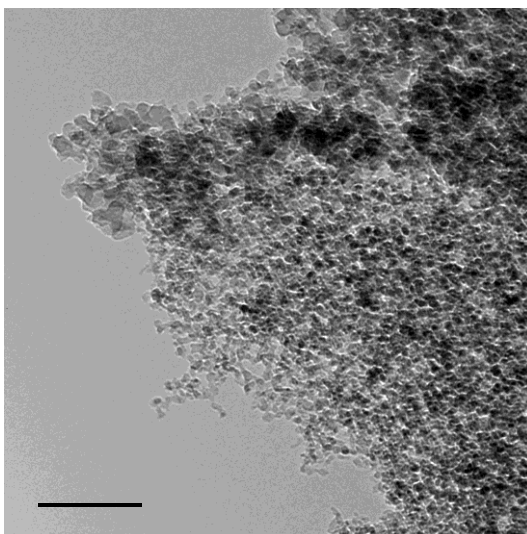


Abb. 4.21: ND (PC), 80_2 (80.000x).

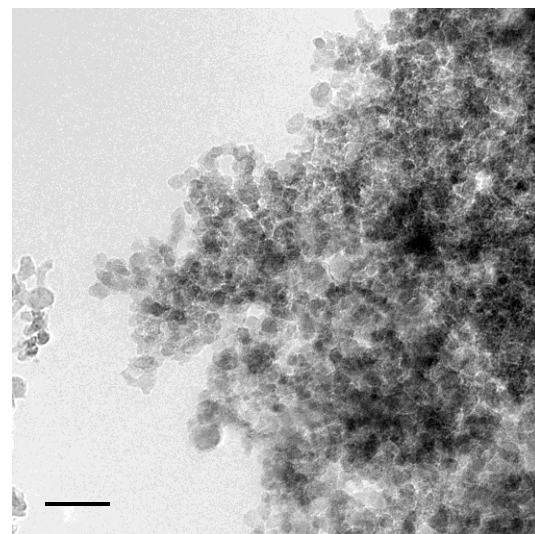


Abb. 4.22: ND (PC), 125_1 (125.000x).

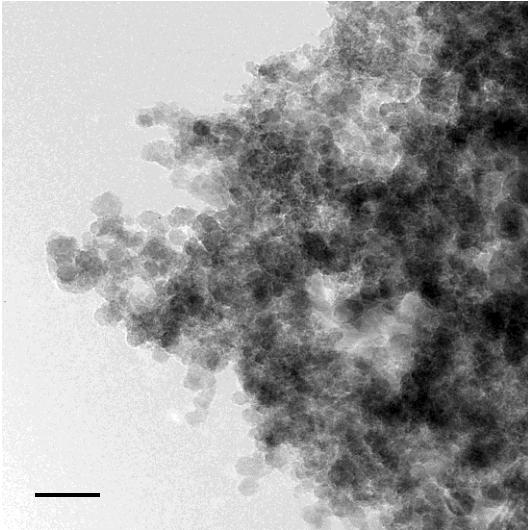


Abb. 4.23: ND (PC), 125_2 (125.000x).

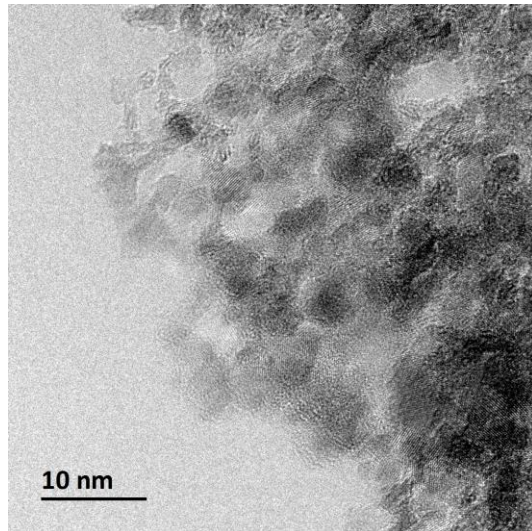


Abb. 4.24: ND (PC), 400_1 (400.000x).

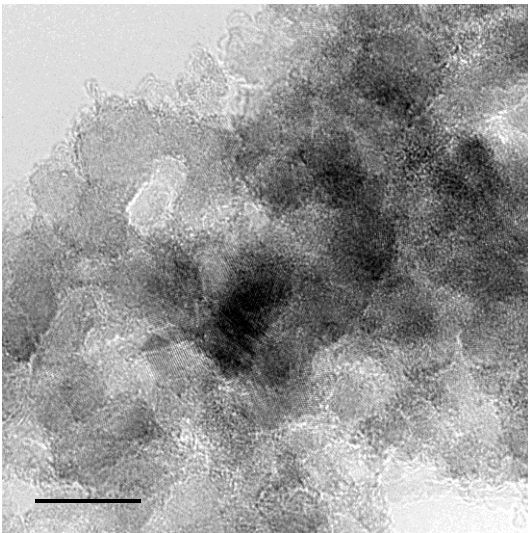


Abb. 4.25: ND (PC), 400_2 (400.000x).

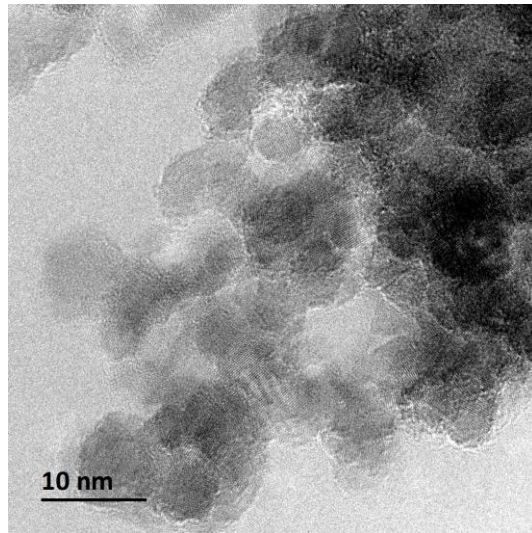


Abb. 4.26: ND (PC), 400_3 (400.000x).

In einem vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung 4.26 wird die Struktur von Diamant gezeigt (Abb. 4.27), wobei deutlich die Abstände der Netzebenen mehrerer Einzelpartikel erkennbar sind.

Nach Auswertung aller Aufnahmen mit 400.000facher Vergrößerung wird festgestellt, dass an den untersuchten Positionen der Probe kaum Graphitstrukturen vorlagen. ND (PC) bestehen demnach überwiegend aus sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff (Diamant), was auf ein Reinigungsverfahren hinweist, bei dem sp^2 -hybridisierter Kohlenstoff weitgehend entfernt wurde. Die Partikelgrößen bewegen sich, wie bei Detonationsdiamanten üblich, im Bereich von etwa 3-10 nm.

ND (S): Zunächst werden Übersichtsbilder gezeigt, die die Lage der Partikel auf dem Substrat und deren Größe verdeutlichen. Bereits daraus ist erkennbar, dass sich die Partikelgrößen im dreistelligen Nanometer- bis einstelligen Mikrometerbereich bewegen. Aus den Aufnahmen mit den höchsten Vergrößerungen ist ersichtlich, dass es sich um ein polykristallines Material mit dicht aneinander gelagerten, „zusammengesinterten“ Einzelkristallen handelt.

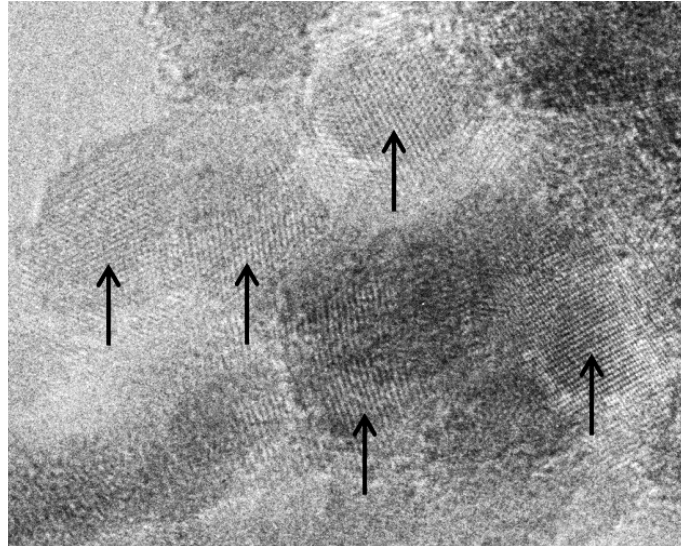


Abb. 4.27: ND (PC), Detail aus Abbildung 4.26: Die Vergrößerung des Bildausschnittes zeigt die parallel verlaufenden Netzebenen der Diamantstruktur anhand verschiedener Einzelpartikel (schwarze Pfeile).

Die Abbildungen 4.30 und 4.31 entstanden im STEM-Modus des TEM, in dem die Diamantpartikel – vergleichbar mit Aufnahmen im Dunkelfeld eines Lichtmikroskopes – hell erscheinen. Die Kohlenstoffolie wird grau, der Hintergrund schwarz abgebildet. Ein Partikel aus dem rechten oberen Bildbereich von Abbildung 4.30 wird vergrößert in Abbildung 4.31 dargestellt (Detail 1). Es ist überdurchschnittlich groß und zeigt die typisch kantige, unregelmäßige Form dieser Detonationsdiamanten. Das in der Mitte von Abbildung 4.30 lokalisierte Diamantpartikel (Detail 2) wird in den Abbildungen 4.32 bis 4.35, wieder im TEM-Modus, in höheren Vergrößerungen gezeigt.

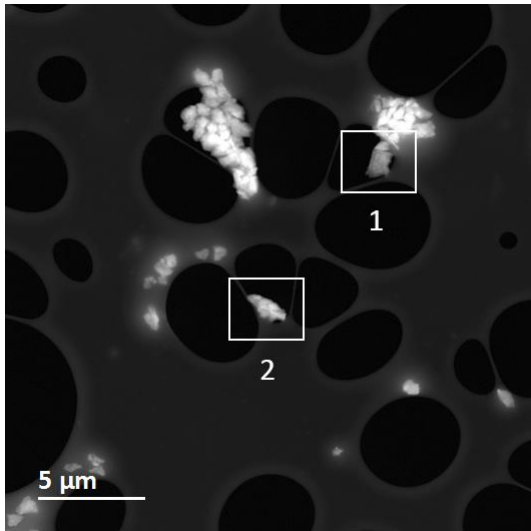


Abb. 4.30: ND (S) auf C-Folie (400x).

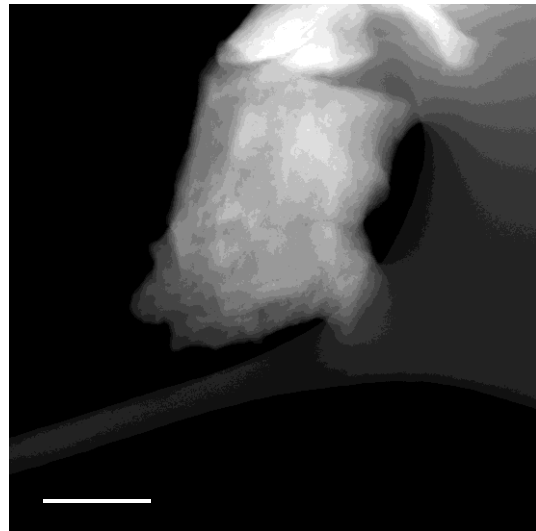


Abb. 4.31: ND (S), Detail 1 aus Abb. 4.30 (40.000x).

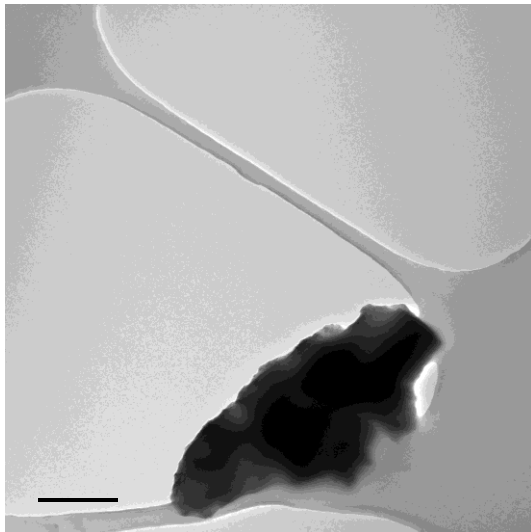


Abb. 4.32: ND (S), Detail 2 aus Abb. 4.30 (6.300x).

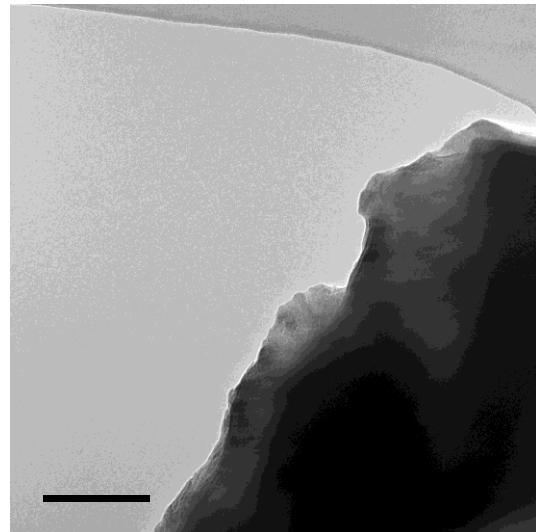


Abb. 4.33: ND (S), Detail 2 (20.000x).

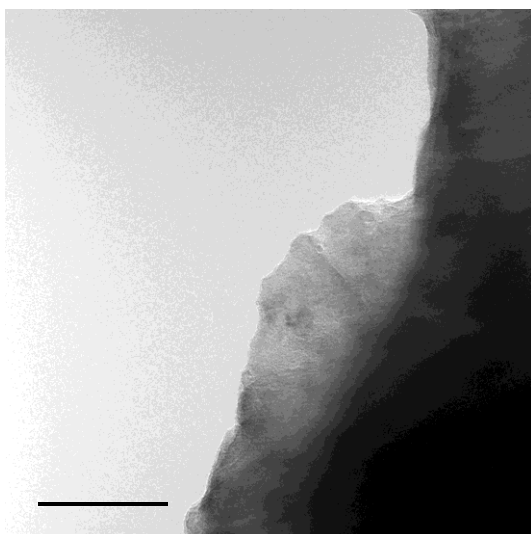


Abb. 4.34: ND (S), Detail 2 (50.000x).

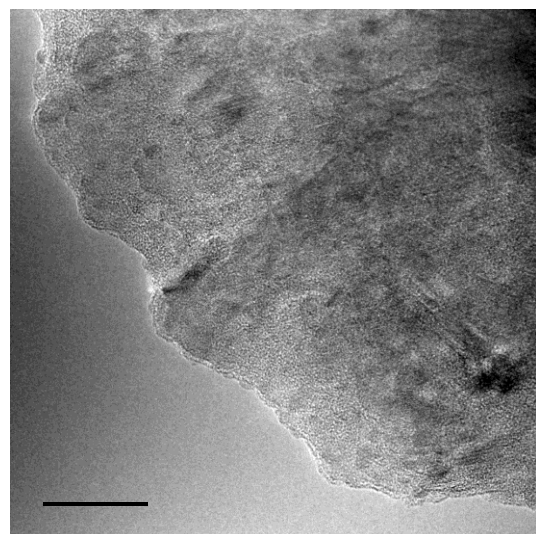


Abb. 4.35: ND (S), Detail 2 (200.000x).

Bereits bei 200.000facher Vergrößerung sind Details in Bezug auf die Struktur des Kohlenstoffs sichtbar (Abb. 4.35). Noch deutlicher ist die Zusammensetzung der Partikel bei 400.000facher Vergrößerung in Abbildung 4.36 zu erkennen: Die Kohlenstoffallotrope Diamant und Graphit sowie amorpher Kohlenstoff liegen hier nebeneinander vor.

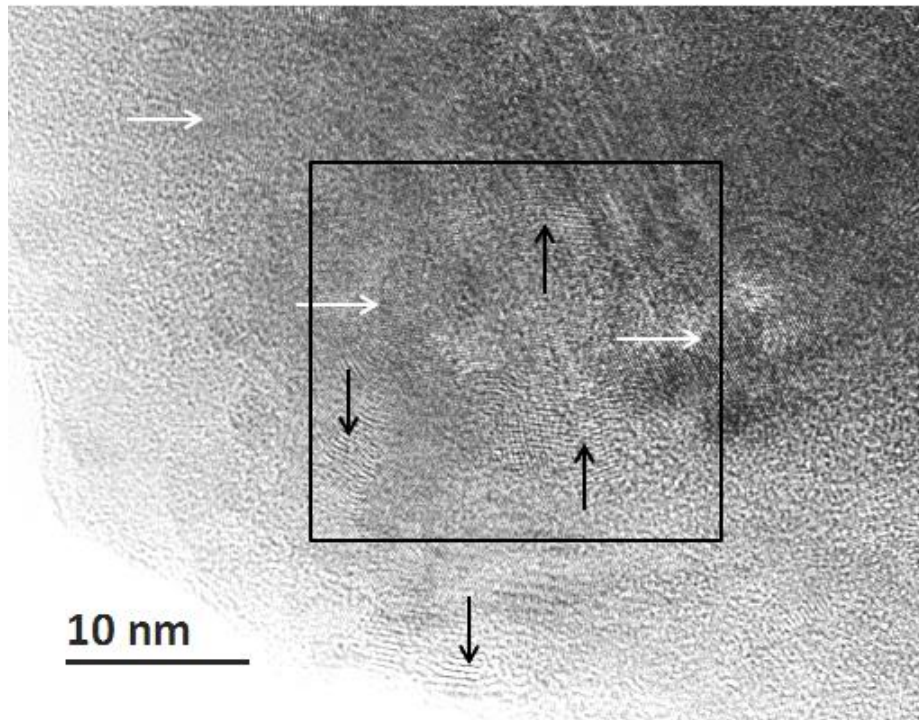


Abb. 4.36: ND (S), Ausschnitt aus Abbildung 4.35 (400.000x). Diamantstruktur (weiße Pfeile), Graphit (schwarze Pfeile) und amorpher Kohlenstoff (vor allem im Randbereich) liegen nebeneinander vor. Die dichte Lage der Einzelpartikel deutet auf das Zusammensintern bei der Detonationssynthese hin. Vergrößerung des eingerahmten Areals in Abbildung 4.37.

Bereiche der Probe mit übereinstimmendem Erscheinungsbild zum Substrat, setzen sich ebenfalls aus amorphem Kohlenstoff zusammen (siehe auch Abb. 4.41), der vor allem im Randbereich des Partikels erkennbar ist (Abb. 4.35 und 4.36). Übertragen auf eine dreidimensionale Struktur, kann daraus auf eine Hülle aus amorphem Kohlenstoff um die Partikel geschlossen werden. Die Struktur des Diamantgitters ist an ihren feinen, parallelen Linien – den Netzebenen – zu erkennen. Die Graphenschichten des Graphits erscheinen dagegen als stärkere wellenförmige Linien mit größeren Abständen zueinander. Der eingerahmte Bildbereich in Abbildung 4.36 wird nochmals vergrößert in Abbildung 4.37 dargestellt.

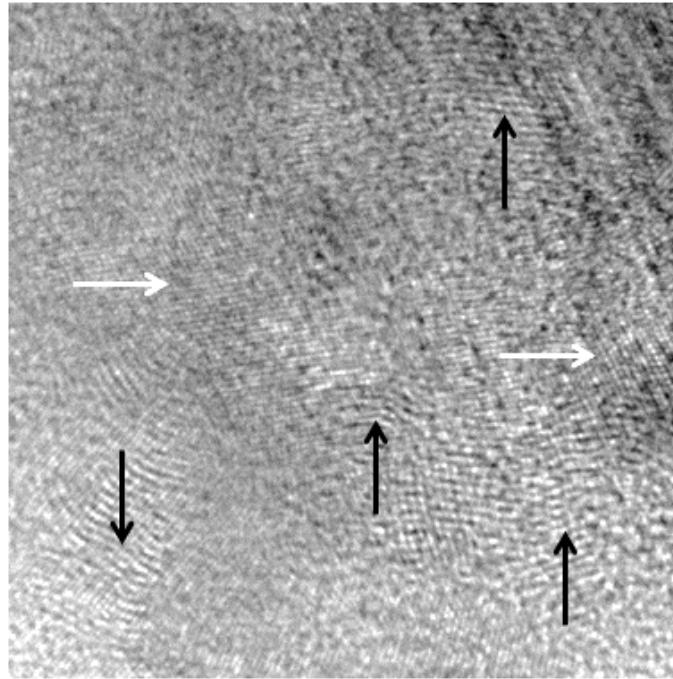


Abb. 4.37: ND (S), Vergrößerung des Bildausschnittes aus Abbildung 4.36. Die Strukturen von Diamant (weiße Pfeile) und Graphit (schwarze Pfeile) sind deutlich voneinander zu unterscheiden.

In den Abbildungen 4.39 bis 4.43 wird die Struktur eines weiteren, außerhalb des Probenbereiches von Abbildung 4.30 befindlichen Partikels gezeigt (Detail 3 in Abb. 4.38). In den Aufnahmen dieses Partikels ist der Randbereich aus amorphem Kohlenstoff, in unmittelbarer Nachbarschaft der Folie, besonders gut sichtbar. In den 400.000fachen Vergrößerungen (Abb. 4.42 und 4.43) sind zudem zahlreiche Primärpartikel in sehr dichter Packung zu beobachten. Deutlicher erkennbar werden diese Strukturen in der nochmaligen Vergrößerung eines Bildausschnittes in Abbildung 4.44.

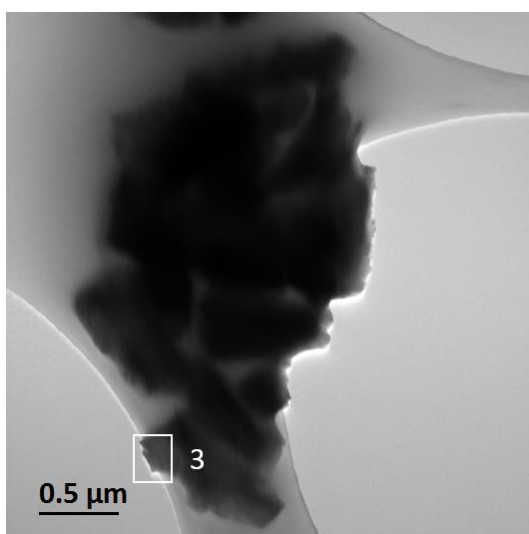


Abb. 4.38: ND (S), Detail 3 (6.300x).

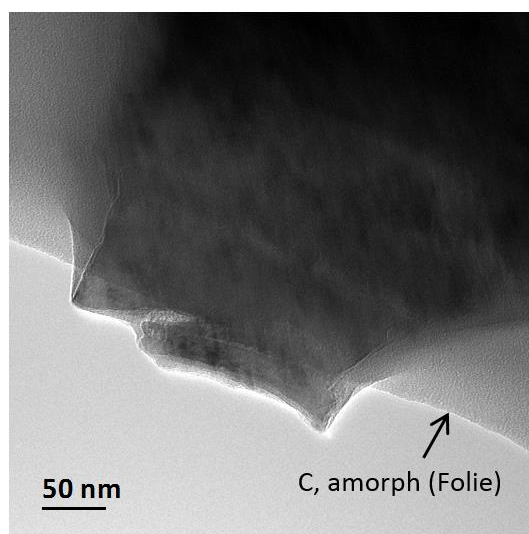


Abb. 4.39: ND (S), Detail 3 aus Abb. 4.38 (50.000x).

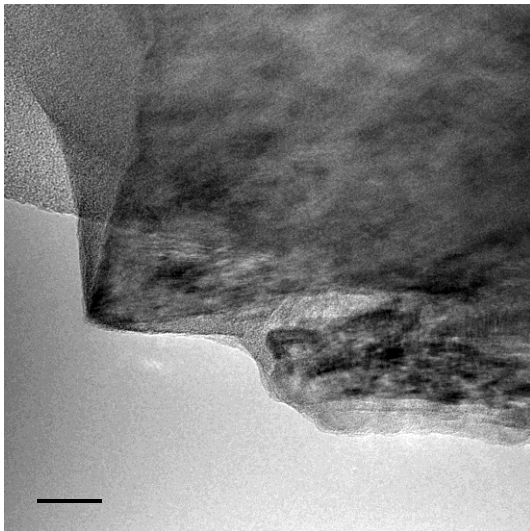


Abb. 4.40: ND (S), Detail 3 (125.000x).

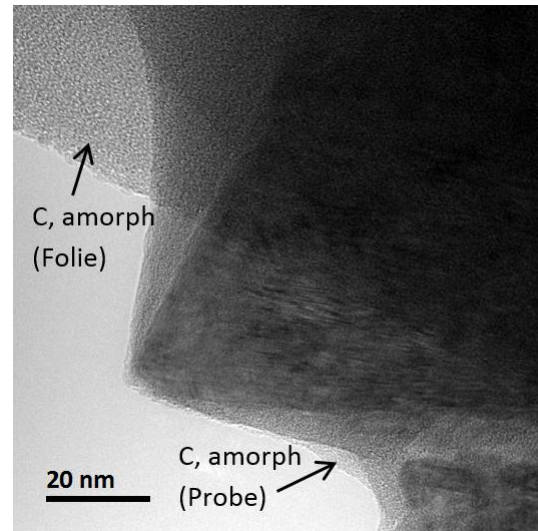


Abb. 4.41: ND (S), Detail 3 (200.000x).

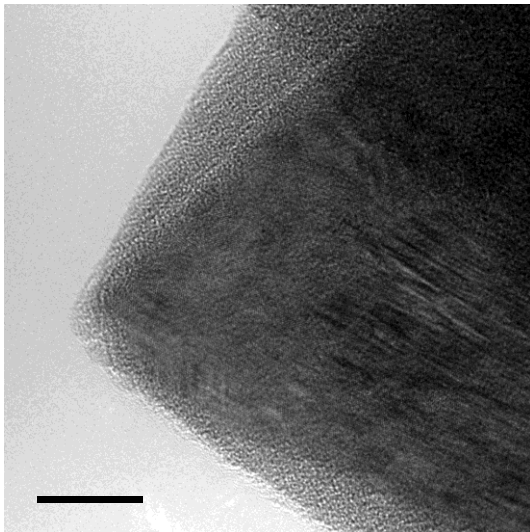


Abb. 4.42: ND (S), Detail 3, 400_1 (400.000x).

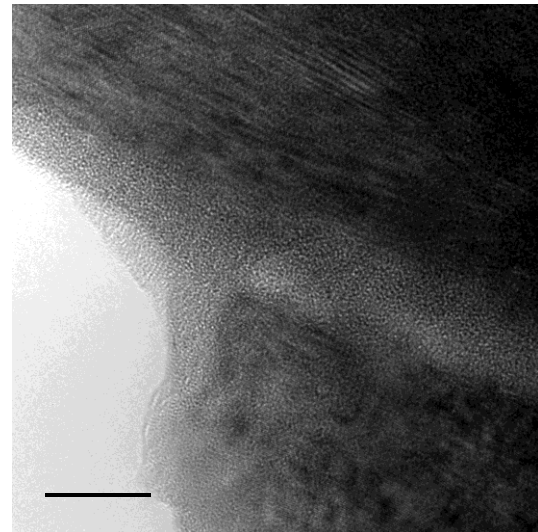


Abb. 4.43: ND (S), 3, 400_2 (400.000x).

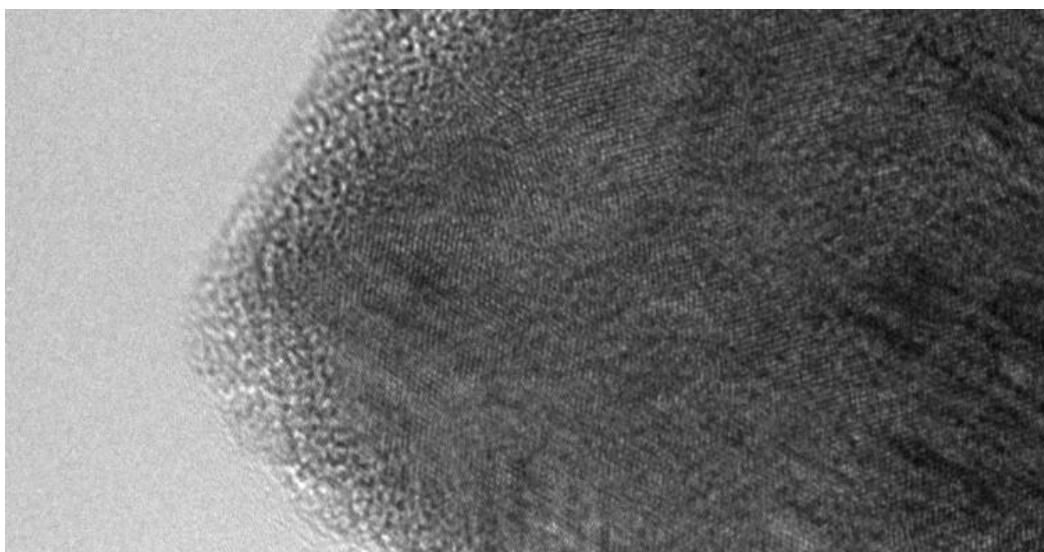


Abb. 4.44: ND (S), Detail aus Abb. 4.42: In der nochmaligen Vergrößerung sind dicht übereinanderliegende Diamant-Strukturen erkennbar, die eine Vielzahl von Primärpartikeln repräsentieren.

Die unter 4.2 vorgestellten Ergebnisse liefern Informationen zu den Materialeigenschaften der beiden untersuchten Proben. Anhand von REM-, EDX- und TEM-Untersuchungen erfolgte die Charakterisierung der Diamantpulver im Hinblick auf Partikelform und -größe, enthaltene Verunreinigungen sowie die Struktur des Kohlenstoffes. Zusammenfassend wird festgehalten, dass es sich bei ND (PC) um ein typisches monokristallines Produkt aus der Detonationssynthese mit nanoskaligen Primärpartikeln und einem gewissen Anteil an graphitischen Strukturen handelt. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen von ND (S) wird abgeleitet, dass es sich um ein polykristallines Material mit amorphen sowie Graphit- und Diamantstrukturen handelt, bei dem sich die Partikelgrößen im dreistelligen Nanometer- bis einstelligen Mikrometerbereich bewegen. Anhand stark vergrößerter TEM-Aufnahmen lässt sich das Zusammensintern der Primärpartikel während des Produktionsprozesses nachvollziehen (Abb. 4.36, 4.37, 4.44, Abschnitt 2.1.2). Aus den Ergebnissen der Elementanalyse wird abgeleitet, dass beide Proben qualitativ kaum Verunreinigungen enthalten. Diese Feststellung gilt mit der Einschränkung, dass das EDX-Verfahren nicht empfindlich genug für die Detektion sehr kleiner Anteile von Elementen in einer Probe ist.

In Bezug auf das Reaktionsverhalten von ND (S) erscheinen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen widersprüchlich zu den im Abschnitt 4.3.1 und 4.4.1 erzielten Ergebnissen. Die den Diamantkern umgebende Hülle aus sp^2 -hybridisiertem Kohlenstoff – hier nachweislich vorhanden – ist chemisch reaktiv und ermöglicht damit die Einführung funktioneller Gruppen an den Partikeloberflächen. Wie eigene FT-IR-Untersuchungen (Ergebnisse nicht gezeigt) und Fluoreszenzaufnahmen belegen, waren Versuche zur Carboxylierung der Oberflächen wahrscheinlich nicht erfolgreich. Deshalb ist die Frage zu stellen, mit welcher Oberflächenbeschaffenheit diese Reaktionsträgheit einhergeht. Vom Hersteller wird lediglich angegeben, dass ein stabiler Oberflächenzustand vorliegt. Zu beachten ist, dass ND (S) aufgrund ihrer Abmessungen nicht mehr als Nanopartikel im engeren Sinn bezeichnet werden können. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, verschiebt sich bei diesen das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen mit abnehmender Partikelgröße immer mehr in Richtung der Oberfläche. Bei ND (S) dominieren dagegen Volumeneigenschaften und der Anteil an Oberflächenatomen ist – ebenso wie die Oberflächenenergie – im Vergleich zu echten Nanopartikeln deutlich reduziert. Diese Eigenschaften tragen zu einer verminderten Reaktivität der Partikel bei.

Die TEM kann weiterhin auch dazu genutzt werden, Informationen über den Netzebenenabstand im Diamantgitter bzw. den Abstand der Graphenschichten im Graphit zu gewinnen. Im Allgemeinen liegen diese Abstände bei etwa 2 Å im Diamantgitter (2 Å [Krü07]; 2,06 Å [KB06]; 1,93 Å [SZB02]) bzw. 3,4 Å zwischen den Graphenschichten (3,5 Å [KB06]; 3,34 Å [SZB02]). In den oben gezeigten Abbildungen sind die größeren Abstände in der Graphitstruktur im Vergleich zum Gitterabstand von Diamant deutlich zu erkennen, jedoch wurden keine eigenen Messungen durchgeführt.

Die folgenden Beispiele aus der Literatur sollen verdeutlichen, dass die TEM auch für weiterführende Untersuchungen an ND eingesetzt werden kann, bzw. zur Bestätigung von Ergebnissen, die durch andere Methoden gewonnen wurden, geeignet ist.

LIANG *et al.* [LOK09] belegten mittels HRTEM die erfolgreiche Deagglomeration von ND-Partikeln, die zuvor einer mehrstündigen BASD-Behandlung unterzogen wurden. Neben einer homogenen Verteilung der Partikel konnte gezeigt werden, dass der mechanische Zerkleinerungsprozess keine signifikante Graphitisierung zur Folge hatte. Hiermit wird belegt, dass außer der Bestimmung der Partikelgrößen und des ZPs auch elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Kontrolle des Erfolges von Deagglomerationsprozessen eingesetzt werden können.

Anhand von TEM-Aufnahmen bestätigten SHIMKUNAS *et al.* [SRL+09] die Adsorption von Insulin an die Oberflächen von ND-Partikeln. Demnach waren ND mit adsorbiertem Insulin von einer zusätzlichen Schicht von etwa 5-10 nm Dicke umgeben, die im Ausgangsmaterial nicht vorhanden war. Diese Untersuchungen weisen – sowohl im Hinblick auf die Aufgabenstellung als auch die angewandten Untersuchungsmethoden – eine hohe Relevanz zu dem in dieser Arbeit behandelten Thema auf. Die Erweiterung des Methodenspektrums durch den Einsatz der TEM zum Nachweis einer erfolgreichen Konjugation zwischen ND und Biomolekülen kann daher als Möglichkeit für künftige Untersuchungen aufgefasst werden.

ZURBUCHEN *et al.* [ZLK+13] setzten die TEM zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von ND-Antikörper-Konjugaten in HeLa-Zellen ein. Die ND wurden mit targetspezifischen Strukturen (Antikörper gegen ein Nucleoporin-Protein, das in die Kernmembran von Kernporen eingebettet ist) funktionalisiert und waren sowohl mit optischen Mikroskopen als auch Elektronenmikroskopen nachweisbar. Als Ergebnis wird eine TEM-Aufnahme präsentiert, in der ein ND-Aggregat auf der Innenseite einer Kernmembran haftet. D. h., dass der ND-Antikörper-Komplex zuvor eine Kernpore passiert und sich an der inneren Seite der Kernmembran angelagert hat. Vergrößerte Aufnahmen des ND-Aggregates zeigen die Netzebenen der Diamantstruktur und belegen damit die tatsächliche Präsenz der Partikel im Inneren des Zellkernes. Infolgedessen stellen die Autoren fest, dass sich die TEM zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion und Lokalisierung von Partikeln innerhalb einer bestimmten Zellregion eignet, was von entscheidender Bedeutung für die Anwendung von ND für den Wirkstofftransport ist. Die soeben geschilderten Untersuchungen weisen deutliche Parallelen zur Arbeit von MKANDAWIRE *et al.* [MPG+09] auf, an der die Autorin der vorliegenden Arbeit beteiligt war. Der Transfektionsnachweis wurde in diesem Fall durch Fluoreszenzmikroskopie erbracht. ZURBUCHEN *et al.* [ZLK+13] weisen darauf hin, dass hierbei keine unabhängige Bestätigung der Ergebnisse mittels TEM oder Röntgendiffraktion erfolgte. Bei weiteren Versuchen zur Einbringung von Konjugaten aus ND und Biomolekülen oder anderen Substanzen in Zellen, könnte die TEM daher als ergänzende Nachweismethode in Betracht gezogen werden.

Schließlich soll noch auf die umfangreichen Untersuchungen von TURNER *et al.* [TLS+09] verwiesen sein, die eine Kombination verschiedener TEM-Techniken zur Determination der Größe, Struktur und Morphologie sowie zur Lokalisierung von Stickstoffverunreinigungen in Detonationsdiamanten nutzten. Hinsichtlich der drei erstgenannten Parameter wurden die Auswirkungen des Temperns bei 300 bzw. 1100 °C und verschiedener Reinigungsmethoden in Bezug auf ein Ausgangsmaterial untersucht. Dessen Partikelgrößen wiesen einen Durchschnitt von 4,4 nm auf, wobei der Diamantkern von einer Monolage graphitischen Materials umgeben war. Die Ergebnisse der Röntgendiffraktion zeigten eine typische Diamantstruktur der Raumgruppe 227. Nach einem moderaten Ausglühen bei 300 °C und der Reinigung mit HNO₃ verringerte sich die Partikelgröße auf 3,8 nm, während gleichzeitig ein Verlust der Graphithülle beobachtet wurde. Die Autoren werten dies als klaren Beweis dafür, dass ND-Kerne nicht zwingenderweise in Koexistenz mit einer graphitischen Hülle vorliegen müssen. Ein weiterer Rückgang der Partikelgrößen wurde nach einem Ausglühen bei 1100 °C registriert. In Abhängigkeit vom Reinigungsverfahren wurden Durchmesser von 3,6 (HNO₃/H₂SO₄) bzw. 3,2 nm (K₂Cr₂O₇/H₂SO₄) bei insgesamt kleineren Diamantkernen erreicht, wobei im ersten Fall keine Graphithülle erhalten blieb. Die Reinigung mit einem Gemisch aus HNO₃ und H₂SO₄ wird daher als effizienter beurteilt. Die Lokalisierung von Stickstoffverunreinigungen sowie die Ermittlung der Konzentration von Stickstoff erfolgte über die Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS). Mit dieser Studie wird gezeigt, wie die Ergebnisse bildgebender Verfahren die künftige Auswahl von Methoden zur Reinigung bzw. Graphitisierung von ND durch Ausglühen bei variablen Temperaturen unterstützen, bzw. zur Elementanalyse durch EDX beitragen können.

4.3 Fourier-Transform-Infrarot- (FT-IR-) Spektroskopie

Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der FT-IR-Untersuchungen von ND und ND-DNA-Konjugaten dargestellt und diskutiert. Diese umfassen Mittelwertspektren aus je drei Messungen des entsprechenden Materials, einschließlich der Zuordnung von Schwingungen zu den auftretenden Banden. Die verschiedenen Schwingungsarten werden zum Teil mit folgenden Symbolen abgekürzt: ν = Streck-, δ = Deformations-, γ = Scher- und ω = Kippschwingung. Als tiefgestellte Abkürzungen werden verwendet: s = symmetrisch, as = asymmetrisch, ip = in plane (in der Ebene), oop = out of plane (aus der Ebene). Spektrenvergleiche sind überwiegend im Anhang 4 aufgeführt.

Der Präsentation der Ergebnisse werden zum besseren Verständnis einige Informationen vorangestellt. Im Bereich der Streckschwingungen von Einfachbindungen ($4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) ist in fast allen Spektren eine breite, mehr oder weniger intensive Bande zu beobachten, die rechtsseitig häufig eine Schulter oder Nebenbande – zum Teil mit mehreren Maxima – trägt. Diese Bande ist den O–H-Streckschwingungen von Carbonsäuren ($3550\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) oder Alkoholen und Phenolen ($3650\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$) bzw. den N–H-Streckschwingungen von Aminen (primär: zwei Banden zwischen $3550\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$, sekundär: eine Bande zwischen $3450\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) oder Amiden (primär: zwei Banden zwischen 3550 und 3180 cm^{-1} , sekundär: eine Bande zwischen 3450 und 3100 cm^{-1}) zuzuordnen [Gre02]. Außerdem kommen O–H-Streckschwingungen aus adsorbiertem Wasser in Frage.

Die Schulter oder Nebenbande um 2900 cm^{-1} resultiert aus C–H-Streckschwingungen von Methylen ($-\text{CH}_2$) und Methylgruppen ($-\text{CH}_3$). Jede der vier möglichen Schwingungen ist durch einen engen Wellenzahlbereich definiert: $2962 \pm 10\text{ cm}^{-1}$ für $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $2926 \pm 10\text{ cm}^{-1}$ für $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2872 ± 10 für $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ und 2855 ± 10 für $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ [Smi99, Gre02, GG03].

Banden bei niedrigeren Wellenzahlen, einschließlich des Fingerprintbereiches bis etwa 700 cm^{-1} , liegt eine größere Anzahl möglicher Schwingungen zugrunde, weshalb sie differenzierter zu betrachten sind und für jedes Spektrum einzeln ausgewertet werden. Die im Bereich von ca. $1780\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ auftretenden C=O-Streckschwingungen können u. a. Ketonen, Ethern, Lactonen, Carbonsäuren, Aldehyden oder Estern zugeordnet werden [Gre02], wobei die Schwingungen von Estergruppen – in Abhängigkeit vom Typ des Esters – um einen Wert von 1740 cm^{-1} variieren [Gre02, CDW90]. Bei Lactonen können diese Schwingungen auch noch bei höheren Wellenzahlen, bis etwa 1840 cm^{-1} , auftreten [Gre02]. C=O-Streckschwingungen in Carbonsäureanhydriden umfassen zwei scharfe Banden, von denen zumindest eine oberhalb 1800 cm^{-1} erscheint. Da solche Maxima in den hier gezeigten Spektren nicht auftreten, ist die Präsenz von Säureanhydriden eher unwahrscheinlich. Auch das Vorkommen weiterer Verbindungen kann anhand fehlender diagnostischer Banden wahrscheinlich ausgeschlossen werden. So fehlen z. B. die für Aldehyde typische Bande um 1390

cm^{-1} , als auch die beiden Schlüsselbanden bei 2900 und 2680 cm^{-1} . Im Wellenzahlbereich zwischen 1650 und 1600 cm^{-1} treten nur wenige Schwingungen sauerstoffhaltiger Gruppen auf. Dazu gehören mit C=C-Doppelbindungen assoziierte C–O-Gruppen, mit Stickstoff assoziierte Sauerstoffatome (NO_2) oder C=O-Gruppen von Amiden. Darüber hinaus absorbieren in diesem Abschnitt des mittleren Infrarots vor allem N–H-Gruppen von Aminen ($\delta(\text{N–H})_{\text{ip}}$ [Gre02] bzw. $\gamma(\text{NH}_2)$ [Smi99]). Banden zwischen 1650 und 1620 cm^{-1} können aber auch auf Carboxylate (1650-1540 cm^{-1} [Gre02, Smi99]) oder O–H-Scherschwingungen von Wassermolekülen [Smi99] zurückgeführt werden. Streck-schwingungen von C–O- bzw. C–O–C-Bindungen sind im Bereich von ca. 1300-1000 cm^{-1} lokalisiert und auf Ether, Alkohole und Phenole, Carbonsäuren, Epoxide oder Ester zurückzuführen. Ausnahmen bilden hierbei cyclische Ether, die auch noch bei niedrigeren Wellenzahlen absorbieren. Unterhalb 700 cm^{-1} sind generell nur noch wenige Schwingungen, z. B von Halogenverbindungen oder C–H-Gruppen in Alkenen und aromatischen Ringen, zu verzeichnen. Relevant für die vorliegenden Untersuchungen dürften jedoch besonders die C–O–H-Scherschwingungen von Alkoholen und Phenolen sein, die im Bereich von 700-400 cm^{-1} auftreten. Schwingungen bei Wellenzahlen von $650 \pm 50 \text{ cm}^{-1}$ werden nach SMITH [Smi99] durch O–H-Deformationen verursacht. Grundsätzlich ist außerdem zu beachten, dass durch die oberflächennahe Anbindung der funktionellen Gruppen an die Partikel Bandenverschiebungen erfolgen können.

