

Präparation und Charakterisierung von biofunktionalisierten  
Nanopartikeln für die medizinische Diagnostik von  
Tumorzellen mittels oberflächenverstärkter  
Raman-Spektroskopie (SERS)

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*



---

seit 1558

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Isabel Freitag, M.Sc.**

geboren am 06.08.1982 in Apolda, Thüringen

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Jürgen Popp

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Volker Deckert

**Tag der Verteidigung:** 18.03.2015

**Für meine Familie**

Zirkulierende Tumorzellen: „Nicht alle detektierten Zellen sind  
böartig und nicht alle böartigen Zellen werden detektiert.“

*Wicha, 2011*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Tumorbiologie . . . . .	2
1.2	Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTCs) . . . . .	5
1.3	Anwendung der Raman-Spektroskopie . . . . .	8
1.4	Vergleich ausgewählter Methoden . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung und Zielstellung der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Geräte und Materialien . . . . .	19
3.1.1	Herstellung der Puffer . . . . .	19
3.1.2	Messmethoden . . . . .	19
3.1.2.1	Raman- und SERS-Spektroskopie . . . . .	19
3.1.2.2	UV/VIS-Absorptionsspektrometrie . . . . .	22
3.1.2.3	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie . . . . .	22
3.1.2.4	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie . . . . .	22
3.1.2.5	Dynamische Lichtstreuung . . . . .	23
3.1.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	23
3.1.2.7	Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	24
3.1.2.8	Lichtmikroskopie: Fluoreszenz- und Dunkelfeldmikroskopie . . . . .	24
3.1.3	Software und Berechnungen . . . . .	24
3.2	Präparation von Immun-SERS-Markern . . . . .	25
3.2.1	Voruntersuchungen . . . . .	26
3.2.1.1	Die Auswahl der Nanopartikel und Raman-Reporter . . . . .	26
3.2.1.2	Die Siliciumdioxidhülle . . . . .	29
3.2.1.3	Funktionalisierung mit Antikörpern . . . . .	30
3.2.1.4	Zelldetektion . . . . .	31
3.2.2	Synthese der Immun-SERS-Marker . . . . .	31
3.2.2.1	Herstellung plasmonisch aktiver Au-Nanokugeln . . . . .	32
3.2.2.2	Aggregation von Au-Nanokugeln und Konjugation des Raman-Reporters . . . . .	33
3.2.2.3	Silberverstärkung der Au-Nanokugel-Aggregate . . . . .	33
3.2.2.4	Silanisierung und Stabilisierung der SERS-Marker . . . . .	33
3.2.2.5	Oberflächenmodifizierung der SERS-Marker . . . . .	34
3.2.2.6	Vergleich verschiedener Anregungswellenlängen . . . . .	34

3.2.2.7	Funktionalisierung der SERS-Marker mit Antikörpern	34
3.3	Kultivierung und Vorbereitung der Zelllinien	35
3.3.1	Zelllinien des Mammakarzinoms und Vorhautfibroblasten	35
3.3.2	Leukozytenextraktion	35
3.4	Detektion der Zelllinien mit Immun-SERS-Markern	36
3.5	Zellviabilitätstests	37
3.6	Messungen in einem mikrofluidischen System	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>41</b>
4.1	Komponenten eines Immun-SERS-Markers	41
4.2	Charakterisierung von Nanopartikeln	41
4.3	Ein Vergleich der SERS-Aktivität von Nanopartikeln	45
4.4	Kontrollierte Aggregation von Au-Nanokugeln	47
4.5	Eigenschaften von Raman-Reporter-Molekülen	52
4.6	Ag-Abscheidung an Au-Nanokugel-Aggregaten	59
4.7	Silanisierung und Modifizierung von SERS-Markern	64
4.8	SERS-Aktivität modifizierter SERS-Marker	70
4.9	Biologische Funktionalisierung von SERS-Markern	73
4.10	Auswahl geeigneter Zellen und Antikörper	75
4.11	Detektion von Tumorzellen mittels ISM	76
4.12	Immun-SERS-Marker und Zellviabilität	83
4.13	Differenzierung von Tumorzellen und Leukozyten im Mikrofluidikchip	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>89</b>
	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
<b>A</b>	<b>Geräte, Materialien und Chemikalien</b>	<b>93</b>
<b>B</b>	<b>SERS-Spektren</b>	<b>99</b>
	<b>Literatur</b>	<b>105</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>123</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>APTES</b>	3-Aminopropyltriethoxysilan
<b>APTMS</b>	3-Aminopropyltrimethoxysilan
<b>AV</b>	Aspektverhältnis
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin <i>engl.: bovines serum albumin</i>
<b>BT-20</b>	Zelllinie des Mammakarzinoms
<b>CaF<sub>2</sub></b>	Calciumfluorid
<b>CCD</b>	ladungsgekoppeltes Bauteil <i>engl.: charge coupled device</i>
<b>COINs</b>	<i>engl.: Composite Organic Inorganic Nanoparticles</i>
<b>CTCs</b>	zirkulierende Tumorzellen <i>engl.: circulating tumor cells</i>
<b>DE</b>	Deutschland
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium ( <i>Nährmedium für Zellkulturen</i> )
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure <i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>
<b>EDC</b>	<i>N</i> -3-Dimethylaminopropyl- <i>N</i> -ethylcarbodiimide
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EpCAM</b>	epitheliales Zelladhäsionsmolekül <i>engl.: epithelial cell adhesion molecule</i>
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung <i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	fötales Rinderserum <i>engl.: fetal calf serum</i>

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>FDA</b>	<i>engl.: Food and Drug Administration, U.S.</i>
<b>FISH</b>	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<b>GOPS</b>	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
<b>HAuCl<sub>4</sub></b>	Tetrachloridogoldsäure
<b>HER2/neu</b>	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 <i>engl.: human epidermal growth factor receptor 2</i>
<b>HFF</b>	humane Vorhautfibroblasten <i>engl.: humane foreskin fibroblasts</i>
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase <i>engl.: horseradish peroxidase</i>
<b>HSAB</b>	harte und weiche Säuren und Basen <i>engl.: hard and soft acids and bases</i>
<b>Laser</b>	Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung <i>engl.: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
<b>mAb</b>	monoklonaler Antikörper
<b>MCF-7</b>	Zelllinie des Mammakarzinoms
<b>MES</b>	2- <i>N</i> -Morpholinoethansulfonsäure
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mW</b>	Milliwatt
<b>mRNA</b>	Boten-Ribonukleinsäure <i>engl.: messenger ribonucleic acid</i>
<b>nm</b>	Nanometer
<b>MSL</b>	mehrkernige SERS Marker <i>engl.: multicore SERS label</i>
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniak
<b>NHS</b>	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAMAM</b>	Polyamidoamin

<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion <i>engl.: polymerase chain reaction</i>
<b>PE</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Ethylendiamintetraessigsäure
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PVA</b>	Polyvinylalkohol
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>P</b>	Laserleistung
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskop
<b>RIU</b>	Brechungsindexeinheiten <i>engl.: refractive index units</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure <i>engl.: ribonucleic acid</i>
<b>PSA</b>	prostataspezifisches Antigen
<b>q-PCR</b>	quantitative Polymerasekettenreaktion <i>engl.: quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion <i>engl.: reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>SAM</b>	selbstorganisierende Monolagen <i>engl.: self assembled monolayer</i>
<b>SERS</b>	oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie <i>engl.: surface enhanced Raman-spectroscopy</i>
<b>SK-BR-3</b>	Zelllinie des Mammakarzinoms
<b>s.</b>	siehe
<b>t</b>	Zeit <i>engl.: time</i>
<b>TEOS</b>	Tetraethylorthosilikat
<b>TESBA</b>	Triethoxysilylbutyraldehyd
<b>TMB</b>	3.3'.5.5'-Tetramethylbenzidin
<b>UV</b>	Ultraviolett

*Inhaltsverzeichnis*

**VIS**     sichtbar  
          *engl.: visible*

# 1 Einleitung

Seitdem es Krankheiten gibt, wurden immer wieder Versuche unternommen, sie zu heilen. Erst das detaillierte Wissen über die Krankheiten selbst, ihre Ursachen (Pathogene), ihre Übertragung und Ausbreitung führten zu einer erfolgreichen Eindämmung dieser. Aber selbst mit dem heutigen Kenntnisstand lassen sich manche Krankheiten nur schwer bekämpfen. Hierzu zählen maligne (böartige) Tumoren welche ein sehr differenziertes Krankheitsbild zeigen können. Ihr infiltrierendes und unkontrolliertes Wachstum macht sie so gefährlich. Aus der Form ihres Wachstums wurde die für sie typische Bezeichnung „Krebs“ abgeleitet. In den letzten Jahrzehnten wurde viel Wissen gesammelt und zahlreiche Behandlungsstrategien entwickelt um Tumorerkrankungen zu heilen. Man weiß trotz allem noch viel zu wenig darüber. Eine Therapie ist nur erfolgreich, wenn sie gezielt den Tumor bekämpft. Voraussetzung hierfür ist eine genaue Kenntnis über die Erkrankung selbst. Bereits etablierte Verfahren wie die PCR und Immunfluoreszenz haben hierfür gute Dienste geleistet. Der Einsatz noch nicht regulär auf dem Gebiet der Tumordiagnostik eingesetzter Techniken kann helfen, weitere detaillierte Informationen über den Tumor selbst und seine Invasivität zu liefern. Bei der Analyse einzelner Tumorzellen erzielte beispielsweise die Raman-Spektroskopie bereits gute Ergebnisse. Bietet diese Technik somit vielleicht neue Möglichkeiten zur Diagnostik von Tumorerkrankungen? Aktuelle Ansätze belegen die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser innovativen Technik für biomedizinische Fragestellungen. Diesbezüglich wurden neue Konzepte zur schnellen Identifizierung von Mikroorganismen [1, 2] sowie zur Zell- und Gewebecharakterisierung [3, 4] erfolgreich erarbeitet. Grundsteine wie diese stellen einen wichtigen Schritt zur frühzeitigen Erkennung schwerer Erkrankungen wie maligner Tumoren dar. Ihr Vorteil liegt in der Möglichkeit zur Charakterisierung einzelner Zellen. Untersuchungen von Gewebe sind somit aufgrund minimaler Gewebeentnahme schneller und effizienter realisierbar. Eine Diagnose ist daher mit geringem Aufwand möglich und sinnvoll.

Bösartige Tumoren (Malignome) zeigen ein unkontrolliertes Wachsen und Vermehren von Zellen, einhergehend mit der Verdrängung und Zerstörung von gesundem Gewebe. Diese böartige Gewebeneubildung wird auch als Neoplasie bezeichnet und ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Das statistische Bundesamt meldete 2013 (Pressemitteilung Nr. 042 vom 04.02.2013), dass insgesamt 26% der Todesursachen von böartigen Neubildungen ausgingen. Dabei lag der Anteil der Männer mit 54% sogar höher als der der Frauen. Nur die kardiovaskulären Erkrankungen (Kreislaufsystem) überstiegen diesen Wert, mit über 40% für beide Geschlechter.

Malignome können in Karzinome, welche epithelialen Ursprungs sind, sowie in Sarkome, mit Ausgangspunkt in mesenchymalen Geweben, unterteilt werden. Ihren Ursprung haben die meisten Karzinome im Platten- (squamöses Karzinom) oder

## 1 Einleitung

Drüsenepithel (Adenokarzinom). Karzinome machen den größten Teil (ca. 80%) maligner Tumoren aus. Zu ihnen zählen beispielsweise Bronchialkarzinome (Lungentumoren), hepatozelluläre Karzinome (Lebertumoren), Pankreaskarzinome (Bauchspeicheldrüsentumoren), Prostatatumoren sowie Mammakarzinome (Brusttumoren). In Deutschland stehen Mammakarzinome bei den Tumorerkrankung bei Frauen an erster Stelle und sind damit eine der häufigsten Todesursachen. Aber auch andere Tumorerkrankungen nehmen in ihrer Häufigkeit zu. Neue Studien ergaben, dass Bronchialkarzinome bei Frauen nach den Ösophaguskarzinomen (Speiseröhrentumor) den höchsten prozentualen Anstieg aufweisen [5]. Bei Männern hingegen sind Bronchialkarzinome die häufigste Todesursache unter den Tumorerkrankungen. Die zweithäufigste Todesursache bei beiden Geschlechtern sind Kolonkarzinome.

Bei der Bekämpfung von Tumoren haben neben Operationen, Chemotherapien und Strahlentherapien die Antikörpertherapien (z.B. Trastuzumab) eine wichtige Rolle eingenommen. Antikörper sind folglich ein wichtiger Bestandteil bei der Diagnose und Therapie von Tumoren. Ein für Epithelien (außer Plattenepithelien) typisches Oberflächenprotein ist das Zelladhäsionsmolekül EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). In normalen Epithelien wird EpCAM in der Regel in geringeren Mengen als in Tumoren exprimiert, daher ist es ein vielversprechendes Zielmolekül für die Diagnose und Therapie von Tumoren mit Antikörpern. Es wäre folglich für eine Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut (CTCs = circulating tumor cells) von großem Nutzen, welche bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen. Zudem kann EpCAM bei bestimmten Tumoren auf Zellen nachgewiesen werden, welche dieses normalerweise nicht bilden. Ein Beispiel hierfür liefern manche Plattenepithelkarzinome [6].

Die hohe Anzahl an Tumorerkrankungen zeigt die Notwendigkeit durch Prävention, Früherkennung und individuell abgestimmter Therapien, die Mortalität durch Tumorerkrankungen zu senken. Tumorassoziierte Marker wie EpCAM spielen dabei eine wichtige Rolle. Aufgrund der dominanten Rolle von Karzinomen in der Menge an Tumorerkrankungen, sollen diese am Beispiel des Mammakarzinoms als Modellsystem für die vorliegende Arbeit herangezogen werden.

### 1.1 Tumorbiologie

In diesem Abschnitt soll neben der Biologie des Tumors auch der Prozess der Metastasierung näher betrachtet werden. Das Verständnis darüber ist für eine genaue Diagnose wichtig.

Im Allgemeinen entstehen Tumoren durch invasives Wachstum von Körperzellen, welche gesundes Gewebe verdrängen und zerstören können. Dies ist auf eine Störung der Homöostase zwischen Zellproliferation und Apoptose zurück zu führen, welche sich bei Tumoren zugunsten des Zellwachstums verändert. Der Grund dafür ist eine Mutation im Genom der Zelle oder Defekte während der Transkription (z.B. durch Hypermethylierung eines Tumorsuppressorgens), welche zu einer Störung und Veränderung der Signale führen. Jedes Organ des menschlichen Körpers kann an

Tumoren erkranken. Bestimmte Organe werden aufgrund unterschiedlicher Faktoren wie Alter, Geschlecht oder geografischem Standort häufiger befallen. In Deutschland gehören daher Mamma-, Prostata-, Bronchial- und Kolonkarzinome zu den am zahlreichsten auftretenden Tumorerkrankungen.

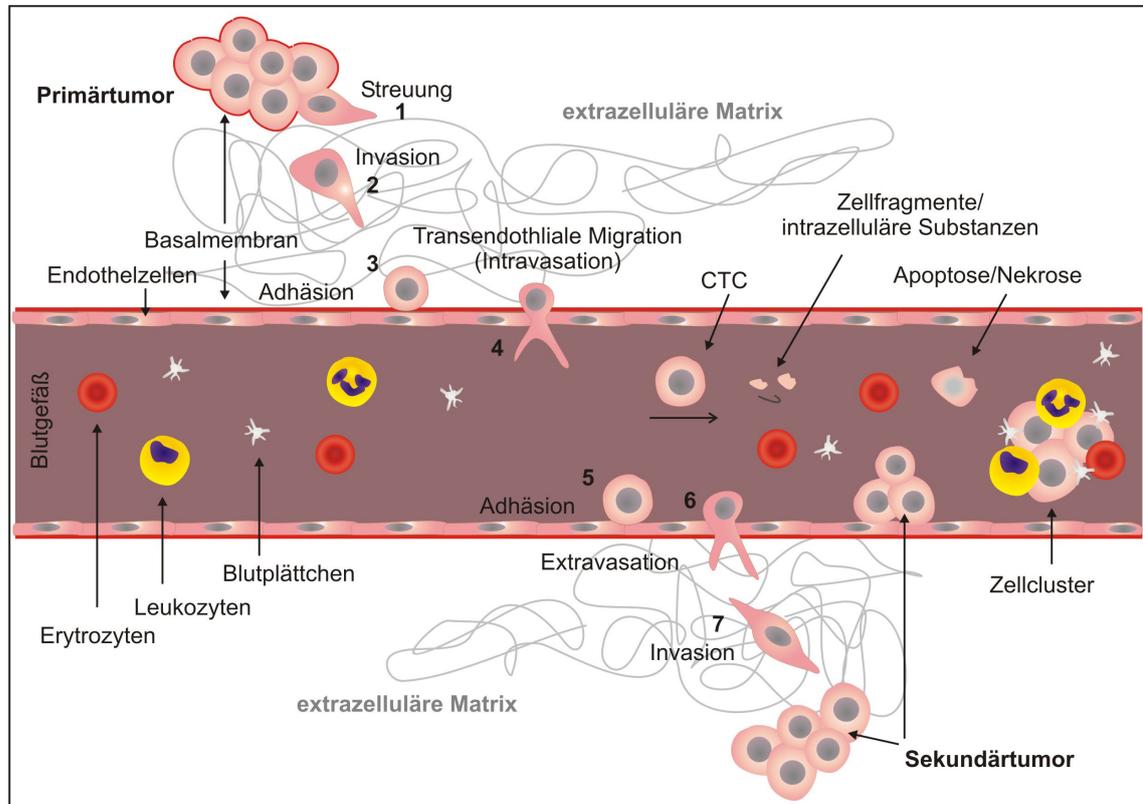
Tumorsuppressoren kontrollieren und steuern die Zellproliferation (Wachstum und Vermehrung) und die Apoptose (programmierter Zelltod). Diese Proteine unterdrücken die Genexpression von Wachstumsfaktoren und somit die Zellteilung. Sie überprüfen die korrekte Anordnung der Basenpaare in der DNA und leiten bei irreversiblen Veränderungen die Apoptose ein, um den Organismus zu schützen. Im Gegensatz hierzu dienen die Protoonkogene der Einleitung und Aufrechterhaltung der Proliferation und folgender Differenzierung der Zelle zu einem speziellen Zelltyp. Eine Mutation oder Deletion (Verlust) des Tumorsuppressor- oder Protoonkogens kann die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Tumorzelle erhöhen und infolgedessen die Karzinogenese einleiten. Veränderungen im Genom müssen nicht notwendigerweise auf einen Fehler in der Replikation der DNA zurückzuführen sein, sondern können, seltener jedoch, sich auf eine angeborene Mutation begründen. Ein verändertes Gen ist nicht mehr in der Lage seine Aufgaben korrekt auszuführen. Die Folge sind weitere Gendefekte in den nächsten Zellgenerationen. Es liegt demnach nahe, dass die Inaktivierung der Apoptose genauso wie die Aktivierung der Protoonkogene, aufgrund von Schäden in der DNA, zu einem unkontrollierten Wachstum des Gewebes führen kann. Nach der Multi-Mutationen-Theorie [7] sind für das Entstehen eines Tumors mehrere aufeinanderfolgende Mutationsereignisse notwendig. Demnach geht die Karzinogenese mit der Aktivierung von Onkogenen und der Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen einher. Ein in der Zelle noch aktiver Tumorsuppressor kann die Entstehung einer Tumorgeschwulst verhindern. Erst die Schädigung der Tumorsuppressorgene führt zur Ausbildung der Erkrankung.

Eine Veränderung der genetischen Information kann durch äußere Einflüsse wie unter anderem durch chemische und physikalische Noxen, Lebensstil (wie Ernährung und Tabakkonsum) sowie Onkoviren (z.B. Papillomaviren) induziert werden. Zudem spielt die genetische Instabilität von Zellen eine wichtige Rolle. Diesbezüglich weisen Tumorzellen oder ihre Vorläuferzellen eine besonders hohe Mutationsrate auf. Mutationen können zudem in Keimzellen (Spermien und Eizellen) auftreten. Werden diese nicht erkannt und findet keine Beeinträchtigung der Ontogenese statt, wird die Veränderung an alle Zellen des sich entwickelnden Organismus weiter gegeben. Dieser trägt dann ein lebenslanges hohes Risiko an einem Tumor zu erkranken. Xeroderma pigmentosum, die Mondscheinkrankheit, ist ein eindrucksvolles Beispiel dafür.