4.3.1 Nanodiamanten: Originalmaterial und modifizierte Nanodiamanten

In diesem Abschnitt erfolgt die Auswertung der IR-Spektren der ND-Originalmaterialien, sowie der carboxylierten, aminomodifizierten und hydroxylierten ND.

4.3.1.1 Nanodiamanten – Originalmaterial

Zuerst werden die IR-Spektren der Originalmaterialien ND (PC), ND (S) sowie einer aus ND (PC) hergestellten kolloidalen ND-Suspension ausgewertet.

ND (PC) – Abbildung 4.45

Das hier untersuchte ND-Pulver stellt eines der Ausgangsmaterialien für die chemischen Modifikationen dar. Es ist von einer größtenteils unbekanntem, inhomogenen Oberflächenbelegung der Partikel auszugehen. Nach Auskunft des Herstellers sind Carboxylgruppen und, in geringerem Umfang, auch Lactone vorhanden.

Im mittleren Bereich des Spektrums befindet sich eine starke Doppelbande mit Maxima bei 1730 cm^{-1} , verursacht durch $\nu(\text{C=O})$, und 1626 cm^{-1} . Das zuletzt genannte Maximum kann auf die Präsenz

von Wasser oder, weniger wahrscheinlich, von Aminen zurückgeführt werden. Das Spektrum wird dominiert von einer durch $\nu(\text{C-O})$ verursachten Bande bei 1106 cm^{-1} , der eine Schulter bei 1195 cm^{-1} (C-O-H-Deformation) aufsitzt. Weiterhin kommen dafür auch Streckschwingungen von C-O-C - oder C-N -Gruppen in Frage. Im Fingerprintbereich ist die Bande bei 668 cm^{-1} hervorzuheben, die an dieser Stelle auch in weiteren Spektren auftaucht.

- FT-IR: 3391 cm^{-1} $\nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, 2978 cm^{-1} $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1730 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1626 cm^{-1} $\delta(\text{O-H})/(\delta(\text{N-H}))_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)$, 1195 cm^{-1} $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-N})$, 1106 cm^{-1} $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-N})$, 788 , 668 , 453 , 401 cm^{-1} .

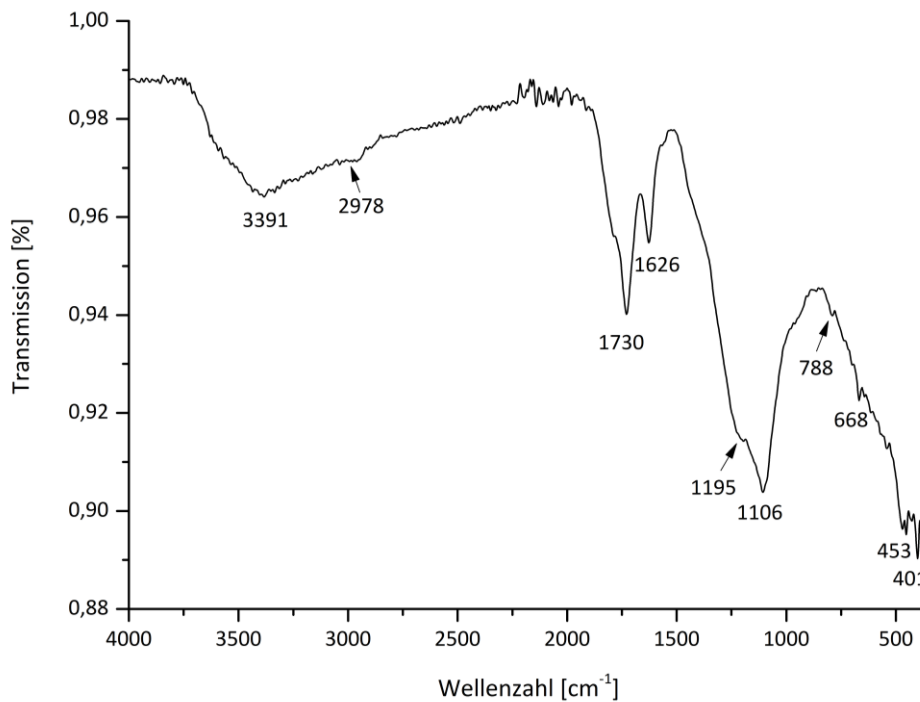


Abb. 4.45: FT-IR-Spektrum von ND (PC).

Die Bande bei 1626 cm^{-1} liegt im Bereich der Schwingungen von N-H -Gruppen primärer und sekundärer Amine. Da stickstoffhaltige Gruppen auf den Oberflächen nicht modifizierter ND-Partikel weitgehend fehlen (Abschnitt 2.1.5), handelt es sich hierbei wahrscheinlicher um Schwingungen der O-H -Gruppen von Wassermolekülen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Ergebnisse der EDX-Untersuchungen im Abschnitt 4.2.2 keinen Hinweis auf Stickstoff liefern. Dagegen sind für ND (PC) Schwingungen von Bindungen mit Silizium und Chlor, wie z. B. Si-Cl -Schwingungen, zu erwarten, die zu Banden im Bereich von $650\text{-}460\text{ cm}^{-1}$ führen. Aliphatische C-Cl -Bindungen absorbieren bei $830\text{-}560\text{ cm}^{-1}$ [CDW90]. Aus Abbildung 4.45 ist ersichtlich, dass dementsprechende Banden tatsächlich existieren und daher ebenfalls für die Zuordnung in Frage kommen.

Kolloidale Suspension aus ND (PC) – Abbildung 4.46

Die Doppelbande mit Maxima bei 1744 und 1620 cm^{-1} kann $\nu(\text{C}=\text{O})$ bzw. Schwingungen von N–H- oder O–H-Gruppen als auch Carboxylaten zugeordnet werden. Es folgt eine Absorption bei 1340 cm^{-1} , die auf $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$, $\delta(\text{C}-\text{H})$ oder $\nu(\text{C}-\text{N})$ beruhen kann. Weiterhin kommen hierfür Schwingungen von Carboxylaten in Betracht. Für diese Annahme spricht das Auftreten von zwei Banden im Bereich um 1600 und 1400 cm^{-1} , die damit den asymmetrischen bzw. symmetrischen Streck-schwingungen der anderthalbfachen C–O-Bindungen in Carboxylaten entsprechen würden. Allerdings wäre eine Bande bei 1340 cm^{-1} bereits im Grenzbereich für Carboxylate angesiedelt. Die stärkste Bande des Spektrums bei 1126 cm^{-1} wird durch C–O-Streckschwingungen verursacht.

• FT-IR: 3400 $\nu(\text{O}-\text{H})/\nu(\text{N}-\text{H})$, 2974 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1744 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1620 $\delta(\text{O}-\text{H})/\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)/\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)$, 1340 $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})_{\text{ip}}/\delta_{\text{s}}(\text{C}-\text{H})/\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)/\nu(\text{C}-\text{N})/\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, 1246 und 1126 $\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})/\nu(\text{C}-\text{N})$, 679, 617 cm^{-1} .

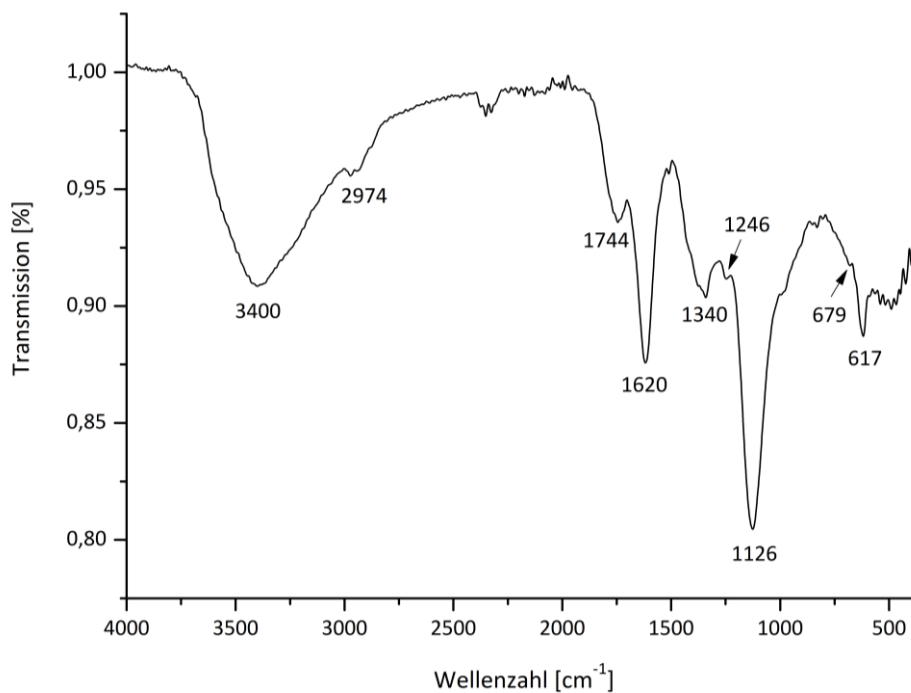


Abb. 4.46: FT-IR-Spektrum einer 0,1 %igen kolloidalen ND-Suspension aus ND (PC).

Beim Vergleich der Spektren von Suspension und Ausgangsmaterial (Abb. A-4.1) fallen verschiedene Abweichungen auf. Dazu gehören besonders die größere Intensität der Bande um 3400 cm^{-1} und zusätzliche Banden bei 1340 und 617 cm^{-1} in Abbildung 4.46, für die mehrere Schwingungen in Frage kommen. In Abbildung 4.45 treten dagegen starke Absorptionen im Bereich unterhalb 700 cm^{-1} auf. Die zwischen den Spektren bestehenden Unterschiede können auf die mechanischen

Einwirkungen durch die Scherkräfte in der Planetenmühle bzw. bei der Ultraschallbehandlung der Suspension zurückgeführt werden.

ND (S) – Abbildung 4.47

Das IR-Spektrum von ND (S) weist, neben einer ungewöhnlichen Form, keine ausgeprägten Banden auf. In einigen Bereichen des Spektrums sind jedoch schwache, überwiegend schulterförmige Absorptionen erkennbar (Markierung durch Pfeile). Auffällig ist dabei, dass diese in etwa den selben Bereichen des Spektrums wie bei ND (PC) auftreten.

- FT-IR: $\sim 2950\text{-}2850$ $\nu_{s/as}(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$, ~ 1750 $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\sim 1650\text{-}1600$ $\delta(\text{O-H})/(\delta(\text{N-H})_{ip}/\gamma(\text{NH}_2))$, ~ 1100 $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-N})$, $\sim 850\text{-}800$, $\sim 670\text{-}650$ cm^{-1} .

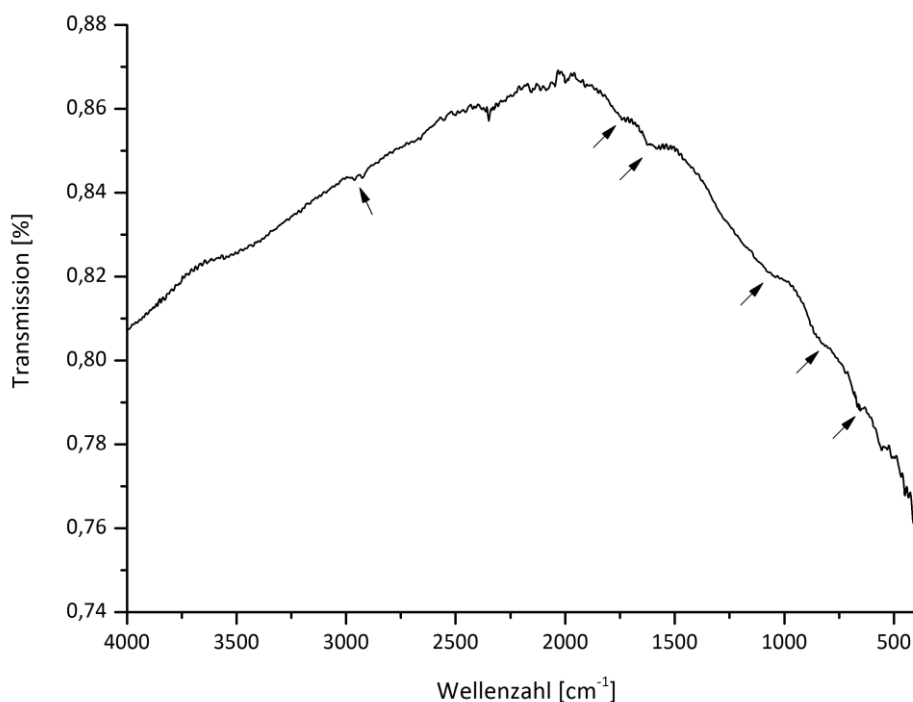


Abb. 4.47: FT-IR-Spektrum von ND (S).

Nach Carboxylierung des Materials, wie unter 3.3.2 beschrieben, zeigt das IR-Spektrum von ND (S) ein ähnliches Erscheinungsbild wie in Abbildung 4.47. Erst nach Modifikationen mit Biomolekülen, wie Thymidin oder PLL, erscheinen stärkere Banden in den Spektren. Aus dem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass funktionelle Gruppen auf den Partikeloberflächen von ND (S) nur in geringer Anzahl vorhanden sind. Das kann sowohl aus einer weniger dichten Belegung als auch einer kleineren Oberfläche im Verhältnis zum Volumen, verglichen mit nanoskaligen Detonationsdiamanten, resultieren.

4.3.1.2 Modifikation mit Carboxylgruppen (ND-COOH)

An dieser Stelle wird das IR-Spektrum des nach 3.3.2 hergestellten, carboxylierten ND-Pulvers ausgewertet (Abb. 4.48). Die Partikel sollten vorrangig Carboxylgruppen tragen. Im mittleren Bereich des Spektrums ist eine Doppelbande mit Maxima bei 1746 und 1630 cm^{-1} lokalisiert. Während sich das erste Maximum auf $\nu(\text{C}=\text{O})$ zurückführen lässt, kann das zweite nicht mit Schwingungen von Carbonsäuren in Verbindung gebracht werden, da deren $\text{C}=\text{O}$ -Bindungen im Bereich von 1720-1680 cm^{-1} (dimer) bzw. 1800-1740 cm^{-1} (monomer) absorbieren. Gegen die Präsenz von Carboxylaten, deren anderthalbfache $\text{C}=\text{O}$ -Bindungen asymmetrische Streckschwingungen bei 1650-1540 cm^{-1} verursachen ($\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$), spricht das Fehlen einer zweiten Bande bei 1450-1360 cm^{-1} , die auf symmetrische Streckschwingungen derselben Bindungen ($\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$) zurückgeht. Unter Berücksichtigung der Erklärungen in Abschnitt 4.3.1.1 ist das Maximum bei 1630 cm^{-1} am wahrscheinlichsten auf $\delta(\text{O}-\text{H})$ von Wasser zurückzuführen, $\delta(\text{N}-\text{H})$ von Aminen werden jedoch nicht völlig ausgeschlossen. Sollte Letztgenanntes zutreffen, wäre das ein Indiz dafür, dass die Aminogruppen des Originalmaterials im Verlauf der Oxidation erhalten geblieben sind. Als dominant erweist sich auch in diesem Spektrum die Bande der $\text{C}-\text{O}$ -Streckschwingungen bei 1130 cm^{-1} , die wiederum eine schwache, scharfe Bande bei 1057 cm^{-1} trägt. Ein direkter Vergleich mit dem Spektrum des Ausgangsmaterials ND (PC) wird im Anhang in Abbildung A-4.2 gezeigt.

- FT-IR: ~ 3300 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1746 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1630 $\delta(\text{O}-\text{H})$, $\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)$, 1130 und 1057 $\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 822, 579 cm^{-1} .

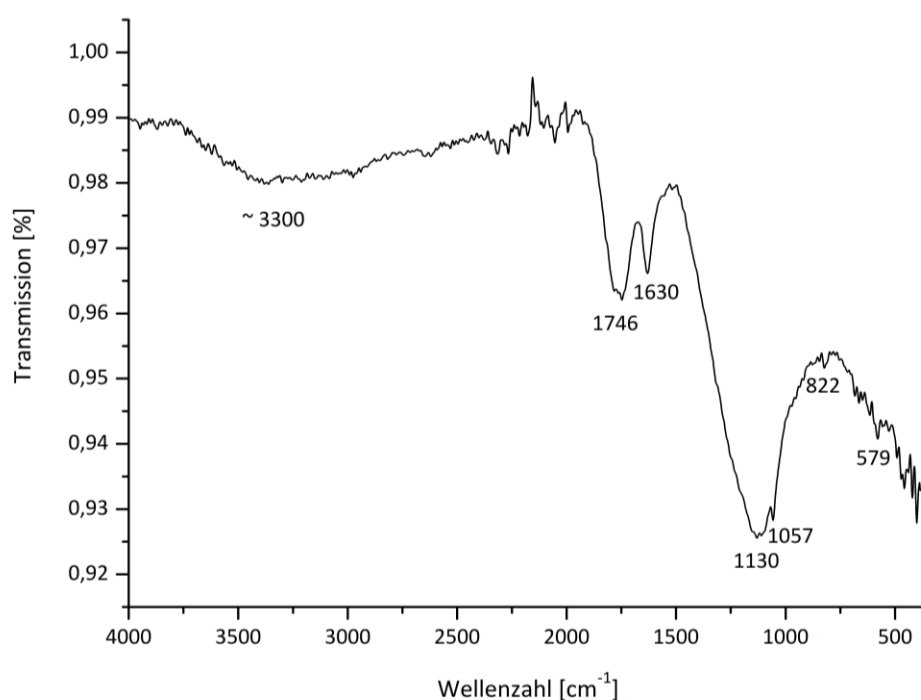


Abb. 4.48: FT-IR-Spektrum von ND-COOH (PC).

4.3.1.3 Modifikation mit Hydroxylgruppen (ND-OH)

Unter diesem Gliederungspunkt werden die Ergebnisse mehrerer Typen hydroxylierter ND zusammengefasst. Es werden IR-Spektren von ND-OH (ITC), sowie ND (PC) und ND (S) gezeigt, die nach der Methodik von USHIZAWA *et al.* [USM+02] (Abschnitt 3.3.3 b), 3.4.3) bzw. KRÜGER *et al.* [KLJS06] (Abschnitt 3.3.3 a)) modifiziert wurden.

ND-OH (ITC) – Abbildung 4.49

Das Verfahren der Hydroxylierung dieses Materials ist nicht bekannt. Die Zuordnung der Banden erfolgt daher in Anlehnung an die ND-OH (PC)-Spektren.

Bei 1631 cm^{-1} erscheint eine schmale, mittlere Bande, die Schwingungen von O–H-Gruppen zugeordnet wird. Im Bereich von 1122 cm^{-1} liegt das Maximum einer starken Bande, mit zwei Schultern in höheren Wellenzahlbereichen (1318 und 1253 cm^{-1}). Die Bande selbst, einschließlich der Schulter bei 1253 cm^{-1} , ist im Bereich der C–O-Streckschwingungen lokalisiert. Dabei kann es sich um $\nu(\text{C–O})$ von Alkoholen und Phenolen oder $\nu(\text{C–O–C})$ von Ethern handeln. Für die intensive Bande bei 549 cm^{-1} kommen evtl. Scherschwingungen von C–O–H-Bindungen ($\gamma(\text{C–O–H})_{\text{oop}}$) in Frage, die bei Alkoholen und Phenolen auftreten.

- FT-IR: 3396 cm^{-1} $\nu(\text{O–H})/\nu(\text{N–H})$, 2967 cm^{-1} $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1712 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1631 cm^{-1} $\delta(\text{O–H})/\delta(\text{C–O–H})$, 1318 , 1253 und 1122 cm^{-1} $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})$, 666 , 549 , 424 cm^{-1} .

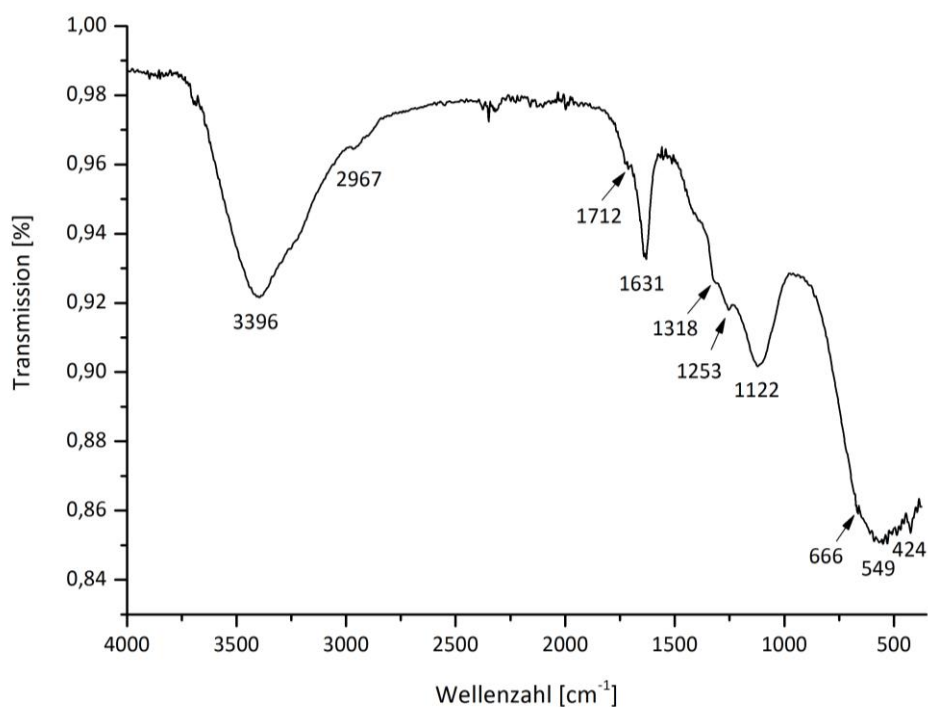


Abb. 4.49: FT-IR-Spektrum von ND-OH (ITC).

ND-OH (Thymidin) (PC) – Abbildung 4.50

Die Banden bei 1725 und 1647 cm^{-1} werden $\nu(\text{C}=\text{O})$ zugeordnet, die zu Ketonen, Carbonsäuren, Amiden oder Estern gehören. Im Unterschied zum Spektrum von ND-COOH (Abb 4.48), weist hier die Bande mit der höheren Wellenzahl die geringere Intensität auf. Eine mögliche Begründung dafür ist die Auswirkung der starken Absorption des Thymidins (Doppelbande) in diesem Bereich (Abb. A-4.3), womit eine erhöhte Intensität von $\delta(\text{N}-\text{H})$ verbunden ist. Möglicherweise wird die nun stärkere Absorption bei 1647 cm^{-1} auch ausschließlich durch Schwingungen der N–H-Bindungen verursacht. Es folgt eine Bande bei 1108 cm^{-1} mit einer schmalen Nebenbande bei 1217 cm^{-1} , die aus C–O-Streckschwingungen resultieren und auf Ether, Ester, Alkohole oder Phenole zurückgeführt werden können. Mit den Banden bei 1725 und 1108 cm^{-1} werden die für Ester typischen Absorptionen nachgewiesen. Allerdings ist damit die Präsenz von Thymidin nicht eindeutig zu belegen, da die Banden in den für Ester entscheidenden Wellenzahlbereichen bereits im Spektrum von ND (PC) vorhanden sind. Es ist deshalb anzunehmen, dass Ester bereits in der Oberflächenbelegung des Originalmaterials enthalten sind. In Abbildung A-4.3 wird der Vergleich mit den Spektren des Ausgangsmaterials ND-COOH und von Thymidin gezeigt.

- FT-IR: 3410 $\nu(\text{O}-\text{H})/\nu(\text{N}-\text{H})$, 2976 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1725 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1647 $\nu(\text{C}=\text{O})/\delta(\text{O}-\text{H})$ $\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)$, 1217 und 1108 $\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 810, 668 cm^{-1} .

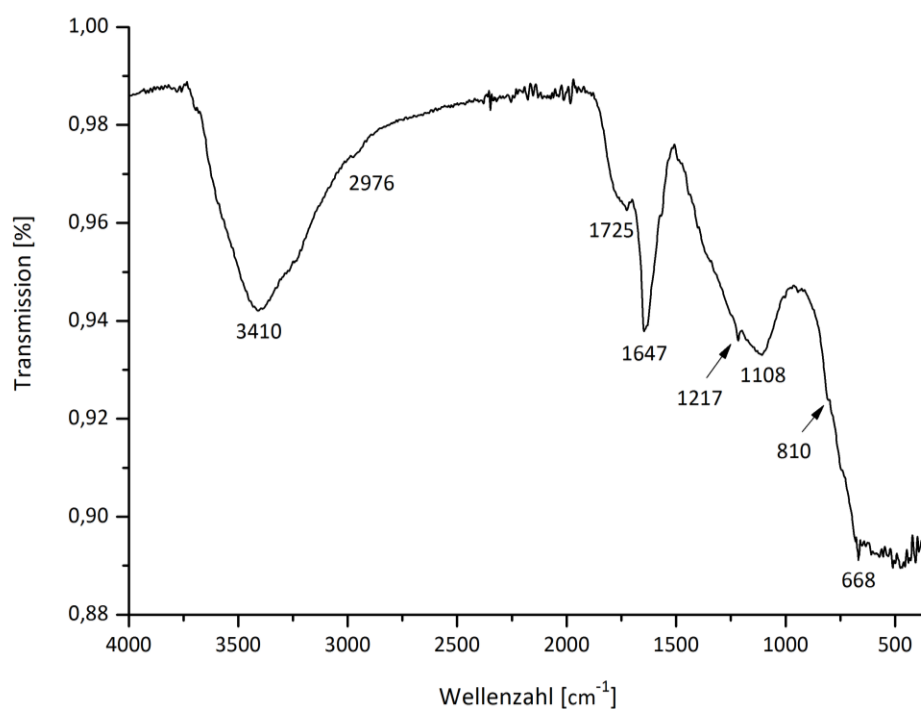


Abb. 4.50: FT-IR-Spektrum von ND-OH (Thymidin) (PC).

Bei der Auswertung ist auch das IR-Spektrum von Thymidin (Abb. A-4.3) zu berücksichtigen, das jedoch aufgrund der Komplexität seiner Molekülstruktur schwierig zu interpretieren ist. Die höchste Intensität im Thymidin-Spektrum zeigt eine Doppelbande im Bereich der C=O-Streckschwingungen bei 1698 und 1657 cm^{-1} . Es wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um die Kombination einer C=O-Streckschwingung und einer N–H-Deformationsschwingung (1657 cm^{-1}), verursacht durch N–H-Gruppen in der Ringstruktur des Thymidins, handelt. Im Fingerprintbereich treten zahlreiche scharfe, mittelstarke Banden auf, die im ND-OH (T)-Spektrum nicht mehr als solche erkennbar sind. Für ausführlichere Informationen zur IR-Spektroskopie von Thymidin wird auf die Arbeit von MATHLOUTHI & SEUVRE [MS84] verwiesen.

ND-OH (T) (S) – Abbildung 4.51

Im FT-IR-Spektrum von ND-OH (T) (S) dominieren wenige Absorptionen bei 1261, 1097, 1023 und 801 cm^{-1} . Insgesamt weist das Spektrum folgende Banden auf:

- FT-IR: 2960 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2921 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 1645 $\nu(\text{C}=\text{O})/\delta(\text{O}-\text{H})/\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)$, 1550, 1261 $\nu(\text{C}-\text{N})/\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 1095 und 1023 $\nu(\text{C}-\text{N})/\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 801, 667, 453 cm^{-1} .

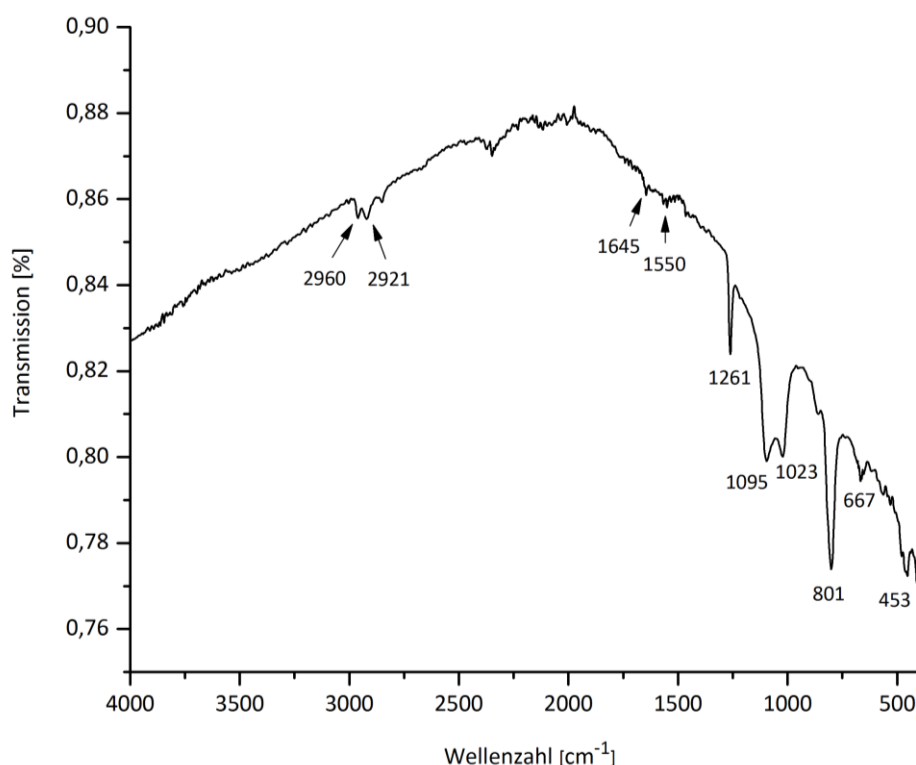


Abb. 4.51: FT-IR-Spektrum von ND-OH (T) (S).

Ein Vergleich mit dem Spektrum des Ausgangsmaterials (Abb. 4.47 und A-4.4) verdeutlicht, dass nach der Modifikation mit Thymidin wesentlich stärkere Absorptionen auftreten, was als Nachweis für die Erhöhung der Anzahl funktioneller Gruppen zu werten ist. In mehreren Bereichen liegen Übereinstimmungen von Bandenlagen mit dem Spektrum von Thymidin (Abb. A-4.4) vor, woraus auf das Vorhandensein von Thymidin auf den Oberflächen der modifizierten Partikel geschlossen wird. Zum sicheren Nachweis von Estern fehlt die C=O-Streckschwingungsbande bei 1740 cm^{-1} , wogegen Banden von C–O-Streckschwingungen im Bereich von $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ vorhanden sind. Die kovalente Bindung des Thymidins an die ND-Partikel kann daher nicht sicher nachgewiesen werden. Zumindest erfolgte jedoch die Adsorption der Biomoleküle.

ND-OH (PC) – Abbildung 4.52

Das IR-Spektrum der nach KRÜGER *et al.* [KLJS06] hydroxylierten ND weist eine Doppelbande bei $1752\text{ (}\nu(\text{C=O}))$ und 1629 cm^{-1} auf, wobei der letztgenannte Teil mit höherer Intensität schwingt. Die beiden Maxima sind im Vergleich zu Abbildung 4.50 weiter voneinander getrennt, wobei die Bande mit der höheren Intensität zu kleineren Wellenzahlen verschoben ist und daher nicht mehr den C=O-Streckschwingungen zugerechnet werden kann. Für die Zuordnung der Bande bei 1629 cm^{-1} wird den Angaben von KRÜGER *et al.* [KLJS06] gefolgt, wonach es sich um O–H-Schwingungen handelt. Es schließt sich eine Bande bei 1100 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1366 cm^{-1} an, die aus $\nu(\text{C–O})$ bzw. $\delta(\text{O–H})$ von Alkoholen und Phenolen resultiert. In Abbildung A-4.4 werden die Spektren von ND-OH (PC) und ND (PC) einander direkt gegenübergestellt.

- FT-IR: $3402\text{ }\nu(\text{O–H})$, $1752\text{ }\nu(\text{C=O})$, $1629\text{ }\delta(\text{O–H})$, $1366\text{ }\delta(\text{O–H})$, $1100\text{ }\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})$, 663 , 466 cm^{-1} .

Zum Vergleich der ND-OH-Spektren sind diese in Abbildung 4.53 zusammengefasst. Allen gemeinsam ist die breite, mittelstarke Bande im Bereich der O–H-Streckschwingungen mit nahezu vollkommen übereinstimmender Lage des Maximums bei 3396 , 3410 bzw. 3402 cm^{-1} . Weiterhin besteht Übereinstimmung in einer Doppelbande im Bereich um etwa $1732\text{ (}\nu(\text{C=O}))$ und 1638 cm^{-1} . In allen drei Spektren zeigt dabei die Bande mit der niedrigeren Wellenzahl die höhere Intensität. Bei etwa 1111 cm^{-1} weisen alle drei Spektren eine starke, breite Bande für $\nu(\text{C–O})$ auf, die auf Seiten der höheren Wellenzahl eine oder mehrere Schulter(n) bzw. Nebenbande(n) trägt. Auch im Bereich der niedrigsten Wellenzahlen treten allgemein starke Absorptionen auf, die aus verschiedenen Schwingungen resultieren können. Zu berücksichtigen sind hierbei auch Schwingungen von Bindungen mit Chlor oder Silizium bei Material aus ND (PC).

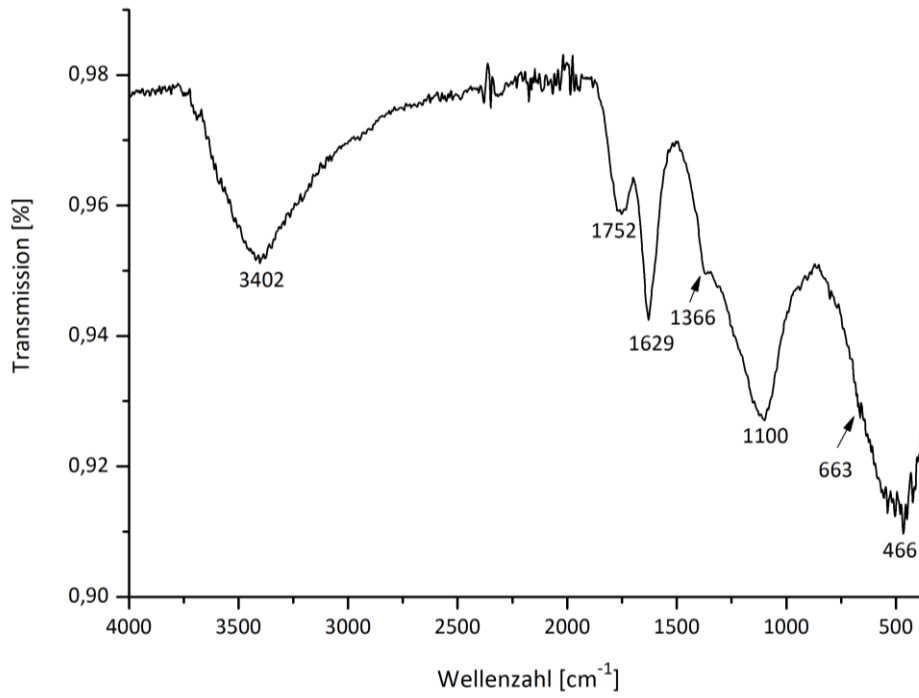


Abb. 4.52: FT-IR-Spektrum von ND-OH (PC).

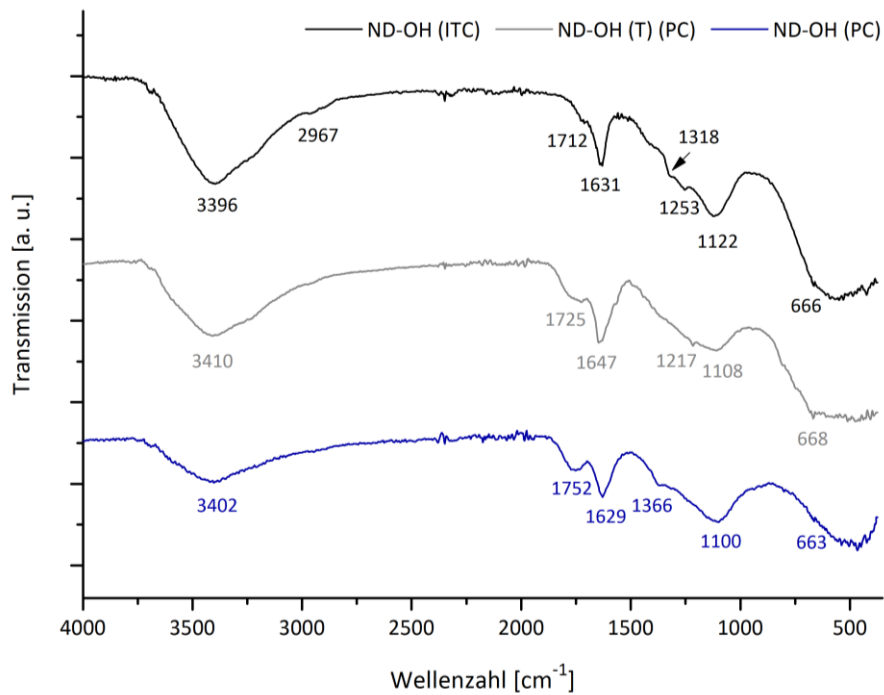


Abb. 4.53: Vergleich der FT-IR-Spektren hydroxylierter ND.

4.3.1.4 Modifikation mit Aminogruppen (ND-NH₂)

Auch für die Modifikation mit Aminogruppen werden Ergebnisse verschiedener ND-Typen vorgestellt. An erster Stelle steht das Originalmaterial von ITC, es folgen mit PLL modifizierte ND (PC) und ND (S). Abschließend wird das Ergebnis der Silanisierung von ND (PC) mit APTMS ausgewertet.

ND-NH₂ (ITC) – Abbildung 4.54

Vom Hersteller liegen keine näheren Angaben zur Modifikation des Materials vor, weshalb der Ursprung der Aminogruppen unbekannt ist. Hervorzuheben sind die Banden bei 1642 und 1105 cm⁻¹ die den N–H-Deformations- und C–N-Streckschwingungen von Aminen zugeordnet werden. Die zuletzt genannte, starke Bande wird in ihrer Intensität noch von derjenigen bei 617 cm⁻¹ übertroffen, die jedoch nicht isoliert, sondern im Komplex mit anderen Schwingungen auftritt.

- FT-IR: 3411 $\nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, 2958 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1642 $\delta(\text{N-H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)/\delta(\text{O-H})$, 1258 und 1105 $\nu(\text{C-N})/\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})$, 977, 617 cm⁻¹.

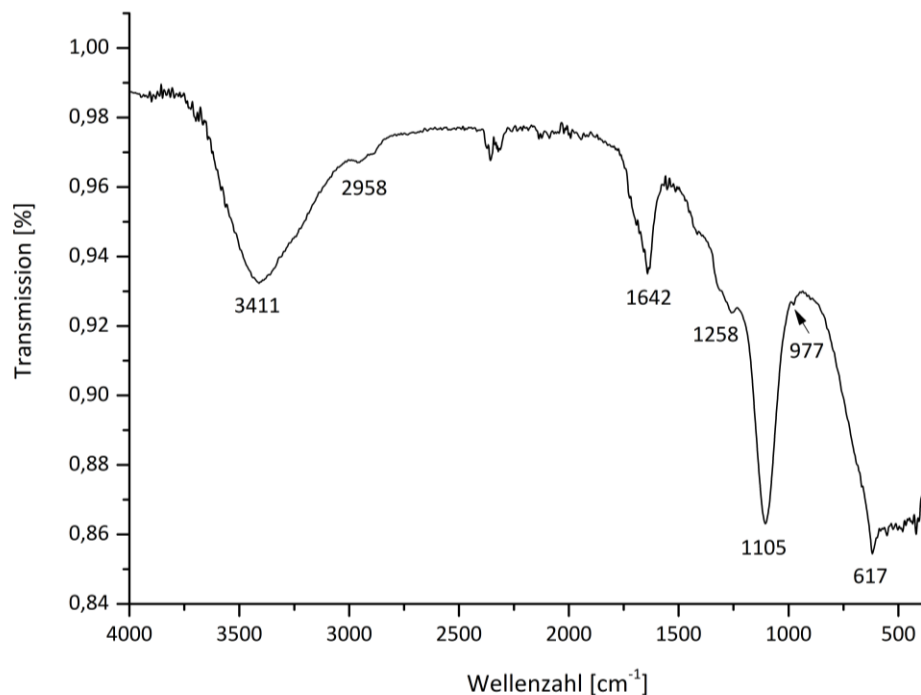


Abb. 4.54: FT-IR-Spektrum von ND-NH₂ (ITC).

Die Bande bei 3411 cm⁻¹ resultiert aus Streckschwingungen von O–H- und N–H-Gruppen. Das Fehlen einer zweiten Bande in diesem Bereich des Spektrums deutet auf die Präsenz sekundärer Amine hin, zwei Banden würden dagegen primäre Amine anzeigen. Des Weiteren fehlen die bei primären Aminen durch N–H-Scherschwingungen verursachten scharfen Banden bei etwa 830 und 785 cm⁻¹,

die jedoch nur eine geringe diagnostische Bedeutung besitzen [Gre02]. Sekundäre Amine weisen dagegen nur eine Bande im Bereich zwischen 750 und 700 cm^{-1} auf, die im Spektrum durchaus Bestandteil des oben erwähnten Komplexes sein kann.

ND-NH₂ (Lysin) (PC) und (S)

Die beiden nachfolgend dargestellten IR-Spektren sind das Ergebnis der Aminomodifizierung mit PLL. Wie unter 3.3.4 beschrieben, wurden zwei unterschiedliche Immobilisierungsstrategien – jeweils an ND (PC) und ND (S) getestet – angewandt. Gezeigt werden hier die Ergebnisse der Aminomodifizierung von ND-COOH (PC) durch Adsorption, und von ND (S) durch kovalente Anbindung der Biomoleküle. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurde noch das Vorhandensein von Carboxylgruppen auf den Oberflächen von ND (S)-Partikeln angenommen. Bei der Zuordnung der Banden müssen Amide berücksichtigt werden, die Bestandteil der Molekülstruktur von PLL sind. Amide zeigen neben den Banden der bereits erwähnten N–H-Streckschwingungen weitere Banden bei 1690-1600 cm^{-1} , die durch $\nu(\text{C}=\text{O})$ (Amid-I) sowie 1570-1510 cm^{-1} , die durch $\delta(\text{N}-\text{H})$ unter Beteiligung von $\nu(\text{C}-\text{N})$ entstehen (Amid-II bei sekundären Amidinen) [Gre02].

a) ND-NH₂ (Lysin) (PC), Aminierung nach [HCO4] – Abbildung 4.55

Im Bereich der Streckschwingungen von O–H- und N–H-Gruppen liegt eine schwache Bande mit einem wenig ausgeprägten Maximum bei 3263 cm^{-1} vor, die als Summe der Schwingungen beider Gruppen gewertet wird. Die Bande bei 1756 cm^{-1} ist auf $\nu(\text{C}=\text{O})$ der funktionellen Gruppen der ND zurückzuführen. Es folgt eine Doppelbande mit Maxima bei 1647 und 1524 cm^{-1} , die offensichtlich der Amid-I- und Amid-II-Bande des PLLs entsprechen. Eine Zunahme der Intensität der Bande bei 1647 cm^{-1} im Vergleich zu PLL ohne ND, kann durch eine Erhöhung der Anzahl von C=O-Gruppen bedingt sein. Der Bande bei 1077 cm^{-1} , verursacht durch C–O-Streckschwingungen der funktionellen Gruppen der ND, sitzen zwei Schultern bei etwa 1299 und 1230 cm^{-1} auf, die möglicherweise mit den schwachen Banden des PLL bei 1309 und 1236 cm^{-1} korrespondieren. Alternativ kann eine Zugehörigkeit zur dominanten Bande im Spektrum des Ausgangsmaterials ND-COOH (Abb. 4.48), und damit ebenfalls zu $\nu(\text{C}-\text{O})$, angenommen werden.

• FT-IR: 3263 $\nu(\text{O}-\text{H})/\nu(\text{N}-\text{H})$, 2937 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2865 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ u. a. $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1756 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1647 $\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)/\nu(\text{C}=\text{O})/\delta(\text{O}-\text{H})$, 1524 $\delta(\text{N}-\text{H})$, 1442 $\delta(\text{C}-\text{H})$, 1299 $\nu(\text{C}-\text{N})/\delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$, 1230 $\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{N})$, 1077 $\nu(\text{C}-\text{O})/\nu(\text{C}-\text{N})$, 815, 664, 479, 410 cm^{-1} .

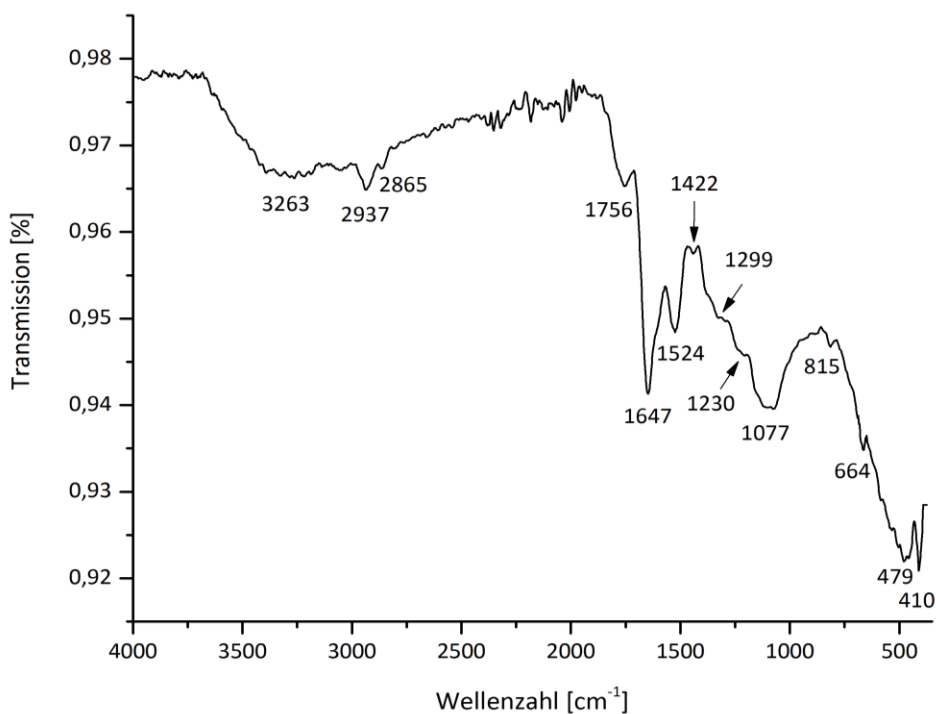


Abb. 4.55: FT-IR-Spektrum von ND-NH₂ (Lysin) (PC).

Zur Interpretation sind auch die Spektren der Ausgangsmaterialien PLL (Abb. A-4.5) und ND-COOH (PC) (A-4.6) zu berücksichtigen. Aus der Molekülstruktur von PLL (Abb. 3.4) ist ersichtlich, dass vor allem Schwingungen von C–N-, C–H-, CH₂-, N–H-, NH₂- und C=O-Bindungen vorliegen müssen. Dem entsprechend befinden sich die dominierenden Banden bei 2925 ($\nu(\text{CH}_2)$), 1645/1621 ($\nu(\text{C=O})/\delta(\text{NH}_2)$) und 1525 cm^{-1} ($\delta(\text{N-H})$). Die intensive Doppelbande bei 1645/1621 und 1525 cm^{-1} im PLL-Spektrum kann Amid-I bzw. -II zugeordnet werden, was der Präsenz sekundärer Amide entspricht. Weiterhin wird angenommen, dass durch die ebenfalls vorhandenen primären Amine (NH₂), die Doppelspitze des Peaks bei 1645/1621 cm^{-1} entsteht. Nach GREMLICH [Gre02] verursachen sekundäre Amide C=O-Streckschwingungen im Bereich von 1680 bis 1630 cm^{-1} , primäre Amine N–H-Deformationsschwingungen bei 1650 bis 1590 cm^{-1} . Eine Überlagerung der Schwingungen könnte demnach zu zwei Absorptionsmaxima in unmittelbarer Nachbarschaft führen.

Im Hinblick auf das Vorhandensein primärer Amine (–NH₂) in den PLL-Molekülen sind im Spektrum von ND-NH₂ (Lysin) (PC) (Abb. 4.55) zwei N–H-Banden im Bereich zwischen 3550 und 3250 cm^{-1} zu erwarten [Gre02], die auch erforderlich für deren Nachweis sind. Im PLL-Spektrum sind diese bei 3382 und 3257 cm^{-1} lokalisiert, wobei die erstgenannte deutlich schwächer ausgeprägt ist. Tatsächlich liegt für ND-NH₂ (Lysin) (PC) jedoch nur eine breite schwache Bande ohne ein deutliches Maximum vor. Als Ursache dafür wird die bereits oben genannte geringe Intensität der Bande bei 3382 cm^{-1} angesehen, die im ND-Spektrum nicht mehr als Maximum erkennbar ist. Ein sicherer Nachweis primärer Aminogruppen kann damit nicht erbracht werden.

b) ND-NH₂ (Lysin) (S), Aminierung nach [FLC+07] – Abbildung 4.56

Das IR-Spektrum aminomodifizierter ND (S) weist ebenfalls eine sehr ungewöhnliche Form auf, die allerdings grundlegend von derjenigen des Originalmaterials abweicht. Auffallend ist ein hoher Grad an Übereinstimmung mit den Bandenlagen von ND-NH₂ (Lysin) (PC) in Abbildung 4.55, sowohl im Bereich der Streckschwingungen von Einfachbindungen und Doppelbindungen, als auch im Fingerprintbereich.

Bei 1705 cm⁻¹ ist eine zusätzliche Bande für ν(C=O) zu verzeichnen. Übereinstimmung besteht in der Lage von Amid-I, während Amid-II bei einer etwas höheren Wellenzahl liegt (1649 bzw. 1548 cm⁻¹). Statt der beiden Schultern bei 1299 und 1230 cm⁻¹ erscheint eine schmale, mittelstarke Bande bei 1217 cm⁻¹, die sich an ihrer Wurzel verbreitert. Daraus lässt sich ableiten, dass auch hier eine Schwingung um 1230 cm⁻¹ in geringer Intensität vorliegt. Auch die Bande der C–O- bzw. C–N-Streckschwingungen bei 1076 cm⁻¹ tritt an gleicher Stelle auf. Eine mögliche Ursache dafür ist das Fehlen bzw. zahlenmäßig geringere Auftreten von C–O-Bindungen, z. B. durch weniger Carboxylgruppen. In Abbildung A-4.7 wird das Spektrum mit dem des Ausgangsmaterials PLL verglichen.

- FT-IR: 3281 ν(O–H)/ν(N–H), 2926 ν_{as}(CH₂), 2866 ν_s(CH₂), 1779 und 1705 ν(C=O), 1649 ν(C=O)/δ(N–H)_{ip}/γ(NH₂)/δ(O–H), 1548 δ(N–H)_{ip}/γ(NH₂), 1472 δ_{as}(CH₂), 1217 δ_s(CH₂) und 1076 ν(C–O)/ν(C–N), 999, 818, 657 cm⁻¹.

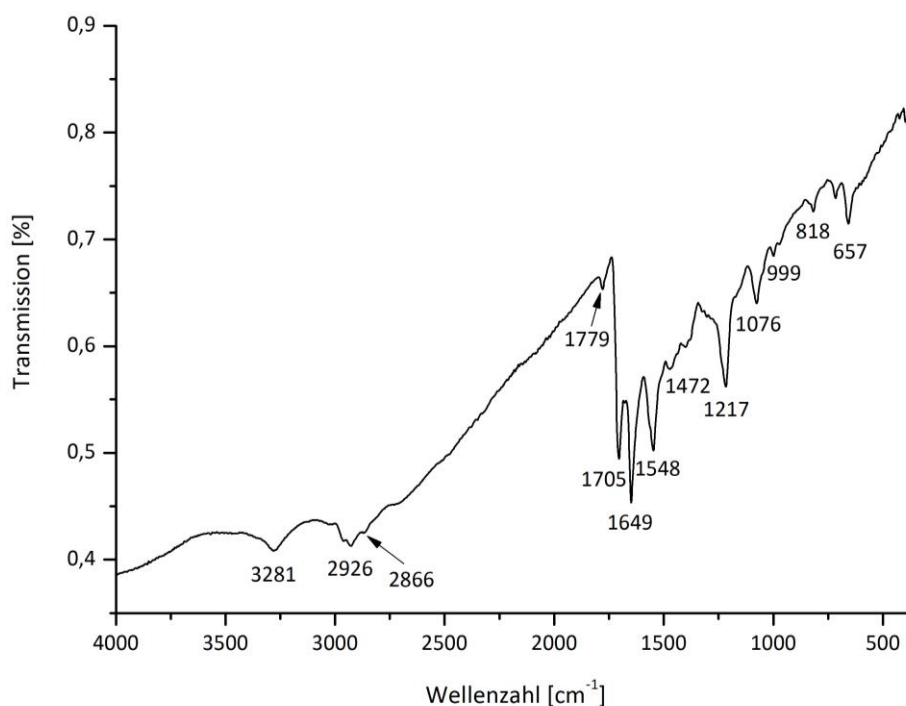


Abb. 4.56: FT-IR-Spektrum von ND-NH₂ (Lysin) (S).

ND-NH₂ (Silan) (PC) – Abbildung 4.57

Aus der Übereinstimmung der Spektren von ND-NH₂ (Silan) (PC) und APTMS lässt sich die Präsenz des Silans auf den Oberflächen der ND-Partikel ableiten. Die schwachen Banden bei 1773 und 1633 cm⁻¹ haben ihren Ursprung in C=O-Streckschwingungen der funktionellen Gruppen auf den ND-Oberflächen, während die folgende, bei 1555 cm⁻¹, im Bereich der N–H-Deformationsschwingungen liegt. Das Spektrum wird von einer sehr starken Doppelbande mit Absorptionsmaxima bei 1111 und 1032 cm⁻¹ dominiert, die auf symmetrischen und asymmetrischen Si–O–C-Streckschwingungen der Silanmoleküle beruht. Die Bande von mittlerer Intensität bei 692 cm⁻¹ kann möglicherweise den Pendelschwingungen von Si–CH₂–R zugeordnet werden [CDW90]. Einen Vergleich mit den Spektren von APTMS bzw. ND-COOH liefern die Abbildungen A-4.8 und A-4.9 im Anhang.

- FT-IR: 3180 $\nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, 2934 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 1773 und 1633 $\nu(\text{C=O})/\delta(\text{O-H})$, 1555 $\delta(\text{N-H})_{\text{ip}}/\gamma(\text{NH}_2)$, 1487, 1317, 1193 $\nu(\text{C-O})$, 1111 und 1032 $\nu_{\text{s,as}}(\text{Si-O-C})/\nu(\text{C-N})/\nu(\text{C-O})$, 923, 750, 692, 427 cm⁻¹.

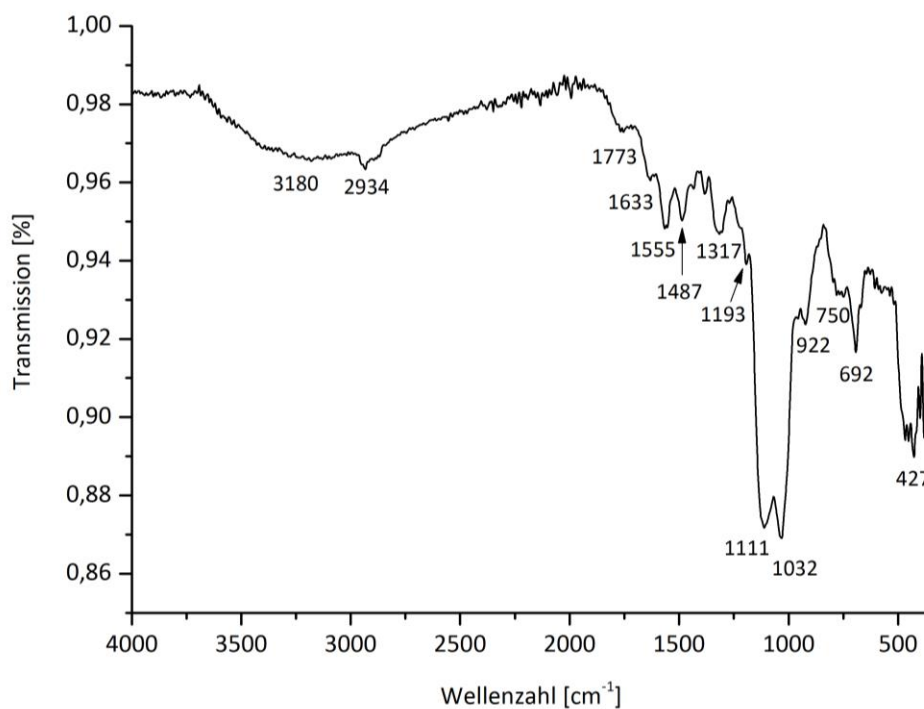


Abb. 4.57: FT-IR-Spektrum von ND-NH₂ (Silan) (PC).

Abschließend erfolgt ein Vergleich der ND-NH₂-Spektren (Abb. 4.58), mit Ausnahme von ND-NH₂ (Lysin) (S). Allen drei Spektren gemeinsam sind Banden von $\nu(\text{CH}_2)$ und $\nu(\text{CH}_3)$ im Bereich um 2960 bis 2930 cm⁻¹ und $\nu(\text{C-N})$ bzw. $\nu(\text{C-O})$ bei etwa 1110 bis 1030 cm⁻¹. Diese können im Fall von ND-NH₂ (Silan) (PC) auch durch $\nu(\text{Si-O-C})$ verursacht werden.

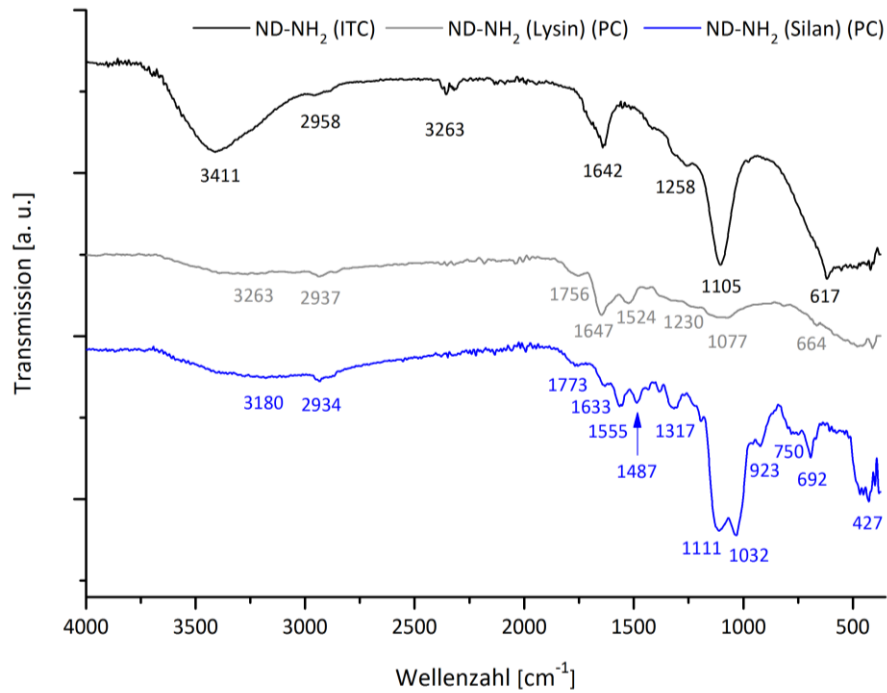


Abb. 4.58: Vergleich der FT-IR-Spektren aminomodifizierter ND.

Die FT-IR-Spektroskopie ist eine häufig angewandte Methode zur Untersuchung der Oberflächen von ND-Partikeln [AYI+93, AYM+96, BYS09, CPT+06, DMK+07, FLC+07, HC04, JHM+14, JJXL98, JX95, KLJS06, LGMK04, LK11, LMJ+11, LOK09, MNE+11, MOG09, MPL+13, MTK+12, PTC+06, SDG+06, SPC+12, VMS+08, ZLZW09]. Von MEINHARDT [Mei11] wird sie sogar als die mit Abstand wichtigste Methode zur Charakterisierung von ND-Proben bezeichnet. Für die im Abschnitt 4.3.1 vorgestellten Ergebnisse liegen daher zahlreiche vergleichbare Untersuchungen vor. Dennoch sind die Bandenlagen in den Spektren – selbst bei gleichartigen Modifikationen, wie z. B. $-\text{NH}_2$ – zumeist nicht identisch, was vor allem mit den heterogenen Ausgangsmaterialien, aber auch mit unterschiedlichen Chemikalien oder Bearbeitungsmethoden zu begründen ist. Ein Vergleich der hier gezeigten Ergebnisse mit Literaturdaten, ist insbesondere für nicht zusätzlich modifizierte Originalmaterialien nur sehr bedingt möglich, da das Rohmaterial aus der Detonationssynthese von verschiedenen Herstellern, die unterschiedliche Aufbereitungsmethoden anwenden, stammt. Um diese Aussagen zu verdeutlichen, werden nachfolgend einige Literaturbeispiele von ausgewerteten ND-Spektren vorgestellt und mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit verglichen. Damit wird erneut bestätigt, dass jedes ND-Produkt – einschließlich seiner verschiedenen Chargen – ein sehr spezifisches Material darstellt.

Von besonderer Relevanz für die Auswertung der hier gezeigten IR-Spektren sind, sofern vorhanden, die Ergebnisse der FT-IR-Untersuchungen in den als Protokollvorlagen genutzten Literaturquellen. Für aminomodifizierte ND betrifft das die Arbeiten von HUANG & CHANG [HC04] und KRÜGER

et al. [KLJS06], während bei *Fu et al.* [FLC+07] keine IR-spektroskopischen Untersuchungen vorgenommen wurden.

Weil die Aminomodifizierung von ND die vorherige Carboxylierung (und teilweise auch Hydroxylierung) einschließt, können die Abbildungen 4.48, 4.54 und 4.55 den Ergebnissen von HUANG & CHANG [HC04] gegenübergestellt werden. Nach der Behandlung mit konzentrierten Säuren treten dort folgende (beschriftete) Banden in Erscheinung: 3704, 3560 $\nu(\text{O-H})$, 1824 $\nu(\text{C=O})$, 1623 $\delta(\text{O-H})$ und 1277 cm^{-1} . Die Autoren schließen eine Zuordnung der Bande bei 1623 cm^{-1} zu $\nu(\text{C=O})$ von Carboxylaten aus, und ordnen diese stattdessen den O-H-Streckschwingungen von adsorbiertem Wasser zu. Angenommen wird auch die Zugehörigkeit der Schulter bei 3704 cm^{-1} zu diesen O-H-Schwingungen. Die Adsorption bei 1277 cm^{-1} wird in Anlehnung an ANDO *et al.* [AYI+93] Ether-ähnlichen Gruppen zugeschrieben. Ein Vergleich mit Abbildung 4.48 (ND-COOH (PC)) offenbart nur wenige Gemeinsamkeiten bei den Bandenlagen und -intensitäten. Besonders auffällig ist der Unterschied bei der dominierenden Bande im Spektrum: Während in Abbildung 4.48 die Bande bei 1130 cm^{-1} die höchste Intensität zeigt, ist es bei HUANG & CHANG [HC04] diejenige bei 1824 cm^{-1} . Voneinander abweichend ist auch die Lage der beiden stärksten Banden bei 1746/1130 bzw. 1824/1277 cm^{-1} . Die Zuordnung erfolgt allerdings in der gleichen Weise: Mit Ausnahme der bei 1630 cm^{-1} genannten N-H-Deformationsschwingungen werden die Banden den Streckschwingungen von O-H-, C=O-, C-O- und C-O-C-Gruppen zugeordnet.

Das Spektrum der mit PLL modifizierten ND zeigt bei HUANG & CHANG [HC04] folgende Banden: 3377, 3248, 2939, 2869, 1809 (C=O), 1672 $\nu(\text{C=O})$ Amid-I, 1502 $\delta(\text{N-H})$ Amid-II und 1268 cm^{-1} . Die höchsten Intensitäten liegen bei 1809 und 1672 cm^{-1} vor. In Abbildung 4.54 sind dagegen die Banden bei 1647 und 1077 cm^{-1} am stärksten ausgeprägt. Auffallend sind bei HUANG & CHANG [HC04] die beiden Maxima im Bereich zwischen 3400 und 3200 cm^{-1} , bei denen es sich um einen Nachweis für primäre Amine handeln könnte. In Abbildung 4.54 ist nur eine breite schwache Bande ausgebildet, obwohl im PLL-Spektrum ebenfalls zwei Maxima bei 3382 (Schulter) und 3257 cm^{-1} (Bande) vorliegen.

USHIZAWA *et al.* [USM+02] präsentieren Spektren von ND-COOH und ND-OH (T), die mit den hier erzielten Ergebnissen in Abbildung 4.48 und 4.50 verglichen werden können. Im zuerst genannten Spektrum treten Banden bei 3710 und 1773 cm^{-1} auf, die den O-H-Streckschwingungen von Carbonsäuren bzw. C=O-Streckschwingungen zugeordnet werden. Das Maximum der stärksten Bande liegt bei etwa 1100 cm^{-1} und wird $\nu(\text{O-C-O})$ zugeschrieben, auf eine weitere intensivere Bande bei etwa 1300 cm^{-1} wird nicht näher eingegangen. Das Spektrum der Thymidin-modifizierten ND enthält Banden bei 1797 ($\nu(\text{C=O})$) sowie 1703, 1650, 1460, 1401 cm^{-1} , die alle den Bindungen des Thymidins zugeordnet werden. Ein Vergleich mit Abbildung 4.50 zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Spektren, die sich über alle Wellenzahlbereiche erstrecken. Während das Spektrum

von USHIZAWA *et al.* [USM+02] keine Bande im Bereich um 3500 cm^{-1} ausweist, ist diese in Abbildung 4.50 bei 3410 cm^{-1} sehr stark ausgeprägt, das Gleiche gilt für Schwingungen im Fingerprintbereich unterhalb 900 cm^{-1} (keine Banden bei USHIZAWA *et al.* [USM+02] im Gegensatz zu starken Absorptionen in Abbildung 4.50). Auch im mittleren Bereich der Spektren bestehen Unterschiede in den Bandenlagen und -intensitäten. Ein direkter Vergleich wird jedoch durch die fehlende Beschriftung und Zuordnung von Banden durch USHIZAWA *et al.* [USM+02] erschwert.

Ausgehend von ND-OH synthetisierten KRÜGER *et al.* [KLJS06] aminomodifizierte ND durch Silanisierung mit APTMS. Im IR-Spektrum von ND-OH wurden Banden bei 3424 (O-H) und 1636 (O-H) cm^{-1} registriert, die durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden. Eine bei KRÜGER *et al.* [KLJS06] schwach ausgeprägte Bande um 1100 cm^{-1} tritt auch in Abbildung 4.51 auf, erreicht hier aber eine wesentlich höhere Intensität. Zusätzlich ist in Abbildung 4.51 eine Absorption bei 1752 cm^{-1} zu verzeichnen, die in der Arbeit von KRÜGER [KLJS06] fehlt, aber bereits im Originalmaterial nachweisbar ist. Silanierte ND-NH₂ zeigten folgende Banden: 3426 (-NH/-OH) , 2928 (-CH) , 1636 (-OH) , 1598 (-NH) und 1108 (-Si-O-) . Übereinstimmung mit Abbildung 4.56 besteht vor allem in einer stark ausgeprägten Bande mit zwei Maxima bei 1111 und 1032 cm^{-1} , die jedoch weniger bestimmt verschiedenen Schwingungen zugeordnet werden ($\nu_{s,as}(\text{Si-O-C})/\nu(\text{C-N})/\nu(\text{C-O})$). Abweichungen zum Spektrum in Abbildung 4.56 sind insbesondere durch Intensitätsunterschiede festzustellen. Viel schwächer sind hier die Banden bei 3180 cm^{-1} als auch im Bereich zwischen etwa 1700 und 1400 cm^{-1} ausgeprägt.

Zou *et al.* [ZLZW09] stellen eine umfassende Untersuchung von Detonationsdiamanten ohne zusätzliche Modifikationen mit einer Primärpartikelgröße von etwa 5 nm vor. Das FT-IR-Spektrum der ND umfasst folgende Banden, die einschließlich ihrer Zuordnung angegeben werden: $3420\text{ } \nu(\text{O-H})/\delta(\text{H}_2\text{O})$, 2957 und $2855\text{ } \nu(\text{CH}_3)/\nu(\text{CH}_2)$, 2382 , $2341\text{ (CO}_2)$, $1753\text{ } \nu(\text{C=O})/\nu(\text{COOH})$, $1630\text{ } \nu(\text{O-H})/\delta(\text{H}_2\text{O})$, 1261 und $1121\text{ cm}^{-1}\text{ (C-O-C)}$ cm^{-1} . Damit zeigt dieses Spektrum eine weitgehende Übereinstimmung mit Abbildung 4.45 (ND (PC)), was darauf hindeutet, dass sehr ähnliche Bedingungen bei der Produktion und Aufbereitung des Materials vorgelegen haben. Möglicherweise wurde das gleiche Sprengstoffgemisch für die Herstellung genutzt. Abweichend von Zou *et al.* wird bei der Auswertung von Abbildung 4.45 und weiterer Spektren auch die Präsenz stickstoffhaltiger Gruppen in Betracht gezogen, die als Alternative zu adsorbiertem Wasser in Frage kommen.

In Bezug auf Untersuchungen von carboxylierten Partikeln wird weiterhin auf die Arbeit von PEREVEDENTSEVA *et al.* [PTC+06] verwiesen. Die Autoren modifizierten synthetisches ND-Pulver mit Partikelgrößen von 100 nm durch verschiedene Oxidationsmethoden. Folgende Zuordnungen wurden vorgenommen: 3710 und $3560\text{ cm}^{-1}\text{ } \nu(\text{O-H})$, $1850\text{-}1650\text{ cm}^{-1}\text{ } \nu(\text{C=O})$, $1625\text{ cm}^{-1}\text{ } \nu(\text{C=O})$ des Carboxylat-Anions (R-COO^-). Es wird die Aussage getroffen, dass Banden um 1800 bzw. 1775 cm^{-1}

auf Schwingungen von Carboxylgruppen bzw. Carbonsäureanhydriden beruhen, wogegen Banden im Bereich von $1450\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ auf Ether-Gruppen zurückzuführen sind. In den hier gezeigten Ergebnissen fehlen Schwingungen um 1800 cm^{-1} – falls sie nicht Bestandteil der breiteren Bande bei 1746 cm^{-1} sind – (Abb. 4.48), jedoch wird die Präsenz von Carboxylgruppen aufgrund anderer Merkmale vorausgesetzt. Nach GREMLICH [Gre02] erfordert der Nachweis von Carbonsäureanhydriden drei Banden im Bereich zwischen 2000 und 1000 cm^{-1} , weshalb eine Absorption bei 1800 cm^{-1} möglicherweise nicht ausreichend ist.

Zur Diskussion über die IR-Spektren aminomodifizierter ND wird auf die Arbeit von VIAL *et al.* [VMS+08] Bezug genommen. Die Autoren verwendeten HPHT-Diamanten zur Funktionalisierung mit Biomolekülen. Die IR-Spektren der zuvor carboxylierten Partikel zeigen folgende Schwingungen an (Zuordnung durch die Autoren): $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{O-H})$, 2917 cm^{-1} $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, 2836 cm^{-1} $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$, 1790 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1630 cm^{-1} $\delta(\text{O-H})$. Weitere Banden bei 1400 und 1093 cm^{-1} werden auf Ether-Gruppen zurückgeführt. Bei der anschließend erfolgten Aminomodifizierung der Partikel wurden zwei Strategien angewandt, darunter die auch in dieser Arbeit genutzte Silanisierung mit APTMS (hier als APS bezeichnet). Die FT-IR-Untersuchung der Partikel ergab u. a. Banden bei 1130 und 1032 cm^{-1} ($\nu(\text{Si-O-Si})$) sowie eine Bande bei 1575 cm^{-1} , deren Vorhandensein mit der Präsenz primärer Amine begründet wird [VMS+08]. Während eine bei 1555 cm^{-1} lokalisierte Bande im Spektrum von ND-NH₂ (Silan) (PC) (Abb. 4.56) ebenfalls auf Amine zurückgeführt wird, erfolgt eine von VIAL *et al.* [VMS+08] abweichende Zuordnung für die Doppelbande bei 1111 und 1032 cm^{-1} . Obwohl diese äußerst intensive Bande sicher durch die Schwingungen von Si-O-Gruppen entsteht, und GREMLICH [Gre02] für Si-O-Si Absorptionen bei $1090\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$, COLTHUP [CDW90] bei $1130\text{-}1000$ angibt, enthält doch das APTMS-Molekül keine Si-O-Si-Bindung(en).

Weitere FT-IR-Untersuchungen modifizierter ND werden z. B. in [AYM+96, BDJ+13, CPT+06, DMK+07, MNE+11, MPL+13] (ND-COOH), [BYS09, KSL+08, MNE+11, MPL+13] (ND-NH₂), [BDJ+13, KSL+08] (ND-OH), [AYM+96, DMK+07, LGMK04] (fluorierte ND) und [AYI+93, DMK+07, SDG+06] (hydrierte ND) vorgestellt.

Oftmals können Banden in IR-Spektren nicht eindeutig einer bestimmten Schwingung zugeordnet werden, was mit der Unsicherheit, welche Elemente bzw. Bindungen tatsächlich in der Probe vorliegen, verbunden ist. Daher ist es empfehlenswert, eine weitere Analyseverfahren zur Feststellung der chemischen Zusammensetzung, wie z. B. das in dieser Arbeit eingesetzte REM-EDX-Verfahren, anzuwenden. Weiterhin werden zu diesem Zweck auch die Elementanalyse [JX95, LK11, LMJ+11], die Raman-Spektroskopie [BYS09, MG09, PNJ+00, ZLZW09] oder die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) [DMK+07, LGMK04, LMJ+11] eingesetzt.

Abschließend wird auf die Adsorption von Wasser, die Schwingungen in zwei Bereichen des MIR-Spektrums (3500-3000 und etwa 1640 cm^{-1}) verursacht, und die eigentlichen Schwingungen des Untersuchungsmaterials verdecken kann, eingegangen. Dieses Problem wurde von Ji *et al.* [JJXL98] anhand von 5-15 nm großen Partikeln aus der Detonationssynthese, die mit Luft, Wasserstoff bzw. Stickstoff bei erhöhten Temperaturen behandelt wurden, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die ND-Partikel sehr leicht Wasser adsorbieren, was bereits bei einer relativen Luftfeuchte von unter 35 % der Fall war. In den Spektren traten u. a. Banden bei ~ 3400 (mit Schultern bei 3575 und 3240), 2920, 2851, 1750 und 1630 cm^{-1} auf. Bei IR-Untersuchungen im Vakuum fehlte die Bande bei 3400 cm^{-1} , die den O–H-Streckschwingungen von Wasser zugeordnet wurde. Nachdem die Partikel wieder mit Luft in Berührung kamen, war sehr schnell eine erhöhte Intensität von $\nu(\text{O–H})$ zu beobachten. Ebenso ergab sich eine Erhöhung der zuvor nur sehr geringen Intensität der Bande bei 1630 cm^{-1} , die den O–H-Deformationsschwingungen des Wassers zugeordnet wurde. Die Existenz einer schwachen Bande im Vakuum bei derselben Wellenzahl wurde nach Angabe der Autoren durch das Auftreten anderer Schwingungen, wie z. B. $\nu(\text{C=O})$, verursacht. Als Begründung wird die allgemein höhere Intensität von Streck- gegenüber Deformationsschwingungen angeführt, die eine Präsenz der Letzteren ausschließt, wenn die entsprechenden Streckschwingungen fehlen. Als Schlussfolgerung aus den durchgeführten Untersuchungen wurden folgende drei Arten von adsorbiertem Wasser vorgeschlagen: Monolayer aus Wassermolekülen, die an Lewis-Säuren (wie kohlenstoffhaltigen Gruppen mit positiver Ladung) an den ND-Oberflächen adsorbieren; Monolayer aus Wassermolekülen, die an Lewis-Basen (wie kohlenstoffhaltigen Gruppen mit negativer Ladung, sauerstoff- und stickstoffhaltigen Gruppen) an den ND-Oberflächen adsorbieren und schließlich benachbarte adsorbierte Wassermoleküle, die intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden [JJXL98].

Nach MEINHARDT [Mei11] enthält jedes FT-IR-Spektrum Banden adsorbierten Wassers, die bei ca. 3400 und 1630 cm^{-1} lokalisiert sind. Bei Messungen in Transmission sind diese Einflüsse noch stärker als bei der Verwendung einer ATR-Einheit, da auch die Kaliumbromid-Presslinge Wasser enthalten. Das für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendete FT-IR-Spektrometer verfügt über eine Heizeinrichtung im Bereich des Diamantkristalls, welche die Verdunstung des Wassers aus den Proben bewirkt. Eine vollständige Entfernung – in dem Maße, dass überhaupt kein Wasser mehr detektierbar ist – kann jedoch nicht vorausgesetzt werden, zumal, wie von Ji *et al.* [JJXL98] beschrieben, auch Feuchtigkeit aus der Umgebungsluft aufgenommen wird. Daher werden bei Banden in den Bereichen um 3400 und 1630 cm^{-1} auch immer Schwingungen durch O–H-Gruppen von Wasser in Betracht gezogen.

4.3.2 Nanodiamant-DNA-Konjugate

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der FT-IR-Untersuchungen an ND-DNA-Konjugaten dargestellt. Die Konjugation zwischen ND und Aptameren bzw. dsDNA erfolgte, wie im Abschnitt 3.4 beschrieben, über Amid-, Phosphodiester- und Isoharnstoffbindungen. Dementsprechend sind die Ergebnisse auch in diesem Abschnitt gegliedert. Im Anhang 5 werden die Konjugatspektren in jeweils einem Diagramm mit den Spektren ihrer Ausgangsmaterialien verglichen.

Neben den Schwingungen von funktionellen Gruppen der ND-Oberflächen, treten bei Konjugaten zusätzliche Schwingungen durch die Bindungen in der DNA, bzw. zwischen Partikeln und DNA, auf. Das ist vergleichbar mit den bereits beschriebenen Prozessen der Aminomodifikation bzw. Hydroxylierung von ND, die durch Anbindung von PLL, APTMS oder Thymidin vonstattengeht, und grundsätzlich ebenfalls eine Konjugation verschiedener Moleküle an ND darstellt.

Aufgrund der Präsenz von DNA, sind in den nachfolgend vorgestellten Spektren Schwingungen von Heterozyklen mit N-Atomen, den ebenfalls ringförmigen Desoxyribosestrukturen, sowie Phosphatgruppen zu erwarten. Zu beachten ist insbesondere: Die Konjugate besitzen eine Molekülstruktur, die aromatische Ringe enthält. Nach COLTHUP *et al.* [CDW90] führen die Schwingungen in aromatischen Ringen zu Banden in der Nähe von 1600, 1580, 1500 und 1460 cm^{-1} . Heterozyklische Verbindungen mit zwei Doppelbindungen in einem Fünfring, wie sie in den Basen Guanin und Adenin auftreten, absorbieren bei 1600-1530 und 1500-1430 cm^{-1} . Im Bereich von 900-700 cm^{-1} können Kippschwingungen aromatischer C-H-Bindungen auftreten. HESSE *et al.* [HMZ11] geben für C=C-Streckschwingungen aromatischer Verbindungen Banden bei ca. 1600, 1580 und 1500 cm^{-1} an. GÜNZLER & GREMLICH [GG03] unterscheiden bei aromatischen Ringen nach Schwingungen von C-C- und C-H-Bindungen. Demnach sind auf C-C-Schwingungsformen Banden bei 1600-1585, 1500-1430 und etwa 700 cm^{-1} zurückzuführen, C-H-Schwingungen absorbieren bei 3100-3000, 2000-1600, 1300-1000 und 910-660 cm^{-1} . Aromatische Ringe können demnach folgendermaßen identifiziert werden: Substitutionsbanden bei 910-660 cm^{-1} , C=C-Streckschwingungsbanden um 1600, 1515 und 1450 cm^{-1} , Oberton- und Kombinationsbanden bei 2000-1600 cm^{-1} , sowie C-H-Streckschwingungsbanden bei 3100-3000 cm^{-1} .

Daneben sind auch die Phosphatgruppen in der DNA zu beachten. Das betrifft z. B. Einfach- (P-O) und Doppelbindungen (P=O) zwischen Phosphor und Sauerstoff, aber auch die Schwingungen von Gruppen wie P-O-H, P-O-C und $-\text{PO}_4^{-3}$ spielen hierbei eine Rolle. Die Zuordnung von Banden zu diesen Schwingungen wird aufgrund ihrer Vielfalt und der etwas voneinander abweichenden Angaben in der Fachliteratur erschwert. Die Übersicht in Tabelle 4.5 soll daher zur Erleichterung der Zuordnung beitragen.

Tab. 4.5: Lage der FT-IR-Banden der Schwingungen von Phosphatgruppen.

Art der Bindung	Bandenlage [cm^{-1}]	Literaturnachweis
$\text{P}^{\text{v}}-\text{O}$	995-915	[GG03]
$\text{P}-\text{O}-\text{C}_{\text{aliph.}}$	1050-970, 830-740	[GG03]
$\text{R}-\text{P}(\text{OH})=\text{O}$	1040-910	[GG03]
$\text{R}-\text{P}(\text{OH})=\text{O}$	1240-1180 $\nu(\text{P}-\text{O})$, 2700-2560 (O-H)	[HMZ11]
$\text{P}=\text{O}$	1300-1250	[HMZ11]
$\text{P}-\text{O}-\text{H}$	2700-2550, 2300-2100, 1040-910	[CDW90]
$\text{P}=\text{O}$	1300-1140	[CDW90]
PO_3^{-2}	1030-970	[CDW90]
PO_4^{-3}	1100-1000	[CDW90]
$\text{PO}_4^{-3} (\nu)$	1100-1000	[Smi99]
$\text{PO}_4^{-3} (\delta)$	600-500	[Smi99]

Absorptionen, die in diesen Bereichen der Spektren auftreten, können demnach auf Schwingungen der Phosphatgruppen in der DNA rückführbar sein. Diese Aussage gilt für alle Konjugatspektren. Bei ihrer Auswertung wird nicht mehr explizit auf die Schwingungen der Phosphate eingegangen.

Einige Aptamer- und Konjugatspektren enthalten Banden im Wellenzahlbereich zwischen 2400 und 2300 cm^{-1} , die ihren Ursprung in den Schwingungen der DNA-Moleküle haben, jedoch keiner Bindung zugeordnet werden können. Nach Untersuchungen der Einzelbausteine von DNA kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass diese Banden nicht auf 2-Desoxyribose zurückzuführen sind.

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Schwingungen in den komplexen Untersuchungsobjekten, entstehen Kombinationsbanden und Verschiebungen in der Lage der Absorptionsbanden (eng. *shift*). Dadurch wird die Interpretation der Bandenlagen wesentlich erschwert, und ist im Ergebnis weniger zuverlässig, als die Auswertung der Spektren von Reinsubstanzen.

Zum Verständnis der Auswertung der IR-Spektren wird auf die Abbildungen im Abschnitt 3.4 verwiesen, aus denen u. a. die Struktur von ssDNA (Abb. 3.11) und der beteiligten Bindungen (Abb. 3.7) ersichtlich ist.

4.3.2.1 Konjugation über Amidbindungen

Wie bereits unter 3.4.2 beschrieben, besteht die Möglichkeit, Reaktionen zur Generierung von Amidbindungen in zwei Richtungen ablaufen zu lassen: Es können sowohl carboxylierte Partikel mit NH_2 -Aptameren, als auch aminomodifizierte Partikel mit COOH -Aptameren konjugiert werden. Zunächst werden die Ergebnisse der zuerst genannten Variante vorgestellt.

ND-COOH (PC) + NH_2 -TBA – (Abb. 4.58 und 4.59)

Es werden die Ergebnisse von zwei Versuchen gezeigt, bei denen die Aptamere von verschiedenen Herstellern stammen. Das in Abbildung 4.58 gezeigte Spektrum basiert auf Konjugaten, die Aptamere der IBA GmbH (Beispiel 1) enthalten. Die schwache Bande bei 1762 cm^{-1} wird durch $\nu(\text{C}=\text{O})$ verursacht. Sekundäre Amide werden am deutlichsten durch die nachfolgende Doppelbande bei 1651 und 1531 cm^{-1} (Amid-I und -II) bestätigt. Die Absorption im Bereich von 1378 cm^{-1} kann C–O–H- oder CH_3 -Deformationsschwingungen bzw. C–N-Streckschwingungen von Aminen zugeordnet werden. Auf Streckschwingungen von C–O- bzw. C–O–C-Bindungen von Estern bzw. Ethern sind die Banden bei 1230 und 1087 cm^{-1} zurückzuführen. Spektrenvergleich: In Abbildung A-5.1.

- FT-IR: 3388 cm^{-1} $\nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, 2965 cm^{-1} $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1762 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1651 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu(\text{C-N})/\delta(\text{O-H})$, 1531 cm^{-1} $\delta(\text{N-H})/\nu(\text{C-N})$, 1378 cm^{-1} $\delta(\text{C-O-H})/\nu(\text{C-N})$, 1230 und 1087 cm^{-1} $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})$, 668 , 463 cm^{-1} .

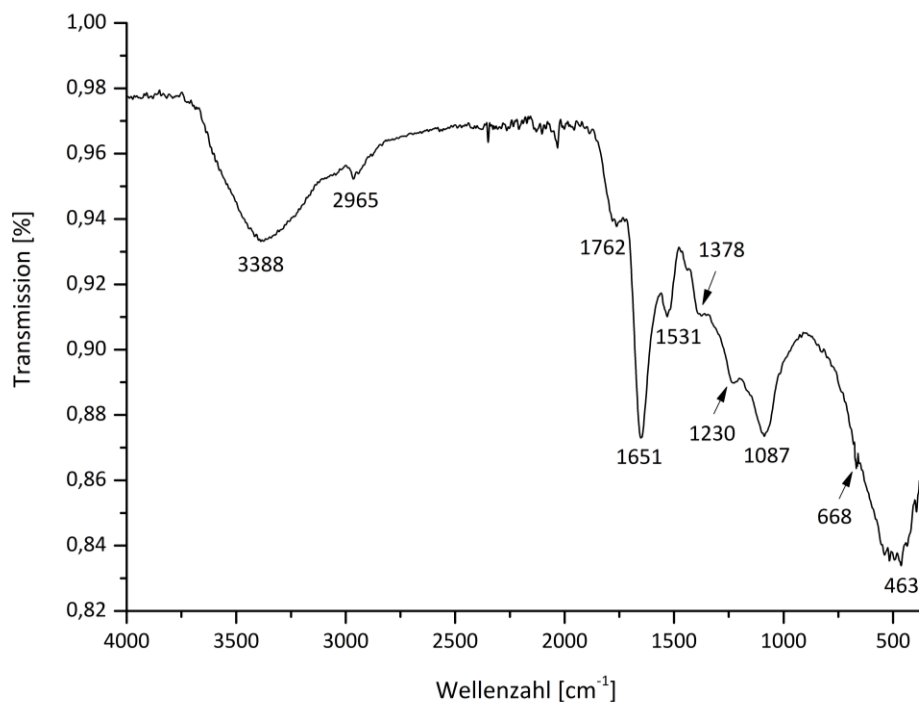


Abb. 4.58: FT-IR-Spektrum von ND-COOH (PC) + NH_2 -TBA – Konjugaten, Beispiel 1 (Amidbindung).