Tumorzellen sind sehr wandelbar und können sich schnell an die jeweilige Situation anpassen. Diese Fähigkeit macht es ihnen möglich, unbeschadet aus einer Chemotherapie hervorzugehen. Sogenannte Tumorstammzellen teilen sich wesentlich seltener und sind oft der Grund dafür, dass ein scheinbar erfolgreich bekämpfter Tumor nach Jahren wieder auftritt. Tumorzellen können unter Sauerstoffmangel überleben oder eine Angiogenese induzieren, was zu einer ausreichenden Versorgung des Malignoms mit Nährstoffen und Sauerstoff führt, womit das weitere Wachstum des Tumors gesichert ist. Eine Metastasierung, das Auswandern einzelner Zellen aus dem Zell-

## 1 Einleitung

verband, stellt wohl das gefährlichste Potential eines Tumors dar. Es ist bekannt, dass 90% der Todesfälle bei Tumorerkrankungen auf Metastasen zurückzuführen sind [8]. Einzelne Zellen können über das Blutsystem (Abb. 1.1) und die Lymphbahnen absiedeln. Im Kreislaufsystem des Körpers werden sie als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet. Die Präsenz dieser Zellen wurde vor etwa 140 Jahren zum ersten



**Abbildung 1.1:** Schema der Metastasierung über das Blutsystem: Einzelne Tumorzellen oder Zellcluster gelangen durch Intravasation in die Blutbahn. Dieser Prozess beinhaltet einen epithelialen-mesenchymalen Übergang (Transition) der Zellen. Die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) können über Extravasation sekundäre Tumoren (Metastasen) in entfernten Organen bilden. Viele CTCs werden durch Apoptose oder Nekrose zerstört. Einige bilden über Adhäsion zusammen mit Blutzellen Zellkomplexe aus. Nicht vom Immunsystem erkannte CTC-Cluster stellen ein höheres Gefährdungspotential als einzelne CTCs dar [9].

Mal erkannt [9]. Zudem können sich Tumorzellen über Körperhöhlen ausbreiten und wie die CTCs in anderen Bereichen des Körpers neue Tumoren (Metastasen, sekundäre Tumoren) bilden. Wegen der dünneren Wände erfolgt die Metastasierung häufiger über die Venen als die Arterien. Die Verbreitung über Körperhöhlen erfolgt durch Streuung der Krebszellen über peritoneale Räume (Magen, Darm und andere Bauchorgane), über die Pleura (Lungenfell), den Herzbeutel oder über den subarachnoidalen Raum (um das Zentralnervensystem) und Membranen. Eine Transplantation des Tumors kann ebenfalls Ursache für das Auswandern einzelner Zellen sein. Dies geschieht durch Beförderung von Fragmenten von Tumorzellen durch Nadeln oder

chirurgische Instrumente in andere Teile des Körpers während der Operation und Diagnoseverfahren. Fernmetastasen, das heißt, die Absiedlung von Tochter Tumoren in entfernte Körperteile, entstehen oft in stark durchbluteten lebenswichtigen Organen und sind in den meisten aller Fälle die Todesursache eines Patienten. Die mögliche Entstehung solcher Fernmetastasen erfolgt im Fall des Mammakarzinoms häufig in den Knochen (bis zu 60% aller Metastasen), der Lunge (bis zu 20%), der Leber (ca. 10%) oder im Gehirn. Tumorzellen stammen von körpereigenen Zellen ab und weisen daher nur geringe Unterschiede zu gesunden Zellen auf. Dies macht es dem Immunsystem fast unmöglich, effektiv die unkontrolliert wachsenden Zellen zu finden und zu zerstören.

## 1.2 Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTCs)

Das Absiedeln zirkulierender Tumorzellen über das Blut kann zur Bildung von sekundären Tumoren führen. Durch einen einfachen Eingriff (Blutentnahme) und einer damit verbundenen Entnahme von Tumorzellen ist es möglich, wichtige Informationen über diese Zellen und folglich über die Tumorerkrankung zu erhalten. Im Jahre 1968 stellte Doebroessy [10] in Experimenten an Tieren fest, dass die Anzahl zirkulierender Tumorzellen unter Therapie und in seltenen Fällen aber auch spontan sinken kann. Es gibt Patienten bei denen sich der Tumor ohne Behandlung zurück gebildet hat. Die Ursachen hierfür sind noch unbekannt. Eine Änderung der Zellzahl unter adjuvanter Therapie sowie deren Bedeutung für ein rezidiv-freies Überleben kann durch eine quantitative und qualitative Analyse zirkulierender Tumorzellen bestimmt werden und folglich wichtige Informationen für eine gezieltere Behandlung liefern. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die hämatogene Streuung von Tumorzellen, welche die Bildung sekundärer Tumoren zur Folge haben kann, meist mit einer schlechteren Überlebensprognose einhergeht [11, 12, 13, 14, 15]. Umso wichtiger ist es diese Zellen frühzeitig zu erkennen und zu charakterisieren um eine effektive Therapie zu gewährleisten. Insbesondere die Bedeutung zirkulierender Zellen bei Mammakarzinomen wurde in den letzten Jahren verstärkt untersucht. Daher ist bekannt, dass bei dieser Form von Tumoren Zellen frühzeitig in das Blut streuen und Metastasen bilden. CTCs nehmen immer mehr an Bedeutung zu, da sie eine wichtige Rolle bei der Einschätzung der Prognose während der Erkrankung sowie des Therapieerfolges spielen. Erste Untersuchungen zeigen, dass der Nachweis von CTCs bei Patienten mit Erstdiagnose mit einer schlechteren Prognose korreliert [16]. Cristofanilli et al. und Andere zeigten, dass der Nachweis von 5 CTCs pro 7.5 ml Blut bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom vor bzw. nach der Behandlung mit einer negativen Prognose einhergeht [17, 18]. Dies bedeutet ein schnelleres Voranschreiten der Erkrankung und ein schlechteres Gesamtüberleben bei diesen Patienten. Mit Hilfe der Detektion von CTCs kann daher frühzeitig erkannt werden, ob eine Therapie anschlägt oder keinen Einfluss auf die Erkrankung hat [19]. Weitere Studien zum Nachweis einer bestimmten Anzahl von CTCs im Verlauf einer Behandlung und dem sinnvollen Einsatz eines Therapiewechsels, stehen jedoch

## 1 Einleitung

noch aus. Für einen faktischen Vergleich der Daten ist eine einheitliche Messmethode unabdingbar. Zu diesem Zweck erlaubte die amerikanische Zulassungsbehörde (FDA) den immunomagnetischen Nachweis zirkulierender Tumorzellen mittels CellSearch<sup>®</sup> als standardisierte und automatisierte Methode [20] im klinischen Bereich.

Nicht nur die Anzahl der CTCs spielt eine entscheidende Rolle, sondern auch molekulare Eigenschaften der Zellen, wie beispielsweise die Ausprägung bestimmter Antigene der Zellmembran. Amir et al. [21] konnten zeigen, dass sich der Hormonrezeptor-sowie HER2/neu-Rezeptor-Status bei Patienten mit Mammakarzinom während des Verlaufes der Erkrankung ändern kann. Da CTCs Ursache für die Ausbildung von Metastasen sind, ähneln sie in ihrem Erscheinungsbild den aggressiven Tumorzellen [22]. Eine genaue molekulare Charakterisierung der CTCs sollte demnach zu einer Optimierung der Therapie führen. Eine Behandlung mit dem HER2/neu-Antikörper Trastuzumab<sup>®</sup> bei dem Befund HER2/neu-positiver Tumorzellen beim Mammakarzinom, welche von einem HER2/neu-negativen Primärtumor abstammten, führte bereits zu einer Tumorremission (Tumorreduktion) [23].

Da CTCs nur in sehr geringer Anzahl auftreten, im peripheren Blut tritt eine Tumorzelle im Verhältnis zu circa  $10^5$ - $10^7$  mononukleärer Zellen auf [24], ist deren Anreicherung extrem schwierig. Es existieren verschiedene Methoden, welche mehr oder weniger für den effektiven und routinemäßigen Nachweis und der Charakterisierung von CTCs möglich sind. Einige sollen im weiteren Verlauf kurz erläutert werden. Die folgenden Methoden dienen dem Nachweis von CTCs bzw. deren Differenzierung von Blutzellen, können aber keine Aussage über deren genaue Anzahl im Blut liefern. Einen guten Nachweis von Tumorzellen und somit hohe Sensitivität ermöglicht die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). In diesem molekulargenetischen Ansatz bedarf es keiner subjektiven Entscheidung, wie beispielsweise in der Immunzytochemie, welche Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper färbt. Das Verfahren besteht in dem Nachweis von Aberrationen in der DNA, welche die Tumorzellen von den umgebenen hämatopoetischen Zellen unterscheidet. Aufgrund ihrer Natur ist die DNA von Tumorzellen sehr heterogen [25], entsprechend ist es fast unmöglich, einen einheitlichen Marker zu finden. Falsch-negative Ergebnisse können sowohl bei der PCR als auch in der Immunzytochemie (beispielsweise bei der Expression von Zytokeratin) aufgrund nicht exprimierter Gene auftreten. Eine bessere Methode verspricht die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), zum Nachweis von mRNA. Aufgrund der schnellen Wandlung einer Tumorzelle, wird hier versucht, mehrere mRNA-Marker zu verwenden [26, 27]. Leider konnten entsprechend untersuchte Gentranskripte auch in Blutzellen nachgewiesen werden, was zu Einbußen hinsichtlich der Spezifität führt [28, 29, 30]. Fersis et al. nutzten den Immunmagnetismus zur vorherigen Aufreinigung der Blutprobe, um die Spezifität der RT-PCR zu erhöhen, was jedoch einen langwierigen Prozess darstellt. Die quantitative PCR (qPCR) stellt ebenfalls einen alternativen Lösungsansatz dar [31]. Mit ihr kann die Menge eines definierten DNA-Abschnittes bestimmt und folglich hoch-regulierte Gensequenzen identifiziert werden. Probleme entstehen hier, wenn sich die Frage stellt, ob sich die Expression eines Gens oder die Anzahl der Tumorzellen verändert hat. Wie bei allen Varianten der PCR sind hier mehrere

Marker-Gene notwendig. Eine Beurteilung morphologischer Eigenschaften ist nach einer PCR nicht mehr möglich. Die für den Prozess notwendige Lyse der Zellen macht zudem eine Zählung schwierig und Studien vitaler Zellen unmöglich.

Die Immunzytochemie bietet den Vorteil einer direkten Zellzählung. Hier können unklare Fälle im Anschluss mittels anderer fluoreszenzmarkierter Antikörper, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH, mit dieser Methode wird die Anzahl der Kopien eines bestimmten Gens im Zellkern bestimmt) oder anderer molekular genetischer Verfahren charakterisiert werden. Eine weitere, bewährte Methode zur Zellzählung ist die Durchflusszytometrie, wie sie bei Lymphomen und Leukämien angewandt wird. Bei Karzinomen wie dem Mammakarzinom bringt diese fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) aufgrund der oft niedrigen Zellzahl jedoch keinen Vorteil [32].

Trotz der Vielzahl möglicher Methoden ist die Suche nach einem Verfahren mit erhöhter Sensitivität, Spezifität sowie Zeitersparnis notwendig und sinnvoll. Zudem erfolgt bei den vorgestellten Methoden keine Differenzierung zwischen lebenden und apoptotischen Zellen. Das von Alix-Panabière et al. erstellte Assay (*epithelial immunspot*) macht es möglich, mit hoher Sensitivität vitale Zellen mittels ihrer Sekretion bestimmter Proteine zu detektieren [33]. Diese Methode setzt jedoch voraus, dass bei allen Tumorzellen das entsprechende Gen aktiv ist. Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität ist eine Kombination verschiedener Verfahren denkbar, bei welchen CTCs gleichzeitig identifiziert, gezählt und charakterisiert werden. So ist es beispielsweise beim CellSearch<sup>®</sup> System der Fall, welches immunomagnetische und Fluoreszenzmikroskopie-Techniken anwendet und bei Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinomen Anwendung findet. Dieses Verfahren basiert auf der Verwendung von Ferrofluid-Nanopartikeln, welche mit Antikörpern gegen EpCAM (zur Erfassung von CTCs) konjugiert wurden. Es erfolgt eine immunomagnetische Anreicherung der Tumorzellen (Epithelzellen) mit einem Magneten. Die gewonnenen Zellen werden permeabilisiert und der Kern gefärbt, zudem erfolgt eine Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD45 (Leukozyten-Marker) und verschiedener Zytokeratine. CTCs müssen einen Kern enthalten, Zytokeratin positiv und CD45 negativ sowie größer als 5 µm im Durchmesser sein. Dieses System zeigt eine Nachweisgrenze von einer CTC pro 7.5 ml Vollblut. Ein Problem besteht hier in einer Verunreinigung durch Lymphozyten, was zu einem falsch-positiven Ergebnis führt [34]. Eine Immunselektion mit folgender PCR unter Verwendung mehrerer Marker liefert ebenfalls einen zuverlässigen Nachweis zirkulierender Tumorzellen [35]. Eine weitere kombinierte Methode ist der klinisch anerkannte Adna-Test. Mit Antikörpern umhüllte magnetische Nanopartikel werden hier zur Detektion von CTCs mit anschließender semiquantitativer RT-PCR zur Bestimmung tumorspezifischer Gene eingesetzt.

Die meisten der beschriebenen Methoden stützen sich auf epitheliale Marker. Darin liegt eine inhärente Einschränkung, da ein teilweiser Mangel der Expression bestimmter Antigene bei Tumorzellen besteht. Darüber hinaus ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), welche bei vielen metastatischen Zellen auftritt, bekannt für den Verlust von epithelialen Tumormarkern wie beispielsweise Cytokeratinen.

Eine sehr zuverlässige und schnelle Methode kann sich mit einer Kombination aus etablierten und neuen innovativen Techniken entwickeln.

### 1.3 Anwendung der Raman-Spektroskopie

Die Entnahme von Blut und möglicherweise von darin enthaltenen CTCs bei Tumorpatienten stellt eine wenig invasive und fast beliebig wiederholbare Methode dar. Krankheitsverlauf und Therapieerfolg lassen sich mit der damit verbundenen Bestimmung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen kontrollieren. Tumorzellen haben eine Halbwertszeit von wenigen Stunden im Blut [23]. Diese Eigenschaft ermöglicht eine Diagnose mit hoher Zeitaufösung. Das heißt, die aktuell vorhandenen Tumorzellen und Änderungen in ihrer Anzahl z.B. als Folge einer Therapie können zeitnah gemessen werden. Entsprechend kann rechtzeitig bei nicht Anschlägen der Therapie ein neuer Behandlungsweg gewählt werden.

Voraussetzung für eine Methode, welche lebende Zellen gezielt separieren soll, um sie für weitere Charakterisierungen zur Verfügung zu stellen, ist eine Technik mit hoher Spezifität und Sensitivität, welche Messungen an vitalen Proben erlaubt. Ein Lösungsweg zur gezielten Detektion zirkulierender Tumorzellen stellt hier die Raman-Spektroskopie dar. Sie ist die Methode der Wahl, wenn es um die Beurteilung gesunder und maligner Zellen geht. Hierbei nutzt sie Unterschiede in der Ausbildung molekularer zellulärer Bestandteile von Tumorzellen und gesunden Zellen [36, 37]. Für die Charakterisierung von CTCs besteht zunächst die Schwierigkeit einer Separation dieser Zellen aus dem Blut. Der Raman-Effekt ist aufgrund des geringen Raman-Streuquerschnittes ein relativ schwacher optischer Prozess, welcher Informationen über die spezifischen Molekülschwingungen einer Zelle liefert, fast wie ein Fingerabdruck. Die Messung und Identifizierung einzelner tumorverdächtiger Zellen erfordert lange Messzeiten. Durch eine Verstärkung des Raman-Signals mittels resonanter Anregung der zu untersuchenden Moleküle kann die Messzeit verkürzt werden. Bei der sogenannten Resonanz-Raman-Spektroskopie muss die Laserwellenlänge resonant mit dem elektronisch angeregten Zustand der Zelle sein. Dies würde zu einer Verstärkung des Raman-Signals von 3-5 Größenordnungen führen [38]. Aufgrund der hohen Anzahl mononuklearer Zellen im Blut müssen die Messungen sehr zügig erfolgen. Eine Methode welche dies ermöglicht wurde durch die Entdeckung eines verstärkten Raman-Signals von Pyridin nach Adsorption an einer rauen Silberelektrode gefunden [39]. Mit der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS) wurden somit neue Möglichkeiten, wie die Einzelmoleküldetektion erschlossen [40, 41, 42]. Infolge der Wechselwirkung eines Raman-Reporters mit einer Metalloberfläche können wesentlich höhere Verstärkungen von  $10^4$ - $10^6$  [43, 44] erzielt werden. Bei einem Raman-Reporter handelt es sich um ein definiertes Molekül, welches nicht von der Zelle stammt. Neben der Messzeit liegt der Vorteil in klar definierten Spektren. Eine Identifizierung der Zellen muss hier mittels spezifischer Marker (Antikörper) erfolgen. Kneipp et al. (1997) konnten sogar einen Verstärkungsfaktor von  $10^{14}$  an Einzelmolekülen beobachten [45]. Aufgrund des elektromagnetischen Verstärkungsmechanismus

können extrem kurze Messzeiten mit einer geringeren Laserleistung sogar im nah-infraroten Bereich realisiert werden. Der daraus resultierende geringe Energieeintrag in die Probe ist essentiell für die Messung vitaler Zellen.

Bei der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS) müssen die optischen Eigenschaften der metallischen Nanopartikel auf die Anregungswellenlänge des Lasers angepasst werden. Unter Verwendung geeigneter Nanopartikel, d.h., welche resonant zur eingestrahlten Wellenlänge sind, werden die kollektiven Oszillation von Elektronen durch das eingestrahlte Laserlicht angeregt (*localized surface plasmon resonance*). Änderungen ihrer Struktur und Materialzusammensetzung können maßgeblich die Messzeiten beeinflussen. Um die elektromagnetische Verstärkung zu maximieren, müssen verschiedene physikalische Faktoren beachtet werden. So ist beispielsweise die Wahl eines geeigneten Metalls von der Plasmonen-Resonanz-Bedingung abhängig. Die Anregungswellenlänge des Lasers muss idealerweise kurz vor dem Absorptionsmaximum der Nanopartikel liegen [46, 47, 48]. Im Fall der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS) sollte sie kurz hinter dem Absorptionsmaximum des Raman-Reporters erfolgen, um eine Reabsorption der Raman-Streustrahlung zu verhindern. Gold-, Silber- und Kupfernanoartikel sind daher besonders gut geeignet, da sie mit konventionellen Laser-Systemen angeregt werden können [49]. Starke Krümmungen wie sie bei Ecken, Spitzen und Kanten auftreten, führen zu dichteren Feldlinien und folglich zu einer Verstärkung des induzierten elektromagnetischen Feldes [50]. Dieser Mechanismus wird als „*lightning-rod-effect*“ bezeichnet [43].

Eine effektive elektromagnetische Verstärkung tritt erst bei Strukturen, die größer als 5 nm sind, auf [51]. Zu große Strukturen hingegen führen aufgrund der geringen Feldliniendichte zu keiner oder nur geringer elektromagnetischer Verstärkung. Nanopartikel sollten daher im Durchmesser kleiner als ihre Anregungswellenlänge sein. Eine Aggregation von Nanopartikeln führt zu einem Anstieg der Feldliniendichte [52], welcher wesentlich höher ist, als zwischen einzelnen Nanopartikeln [50].