Im Anhang (Abb. A-5.1) wird das Konjugatspektrum aus Abbildung 4.58 mit den Spektren der Ausgangsmaterialien ND-COOH und NH₂-TBA verglichen. Die Vergleiche der folgenden Konjugatspektren sind mit fortlaufender Nummerierung im Anhang aufgeführt.

Ein zweites Beispiel zeigt das Spektrum von Konjugaten, die mit Aptameren der biomers.net GmbH hergestellt wurden (Abb. 4.59). Die mittelstarken Banden mit Maxima bei 2377, 2351 und 2314 cm⁻¹ haben ihren Ursprung eindeutig im Spektrum des Aptamers, in dem diese Maxima allerdings bei etwas höheren Wellenzahlen positioniert sind. Es folgen Amid-I und -II bei 1651 und 1537 cm⁻¹. Die Bande bei 1082 cm⁻¹ wird ν(C–O) zugeschrieben. Spektrenvergleich: In Abbildung A-5.2.

• FT-IR: 3727, 3290 ν(O–H)/ν(N–H), 2954 ν_{as}(CH₃), 2877 ν_s(CH₃), 2377, 2351, 2314, 1651 ν(C=O)/ν(C–N)/δ(O–H), 1537 δ(N–H)/ν(C–N), 1395 δ(C–O–H), 1245, 1082 ν(C–O)/ν(C–O–C), 985, 670, 546 cm⁻¹.

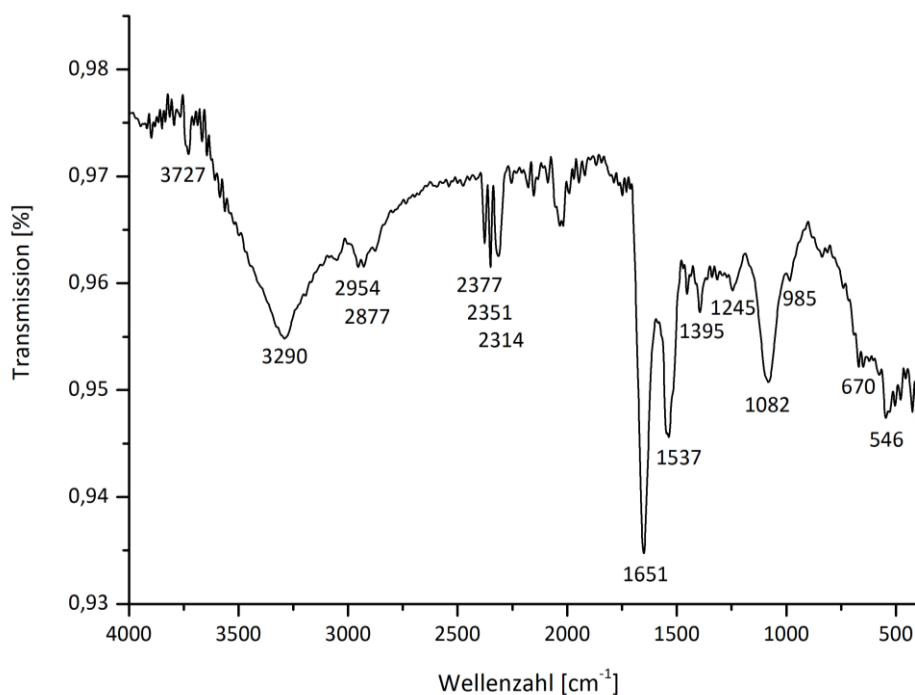


Abb. 4.59: FT-IR-Spektrum von ND-COOH (PC) + NH₂-TBA – Konjugaten, Beispiel 2 (Amidbindung).

Ein Vergleich der Aptamerspektren in den Abbildungen A-5.1 und A-5.2 offenbart einige Unterschiede, die aufgrund der annähernd gleichen DNA-Sequenzen als auch gleicher 5'-Modifikationen nicht plausibel erscheinen. So fehlen im Spektrum von TBA 00151326_3 (Beispiel 2) Banden im Bereich der O–H- und N–H- bzw. C–H-Streckschwingungen im Wellenzahlbereich zwischen 3600–3200 cm⁻¹ bzw. 2900–2800 cm⁻¹. Dagegen findet die intensive Bande mit den drei Maxima im Spektrum von TBA 00151326_3 keine Entsprechung im Spektrum von TBA 127316, ist aber ebenso in den Spektren weiterer IBA-Aptamere zu finden.

Obwohl grundsätzlich auch mit der Adsorption von DNA an die Partikeloberflächen zu rechnen ist, liefert das Vorhandensein der Amid-Banden den Nachweis für eine erfolgreiche Konjugation der Biomoleküle an die ND-Oberflächen. Insbesondere das Erscheinen von Amid-II in den Spektren der Konjugate (beim ND-Ausgangsmaterial nicht vorhanden) weist auf die Ausbildung von Amidbindungen hin. Inwieweit Amidstrukturen in den DNA-Basen zu diesen Schwingungen beitragen, ist nicht bekannt. Zumindest für das Beispiel 2 (Abb. A-5.2, $\text{NH}_2\text{-TBA}$) ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei den Banden an diesen Positionen nicht um Amidbanden handelt, da Amid-II bei sekundären Amiden schwächer als Amid-I ausgeprägt ist [Gre02].

ND-NH₂ (PC) + COOH-TBA – (Abb. 4.60)

Die zweite Variante zur Generierung von Amidbindungen geht von aminomodifizierten ND, hier ND-NH₂ (PC) (Lysin), und COOH-Aptameren aus (Abb. 4.60). Auffallend ist eine nahezu komplette Übereinstimmung mit dem Spektrum in Abbildung 4.59, die Zuordnung der Banden kann daher in gleicher Weise erfolgen. Eine Ausnahme stellt die Zuordnung der C–H-Streckschwingungen dar: Wie auch bei den aminomodifizierten ND, sprechen die Bandenlagen eher für Schwingungen von CH₂-Gruppen. Spektrenvergleich: In Abbildung A-5.3.

- FT-IR: 3297 $\nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, 2933 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2866 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1652 $\nu(\text{C=O})/\delta(\text{O-H})$, 1533 $\delta(\text{N-H})$, 1392 $\delta(\text{C-O-H})$, 1229, 1058 $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})$, 874, 673, 536, 477, 412 cm^{-1} .

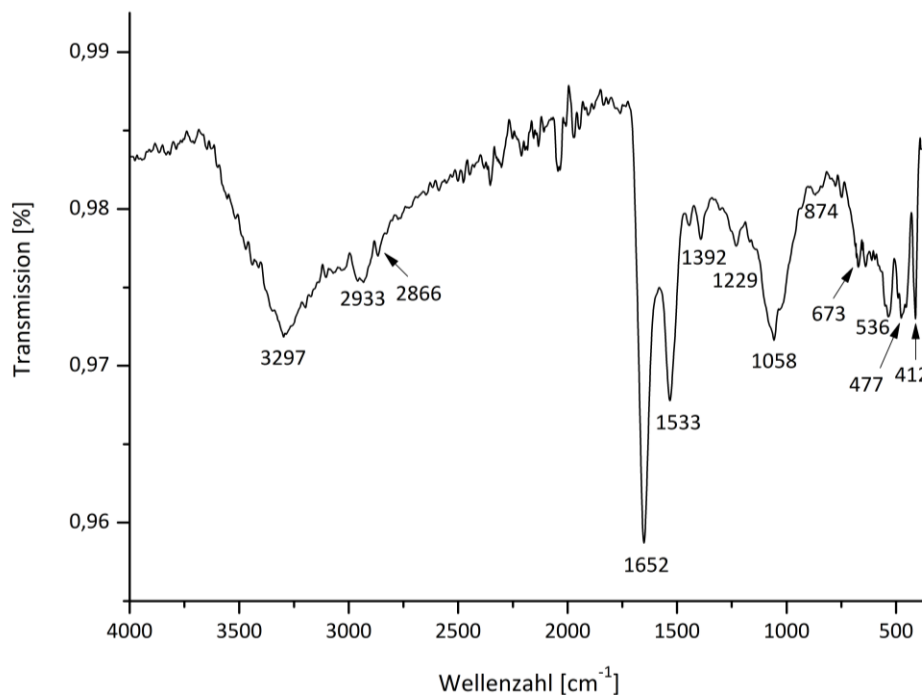


Abb. 4.60: IR-Spektrum von ND-NH₂ (Lysin) (PC) + COOH-TBA – Konjugaten (Amidbindung).

In Abb. 4.61 erfolgt ein Vergleich der Spektren von Konjugaten, die durch Amidbindungen erzeugt wurden. Alle drei Spektren aus den Abbildungen 4.58 bis 4.60 weisen die für Amide typischen Amid-I- und -II-Banden im Bereich um 1650 und 1530 cm^{-1} auf.

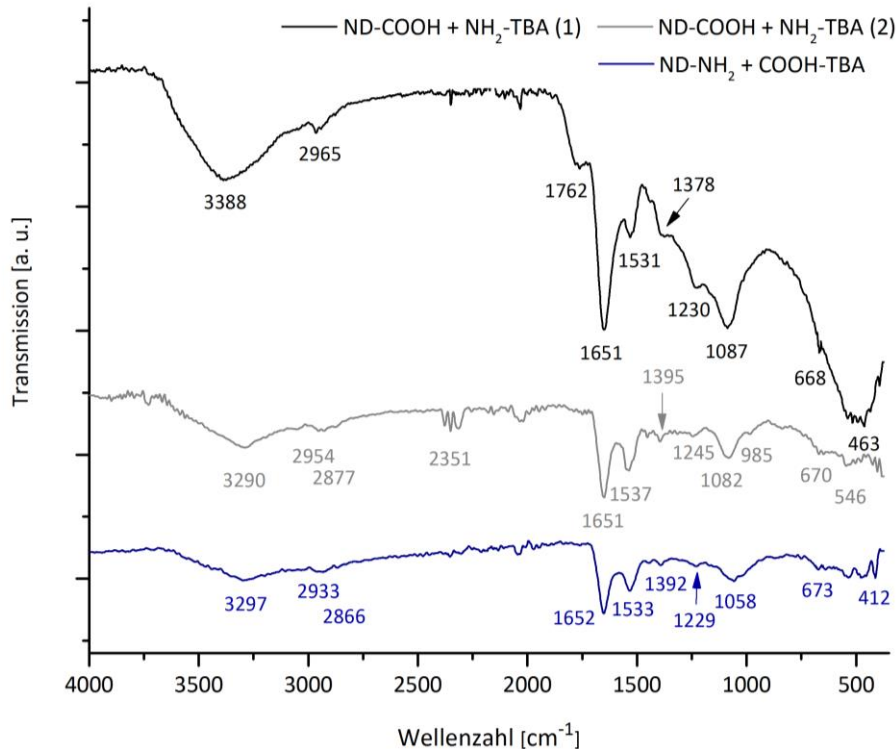


Abb. 4.61: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten aus Versuchen zur Amidbindung.

Im Fall des Spektrums von ND-NH₂ – COOH-TBA sind diese Absorptionen bereits im Ausgangsmaterial ND-NH₂ nachweisbar (Abb. 4.55). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Einführung der Aminogruppen bei den verwendeten ND durch die Adsorption von PLL erfolgte. In dessen Molekülstruktur sind bereits zahlreiche Amidbindungen enthalten, die die entsprechenden Absorptionen auch ohne die Verbindung mit Aptameren verursachen. Letztendlich kann ein Erfolg der Konjugation anhand qualitativer Untersuchungen nicht sicher bestätigt werden, obwohl die Lage der Banden sehr dafür spricht. Sicherheit könnten in dieser Hinsicht ausschließlich quantitative Untersuchungen der Konjugate oder der Einsatz weiterer Analyseverfahren, wie z. B. der Massenspektrometrie geben.

In Auswertung der Versuche zur Konjugation über Amidbindungen wird daher festgehalten, dass für einen eindeutigen Nachweis dieser Bindungen mittels qualitativer IR-Spektroskopie die Modifikation von ND mit PLL nicht geeignet ist. Versuche zur Generierung von Amidbindungen sollten mit silanisierten ND durchgeführt werden, da die Silan-Moleküle zwar Aminogruppen, aber keine Amidbindungen enthalten.

4.3.2.2 Konjugation über Phosphodiesterbindungen

An dieser Stelle werden drei Spektren von Konjugaten gezeigt, die nach den unter 3.4.3 beschriebenen Methoden a), b) und c) hergestellt wurden. Im Abschnitt 4.4 werden Fluoreszenzaufnahmen aller vier Konjugatvarianten vorgestellt.

a) ND-OH (T) (S) + dsDNA – (Abb. 4.62)

Im Unterschied zu anderen hier gezeigten Spektren liegt eine $\nu(\text{C-H})$ -Bande bei so hohen Wellenzahlen, dass diese Zuordnung fraglich ist. Da in diesem Bereich jedoch keine anderen Schwingungen zu erwarten sind, ist eine Verschiebung von $\nu(\text{C-H})$ wahrscheinlich. Neben der mittleren Bande bei 1649 cm^{-1} sind vor allem die Doppelbanden bei $1435/1405\text{ cm}^{-1}$ und $1014/950\text{ cm}^{-1}$ hervorzuheben. Für die erstgenannte kommen im Prinzip lediglich $\delta(\text{C-H})$ (1435 cm^{-1}) oder $\delta(\text{O-H})$ in Frage, da in diesem Bereich keine der sonst für ND bzw. ND-Konjugate typischen Schwingungen auftreten. Die zweite Doppelbande scheint vor allem auf Schwingungen von Ether- und Aminogruppen rückföhrbar zu sein. Spektrenvergleich: In Abbildung A-5.4.

- FT-IR: $3398\ \nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, $2998\ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)?$, $2914\ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $1649\ \nu(\text{C=O})/\nu(\text{C=C})/\nu(\text{C=N})/\delta(\text{O-H})/\delta(\text{N-H})_{\text{ip}}$, $1435\ \delta(\text{C-O-H})/\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)/\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $1405\ \delta(\text{C-O-H})$, $1312\ \nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-N})/\delta(\text{O-H})/\delta(\text{C-O-H})$, $1014\ \nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-N})$, $950\ \nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-N})/\delta(\text{O-H})_{\text{oop}}/\gamma(\text{OH...O})_{\text{oop}}$, $700, 510\text{ cm}^{-1}$.

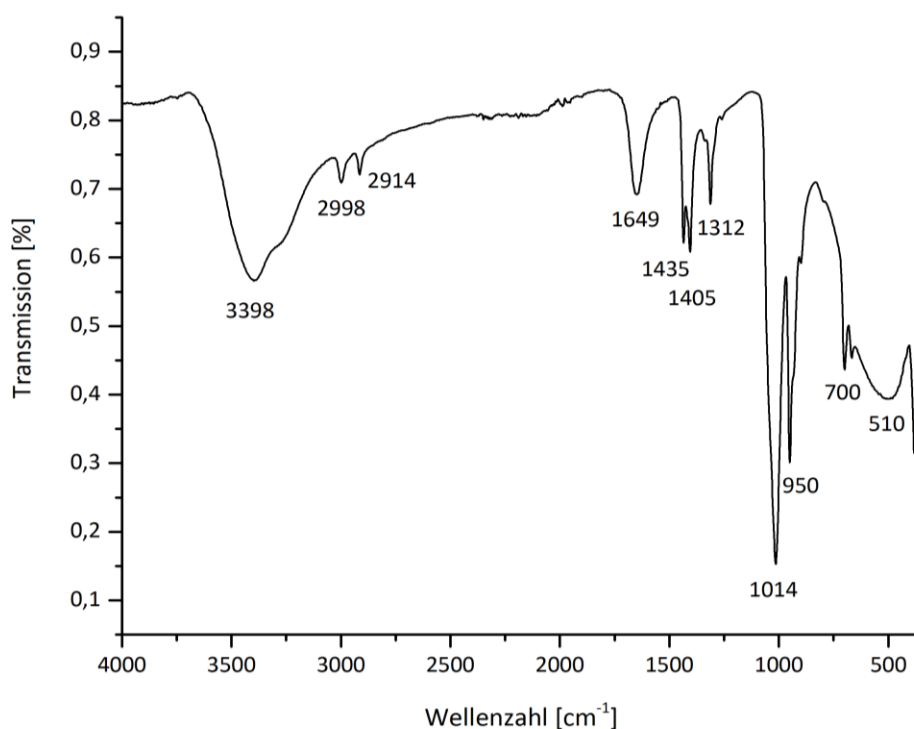


Abb. 4.62: FT-IR-Spektrum von ND-OH (T) (S) + dsDNA – Konjugaten (Phosphodiesterbindung).

Die Ligation von dsDNA führte bei ND (S) zu mehreren starken Banden, was auf eine hohe Anzahl funktioneller Gruppen hinweist (Abb. 4.62). Dadurch verändert sich das Erscheinungsbild des Spektrums im Vergleich zu demjenigen des Ausgangsmaterials erheblich. Besonders im Bereich der Streckschwingungen von O–H- und N–H-Gruppen fällt jetzt eine sehr starke Bande auf, die im Spektrum der modifizierten ND (S) nicht vorhanden ist. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum der mit dsDNA ligierten ND-OH (ITC) lediglich Banden mit geringer Intensität, die auf weniger Schwingungen und damit weniger funktionelle Gruppen hinweisen (Abb. 4.64). Möglicherweise ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass das Enzym Ligase einen DNA-Baustein benötigt, um seine Funktion erfüllen zu können.

b) ND-OH (T) (PC) + ssDNA (TBA) – Abbildung 4.63

Das Spektrum dieser Konjugate zeigt sehr intensive Absorptionen der C–H-Gruppen an. Die Bande bei 1639 cm^{-1} wird $\delta(\text{O–H})$ und $\nu(\text{C=O})$ (u. a. von Amid-I) zugeordnet. Außerdem können $\delta(\text{N–H})$ von Aminen sowie C=C- und C=N-Schwingungen beteiligt sein, die Bestandteil der Heterozyklen in den DNA-Basen sind. Die Bande bei 1522 cm^{-1} wird der kombinierten $\nu(\text{C–N})/\delta(\text{N–H})$ -Schwingung von Amid-II zugerechnet. Es folgen einige mittlere Banden im Bereich zwischen 1500 und 1200 cm^{-1} . Die Schwingungen bei 1466 und 1343 cm^{-1} werden durch Deformation von C–H- bzw. C–O–H-Gruppen, diejenigen bei 1279 und 1242 cm^{-1} durch Streckung von C–O- und C–N-Gruppen verursacht. Es folgen Maxima bei 1107 und 1036 cm^{-1} , die als Doppelbande erscheinen und Streckschwingungen von C–O- bzw. C–O–C-Bindungen repräsentieren. Diese Doppelbande weist, neben den O–H- und N–H-Streckschwingungen, die intensivste Absorption in diesem Spektrum auf. Auch die Bande bei 964 cm^{-1} kann Streckschwingungen von C–O–C-Bindungen zugeordnet werden. Kipp-schwingungen einer isolierten aromatischen C–H-Gruppe können die Ursache der Bande bei 841 cm^{-1} sein, charakteristisch für diesen Wellenzahlbereich sind aber auch Absorptionen symmetrischer Streckschwingungen von C–O–C-Gruppen [Smi99]. Im Gegensatz zu allen anderen Konjugatspektren, wie auch den Spektren der mit Biomolekülen modifizierten ND, liegt hier eine wesentlich höhere Intensität der Banden der Konjugate im Vergleich zu DNA vor (Abb. A-5.5). Diese erweist sich, ebenso wie eine sehr viel höhere Intensität von DNA-Banden, als nachteilig für die vergleichende Darstellung in einem gemeinsamen Spektrum. Weniger intensive Banden treten dann kaum noch im Spektrum hervor.

- FT-IR: 3322 cm^{-1} $\nu(\text{O–H})/\nu(\text{N–H})$, 2930 cm^{-1} $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2883 cm^{-1} $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1639 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})/\nu(\text{C=C})/\nu(\text{C=N})/\delta(\text{O–H})/\delta(\text{NH}_2)_{\text{ip}}$, 1522 cm^{-1} $\nu(\text{C–N})/\delta(\text{N–H})$, 1466 cm^{-1} $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)/\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)/\delta(\text{C–O–H})$, 1343 cm^{-1} $\delta(\text{C–O–H})$, 1279 und 1242 cm^{-1} $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})/\nu(\text{C–N})$, 1107 cm^{-1} $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})$, 1036 cm^{-1} $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})$, 964 cm^{-1} $\nu(\text{C–O–C})$, 841 cm^{-1} $\omega(\text{C–H})/\nu_{\text{s}}(\text{C–O–C})$, 477 cm^{-1} .

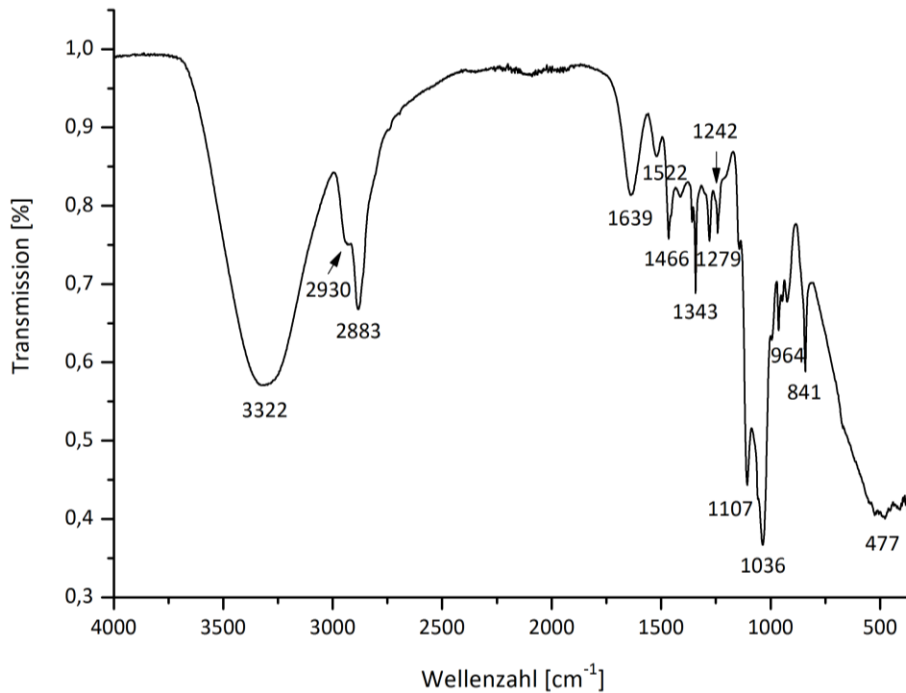


Abb. 4.63: FT-IR-Spektrum von ND-OH (T) (PC) + TBA – Konjugaten (Phosphodiesterbindung).

c) ND-OH (ITC) + dsDNA – Abbildung 4.64

Betreffs der Bandenlagen besteht in Abbildung 4.64 – bei wesentlich geringerer Intensität der Absorptionen – eine weitgehende Übereinstimmung zum vorhergehenden Spektrum (Abb. 4.63). Dementsprechend erfolgt auch die Zuordnung der Banden. Einige schwache Absorptionen, z. B. bei 1411 und 1246 cm^{-1} , sind auf Deformationsschwingungen von C–H- und C–O–H-Gruppen, bzw. C–N-Streckschwingungen zurückzuführen. Die nächsten drei Banden bei 1096, 1015 und 948 cm^{-1} sind in ihrer der Lage mit denen bei 1107, 1036 und 964 cm^{-1} in Abbildung 4.63 vergleichbar, wobei lediglich eine geringe Verschiebung um etwa 15 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen vorliegt. Unterschiede zum vorhergehenden Konjugatspektrum bestehen z. B. im Fehlen der scharfen Bande im Bereich um 840 cm^{-1} und der Ausprägung mehrere Maxima um etwa 3300 cm^{-1} . Spektrenvergleich: In Abbildung A-5.6.

- FT-IR: 3392 und 3268 $\nu(\text{O–H})/\nu(\text{N–H})$, 2915 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2870 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1641 $\nu(\text{C=O})/\nu(\text{C=C})/\nu(\text{C=N})/\delta(\text{O–H})/\delta(\text{NH}_2)_{\text{ip}}$, 1515 $\nu(\text{C–N})/\delta(\text{N–H})$, 1411 $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)/\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)/\delta(\text{C–O–H})$, 1246 $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})/\nu(\text{C–N})/\nu(\text{P=O})$, 1096 $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})$, 1015 $\nu(\text{C–O})/\nu(\text{C–O–C})/\nu(\text{P–O–H})$, 948 $\nu(\text{C–O–C})/\nu(\text{P–O–H})$, 707, 635, 538 cm^{-1} .

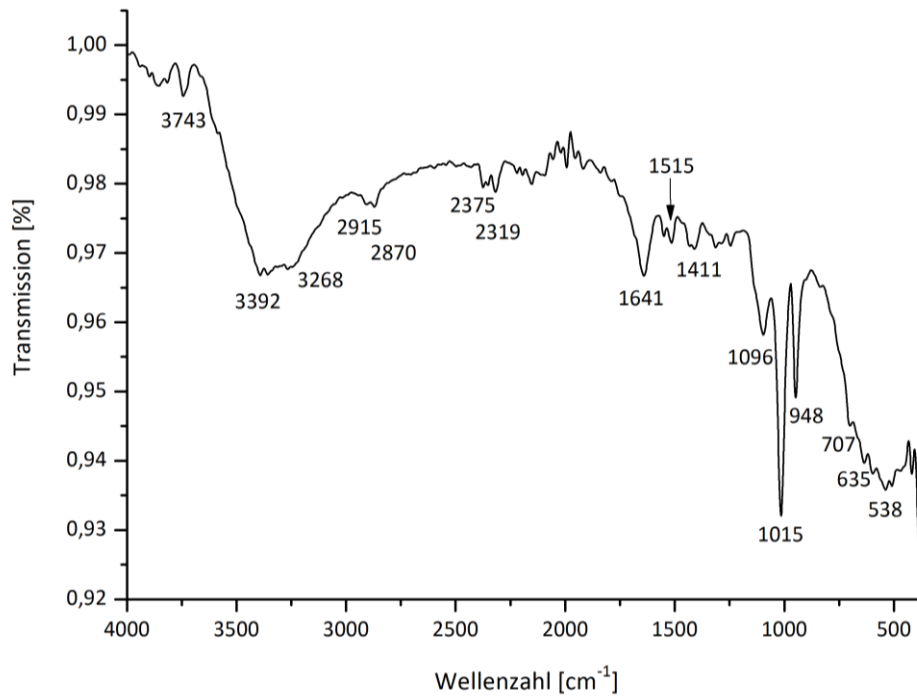


Abb. 4.64: FT-IR-Spektrum von ND-OH (ITC) + dsDNA – Konjugaten (Phosphodiesterbindung).

In Abbildung 4.65 wird das Vergleichsspektrum zweier Konjugate mit Phosphodiesterbindungen gezeigt. Wegen der geringen Intensität der Banden des Spektrums in Abbildung 4.64 wäre dessen Einbeziehung in den Vergleich nicht aussagekräftig.

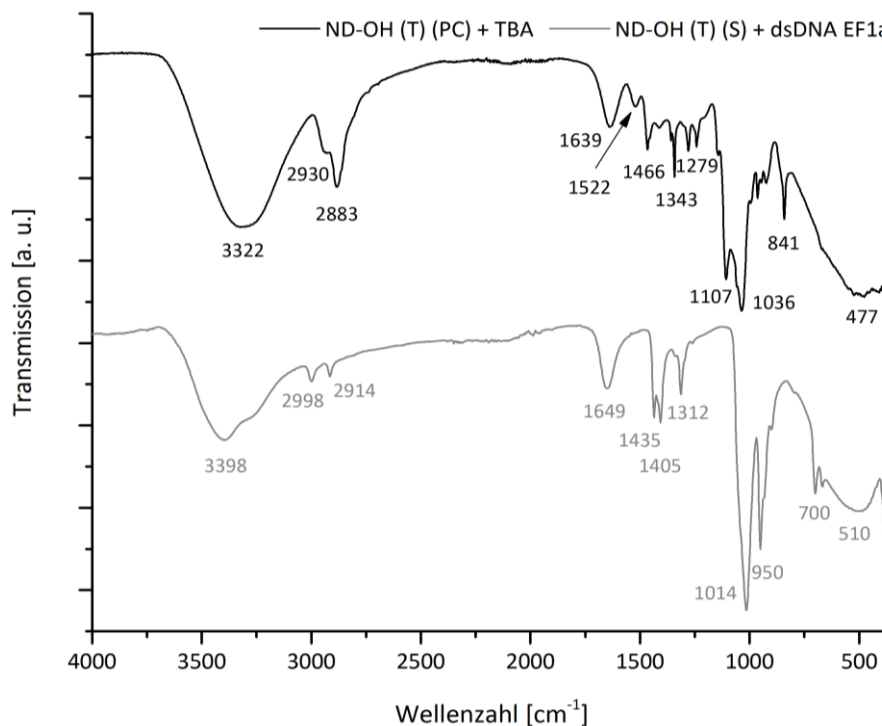


Abb. 4.65: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-Aptamer-Konjugaten (Phosphodiesterbindung).

Der Diskussion zu den Spektren werden einige Anmerkungen zur Ligation vorangestellt. (DNA-)Ligasen sind Enzyme, die Einzelstrangbrüche in doppelsträngiger DNA verschließen (ligieren) können. Damit katalysieren sie die letzten Teilschritte bei der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und bei der Rekombination von DNA [028]. Sie schließen die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem, und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen Ende von DNA-Molekülen [Kni95].

Daraus ergeben sich folgende Fragen: Kann das Enzym seine Funktion auch bei einzelsträngiger DNA erfüllen? Akzeptiert es die zur Verfügung stehenden OH-Gruppen auch dann, wenn diese nicht Bestandteil von Desoxyribose sind? In den Abbildungen 4.63 und 4.64 ist DNA durch das Auftreten zusätzlicher Banden nachweisbar, die Spektren zeigen keine wesentlichen Unterschiede zueinander, und – noch wichtiger – es besteht eine auffallende Ähnlichkeit mit dem IR-Spektrum in der Referenzliteratur (ND-OH (T) + dsDNA, [USM+02]). Daraus kann auf zwei Möglichkeiten geschlossen werden: Entweder war die Ligation in allen Fällen erfolgreich, oder es handelt sich in allen Fällen lediglich um eine Adsorption der DNA-Moleküle an die modifizierten Diamantoberflächen.

Für den Nachweis von Estern sind nach GREMLICH [Gre02] sowie GÜNZLER & GREMLICH [GG03] eine Carbonylbande um 1740 cm^{-1} sowie eine etwas schwächeren $\nu(\text{C}-\text{O})$ -Kontrollbande zwischen 1300 und 1000 cm^{-1} erforderlich. Allein das Vorhandensein der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Bande reicht noch nicht aus, um einen Ester sicher zu erkennen – dessen Identifizierung bedarf außerdem der Kontrollbande im o. g. Bereich. Diese Banden fehlen in beiden Spektren. Dabei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei Phosphodiestern nicht um Carbonsäureester handelt: An die Stelle des zentralen C-Atoms tritt hier ein P-Atom, das außerdem fünf Bindungen ausbilden kann. Allerdings sind bei Thymidin-modifizierten ND auch Carbonsäureester-Bindungen zu erwarten, deren Banden in den Spektren ebenso fehlen.

Ein Nachweis der Konjugation von DNA muss also durch Absorptionen von Phosphorverbindungen erbracht werden. Auf die Lage der Banden von Phosphatgruppen wurde bereits eingegangen, doch lässt sich nur ein Teil dieser Schwingungen durch Banden in den entsprechenden Bereichen der DNA- bzw. Konjugatspektren nachweisen. Die Unterschiede zwischen ND-OH- und Konjugatspektren weisen jedoch auf Veränderungen in der chemischen Struktur des untersuchten Materials hin, woraus auf die Präsenz von DNA geschlossen werden kann. USHIZAWA *et al.* [USM+02] beziehen sich zum Beweis einer erfolgreichen Anbindung der Biomoleküle auf die Arbeiten von Tsuboi *et al.* [Tsu61] und Shimanouchi *et al.* [STK64]. Die Autoren führen den Nachweis von DNA auf Banden bei 1100 bzw. $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ zurück, die den Streckschwingungen von $-\text{PO}_2^-$ -Gruppen bzw. den aromatischen Strukturen der Basen angehören. Als zusätzlicher Beweis für das Vorhandensein von Esterbindungen galt die Hydrolyse der Konjugat-Proben mit NaOH, nach welcher die entscheidenden Banden (bei erneuter FT-IR-Untersuchung) verschwunden waren.

Ob damit jedoch der Nachweis einer kovalenten Anbindung von DNA-Molekülen an ND erbracht werden kann, ist fraglich: Phosphodiesterbindungen sind bereits in größerer Anzahl im Zucker-Phosphat-Rückgrat von DNA enthalten. Erbringt man den Beweis für die Gegenwart von Nucleinsäuren, kann daraus nicht zwingend auf kovalente Bindungen zu Nanopartikeln geschlossen werden. Ebenso ist, vollständig oder teilweise, eine Adsorption von DNA in Betracht zu ziehen.

In einer weiteren Arbeit von Tsuboi [Tsu61] werden die IR-Spektren von NaDNA (Natriumsalz von DNA) untersucht, wonach drei Banden auf die Präsenz von Phosphatgruppen hinweisen. Diese werden den antisymmetrischen Streckenschwingungen von PO_2^- (1220 cm^{-1}), den symmetrischen Streckenschwingungen von PO_2^- (1084 cm^{-1}) und Streckenschwingungen von P–O-Gruppen (965 cm^{-1}) zugeordnet. Das ist besonders deshalb erwähnenswert, weil sowohl das Spektrum des Thrombin-Aptamers 127315, als auch dasjenige der dsDNA von *O. niloticus* in diesen Bereichen Absorptionen aufweisen. Dazu gehören Banden bei 1239, 1066 (Doppelbande mit zweitem Maximum näher an 1084 cm^{-1} , nicht beschriftet) und 965 cm^{-1} im Spektrum des Aptamers, sowie Banden bei 1238, 1076 und 965 cm^{-1} im dsDNA-Spektrum. Wird dieser Zuordnung gefolgt, können die entsprechenden Banden mit Phosphodiesterbindungen assoziiert werden. In den Konjugatspektren sind sie bei 1242, 1036 (in der intensiven Bande ist möglicherweise noch eine Absorption bei höheren Wellenzahlen enthalten) und 964 cm^{-1} (Abb. 4.63) bzw. 1246, 1096 und 948 cm^{-1} (Abb. 4.64) lokalisiert. Das Spektrum in Abbildung 4.62 zeigt dagegen lediglich eine Bande bei 950 cm^{-1} .

Aus heutiger Sicht wird zur Optimierung der Ligation von Aptameren an ND folgende Verfahrensweise vorgeschlagen: Als Test zur experimentellen Umsetzung ist zuerst der von Ushizawa *et al.* [USM+02] beschriebene Versuch durchzuführen. Die ND-Oberflächen sind ausschließlich mit DNA-Nucleotiden zu modifizieren, wobei es sich nicht zwingend um Thymidin handeln muss, da die entscheidende OH-Gruppe Bestandteil des Zuckers ist. Für die Ligation von Aptameren ist eine RNA-Ligase zu verwenden, die der Autorin im Versuchszeitraum noch nicht bekannt war und die inzwischen über verschiedene Anbieter wie NEB, BIORON oder Fisher Scientific erhältlich ist. Die Substrate der T4 RNA-Ligase schließen laut Angaben von NEB sowohl RNA und ssDNA als auch Dinucleosid-Pyrophosphate ein. Die Reaktion ist mit der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) verbunden.

Die kovalente Anbindung von DNA-Molekülen über Phosphodiesterbindungen kann mittels qualitativer FT-IR-Spektroskopie nicht sicher nachgewiesen werden, da Phosphodiester bereits Strukturbestandteile von Nucleinsäuren sind. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Konjugation ist daher der Einsatz anderer Nachweismethoden, wie z. B. der quantitativen FT-IR-Spektroskopie, empfehlenswert.

4.3.2.3 Konjugation über Isoharnstoffbindungen

In Bezug auf die Ausbildung von Isoharnstoffbindungen wurden ND-OH (ITC) und ND-OH (PC) als Ausgangsmaterialien eingesetzt. Die zugehörigen IR-Spektren sind in den Abbildungen 4.66 bis 4.68 dargestellt.

ND-OH (ITC) + NH₂-TBA – (Abb. 4.66)

Die dominierende starke Doppelbande bei 1653 und 1533 cm⁻¹ entspricht Amid-I und -II. Außerdem absorbieren in diesem Bereich C=C- und C=N-Bindungen. Die schwächeren Banden bei 1395 und 1232 cm⁻¹ werden auf $\delta(\text{C-O-H})$ bzw. $\nu(\text{C-N})$ zurückgeführt. Schließlich erscheint noch eine mittelstarke Bande bei 1070 cm⁻¹, die aus C-O- oder C-N-Streckschwingungen resultieren kann. Spektrvergleich: In Abbildung A-5.7.

- FT-IR: 3734, 3279 $\nu(\text{O-H})/\nu(\text{N-H})$, 2953 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2369, 2327, 1653 $\nu(\text{C=O})/(\text{C=N})/\delta(\text{N-H})_{\text{ip}}/\delta(\text{O-H})$, 1533 $\delta(\text{N-H})$, 1395 $\delta(\text{C-O-H})$, 1232 $\nu(\text{C-N})/\nu(\text{P-O})/(\text{P=O})$, 1070 $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-O-C})/\nu(\text{C-N})$, 667, 551, 475 cm⁻¹.

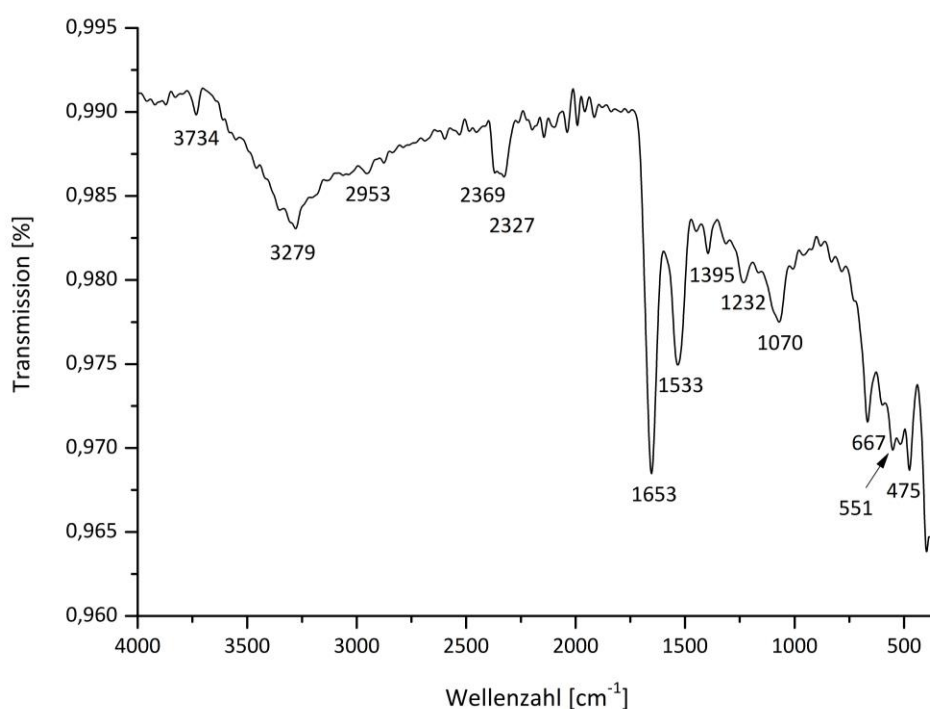


Abb. 4.66: FT-IR-Spektrum von ND-OH + NH₂-TBA – Konjugaten aus ND-OH (ITC) (Isoharnstoffbindung).

ND-OH (PC) + NH₂-TBA – (Abb. 4.67)

Auffällig ist das Fehlen von Banden im Bereich der O–H-, N–H- und C–H-Streckschwingungen, zumal diese in den Spektren der Ausgangsmaterialien vorhanden sind. Die Banden bei 1652 und 1522 cm⁻¹, die in Abbildung 4.66 noch deutlicher als Doppelbande ausgebildet sind, weisen eine etwas höhere Differenz zwischen den Maxima auf. Die Bande bei der kleineren Wellenzahl ist hier geringfügig nach rechts verschoben. Einschließlich der Absorption bei 1393 cm⁻¹ erfolgt aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der Bandenlagen die gleiche Zuordnung. Spektrenvergleich: In Abbildung A-5.8.

- FT-IR: 3734, 2378, 2349, 2315, 1652 (C=O)/(C=N)/δ(N–H)_{ip}, 1522 δ(N–H), 1393 δ(C–O–H), 1095 ν(C–O)/ν(C–O–C)/ν(C–N), 789, 552, 468 cm⁻¹.

Als Unterschiede zwischen den Konjugatspektren von ND (ITC) und ND (PC) sind aufzuzählen: Das Fehlen der Banden im Bereich der O–H-, N–H- und C–H-Streckschwingungen und einer Bande um 1232 cm⁻¹ in Abbildung 4.67 sowie deutliche Abweichungen im Fingerprintbereich unterhalb 800 cm⁻¹. Während dort in Abbildung 4.67 eine sehr starke und scharfe Bande bei 468 cm⁻¹ dominiert, enthält das Spektrum von ND-OH (ITC) mehrere ebenfalls starke Banden bei 667, 551 und 475 cm⁻¹. Dennoch ist festzuhalten, dass die Gemeinsamkeiten in den Spektren überwiegen und die Konjugate beider ND-Typen ein ähnliches Absorptionsverhalten zeigen.

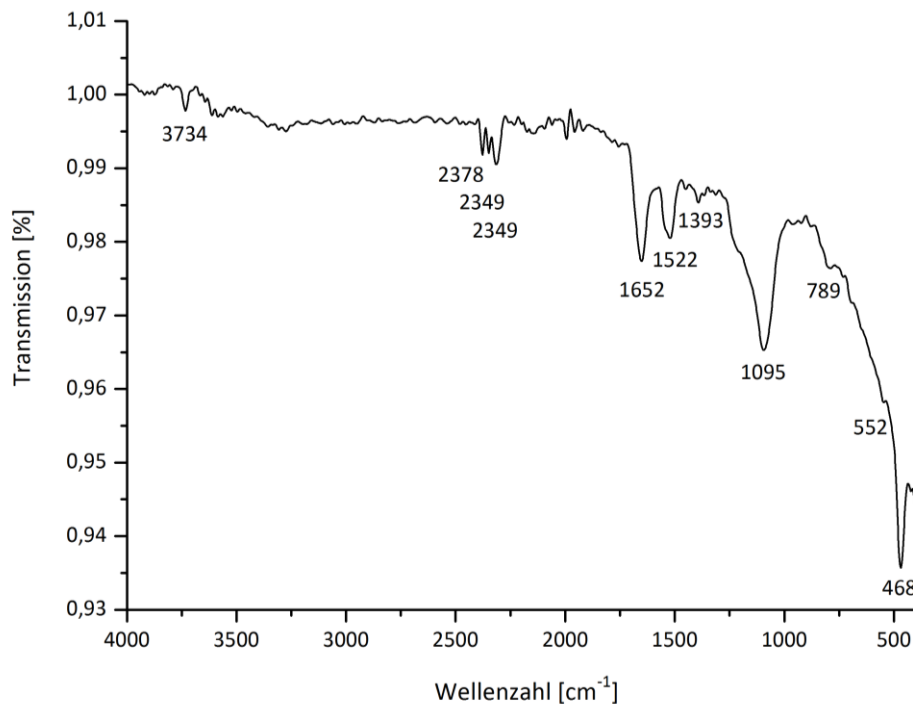


Abb. 4.67: FT-IR-Spektrum von ND-OH + NH₂-TBA – Konjugaten aus ND-OH (PC) (Isoharnstoffbindung).

In Abbildung 4.68 erfolgt die Gegenüberstellung der beiden Spektren von Konjugaten mit Isoharnstoffbindungen. Gemeinsamkeiten bestehen insbesondere in den ausgeprägten Amid-I- und Amid-II-Banden und einer Absorption von $\nu(\text{C-O})/\nu(\text{C-N})$ -Bindungen bei 1070 bzw. 1095 cm^{-1} , die im Spektrum der ND-OH (PC)-Konjugate eine deutlich höhere Intensität aufweist.