Die Form und Zusammensetzung metallischer Nanopartikel bestimmen somit deren optische Eigenschaften. Edelmetallnanopartikel reflektieren aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften Farben des sichtbaren Lichtes. Für die weitere Bearbeitung bietet dies den Vorteil einer ständigen und schnellen optischen Kontrolle über den Bearbeitungszustand dieser Partikel. Es lässt sich beispielsweise bei sphärischen Au-Nanopartikeln eine Farbänderung von rot zu violett nach deren Aggregation erkennen. Die Edelmetalle Gold und Silber werden typischerweise für SERS-Experimente genutzt, da ihre Plasmonen-Resonanz-Frequenz mit dem Wellenlängenbereich des sichtbaren und nah-infraroten Lichtes übereinstimmen. Aufgrund der daraus resultierenden möglichen Anregung mit handelsüblichen Lasersystemen und der guten SERS-Eigenschaften von Au- und Ag-Nanopartikeln sollen diese im Folgenden weiter betrachtet werden. Für die Wahl geeigneter Nanopartikel spielt des Weiteren die exakte Anregungswellenlänge des Lasers eine entscheidende Rolle. Diese sollte primär von ihren Eigenschaften in Bezug auf die zu detektierende Probe gewählt werden. Da es sich um vitale biologische Proben handelt, ist eine Wellenlänge im nah-infraroten

## 1 Einleitung

Bereich aufgrund der geringen Zellschädigung [53] und der zu vernachlässigenden Autofluoreszenz der Probe von großem Nutzen.

Des Weiteren spielt die Wahl eines geeigneten Raman-Reporters sowie dessen Anlagerung auf der Metalloberfläche eine entscheidende Rolle. Die Reichweite des elektromagnetischen Feldes (EM) einer Metallkugel kann als Funktion des Abstandes  $d$  zwischen dem Raman-Reporter-Molekül und der Metallkugel sowie deren Radius  $r$  beschrieben werden. Folglich zeigt sich eine höhere EM-Verstärkung bei Zunahme der Molekülanzahl und das ein Wachstum der Partikel mit einem weiter in den Raum reichenden EM-Feld einher geht.

Für die EM-Verstärkung gilt [54]:

$$EM \sim \left(\frac{r}{r+d}\right)^{12} \text{ für Einzelmoleküle} \quad (1.1)$$

$$EM \sim \left(\frac{r}{r+d}\right)^{10} \text{ für Monolagen} \quad (1.2)$$

Geht das Molekül mit der Metalloberfläche eine Bindung ein, bildet sich ein Charge-Transfer-Komplex. Die Signalverstärkung basiert dann auf chemischen Wechselwirkungen zwischen Molekül und Nanopartikel, einer SERS-Verstärkung durch die resonante Anregung von Charge-Transfer-Übergängen zwischen dem Nanopartikel und dem Molekül sowie einer Resonanz-Raman-Verstärkung durch Anregung eines elektronischen Übergangs im Molekül [55]. Eine chemische Bindung des Raman-Reporter-Moleküls am Nanopartikel führt im Gegensatz zu einer reinen Adsorption des Moleküls zu einer höheren SERS-Verstärkung. Bei diesen Bindungen handelt es sich um lokalisierte Bindungen, die auf der Bildung von Elektronenpaaren basieren. Innerhalb der lokalisierten Elektronenpaarbindungen wird meist zwischen der kovalenten Bindung, bei der jedes Atom ein Elektron zur Bindung beiträgt, und der koordinativen Bindung, bei der ein Elektronenpaar eines Liganden mit einem leeren Orbital des Metallatoms wechselwirkt, unterschieden.

## 1.4 Vergleich ausgewählter Methoden

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit sowie der starken Ähnlichkeit zirkulierender Tumorzellen zu gesunden Zellen ist es notwendig, eine Kombination mehrerer optimierter Verfahren zur Auftrennung und Charakterisierung dieser zu nutzen. Im Folgenden sind kurz die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren dargestellt. Eine Verknüpfung der Methoden ist sinnvoll, da sie sich gegenseitig gut ergänzen.

Die Separation von CTCs mit Hilfe von funktionalisierten SERS-Nanopartikeln liefert den Vorteil einer hoch spezifischen, schnellen und nicht toxischen Trennung vitaler tumorverdächtiger Zellen aus einer Blutprobe. Der Nutzen liegt in der Verfügbarkeit vitaler Tumorzellen für weitere Untersuchungen und Charakterisierungen. Ein anderes schonendes Verfahren beruht auf der Sortierung von Zellen anhand ihrer Streueigenschaften, basierend auf ihrer Morphologie (Granularität und Größe) [56]. Aufgrund der reinen morphologischen Charakterisierung ist dieses Verfahren aber

sehr unspezifisch. Ebenfalls die Durchflusszytometrie, welche fluoreszenzmarkierte Zellen mikrofluidisch sortiert [56], ist im Vergleich zu den SERS-Nanopartikeln, insbesondere bei der Verwendung mehrerer Reporter, weniger sensitiv. Beide Methoden zeichnen sich jedoch durch ihre Zeitersparnis aus und sind daher ebenso, insbesondere bei der Vorsortierung und Zählung der Zellen von großem Nutzen. PCR-Analysen können tumorspezifische Gene sehr genau identifizieren. Ihr Nachteil besteht jedoch darin, dass weitere Untersuchungen der lysierten Zellen nicht möglich sind. Sie sollte daher als letzte Methode angewandt werden.

Im Gegensatz zu anderen immunhistochemischen Methoden erlaubt die Verwendung von SERS-Nanopartikeln zudem eine Detektion von Tumorzellen, bei welchen das entsprechende Antigen nicht bekannt ist oder beispielsweise durch Folge einer phänotypischen Änderung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen nicht mehr exprimiert wird. Es ist bekannt, dass beispielsweise in 30% der Tumorzellen eine fehlende EpCAM-Expression (epitheliales Zelladhäsionsmolekül, vermittelt unter anderem Zell-Zell Kontakte) besteht [57]. Die stark proliferierenden Tumorzellen können die Nanopartikel schneller internalisieren, als es bei gesunden Zellen der Fall ist und diese für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie detektierbar machen. Solch ein Verfahren wurde in ähnlicher Weise für die magnetische Separation von CTCs aus Blut angewandt [58]. Hierbei wurden magnetische Nanopartikel von den CTCs aufgenommen und mittels eines Magneten von den Blutzellen getrennt. Systeme, welche magnetische Nanopartikel für die Separation von CTCs aus einer Blutprobe nutzen, sind sehr vielversprechend, können im Gegensatz zu SERS-Nanopartikeln Zellen mit unterschiedlichen Antigenen zwar detektieren, aber nicht nach der Art des Antigens bzw. der Zelle separieren.

Für eine schnelle und gezielte Trennung der Zellen aus dem peripheren Blut mittels SERS-Nanopartikeln, müssen diese so optimiert werden, dass sie ein möglichst intensives SERS-Signal liefern, um sehr kurze Messzeiten zu erzielen. Der Einsatz eines mikrofluidischen Systems mit kontinuierlichem Fluss zur Aufreinigung von Tumorzellen [59, 60] ist dann von großem Nutzen.



## 2 Stand der Forschung und Zielstellung der Arbeit

SERS bietet eine Möglichkeit für die Detektion vitaler Krebszellen mittels Immun-SERS-Mikroskopie sowie für die Entwicklung diagnostischer Tests und Therapien [61]. Neben der hohen Empfindlichkeit bietet SERS wegen der sehr geringen spektralen Breite der Raman-Banden (typischerweise 10-100 mal schmaler als Fluoreszenzbanden) [62, 63] ein hervorragendes Multiplexpotential. Die Möglichkeit einer einzigen Anregungsquelle für verschiedene biologische und chemische Substanzen, minimale Photodegeneration und Messungen in wässriger Umgebung mit geringem Hintergrundsignal sind weitere Vorteile, welche verstärkt zur Anwendung von SERS in biomedizinischen Anwendungen geführt haben [64, 63].

Neben der Verstärkung des Raman-Signals und der damit einhergehenden Identifizierung chemischer [65] und biologischer (z. B. zellulärer Bestandteile) Proben [37, 66], erfolgt in vielen Anwendungen die Nutzung spezieller Raman-Reporter für einen indirekten Nachweis. Als Raman-Reporter werden möglichst kleine Moleküle gewählt, welche über Chemisorption direkt an eine Metalloberfläche binden können oder lediglich an diese adsorbieren. Hierbei handelt es sich häufig um aromatische Verbindungen mit wenigen Atomen, welche intensive aber wenige SERS-Banden liefern. Die leichtere Polarisierbarkeit, eine durch ein elektrisches Feld verursachte Ladungsverschiebung in Atomgruppen, führt zur Bildung von getrennten Ladungsschwerpunkten derartiger Verbindungen. Sie beruht auf der Reaktivität sogenannter „weicher“ Moleküle. „Weich“ bezeichnet nach dem HSAB-Konzept („*Hard and Soft Acids and Bases*“) Teilchen mit geringer Ladungsdichte, also solche mit geringer Ladung und großem Radius [67].

Verwendet man solche SERS-Marker (SM) - einen Komplex aus einem metallischen Nanopartikel und Raman-Reporter-Molekülen - erhält man keinen Fingerabdruck (chemische Information) der zu untersuchenden Probe, sondern ein Spektrum des Raman-Reporter-Moleküls. Aufgrund der gleichmäßigen Orientierung des Raman-Reporters typischerweise über die Konjugation von Thiolgruppen auf der metallischen Oberfläche, ist dieses Spektrum immer identisch. Eine Differenzierung zwischen mehreren Raman-Reportern ist daher problemlos möglich. SERS-Messungen, bei welchen die Zielmoleküle das Signal liefern, lassen sich hingegen nur sehr mühsam deuten. Die Spektren sind aufgrund unterschiedlicher zufälliger Orientierungen der Moleküle zur metallischen Oberfläche sehr inhomogen. Ihre Zuordnung und Charakterisierung ist daher schwierig. Über den Nachweis mittels SERS-Markern, an welche beispielsweise ein Antikörper konjugiert wurde, erhält man hingegen innerhalb weniger Millisekunden

den genauen Informationen über das Vorhandensein eines bestimmten Zielmoleküls (z.B. Antigens).

Au- und Ag-Nanopartikel eignen sich sehr gut für die Synthese von SERS-Markern. Sie bieten wegen ihrer unterschiedlichen Eigenschaften eine gute Grundlage für verschiedene medizinische und biologische Anwendungsgebiete. So können sie beispielsweise zum Transport von Medikamenten in Tumorzellen [68], zur photothermalen [69] bzw. chemo-photothermalen Therapie [70] von Tumoren oder zur Detektion von Biomolekülen [71] eingesetzt werden.

Die Detektion von beispielsweise Tumorzellen mit SM würde über eine Antikörper-Antigen-Bindung erfolgen. Dies ist möglich, da sich Tumorzellen durch ein verändertes Expressionsmuster bestimmter Proteine charakterisieren lassen, welche bereits als Targets für die Diagnostik und Verlaufskontrolle im Rahmen einer Tumorthherapie eingesetzt werden. Es wird zwischen tumorspezifischen und tumorassoziierten Antigenen unterschieden. Erstere sind Moleküle/Proteine, die ausschließlich in Tumoren zu finden sind. Hierzu zählen beispielsweise mutierte Onkogene oder mutierte Tumorsuppressorgene [72]. Tumorassoziierte Antigene sind Moleküle/Proteine, die sowohl in Tumoren als auch in den meisten gesunden Geweben zu finden sind, aber quantitative Unterschiede bezüglich der Expression zeigen können. Hierzu zählen die meisten Tumormarker (Proteine, Hormone und Antikörper im Körperserum bzw. Gewebe) und Tumorantigene. Bei der Analyse und Bekämpfung des Mammakarzinoms spielt insbesondere das Tumorantigen HER2/neu eine wichtige Rolle. Dieser Wachstumsfaktor kommt in vielen normalen Geweben vor, wo er unter anderem an der Entwicklung und Reifung von Zellen beteiligt ist. 20-25% aller invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression dieses Proteins, was zu einer verstärkten Stimulation der Tumorzelle führt. Ein gegen dieses Protein gerichteter Antikörper (in Deutschland zugelassen: Trastuzumab [Herceptin<sup>®</sup>]) kann das Tumorwachstum hemmen, wenn HER2/neu in ausreichender Anzahl von den Tumorzellen exprimiert wird. Die Überexpression von Tumorantigenen variiert sehr stark und ist sogar von Patient zu Patient mit der gleichen Tumorerkrankung unterschiedlich. Sie scheint bei einigen Tumoren ein Indiz für deren Malignität zu sein. Aus diesem Grund wird intensiv nach Tumorantigenen gesucht, welche, wie es beim HER2/neu-Protein der Fall ist, über die Verwendung spezieller Antikörper zur Eindämmung beziehungsweise Bekämpfung von Tumoren beitragen können.

Mit Antikörpern konjugierte SERS-Marker (ISM, Immun-SERS-Marker) wurden bereits erfolgreich in wissenschaftlichen Studien eingesetzt. Diesbezüglich erfolgten Versuche zur *In-vivo*- [73] und *In-vitro*-Charakterisierung [74] von Tumoren sowie Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass ISM und Tumorzellen sogenannte Immunkomplexe ausbilden [75]. Die Möglichkeit einer schnellen, gezielten und parallelen (mehrere Tumorantigene gleichzeitig) Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus einer Blutprobe unter Verwendung von ISM soll helfen, die Genauigkeit einer Diagnose sowie Therapie zu verbessern und eine individuellere Behandlung zu ermöglichen. ISM haben großes Potential für die Anwendung zur Detektion zirkulierender Tumorzellen aus einer Blutprobe. Dies belegen Experimente von Wang et al. [34]. Sie fügten ISM in Form von EGF-SERS-Nanopartikeln (*epidermal growth factor*, EGF) einer

Blutprobe von Patienten mit squamösem Karzinom am Kopf und Hals zu. Die EGF-SERS-Nanopartikel können an den EGF-Rezeptor ein am Zellwachstum beteiligtes Transmembranprotein der Tumorzellen binden. Nach der Entfernung überschüssiger EGF-SERS-Nanopartikel wurde die Probe mittels Raman-Spektroskopie gemessen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Tumorzellen mit der Intensität der SERS-Spektren korreliert. Aufgrund der möglichen Agglomeration einzelner EGF-SERS-Nanopartikel und einer damit verbundenen Erhöhung der spektralen Intensität, kann es hier zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Um nähere Informationen über die zirkulierenden Tumorzellen zu erhalten, ist zudem eine Separation notwendig. Eine praktische Lösung stellen hier Sha et al. [76] mit einer Kombination aus magnetischen und Immun-SERS-Nanopartikeln dar. Diese Methode wurde für die schnelle und direkte Zählung von zirkulierenden Tumorzellen in Gegenwart von Blut entwickelt. Magnetische Nanopartikel und ISM (SERS-Tags) wurden jeweils mit EpCAM- bzw. HER2/neu-Antikörpern zur Erfassung und Erkennung von Tumorzellen in Gegenwart von Vollblut konjugiert. Dies setzt aber das Vorhandensein beider Antigene auf der Tumorzelle voraus. Für die Anwendung von ISM ist daher ein mikrofluidisches System zur Separation der Zellen eine gute Alternative.

Eine Vielzahl der bis heute vorgestellten ISM wurden nicht an vitalen, sondern mit Paraformaldehyd fixierten Zellen getestet [77, 78]. Des Weiteren wurde die Möglichkeit der Verwendung verschiedener Antigene mittels unterschiedlicher Raman-Reporter nur selten geprüft [79, 80]. Zudem konnten Raman-Messungen im nah-infraroten Bereich meist nur mit Nanostäbchen, welche durch das toxische CTAB [81] stabilisiert sind, realisiert werden [78]. Andere in diesem Wellenlängenbereich absorbierende Nanopartikel sind schwer zu synthetisieren und scheitern oft aufgrund ihrer Instabilität und Reproduzierbarkeit an einer effektiven Anwendung. Kürzere Anregungswellenlängen, wie sie oftmals verwendet werden [77], stellen aufgrund einer möglichen Photodegradation ein Problem für vitale Proben dar [82, 83]. Eine Ausnahme sind die glasverkapselten Nanoschalen von Küstner et al. [84], welche für die Anregung mit rotem Laserlicht entwickelt wurden. Die Anwendung erfolgte hier durch SERS-Mikroskopie-Experimente an Gewebeschnitten. Glasverkapselte Nanoschalen wurden zum Nachweis prostataespezifischer Antigene (PSA) mit PSA-Antikörpern versehen und zeigten eine deutliche Bindung an den Epithelzellen. Eine so hohe plasmonische Feldverstärkung, wie sie bei Nanopartikel-Aggregaten auftritt, ist hier jedoch nicht zu erwarten. Ein Beispiel für entsprechende Aggregate liefern Sun et al. [79], welche sogenannte COINs (*Composite Organic-Inorganic Nanoparticles*) aus Ag-Nanopartikeln, für Gewebeanalysen bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm, nutzten. Solche Nanopartikel-Aggregate liefern aufgrund ihrer Größe möglicherweise eine schlechtere Qualität bzw. Auflösung in der Bildgebung. Sie sind jedoch in der Detektion von CTCs sehr hilfreich, da es sich hier um ein alles oder nichts Prinzip handelt, d.h. tumorverdächtige Zelle (Signal) oder Blutzelle (kein Signal), welches auf eine hohe Detektionsrate hinzielen würde. Leider sind Ag-Aggregate aufgrund ihrer plasmonischen Aktivität für die Anregung im nah-infrarot Bereich nur bedingt geeignet.

Neben wichtigen physikalischen Voraussetzungen der Nanopartikel spielen die Antigene der zu detektierenden Zellen eine wichtige Rolle. Sie entscheiden über die Wahl eines geeigneten Antikörpers für eine möglichst spezifische und zuverlässige Konjugation der ISM an die zirkulierenden Tumorzellen und infolgedessen deren Detektion.

Als Folge der Karzinogenese können tumorassoziierte Antigene überexprimiert sein. Quantitative Unterschiede in ihrer Expression erlauben jedoch keine einheitliche Aussage über deren Status. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist dafür bekannt, dass es in vielen Karzinomen überexprimiert wird und ein Zusammenhang zwischen der Überexpression und der Stärke des Krankheitsverlaufes besteht. Daher wurde es bereits in mehreren klinischen Studien für die Immuntherapie eingesetzt [85]. Das transmembrane Glykoprotein EpCAM besteht aus 2 extrazellulären Domänen, einer cysteinarmen Region, einer transmembranen Domäne, sowie einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Es wird durch das Gen *GA733-2* kodiert, welches auf den Chromosomen 4 liegt. EpCAM wurde auf der basolateralen Membran in der Mehrzahl epithelialer Gewebe nachgewiesen [86, 87]. Es kann auf vielen Karzinomen wie dem Kolorektalen-, Mamma-, Prostata-, Kopf- und Hals- sowie dem hepatozellulären Karzinom überexprimiert sein [86, 88, 89, 90, 91, 92, 93]. Aus diesem Grund hat Anti-EpCAM an Bedeutung in Immuntherapien als monoklonaler Antikörper zur Bekämpfung maligner Tumoren gewonnen. Bei Kolorektalen- und Mammakarzinomen ist eine Verbesserung der erkrankungsfreien Zeit bei Patienten mit minimaler Resterkrankung gelungen [94, 95]. Es gibt Hinweise darauf, dass die EpCAM-Expression mit der Proliferationsaktivität der Zellen korreliert und somit zur neoplastischen Transformation beiträgt [85]. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Überexpression von EpCAM mit einer geringeren erkrankungsfreien Zeit sowie Gesamtüberlebensrate einhergeht. Da EpCAM in primären als auch in metastatischen Mammakarzinomen überexprimiert sein kann [85] und an Bedeutung in der Immuntherapie zunimmt, ist es ein vielversprechender Marker zur Detektion zirkulierender Tumorzellen, welche ihren Ursprung in Mammakarzinomen haben. Zudem soll die mögliche Anwendung an anderen Karzinomen hier nicht außer Acht gelassen werden. Über ISM in Kombination mit Anti-EpCAM-Antikörpern wurde trotz allem bisher noch nicht berichtet. Die spezifische Bindung an CTCs von magnetischen Nanopartikeln über dieses Protein war zudem schon erfolgreich [76].

Die Stärke der Expression von Antigenen ist bei Tumorzellen sehr unterschiedlich. So können Tumorzellen zum Zweck der Migration bestimmte Gene herunter regulieren (epithelial-mesenchymale Transition). Dieser Phänotypenwechsel macht eine Detektion über Oberflächenantigene fast unmöglich. Immunologische Verfahren wären hier ineffizient. Ein sinnvoller Einsatz ist hier die Raman-Spektroskopie zur molekularen Charakterisierung der Tumorzellen. Wenn beispielsweise ISM zur Detektion von Leukozyten mittels bestimmter Leukozytenmarker eingesetzt und folglich zu deren Trennung von tumorverdächtigen Zellen genutzt werden, bestünde bei der Verwendung unterschiedlicher Raman-Reporter und Marker sogar die Möglichkeit einer Trennung von Leukozyten, Tumorzellen mit hoch regulierten sowie Tumorzellen mit herunter regulierten Genen. Letztere würden aufgrund der fehlenden Antigene kein

SERS-Signal liefern, da sie von den ISM nicht erkannt werden können. Ob es sich bei diesen Zellen wirklich um Tumorzellen handelt, kann Raman-spektroskopisch untersucht werden [36].

Eine weitere Herausforderung ist es, den Prozess der Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung von CTCs zu beschleunigen und dabei die Spezifität nicht zu beeinträchtigen. Hierfür wurden bereits etablierte Verfahren in mikrofluidischen Systemen getestet. Mechanismen wie eine magnetische Markierung der CTCs, die Affinitätschromatographie mittels spezieller Zellmembranmoleküle, eine Charakterisierung aufgrund der Größe und Verformbarkeit der Zellen und die Dielektrophorese mittels der Polarisierbarkeit von Zellen fanden an dieser Stelle Anwendung [96].

Eine Trennung magnetisch markierter CTCs ist eine schnelle Technik, sie ermöglicht eine gute Zellviabilität [97] sowie das Zählen der CTCs [98]. Nachteilig ist jedoch das Differenzierungspotential und infolgedessen die Unterscheidung von Zellen mit verschiedenen Antigenen. Bei Dielektrophorese-Verfahren sowie bei der Trennung der CTCs aufgrund ihrer Größe und Verformbarkeit, ist insgesamt eine niedrigere Fangeffizienz und Spezifität zu erwarten. Eine Verbesserung der Fangeffizienz in der Affinitätschromatographie ist bereits in mehreren Ansätzen in Arbeit [99, 100]. All diese Verfahren haben wichtige Vorteile. Das optimierte System sollte eine hohe Fangeffizienz einhergehend mit einer sehr guten Spezifität und Sensitivität aufweisen. Welche kombinierte Methode sich letztendlich etablieren wird, bleibt abzuwarten.

Ebenso fand die Raman-Spektroskopie in diesem Bereich erste vielversprechende Ansätze. Diesbezüglich wurden unmarkierte Tumor- und Blutzellen unter Verwendung eines mikrofluidischen Systems bereits erfolgreich differenziert [59, 60, 101]. Eine zügige Trennung dieser Zellen wird vermutlich nur mit Unterstützung von ISM zu bewerkstelligen sein. Die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie zur Trennung von CTCs in einem mikrofluidischen System bietet dafür viele Vorteile. Darunter zählen die wesentlich kürzeren Messzeiten. Für eine Messung im kontinuierlichen Fluss ist das ein essentieller Faktor. Daher soll im letzten Abschnitt dieser Arbeit die Anwendung von ISM zur Detektion von Zellen des Mammakarzinoms sowie deren Differenzierung von Blutzellen in einem mikrofluidischen System getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen ISM entwickelt werden, welche klare Vorteile gegenüber bereits verwendeten Nanopartikeln für die Zelldetektion aufweisen. ISM müssen daher so aufgebaut sein (Größe, Form, verwendete Chemikalien etc.), dass sie biokompatibel sind und eine sehr gute SERS-Aktivität zeigen. Zudem soll die Anregung der Oberflächenplasmonen, zur Verhinderung einer Fotodegradation der Tumorzellen, im nah-infraroten Bereich erfolgen. Um später CTCs von anderen Blutzellen separieren zu können, ist der Einsatz eines Mikrofluidikchips notwendig. Für eine solche Anwendung müssen die optischen Eigenschaften der ISM so gewählt werden, dass möglichst kurze Messzeiten und folglich ein hoher Durchsatz an ISM-markierten Tumorzellen realisiert werden kann. Die Schwierigkeit besteht hierbei in der Erzeugung intensiver SERS-Signale (hohe Sensitivität) unter Verwendung nicht toxischer und stabiler Nanopartikel. Entsprechende SERS-Spektren erlauben kurze Messzeiten im Bereich weniger Millisekunden. Darüber hinaus haben Messparameter wie die Laserwellenlänge, die Laserleistung und die Messzeit einen großen Einfluss auf

das SERS-Signal und müssen entsprechend angepasst werden. Dabei darf während der Messung der Energieeintrag in die Zelle zu keiner degenerativen Veränderung oder sogar zur Nekrose dieser führen. Andere Parameter wie beispielsweise die Zusammensetzung und Konzentration der ISM, die Art des Raman-Reporters sowie der verwendete Puffer beeinflussen das SERS-Signal zusätzlich.

Eine Identifizierung von ISM-markierten Tumorzellen in einem mikrofluidischen System unter Verwendung eines nah-infraroten Lasers wurde bisher noch nicht verwirklicht. Für eine bessere Spezifität der ISM sollen zum ersten Mal die vielversprechenden EpCAM-Antikörper zur Funktionalisierung von ISM und folglich zur Detektion der Tumorzellen genutzt werden. Der Nutzen solcher ISM in Kombination mit einem Mikrofluidikchip läge in einer hohen Fangeffizienz vitaler Tumorzellen einhergehend mit einer sehr guten Spezifität und Sensitivität. Bereits etablierte Verfahren wie die Durchflusszytometrie sind dem gegenüber weniger sensitiv, insbesondere bei der Verwendung mehrerer Reporter. Im Vergleich zu einer rein morphologischen Charakterisierung (Größe und Form von Zellen) ist die Spezifität der ISM erhöht und im Vergleich zur PCR werden die Zellen nicht beschädigt.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Geräte und Materialien

Alle relevanten Geräte, Materialien und Chemikalien, welche während der Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurden, sind in den Tabellen im Anhang A aufgeführt. Für die Experimente und Synthesen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Hilfsmittel wurden sterilisiert und gesäubert, um Kontaminationen und Verunreinigungen zu vermeiden.

### 3.1.1 Herstellung der Puffer

Die Phosphatgepufferte Salzlösung (1 x PBS, *phosphate buffered saline*) wurde aus 8.0 g Natriumchlorid (NaCl), 0.2 g Kaliumchlorid (KCl), 1.42 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0.27 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) und einem l destillierten Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Pufferlösung beträgt 7.4. Durch die verschiedenen Salze besitzt die Lösung den osmotischen Druck des menschlichen Organismus (isotonische Salzlösung). Durch Zugabe von 0.1 % Bovines Serum Albumin (BSA) wurde der Blockpuffer hergestellt. PE-Puffer (PBS-EDTA) mit einer Endkonzentration von 2 mM wurde durch das Hinzufügen von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zu 1 x PBS (pH = 7.4) erzeugt. Für 2-*N*-Morpholinoethansulfonsäure (MES, 0.1 M, pH 4.5) wurden 9.56 g MES-H, 0.215 g MES-Na und 500 ml H<sub>2</sub>O sorgfältig gemischt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter überprüft und bei Bedarf entsprechend eingestellt. Alle Puffer wurden sterilfiltriert.

### 3.1.2 Messmethoden

#### 3.1.2.1 Raman- und SERS-Spektroskopie

Unter Raman-Spektroskopie versteht man die spektroskopische Untersuchung der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen. Diese Analysemethode dient der molekularen Charakterisierung biologischer sowie chemischer Proben. Die Raman-Streuung von Molekülen besitzt einen sehr kleinen Streuquerschnitt. Eine hohe Anzahl an Molekülen ist daher notwendig. Bei der Raman-Spektroskopie werden die zu untersuchenden Materialien mit monochromatischem Licht bestrahlt, typischerweise mit einem Laser. Ein Molekül ist Raman-aktiv, wenn sich dessen Polarisierbarkeit während der Laser-Anregung ändert. Das Raman-gestreute Licht ist in seiner Frequenz zum eingestrahlten Licht verschoben. Der Grund liegt hier in einer Wechselwirkung des Lichtes mit der Materie, wobei Energie vom Licht auf die Materie übertragen

wird (Stokes-Streuung) oder Energie von der Materie ans Licht abgegeben wird (Antistokes-Streuung). Aus dem erhaltenen Spektrum lassen sich Informationen über den molekularen Aufbau verschiedener Materialien ziehen. Jedes Molekül zeigt daher ähnlich einem Fingerabdruck ein für dieses spezifisches Spektrum. Das bedeutet, dass eine Schwingung zwischen zwei oder mehr Atomen einer oder mehrerer Banden im Spektrum zugeordnet werden kann.

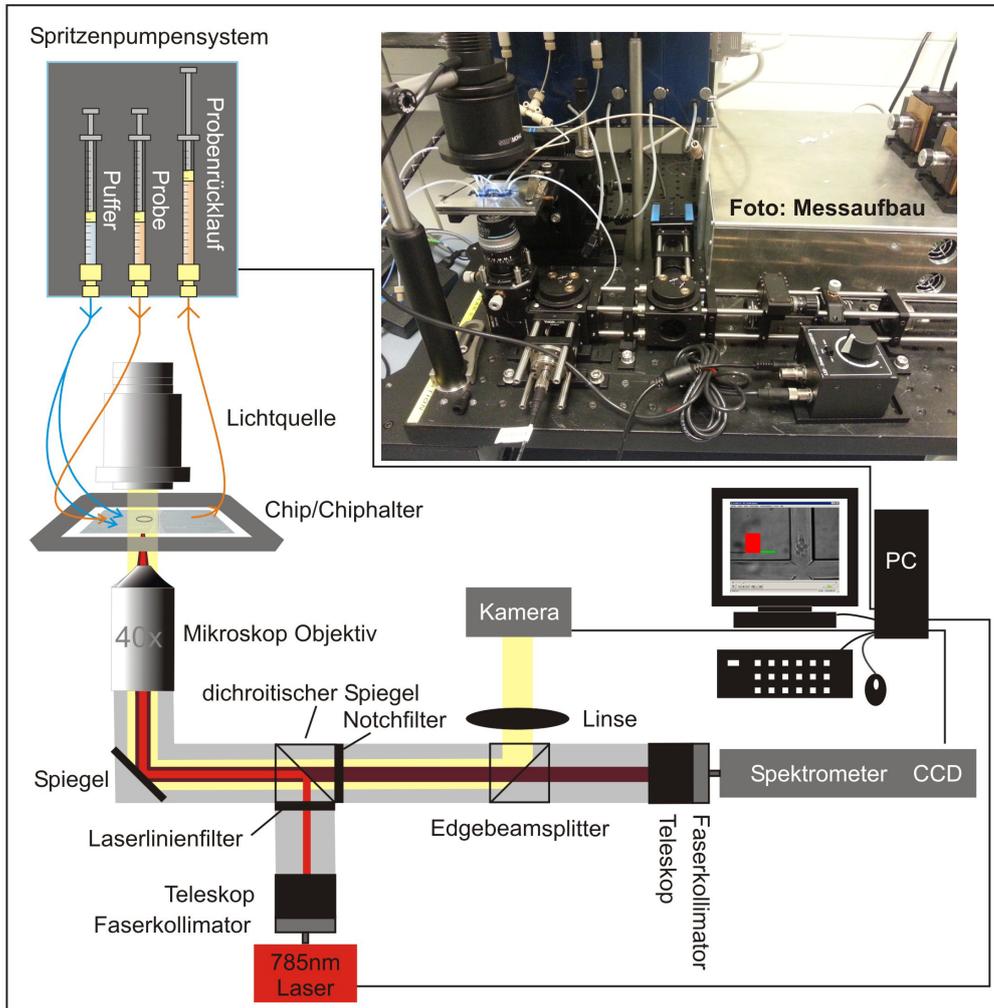
Bei der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (s. Abschnitt 1.3 auf Seite 8) wird das Raman-Signal von Molekülen verstärkt, wenn sich diese nahe einer metallischen Oberfläche befinden. Zwei mögliche sich ergänzende Begründungen werden hierzu diskutiert. Bei der chemischen Verstärkung bildet das Molekül über Chemisorption mit dem Metall einen Komplex. Angeregte Elektronen können zwischen Metall und Molekül oszillieren (hin und her wandern). Bei dieser Ladungsübertragung wird das Molekül in einem angeregten Schwingungszustand überführt. Die elektromagnetische Verstärkung beruht auf einer Anregung von Oberflächenplasmonen im Metall. Sie regt zusammen mit dem einfallenden Licht das Molekül an und führt zu einer verstärkten Raman-Streuung. Das Molekül braucht hierzu nicht an der Oberfläche des Metalls gebunden zu sein, wobei der Effekt mit der Distanz abnimmt.

Für die Untersuchung der Proben wurden zwei Raman-Apparaturen herangezogen. Aufgrund der dazu gehörigen Mikroskope und entsprechenden Bildgebung erwies sich das Raman-System von Kaiser als sehr zuverlässig für Messungen von Nanopartikel-Proben (10x Objektiv) und einzelnen Zellen (40x Objektiv) mit nur einem Messpunkt. Das durchlässige holografische Gitter umfasst einen spektralen Bereich von  $0\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$  bei einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$ . Der eingebaute 785 nm Halbleiterlaser (multimode) von Invictus<sup>TM</sup> wurde so eingestellt, dass eine effektive Leistung von 40 mW auf der Probe messbar war. Die Laserwellenlänge wurde mittels Cyclohexan kalibriert. Mit einer Helium-Neon Lichtquelle wurden die Wellenzahlen eingestellt. Eine Weißlichtquelle wurde für die Intensitätskalibrierung der Spektren herangezogen.

Für die Anfertigung mehrerer Messpunkte auf einer Zelle ähnlich einer Kartierung wurde das konfokale Raman-Mikroskop von WITec (Ulm, Deutschland) verwendet. Es besitzt einen Single-Mode Dioden-Laser mit 785 nm. Dieser ist ideal für ein hohes Auflösungsvermögen. Abbildungen (image, map) wurden unter Verwendung eines 300/mm Gitters mit einer Schrittweite von  $0.5\text{ }\mu\text{m}$  und einer Messzeit von 0.5 s pro Spektrum aufgenommen. Die spektrale Auflösung betrug  $6\text{ cm}^{-1}$  und die spektrale Breite betrug 300 bis  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Es wurde ein  $60\times/\text{NA}=1$  Wasserimmersionsobjektiv (Nikon, Japan) verwendet. Für alle Zellmessungen wurden  $\text{CaF}_2$ -Objektträger herangezogen, da diese keine störenden Banden im Raman-Spektrum aufweisen.

Nanopartikel-Suspensionen wurden in kleinen Quarzglasröhrchen gemessen, welche für Vergleichsmessungen dieselbe Eindringtiefe des Lasers in die Probe gewährleisten. An den Raman-Spektren wurde eine Basislinienkorrektur vorgenommen und bei Bedarf die Intensitäten skaliert (Vektor-Normalisierung). Hierfür wurde die Software OPUS von Bruker genutzt. Kartierungen von Zellen wurden mit der Software WITec Projekt erstellt und analysiert.

Ein am IPHT entwickelter inverser Mikroskopaufbau, gekoppelt mit dem Raman-System von Kaiser (RXN1, Kaiser Optical Systems, USA), wurde für Raman-Messungen von Zellen in einem mikrofluidischen System genutzt (Abb. 3.1). Er besteht



**Abbildung 3.1:** Schema und Foto des inversen Mikroskopaufbaus und Raman-Setups für Messungen in einem Mikrofluidikchip sowie ein Spritzenpumpensystem zur Steuerung und Fokussierung des Probedurchsatzes.

aus einem Faserkollimator für die Einkopplung einer Multimodefaser, einem achromatischen Linsensystem, welches den Strahl aufweitet, dem Laserlinienfilter mit einem Transmissionsprofil von 785 nm entsprechend der Laserwellenlänge, dem Notchbeamsplitter, welcher für alle Wellenlängen bis auf die des Lasers transparent ist und einem weiteren Notchfilter, welcher das elastisch gestreute Licht (Rayleigh Strahlung) filtert. Des Weiteren reflektiert ein Edgebeamsplitter Licht unter 785 nm, so dass nur das inelastisch gestreute Licht (Stokes Strahlung) passieren kann. Licht aus einer Weißlichtquelle wird entsprechend vom Edgebeamsplitter reflektiert und über eine Linse auf die Kamera projiziert, welches eine Abbildung der Probe ermöglicht. Über

ein Teleskop wird das Stokes gestreute Licht (Raman-Streulicht) gebündelt und in eine Multimodefaser eingekoppelt.

#### 3.1.2.2 UV/VIS-Absorptionsspektrometrie

Die UV/VIS-Absorptionsspektrometrie nutzt elektromagnetische Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Lichtes (VIS, *visible*). Entspricht die Energie eines Photons der Energiedifferenz zweier elektronischer Zustände, so können die Elektronen in ein höheres Energieniveau angeregt werden. Gleichzeitig erfolgt die Absorption der entsprechenden Frequenzen. Absorptionsspektren können Aussagen über die Konzentration, Schichtdicken, Größenverteilung und die zugrunde liegende Struktur einer Probe liefern.

Für die Messungen wurde das UV/VIS-Absorptionsspektrometer V-670/Jasco (Japan) verwendet. Hierfür wurden UV-Küvetten genutzt. Die Wellenlängengenauigkeit beträgt  $\pm 0.3$  nm.

#### 3.1.2.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie) basiert auf der Absorption von Licht aus dem Spektrum einer infraroten Lichtquelle. Die absorbierten Wellenlängen sind charakteristisch für bestimmte Moleküle. Bei der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie wird das Spektrum durch eine Fourier-Transformation eines gemessenen Interferogramms berechnet. Anhand der gewählten Anregungswellenlänge lassen sich unterschiedliche Schwingungen anregen. Beispielsweise können im fernen Infrarot Gitterschwingungen und im mittleren Infrarot Schwingungen, welche auf intramolekulare Bewegungen zurückzuführen sind, detektiert werden. Die IR-Spektroskopie wird daher häufig für analytische Zwecke eingesetzt.

Für die Untersuchungen von Proben wurde ein FT-IR Spektrometer 670 gekoppelt an ein Mikroskop 620 (Agilent, USA) verwendet. Die Messungen erfolgten an getrockneten Proben auf  $\text{CaF}_2$ -Objektträgern.

#### 3.1.2.4 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) handelt es sich um eine spektroskopische Methode zur Messung von Schichtdicken und dielektrischen Eigenschaften dünner Filme. Dies geschieht durch Anregung von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche metallisch bedampfter Oberflächen mittels eines Prismas in Totalreflexion auf der dem Analyten abgewandten Seite. Die Oberflächenplasmonenresonanz ist sehr stark vom Brechungsindex des Analyten abhängig. So reicht bereits eine Monolage einer molekularen Substanz an der Oberfläche der Metallschicht aus, um eine detektierbare Änderung der Plasmonenresonanz hervorzurufen. Das Intensitätswinkelspektrum des total reflektierten Lichtes weist bei einem bestimmten Winkel ein Minimum auf. Die Brechzahl des Analyten beeinflusst dabei empfindlich die Anregungsbedingungen und damit den Winkel des Minimums. Der Verlauf einer

Oberflächenreaktion einhergehend mit einer Änderung der Schichtdicke wird so in Echtzeit beobachtet.

Eine Veränderung der Schichtdicke nach Adsorption von Polymeren wurde mit dem Doppelkanalgerät SR 7000 DC von Reichert realisiert. Für die Messung der Adsorption von Polymeren auf einer Au-Oberfläche, wurde ein Objektträger mit Au bedampft und darauf ein Raman-Reporter immobilisiert. In einem zweiten Schritt wurde nacheinander eine Lösung mit dem Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) bzw. Polyvinylalkohol (PVA) über die Oberfläche geleitet.