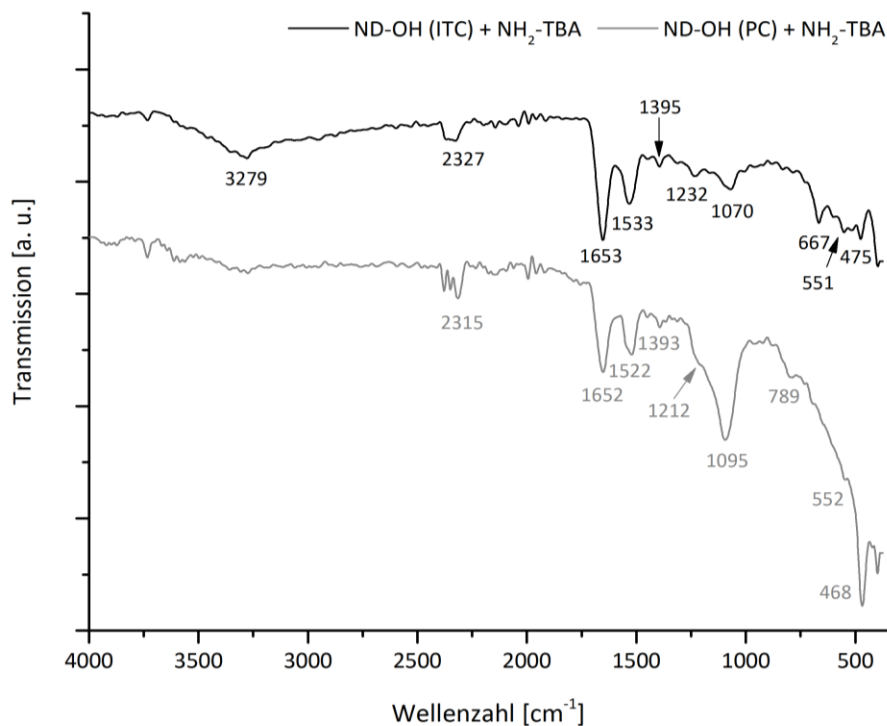


Abb. 4.68: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-Aptamer-Konjugaten aus ND-OH (PC) und ND-OH (ITC) (Isoharnstoffbindung).

Ein Vergleich mit den Spektren der Ausgangsmaterialien (Abb. A-5.7 und A-5.8) zeigt bei beiden ND-Typen das Verschwinden einer Bande bei 1712 bzw. 1752 cm^{-1} in den Konjugatspektren an. Gleiches ist bei zwei der drei gezeigten Konjugate (Abb. 4.59 und 4.60) mit Amidbindungen zu beobachten, beim dritten hat die Bande in diesem Bereich zumindest an Intensität verloren (Abb. 4.58). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass während der Konjugation mit DNA eine Reduktion von C=O-Doppelbindungen, z. B. durch die Reaktion mit entsprechenden nukleophilen Gruppen, auftritt.

Aufgrund fehlender Vergleichsdaten zur IR-Spektroskopie von Isoharnstoff bzw. Isoharnstoffbindungen, wird nachfolgend kurz auf den strukturverwandten Harnstoff eingegangen. Die hier gezeigten Ergebnisse bilden somit eine Basis für zukünftige FT-IR-Untersuchungen von Isoharnstoffbindungen.

Nach COLTHUP *et al.* [CDW90] zeigen die IR-Spektren von Harnstoffen große Ähnlichkeiten zu denen von Amiden, wobei Schwingungen von C=O- und NH_2 -Gruppen nur geringe Verschiebungen gegen-

über den FT-IR-Spektren von Amiden aufweisen. Als Bestätigung dieser Aussage können die Spektren der Amidbindungen in den Abbildungen 4.58 bis 4.60 betrachtet werden. In Abhängigkeit von den jeweiligen Resten an den beiden N-Atomen lassen sich für Harnstoff Schwingungen von NH₂-, N–H-, C=O- und C–N–H-Bindungen nachweisen [CDW90].

Diese Angaben können mit Daten von PIASEK & URBAŃSKI [PU62], die ebenfalls durch IR-Spektroskopie von Harnstoff gewonnen wurden, ergänzt werden: Banden im Bereich um 790 cm⁻¹, die in sehr schwacher Ausprägung auch in den Abbildungen 4.66 und 4.67 auftreten, sind nach Auffassung der Autoren wahrscheinlich auf Kipp- oder Pendelschwingungen von NH₂-Gruppen zurückzuführen. Die gleiche Art von Schwingungen wird Banden im Bereich von 1060-1050 cm⁻¹ zugrunde gelegt. Diese erscheinen in Abbildung 4.66 bei 1070 cm⁻¹, in Abbildung 4.67 mit größerer Abweichung bei 1095 cm⁻¹. Andere Absorptionen fehlen demgegenüber in beiden Spektren, so beispielsweise eine Bande bei etwa 1470-1460 cm⁻¹, die von den Autoren den C–N-Streckschwingungen zugeordnet wird.

Über die Konjugation von ND mit Biomolekülen oder anderen Verbindungen wurde schon vielfach berichtet. Häufig handelt es sich dabei um Proteine, wie z. B. Antikörper, [CPT+06, HC04, MPG+09, SRL+09] oder Peptide [KLJS06, VMS+08], aber auch einzelne Aminosäuren [LGMK04] oder Vitamine wie Biotin [DMM+03, HCT+08]. Andere, ebenfalls häufig eingesetzte Gruppen von Substanzen sind die Antibiotika und Zytostatika, die eine wichtige Rolle in der Tumorthherapie spielen [BYS09, CZC+11, HPOH07, MH13, MPL+13]. Über die Adsorption von humanem Blutplasma an ND-Oberflächen wurde von MONA *et al.* [MTK+12] berichtet. Nicht immer wurden die Komplexe mittels FT-IR-Spektroskopie untersucht. Zumeist vollzog sich zudem die Anlagerung der Substanzen an die ND-Oberflächen über Adsorptionsprozesse, sodass über die hier thematisierten Bindungen keine Aussagen hinsichtlich infrarotspektroskopischer Untersuchungen getroffen werden können.

Ein Beispiel für die Konjugation von Nukleinsäuren an ND ist die von KAUR *et al.* [KCM+12] beschriebene Anbindung von Plasmid-DNA und siRNA an mit Lysin modifizierte, positiv geladene Detonationsdiamanten über elektrostatische Wechselwirkungen. Der Nachweis über den Erfolg der Konjugationen wurde in diesem Fall jedoch nicht durch FT-IR-Spektroskopie, sondern durch Gelelektrophorese geführt. Auch die bereits in der Einleitung erwähnte Arbeit von ZHANG *et al.* [ZNL+15], in der über die nanometergenaue Positionierung fluoreszierender ND an DNA-Origami-Strukturen berichtet wird, beinhaltet andere Methoden zum Nachweis der Reaktionserfolge.

Für die hier gezeigten FT-IR-Spektren von ND-DNA-Konjugaten liegen nach Kenntnis der Autorin – mit Ausnahme der unter 4.3.2.2 zitierten Arbeit von USHIZAWA *et al.* [USM+02] – keine direkten Vergleichsdaten in der Literatur vor.

4.4 Fluoreszenzmikroskopie an Nanodiamant-Aptamer-Konjugaten

Die unter 3.4 beschriebene Konjugatbildung zwischen ND und DNA wird anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen nachgewiesen. Für jede Konjugationsvariante liegt mindestens eine Aufnahme vor. Die Abbildungen umfassen jeweils eine Fluoreszenz- und eine Hellfeldaufnahme des entsprechenden Bildabschnittes. Den Abbildungen mit fluoreszenzmarkierter DNA sind Kontrollen mit DNA ohne Fluoreszenzlabel gegenübergestellt. Beispielhaft werden außerdem Autofluoreszenzen von ND und Aptameren gezeigt.

4.4.1 Konjugation über Amidbindungen

Für die Konjugation von NH_2 -Aptameren an ND-COOH wurden ND-COOH (PC) eingesetzt (Abb. 4.69 bis 4.74, Tab. 3.13), im umgekehrten Fall ND-NH₂ (Lysin) (PC), ND-NH₂ (Lysin) (S) und ND-NH₂ (ITC) für die Konjugation mit COOH-Aptameren (Abb. 4.75 bis 4.85, Tab. 3.14).

a) ND-COOH + NH₂-TBA

Die den Abbildungen 4.69 bis 4.74 zugrundeliegenden Konjugationen verliefen erfolgreich, indem Konjugate mit FAM-markierten Aptameren fluoreszierten, während die Kontrollen keine Fluoreszenz zeigten. Die Fluoreszenz der Konjugate ist in jedem Fall stark ausgeprägt.

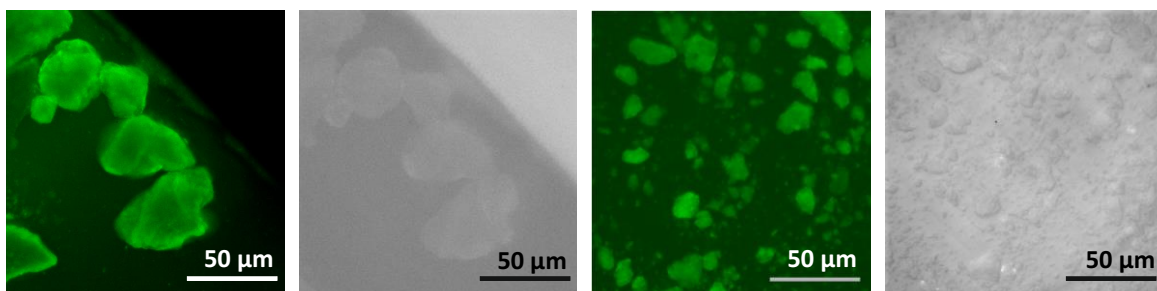


Abb. 4.69: ND-COOH (PC) + 5'-NH₂-TBA-FAM-3' (00151326_2).

Abb. 4.70: ND-COOH (PC) + 5'-NH₂-TBA-FAM-3' (00151326_2).

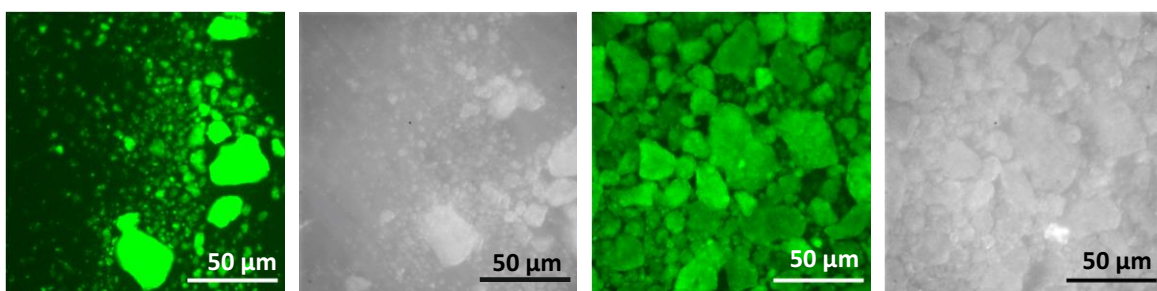


Abb. 4.71: ND-COOH (PC) + 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1).

Abb. 4.72: ND-COOH (PC) + 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1).

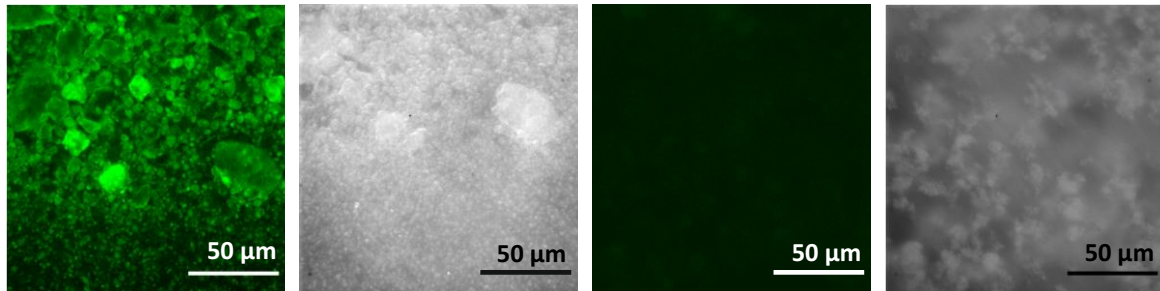


Abb. 4.73: ND-COOH (PC) + 5'-NH₂-TBA-FAM-3' (00160757_2).

Abb. 4.74: ND-COOH (PC) + 5'-NH₂-TBA-GCTAGC-3' (127317).

b) ND-NH₂ + COOH-TBA

Die Konjugationen von carboxylierten Aptameren an ND-NH₂ verliefen erfolgreich für ND-NH₂ (Lysin) (PC) (Abb. 4.75 bis 4.78), ND-NH₂ (ITC) (Abb. 4.79 bis 4.81) und ND-NH₂ (Lysin) (S) (Abb. 4.83 bis 4.85). Bei Reaktionen mit Aptameren ohne Fluoreszenzlabel war keine, bzw. nur eine sehr schwache Fluoreszenz (Abb. 4.78 und 4.81) zu beobachten. In Abbildung 4.82 wird anhand von ND-NH₂ (ITC) gezeigt, dass bei unkonjugierten ND keine Autofluoreszenz auftritt.

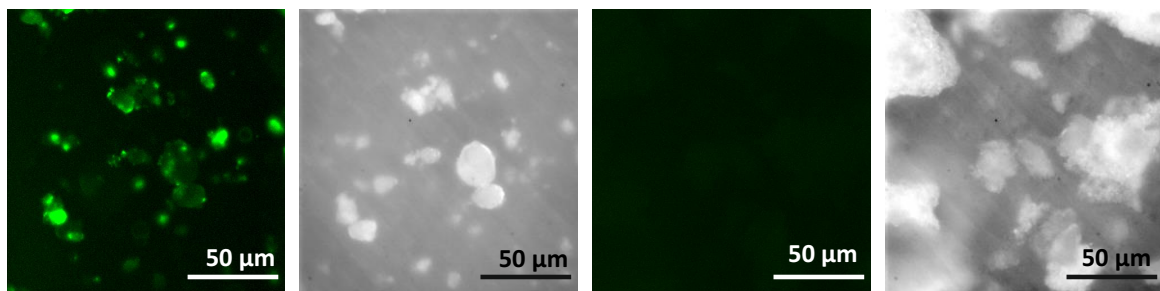


Abb. 4.75: ND-NH₂ (Lysin) (PC) + 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4).

Abb. 4.76: ND-NH₂ (Lysin) (PC) + 5'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318).

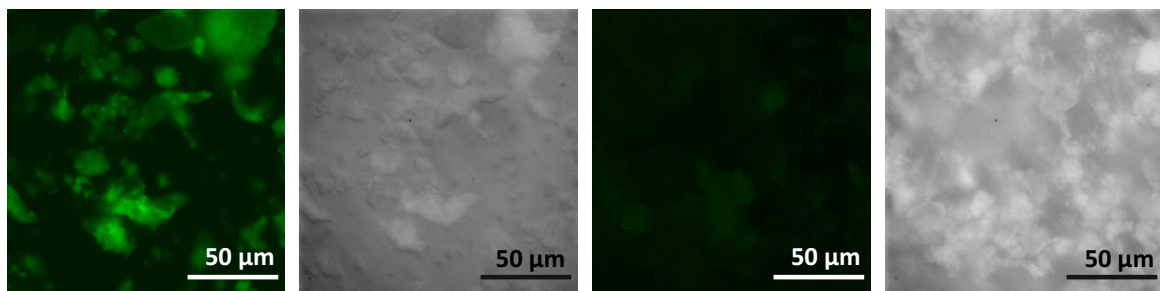


Abb. 4.77: ND-NH₂ (Lysin) (PC) + 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4).

Abb. 4.78: ND-NH₂ (Lysin) (PC) + 5'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318).

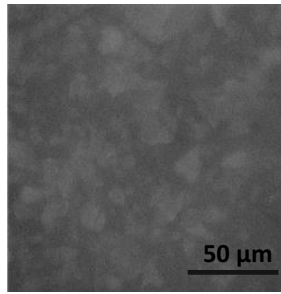
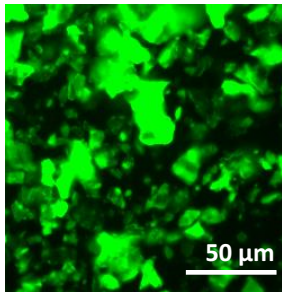


Abb. 4.79: ND-NH₂ (ITC) + 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4).

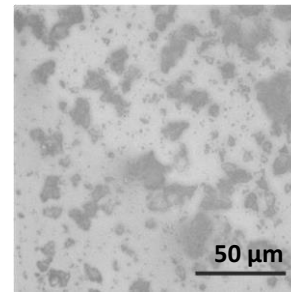
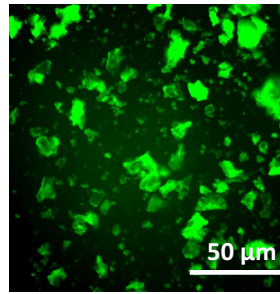


Abb. 4.80: ND-NH₂ (ITC) + 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4).

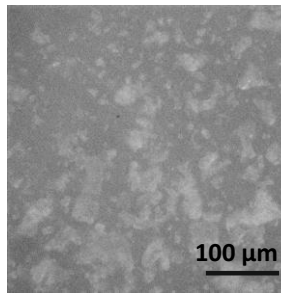
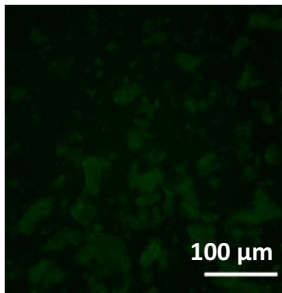


Abb. 4.81: ND-NH₂ (ITC) + 5'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318).

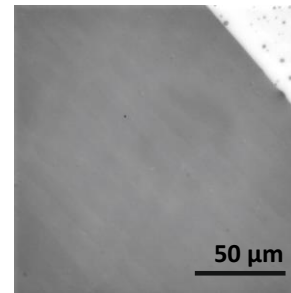
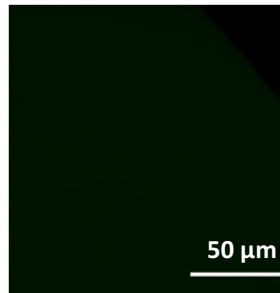


Abb. 4.82: Autofluoreszenz von ND-NH₂ (ITC).

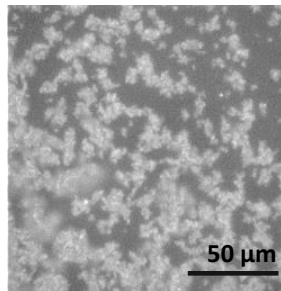
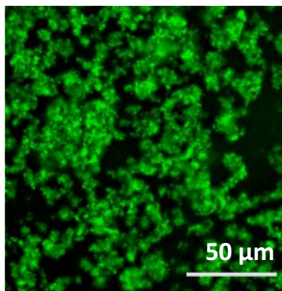


Abb. 4.83: ND-NH₂ (Lysin) (S) + 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4).

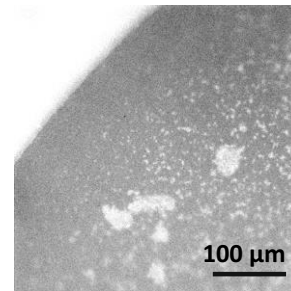
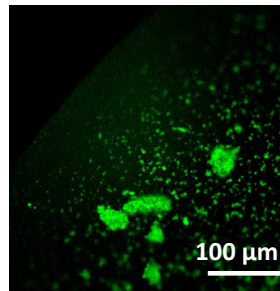


Abb. 4.84: ND-NH₂ (Lysin) (S) + 5'-COOH-TBA-FAM-3' (00151326_4).

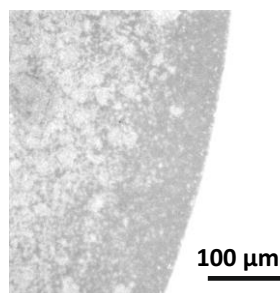
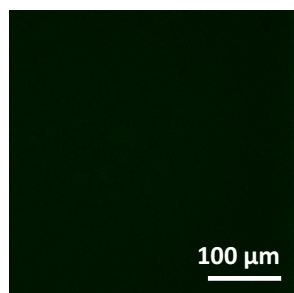


Abb. 4.85: ND-NH₂ (Lysin) (S) + 5'-COOH-TBA-GACGTC-3' (127318).

Mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie kann die Präsenz von Aminogruppen auf den Oberflächen von ND (S) durch die Funktionalisierung mit PLL bestätigt werden (Abb. 4.83 bis 4.85), worauf bereits das Ergebnis der FT-IR-Spektroskopie hindeutet (Abb. 4.56). Da diese Partikel nicht mit Carboxylgruppen modifiziert sind, was ursprünglich angenommen wurde, war der Erfolg der Versuche nicht von vornherein gegeben. Als Voraussetzung für die Ausbildung von Amidbindungen

müssen die Partikel Carboxylgruppen an ihren Oberflächen tragen, an die die Aminogruppen von PLL kovalent binden können. Ist die Funktionalität von ND (S) durch fehlende Carboxylgruppen nicht gegeben, kann dennoch eine Anlagerung von PLL stattfinden, wenn dieses nicht kovalent, sondern durch Adsorption bzw. über elektrostatische Wechselwirkungen an die ND bindet. Als Voraussetzung für die elektrostatische Anziehung des positiv geladenen PLLs müssen die Partikeloberflächen negativ geladen sein, wobei der pH-Wert des Mediums eine Rolle spielt. Diese Möglichkeit bietet sich als Begründung für den positiven Verlauf der Versuche mit ND-NH₂ (Lysin) (S) an.

Weiterhin ist anzumerken, dass die Konjugation von ND-COOH mit aminomodifizierten (Abb. 4.69 und 4.70) und unmodifizierten Aptameren (Abb. 4.71 und 4.72) jeweils mit gleich hoher Fluoreszenzintensität einherging. Dieses Ergebnis liegt darin begründet, dass entlang einzelsträngiger DNA-Moleküle freie Aminogruppen an den Nukleinbasen vorliegen (Abb. 3.11), die nicht wie bei dsDNA mit komplementären Basen gepaart sind. Alle diese Aminogruppen – und nicht nur die terminalen – sind für Bindungen an potenzielle Reaktionspartner verfügbar. Eine gerichtete Konjugation, nur über den 5'-Terminus der Aptamere, ist daher auszuschließen.

4.4.2 Konjugation über Phosphodiesterbindungen

Die Konjugationen über Phosphodiesterbindungen stellen die umfangreichste Versuchskategorie dar. Nur bei dieser Bindungsvariante wurde dsDNA zur Konjugation mit ND eingesetzt, zusätzlich wurden die Experimente mit Aptameren wiederholt.

In dieser Arbeit sind zwei verschiedene Typen von Esterbindungen zu unterscheiden, die im Abschnitt 3.4.2 beschrieben werden. Ausgangsmaterialien waren dabei jeweils carboxylierte ND, die mit Thionylchlorid aktiviert wurden, wobei sich Carbonsäurechloride bildeten. Die Anbindung von Thymidin an die Carbonsäurechloride auf den ND-Oberflächen resultierte in Carbonsäureestern. In einem weiteren Schritt wurde DNA an Thymidin – selbst ein Bestandteil von DNA – ligiert, wobei Phosphodiester entstanden.

Unter a) und b) sind die Ergebnisse der Konjugationen von dsDNA bzw. ssDNA mit ND-OH (T) aufgeführt. Die unter 4.4.2 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen basieren auf Phosphodiesterbindungen. Die starke Fluoreszenz sowie die scharfen Kontraste beim Einsatz von Ligase deuten auf erfolgreich verlaufene Ligationen hin (Abb. 4.86, 4.90, 4.94, 4.96 und 4.100).

In den Kontrollen wurde auf das Enzym verzichtet, wobei im Ergebnis keine Fluoreszenz erwartet wurde. Dennoch konnte für diese Proben Fluoreszenz nachgewiesen werden, wahrscheinlich basierend auf Adsorption bzw. unspezifischen Bindungen zwischen den Reaktionspartnern.

a) ND-OH (T) mit dsDNA

Zur Konjugation von ND-OH (T) mit dsDNA wurden ND-OH (T) (PC) und ND-OH (T) (S) eingesetzt. Für beide ND-Pulver verlief die Ligation unter Zugabe von Ligase erfolgreich (Abb. 4.86 und 4.90). Fluoreszenz trat jedoch, mit geringerer Intensität, auch ohne Verwendung von Ligase auf (Abb. 4.87 und 4.91). Allerdings erscheinen in diesem Fall die fluoreszierenden Partikel diffuser, was auch unter c) beobachtet werden kann. ND-OH (T) zeigten keine Autofluoreszenz (Abb. 4.88, 4.92). Auch nach der Zugabe von SYBR Green I wurde kein Fluoreszenzlicht emittiert, da das Fluorochrom nur nach Komplexbildung mit DNA fluoresziert (Abb. 4.89, 4.93).

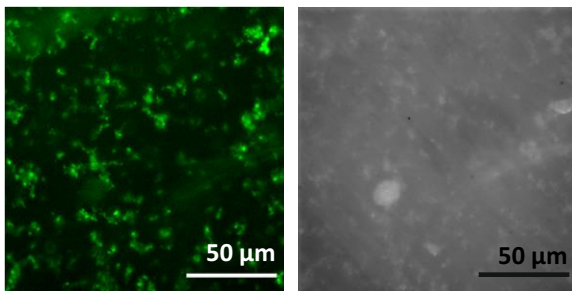


Abb. 4.86: ND-OH (T) (PC) + dsDNA + SYBR Green I + Ligase.

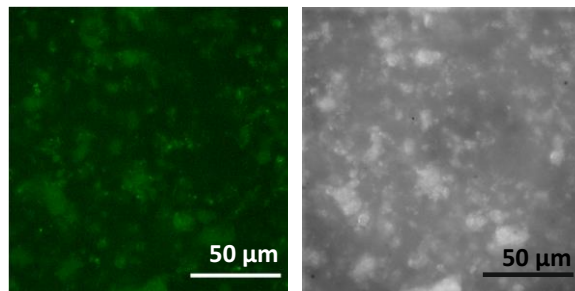


Abb. 4.87: ND-OH (T) (PC) + dsDNA + SYBR Green I (ohne Ligase).

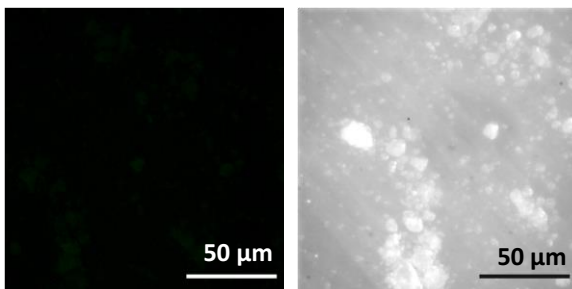


Abb. 4.88: Autofluoreszenz von ND-OH (T) (PC).

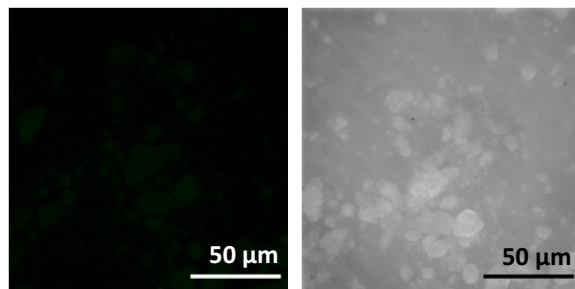


Abb.4.89: ND-OH (T) (PC) + SYBR Green I.

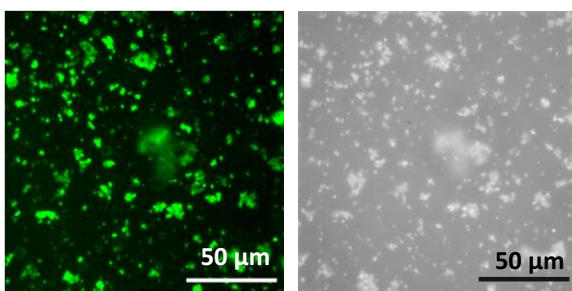


Abb. 4.90: ND-OH (T) (S) + dsDNA + SYBR Green I + Ligase.

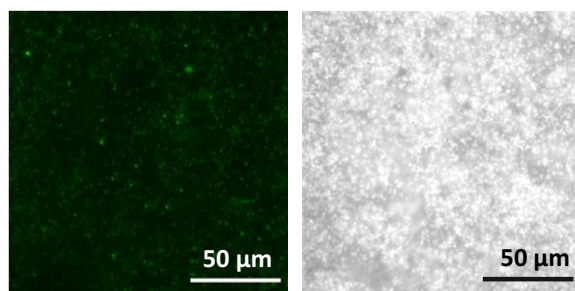


Abb. 4.91: ND-OH (T) (S) + dsDNA + SYBR Green I (ohne Ligase).

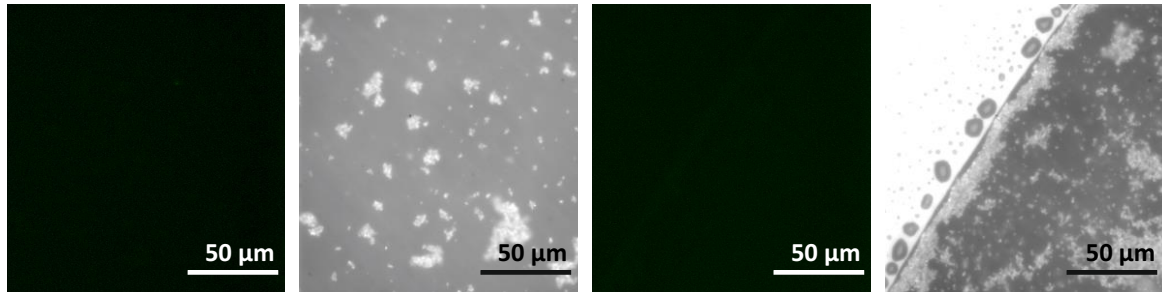


Abb. 4.92: Autofluoreszenz von ND-OH (T) (S).

Abb. 4.93: ND-OH (T) (S) + SYBR Green I.

Vergleicht man die Aufnahmen der Ligase-Proben mit denen ohne Ligase, fällt allgemein eine schwächere, diffuse Fluoreszenz mit schwächerem Kontrast bei Letzteren auf. Besonders deutlich ist dieses Ergebnis in den Abbildungen 4.87, 4.91 und 4.97, jeweils im Vergleich zur benachbarten Abbildung, ersichtlich. Hierbei stellt sich die Frage nach der Spezifität der Bindungen, bei denen keine Ligase verwendet wurde.

Weiterhin ist festzustellen, dass ein positives Ergebnis für den DNA-Nachweis an ND-OH (T) (S) vorliegt. Die FT-IR-Untersuchung von ND-OH (T) (S) (Abschnitt 4.3.1.3) erbrachte keinen eindeutigen Hinweis auf eine erfolgreiche Anbindung von Thymidin. Es ist daher unklar, ob tatsächlich Phosphodiesterbindungen zwischen den OH-Gruppen von Thymidin und den 5'-Phosphatresten der DNA-Moleküle ausgebildet wurden, obwohl dies der Vergleich zu den Proben ohne Ligase nahelegt. Dennoch ist auch die Möglichkeit nichtkovalenter Bindungen in Betracht zu ziehen.

b) ND-OH (T) mit ssDNA (TBA)

Die Konjugation von ND-OH (T) mit 5'-unmodifizierten TBA wurde anhand von ND-OH (T) (PC) untersucht. Obwohl das Enzym Ligase allgemein nur für die Schließung der Phosphodiesterbindungen in dsDNA bekannt ist, wurde auch beim Einsatz von ssDNA Fluoreszenz beobachtet (Abb. 4.98). Wie unter a) trat diese auch ohne Verwendung von Ligase im Reaktionsansatz auf (Abb. 4.99). Im Vergleich zu a) entfiel jedoch die Kontrastschwäche der fluoreszierenden Partikel.

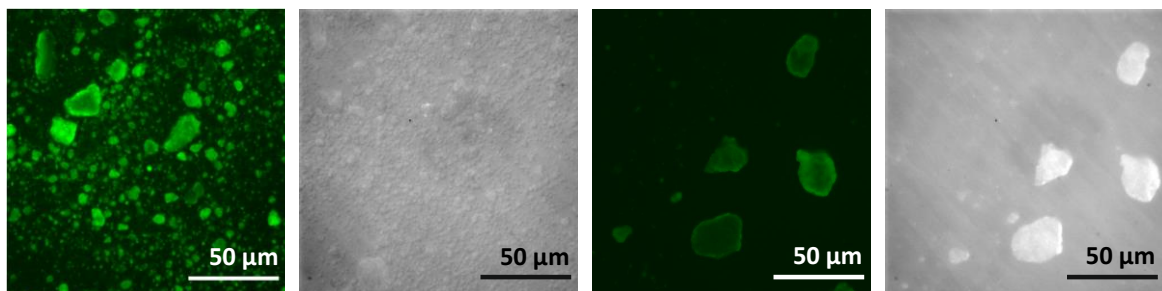


Abb. 4.94: ND-OH (T) (PC) + 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1) + Ligase.

Abb. 4.95: ND-OH (T) (PC) + 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1) (ohne Ligase).

Sowohl die Reaktion mit Ligase als auch ohne Ligase führte zu fluoreszierenden ND-Partikeln. Inwieweit tatsächlich eine Ausbildung von Phosphodiesterbindungen erfolgte, ist daher unklar – besonders da die Konjugation auch ohne Beteiligung von Ligase erfolgreich war. Die positiven Ergebnisse können auch auf der Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Hydroxylgruppen des Thymidins (wenn vorhanden) bzw. der ND-Oberflächen und der Aminogruppen der Nukleinbasen beruhen. Als einschränkende Bedingung ist hierbei allerdings die fehlende Aktivierung der Hydroxylgruppen anzusehen.

c) ND-OH (ITC) + dsDNA

Die in den Abbildungen 4.100 und 4.101 gezeigten Ergebnisse der Konjugation von ND-OH (ITC) sind vergleichbar mit den unter a) erzielten Ergebnissen. Unter Beteiligung von Ligase verliefen die Reaktionen erfolgreich, was an der intensiven Fluoreszenz in Abbildung 4.100 erkennbar ist. Die Reaktionen ohne Ligase führten ebenfalls zu (diffus) fluoreszierenden Partikeln, die wie bei ND-OH (T) (PC) jedoch nur einen schwachen Kontrast aufwiesen (Abb. 4.101). Mit Abbildung 4.102 wird demonstriert, dass ND-OH (ITC) keine Autofluoreszenz zeigen. SYBR Green I fluoresziert nur nach Komplexbildung mit dsDNA, weshalb beim Fehlen der Nukleinsäuremoleküle keine Fluoreszenz entstehen kann (Abb. 4.97 und 4.103).

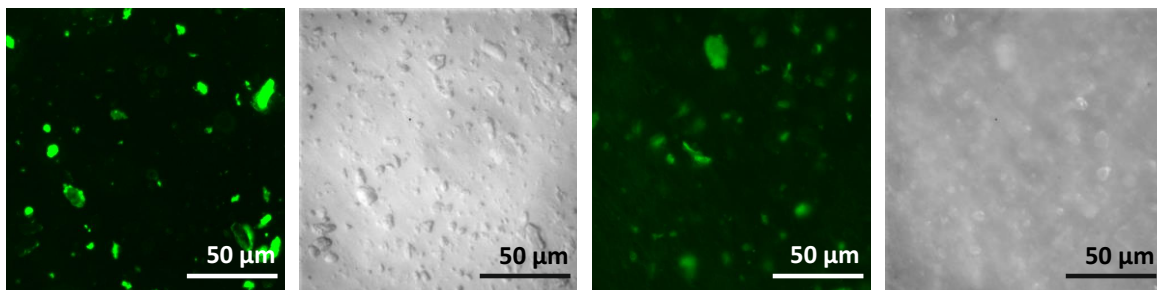


Abb. 4.96: ND-OH (ITC) + dsDNA + Ligase + SYBR Green I.

Abb. 4.97: ND-OH (ITC) + dsDNA + SYBR Green I (ohne Ligase).

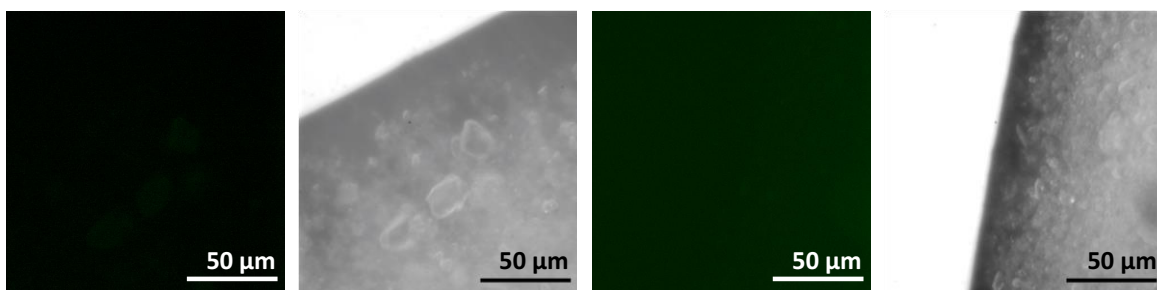


Abb. 4.98: Autofluoreszenz von ND-OH (ITC).

Abb. 4.99: ND-OH (ITC) + SYBR Green I.

d) ND-OH (ITC) + ssDNA (TBA)

Auch die Anbindung von ssDNA an ND-OH (ITC) kann über fluoreszierende Konjugate nachgewiesen werden (Abb. 4.104). Allerdings trat Fluoreszenz ebenso bei Reaktionsansätzen ohne Ligase auf (Abb. 4.105), womit das gleiche Resultat wie für ND-OH (T) (PC) (Abb. 4.98 und 4.99) erzielt wurde.

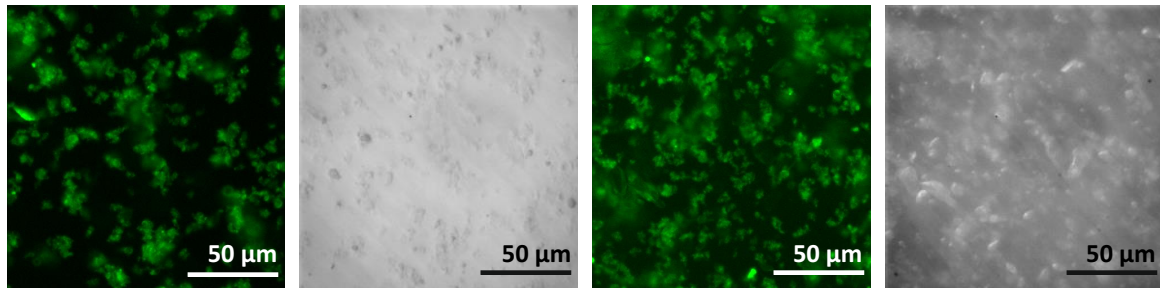


Abb. 4.100: ND-OH (ITC) + 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1) + Ligase.

Abb. 4.101: ND-OH (ITC) + 5'-TBA-FAM-3' (00151326_1) (ohne Ligase).

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Versuche zur Konjugation über Phosphodiesterbindungen zwar zu positiven Ergebnissen bei der Anwendung von Ligase führten, Fluoreszenz aber ebenso bei den Kontrollen ohne Ligase sowie beim Einsatz von ssDNA auftrat. Aus den Ergebnissen wird abgeleitet, dass die fluoreszenzmarkierten Aptamere möglicherweise über einen anderen Mechanismus als den der Ligation an die ND binden. In Frage kommen dafür kovalente Bindungen zwischen Carboxyl- oder Hydroxylgruppen auf den ND-Oberflächen und Aminogruppen an den Nukleinbasen der Aptamere. Beim Einsatz von Ligase ist jeweils eine starke Fluoreszenz mit deutlichem Kontrast der fluoreszierenden Partikel zu beobachten. Reaktionsansätze ohne Ligase führten zu einer abgeschwächten, diffusen Fluoreszenz der Partikel mit schwachen Kontrasten zur Umgebung. Kontrollen ohne dsDNA, jedoch mit SYBR Green I, zeigten erwartungsgemäß keine Fluoreszenz.

4.4.3 Konjugation über Isoharnstoffbindungen

Isoharnstoffbindungen entstehen durch Reaktionen zwischen Cyanat- und Aminogruppen. Als Ausgangsmaterialien für die vorliegenden Untersuchungen wurden ND-OH (PC) und ND-OH (ITC) verwendet, die nach Aktivierung mit BrCN mit NH_2 -Aptameren konjugiert wurden (Tab. 3.16). Die Ergebnisse für ND-OH (PC) werden in den Abbildungen 4.102 bis 4.104, für ND-OH (ITC) in den Abbildungen 4.105 bis 4.107 dargestellt. Demnach kann für beide ND-Typen eine erfolgreiche Konjugation nachgewiesen werden (Abb. 4.102 und 4.105). Aptamere ohne terminale Aminogruppen können – wie bereits unter 4.4.1 und 4.4.2 dargelegt – mit den freien Aminogruppen der Nukleinbasen entlang des DNA-Stranges an die Cyanatgruppen auf den ND-Oberflächen binden. Daher wurden auch für diese Reaktionsansätze positive Resultate, d. h. fluoreszierende ND-Aptamer-

Konjugate, nachgewiesen (Abb. 4.103 und 4.106). Bei den Kontrollen mit unmarkierten Aptameren trat keine Fluoreszenz auf (Abb. 4.104 und 4.107).

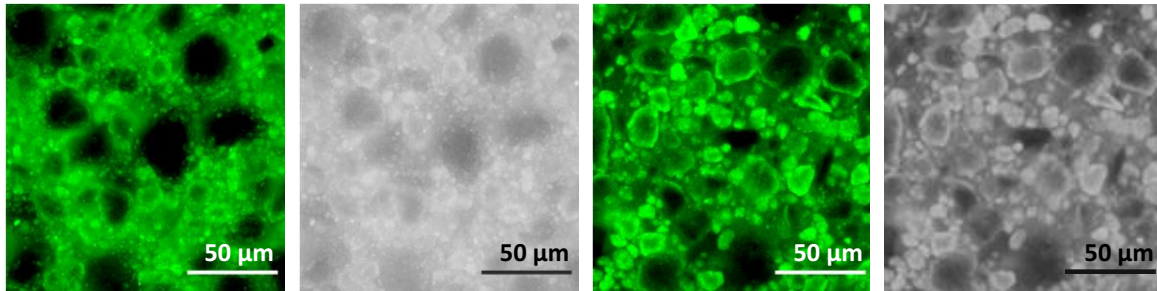


Abb. 4.102: ND-OH (PC) + 134465
(5'-NH₂-TBA-FAM-3').

Abb. 4.103: ND-OH (PC) + 134464
(5'-TBA-FAM-3').

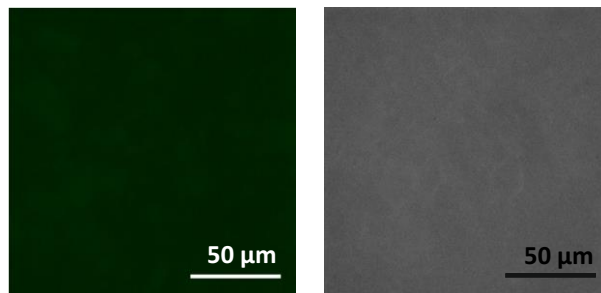


Abb. 4.104: ND-OH (PC) + 5'-NH₂-TBA-GACGTC-3' (127316).