#### 3.1.2.5 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung wird zur Messung von Partikel- und Molekülgrößen im Submikrometerbereich verwendet. Bei dieser Methode wird die Diffusion von Partikeln, die aufgrund der Brownschen Molekularbewegung erfolgt, gemessen. Die Brownsche Molekularbewegung von Partikeln oder Molekülen in Suspension verursacht die Streuung von Laserlicht mit unterschiedlichen Intensitäten. Die Intensitätsschwankungen ergeben sich aus der Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung. Die Daten können mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung eine Aussage über die Größe und Größenverteilung der Partikel liefern. Die Stokes-Einstein-Beziehung beschreibt die Diffusion eines Moleküls und stellt einen Zusammenhang zwischen Größe und Dichte der als kugelförmig betrachteten Teilchen und ihrer Sinkgeschwindigkeit her. Für die Messungen von Nanopartikeln in wässrigem Milieu wurde der Zetasizer 6.20 (Malvern Instruments, UK) herangezogen.

#### 3.1.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erhält man Informationen über das Innere der Probe. Dazu wird die Probe in einem Hochvakuum einem Elektronenstrahl ausgesetzt. Der Elektronenstrahl wird durch magnetische Linsen auf die Probe gelenkt. Elektronen können die Probe ungehindert durchdringen, elastisch oder inelastisch gestreut werden. Die zur Bildentstehung verwendeten elastisch gestreuten Elektronen werden durch eine magnetische Linse auf die Bildebene projiziert. Bei der Elektronenmikroskopie wird durch die geringere Wellenlänge der Elektronen im Vergleich zum sichtbaren Licht, eine viel größere Auflösung erreicht. Aufgrund des Durchdringens der Elektronen durch die Probe muss diese für eine gute Abbildung sehr dünn sein. Zu dicke Proben liefern schlechtere Kontraste. Um morphologische Veränderungen der Proben im Hochvakuum zu vermeiden und Dünnschnitte zu ermöglichen, müssen die Proben getrocknet werden. Hierfür stehen verschiedene Methoden wie die Kryofixation oder eine chemische Fixierung zur Verfügung.

Messungen an einem Transmissionselektronenmikroskop erfolgten mit dem CEM 902A/Zeiss (DE) durch Franka Jahn (IPHT, Jena). Hierfür wurden 10 µl Probenvolumen auf 300 mesh-Netzchen aus Formvar-Kohle-Film aufgebracht und vollständig eingetrocknet.

#### 3.1.2.7 Rasterelektronenmikroskopie

Diese Methode ist ähnlich der Transmissionselektronenmikroskopie. Bei der Rasterelektronenmikroskopie ist jedoch nur eine Oberflächenabbildung großer und kompakter Proben möglich. Ein feiner Elektronenstrahl rastert die Probe zeilenweise ab. Dabei werden aus dem Objekt wieder austretende oder rückgestreute Elektronen oder andere Signale synchron detektiert. Der detektierte Strom bestimmt den Intensitätswert des zugeordneten Bildpunktes. Dementsprechend erfolgt die Abbildung aufgrund sämtlicher vom Objekt ausgehender Signale.

Die Messungen am Rasterelektronenmikroskope JEOL JSM 6700 F wurden von Franka Jahn (IPHT, Jena) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben aus Au- und Ag-Nanopartikeln auf REM-Probenhaltern aufgebracht und getrocknet.

#### 3.1.2.8 Lichtmikroskopie: Fluoreszenz- und Dunkelfeldmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Sie beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz, bei dem Fluorophore mit Licht einer Wellenlänge angeregt werden. Die so angeregten Fluorophore emittieren Licht, welches durch die Stokesverschiebung langwelliger als das eingestrahlte Licht selbst ist. Die Größe der zu untersuchenden Objekte kann aufgrund des emittierten Lichtes weit unter der Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops liegen. Zelluläre Bestandteile können nach Anfärbung mit Fluorophoren wesentlich deutlicher und detaillierter dargestellt werden.

Bei der Dunkelfeldmikroskopie werden Strukturen hell auf dunklem Hintergrund abgebildet. Dadurch können Proben mit nur sehr geringem Kontrast dennoch gut aufgelöste und kontrastreiche Bilder erzeugen. Hierzu wird das von der Probe abgelenkte Licht detektiert. Dieser Effekt beruht bei Objekten, deren Durchmesser in etwa der Wellenlänge der Strahlung entspricht, auf der Mie-Streuung des Lichts, bei der Strahlenbündel seitlich heraus gestreut werden. Dadurch wird der gesamte Lichtstrahl von der Seite her sichtbar. Diese elastische Streuung elektromagnetischer Wellen an sphärischen Objekten führt zur Auflösung von Teilchen, die kleiner sind als die Auflösungsgrenze des Mikroskops. Im Gegensatz zur Dunkelfeldmikroskopie beruht die Hellfeldmikroskopie darauf, dass das Präparat einen Teil des eingestrahnten Lichts absorbiert und so der entsprechende Bereich dunkler erscheint.

Die zu untersuchenden Proben wurden auf Glasobjektträgern getrocknet (Nanopartikel) oder in wässrigem Milieu (Zellen) mit dem AxioImager A1 von Zeiss (DE) mikroskopisch betrachtet. Für die Anregung der Fluoreszenz wurde eine UV-Lampe verwendet. Für das Fluorophor Propidiumiodid wurde das Filter-Set 77HE (Zeiss) und für Alexafluor das Filter-Set 09 (Zeiss) genutzt.

#### 3.1.3 Software und Berechnungen

Die theoretische Berechnung des Absorptionsquerschnittes und die Ausbreitung des elektromagnetischen Feldes eines AuAg-Dimers unter Verwendung drei verschiedener

Orientierungen des Anregungslichtes wurde mit der Software „COMSOL Multiphysics (version 4.3.b)“ basierend auf der „Finite Element Method“ durch Ondrej Stranik durchgeführt.

Eine spektrale Datenanalyse zur Differenzierung markierter und unmarkierter Zellen im Mikrofluidikchip für eine schnelle und einfache visuelle Differenzierung dieser, wurde durch Dr. Claudia Beleites (IPHT Jena) mit der Software R und dem Algorithmus N-FindR realisiert.

## 3.2 Präparation von Immun-SERS-Markern

Im Folgenden wird die Präparation und Charakterisierung von Immun-SERS-Markern (ISM) beschrieben. Der Aufbau ist von den Anwendungsbedingungen abhängig und variiert daher. In der Regel bestehen ISM aus einem oder mehreren metallischen Nanopartikeln, welche in Form und Struktur sehr unterschiedlich sein können. Des Weiteren muss ein Raman-Reporter auf der metallischen Oberfläche adsorbiert oder konjugiert sein, dieser liefert das für ihn typische SERS-Spektrum. Für die zielgerichtete Detektion von Antigenen sind spezifische Antikörper notwendig, welche sich auf der Oberfläche der ISM befinden müssen.

Abbildung 3.2 veranschaulicht den schematischen Aufbau der in dieser Arbeit synthetisierten ISM. Dabei handelt es sich um Nanopartikel-Aggregate, welche aus mehreren Au-Nanokugeln zusammengesetzt sind. Daher werden sie ebenfalls als „multicore-SERS-label“ (MSL) bezeichnet [102]. Sie sind mit einem Raman-Reporter und einer Silberhülle ummantelt. Verschiedene Polymere stoppen das weitere Wachstum der Nanopartikel-Aggregate und erleichtern die Anbindung des Siliciumdioxids. Eine anschließende Silanisierung mit einem Alkoxysilan ermöglicht eine effektive Konjugation von Antikörpern über ein Carboxyl-Dendrimer auf der Oberfläche der ISM.

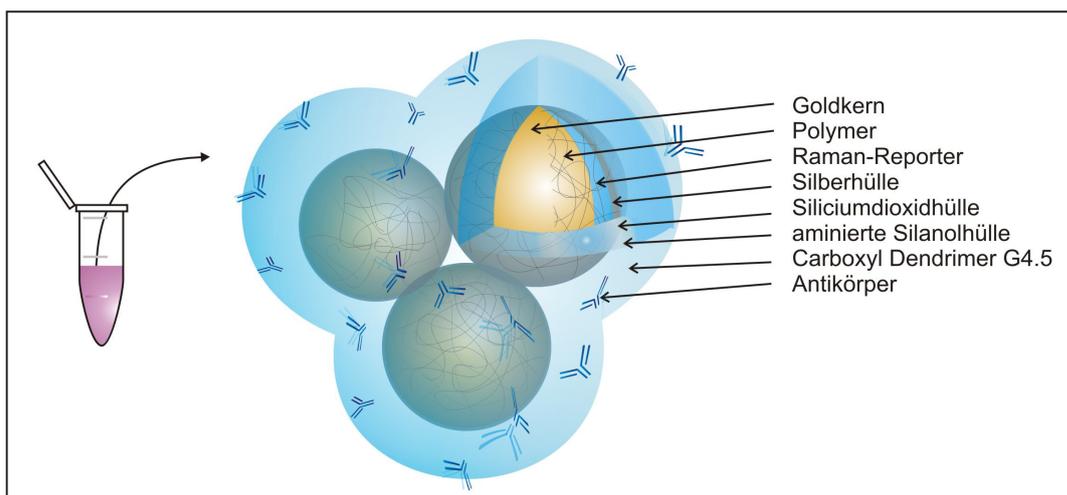


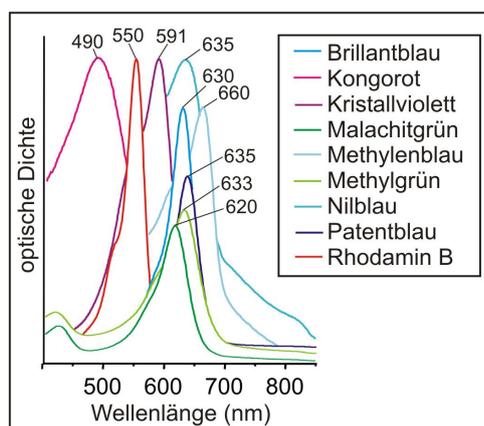
Abbildung 3.2: schematischer Aufbau eines Immun-SERS-Markers

Der Präparation solcher ISM sind eine hohe Anzahl an kleineren und größeren Tests vorausgegangen. Eine Übersicht dieser ist im Folgenden kurz zusammengefasst. Sie spielen eine wichtige Rolle auf dem Weg zur erfolgreichen Synthese der ISM, sollen hier jedoch nur dem Verständnis der komplizierten Sachverhalte dienen. Im Anschluss daran ist das endgültige Protokoll für die Herstellung der ISM ausführlich beschrieben.

## 3.2.1 Voruntersuchungen

### 3.2.1.1 Die Auswahl der Nanopartikel und Raman-Reporter

Am Anfang stand die Wahl der zu testenden Nanopartikel und Raman-Reporter. Hierfür wurden eine Reihe zwischen 15 nm und 100 nm großer kommerzieller und am IPHT oder anderen Häusern synthetisierter Nanopartikel (Tab. 3.1) verglichen (s. Abschnitt 4.2 auf Seite 41). Mischungen aus Nanopartikeln und verschiedenen Raman-Reportern (Tab. 3.1, Abb. 3.3) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen sowie Inkubationszeiten mit anschließenden SERS-Messungen untersucht (s. Abschnitt 4.3 auf Seite 45).



**Abbildung 3.3:** Übersicht über die Absorptionseigenschaften der verwendeten Farbstoffe aus Tabelle 3.1.

SERS-Messungen erfolgten an wässrigen Nanopartikel-Suspensionen in kleinen Quarzglasküvetten (Abb. 3.4) mit einheitlichem Durchmesser, um eine möglichst gleiche Eindringtiefe des Lasers in die Probe zu gewährleisten.

Die Auswahlkriterien für die entsprechenden Nanopartikel ergaben sich aus deren Handling, deren Neigung zur Aggregation nach Zugabe des Raman-Reporters, der Anzahl an Raman-Reportern, welche ein deutliches Spektrum mit dem jeweiligen Nanopartikel zeigten sowie der Intensität des SERS-Signals. Dabei wurde auf ein intensives SERS-Spektrum bei minimaler Aggregation der Nanopartikel durch den Raman-Reporter geachtet. Die fertigen Suspensionen wurden Raman-spektroskopisch vermessen und wenn nötig, die Raman-Reporter Konzentration neu eingestellt. Für frisch synthetisierte Nanopartikel musste die Konzentration der Raman-Reporter

**Tabelle 3.1:** getestete Nanopartikel und Raman-Reporter

<b>Nanopartikel</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft</b>
Ag-Nanokugeln	15-100 nm	IPHT/BBC international
Ag-Au Nanokugeln	15-100 nm	IPHT
Au-Nanokugeln	5-100 nm	IPHT/BBC international
Au-Au Nanokugeln	15-100 nm	IPHT
Au-Ag Nanokugeln	15-100 nm	IPHT
Au-Nanostäbchen	AV 4.2	TU Dresden, M. Lakatos
Au-Nanostäbchen	AV 4.9	TU Dresden, M. Lakatos
Au-Ag Nanostäbchen	AV 4.2	IPHT
Au-Ag Nanostäbchen	AV 4.9	IPHT
Ag-Nanodreiecke		IPHT
Au-Nanopeanuts (Erdnüsse)	Abs. <sub>max</sub> 525/650 nm	IPHT, F. Theil
Au-Nanorasseln	Abs. <sub>max</sub> 490/740 nm	Universität Mainz,
	Abs. <sub>max</sub> 475/725 nm	C. Sönnichsen
AuAg-Nanorasseln		Universität Mainz, C. Sönnichsen

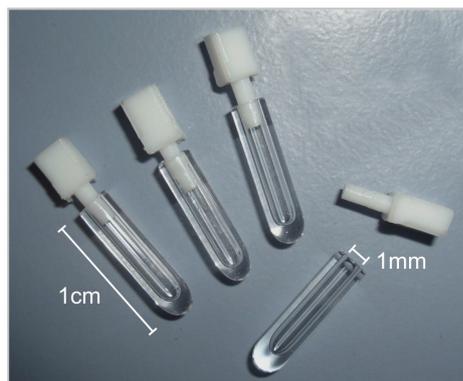
  

<b>Farbstoffe</b>	<b>Abs.<sub>max</sub></b>	<b>Herkunft</b>
Brillantblau	630 nm	Sigma Aldrich
Kongorot	490 nm	Sigma Aldrich
Kristallviolett	591 nm	Sigma Aldrich
Malachitgrün	620 nm	Sigma Aldrich
Methylenblau	660 nm	Sigma Aldrich
Methylgrün	633 nm	Sigma Aldrich
Nilblau	635 nm	Sigma Aldrich
Patentblau	635 nm	Sigma Aldrich
Rhodamin B	550 nm	Sigma Aldrich

<b>aromatische Thiole</b>	<b>Herkunft</b>
3-Mercaptobenzoessäure	Sigma Aldrich
4-Mercaptobenzoessäure	Sigma Aldrich
2-Mercapto-4-methylthiazol-5-essigsäure	Sigma Aldrich
4-Mercaptophenol	Sigma Aldrich
6-Mercaptopyridin-3-carbonsäure	Sigma Aldrich
Thiophenol	Sigma Aldrich

### 3 Material und Methoden



**Abbildung 3.4:** Küvetten aus Quarzglas für wenige Mikroliter Probenvolumen ermöglichen SERS-Messungen mit einheitlicher Eindringtiefe des Lasers in die Probe und Teflon-Stopfen für flüchtige Substanzen.

erneut angepasst werden. Bei Raman-Reportern mit einer funktionellen Gruppe (Thiolgruppe) erfolgte der Nachweis einer erfolgreichen Chemisorption über einen genauen Vergleich von Raman- und SERS-Spektren des entsprechenden Raman-Reporter-Moleküls (s. Abb. 4.10 auf Seite 54).

Zur Verbesserung der Absorptionseigenschaften für die Anregung im nah-infraroten Bereich wurden einige Nanopartikel zusätzlich mit einer Gold- und/oder Silberhülle ummantelt. Eine Umhüllung von Nanokugeln mit Gold wurde durch die Reduktion von Gold-Chlorsäure mit Hydroxylamin realisiert. Für die Umhüllung der Nanopartikel (Au-Nanorods, Au-Nanokugeln, Au-Nanorasseln) mit Silber, welche die plasmonischen Eigenschaften der ISM verbessern soll, wurde ein Silberverstärkungs-Kit der Firma BBC bestehend aus zwei Lösungen verwendet. Bei deren Mischung im Verhältnis 1:1 wird Silber durch die Reduktion von Silbernitrat über ein unbekanntes Reduktionsmittel an der Oberfläche der Nanopartikel abgeschieden. Die Stärke der Silberhülle wurde mittels Variation der Konzentration des Silberverstärkungs-Kits eingestellt. Für die Ermittlung der optimalen Verdünnung mit Reinstwasser wurden Konzentrationsreihen erstellt und die Nanopartikel-Suspension nach Zugabe des Raman-Reporters in einem Raman-Spektrometer gemessen (s. Abb. 4.15 auf Seite 59). Anschließend wurde die Hüllendicke mit einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet (s. Abb. 4.17 auf Seite 61). Zusätzlich wurden die plasmonischen Eigenschaften mit einem UV/VIS-Absorptionsspektrometer untersucht (s. Abb. 4.17 auf Seite 61).

Ein weiterer interessanter Sachverhalt, den es zu untersuchen galt, war der Zeitpunkt für die Zugabe des Raman-Reporters zu den Nanopartikeln (s. Abb. 4.18 auf Seite 62). Hierfür wurde eine Zugabe des Raman-Reporters vor und nach der reduktiven Silberabscheidung getestet.

1. Au-Nanopartikel/Raman-Reporter/Silberabscheidung/ -
2. Au-Nanopartikel/ - /Silberabscheidung/Raman-Reporter

### 3. Au-Nanopartikel/Raman-Reporter/Silberabscheidung/Raman-Reporter

Da die Affinität der Thiolgruppen zu Gold höher als zu Silber ist, sollte eher eine Verschlechterung der SERS-Intensität bei Zugabe des Raman-Reporters nach der Silberabscheidung zu erwarten sein.

Um das SERS-Signal zu erhöhen, wurden zusätzlich Nanopartikel-Konstrukte synthetisiert und getestet. Diese waren aus unterschiedlichen Nanopartikeln (Material, Größe) zusammengesetzt. Ziel war es, durch Erhöhung der Oberflächenrauigkeit von Nanopartikeln mittels Auftragung neuer Strukturen oder durch gezielte Aggregation die plasmonischen Eigenschaften für die Anregung im nah-infraroten Bereich zu verbessern. Zuerst wurden Siliciumdioxid- (100 nm) und magnetische Nanokugeln (50 nm) mit wesentlich kleineren Au-Nanokugeln (30 nm und 5 nm) umhüllt. Die Kopplung erfolgte über Aminogruppen auf der Oberfläche der Siliciumdioxid- bzw. magnetischen Nanopartikel. Die Zielstruktur sollte einer Brombeere ähneln (s. Abb. 4.5 auf Seite 48).

Ein weiterer Versuch bestand in der Adsorption des Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) auf der Oberfläche von Au-Nanokugeln (30 nm) und Au-Nanostäbchen. Unter Verwendung des EnzMet-Kits der Firma Nanoprobes mit dem vom Hersteller vorgegebene Protokoll erfolgte die enzymatische Silberabscheidung auf den Nanopartikeln (s. Abb. 4.6 auf Seite 49).

Für eine kontrollierte Aggregation von Au-Nanopartikeln wurde das Linkermolekül 4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin herangezogen (s. Abschnitt 4.4 auf Seite 48). Die Au-Nanopartikel wurden mit diesen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Stärke der Aggregation konnte visuell bestimmt und messtechnisch mit dem UV/VIS-Absorptionsspektrometer sowie dem Raman-Spektrometer bestätigt werden (s. Abb. 4.7 auf Seite 50). Eine sehr dunkle, lila bis graue Verfärbung war typisch für Aggregate, welche sich nach kurzer Zeit ablagerten und den Nanometerbereich überschritten. Suspensionen, welche eine leichte bis intensive lila Färbung zeigten, wurden für weitere Versuche verwendet.