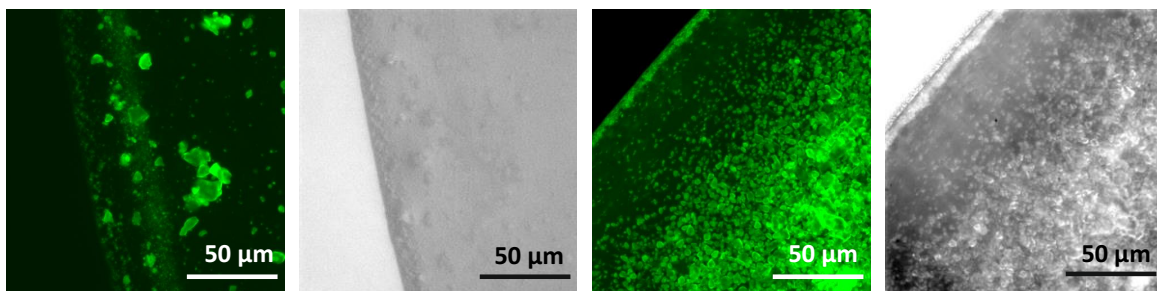


Abb. 4.105: ND-OH (ITC) + 5'-NH₂-TBA-FAM-3'
(134465).

Abb. 4.106: ND-OH (ITC) + 5'-TBA-FAM-3'
(134464).

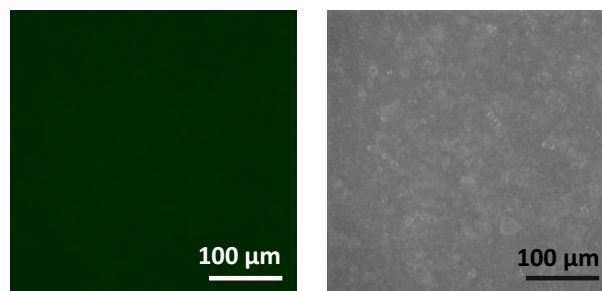


Abb. 4.107: ND-OH (ITC) + 5'-NH₂-TBA-GACGTC-3' (00151326_2).

Für die Fluoreszenzmikroskopie wird zusammenfassend festgehalten, dass von allen drei Konjugationsvarianten die besten Ergebnisse mit Isoharnstoff- und Amidbindungen (ND-NH₂ + COOH-TBA) erzielt wurden.

Eigenfluoreszenz von Aptameren

Abschließend wird noch je ein Beispiel für die Eigenfluoreszenz von FAM-markierten bzw. unmarkierten Aptameren gezeigt, die gelöst in Reinstwasser vorlagen. Erwartungsgemäß fluoreszieren FAM-Aptamere, die nicht an ND gebunden sind, mit gleicher Intensität über die gesamte Probe verteilt (Abb. 4.108, links). Unmarkierte Aptamere zeigen keine Fluoreszenz (Abb. 4.108, rechts).

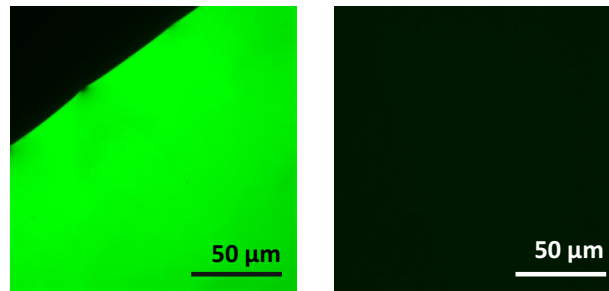


Abb. 4.108: Beispiele für Autofluoreszenzen von Aptameren. Links mit Fluorochrom: 5'-NH₂-TBA-FAM-3' (00151326_2), rechts ohne Fluorochrom: 5'-NH₂-TBA-ACGT-3' (00151326_3).

Für die Auswertung und Diskussion der unter 4.4 gezeigten Ergebnisse wird auch auf Abschnitt 4.3 verwiesen, in dem die Ergebnisse der FT-IR-Spektroskopie dargestellt und diskutiert werden. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Konjugatbildung stellt eine wichtige Ergänzung zu den entsprechenden FT-IR-Spektren dar, die aufgrund der Komplexität der Konjugate – und der damit verbundenen zahlreichen Molekülschwingungen – keine ausreichend sichere Interpretation erlauben. Entgegen der Erwartungen sind die Resultate der Fluoreszenzmikroskopie jedoch ebenfalls nicht immer eindeutig, was auf verschiedene Ursachen zurückzuführen ist, die bereits diskutiert wurden. Hier sind insbesondere die freien Aminogruppen der Nukleinbasen der Aptamere zu nennen, die außer den terminalen Modifikationen mit den funktionellen Gruppen auf den Partikeloberflächen reagieren können.

In Bezug auf Phosphodiesterbindungen ist unklar, auf welchen Reaktionsmechanismus die Anbindung von dsDNA ohne den Einsatz von Ligase zurückzuführen ist. Herausgestellt hat sich dabei, dass diese Reaktion als Kontrolle zur Ligation ungeeignet ist. Die qualitativen Unterschiede in den Fluoreszenzaufnahmen lassen dennoch anschaulich auf eine erfolgreiche Konjugation unter Beteiligung von Ligase schließen. Ligationsversuche von ssDNA an ND sollten, wie unter 4.3.2.2 beschrieben, unter Verwendung einer RNA-Ligase ablaufen.

Fluoreszenznachweise von Reaktionen, an denen ND beteiligt sind, erfolgen überwiegend durch die intrinsische Fluoreszenz der Nanopartikel, wobei am häufigsten die durch N-V-Zentren verursachte Fluoreszenz genutzt wird [BDJ+13, FLC+07, MPG+09, WCC+12, YKC+05, ZLK+13]. Ein zweiter Weg

ist die in dieser Arbeit demonstrierte Anbindung von Fluorochromen. Dabei werden, wie auch in den nachfolgend zitierten Publikationen, nichtfluoreszierende ND verwendet.

WENMACKERS *et al.* [WHN+03] nutzten Fluorochrome zum Nachweis der Anbindung von DNA auf CVD-Diamant. Nach der von USHIZAWA *et al.* [USM+02] für ND-Partikel beschriebenen Methode, immobilisierten die Autoren mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierte dsDNA auf zuvor mit Thymidin modifizierten Diamantfilmen. In einer später publizierten Arbeit werden von verschiedenen Autoren eingesetzte Methoden zur Konjugation von fluoreszenzmarkierter ssDNA bzw. dsDNA an hydrierte Diamantfilme aufgezeigt, bei denen der DNA-Nachweis ebenfalls über Fluoreszenzmikroskopie erfolgte.

Ein Beispiel für die Fluoreszenzmarkierung eines mit ND-Partikeln konjugierten Proteins wird von HUANG & CHANG [HC04] mit der Adsorption von PLL demonstriert. In einem weiteren Reaktionsschritt wurde das Protein mit Alexa Fluor 488 markiert. Dieser Farbstoff enthält einen Succinimidyl-ester-Rest, mit dem er an primäre Amine von Proteinen binden kann. Fluoreszenzaufnahmen belegen die Adsorption von PLL und zeigen das Potenzial von fluoreszenzmarkierten ND für biomedizinische Applikationen.

VIAL *et al.* [VMS+08] untersuchten die Zytotoxizität Peptid-konjugierter, nichtfluoreszierender ND in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters. In mehreren Reaktionsschritten wurden Fluorescein-markierte Tripeptide an die ND-Partikel konjugiert, die anschließend in lebende Zellen eingebracht und dort über ihre Fluoreszenz detektiert wurden.

Über eine *in vivo*-Anwendung von fluoreszenzmarkierten ND in Mausmodellen (Brust- und Leberkrebs) berichten CHOW *et al.* [CZC+11]. In Verbindung mit Versuchen zum Wirkstofftransport mit Doxorubicin-konjugierten ND, wurde die Ausbreitung mit Xeno Fluor 750 und Alexa Fluor 488 markierter, in Mäuse injizierter ND-Partikel untersucht. Die Lokalisierung der ND erfolgte über Fluoreszenzaufnahmen und kann auf Doxorubicin-konjugierte ND übertragen werden, die das Chemotherapeutikum im Organismus verbreiten.

Als weitere Beispiele für die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Bestätigung erfolgreicher Reaktionen an Diamantoberflächen seien die Arbeiten von HENS *et al.* [HCT+08], JARRE *et al.* [JLB+11] und MEINHARDT [Mei11] erwähnt. Nachweise über den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen sind dann die Methode der Wahl, wenn das vorhandene ND-Material keine intrinsische Fluoreszenz aufweist, oder diese nicht selbst durch Bestrahlung des Materials induziert werden kann. Durch kommerziell erhältliche, fluoreszenzmarkierte Biomoleküle stehen zudem unkompliziert anwendbare Alternativen zur Verfügung.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Oberflächenmodifikation von Nanodiamanten (ND) aus der Detonationssynthese, mit anschließender Konjugation von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA an die modifizierten Partikel, experimentell umgesetzt und verifiziert. Sowohl die Oberflächenmodifikationen im ersten Teil der Arbeit, als auch die Konjugationen mit DNA im zweiten Teil, wurden durch verschiedene chemische Reaktionen realisiert.

Als Ausgangsmaterialien für die Homogenisierung der Oberflächenbelegung – dem Ziel aller Modifikationsschritte – wurden zwei unterschiedliche Diamantpulver aus der Detonationssynthese eingesetzt. Dabei handelte es sich einerseits um typische monokristalline ND-Partikel mit einem Durchmesser von etwa 3-10 nm (ND (PC)), andererseits um ein polykristallines Material mit Partikelgrößen im dreistelligen Nanometer- bis einstelligen Mikrometerbereich (ND (S)). Die Partikelgrößen beider Materialien, ihre strukturelle Zusammensetzung aus graphitischem, amorphem und Diamantkohlenstoff sowie ihre Verunreinigungen mit anderen chemischen Elementen wurden durch elektronenmikroskopische Methoden untersucht. Für beide Materialien ergaben sich nur geringe qualitative Verunreinigungen mit Silizium und Chlor (ND (PC)) bzw. Natrium und Schwefel (ND (S)). Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (HRTEM) belegen, dass ND (PC) überwiegend aus sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff (Diamant) bestehen, während amorphe bzw. graphitische Strukturen in geringerem Umfang vorliegen. Bei ND (S) lassen sich dagegen, neben Diamantkohlenstoff, höhere Anteile an graphitischem und amorphem Kohlenstoff nachweisen.

Die Partikeloberflächen beider Diamantpulver wurden durch die Einführung von Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminogruppen modifiziert. Die Überprüfung der Ergebnisse dieser Reaktionen erfolgte mittels FT-IR-Spektroskopie. Für ND (PC) konnte dabei in jedem Fall auf eine erfolgreiche Modifikation geschlossen werden, da sich die jeweiligen funktionellen Gruppen über bestimmte Molekülschwingungen nachweisen ließen. Bei den FT-IR-Untersuchungen von ND (S) wurde festgestellt, dass sich auf den Oberflächen des originalen als auch des carboxylierten Materials keine nachweisbaren funktionellen Gruppen befinden. Spektren mit auswertbaren Banden ergaben sich erst durch die Anbindung von Poly-L-Lysin (PLL). Als Ursache dafür wird die Adsorption der Moleküle bzw. eine Anlagerung über elektrostatische Wechselwirkungen angesehen. In diesem Fall ist die

Präsenz von Carboxylgruppen auf den Partikeloberflächen, anders als für die Ausbildung kovalenter Bindungen, nicht unbedingt erforderlich.

Weiterhin wurden bereits kommerziell mit Hydroxyl- und Aminogruppen modifizierte Detonationsdiamanten bezogen (ND (ITC)). Alle diese ND-Materialien wurden für die Konjugation mit DNA über Amid-, Phosphodiester- und Isoharnstoffbindungen im zweiten Teil der Arbeit eingesetzt. Dabei wurden Aptamere (einzelnsträngige DNA-Moleküle, ssDNA), die jeweils am 5'-Ende mit Amino- oder Carboxylgruppen modifiziert waren, bzw. doppelsträngige DNA (dsDNA) kovalent mit carboxylierten, hydroxylierten oder aminomodifizierten ND verbunden.

Für die Generierung von Amidbindungen wurden carboxylierte ND (ND-COOH) mit aminomodifizierten Thrombin-Aptameren (NH₂-TBA), bzw. umgekehrt (ND-NH₂ mit COOH-TBA), konjugiert. Phosphodiesterbindungen entstanden über die Konjugation hydroxylierter ND (ND-OH) mit dsDNA bzw. Aptameren ohne 5'-Modifikation (TBA). Die Generierung von Isoharnstoffbindungen erfolgte über den Einsatz von ND-OH und NH₂-TBA. Die Konjugationserfolge wurden mittels FT-IR-Spektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die FT-IR-Spektren zu den Konjugationen über Amid- und Isoharnstoffbindungen bestätigen den erfolgreichen Verlauf der Reaktionen. Einige Einschränkungen gab es bei den Konjugationen über Phosphodiesterbindungen, weil in den betreffenden Spektren nicht alle relevanten Molekülschwingungen nachweisbar sind. Hierbei muss in Betracht gezogen werden, dass die DNA-Moleküle lediglich über Adsorption an die Partikeloberflächen binden konnten.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Infrarotspektroskopie für derart komplexe Untersuchungsobjekte wie ND-DNA-Konjugate keine ausreichend zuverlässige Untersuchungsmethode darstellt. Die Konjugationserfolge zwischen ND und DNA wurden daher zusätzlich über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verifiziert. Diese Ergebnisse bestätigen zweifelsfrei die Präsenz von DNA an den Partikeloberflächen. Fraglich bleibt jedoch hierbei, ob es zur Ausbildung kovalenter Bindungen gekommen ist oder ob die Biomoleküle lediglich an die Oberflächen der Partikel adsorbiert waren.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit 6-FAM (ssDNA) bzw. SYBR Green I (dsDNA) markierte DNA-Moleküle eingesetzt. Autofluoreszenzen der ND waren durch die Auswahl des Filtersatzes ausgeschlossen, was im Ergebnisteil anhand verschiedener Aufnahmen gezeigt wird. Prinzipiell ist eine Eignung des Verfahrens für den Nachweis der Konjugation zwischen ND und DNA festzustellen. Dennoch ergeben sich einige Fragestellungen, die nicht abschließend beantwortet werden können.

Bei den Amidbindungen verliefen die Nachweisreaktionen stets erfolgreich. Versuche mit Aptameren ohne Fluoreszenzmarkierung erwiesen sich als geeignete Kontrollen für die Anbindung von

fluoreszenzmarkierter DNA an die Partikeloberflächen, da bei diesen Konjugaten keine Fluoreszenz auftrat. Die Konjugation von ND-COOH mit unmodifizierten Aptameren (TBA), die als zweite Kontrollvariante geplant war, erwies sich dagegen als ungeeignet. Im Ergebnis war jeweils eine etwa gleich hohe Fluoreszenzintensität wie bei aminomodifizierten Aptameren zu beobachten, was sich damit begründen lässt, dass entlang einzelsträngiger DNA-Moleküle freie Aminogruppen an den Nukleinbasen vorliegen. Diese können ebenso wie die terminalen Funktionen an die Carboxylgruppen auf den Partikeloberflächen binden.

Die Konjugationen über Phosphodiesterbindungen führten zu positiven Ergebnissen bei der Anwendung von Ligase, Fluoreszenz trat aber ebenso bei den Kontrollen ohne Ligase auf. Beim Einsatz von Ligase war jeweils eine starke Fluoreszenz mit deutlichem Kontrast der fluoreszierenden Partikel zu beobachten. Reaktionsansätze ohne Ligase führten zu einer abgeschwächten, diffusen Fluoreszenz der Partikel mit schwachen Kontrasten zur Umgebung. Aus den Ergebnissen wird abgeleitet, dass dsDNA ohne Zugabe von Ligase sowie Aptamere wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus als den der Ligation an die ND binden. Neben der Adsorption kommen dafür bei Aptameren kovalente Bindungen zwischen Aminogruppen an den Nukleinbasen und Carboxyl- oder Hydroxylgruppen auf den ND-Oberflächen in Frage. Kontrollen ohne dsDNA, jedoch mit SYBR Green I, zeigten erwartungsgemäß keine Fluoreszenz.

Die Konjugation über Isoharnstoffbindungen verlief insgesamt erfolgreich. Unmodifizierte, aber fluoreszenzmarkierte Aptamere ohne terminale Aminogruppen (TBA-FAM), die als Kontrollen eingesetzt wurden, können mit den freien Aminogruppen der Nukleinbasen entlang des DNA-Stranges an die Hydroxylgruppen auf den ND-Oberflächen binden. Daher werden auch für diese Reaktionsansätze fluoreszierende ND-Aptamer-Konjugate nachgewiesen. Bei den Kontrollen mit unmarkierten Aptameren trat keine Fluoreszenz auf. Von allen drei Konjugationsvarianten wurden mit Isoharnstoff- und Amidbindungen (Variante 2, ND-NH₂ + COOH-TBA) die besten Ergebnisse erzielt.

Neben den Methoden und Ergebnissen zur Materialcharakterisierung, Modifikation der Partikeloberflächen und Konjugation wird ein mechanisches Verfahren zur Herstellung kolloidaler ND-Suspensionen beschrieben. Das Verfahren wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, jedoch zur Herstellung einer 0,1 %igen kolloidalen ND-Suspension eingesetzt, deren Eigenschaften hier erstmals durch Partikelgrößen- und Zeta-Potenzial-Messungen untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Messungen ergaben eine durchschnittliche Partikelgröße im zweistelligen Nanometerbereich und bestätigten eine gute Stabilität der Suspension ohne weitere Agglomeration der Teilchen. Die bei diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse bilden eine Grundlage für die Optimierung des Verfahrens, bis hin zur Gewinnung von Primärpartikeln, und eröffnen Anwendungsmöglichkeiten für ND, die sehr kleine Partikeldurchmesser erfordern.

Für weiterführende Arbeiten an der Thematik sollten folgende Erkenntnisse aus den durchgeführten Versuchen berücksichtigt werden:

Kolloidale Suspensionen: Aufgrund der hohen Relevanz der Partikelgrößen für biomedizinische Anwendungen ist die Arbeit mit zuvor dispergierten Partikeln aus kolloidalen Suspensionen zu bevorzugen. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde insbesondere deshalb darauf verzichtet, weil Unsicherheit darüber bestand, wie sich die mechanische Behandlung auf die Zusammensetzung bereits eingeführter Oberflächenfunktionen (z. B. Abtrennung funktioneller Gruppen) auswirkt. Ebenso ist fraglich, welches Aggregationsverhalten die dispergierten Partikel des Originalmaterials bei einer nachträglichen Modifikation zeigen. Hier können gezielte Untersuchungen mit modifizierten Partikeln (z. B. durch FT-IR-Spektroskopie), die der unter 3.1 beschriebenen Behandlung unterzogen werden, zu weiteren Erkenntnissen führen.

Es erfolgten keine Partikelgrößen- und Zeta-Potenzial-Messungen von kolloidalen Suspensionen mit bereits modifizierten Partikeln. Da diese Untersuchungen jedoch wichtige Aussagen zu den Eigenschaften der Partikel liefern, sollten neben dem Ausgangsmaterial auch alle Produkte der Oberflächenmodifikationen durch die Erfassung der Partikelgrößen und des Zeta-Potenzials charakterisiert werden.

Materialcharakterisierung: Mit den vorliegenden Ergebnissen wird gezeigt, dass auch der Einsatz der Rasterelektronenmikroskopie zu verwertbaren Ergebnissen bei der Untersuchung von ND führen kann. Im Fall von ND (S) wäre durch die Entfernung des amorphen Kohlenstoffs von den Partikeloberflächen eine bessere Beobachtung der dicht übereinanderliegenden Diamantstrukturen möglich. Das kann, wie mehrfach in der Arbeit erwähnt, durch die Oxidation der Partikeloberflächen in einem Säuregemisch erreicht werden.

Die Anwendung eines Verfahrens der Elementanalyse ist sowohl für die Beurteilung der Reinheit des Materials, als auch zur Unterstützung der Interpretation von Infrarotspektren von Bedeutung.

Modifikation der Partikeloberflächen durch Einführung funktioneller Gruppen und Herstellung von

ND-DNA-Konjugaten: Die Einführung von Aminogruppen wurde durch die Anbindung von PLL bzw. Silanisierung der Partikeloberflächen mit (3-Aminopropyl)-Trimethoxysilan (APTMS) umgesetzt. Eine anschließende Konjugation mit DNA über Amidbindungen kann im Fall der Verwendung von PLL nicht eindeutig über qualitative FT-IR-Untersuchungen belegt werden, da PLL-Moleküle bereits Amidbindungen enthalten. Es wird daher vorgeschlagen, für die Konjugation von DNA über Amidbindungen Methoden der Click-Chemie [KFS01] oder silanisierte ND einzusetzen, da Silan-Moleküle zwar Aminogruppen, aber keine Amidbindungen enthalten.

Für die Ligation von ssDNA bei der Konjugation über Phosphodiesterbindungen, ist der Einsatz einer RNA-Ligase zu empfehlen. Zu beachten ist dabei, dass Konjugationen über Phosphodiesterbindungen nicht sicher durch den Einsatz der Infrarotspektroskopie belegt werden können, da Phosphodiester bereits Strukturbestandteile von Nucleinsäuren sind.

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen erweitert sich der Kenntnisstand zur Konjugation von DNA an Detonationsdiamanten. Die experimentell bereits häufiger umgesetzte Immobilisierung von DNA auf Diamantfilmen wird auf verschiedenen Reaktionswegen auch für ND-Partikel realisiert.

(Bio)Funktionalisierte ND eignen sich für zahlreiche Anwendungen im biomedizinischen Bereich und in der Nanotechnologie – beispielhaft sollen nochmals der Einsatz in Diagnostik und Therapie, die Funktion als Träger von Wirkstoffen, Proteinen oder Nucleinsäuren in Zellen und Gewebe, antivirale und antibakterielle Applikationen, Gerüstmaterialien für die Gewebezüchtung (Tissue Engineering) oder als Nanoroboter im Bereich der Nanotechnologie genannt sein [SHS09].

6 Literaturverzeichnis

- [001] https://www.bmbf.de/pub/Vom_Material_zur_Innovation.pdf (08.04.2016).
- [002] www.reishauer.com/de/Diamant-145.html (20.03.2016).
- [003] <http://www.spektrum.de/lexikon/chemie/diamant/2348> (24.03.2016).
- [004] <http://freebase.com/base/aptamer/aptamer?schema=> (10.09.2014).
- [005] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/dna.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/nukleinsauren/dna_strukturen/dna_doppelhelix/basenstapelung.vscml.html (22.09.2014).
- [006] <http://de.wikipedia.org/wiki/SELEX> (18.07.2014).
- [007] <http://www.fritsch.de/produkte/mahlen/planetenmuehlen/pulverisette-54-classic-line/>(04.03.2015).
- [008] <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx> (04.03.2014).
- [009] User's manual - Delsa nano submicron particle size and Zeta potential particle analyzer (Beckman Coulter). Introduction: particle sizing by dynamic light scattering.
- [010] User's manual - Delsa nano submicron particle size and Zeta potential particle analyzer (Beckman Coulter). Introduction: Zeta potential determination by electrophoretic light scattering.
- [011] <http://www.spektrum.de/lexikon/chemie/disperses-system/2581> (17.02.2016).
- [012] <http://www.malvern.com/en/products/technology/electrophoretic-light-scattering/default.aspx> (04.03.2014).
- [013] https://de.wikipedia.org/wiki/Energiedispersive_Röntgenspektroskopie (11.12.2013).
- [014] <http://www.spektrum.de/lexikon/chemie/infrarotspektroskopie/4458> (31.01.2015).
- [015] <http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html> (18.12.2014).
- [016] <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzmikroskopie> (18.12.2014).
- [017] www.univie.ac.at/mikroskopie/pdf/3_Fluoreszenz.pdf (18.12.2014).
- [018] <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=A54412AC.pdf> (11.02.2016).
- [019] <https://www.applichem.com/shop/produktdetail/as/edc-hydrochlorid-ibiochemical/>(11.07.2014).

- [020] <http://lifetechnologies.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-isolation-protocol/dynabeads-myone-carboxylic-acid.html>.
- [021] <http://lifetechnologies.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-isolation-protocol/m-270-amine.html>.
- [022] www.chemicell.com/products/protocols/index.html.
- [023] <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C1360> (08.01.2015).
- [024] <https://www.biomers.net/de/Produkte/Fluoreszenzfarbstoffe.html?lang=de> (16.09.2015).
- [025] <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labelling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=7567dna> (18.12.2014).
- [026] https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labelling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=2761old_2 (18.12.2014).
- [027] xdb.lbl.gov (11.11.2013).
- [028] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/dna-ligase/18846> (20.11.2015).
- [ABOV10] A. Aleksenskiy, M. Baidakova, V. Osipov, and A. Vul'. The fundamental properties and characteristics of nanodiamonds. In *Nanodiamonds: applications in biology and nanoscale medicine*. D. Ho (ed.), Springer, 2010.
- [Ack04] J. Ackermann. Handbuch für die Rasterelektronenmikroskope SUPRA(VP) und ULTRA. Carl Zeiss AG, 2004.
- [AWG95] P. Allen, S. Worland, and L. Gold. Isolation of high-affinity RNA ligands to HIV-1 integrase from a random pool. *Virology*, 209 (2): 327–336, 1995.
- [AYI+93] T. Ando, K. Yamamoto, M. Ishii, M. Kamo, and Y. Sato. Vapour-phase oxidation of diamond surfaces in O₂ studied by diffuse reflectance Fourier-transform infrared and temperature-programmed desorption spectroscopy. *J Chem Soc Faraday Trans*, 89: 3635–3640, 1993.
- [AYM+96] T. Ando, K. Yamamoto, M. Matsuzawa, Y. Takamatsu, S. Kawasaki, F. Okino, H. Touhara, M. Kamo, and Y. Sato. Direct interaction of elemental fluorine with diamond surfaces. *Diam Relat Mater*, 5: 1021–1025, 1996.
- [BA96] F. Banhart and P. M. Ajayan. Carbon onions as nanoscopic pressure cells for diamond formation. *Nature*, 382: 433–435, 1996.
- [Bat05] F. Bath. Planeten-Kugelmöhlen für die Herstellung von Nanopartikeln. *Chem Ing Tech*, 77(9): 1276–1278, 2005.
- [BB05] M. Blank and M. Blind. Aptamers as tools for target validation. *Curr Opin Chem Biol*, 9: 336–342, 2005.
- [BCJ+09] J. P. Boudou, P. A. Curmi, F. Jelezko, J. Wrachtrup, P. Aubert, M. Sennour, G. Balasubramanian, R. Reuter, A. Thorel, and E. Gaffet. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. *Nanotechnol*, 20: 235602, 2009.
- [BCK05] G. S. Bang, S. Cho, and G. Kim. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. *Biosens Bioelectron*, 21 (6): 863–870, 2005.

- [BDJ⁺13] J.-P. Boudou, M.-O. David, V. Joshi, H. Eidi, and P. A. Curmi. Hyperbranched polyglycerol modified fluorescent nanodiamond for biomedical research. *Diam Relat Mater*, 38: 131–138, 2013.
- [BF94] P. Burgstaller and M. Famulok. Isolation of RNA aptamers for biological cofactors by in vitro selection. *Angew Chem Int Ed*, 33 (19): 1084–1087, 1994.
- [BGL⁺92] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355: 564–566, 1992.
- [BHB⁺97] D. H. Burke, D. C. Hoffmann, A. Brown, M. Hansen, A. Pardi, and L. Gold. RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibit chloramphenicol. *Chem Biol*, 4 (11): 833–843, 1997.
- [Bic97] G. F. Bickerstaff. Immobilization of enzymes and cells: some practical considerations. In *Immobilization of enzymes and cells. Methods in Biotechnology*. G. F. Bickerstaff (ed.), Humana Press, 1997.
- [BK99] J. G. Bruno and J. L. Kiel. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens Bioelectron*, 14 (5): 457–464, 1999.
- [BKV⁺93] D. S. Bethune, C. H. Kiang, M. S. De Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, and R. Beyers. Cobalt catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*, 363 (6430): 605–607, 1993.
- [BO05] E. Baldrich and C. K. O’Sullivan. Ability of thrombin to act as molecular chaperone, inducing formation of quadruplex structure of thrombin-binding aptamer. *Anal Biochem*, 341: 194–197, 2005.
- [BOSS08] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, and D. A. Spivak. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Anal Bioanal Chem*, 390: 1009–1021, 2008.
- [BPL09] A. Barfod, T. Persson, and J. Lindh. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Parasitol Res*, 105: 1557–1566, 2009.
- [BPP04] V. S. Bondar, I. O. Pozdnyakova, and A. P. Puzyr. Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins. *Phys Solid State*, 46 (4): 758–760, 2004.
- [BRH⁺06] P. J. A. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit, and E. Oberdorster. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol*, 3: 11, 2006.
- [BTS01] C. Berens, A. Thain, and R. Schroeder. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem*, 9: 2549–2556, 2001.
- [BYS09] T. Burleson, N. Yusuf, and A. Stanishevsky. Surface modification of nanodiamonds for biomedical application and analysis by infrared spectroscopy. *JAMME*, 37(2): 258–263, 2009.
- [CDW90] N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberley. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy. 3. edition*. Academic Press, Inc., 1990.
- [CLC⁺08] Y.-R. Chang, H.-Y. Lee, K. Chen, C.-C. Chang, D.-S. Tsai, C.-C. Fu, T.-S. Lim, Y.-K. Tzeng, C.-Y. Fang, C.-C. Han, H.-C. Chang, and W. Fann. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nature Nanotechnol.*, 3: 284–288, 2008.

- [CPT⁺06] P.-H. Chung, E. Perevedentseva, J.-S. Tu, C. C. Chang, and C.-L. Cheng. Spectroscopic study of bio-functionalized nanodiamonds. *Diam Relat Mater*, 15: 622–625, 2006.
- [CZC⁺11] E. K. Chow, X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Osawa, and Dean Ho. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment. *Sci Transl Med*, 3 (73): 73ra21, 2011.
- [CZM⁺10] M. Chen, X.-Q. Zhang, H. B. Man, R. Lam, E. K. Chow, and D. Ho. Nanodiamond vectors functionalized with polyethylenimine for siRNA delivery. *J Phys Chem Lett*, 1 (21): 3167–3171, 2010.
- [Dai06] L. Dai. *Carbon nanotechnology: recent developments in chemistry, physics, materials science and device applications*. Elsevier, 2006.
- [Dan04] V. V. Danilenko. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Phys Solid State*, 46(4): 595–599, 2004.
- [DCB04] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, and S. N. Bhatia. Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking. *Adv Mater*, 16 (12): 961–966, 2004.
- [DeG12] J. A. DeGrasse. A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *PLoS ONE*, 7 (3): e33410, 2012.
- [DH76] G. Davies and M. F. Hamer. Optical studies of the 1.945 eV vibronic band in diamond. *Proc R Soc Lond A*, 384 (1653): 285–298, 1976.
- [DJ61] P. S. DeCarli and J. C. Jamieson. Formation of diamond by explosive shock. *Science*, 133 (3467): 1821–1822, 1961.
- [DKLR01] T. L. Daulton, M. A. Kirk, R. S. Lewis, and L. E. Rehn. Production of nanodiamonds by high-energy ion irradiation of graphite at room temperature. *Nucl Instrum Meth B*, 175: 12–20, 2001.
- [DL03] Y. Ding and C. E. Lawrence. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucl Acids Res*, 31 (24): 7280–7301, 2003.
- [DLC03] J. E. Dahl, S. G. Liu, and R. M. K. Carlson. Isolation and structure of higher diamondoids, nanometer-sized diamond molecules. *Science*, 299 (5603): 96–99, 2003.
- [DMK⁺07] A. Dementjev, K. Maslakov, I. Kulakova, V. Korolkov, and V. Dolmatov. State of C-atoms on the modified nanodiamond surface. *Diam Relat Mater*, 16: 2083–2086, 2007.
- [DMM⁺03] D. Delabouglise, B. Marcus, M. Mermoux, P. Bouvier, J. Chane-Tune, J.-P. Petit, P. Mailley, and T. Livache. Biotin grafting on boron-doped diamond. *Chem Commun*, 21: 2698–2699, 2003.
- [DoI01] V. Y. Dolmatov. Detonation synthesis ultradispersed diamonds: properties and applications. *Russ Chem Rev*, 70: 607–626, 2001.
- [ES90] A. D. Ellington and J. W. Szostak. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346: 818–822, 1990.
- [FBH04] H. Fickert, H. Betat, and U. Hahn. Selection of aptamers. In *Evolutionary methods in biotechnology*. S. Brakmann and A. Schwienhorst (eds.), Wiley-VCH, 2004.
- [FDS96] J. Feigon, T. Dieckmann, and F. W. Smith. Aptamer structures from A to Zeta. *Chem Biol*, 3: 611–817, 1996.

- [Fey61] R. P. Feynman. There's plenty of room at the bottom. (H. D. Gilbert, ed.) Reinhold, New York. *Miniaturization*, pages 282–296, 1961.
- [FHH⁺91] M. Frenklach, W. Howard, D. Huang, J. Yuan, K. E. Spear, and R. Koba. Induced nucleation of diamond powder. *Appl Phys Lett*, 59 (5): 546–548, 1991.
- [FHK95] S. L. Flegler, J. W. Heckman, and K. L. Klomparens. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- [FJK⁺04] O. C. Farokzhad, S. Jon, A. Khademhosseini, T.-N. T. Tran, D. A. LaVan, and R. Langer. Nanoparticle-aptamer bioconjugate: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64: 7668–7672, 2004.
- [FKM⁺00] E.-I. Fukusaki, T. Kato, H. Maeda, N. Kawazoe, Y. Ito, A. Okazawa, S.-I. Kajiyama, and A. Kobayashi. DNA aptamers that bind to chitin. *Bioorg Med Chem Lett*, 10 (5): 423–425, 2000.
- [FLC⁺07] C.-C. Fu, H.-Y. Lee, K. Chen, T.-S. Lim, H.-Y. Wu, P.-K. Lin, P.-H. Tsao, H.-C. Chang, and W. Fann. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *PNAS*, 104 (3): 727–732, 2007.
- [FM99] M. Famulok and G. Mayer. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. In *Combinatorial Chemistry in Biology. Current topics in Microbiology and Immunology*, 243, pages 123–136. Springer, 1999.
- [FSW⁺05] G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csaki, R. Möller, and W. Fritzsche. Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays. *J Fluoresc*, 15 (29): 161–170, 2005.
- [GBvdE⁺96] A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, and M. Famulok. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucl Acids Res*, 24 (6): 1029–1036, 1996.
- [GDC⁺97] A. Gruber, A. Dräbenstedt, C. Tietz, L. Fleury, J. Wrachtrup, and C. von Borczyskowski. Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers. *Science*, 276: 2012–2014, 1997.
- [GG03] H. Günzler and H.-U. Gremlich. *IR-Spektroskopie. 4. Auflage*. Wiley-VCH, 2003.
- [GPS09] B. Gatto, B. Palumbo, and C. Sissi. Nucleic acid aptamers based on the G-quadruplex structure: therapeutic and diagnostic potential. *Curr Med Chem*, 16 (10): 1248–1265, 2009.
- [Gre02] H.-U. Gremlich. *IR-Spektren verstehen - Eine Einführung in die Interpretation von Spektren organischer Verbindungen. 2. überarbeitete Auflage*. Bruker Optik GmbH, 2002.
- [Gru99] D. M. Gruen. Nanocrystalline diamond films. *Annu Rev Mater Sci*, 29: 211–259, 1999.
- [GS06] V. P. Grichko and O. A. Shenderova. Nanodiamond: designing the bio-platform. In *Ultra nanocrystalline diamond: synthesis, properties, and applications*. O. A. Shenderova and D. M. Gruen (eds.), William Andrew, 2006.
- [HC04] L.-C. L. Huang and H.-C. Chang. Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds. *Langmuir*, 20: 5879–5884, 2004.
- [HCT⁺08] S. C. Hens, G. Cunningham, T. Tyler, S. Moseenkov, V. Kuznetsov, and O. Shenderova. Nanodiamond bioconjugate probes and their collection by electrophoresis. *Diam Relat Mater*, 17: 1858–1866, 2008.

- [Her08] G. T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques, 2. Auflage*. Academic Press, 2008.
- [HF95] K. Harada and A. D. Frankel. Identification of two novel arginine binding DNAs. *EMBO J*, 14 (23): 5798–5811, 1995.
- [HG99] H. Homann and H. U. Göringer. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, 27 (9): 2006–2014, 1999.
- [HMZ11] M. Hesse, H. Meier, and B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 8. überarbeitete und erweiterte Auflage*. Georg Thieme Verlag, 2011.
- [HP00] T. Hermann and D. J. Patel. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, 287(5454): 820–825, 2000.
- [HPOH07] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, and D. Ho. Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery. *Nano Lett*, 7 (11): 3305–3314, 2007.
- [HRSW98] L. A. Holeman, S. L. Robinson, J. W. Szostak, and C. Wilson. Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold Des*, 3 (6): 423–431, 1998.
- [HS95] D. E. Huizenga and J. W. Szostak. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*, 34: 656–665, 1995.
- [HWH⁺14] A. Henderson, Y. Wu, Y. C. Huang, E. A. Chavez, J. Platt, F. B. Johnson, R. M. Brosh, D. Sen, and P. M. Lansdorp. Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 42 (2): 860–869, 2014.
- [Ii93] S. Iijima and T. Ichihashi. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363 (6430): 603–605, 1993.
- [Iij91] S. Iijima. Helical microtubulus of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56–58, 1991.
- [IO06] S. Ingebrandt and A. Offenhäusser. Label-free detection of DNA using field-effect transistors. *Phys Status Solidi A*, 203 (14): 3399–3411, 2006.
- [IRB⁺07] M. Ikanovic, W. E. Rudzinski, J. G. Bruno, A. Allman, M. P. Carrillo, S. Dwarakanath, S. Bhaadigadi, P. Rao, J. L. Kiel, and J. Andrews. Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to bacillus thuringiensis spores. *J Fluoresc*, 17: 193–199, 2007.
- [Jay99] S. D. Jayasena. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*, 45 (9): 1628–1650, 1999.
- [JGB⁺95] D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, C. K. Lynott, N. Gill, C. Vargeese, G. Kirschenheuter, D. P. C. McGee, P. Abesinghe, W. A. Pieken, R. Shapiro, D. B. Rifkin, D. Moscatelli, and N. Janjic. Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibit of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 34 (36): 11363–11372, 1995.
- [JHM⁺14] G. Jarre, S. Heyer, E. Memmel, T. Meinhardt, and A. Krüger. Synthesis of nanodiamond derivatives carrying amino functions and quantification by a modified Kaiser test. *Beilstein J Org Chem*, 10: 2729–2737, 2014.
- [JJXL98] S. Ji, T. Jiang, K. Xu, and S. Li. FTIR study of the adsorption of water on ultradispersed diamond powder surface. *Appl Surf Sci*, 133: 231–238, 1998.
- [JLB⁺11] G. Jarre, Y. Liang, P. Betz, D. Lang, and A. Krüger. Playing the surface game - Diels-Alder reaction on diamond nanoparticles. *Chem Commun*, 47: 544–546, 2011.

- [JP95] F. M. Jucker and A. Pardi. Solution structure of the CUUG hairpin loop: a novel RNA tetraloop motif. *Biochemistry*, 34 (44): 14416–14427, 1995.
- [JX95] T. Jiang and K. Xu. FTIR study of ultradispersed diamond powder synthesized by explosive detonation. *Carbon*, 33 (12): 1663–1671, 1995.
- [KB06] V. L. Kuznetsov and Y. V. Butenko. Diamond phase transitions at nanoscale. In *Ultra nanocrystalline diamond: synthesis, properties, and applications*. O. A. Shenderova and D. M. Gruen (eds.), William Andrew, 2006.
- [KBSY09] M. Y. Koroleva, D. V. Berdnikova, B. V. Spitsyn, and E. V. Yurtov. Sedimentation stability of aqueous dispersions of nanodiamond agglomerates. *Theor Found Chem Eng*, 43 (4): 478–481, 2009.
- [KC10] A. D. Keefe and S. T. Cload. SELEX with modified nucleotides. *Curr Opin Chem Biol*, 12: 448–456, 2010.
- [KCM⁺12] R. Kaur, J. M. Chitanda, D. Michel, J. Maley, F. Borondics, P. Yang, R. E. Verrall, and I. Badea. Lysine-functionalized nanodiamonds: synthesis, physiochemical characterization, and nucleic acid binding studies. *Int J Nanomed*, 7: 3851–3866, 2012.
- [KGH⁺95] N. Kossovsky, A. Gelman, H. J. Hnatyszyn, S. Rajguru, R. L. Garrell, S. Torbati, S. S. F. Freitas, and G.-M. Chow. Surface-modified diamond nanoparticles as antigen delivery vehicles. *Bioconjugate Chem*, 6 (5): 507–511, 1995.
- [KHH⁺05] X. L. Kong, L. C. L. Huang, C.-M. Hsu, W.-H. Chen, C.-C. Han, and H.-C. Chang. High-affinity capture of protein by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis. *Anal Chem*, 77: 259–265, 2005.
- [KHKG10] Y. S. Kim, C. J. Hyun, I. A. Kim, and M. B. Gu. Isolation and characterization of enantioselective DNA aptamers for ibuprofen. *Bioorgan Med Chem*, 18: 3467–3473, 2010.
- [KHO⁺85] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, and R. E. Smalley. C 60: buckminsterfullerene. *Nature*, 318 (6042): 162–163, 1985.
- [KK13] T. Kretschmer and J. Kohlhoff. *Neue Werkstoffe: Überblick und Trends*. Springer-Verlag, 2013.
- [KKO⁺05] A. Krüger, F. Kataoka, M. Ozawa, T. Fujino, Y. Suzuki, A. E. Aleksenskii, A. Y. Vul', and E. Osawa. Unusually tight aggregation in detonation nanodiamond: identification and disintegration. *Carbon*, 43: 1722–1730, 2005.
- [KKS98] J. Kawakami, Y. Kawase, and N. Sugimoto. In vitro selection of aptamers that recognize a monosaccharide. *Anal Chim Acta*, 365 (1-3): 95–100, 1998.
- [KL12] A. Krüger and D. Lang. Functionality is key: recent progress in the surface functionalization of nanodiamond. *Adv Funct Mater*, 22: 890–906, 2012.
- [KLJS06] A. Krüger, Y. Liang, G. Jarre, and J. Stegk. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications. *J Mater Chem*, 16: 2322–2328, 2006.
- [KNBE96] S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, and V. A. Erdmann. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol*, 14: 1112–1115, 1996.
- [Kni95] R. Knippers. *Molekulare Genetik. 6. neubearbeitete Auflage*. Georg Thieme Verlag, 1995.