Die Ergebnisse der verschiedenen Tests zu den Nanopartikel-Konstrukten wurden mittels Raman-Spektroskopie, UV/VIS-Absorptionsspektrometrie und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

#### 3.2.1.2 Die Siliciumdioxidhülle

Das Standardprotokoll für die Umhüllung von Nanopartikeln mit Siliciumdioxid beinhaltet eine Mischung aus den Reagenzien Tetraethylorthosilikat (TEOS), Wasser, Ammoniak und dem Lösungsmittel Ethanol. Ammoniak dient hier als Katalysator [103]. Es wurden weitere Lösungsmittel und deren Mischungen getestet, welche einen Einfluss auf das Wachstum der Siliciumdioxidhülle haben können [103]:

1. Ethanol
2. Methanol-Isopropanol
3. Methanol-Propanol

Durch Veränderung der Konzentration der einzelnen Reagenzien sowie der Temperatur und der Inkubationszeit wurde die Reaktionsgeschwindigkeit angepasst, zudem wurde der Einfluss nachstehender, linearer Polymere, sowie Kombinationen aus diesen auf das Wachstum der Siliciumdioxidhülle getestet (s. Abschnitt 4.7 auf Seite 65). Die Anbindung effektiv arbeitender Polymere wurde mittels eines UV/VIS-Absorptionsspektrometers (s. Abschnitt 4.5 auf Seite 57) und FT-IR Absorptionsspektrometers (s. Abb. 4.13 auf Seite 58) überprüft. Das Schichtwachstum zwei verschiedener Polymere wurde mit SPR-Messungen kontrolliert (s. Abb. 4.23 auf Seite 67).

1. PAH (Polyallylamin Hydrochloride, Mw 15.000)
2. PEG (Polyethylenglycol, Mw 400-40.000)
3. PSS (Polynatrium-4-styrolsulfonat, Mw 70.000)
4. PVA (Polyvinylalkohol, Mw 30.000-70.000)
5. PVP10 (Polyvinylpyrrolidon, Mw 10.000)
6. PVP55 (Polyvinylpyrrolidon, Mw 55.000)
7. PAH/PVP55
8. PSS/PVP55
9. PVA/PVP55
10. PVP55/PAH
11. PVP55/PSS
12. PVP55/PSS/PVP55
13. PVP55/PVA

Weiterhin wurde beobachtet, welche Auswirkungen die verschiedenen Raman-Reporter auf das Wachstum der Siliciumdioxidhülle haben.

Neben der Umhüllung mit Siliciumdioxid erfolgte ein weiterer Versuch zur Umantlung der Nanopartikel. Unter Verwendung unterschiedlich geladener Polymere wurde ein Schicht-auf-Schicht Wachstum auf der Nanopartikeloberfläche realisiert. Die Inkubationszeiten und Temperaturen wurden hierfür zusätzlich variiert.

#### 3.2.1.3 Funktionalisierung mit Antikörpern

Für die Konjugation von Antikörpern an die SERS-Marker (SM) musste die Oberfläche modifiziert werden. Hierfür wurden verschiedene Alkoxysilane herangezogen. Diesbezüglich wurden die funktionellen Organosilane 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), Triethoxysilylbutyraldehyde (TESBA), 3-Aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) und 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) getestet (s. Abschnitt 4.7 auf Seite 68). Jedes dieser Silane besitzt andere Eigenschaften wie z.B. unterschiedliche funktionelle Gruppen wie Aldehydgruppen (TESBA), Aminogruppen (APTES, APTMS) oder Epoxygruppen (GOPS). Folglich benötigte jedes einzelne Silan ein speziell angepasstes Protokoll für dessen Anbindung an die Siliciumdioxidhülle der

SM sowie für die Konjugation von Antikörpern an die funktionellen Gruppen. Zu diesem Zweck waren zum Beispiel unterschiedliche Puffer bzw. pH-Werte sowie Inkubationszeiten und Chemikalien nötig. Variationen der Protokolle waren notwendig, wenn die Funktionalisierung nicht erfolgreich funktionierte. Details zur Synthese werden im Kapitel 3.2.2.5 nur für das letztendlich genutzte Protokoll ausführlich beschrieben. Zudem mussten mehrere Antikörper (EpCAM, HER2/neu, fluoreszenzmarkierte Antikörper, monoklonale Antikörper von Maus und Hase (IgG)) für diese Anwendung getestet werden. Der Gebrauch von Reaktionsgefäßen (Eppendorf Protein LoBIND Tubes), an deren Innenwänden funktionelle Gruppen durch eine spezielle Beschichtung kaum haften bleiben, war hier unumgänglich. Der positive Nachweis der Funktionalisierung der SM mit Antikörpern erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper in einem Fluoreszenzmikroskop (s. Abb. 4.30 auf Seite 75). Andere Nachweismethoden wie beispielsweise ein enzymatischer Nachweis mittels eines Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugats, welches nach Zugabe von 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) dieses zu einem blauen Produkt oxidiert oder eine direkte Detektion von Zellantigenen wurden zusätzlich auf ihre Effizienz geprüft.

### 3.2.1.4 Zelldetektion

Die fertig präparierten ISM wurden für die Detektion der Zellen herangezogen. Versuche zur spezifischen Anbindung dieser an Zellen des Mammakarzinoms (MCF7, BT-20, SKBR3) erfolgten an mit Formalin fixierten, getrockneten und vitalen Zellen in Kulturmedium und verschiedenen Puffern (PBS, PBST, PBS (BSA), PE-Puffer). Inkubationszeiten und ISM-Konzentrationen wurden variiert. Eine erfolgreiche Konjugation der an die ISM gebundenen Antikörper an die Zellen wurde mittels eines Fluoreszenzmikroskops (s. Abb. 4.34 auf Seite 81) sowie der Raman-Spektroskopie (s. Abb. 4.35 auf Seite 82) überprüft. Als Negativkontrolle dienten Leukozyten aus humanem Blut sowie humane Vorhautfibroblasten (HFF).

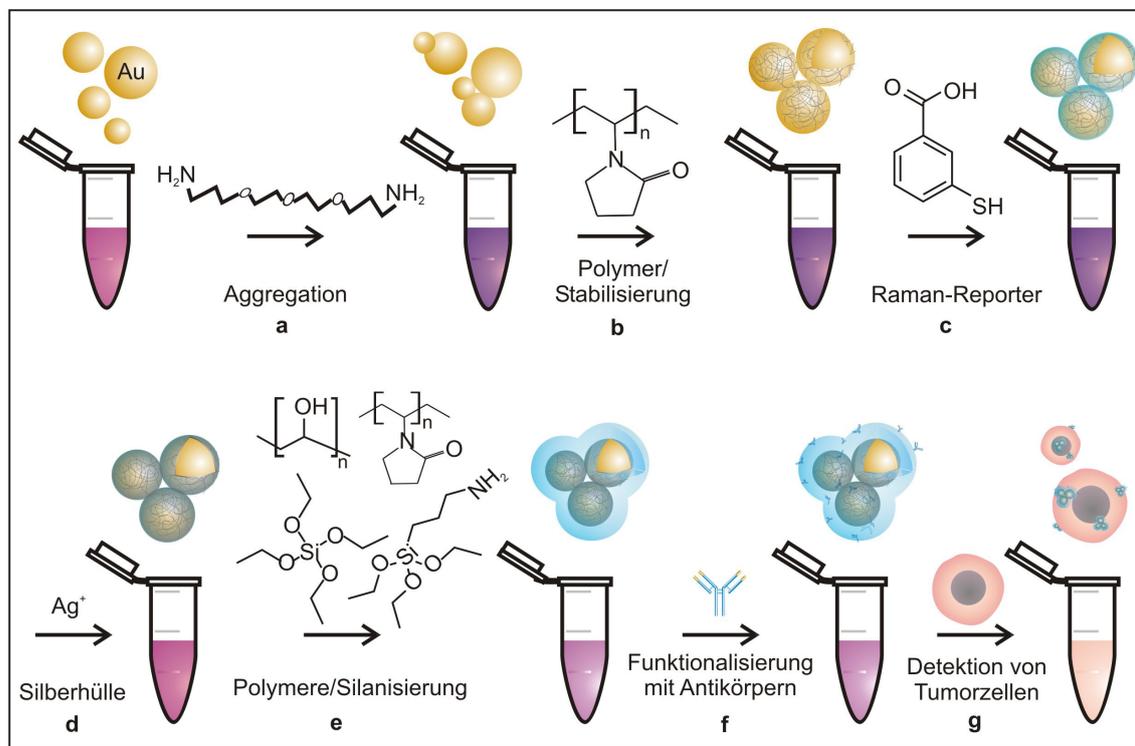
### 3.2.2 Synthese der Immun-SERS-Marker

Aus den bereits erwähnten Synthese-Experimenten kristallisierten sich bestimmte Verfahren als äußerst effektiv heraus, welche nun ausführlich erläutert werden sollen. In Abb. 3.5 ist eine Übersicht der durchgeführten und optimierten Syntheseschritte für die Herstellung von ISM sowie deren Anwendung dargestellt.

Zu Beginn wurden die sphärischen Au-Nanokugeln mittels des linearen Linkermoleküls 4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin (Abb. 3.5a) aggregiert. Im Anschluss fand die Adsorption des Polymers Polyvinylpyrrolidon statt (Abb. 3.5b) sowie die Konjugation aromatischer Raman-Reporter-Moleküle (z.B. 3-Mercaptobenzoessäure) (Abb. 3.5c). Dieser Komplex wurde mit einer dünnen Hülle aus Silber ummantelt (Abb. 3.5d). Eine anschließende Silanisierung wurde mit Tetraethylorthosilikat (TEOS) und dem Alkoxysilan 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) realisiert (Abb. 3.5e). Zu diesem Zweck wurden zusätzlich die Polymere PVP und Polyvinylalkohol (PVA) konjugiert. Die SM wurden mit monoklonalen Anti-EpCAM Antikörpern (IgG)

### 3 Material und Methoden

funktionalisiert (Abb. 3.5f). ISM wurden für die Detektion vitaler Zellen aus Zelllinien des Mammakarzinoms (MCF-7, BT-20 und SKBR3) herangezogen (Abb. 3.5g). Die gerade vorgestellten Syntheseschritte werden im Folgenden im Detail beschrieben.



**Abbildung 3.5:** Übersicht über die Syntheseschritte zur Herstellung von ISM: Aggregation von Au-Nanokugeln (a), Polymeranbindung und Stabilisierung (b), Konjugation eines Raman-Reporters (c), Silberabscheidung (d), Silanisierung und Modifizierung mit einem Alkoxysilan (e), Konjugation von Antikörpern (f), Markierung von Tumorzellen (g).

#### 3.2.2.1 Herstellung plasmonisch aktiver Au-Nanokugeln

Au-Nanokugeln wurden mit freundlicher Unterstützung von Frank Theil mittels Citratreduktion von Tetrachloridogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) in Wasser synthetisiert. Von dieser Methode wurde bereits 1973 von Frens und Turkevich et al. [103, 104] berichtet. 20 mg  $\text{HAuCl}_4$  (50.8 mmol) wurden in 200 ml Wasser gelöst. Unter gleichmäßigem Rühren wurde die Lösung zum Kochen gebracht und anschließend mit 2.7 ml des Reduktionsmittels Natriumcitrat (34 mM) versetzt. Nach weiteren 15 min Kochen unter Rückfluss, wurde die Suspension abgekühlt und gefiltert ( $0.22 \mu\text{m}$ ). Die Au-Nanokugeln wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (s. Abb. 4.3 auf Seite 44) und UV-VIS-Absorptionsspektrometrie (s. Abb. 4.3 auf Seite 44) charakterisiert.

### 3.2.2.2 Aggregation von Au-Nanokugeln und Konjugation des Raman-Reporters

Eine kontrollierte Aggregation der einzelnen Au-Nanokugeln wurde mittels des Diamins 4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin realisiert. Zu diesem Zweck wurden 1.5 ml Au-Nanokugeln zentrifugiert (20 min, 8000 rpm) und das Pellet in 56  $\mu$ l des Diamins (0.18 mM) aufgenommen. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden die Au-Nanokugeln für 2 min im Ultraschallbad behandelt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Anschließend wurden 600  $\mu$ l des Raman-Reporters ( $2 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-8}$  %vol.) zu der Nanopartikel-Suspension hinzugegeben. Nach einer 3 minütigen Inkubation wurden 400  $\mu$ l des Polymers Polyvinylpyrrolidon (PVP) (640 mg/25 ml H<sub>2</sub>O) zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben. Die Suspension wurde 2 h lang kontinuierlich geschüttelt und anschließend über Zentrifugation (20 min, 8000 rpm) ungebundene Raman-Reporter-Moleküle und Polymere entfernt. Das Pellet wurde in 1.5 ml Wasser aufgenommen. Für die Auswertung wurden SERS-Spektren von getrockneten (s. Abb. 4.2 auf Seite 43) und in Suspension (s. Abb. 4.7 auf Seite 50) befindlichen Nanopartikeln durchgeführt.

### 3.2.2.3 Silberverstärkung der Au-Nanokugel-Aggregate

Des Weiteren wurden die Nanopartikel mit Silber umhüllt. Hierfür wurden zwei Lösungen eines Silberverstärkungs-Kits zu gleichen Teilen gemischt. 150  $\mu$ l einer 10 %ige wässrigen Lösung dieser Mischung wurden für die Silberabscheidung verwendet. Nach Zugabe dieser Lösung wurde die Probe gründlich gemischt. Ein weiterer Waschschrift (15 min, 8000 rpm) wurde nach einer Inkubationszeit von 5 min durchgeführt. Das Pellet wurde in 600  $\mu$ l destilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Im Anschluss wurden die AuAg-Nanokugel-Aggregate (SERS-Marker) mittels eines Spritzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 220 nm gefiltert. Die AuAg-Nanopartikel wurden mit einem UV/VIS-Absorptionsspektrometer, mittels TEM und SERS charakterisiert (s. Abschnitt 4.5 auf Seite 59).

### 3.2.2.4 Silanisierung und Stabilisierung der SERS-Marker

Für die Synthese der Siliciumdioxidhülle (s. Abschnitt 4.6 auf Seite 64) wurden zunächst zwei verschiedene Polymere auf die SERS-Marker (SM) adsorbiert. Dies ist für eine effektive und gleichmäßige Anbindung der Siliciumdioxidhülle unumgänglich. Hierfür wurden die Nanopartikel mit 400  $\mu$ l PVP (53.3 mg/ml) für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden 200  $\mu$ l Polyvinylalkohol (PVA) (4%) zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben und für 24 h ruhen gelassen. Darauf hin wurden überschüssige Polymere mittels Zentrifugation (20 min, 8000 rpm) durch Waschen mit Reinstwasser entfernt. Für die Präparation der Hülle wurde die von Stöber et al. [105] beschriebene Methode in einer modifizierten Form angewandt. Die vorbereiteten SM wurden in einen Reaktionsgemisch aus 480  $\mu$ l Reinstwasser, 1920  $\mu$ l Ethanol, 65  $\mu$ l Ammoniak sowie 150  $\mu$ l Tetraethylorthosilikat (TEOS, 10 % in EtOH) aufgenommen und unter

ständigen Rühren mit einem Magnetrührer für 20 min inkubiert. Die Oberfläche wurde im selben Ansatz modifiziert, wie nachfolgend beschrieben.

#### 3.2.2.5 Oberflächenmodifizierung der SERS-Marker

Die Oberflächenmodifizierung der mit Siliciumdioxid umhüllten SM mit primären Aminen erfolgte parallel mit der Silanisierung durch TEOS. Hierfür wurde nach der 20 minütigen Inkubationszeit mit dem Ethoxysilan TEOS das Reaktionsgemisch mit 1 µl 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTES) für weitere 10 min behandelt. Nach der Reaktion wurde das Gemisch zweimal mit Ethanol und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Größere Aggregate wurden mittels eines Spritzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 220 nm entfernt. Die Siliciumdioxidhülle wurde mittels TEM und Absorptionsspektroskopie charakterisiert.

#### 3.2.2.6 Vergleich verschiedener Anregungswellenlängen

Die fertig präparierten SM wurden nun auf ihre plasmonischen Eigenschaften überprüft. Da sie für die Anregung im nah-infraroten Bereich entworfen wurden, erfolgte ein Test mit verschiedenen Anregungswellenlängen (Kaiser: 785 nm, 50 mW (Halbleiterlaser), WITec: 633 nm, 6.3 mW (He/Ne-Laser), 514 nm, 14 mW (Ar-Laser) und 488 nm, 13 mW (Ar-Laser)). Bei einer erfolgreichen Synthese sollten die SM ihr intensivstes Spektrum bei einer Anregung mit 785 nm zeigen. Für diesen Versuch wurde ein und dieselbe Probe heran gezogen und am gleichen Tag in einer Quarzglasküvette mit einem 10x Objektiv mittels Raman-Spektroskopie gemessen (s. Abb. 4.27 auf Seite 71). Als Raman-Reporter wurde Thiophenol ausgewählt.

#### 3.2.2.7 Funktionalisierung der SERS-Marker mit Antikörpern

Mit einem modifizierten Protokoll von Gubala et al. [106] wurden Antikörper an die aminierte Oberfläche der SM konjugiert. Für die Funktionalisierung der SM wurden diese in 2-*N*-Morpholinoethansulfonsäure (MES, pH 4.5) überführt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet in einem Gemisch aus 50 µl Polyamidoamin (PAMAM-Dendrimer), 3.7 mg *N*-3-Dimethylaminopropyl-*N*-ethylcarbodiimide (EDC hydrochlorid) und 4.2 mg *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (Sulfo-NHS), welches mit MES auf insgesamt 1 ml aliquotiert wurde, suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde zuvor für 30 min unter ständigem Durchmischen aktiviert. Danach wurde es zusammen mit den SM für 1 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe zweifach mit MES gewaschen (8000 rpm, 5 min) und von überschüssigen und ungebundenen Chemikalien befreit. 20 µl Anti-EpCAM Antikörper (VU1D9 mouse mAb, Alexa Fluor® 488) wurden zu den aktivierten SM gegeben und sorgfältig über eine Dauer von 4 h durchmischt. Nach der Inkubationszeit wurden alle nicht umgesetzten Proteine aus der Lösung entfernt (6000 rpm, 5 min). Die Probe wurde durch Zentrifugation dreimal mit Blockpuffer gewaschen und in diesem bei 4°C aufbewahrt. Für fluoreszenzmikroskopische Betrachtungen (s. Abb. 4.30 auf

Seite 75) wurden die Proben auf CaF<sub>2</sub>-Objektträgern aufgebracht, getrocknet und mit Reinstwasser gespült.

### 3.3 Kultivierung und Vorbereitung der Zelllinien

#### 3.3.1 Zelllinien des Mammakarzinoms und Vorhautfibroblasten

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen (Tab. 3.2) wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert oder aufbewahrt. Die hier verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien wurden um 1970 aus dem Pleuraerguss von europäischen Frauen verschiedenen Alters (MCF-7 = 69 Jahre, BT-20 = 74 Jahre, SK-BR-3 = 43 Jahre) mit metastasiertem Mammakarzinom etabliert. Epidermale Tumorzellen sowie humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin durch Cornelia Jörke (Universitätsklinikum Jena, Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie) kultiviert. Für die Versuche wurden die Zelllinien einen Tag lang auf CaF<sub>2</sub> Objektträgern im Inkubator kultiviert. Für die Arbeit mit Zellsuspensionen wurden diese im Anschluss mit Trypsin vom Objektträger abgelöst.

**Tabelle 3.2:** verwendete Zellen und Zelllinien vom Universitätsklinikum Jena

Zelle	EpCAM	Herkunft	Ursprung	Spezies
BT-20	positiv	Zellkultur	Mammakarzinom/epithelial	human
MCF-7	positiv	Zellkultur	Mammakarzinom/epithelial	human
SK-BR-3	positiv	Zellkultur	Mammakarzinom/epithelial	human
HFF	negativ	Zellkultur	Bindegewebe/mesenchymal	human
Leukozyten	negativ	Blutprobe	Blut/mesenchymal	human

#### 3.3.2 Leukozytenextraktion

Die Extraktion der Leukozyten wurde am Universitätsklinikum Jena von Cornelia Jörke durchgeführt. Sie erfolgte zeitnah zu den Experimenten. Venöses humanes Vollblut gesunder Spender konnte durch Punktion einer peripheren Vene gewonnen werden. 8 ml der Blutprobe wurden in ein Falcon Tube überführt und mit 40 ml Erythrozytenlysepuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (1200 rpm, 10 min). Das so gewonnene Pellet wurde in 15 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und erneut für 5 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (1200 rpm, 5 min) erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 2 ml PE-Puffer. Die Leukozyten wurden anschließend im Inkubator aufbewahrt.