- [KOJ⁺07] A. Krüger, M. Ozawa, Y. Jarre, Y. Liang, J. Stegk, and L. Lu. Deagglomeration and functionalisation of detonation diamond. *Phys Status Solidi A*, 204: 2881–2887, 2007.
- [KPE10] A. D. Keefe, S. Pai, and A. Ellington. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 9: 537–550, 2010.
- [Krü07] Anke Krüger. *Neue Kohlenstoffmaterialien*. 1. Auflage. Teubner Studienbücher Chemie, 2007.
- [KR11] H. Kawarada and A. R. Ruslinda. Diamond electrolyte solution gate FETs for DNA and protein sensors using DNA/RNA aptamers. *Phys Status Solidi A*, 208 (9): 2005–2016, 2011.
- [Kru8a] A. Krueger. New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials. *Chem Eur J*, 14: 1382–1390, 2008a.
- [Kru11] A. Krueger. Beyond the shine: recent progress in applications of nanodiamond. *J Mater Chem*, 21: 12571–12578, 2011.
- [KRW04] F. Kleinjung, I. Roehl, and J. Wientges. Method and apparatus for designing a nucleic acid having a desired property. Noxxon Pharma AG, 04.02.2004, EP 1 386 972 a1, 2004.
- [KSL⁺08] A. Krüger, J. Stegk, Y. Liang, L. Lu, and G. Jarre. Biotinylated nanodiamond: simple and efficient functionalization of detonation diamond. *Langmuir*, 24: 4200–4204, 2008.
- [KSS97] H. P. Kleber, D. Schlee, and W. Schöpp. *Biochemisches Praktikum. Methoden für Studium, Praxis, Forschung*. 5. Auflage. G. Fischer, Jena, 1997.
- [KUB⁺09] M. Kim, H.-J. Um, S. B. Bang, S.-H. Lee, S.-J. Oh, J.-H. Han, K.-W. Kim, J. Min, and Y.-H. Kim. Arsenic removal from Vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer. *Environ Sci Technol*, 43 (24): 9335–9340, 2009.
- [LBE95] S. M. Lato, A. R. Boles, and A. D. Ellington. In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem Biol*, 2: 291–303, 1995.
- [LCCC07] K.-K. Liu, C.-L. Cheng, C.-C. Chang, and J.-I. Chao. Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell. *Nanotechnology*, 18: 325102, 2007.
- [LDP⁺11] H. Li, X. Ding, Z. Peng, L. Deng, D. Wang, H. Chen, and Q. He. Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88. *Can J Microbiol*, 57 (6): 453–459, 2011.
- [LGMK04] Y. Liu, Z. Gu, J. L. Margrave, and V. N. Khabashesku. Functionalization of nanoscale diamond-powder: fluoro-, alkyl-, amino-, and amino acid-nanodiamond derivatives. *Chem Mater*, 16: 3924–3930, 2004.
- [LK11] D. Lang and A. Krüger. The Prato reaction on nanodiamond: surface functionalization by formation of pyrrolidine rings. *Diam Relat Mater*, 20 (2): 101–104, 2011.
- [LL05] J. Liu and Y. Lu. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angew Chem*, 118 (1): 96–100, 2005.
- [LMJ⁺11] Y. Liang, T. Meinhardt, G. Jarre, P. Vrdoljak, A. Schöll, F. Reinert, and A. Krüger. Deagglomeration and surface modification of thermally annealed nanoscale diamond. *J Colloid Interface Sci*, 354: 23–30, 2011.
- [LMWS87] R. S. Lewis, T. Ming, J. E. Wacker, and E. Steel. Interstellar diamonds in meteorites. *Nature*, 326: 160–162, 1987.

- [LOK09] Y. Liang, M. Ozawa, and A. Krüger. A general procedure to functionalize agglomerating nanoparticles demonstrated on diamond. *ACS Nano*, 3 (8): 2288–2296, 2009.
- [LSJ⁺08] J.-O. Lee, H.-M. So, E.-K. Jeon, H. Chang, K. Won, and Y. H. Kim. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal Bioanal Chem*, 390: 1023–1032, 2008.
- [LZL⁺10] J. Li, Y. Zhu, W. Li, X. Zhang, Y. Peng, and Q. Huang. Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug. *Biomaterials*, 31: 8410–8418, 2010.
- [LZW⁺10] K.-K. Liu, W.-W. Zheng, C.-C. Wang, Y.-C. Chiu, C.-L. Cheng, Y.-S. Lo, C. Chen, and J.-I. Chao. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy. *Nanotechnology*, 21 (31): 315106, 2010.
- [MCH⁺10] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu, and H.-C. Chang. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescence nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett*, 10: 3692–3699, 2010.
- [Mei11] T. Meinhardt. *Effiziente Oberflächenfunktionalisierung von Nanodiamant durch die Click-Reaktion von Alkinen und Aziden*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2011.
- [MG09] V. N. Mochalin and Y. Gogotsi. Wet chemistry route to hydrophobic blue fluorescent nanodiamond. *J Am Chem Soc*, 131 (13): 4594–4595, 2009.
- [MH13] H. B. Man and D. Ho. Nanodiamond as platforms for biology and medicine. *JALA*, 18 (1): 12–18, 2013.
- [MHNP96] R. H. Müller, G. E. Hildebrand, R. Nitzsche, and B. R. Paulke. *Zetapotential und Partikel-ladung in der Laborpraxis*. PAPERBACK APV 37, 1996.
- [MJV⁺03] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, and E. Peyrin. A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J Am Chem Soc*, 125: 8672–8679, 2003.
- [MK05] T. S. Misono and P. K. R. Kumar. Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*, 342 (2): 312–317, 2005.
- [MKP02] E. Mironov, A. Koretz, and E. Petrov. Detonation synthesis ultradispersed diamond: structural properties investigation by infrared absorption. *Diamond Relat Mater*, 11: 872–876, 2002.
- [MNE⁺11] V. N. Mochalin, I. Neitzel, B. J. M. Etzold, A. Peterson, G. Palmese, and Y. Gogotsi. Covalent incorporation of aminated nanodiamond into an epoxy network. *ACS Nano*, 5 (9): 7494–7502, 2011.
- [MOG09] V. Mochalin, S. Osswald, and Y. Gogotsi. Contribution of functional groups to the Raman spectrum of nanodiamond powders. *Chem Mater*, 21: 273–279, 2009.
- [MPG⁺09] M. Mkandawire, A. Pohl, T. Gubarevich, V. Lapina, D. Appelhans, G. Rödel, W. Pompe, J. Schreiber, and J. Opitz. Selective targeting of green fluorescent nanodiamond conjugates to mitochondria in HeLa cells. *J Biophoton*, 2 (10): 596–606, 2009.
- [MPL⁺13] V. Mochalin, A. Pentecost, X.-M. Li, I. Neitzel, M. Nelson, C. Wei, T. He, F. Guo, and Y. Gogotsi. Adsorption of drugs on nanodiamond: toward development of a drug delivery platform. *Mol Pharmaceut*, 10: 3728–3735, 2013.

- [MPRS04] S. Malhotra, A. K Pandey, Y. S. Rajput, and R. Sharma. Selection of aptamers for aflatoxin M1 and their characterization. *J Mol Recognit*, 27 (8): 493–500, 2004.
- [MPT12] M. Mascini, I. Palchetti, and S. Tombelli. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew Chem Int Ed*, 51: 1316–1332, 2012.
- [MRSS05] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, and B. Strehlitz. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem Biophys Res Com*, 338: 1928–1934, 2005.
- [MS84] M. Mathlouthi and A.-M. Seuvre. F.T.-I.R. and laser-Raman spectra of thymine and thymidine. *Carbohydr Res*, 134: 23–28, 1984.
- [MSHG12] V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, and Y. Gogotsi. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat Nanotechnol*, 7: 11–23, 2012.
- [MSS⁺93] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, and J. Feigon. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *PNAS*, 90 (8): 3745–3749, 1993.
- [MTK⁺12] J. Mona, J.-S. Tu, T.-Y. Kang, C.-Y. Tsai, E. Perevedentseva, and C.-L. Cheng. Surface modification of nanodiamond: photoluminescence and Raman studies. *Diam Relat Mater*, 24: 134–138, 2012.
- [MTPN14] D. P. Mitev, A. T. Townsend, B. Paull, and P. N. Nesterenko. Screening of elemental impurities in commercial detonation nanodiamond using sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Mater Sci*, 49 (10): 3573–3591, 2014.
- [MvDRM⁺11] J. Mehta, B. van Dorst, E. Rouah-Martin, W. Herrebout, M.-L. Scippo, R. Blust, and J. Robbens. In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol. *IJB*, 155 (4): 361–369, 2011.
- [Ney73] P. Ney. *Zetapotentiale und Flotierbarkeit von Mineralien*. Springer-Verlag, 1973.
- [NFV07] P. N. Nesterenko, O. N. Fedyanina, and Y. V. Volgin. Microdispersed sintered nanodiamonds as a new stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 132 (5): 403–405, 2007.
- [Nie01] C. M. Niemeyer. Nanopartikel, Proteine und Nukleinsäuren: Die Biotechnologie begegnet den Materialwissenschaften. *Angew Chem*, 113: 4254–4287, 2001.
- [NRHS05] S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, R. A. Harrington, and B. A. Sullenger. The potential of aptamers as anticoagulants. *TCM*, 15 (1): 41–45, 2005.
- [NSC⁺06] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Jr. Cunningham, D. R. Guyer, and A. P. Adamis. Pegaptanib, a target anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 123–132, 2006.
- [NT97] J. Nowakowski and I. Tinoco. RNA structure and stability. *Semin Virology*, 8 (3): 153–165, 1997.
- [OEK76] A. Oberlin, M. Endo, and T. Koyama. Filamentous growth of carbon through benzene decomposition. *J Cryst Growth*, 32 (3): 335–349, 1976.
- [OIM⁺07] M. Ozawa, M. Inaguma, M. Takahashi, F. Kataoka, A. Krüger, and E. Osawa. Preparation and behavior of brownish, clear nanodiamond colloids. *Adv Mater*, 19: 1201–1206, 2007.
- [Osa70] E. Osawa. Superaromaticity. In Japanese. *Kagaku*, 25 (854): 101, 1970.

- [Osa08] E. Osawa. Monodisperse single nanodiamond particulates. *Pure Appl Chem*, 80 (7): 1365–1379, 2008.
- [OYM*06] S. Osswald, G. Yushin, V. Mochalin, S. O. Kucheyev, and Y. Gogotsi. Control of sp^2/sp^3 carbon ratio and surface chemistry of nanodiamond powders by selective oxidation in air. *J Am Chem Soc*, 128 (35): 11635–11642, 2006.
- [PBP*07] A. P. Puzyr, A. V. Baron, K. V. Purtov, E. V. Bortnikov, N. N. Skobelev, O.A. Mogilnaya, and V. S. Bondar. Nanodiamonds with novel properties: a biological study. *Diam Relat Mater*, 16: 2124–2128, 2007.
- [PCQ*95] W. Pan, R. C. Craven, Q. Qiu, C. B. Wilson, J. W. Wills, S. Golovine, and J.-F. Wang. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *P Natl Acad Sci USA*, 92 (25): 11509–11513, 1995.
- [PK97] M. Paterson and J. F. Kennedy. Cellulose paper support for immobilization. In G. F. Bickerstaff, *Immobilization of enzymes and cells*. Methods in Biotechnology, 1997.
- [PMG*05] P. S. Pendergrast, H. N. Marsh, D. Grate, J. M. Healy, and M. Stanton. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *JBT*, 16 (3): 224–234, 2005.
- [PNJ*00] S. Praver, K. W. Nugent, D. N. Jamieson, J. O. Orwa, L. A. Bursill, and J. L. Peng. The Raman spectrum of nanocrystalline diamond. *Chem Phys Lett*, 332: 93–97, 2000.
- [PNT*04] A. P. Puzyr, D. A. Neshumayev, S. V. Tarskikh, G. V. Makarskaya, V. Y. Dolmatov, and V. S. Bondar. Destruction of human blood cells in interaction with detonation nanodiamonds in experiments in vitro. *Diam Relat Mater*, 13 (11-12): 2020–2023, 2004.
- [Poe13] G. Poeggel. *Kurzlehrbuch Biologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. edition, 2013.
- [PSG*07] I. Petrov, O. Shenderova, V. Grishko, V. Grichko, T. Tyler, G. Cunningham, and G. McGuire. Detonation nanodiamonds simultaneously purified and modified by gas treatment. *Diam Relat Mater*, 16 (12): 2098–2103, 2007.
- [PTC*06] E. V. Perevedentseva, J.-S. Tu, C.-Y. Cheng, P.-H. Chung, H.-H. Chang, and C.-L. Cheng. The interaction of protein-modified nanodiamond with bacterial cells. *Nanotechnology*, 2: 440–443, 2006.
- [PU62] Z. Piasek and T. Urbanski. The infra-red absorption spectrum and structure of urea. *B Acad Pol Sci-Chim*, X (3): 113–120, 1962.
- [RDS*10] L. Rondin, G. Dantelle, A. Slablab, F. Grosshans, F. Treussart, P. Bergonzo, S. Perruchas, T. Gacoin, M. Chaigneau, H.-C. Chang, V. Jacques, and J.-F. Roch. Surface-induced charge state conversion of nitrogen-vacancy defects in nanodiamonds. *Phys Rev B*, 82: 115449, 2010.
- [RE08] M. Rajendran and A. D. Ellington. Selection of fluorescent beacons that light up in the presence of zinc. *Anal Bioanal Chem*, 390: 1067–1075, 2008.
- [Rei07] C. Reinemann. *Aptamere als neue molekulare Erkennungselemente in Biosensoren*. Dissertation, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ, ISSN 1860-0387, 2007.
- [RGB*98] J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, and N. Janjic. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). *J Biol Chem*, 273: 20556–20567, 1998.

- [Rid68] T. M. Riddick. *Zeta-Meter Manual*. Zeta-Meter Inc., New York, 1968.
- [Rie94] E. Riedel. *Allgemeine und anorganische Chemie. 6. Auflage*. Walter de Gruyter, 1994.
- [RL52] L. V. Radushkevich and V. M. Lukyanovich. O strukture ugleroda, obrazuju pri termiceskom razlozenii okisi ugleroda na zeleznom kontakte. *Zurn Fisic Chim*, 26: 88–95, 1952.
- [RLE⁺11] V. J. Ruigrok, M. Levisson, M. H. Eppink, H. Smidt, and J. van der Oost. Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? *Biochem J*, 436 (1): 1–13, 2011.
- [RPS⁺07] E. Ramos, D. Pineiro, M. Soto, D. R. Abanades, M. E. Martin, M. Salinas, and V. M. Gonzales. A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. *Lab Invest*, 87: 409–416, 2007.
- [RS14] C. Reinemann and B. Strehlitz. Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. *Swiss Med Wkly*, 144: w13908, 2014.
- [Rud08] M. Rudolph. Wässrige Suspensionen von Detonations-Nanodiamant - Untersuchungen zur mechanischen Dispergierung in einer Planetenmühle und mit Ultraschall zur Herstellung eines stabilen Dispersionskolloids. *Diplomarbeit, TU Bergakademie Freiberg*, 2008.
- [SB05] D. W. Staple and E. Butcher. Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. *PLoS Biol*, 3 (6): e213, 2005.
- [SB08] S. Szunerits and R. Boukherroub. Different strategies for functionalization of diamond surfaces. *J Solid State Electrochem*, 12: 1205–1218, 2008.
- [Sch94] P. F. Schmidt. *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse. Kontakt und Studium, Band 444*. W. J. Bartz and E. Wippler (Hrsg.), Renningen-Mahlsheim: expert-Verlag, 1994.
- [SDG⁺06] B. V. Spitsyn, J. L. Davidson, M. N. Gradoboev, T. B. Galushko, N. V. Serebryakova, T. A. Karpukhina, I. I. Kulakova, and N. N. Melnik. Inroad to modification of detonation nanodiamond. *Diam Relat Mater*, 15: 296–299, 2006.
- [SDS⁺07] A. M. Schrand, L. Dai, J. J. Schlager, S. M. Hussain, and E. Osawa. Different biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. *Diam Relat Mater*, 16: 2118–2123, 2007.
- [SF01] A. Schwarz and M. Famulok. Aptamere und Ribozyme aus kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliotheken. *Biospektrum*, 7 (2): 111–114, 2001.
- [SH10] O. A. Shenderova and S. A. Ciftan Hens. Detonation nanodiamond particles processing, modification and bioapplications. In *Nanodiamonds: applications in biology and nanoscale medicine*. D. Ho (ed.), Springer, 2010.
- [SHC⁺07] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, M. Hussain, and L. Dai. Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J Phys Chem B*, 111 (1): 2–7, 2007.
- [SHK94] A. Streitwieser, C. H. Heathcock, and E. M. Kosower. *Organische Chemie. 2. Auflage*. VCH, 1994.
- [SHS09] A. Schrand, S. A. Ciftan Hens, and O. A. Shenderova. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications. *Crit Rev Solid State*, 34 (1-2): 18–74, 2009.

- [SM06] O. A. Shenderova and G. McGuire. Types of nanocrystalline diamond. In *Ultra nanocrystalline diamond: synthesis, properties, and applications*. O. A. Shenderova and D. M. Gruen (eds.), William Andrew, 2006.
- [Smi99] B. Smith. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. CRC Press, 1999.
- [SNPZ07] B. R. Smith, M. Niebert, T. Plakhotnik, and A. V. Zvyagin. Transfection and imaging of diamond nanocrystals as scattering optical labels. *J Lumin*, 127: 260–263, 2007.
- [Som09] A. Somoza. Origami mit DNA: neue Entwicklungen. *Angew Chem*, 121: 9570–9572, 2009.
- [SPC⁺12] L. Schmidlin, V. Pichot, M. Comet, S. Josset, P. Rabu, and D. Spitzer. Identification, quantification and modification of detonation nanodiamond functional groups. *Diam Relat Mater*, 22: 113–117, 2012.
- [SRH⁺14] J. Slegerova, I. Rehor, J. Havlik, H. Raabova, E. Muchova, and P. Zigler. Nanodiamonds as intracellular probes for imaging in biology and medicine. In *Intracellular delivery II*, pages 363–401. Springer Netherlands, 2014.
- [SRL⁺09] R. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam, S. Lu, X. Xu, X.-Q. Zhang, H. Huang, E. Osawa, and D. Ho. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles. *Biomaterials*, 30: 5720–5728, 2009.
- [SRS07] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz. SELEX - a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*, 24: 381–403, 2007.
- [SS93] M. Sassanfar and J. W. Szostak. An RNA motif that binds ATP. *Nature*, 364: 550–553, 1993.
- [STK64] T. Shimanouchi, M. Tsuboi, and Y. Kyogoku. Infrared spectra of nucleic acids and related compounds. *Adv Chem Phys*, 7: 435–498, 1964.
- [SWK⁺05] H.-M. So, K. Won, Y. H. Kim, B.-K. Kim, B. H. Ryu, P. S. Na, H. Kim, and J.-O Lee. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. *J Am Chem Soc*, 127: 11906–11907, 2005.
- [SZB02] O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, and D. W. Brenner. Carbon nanostructures. *Crit Rev Solid State*, 27 (3/4): 227–356, 2002.
- [TB99] I. Tinoco and C. Bustamante. How RNA folds. *J Mol Biol*, 293 (2): 271–281, 1999.
- [TBDPM04] B. Tian, P. C. Bevilacqua, A. Diegelman-Parente, and M. B. Mathews. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 1013–1023, 2004.
- [TCA09] E. Torres-Chavolla and E. C. Alocilja. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosens Bioelectron*, 24: 3175–3182, 2009.
- [TG90] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249: 505–510, 1990.
- [TG13] J. Thomas and T. Gemming. *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie*. Springer-Verlag, 2013.
- [TLS⁺09] S. Turner, O. I. Lebedev, O. Shenderova, I. I. Vlasov, J. Verbeeck, and G. V. Tendeloo. Determination of size, morphology, and nitrogen impurity location in treated detonation nanodiamond by transmission electron microscopy. *Adv Funct Mater*, 19: 2116–2124, 2009.

- [TM09] S. Tombelli and M. Mascini. Aptamers as molecular tools for bioanalytical methods. *Curr Opin Mol Ther*, 11 (2): 179–188, 2009.
- [TMG92] C. Tuerk, S. MacDougall, and L. Gold. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 6988–6992, 1992.
- [TMM05] S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini. Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron*, 20 (12): 2424–2434, 2005.
- [Tsu61] M. Tsuboi. Infrared spectra and secondary structure of deoxyribonucleic acid. *Sup Prog Theor Phys*, 17: 99–107, 1961.
- [TXSY06] J. Tang, J. Xie, N. Shao, and Y. Yan. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. *Electrophoresis*, 27: 1303–1311, 2006.
- [Uga92] D. Ugarte. Curling and closure of graphitic networks under electron beam irradiation. *Nature*, 359: 707–709, 1992.
- [USM⁺02] K. Ushizawa, Y. Sato, T. Mitsumori, T. Machinami, T. Ueda, and T. Ando. Covalent surface immobilization of DNA on diamond and its verification by diffuse reflectance infrared spectroscopy. *Chem Phys Lett*, 351: 105–108, 2002.
- [VDE90] K. V. Volkov, V. V. Danilenko, and V. I. Elin. Diamond synthesis from the carbon of detonation products. In Russian. *Fiz Goren Vzryva*, 26: 123–125, 1990.
- [VG03] M. Vairamani and M. L. Gross. G-quadruplex formation of thrombin-binding aptamer detected by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 125 (1): 42–43, 2003.
- [VMS⁺08] S. Vial, C. Mansuy, S. Sagan, T. Irinopoulou, F. Burlina, J.-P. Boudou, G. Chassaing, and S. Lavielle. Peptid-grafted nanodiamonds: preparation, cytotoxicity and uptake in cells. *Chem Bio Chem*, 9: 2113–2119, 2008.
- [VTCL09] V. Vaijyanthimala, Y.-K. Tzeng, H.-C. Chang, and C.-L. Li. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake. *Nanotechnology*, 20: 425103, 2009.
- [Vul06] A. Y. Vul'. Characterization and physical properties of UNCD particles. In *Ultra nanocrystalline diamond: synthesis, properties, and applications*. O. A. Shenderova and D. M. Gruen (eds.), William Andrew, 2006.
- [WC06] J. Wang and J. A. Carlisle. Covalent immobilization of glucose oxidase on conducting ultrananocrystalline diamond thin-films. *Diam Relat Mater*, 15: 279–284, 2006.
- [WCC⁺12] M.-F. Weng, B.-J. Chang, S.-Y. Chiang, N.-S. Wang, and H. Niu. Cellular uptake and phototoxicity of surface-modified fluorescent nanodiamonds. *Diam Relat Mater*, 22: 96–104, 2012.
- [WGM03] S. Welz, Y. G. Gogotsi, and J. McNallan. Nucleation, growth, and graphitization of diamond nanocrystals during chlorination of carbides. *J Appl Phys*, 93: 4207–4214, 2003.
- [WHN⁺03] S. Wenmackers, K. Haenen, M. Nesladek, P. Wagner, L. Michiels, M. VandeVen, and M. Ameloot. Covalent immobilization of DNA on CVD diamond films. *Phys Status Solidi A*, 199 (1): 44–48, 2003.
- [WJPW16] Y. Wu, F. Jelezko, M. B. Plenio, and T. Weil. Diamant-Quantensensoren in der Biologie. *Angew Chem*, 128: 6696–6709, 2016.

- [WLS*97] K. P. Williams, X.-H. Liu, T. N. M. Schuhmacher, H. Y. Lin, D. A. Ausiello, P. S. Kim, and D. P. Bartel. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *PNAS*, 94 (21): 11285–11290, 1997.
- [WMS91] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, and C. T. Seto. Molecular self-assembly and nanotechnology: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science*, 254 (5036): 1312–1319, 1991.
- [WN06] O. A. Williams and M. Nesladek. Growth and properties of nanocrystalline diamond films. *Phys Status Solidi A*, 203 (13): 3375–3386, 2006.
- [WNS98] C. Wilson, J. Nix, and J. Szostak. Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot. *Biochemistry*, 37 (41): 14410–14419, 1998.
- [Woc07] A. Wochner. *Selektion von Aptameren gegen Antibiotika und deren Einsatz in empfindlichen Assayformaten*. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2007.
- [WS98] S. T. Wallace and R. Schroeder. In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibodies. *RNA*, 4: 112–123, 1998.
- [WS08] J.-G. Walter and F. Stahl. Aptamere in der Biosensorik. *Chem-Ing-Tech*, 80 (6): 771–781, 2008.
- [WVV*09] S. Wenmackers, V. Vermeeren, M. VandeVen, M. Ameloot, N. Bijnens, K. Haenen, L. Michiels, and P. Wagner. Diamond-based DNA sensors: surface functionalization and read-out strategies. *Phys Status Solidi A*, 206 (3): 391–408, 2009.
- [WWD*96] T. W. Wiegand, P. B. Williams, S. C. Dreskin, M. H. Jouvin, J. P. Kinet, and D. Tasset. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol*, 157 (1): 221–230, 1996.
- [XXZ*11] Y. Xing, W. Xiong, L. Zhu, E. Osawa, S. Hussin, and L. Dai. DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS Nano*, 5 (3): 2376–2384, 2011.
- [YAB*02] W. Yang, O. Ausiello, J. E. Butler, W. Cai, J. A. Carlisle, J. E. Gerbi, D. M. Gruen, T. Knickerbocker, T. L. Lassetter, J. N. Russell, L. M. Smith, and R. J. Hamers. DNA-modified nanocrystalline diamond thin-films as stable, biological active substrates. *Nat Mater*, 1 (4): 253–257, 2002.
- [YGME98] Q. Yang, I. J. Goldstein, H.-Y. Mei, and D. R. Engelke. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *PNAS*, 95 (10): 5462–5467, 1998.
- [YKC*05] S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang, K.-M. Chen, and Y.-C. Yu. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity. *J Am Chem Soc*, 127 (50): 17604–17605, 2005.
- [ZCL*09] X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, X. Xu, E. Osawa, and D. Ho. Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery. *ACS Nano*, 3 (9): 2609–2616, 2009.
- [ZEKS92] A. Zeeck, S. Eick, B. Krone, and K. Schröder. *Chemie für Mediziner. 2. Auflage*. Urban & Schwarzenberg, 1992.
- [ZGAV10] A. N. Zhukov, F. R. Gareeva, A. E. Aleksenskii, and A. Y. Vul'. Surface charge of detonation nanodiamond particles in aqueous solution of simple 1 : 1 electrolytes. *Colloid +*, 72 (5): 640–646, 2010.

[ZGSAB⁺12] G. A. Zelada-Guillen, J. L. Sebastian-Avila, P. Blondeau, J. Riu, and F. X. Rius. Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers. *Biosens Bioelectron*, 31: 226–232, 2012.

[ZGTKN⁺13] G. A. Zelada-Guillen, A. Tweed-Kent, M. Niemann, H. U. Göringer, J. Riu, and F. X. Rius. Ultrasensitive and real-time detection of protein in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor. *Biosens Bioelectron*, 41: 366–371, 2013.

[ZLK⁺13] M. A. Zurbuchen, M. P. Lake, S. A. Kohan, B. Leung, and L.-S. Bouchard. Nanodiamond landmarks for subcellular multimodal optical and electron imaging. *Sci Rep*, 3: 2668, 2013.

[ZLZW09] Q. Zou, Y. G. Li, L. H. Zou, and M. Z. Wang. Characterization of structures and surface state of the nanodiamond synthesized by detonation. *Mater Charact*, 60: 1257–1262, 2009.

[ZMN⁺11] Q. Zhang, V. N. Mochalin, I. Neitzel, I. Y. Knoke, J. Han, C. A. Klug, J. G. Zhou, P. I. Lelkes, and Y. Gogotsi. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. *Biomater*, 32 (1): 87–94, 2011.

[Zsc13] M. Zschornak. Werkstoffwissenschaft - Komplex 2: Kristallstruktur, Realkristall, Gefüge. Vorlesungsskript im Masterstudiengang "Zerstörungsfreie Prüfung", DIU Dresden, 2013.

Anhang 1 – Parameter der Partikelgrößen- und Zeta-Potenzial-Messungen

(zu 4.1 Charakterisierung kolloidaler Nanodiamantsuspensionen)

Tab. A-1.1: Parameter der ersten Partikelgrößen-Messung.

Ergebnisse der Verteilung			Ergebnis kumulativ		
Peak	Durchmesser (nm)	STABW	Durchmesser (d)		
1	79,8	39,3	Polydispersitätsindex (P.I.)	0,184	
2	0,0	0,0	Diffusionskonstante (D)	7,675e-008	(cm ² /s)
3	0,0	0,0	Molekulargewicht	1,698e+008	
4	0,0	0,0	Messbedingungen		
5	0,0	0,0	Temperatur	25,0	(°C)
Durchschnitt Partikelgröße	79,8	39,3	Lösungsmittel	Wasser	
			Brechungsindex	1,3328	
			Viskosität	0,8878	(cP)
Rest	4,45e-003	(O.K)	Streuungsintensität	9669	(cP)

Tab. A-1.2: Parameter der zweiten Partikelgrößen-Messung.

Ergebnisse der Verteilung			Ergebnisse kumulativ		
Peak	Durchmesser (nm)	STABW	Durchmesser (d)		
1	77,9	37,9	Polydispersitätsindex (P.I.)	0,200	
2	0,0	0,0	Diffusionskonstante (D)	7,739e-008	(cm ² /s)
3	0,0	0,0	Molekulargewicht	1,670e+008	
4	0,0	0,0	Messbedingungen		
5	0,0	0,0	Temperatur	25,0	(°C)
Durchschnitt Partikelgröße	77,9	37,9	Lösungsmittel	Wasser	
			Brechungsindex	1,3328	
			Viskosität	0,8878	(cP)
Rest	5,335e-003	(O.K)	Streuungsintensität	9397	(cps)

Tab. A-1.3: Parameter der ersten Zeta-Potenzial-Messung einer 0,5%igen kolloidalen ND-Suspension.

Zeta-Potenzial	-40,80	(mV)	Dopplerverschiebung	24,85	(Hz)
Mobilität	-3,182e-004	(cm ² /Vs)	Grundfrequenz	123,9	(Hz)
Konduktivität	0,0834	(mS/cm)			
Zeta-Potenzial der Zelle			Eigenschaften des Verdünnungsmittels		
Oberseite	-106,93	(mV)	Verdünnungsmittel	Wasser	
Unterseite	-116,64	(mV)	Temperatur	25,0	(°C)
Zellenparameter			Brechungsindex	1,3328	
Zelltyp	Flusszelle		Viskosität	0,8878	(cP)
∅ Elektrisches Feld	-16,17	(V/cm)	Dielektrische Konstante	78,3	
∅ Strom	-0,07	(mA)			

Tab. A-1.4: Parameter der zweiten Zeta-Potenzial-Messung einer 0,5%igen kolloidalen ND-Suspension.

Zeta-Potenzial	-39,61	(mV)	Dopplerverschiebung	24,13	(Hz)
Mobilität	-3,89e-004	(cm ² /Vs)	Grundfrequenz	124,6	(Hz)
Konduktivität	0,0829	(mS/cm)			
Zeta-Potenzial der Zelle			Eigenschaften des Verdünnungsmittels		
Oberseite	-95,32	(mV)	Verdünnungsmittel	Wasser	
Unterseite	-143,80	(mV)	Temperatur	25,0	(°C)
Zellenparameter			Brechungsindex	1,3328	
Zelltyp	Flusszelle		Viskosität	0,8878	(cP)
∅ Elektrisches Feld	-16,17	(V/cm)	Dielektrische Konstante	78,3	
∅ Strom	-0,07	(mA)			

Anhang 2 – Nukleotidsequenz von EF1a

(zu 3.4 Herstellung von Nanodiamant-Aptamer-Konjugaten)

EF1a (elongation factor 1a) von *Oreochromis niloticus* (Tilapia)

GenBank: AB075952.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/18181926>)

>gi|18181926|dbj|AB075952.1| *Oreochromis niloticus* EF1a mRNA for elongation factor 1a, complete cds

```
GCCGTGAAAACCCAGAAACACCGAAACTAAAACAATGGGAAAAGAAAAGACCCACATCAACATCGTGGTCATTGGCC
ATGTCGACTCCGGCAAGTCCACCTCCACCGTCACTTGATCTACAAGTGC GGAGGAATCGACAAGAGAACCATCGAGA
AGTTTGAGAAGGAAGCCGCTGAGATGGGAAAAGGGCTCCTTCAAGTACGCTGGGTGCTGGACAACTGAAGGCTGA
GCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGTCTGTGGAAGTTCGAGACCAGCAAGTACTACGTGACCATCATTGATGC
CCCTGGACACAGAGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGTGTGCTGATCGTTGCTGCT
GGTGTGGCGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGAACGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTGGCCTTTACCTGGGT
GTGAAGCAGCTCATCGTTGGAGTCAACAAGATGGACTCCACCGAGCCCCCTACAGCCAGGCTCGTTTCGAGGAAATC
ACCAAGGAAGTGAGCGCTACATCAAGAAGATCGGCTACAACCTGCCGCCGTTGCCCTCGTCCCATCTCCGGATGG
CACGGAGACAACATGCTGGAGACCAAGTACAAGATGAGCTGGTTC AAGGGATGGAAGATTGAGCGCAAGGAGGGCA
ATGCCTCTGGAACCACTGCTGGAGGCTCTGGATGCCATCCTGCCACCTTCCC GCCCACTGACAAGCCCCTCCGTCT
GCCCCTGCAGGACGTCTACAAGATTGGCGGTATCGGAACTGTACCCGTCGGTCTGTTGAGACTGGTATCCTGAAGCC
CGGTACCGTGTACCTTCGCCCTGTCAACCTGACCACTGAGGTGAAGTCCGTGGAGATGCACCACGAGTCTCTGCC
CGAGGCCGTGCCCGGTGACAACGTTGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAAATCCGTGCTGGATACGTTGC
TGGCGACAGCAAGAACGACCCACCCAAGGGTGTGAGAGCTTCAACGCTCAGGTCATCATCCTGAACCACCCCGGTCA
GATCGCTGCAGGCTATGCCCTGTGCTGGATTGCCACACTGCCACATCGCTTGCAAGTTCAGCGAGCTGGTTGAGAA
GATCGACCGTCTGTTCTGGCAAGAAGCTTGAGGACAGCCCCAAGTTTGTCAAGTCCGGAGATGCCGCCATTGTCAAAC
TATCCACAGAAGCCATGGTTGTGGAGTCTTCTCCAACCTACCTCCCCTCGGTCGTTTCGCGGTGCGTGACATGAGG
CAGACAGTGGCTGTCGGTGTCAAGTCCGTTATCCCCAAGGAAGTGTCCGAAAGACAACCAAGGCTGCAGAGAA
GGCCAGAAGGGCAAGAAATGAATGGCCGTTCAAGGCATCCATCAACAAGACGTGTGCCGGCAGCAGCGGGCAACA
TCTTCCCTTACATCTTCTCCACCTGGATCATCCTCGCTGAGGCACAGCTCTATACTCAAGGACTGGCTTATGCTGAT
TAAAACCCATCGCAAGAGTTTTTCGAGGAAAAAGAACTCTATGGCATTGTCACTTACCTGAATCACATGACAGTGCCTC
TTCTCAGTTGAGTTTAAGTTGAAATGGTTTAGAACTGTATCTCAATGTTGAAATGCCACATTTGATTGAAAGAAGCT
GCTGGTAACTAATAAAAATAATGTCTCTG
```

Fragmentgröße: 241 Basenpaare

Primer:

tiEF1S-832 (forward) TGTTGAGACTGGTATCCTGAAGCC

tiEF1AS-1072 (reverse) GCTTCAACGCTCAGGTCATCATC

Anhang 3 – GFP-Filter-Spektrum

(zu 3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie)

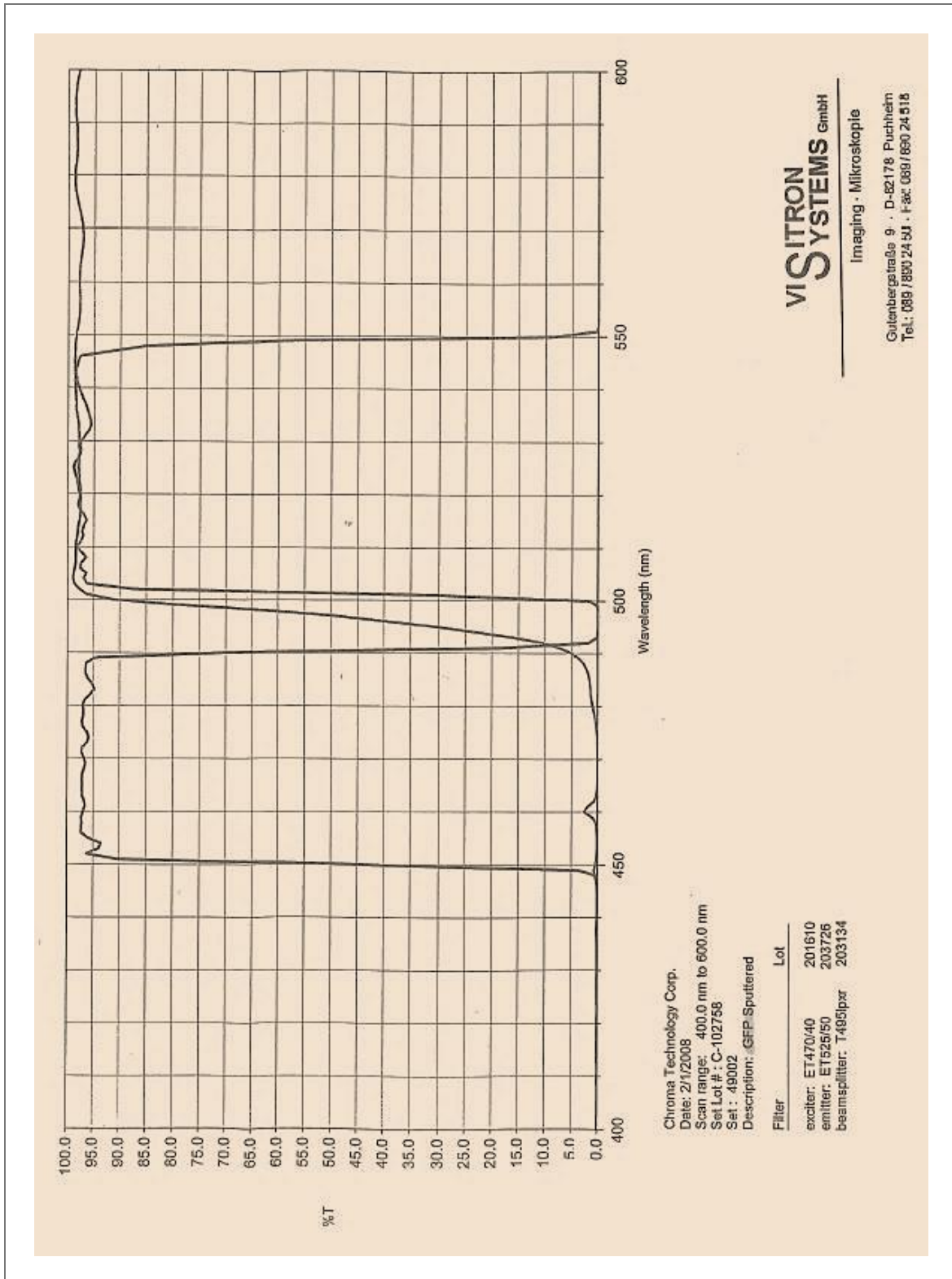


Abb. A-3.1: Wellenlängenbereiche für Anregung und Emission des verwendeten GFP-Filtersatzes.

Anhang 4 – FT-IR-Spektren von Nanodiamanten

(zu 4.3 Ergebnisse FT-IR-Spektroskopie → 4.3.1 Nanodiamanten)

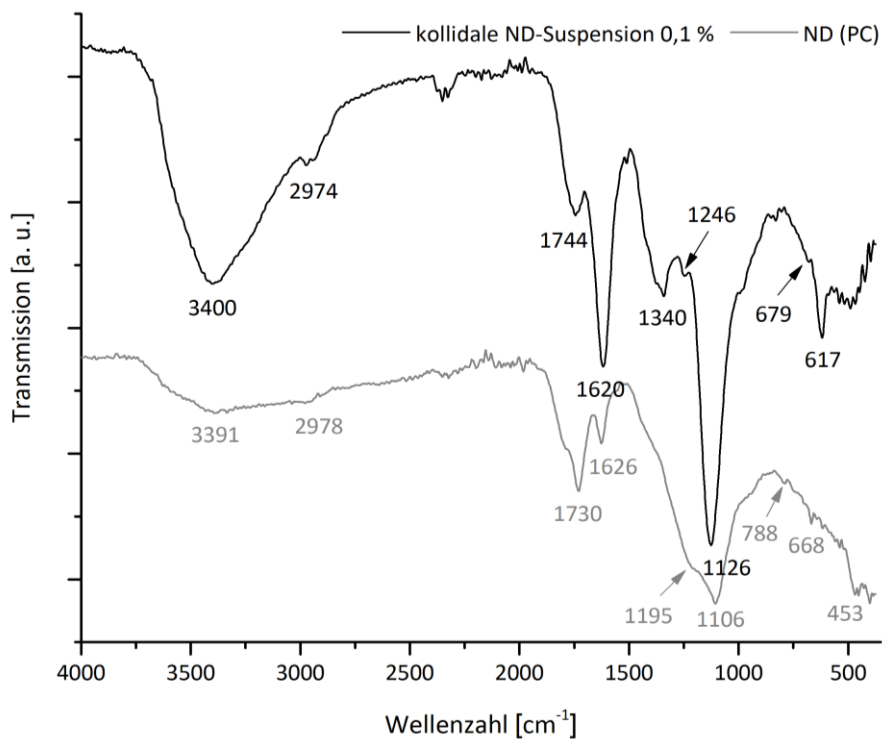


Abb. A-4.1: Vergleich der FT-IR-Spektren von kolloidaler ND-Suspension und ND (PC) (zu Abb. 4.46).

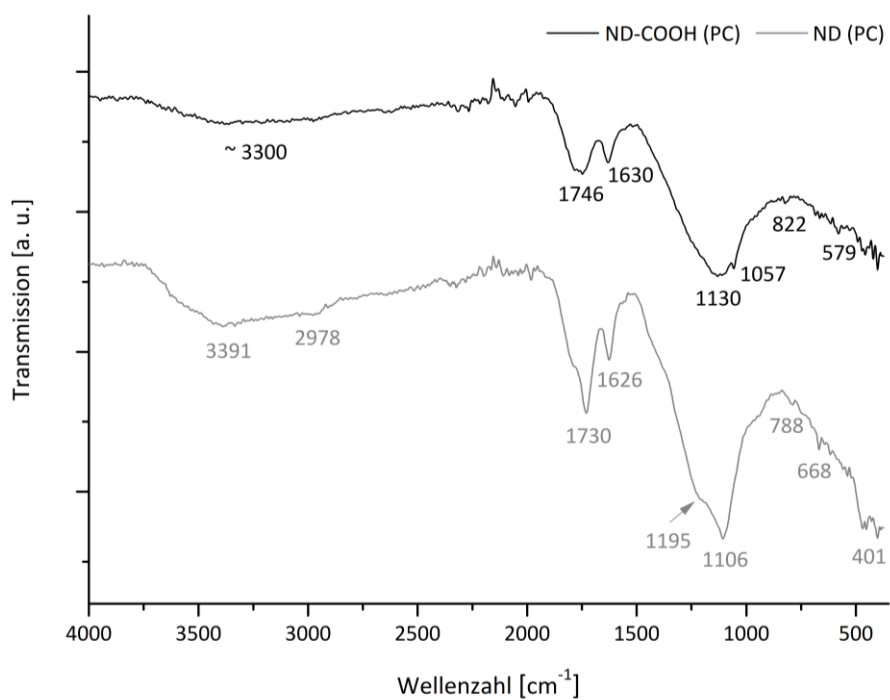


Abb. A-4.2: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-COOH (PC) und ND (PC) (zu Abb. 4.48).

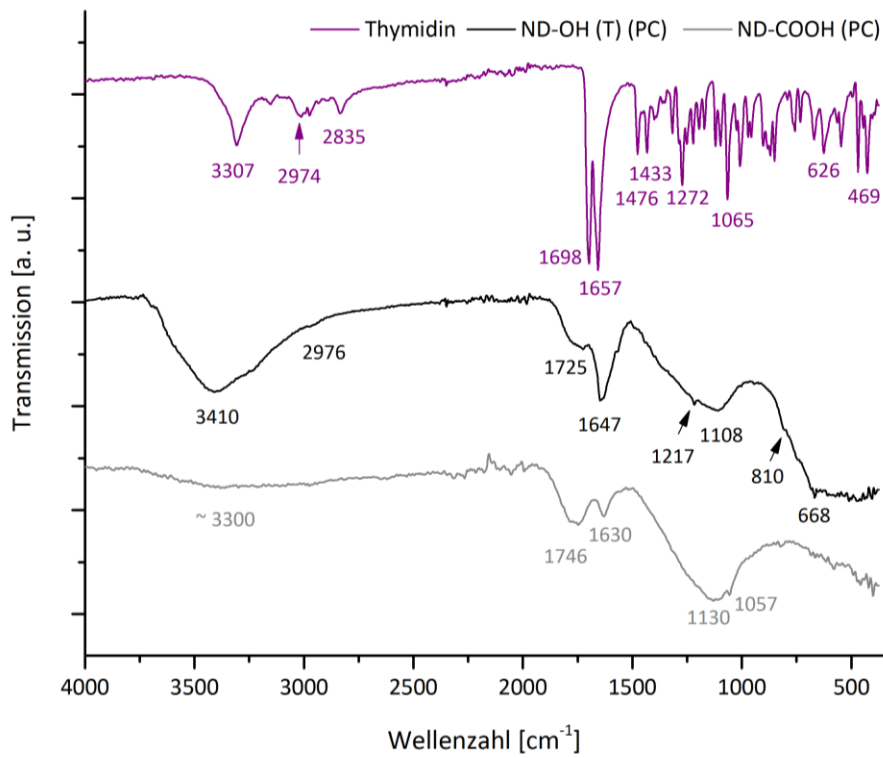


Abb. A-4.3: ND-OH (T) (PC) im Vergleich mit den FT-IR-Spektren von Thymidin und ND-COOH (PC) (zu Abb. 4.50).

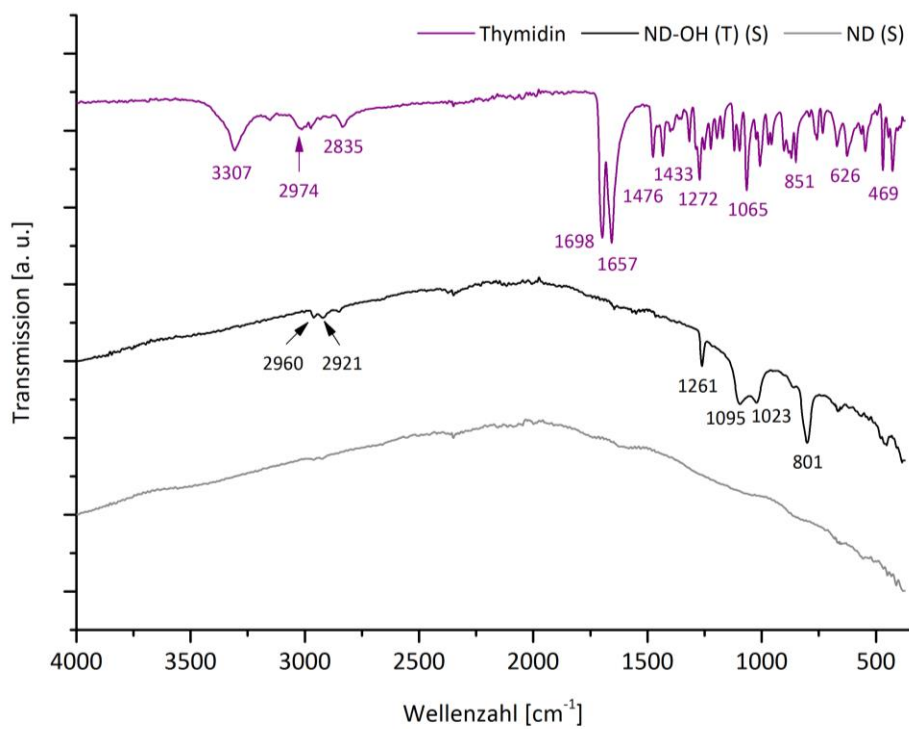


Abb. A-4.4: ND-OH (T) (S) im Vergleich mit den FT-IR-Spektren von Thymidin und ND (S) (zu Abb. 4.51).

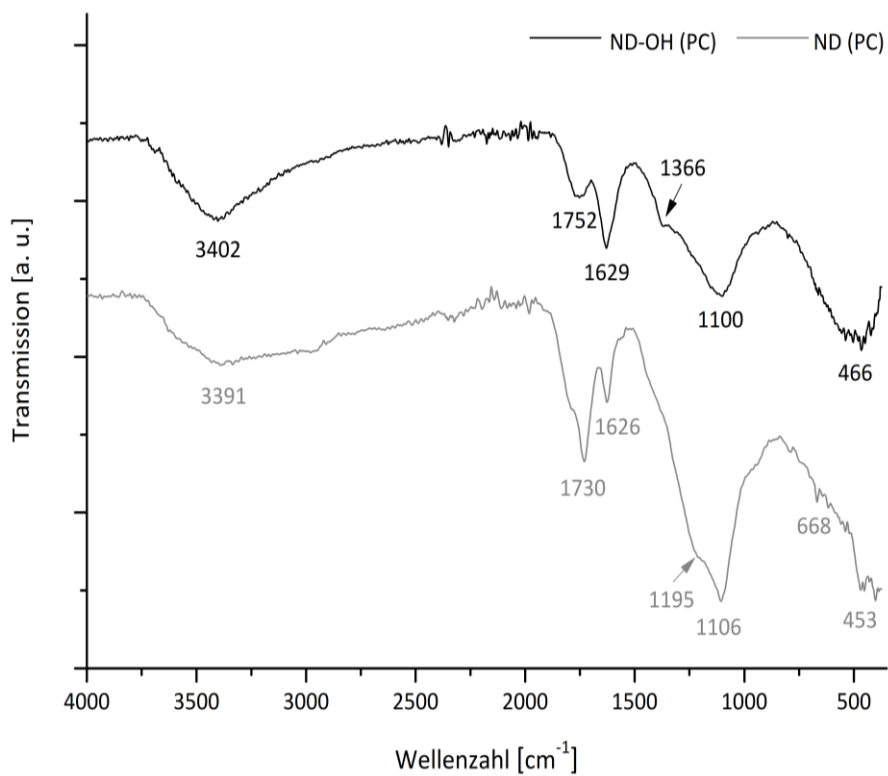


Abb. A-4.5: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-OH (PC) und ND (PC) (zu Abb. 4.52).

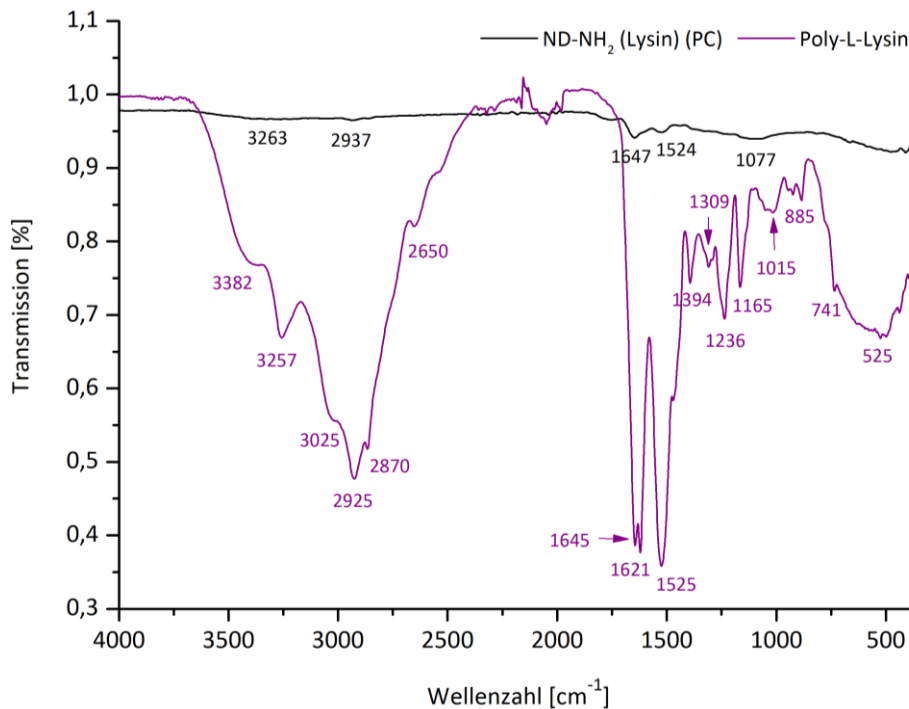


Abb. A-4.6: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-NH₂ (Lysin) (PC) und Poly-L-Lysin (zu Abb. 4.55).

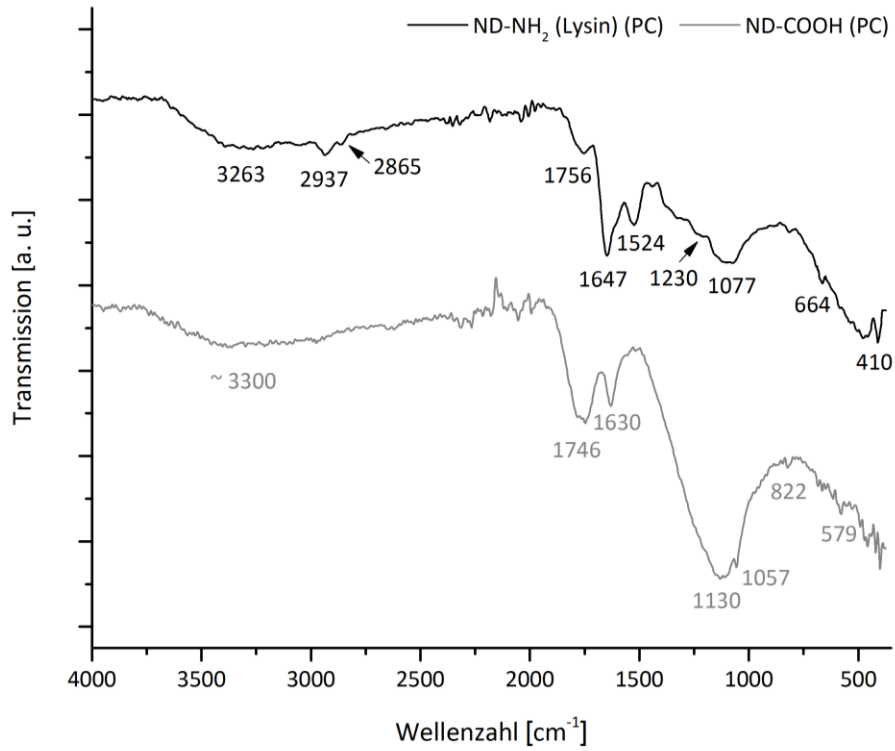


Abb. A-4.7: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-NH₂ (Lysin) (PC) und ND-COOH (PC) (zu Abb. 4.55).

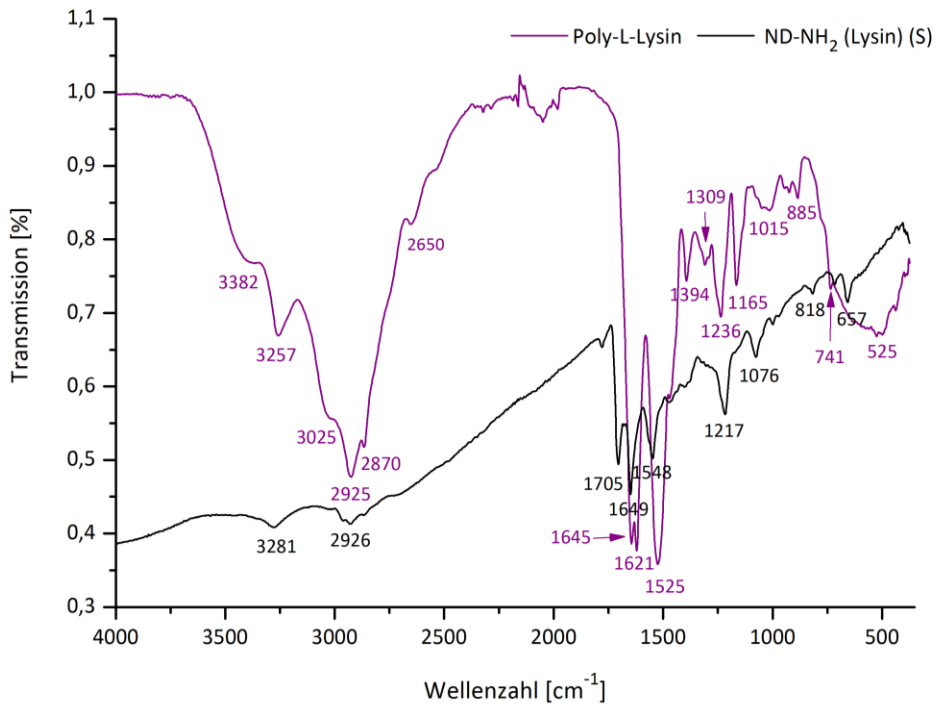


Abb. A-4.8: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-NH₂ (Lysin) (S) und Poly-L-Lysin (zu Abb. 4.56).

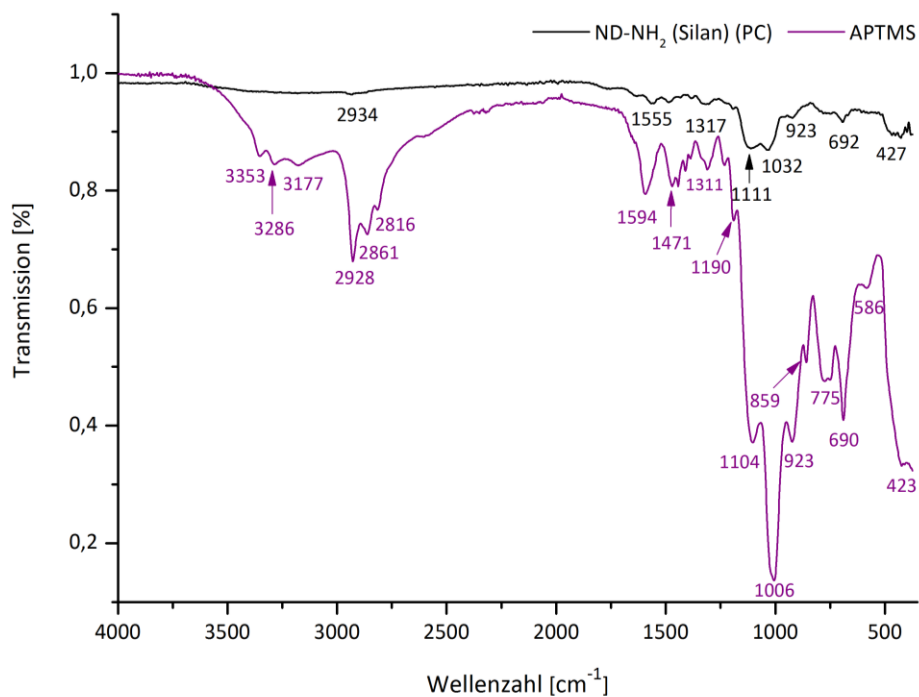


Abb. A-4.9: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-NH₂ (Silan) (PC) und APTMS (zu Abb. 4.57).

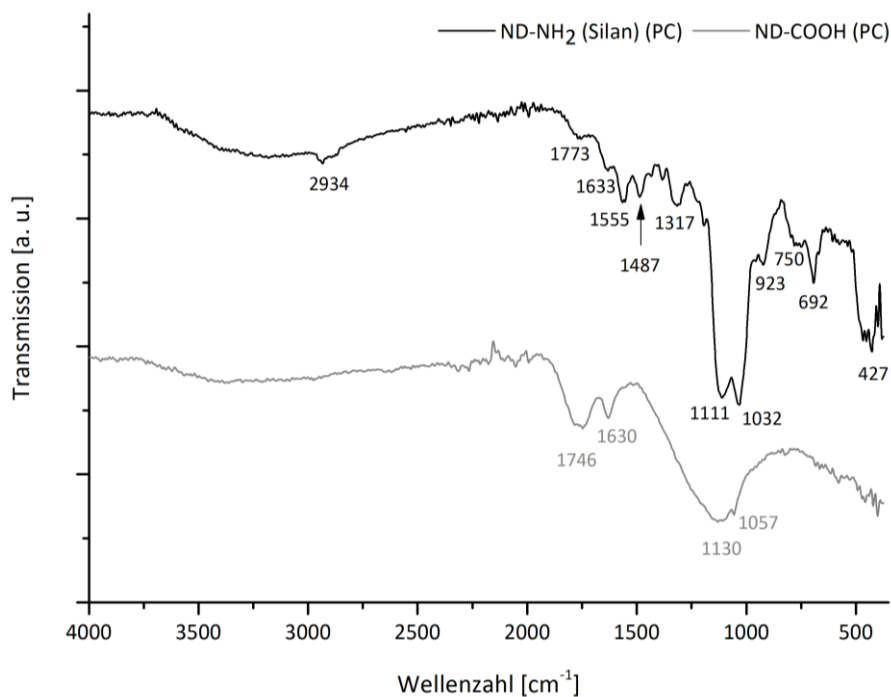


Abb. A-4.10: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND-NH₂ (Silan) (PC) und ND-COOH (PC) (zu Abb. 4.57).

Anhang 5 – FT-IR-Spektren von Nanodiamant-DNA-Konjugaten

(zu 4.3 Ergebnisse FT-IR-Spektroskopie → 4.3.2 Nanodiamant-DNA-Konjugate)

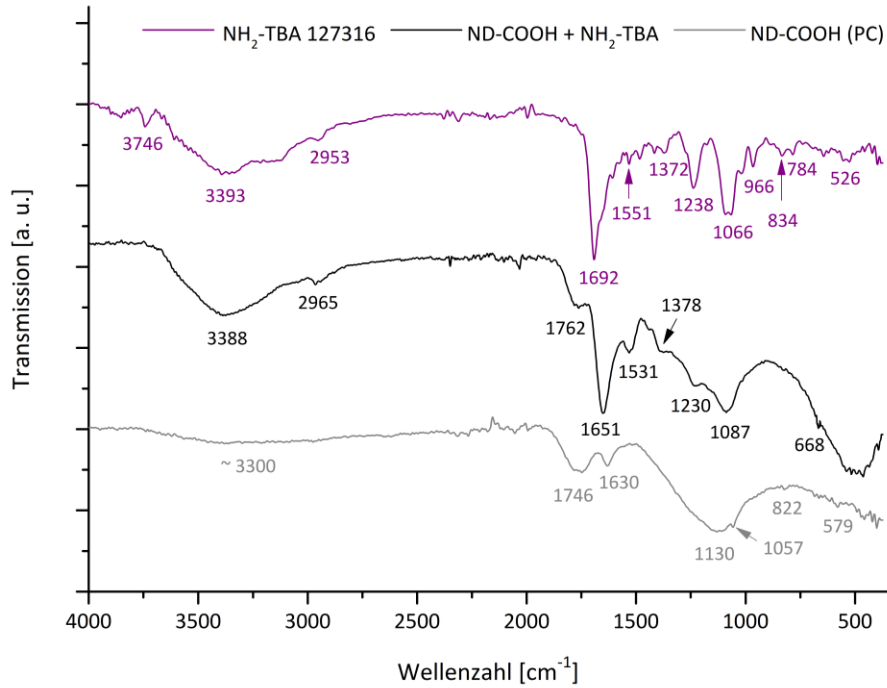


Abb. A-5.1: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (ND-COOH (PC) + $\text{NH}_2\text{-TBA}$, Bsp. 1) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.58, Amidbindung).

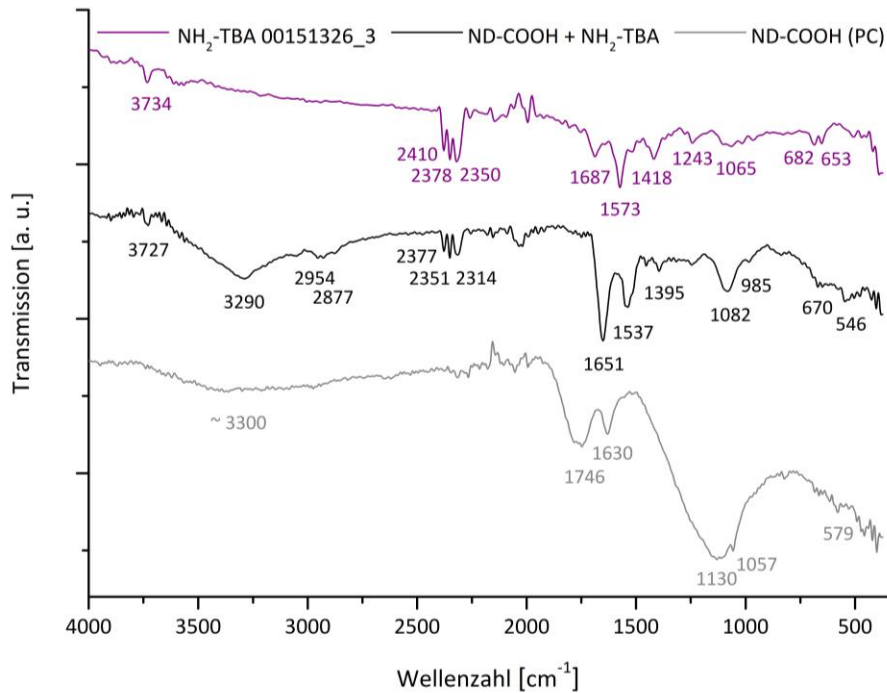


Abb. A-5.2: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (ND-COOH (PC) + $\text{NH}_2\text{-TBA}$, Bsp. 2) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.59, Amidbindung).

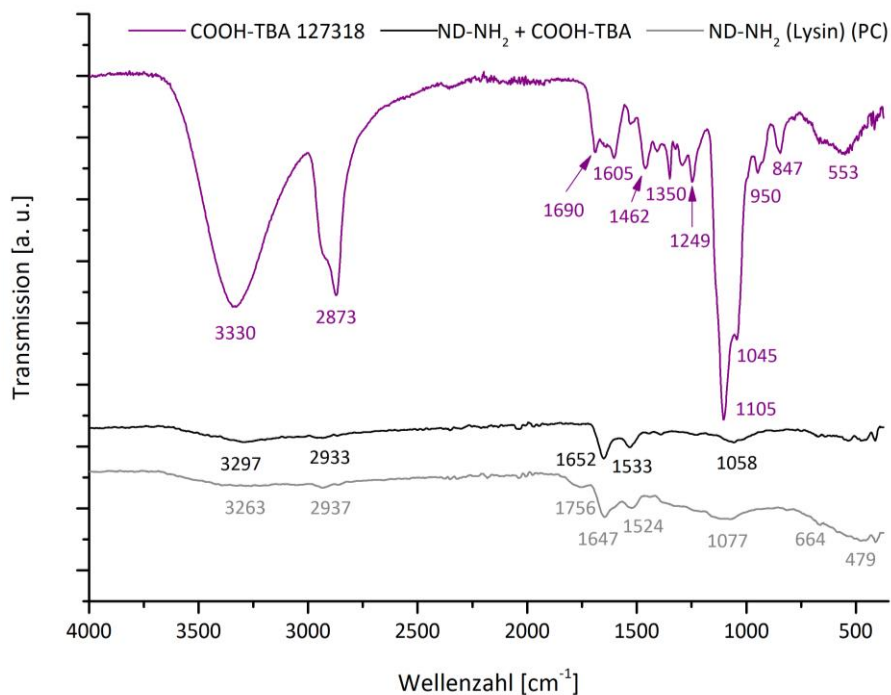


Abb. A-5.3: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (ND-NH₂ (Lysin) (PC) + COOH-TBA) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.60, Amidbindung).

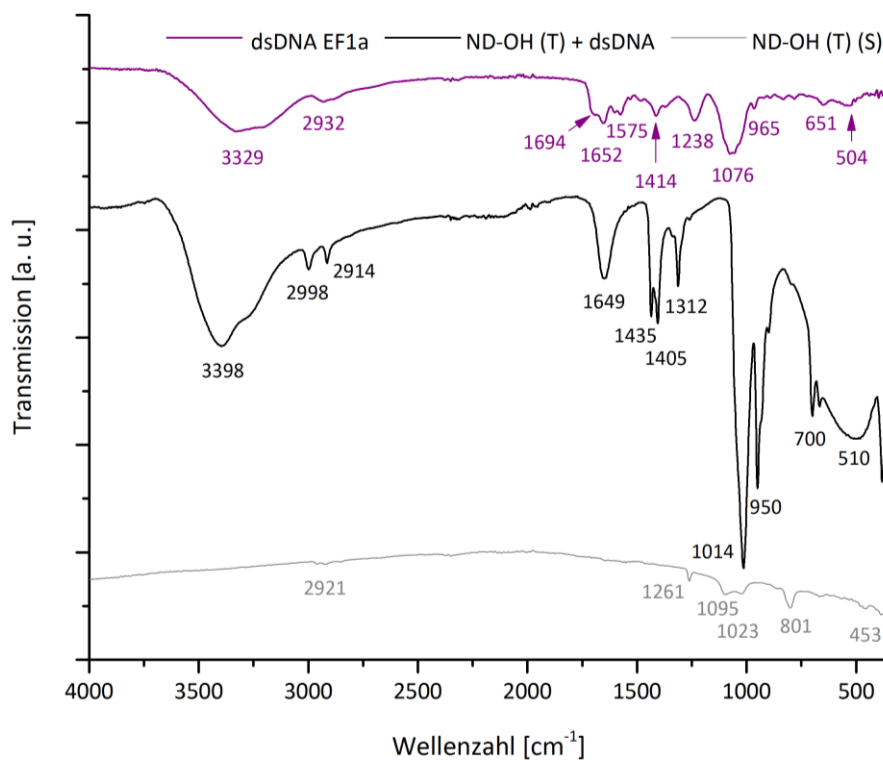


Abb. A-5.4: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (a) ND-OH (T) (S) + dsDNA) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.62, Phosphodiesterbindung).

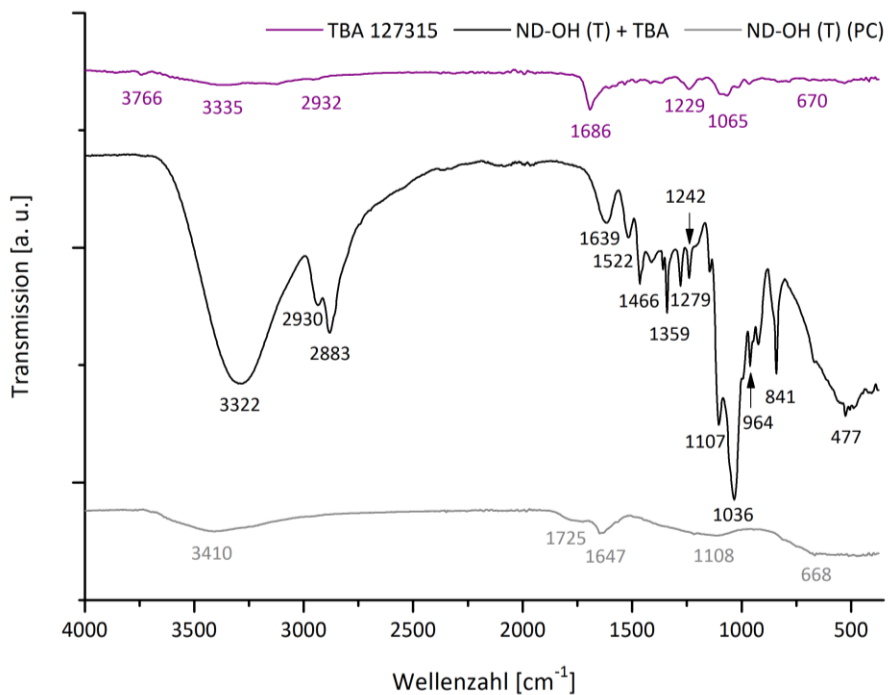


Abb. A-5.5: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (b) ND-OH (T) (PC) + TBA und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.63, Phosphodiesterbindung).

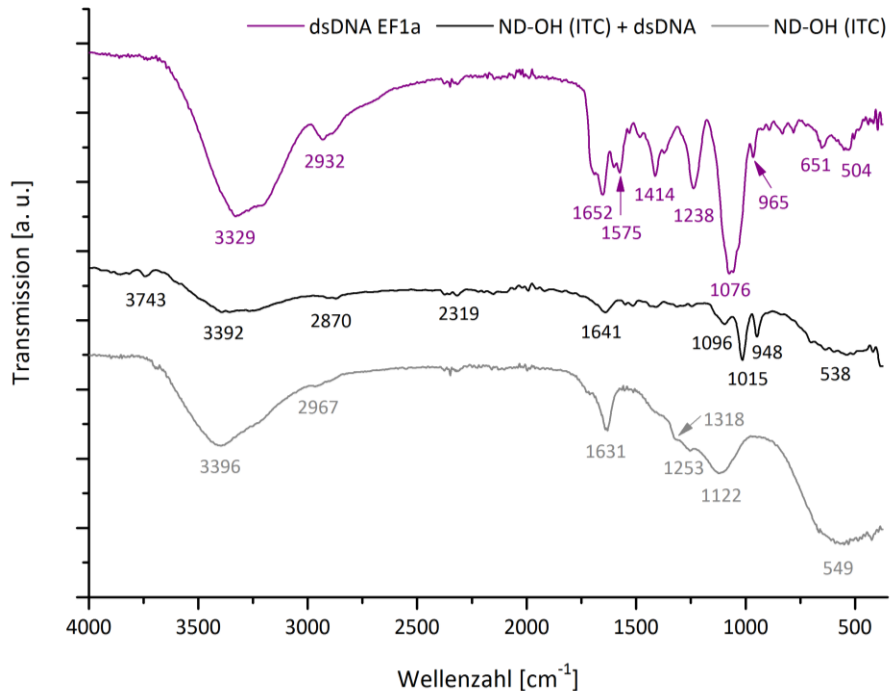


Abb. A-5.6: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (c) ND-OH (ITC) + dsDNA) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.64, Phosphodiesterbindung).

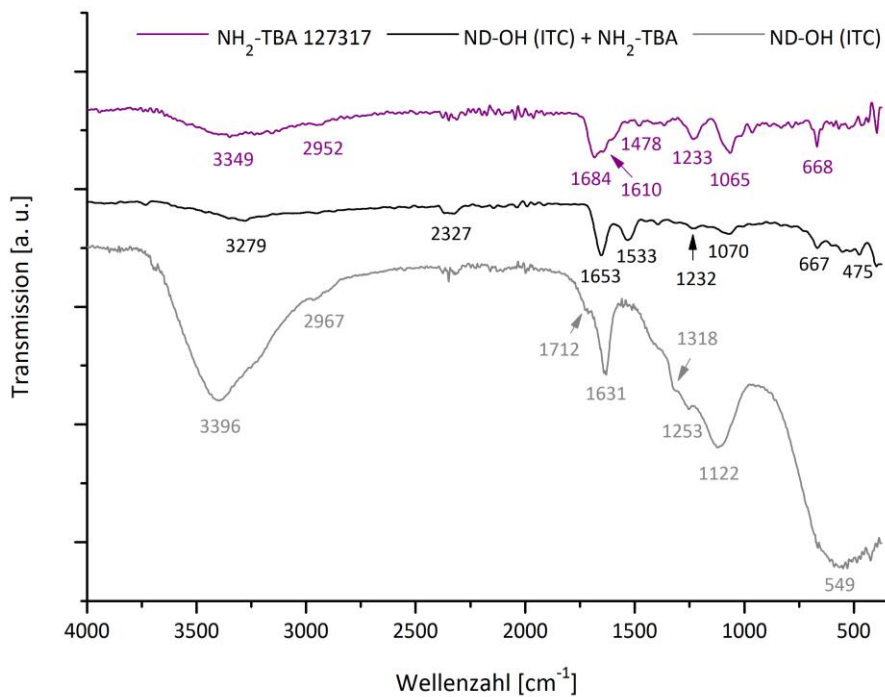


Abb. A-5.7: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (ND-OH (ITC) + NH₂-TBA) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.66, Isoharnstoffbindung).

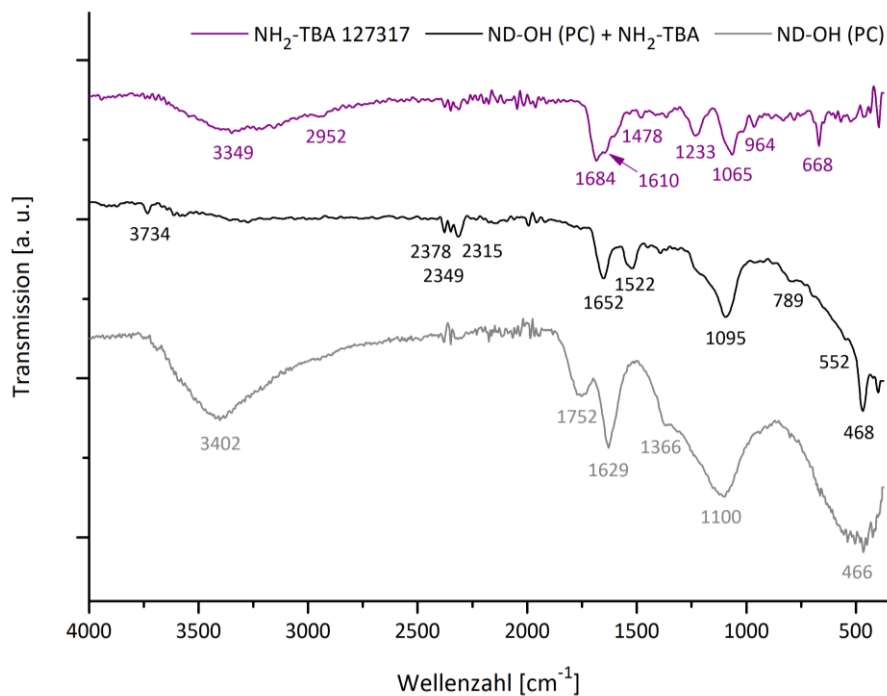


Abb. A-5.8: Vergleich der FT-IR-Spektren von Konjugaten (ND-OH (PC) + NH₂-TBA) und Ausgangsmaterialien (zu Abb. 4.67, Isoharnstoffbindung).

Verzeichnis der Formelzeichen

a	Teilchenradius
c	Lichtgeschwindigkeit
d	hydrodynamischer Durchmesser
D	Diffusionskoeffizient
E	elektrische Feldstärke
F_R	Reibungskraft
k_B	Boltzmann-Konstante
n	Brechungsindex
q	Streuvektor
T	(absolute) Temperatur
U	elektrophoretische Mobilität
v	Teilchengeschwindigkeit
α	Gitterkonstante
ε	Dielektrizitätskonstante
η	Viskosität des Dispersionsmediums
η_0	dynamische Viskosität des Lösungsmittels
θ	Streuwinkel
θ_c	kritischer Winkel
λ	Wellenlänge
ν_D	Frequenzverschiebung des Streulichtes
ν	Frequenz
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
π	Kreiszahl
Ψ_0	Oberflächenpotenzial
Ψ_S	Sternpotenzial

Abkürzungsverzeichnis

APTMS	(3-Aminopropyl)-Trimethoxysilan
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (eng. <i>attenuated total reflection</i>)
BASD	Mahlkörper-unterstützte Ultraschallzerkleinerung (engl. <i>bead assisted sonic disintegration</i>)
BrCN	Bromcyan (eng. <i>cyanogen bromide</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
BSE	rückgestreute Elektronen (eng. <i>backscattered electrons</i>)
CDI	Carbonyldiimidazol
cDNA	komplementäre DNA (eng. <i>complementary DNA</i>)
CVD	chemische Gasphasenabscheidung (eng. <i>chemical vapor deposition</i>)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DLS	dynamische Lichtstreuung (eng. <i>dynamic light scattering</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (eng. <i>desoxyribo nucleic acid</i>)
DSC	Disuccinimidyl
dsDNA	doppelsträngige DNA (eng. <i>double stranded DNA</i>)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie (eng. <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
ELS	elektrophoretische Lichtstreuung (eng. <i>electrophoretic light scattering</i>)
ESB	<i>Energy and angle selective BSE</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot (-Spektroskopie)

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (eng. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HPHT	Hochdruck-Hochtemperatur- (eng. <i>high-pressure-high-temperature</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IgE	Immunglobulin E
IRE	Internes Reflexionselement
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/ Ionisation (eng. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization</i> , MALDI)
MES	2-(N-morpholino)ethan-Sulfonsäure
MWCNT	mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (eng. <i>multiwalled carbon nanotubes</i>)
ND	Nanodiamant(en)
ND-COOH	Nanodiamanten mit Carboxylgruppen
ND-NH ₂	Nanodiamanten mit Aminogruppen
ND-OH	Nanodiamanten mit Hydroxylgruppen
ND (ITC)	von der Firma ITC erworbene Nanodiamanten
ND (PC)	von der Firma Plasmachem erworbene Nanodiamanten
ND (S)	von der Firma Sinta erworbene Nanodiamanten
NEB	New England Biolabs
NHS	N-Hydroxysuccinimid
ODA	Octadecylamin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (eng. <i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Polydispersitätsindex
PLL	Poly-L-Lysin
PLLA	Poly-L-Milchsäure (eng. <i>poly-L-lactic acid</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie) (REM) (eng. <i>scanning electron microscope, SEM</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (eng. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur

SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (eng. <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -Maleimidomethyl)cyclohexan-1-Carboxylat
ssDNA	einzelsträngige DNA (eng. <i>single stranded DNA</i>), in bestimmter Länge auch als Oligonukleotide oder kurz Oligos bezeichnet
STABW	Standardabweichung
STEM	Rastertransmissionselektronenmikroskop (RTEM), (eng. <i>scanning transmission electron microscope</i>)
SWCNT	einwandige Kohlenstoffnanoröhren (eng. <i>single walled carbon nanotubes</i>)
TBA	Thrombin-Aptamer
TE	Tris-EDTA (Puffer)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie) (eng. <i>transmission electron microscopy</i>)
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-VIS	Ultraviolett-sichtbares Licht (eng. <i>ultraviolet-visible light</i>)
ZP	Zeta-Potenzial

Eigene wissenschaftliche Beiträge

Publikationen in Journals

Mkandawire M., Pohl A., Gubarevich T., Lapina V., Appelhans D., Rödel G., Pompe W., Schreiber J., Opitz J. (2009)

Selective targeting of green fluorescent nanodiamond conjugates to mitochondria in Hela cells. J. Biophoton., 2 (10): 596-606

Pohl A., Joch S., Michael J., Boschke E., Quenzel P., Schreiber J., Lapina V., Opitz J. (2011)

Testing possibilities for establishing nanodiamond-DNA-conjugates. Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics 2011, SPIE Vol 8087, 80871T; DOI: 10. 1117/12, 889859.

Päßler S., Vonau W., Mertig M., Henseleit A., Quenzel P., Boschke E., Lange A., Jäger K., Rohayem J., Pohl A., Opitz J., Haufe N. (2013)

Entwicklung eines Sensors zur spezifischen Proteindetektion am Beispiel von Norovirus-Kapsidprotein. tm - Technisches Messen, 80 (5): 155-162

Vandenryt T.*, Pohl A.*, van Grinsven B., Thoelen R., De Ceuninck W., Wagner, P., Opitz J. (2013)

Synergizing electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance into one simultaneous read out system for the detection of surface interactions.

Sensors, 13: 14650-14661

*Erstautoren zu gleichen Teilen

Patent

Boschke E., Quenzel P., Bley T., Opitz J., Pohl A., Schreiber J., Lapina V., Päßler S., Vonau W., Rohayem J., Lange A.

Vorrichtung sowie Verfahren zur Steigerung der Anbindungseffizienz in einer Probe mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) und Elektrochemischer Impedanz Spektroskopie (EIS).

DE 10 2011 086 393 A1 – Anmeldung am 15.11.2011, Veröffentlichung am 16.05.2013

Poster

Pohl A., Schreiber J., Boschke E., Quenzel P., Lapina V., Opitz, J.

Biofunctionalized nanodiamonds – coupling DNA to chemically modified detonation nanodiamonds.

BioMat, European Symposium on Biomaterials and Related Areas, 13.-14. April 2011, Jena

Pohl A., Schreiber J., Boschke E., Quenzel P., Lapina V., Opitz J.

Testing possibilities for establishing nanodiamond-DNA-conjugates.

European Conferences on Biomedical Optics, 20th International Congress on Photonics in Europe, 22.-26. Mai 2011, München

Pohl A., Jimenez Monroy K., Murib M. S., Opitz J., van Grinsven B., Vandenry T., Schreiber J., Lapina V., Wagner P.

Carboxylation of nanodiamond surfaces by UV photoattachment of an unsaturated fatty acid followed by coupling of DNA.

Nanofair, 9th International Nanotechnology Symposium, 12.-13. Juni 2012, Dresden

Michael J., Reitzig M., Pohl A., Hannstein I., Schreiber N., Schreiber J., Lapina V., Opitz J.

Surface Improvement and Nondestructive Testing Using Nanodiamonds.

Hasselt Diamond Workshop, 14.-16. März 2012, Hasselt, Belgien

Pohl A., Kovalenko D., Krylov D., Zeh C., Michael J., Reitzig M., Opitz J.

Characterization of chemical modified nanodiamond powders and suspensions by FTIR and Raman spectroscopy.

Diamond and Carbon Materials, 03.-06. September 2012, Granada, Spanien

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Fraunhofer IKTS in Dresden (bis 31.12.2014 Fraunhofer IZFP). Ich möchte an dieser Stelle sehr herzlich allen Personen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Bley für die Übernahme des ersten Gutachtens, die Befürwortung des Themas und die geduldige Begleitung durch die länger andauernde Zeit der Schreibarbeit. Außerdem danke ich für die Möglichkeit der Teilnahme an zwei Vorlesungen am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der TU Dresden, einschließlich des Ablegens der zugehörigen Prüfungen.

Prof. Dr. rer. nat. Anke Krüger, Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg, für die Übernahme des zweiten Gutachtens und das Korrekturlesen der Arbeit.

Dr. rer. nat. Jörg Opitz für die Betreuung der Arbeit am Fraunhofer IKTS und die Möglichkeit der Mitarbeit in einem interdisziplinären FuE-Vorhaben.

Dr. rer. nat. Andrea Standke für die umfangreiche experimentelle Unterstützung im Labor und eine insgesamt sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit. Dr. rer. nat. Jan Michael für seine ständige Diskussionsbereitschaft, technische Hilfestellungen im Labor, das Wirken als ausgleichender Pol im Kollektiv sowie für das Korrekturlesen der Arbeit. Dr.-Ing. habil. Uwe Mühle und Dr. rer. nat. Sven Niese für die Anfertigung der TEM-bzw. REM-Aufnahmen sowie Dr. rer. nat. Rüdiger Rosenkranz für die Erstellung der EDX-Spektren. Allen drei zuletzt genannten Kollegen für die Hilfestellung bei der Auswertung dieser Ergebnisse und ihre Diskussionsbereitschaft. Dipl.-Ing. Nadja Steinke für die Unterstützung in den Computerprogrammen Origin und ImageJ2go.

Bettina Hahnebach (KSI Meinsberg) für die Ermittlung der Partikelgrößen und des Zeta-Potenzials in der Nanodiamantsuspension.

Sehr herzlich danke ich allen Kollegen, die mich während meiner Zeit am Fraunhofer IKTS auf verschiedenste Weise unterstützt haben (ohne Nennung der Titel):

Noch einmal Sven Niese für seine immerwährende gute Laune, die das Arbeitsklima positiv beeinflusst hat. Ronny Klimke, der mich als HiWi auf sehr zuverlässige, selbständige und mitdenkende Art bei verschiedenen Aufgaben unterstützte und mir praktisch wie moralisch eine große Hilfe war. Martina Reich, die mir unermüdlich bei allen Material- und Gerätebestellungen zur Seite stand. Weiterhin möchte ich hier Julia Katzmann, Daria Kovalenko, Manuela Reitzig, Roland Wuchrer, Martin Küttner, Andreas Gommlich, Taras Chapny und nochmals Nadja Steinke nennen. Mein ganz besonderer Dank gilt Marek Rjelka, der mir in vielerlei Hinsicht eine persönliche und fachliche Hilfe war und zudem interessante Eindrücke vom Leben der Sorben in Sachsen vermittelte. Danke, Marek.

Der Sächsischen Aufbaubank danke ich für die Finanzierung des bearbeiteten Forschungsprojektes (Projekt-Nr. 14218/2465) sowie allen an diesem Vorhaben beteiligten Projektpartnern des Instituts für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der TU Dresden, des KSI Meinsberg und der Riboxx GmbH Radebeul.

Der größte Dank gebührt meiner Familie für das aufgebrachte Verständnis, die vielfältige Unterstützung sowie den langfristigen Verzicht auf gemeinsame Zeit mit mir.

Erklärung

- a) Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
- b) Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
- Prof. Dr. rer. nat. A. Krüger und Dr. rer. nat. J. Michael: Korrekturlesen des Manuskripts
- Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- c) Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.
- d) Die Promotionsordnung der Fakultät Maschinenwesen der Technischen Universität Dresden vom 1. Juli 2001 wird anerkannt.

Dresden, 17.11.2016

Andrea Pohl