### 3.4 Detektion der Zelllinien mit Immun-SERS-Markern

Für die Inkubation der Zellen mit Immun-SERS-Markern (ISM) (s. Abschnitt 4.11 auf Seite 76) wurden diese für 30 min in Blockpuffer überführt. Im Anschluss wurden 100  $\mu\text{l}$  einer definierten Konzentration (Tab. 3.4a) an funktionalisierten (ISM = Immun-SERS-Marker,  $\text{OD}_{534\text{nm}}$ ) oder nicht funktionalisierten (SM = SERS-Marker,  $\text{OD}_{532\text{nm}}$ ) Nanopartikeln zu 500  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension hinzu pipettiert und unter Ausschluss von Licht 1 h lang gleichmäßig durchmischt.

Das Maß für die Konzentration der SM/ISM wurde über die optische Dichte (OD) bei 532 nm bzw. 534 nm bestimmt. In einem weiteren Experiment wurden die ISM bei der zuvor ermittelten Konzentration von  $\text{OD}_{534\text{nm}} = 0.13$  über verschiedene Zeitpunkte hinweg (Tab. 3.4b) auf die gleiche Weise inkubiert. Versuche mit weiteren Zelllinien (Tab. 3.4c) erfolgten mit der bereits ermittelten ISM-Konzentration von  $\text{OD}_{534\text{nm}} = 0.13$  und der zuvor ermittelten Inkubationszeit von 1 h (s. Abb. 4.37 auf Seite 85). Aufgrund unterschiedlicher Voraussetzungen durch die Messmethoden Einzelzellmessung (s. Abb. 4.31 auf Seite 77) oder Kartierung (s. Abb. 4.35 auf Seite 82) oder die Zellen selbst (adhärent wachsend oder nicht) wurden diese entweder frei in einer Suspension oder adhärent auf einen  $\text{CaF}_2$ -Objektträgern bearbeitet. Die Objektträger wurden mittels EtOH im Ultraschallbad gereinigt. Im Anschluss an die Inkubation wurden alle ungebundenen ISM durch dreimaliges Waschen der Zellen (5 min, 300 rpm) mit Blockpuffer entfernt und die Zellen Raman-spektroskopisch gemessen. Zur Überprüfung, ob alle ungebundenen ISM vollständig entfernt wurden, erfolgte eine SERS-Messung des letzten Überstandes sowie des Puffers der Zellprobe.

**Tabelle 3.3:** Inkubationsbedingungen der SERS-Marker und Immun-SERS-Marker mit Zellen

*a. Variation der Immun-SERS-Marker Konzentration:*

Zelllinie	OD–SM <sub>532</sub>	OD–ISM <sub>534</sub>	Inkubationszeit	Kultivierung
MCF-7	0.11		1 h	in Suspension
MCF-7	0.15		1 h	in Suspension
MCF-7		0.11	1 h	in Suspension
MCF-7		0.13	1 h	in Suspension
MCF-7		0.15	1 h	in Suspension
Leukozyten		0.11	1 h	in Suspension
Leukozyten		0.13	1 h	in Suspension
Leukozyten		0.15	1 h	in Suspension

**b. Variation der Inkubationszeit:**

Zelllinie	OD–ISM <sub>534</sub>	Inkubationszeit	Kultivierung
MCF-7	0.13	30 min	adhärent auf CaF <sub>2</sub>
MCF-7	0.13	1 h	adhärent auf CaF <sub>2</sub>
MCF-7	0.13	2 h	adhärent auf CaF <sub>2</sub>

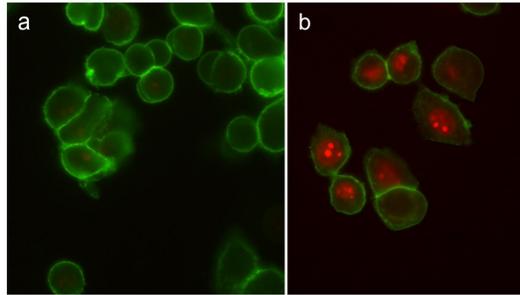
**c. Variation der Zelllinien:**

Zelllinie	OD–ISM <sub>534</sub>	Inkubationszeit	Kultivierung
MCF-7	0.13	1 h	in Suspension
HFF	0.13	1 h	in Suspension
BT-20	0.13	1 h	in Suspension
SK-BR-3	0.13	1 h	in Suspension
Leukozyten	0.13	1 h	in Suspension

Zudem wurden Referenzttests mit purem fluoreszenzmarkierten Anti-EpCAM-Antikörpern durchgeführt, um die Expression von Oberflächenantigenen auf den Zellen zu überprüfen (s. Abb. 4.34 auf Seite 81. Hierzu wurden 10 µl Antikörper unter den gleichen Bedingungen wie bei der Inkubation mit ISM hinzu gegeben. Die Proben wurden aufgrund des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa Fluor®488 mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 3.5 Zellviabilitätstests

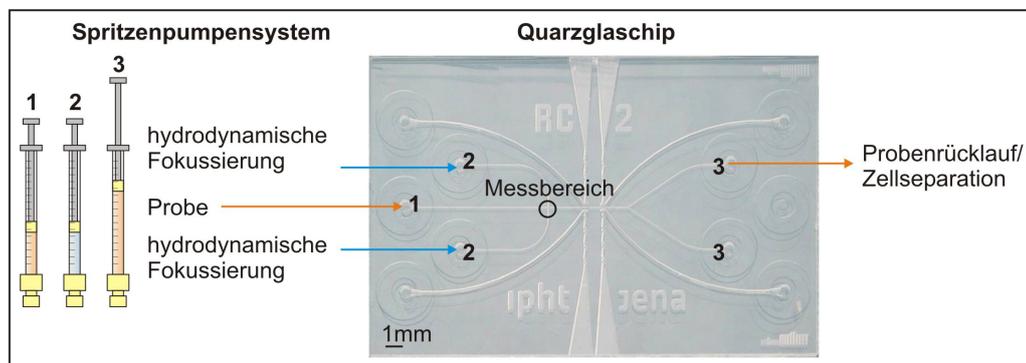
Viabilitätstests (s. Abb. 4.36 auf Seite 84) wurden mit Propidiumiodid (3,8-Diamino-5-(3-diethylaminopropyl)-6phenyl-phenanthridiniumiodid-methiodid) in einem Verhältnis von 1:200 während der Inkubation der Zellen (MCF-7, BT-20, SKBR3) mit und ohne ISM durchgeführt. Referenzzellen ohne die Zugabe von ISM wurden mit puren Antikörpern inkubiert, um möglichst ähnliche Bedingungen für die Zellen zu schaffen. Die Inkubationszeit für ISM ( $OD_{534nm} = 0.13$ ) und reine Antikörper betrug 1 h. Nach dreimaligem Waschen (200 rpm, 5 min) mit PBS (0.1 % BSA) wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine Abnahme der Zellviabilität würde mit einer Rotfärbung des Zellkerns einher gehen (Abb. 3.6). Zudem wurden jeweils 60 Zellen jeder Zelllinie mit dem Raman-Spektrometer gemessen, um die Anbindung der ISM zu überprüfen (s. Abb. 4.37 auf Seite 85).



**Abbildung 3.6:** Mit Propidiumiodid und EpCAM-AlexaFluor<sup>®</sup>488 gefärbte MCF-7 Zellen (40x Objektiv). Die rot gefärbten Zellkerne sind ein Indiz für das beginnende (a) und fortgeschrittene (b) Absterben der Zellen.

### 3.6 Messungen in einem mikrofluidischen System

Der für diesen Versuch bereitgestellte Chip RC2 (Abb. 3.7) wurde am IPHT Jena entwickelt [101]. Er besteht aus zwei spiegelbildlich gleichen, nasschemisch geätzten Quarzglasscheiben von 500  $\mu\text{m}$  und 750  $\mu\text{m}$  Stärke, welche miteinander verbunden wurden. Die Mikrokanäle wurden durch Nassätzung mit Fluorwasserstoffsäure und späterer Verbindung der Scheiben erzeugt. Die Ober- und Unterseite der Mikrokanäle ist planar, ihre Seitenwände sind halbrund nach außen expandiert. Der Probenkanal hat einen Höhendurchmesser von insgesamt 70  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 80  $\mu\text{m}$ . Insgesamt beträgt die Größe des Quarzglaschips 25 x 16 mm.



**Abbildung 3.7:** Spritzenpumpensystem zur Steuerung und Fokussierung des Probendurchsatzes im Mikrofluidikchip.

Der Chip in Kombination mit dem mikrofluidischen Aufbau wurde in das am IPHT entwickelte inverse Mikroskop mittels eines Chiphalters eingesetzt (Abb. 3.1). Dieses war ausgestattet mit einem 785 nm multimode Diodenlaser für die Anregung der Proben. Für Messungen im mikrofluidischen Kanal wurde der Messpunkt kurz hinter den Fokus der Chipstruktur gelegt. Die Anregung und Signalerfassung erfolgte mittels eines 40x Objektivs. Um die Anregung jeder im Fluss befindlichen Zelle zu gewährleisten, wurde der Laserspotdurchmesser annähernd auf den Chipkanaldurchmesser

von 80  $\mu\text{m}$  angepasst. Jede Zelle konnte daher unabhängig von Ihrer Lage innerhalb des Kanals erfasst werden. Die Messzeit pro Spektrum betrug 25 ms und erfolgte im Einvernehmen mit der Auslesezeit der CCD des Spektrometers, deren maximale Ausleserate 17 Hz betrug. Die Strömungsgeschwindigkeit des Probenkanals wurde anschließend in Abstimmung auf die maximale Auslesefrequenz der CCD (*charge-coupled device*) so eingestellt, dass der maximale zeitliche Abstand zwischen zwei Spektren einer Bewegung der Probe um die Hälfte des Fokusbereichs entspricht. Folglich sollte jede Zelle detektiert werden können. Als Resultat ergab sich eine Durchflussgeschwindigkeit von 0.5 nl/sec. Die CCD wurde als kinetische Sequenz mit einem freilaufenden Trigger gelesen. Zudem filmte eine Kamera den mikrofluidischen Kanal und folglich den Zelldurchsatz. Beide, Film- und spektrale Aufnahmen, wurden parallel gestartet und wieder gestoppt und für weitere Analysen zusammen gefügt. Über ein computergesteuertes Spritzenpumpensystem wurden die zu detektierenden Zellen eingefüllt, zentriert und gezogen (Abb. 3.7). Da mit lebenden Zellen gearbeitet wurde, wurde der Chip mit Phosphatpuffer (PBS 0.1 % BSA) gefüllt. Messzeiten von 25 ms pro Zelle wurden realisiert.

In einem Vortest wurde die Zelllinie MCF-7 sowie Leukozyten aus einer humanen Blutprobe herangezogen. Zellsuspensionen der genannten Zellen wurden für 1 h mit anti-EpCAM funktionalisierten ISM ( $\text{OD}_{534\text{nm}} = 0.13$ ) inkubiert und dreimal mit PBS (0.1 % BSA) gewaschen (200 rpm, 5 min), um ungebundene ISM zu entfernen. Im Anschluss an die Inkubation wurden jeweils 100 MCF-7 Zellen und Leukozyten mit dem Raman-Spektrometer von Kaiser bei 785 nm Anregung und 1 s Messzeit pro Zelle gemessen (s. Abb. 4.38 auf Seite 86). Die Aufnahmen von ganzen, einzelnen und vitalen Zellen in einer Zellsuspension erfolgten mit einem Leica-Mikroskop (40x Objektiv). Dazu wurde eine einzelne Zelle fokussiert, der Laserfokus hatte dabei annähernd die Größe einer Zelle, welche dadurch vollständig gemessen werden konnte. Im Anschluss wurden zuerst Leukozyten und anschließend eine Mischung aus Leukozyten, MCF-7-Zellen sowie Polystyrolkugeln (als Modell für eine andere Zelllinie, da sie sich im Gegensatz zu Zellen optisch deutlich von den MCF-7-Zellen unterscheiden lassen) in den Mikrofluidikchip gefüllt und Raman-spektroskopisch gemessen (s. Abb. 4.39 auf Seite 87).



# 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Komponenten eines Immun-SERS-Markers

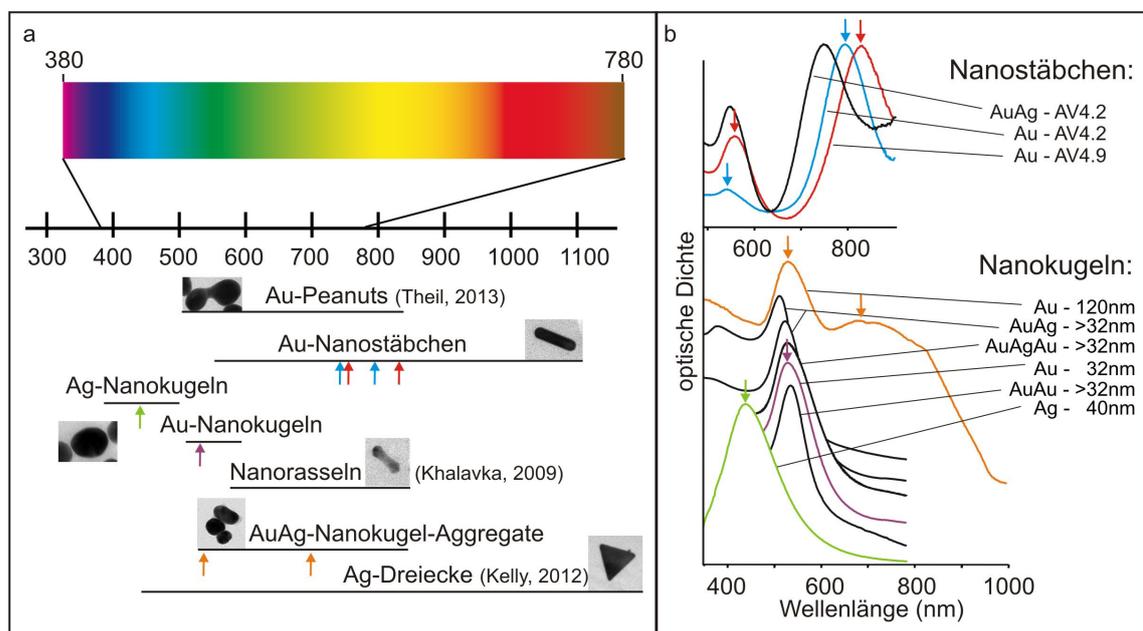
In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Komponenten eines Immun-SERS-Markers (ISM) beschrieben. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird näher darauf eingegangen.

ISM bestehen grundsätzlich aus einem Metallkern (Ag, Au, Cu), welcher in Form, Größe, Zusammensetzung und Beschaffenheit unterschiedlich gestaltet sein kann. Voraussetzung für die Erzeugung eines SERS-Signals ist, dass Nanopartikel kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichtes sind. Eine Schicht SERS-aktiver Moleküle (Raman-Reporter) in der Nähe einer metallischen Oberfläche ist notwendig für die Erzeugung des SERS-Signals. Dabei kommt es, über Adsorption oder chemische Bindungen, zur Bildung von selbstorganisierten Monolagen (SAM, *self assembled monolayer*). Für die Verstärkung des Raman-Effektes spielt der Molekülabstand zur Metalloberfläche eine bedeutende Rolle. Für die Erzeugung eines intensiven SERS-Signals sollten die Raman-Reporter-Moleküle der Nanopartikeloberfläche so nah wie möglich kommen und im besten Fall z.B. über Thiolgruppen kovalent gebunden sein. Für den Einsatz in unterschiedlichen Medien und um eine gute Stabilität zu gewährleisten, wird dieses Konstrukt meist durch bestimmte Strukturen aus Glas (Tetraethoxysilane) [102, 84], Proteinen [79] oder speziellen Polymeren [107] verstärkt. Eine Reihe von Antikörpern auf der äußeren Schale dient der Spezifität der ISM für den aktiven Nachweis definierter Proteine.

## 4.2 Charakterisierung von Nanopartikeln

Im Folgenden wurden diverse Au- und Ag-Nanopartikel sowie Verbindungen aus beiden Metallen für die Anregung mit einem 785 nm Laser getestet. Anhand physikalischer und chemischer Eigenschaften wie der Extinktion, der Intensität des SERS-Spektrums, der Stabilität, dem Handling sowie der Reproduzierbarkeit ihrer Synthese wurden die Nanopartikel charakterisiert. Aufgrund verschiedener Reduktionsmittel während der Kolloidsynthese, unterschiedlicher Konzentrationen, Medien, Metalleigenschaften, Stabilität (Neigung zur Aggregation), Größen und Oberflächenbeschaffenheit erwies sich der Vergleich unterschiedlicher Nanopartikel als ausgesprochen schwierig. Zudem mussten Tests mit verschiedenen Raman-Reportern durchgeführt werden, um die Ergebnisse besser deuten zu können. Neben kommerziellen Nanopartikeln, welche eine deutlich geringere Stabilität aufwiesen, wurden Nanopartikel aus Gold und/oder Silber wie z.B. Nanokugeln, Nanostäbchen, Nanodreiecke sowie Kern-Hülle-

Nanopartikel aber auch Sonderformen wie Au-Nanorasseln und Au-Nanopeanuts untersucht. Ag-Nanopartikel besitzen zwar bessere plasmonische Eigenschaften im Vergleich zu Au-Nanopartikeln, sind jedoch wesentlich anfälliger für Aggregationen. Anhand ihrer Absorptionseigenschaften vielversprechende Nanopartikel wie Ag-Dreiecke [108, 109], Au-Nanorasseln [110], Au-Nanopeanuts [111] und Au-Nanostäbchen (Abb. 4.1) sind bei longitudinaler Anregung eine gute Wahl, konnten jedoch aus Gründen der geringen Reproduzierbarkeit ihrer Synthese, ihres schlechten Handlings und ihrer geringen Stabilität nicht weiter bearbeitet werden. Zudem erschwerte das hochgiftige Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB), welches unter anderem zur Herstellung von Nanostäbchen verwendet wird, aufgrund kristalliner Ausfällungen die Bearbeitung der Proben. Wegen ihrer Absorptionseigenschaften eignen sich Au- und Ag-Nanokugeln nur bedingt zur Anregung mit einem nah-infraroten Laser (Abb. 4.1).



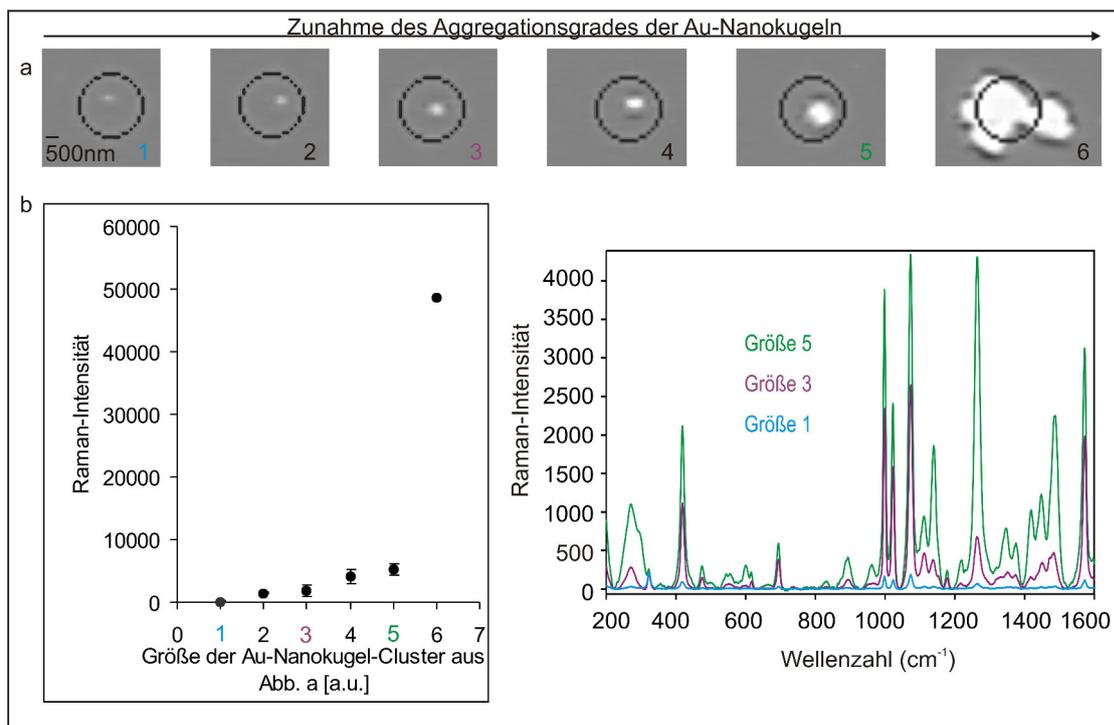
**Abbildung 4.1:** Übersicht über den Plasmonen-Resonanz-Wellenlängen Bereich (Absorptionsmaxima) unterschiedlich geformter Au- und Ag-Nanopartikel. Die farbigen Pfeile ordnen ausgewählte Plasmonen-Resonanz-Spektren aus Abb. b den entsprechenden Bereichen zu (a). Plasmonen-Resonanz Spektren von Au- und Ag-Nanopartikeln definierter Größe und Form. Die Pfeile markieren die Maxima ausgewählter Spektren und stimmen mit denen aus Abb.a überein (b).

Eine Aggregation von Au-Nanopartikeln führt zu einer Verschiebung der Anregungswellenlänge in den nah-infraroten Bereich (Abb. 4.1b) und zu einem Anstieg des Verstärkungsfaktors auf  $10^6$ - $10^8$  [112]. Wenn die Distanz von zwei oder mehr Nanopartikeln geringer als ihr Durchmesser ist, beeinflusst das Nahfeld eines Partikels die Plasmonenoszillation des anderen Nanopartikels. Es kommt zu einer Kopplung der Plasmonen und somit zu einer verstärkten Polarisierbarkeit. Ein intensiveres SERS-Signal ist die Folge. Dieses, sowie Stabilität, gutes Handling, gute visuelle

Charakterisierung und vor allem gute Chemisorption des Raman-Reporter-Moleküls sind wichtige Gründe, welche zur Auswahl der Au-Nanokugel-Aggregate führten.

Monodisperse Au-Nanokugeln lassen sich in definierter Größe (16–150 nm) in Abhängigkeit von der Natriumcitratkonzentration relativ leicht synthetisieren [103]. Eine Schwierigkeit lag in der kontrollierten Aggregation sowie der Auswahl einer geeigneten Größe der Au-Nanokugeln. Im Verlauf der Experimente erwiesen sich Nanokugeln mit einem Durchmesser von 45 nm (+/-10 nm) als geeignet. Kleinere Nanopartikel (<30 nm) aggregierten aufgrund ihrer größeren reaktiven Oberfläche sehr schnell und unkontrolliert, größere (>60 nm) hingegen waren nach der Aggregation zu schwer und sedimentierten. Zudem zeigten Aggregate aus 45 nm Au-Nanokugeln, in diesem Vergleich, die besten Ergebnisse bei SERS-Messungen.

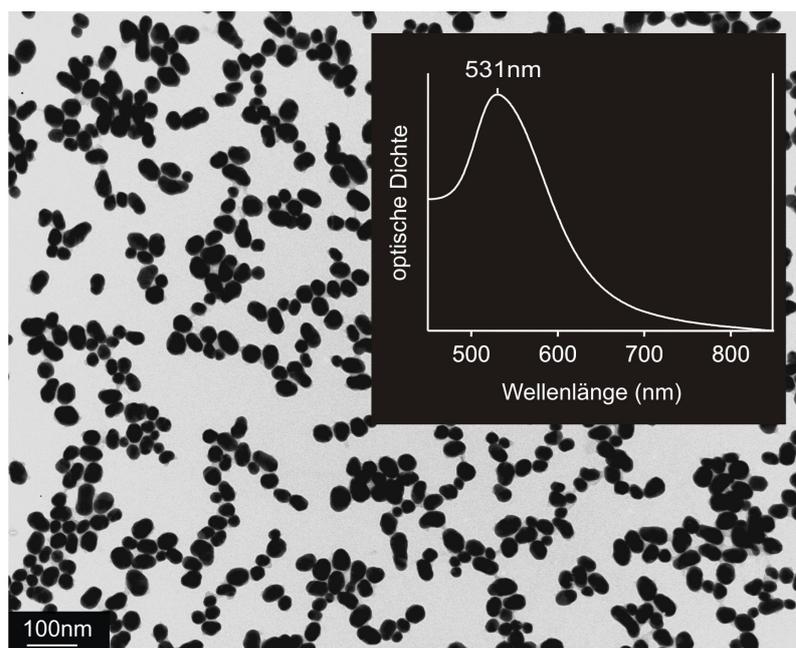
Die Signalintensität korreliert mit der Stärke der Aggregation. Messungen an eingetrockneten Au-Nanokugel-Aggregaten (Abb. 4.2a) zeigten eine Steigerung des SERS-Signals von Thiophenol mit zunehmender Größe der Au-Nanokugel-Aggregate (Abb. 4.2b). Wustholz et al. [112] fanden in diesem Kontext eine durchschnittliche Steigerung des elektromagnetischen Verstärkungsfaktors bei wachsender Aggregation



**Abbildung 4.2:** Dunkelfeldaufnahmen von Au-Nanokugel-Clustern unterschiedlicher Größe immobilisiert auf einem CaF<sub>2</sub> Objektträger (a). Intensität der SERS-Spektren in Abhängigkeit vom Aggregationsgrad der Au-Nanokugel-Cluster aus insgesamt 15 Messungen von 3 Proben. Die Größe der Aggregate wurde mit willkürlichen Einheiten von 1-6 (s. Abb. a) definiert. Ausgewählte SERS-Spektren einzelner repräsentativer Cluster unter Verwendung des Raman-Reporters Thiophenol und 1 s Messzeit (b).

der Nanokugeln von Dimeren ( $9.9 \times 10^7$ ) zu Pentameren ( $1.1 \times 10^8$ ). Eine weitere Aggregation der Nanopartikel und folglich die Zunahme von „hot spots“ führte zu keiner weiteren Erhöhung des Verstärkungsfaktors. Eigene Experimente zeigten eine Steigerung des SERS-Signals bei Au-Nanopartikel-Aggregaten, welche aus mehr als 5 Nanopartikeln zusammengesetzt waren (Abb. 4.2 vergleiche Proben 1-6). Die Ursache ergibt sich vermutlich aus der Summe der Nanopartikel bzw. der erzeugten SERS-Signale, welche ebenfalls zur Gesamtverstärkung beitragen. Die Lage der Plasmonenbande hängt zudem von der Geometrie der Aggregate ab. Größere Aggregate können wegen ihrer unregelmäßigen Struktur unabhängig von ihrer Position von allen Seiten effektiv angeregt werden. Die longitudinale Anregung von mehreren zusammenhängenden Nanopartikeln erfolgt dann im Gegensatz zu Dimeren wesentlich häufiger. Ein weiterer Grund liegt in der Verschiebung der Plasmonenbande hin zu längeren Wellenlängen. Wustholz et al. [112] zeigten weiterhin, dass die Größe des Spaltes zwischen zwei Nanopartikeln einen Einfluss auf die SERS-Intensität hat. Diesbezüglich wirken sich kleinere Abstände ( $d_{\text{Spalte}} < 0 \text{ nm}$ ) positiv auf die Plasmonenresonanz aus. Bei Spaltbreiten zwischen  $-0.5$  und  $+1 \text{ nm}$  variiert der Verstärkungsfaktor um zwei Größenordnungen.

Die für die Experimente genutzten Au-Nanokugeln stammen aus unterschiedlichen Ansätzen, welche alle nach Einstellung der Raman-Reporter Konzentrationen ver-



**Abbildung 4.3:** TEM-Bild nach der Synthese der Au-Nanokugeln mit einem mittleren Durchmesser von 45 nm. Wenige herstellungsbedingte Dimere und Trimere lassen sich bei starker Vergrößerung durch das Fehlen eines kleinen Spaltes zwischen den Nanopartikeln von nur zusammen gelagerten Nanopartikeln unterscheiden. Absorptionsspektrum einer wässrigen Au-Nanokugel-Suspension mit einem Maximum von 531 nm.

wendet werden konnten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden für die einzelnen Versuche jeweils Nanopartikel aus dem gleichen Ansatz herangezogen. Ihre durchschnittliche Größe von 45 nm wurde durch TEM-Messungen (Abb. 4.3) bestätigt. [112]. Koaleszente Nanokugeln sind daher von großer Bedeutung für die Erreichung maximaler SERS-Verstärkung. Dieser Wert entspricht einem Absorptionsmaximum von 531 nm (Abb. 4.3). Mit Hilfe der für die Synthese verwendeten Stoffmengen sowie dem bekannten Durchmesser von 45 nm konnte eine theoretische Konzentration von  $2 \cdot 10^{11}$  Au-Nanokugeln/ml berechnet werden. Die Geometrie der Au-Nanokugeln ist anisotrop und infolgedessen bestens für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie geeignet. Moleküle, die auf diesen Partikeln adsorbiert oder kovalent gebunden sind, zeigen eine höhere Verstärkung als es bei isotropen Nanopartikeln der Fall ist („lightning-rod-effect“).

## 4.3 Ein Vergleich der SERS-Aktivität von Nanopartikeln

Für einen effektiven Vergleich von Nanopartikeln wurden verschiedene Raman-Reporter getestet. Eine Auswahl der SERS-Spektren ist im Anhang B dargestellt. Die im folgenden Text angegebenen Nummern verweisen auf einzelne Spektren in diesem. Dabei werden immer Spektren aus parallel angefertigten Proben verglichen. Eine Stabilisierung zur Verhinderung von Aggregationen nach Zugabe des Raman-Reporters wurde nicht vorgenommen. Für einen Vergleich wurden verschiedene Nanopartikel mit dem gleichen Raman-Reporter unter identischen Bedingungen (Zeit, Konzentration, Temperatur) inkubiert. Messungen erfolgten mit dem Raman-Spektrometer von Kaiser mit 1 s Messzeit bei 40 mW Laserleistung kurz nacheinander. Küvetten mit einem definierten Durchmesser (Abb. 3.4) ermöglichten die gleiche Eindringtiefe des Lasers in die Probe. Für einen direkten Vergleich der SERS-Spektren wurden die Basislinien korrigiert und die Spektren-Intensitäten verglichen. Im Allgemeinen lässt sich folgende Tendenz der Nanopartikel bei Anregung mit 785 nm erkennen.

AuAg-Kern-Hülle-Nanokugeln zeigen oft bessere Verstärkungen als andere Kern-Hülle-Nanokugeln (AuAu (15a/d, 18a/d, 24a/d), AgAu (15a/b), AuAgAu (18a/b, 24a/b)) oder pure Au- (6a/d, 12a/b, 18a/c, 22, 24a/c, 25a/c) und Ag-Nanokugeln (12a/d, 15a/c, 25a/g). Ähnliche Eigenschaften konnten bei Nanostäbchen nachgewiesen werden. Hier zeigten AuAg-Nanostäbchen im Vergleich zu Au-Nanostäbchen deutlich bessere Signale (s. Kapitel 4.6, Abb. 4.16b). Daneben erzeugen AuAg-Nanorasseln stärkere Signale als Au-Nanorasseln (13). Vermutlich lässt sich dies auf die besseren plasmonischen Eigenschaften des Ag zurückführen, da die Durchlässigkeit dieses Metalls für elektrische Felder höher ist (dielektrische Leitfähigkeit). Zudem führt der Au-Kern im Gegensatz zu reinen Ag-Nanokugeln zu einer stärkeren Verschiebung des Absorptionsmaximums zu längeren Wellenlängen (s. Kapitel 4.2, Abb. 4.1 b). Reine Au-Nanokugeln zeigen ebenfalls wegen ihrer zu höheren Wellenlängen

verschobenen Absorptionsbande (s. Kapitel 4.2, Abb. 4.1 b) höhere Verstärkungen als Ag-Nanokugeln (12b/d, 21, 25f/h).

Während des Vergleiches wurde geschaut, ob Unterschiede in der Nanopartikelgröße einen zusätzlichen Einfluss auf die Signalstärke haben. Da sich mit zunehmender Größe der Nanokugeln das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenzahlen hin verschiebt, liegt die Annahme nahe, dass auch das SERS-Spektrum bei Anregung im nah-infraroten Bereich intensiver wird. Nach der Zugabe des Raman-Reporters zeigten sich jedoch unabhängig von der Größe der Nanokugeln unterschiedlich starke SERS-Signale (1, 2, 4, 7-10, 12c/d, 17, 19, 20, 23, 25g/h/i). Die Messergebnisse zeigten, dass der Raman-Reporter einen weitaus stärkeren Einfluss als die Größe der Nanokugeln auf das SERS-Signal hat. Die Stabilität der Nanokugeln sinkt mit steigender Konzentration des Raman-Reporters. Folglich steigt die Tendenz der Nanokugeln zu aggregieren. Bei einem Vergleich der SERS-Spektren wird deutlich, dass größere Nanokugeln ( $\geq 60$  nm) stabiler sind und weniger stark aggregieren. Sie zeigen daher ein geringeres SERS-Signal als kleinere Nanokugeln ( $\leq 30$  nm) welche weniger stabil sind und stärker aggregieren (12c/d, 20, 25g/h/i). Die Ursache liegt hier in der größeren reaktiven Oberfläche kleinerer Nanopartikel im Vergleich zu ihrem Volumen (größere Zahl an Oberflächenatomen) zudem besitzen die Oberflächenatome weniger Bindungspartner als Atome im Nanopartikel-Inneren. Dies führt dazu, dass kleinere Nanopartikel reaktiver sind als größere Partikel.

Zusätzlich konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Raman-Reportern beobachtet werden. Die Ergebnisse standen im Widerspruch zu den vorherigen. So zeigten sich teilweise intensivere SERS-Spektren auch unter Verwendung größerer Nanokugeln (2, 4, 7, 8, 17). Ein Grund hierfür scheint das leichtere Ausfällen kleinerer Nanokugeln zu sein, welche dadurch der SERS-Messung nicht mehr zur Verfügung stehen. Solche Ausfällungen sind deutlich auf den Boden des Reaktionsgefäßes bzw. durch eine Farbänderung der Probe zu erkennen. Trotz gleicher Raman-Reporter-Konzentrationen führten manche deutlich stärker zur Aggregation der Nanokugeln als andere.

Da größere Nanokugeln meist wenig und kleinere oft stark aggregierten, lieferten mittelgroße Nanokugeln ( $45 \pm 15$  nm) häufig das beste SERS-Signal (1, 9, 10, 19, 23). Zudem sind sie für weitere Bearbeitungen noch recht stabil. Fazit ist, dass weniger die Größe der Nanopartikel entscheidend für das SERS-Signal ist, sondern eher die Stärke der Aggregation.

Natürlich werden diese Prozesse wesentlich von der Art des Metalls, Ag ist deutlich instabiler als Au, sowie vom Herstellungsverfahren (Reduktionsmittel) und der Konzentration des Raman-Reporters beeinflusst.

Nanorasseln und Nanostäbchen haben zwar ideale Absorptionseigenschaften für die Anregung mit 785 nm, ihre Verstärkungen liegen aber meist unterhalb der von Nanokugel-Aggregaten (16c/d, 25a-e, 26a-c). Bei den getesteten Au-Nanostäbchen erwiesen sich die mit einem Seitenverhältnis ( $AV = \text{Aspect Ratio}$ ) von 4.2 als effizienter (3, 25d/e), da sie eine bessere Absorption bei Anregung mit 785 nm im Vergleich zu Nanostäbchen mit einem AV von 4.9 besitzen (s. Kapitel 4.2, Abb. 4.1b). Die teilweise schlechteren Resultate bei Verwendung der Nanorasseln im Vergleich zu Nanostäbchen (26b/c) beruhen auf einer geringeren Konzentration dieser. TEM

Bilder der Proben zeigen, dass sich nur aus einem geringen Teil der Nanopartikel Nanorasseln gebildet haben (Abb. 4.4).

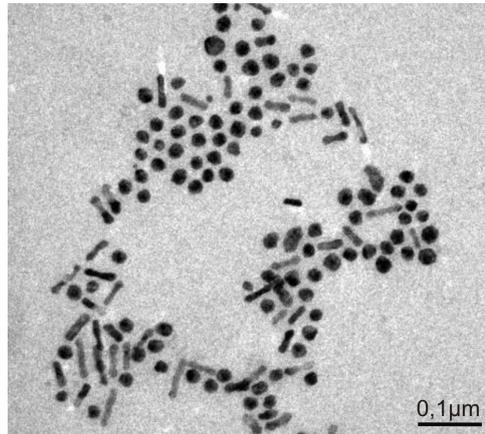


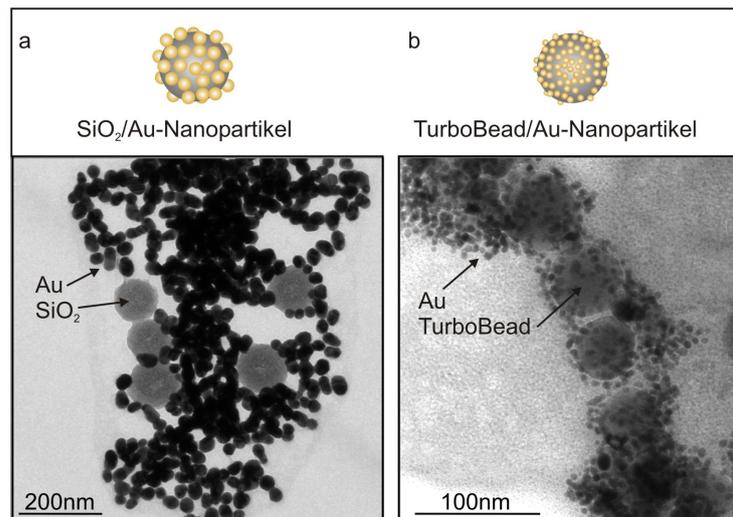
Abbildung 4.4: TEM Bild von AuAg-Nanorasseln.

## 4.4 Kontrollierte Aggregation von Au-Nanokugeln

Für die Anregung der Au-Nanokugeln mit einem 785 nm Laser mussten diese mittels Aggregation auf diesen Wellenlängenbereich angepasst werden. Diesbezüglich erfolgten Versuche Strukturen mit ähnlichen Absorptionseigenschaften herzustellen, welche sich für diese Anwendungen als wenig reproduzierbar und effizient herausstellten. Beispielsweise sollten mit Au-Nanokugeln umhüllte Siliciumdioxidpartikel beerenartige Strukturen bilden (Abb. 4.5a).

Die Bindung wurde mit Hilfe von Aminogruppen auf der Oberfläche der Siliciumdioxidpartikel realisiert, da diese eine hohe Affinität zu Gold haben und über eine koordinative Bindung des Stickstoffs an dieses binden können. Die nah beieinander liegenden Au-Nanokugeln sollten über eine Erhöhung des elektromagnetischen Feldes das Raman-Signal verstärken. TEM-Aufnahmen dieser Konstrukte zeigten eine Gesamtgröße zwischen 70 und 100 nm sowie eine sehr inhomogene bis spärliche Verteilung der Au-Nanokugeln auf den  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln (Abb. 4.5a). Derselbe Versuch wurde anstatt mit Siliciumdioxidpartikeln mit magnetischen Nanopartikeln (50 nm, TurboBeads=metallische Nanopartikel umhüllt mit Graphit und Aminofunktionalisiert) durchgeführt, mit dem Vorteil der Separation durch einen Magneten für Waschstufen während der Synthese bzw. für eine spätere Anreicherung der daran gebundenen Zellen. Die Ergebnisse waren vielversprechend, da es zu einer guten Anbindung der TurboBeads kam (Abb. 4.5b). Leider führten die magnetischen Wechselwirkungen der TurboBeads zur Zusammenlagerung der Partikel, was weitere Bearbeitungen beziehungsweise Messungen erschwerte.

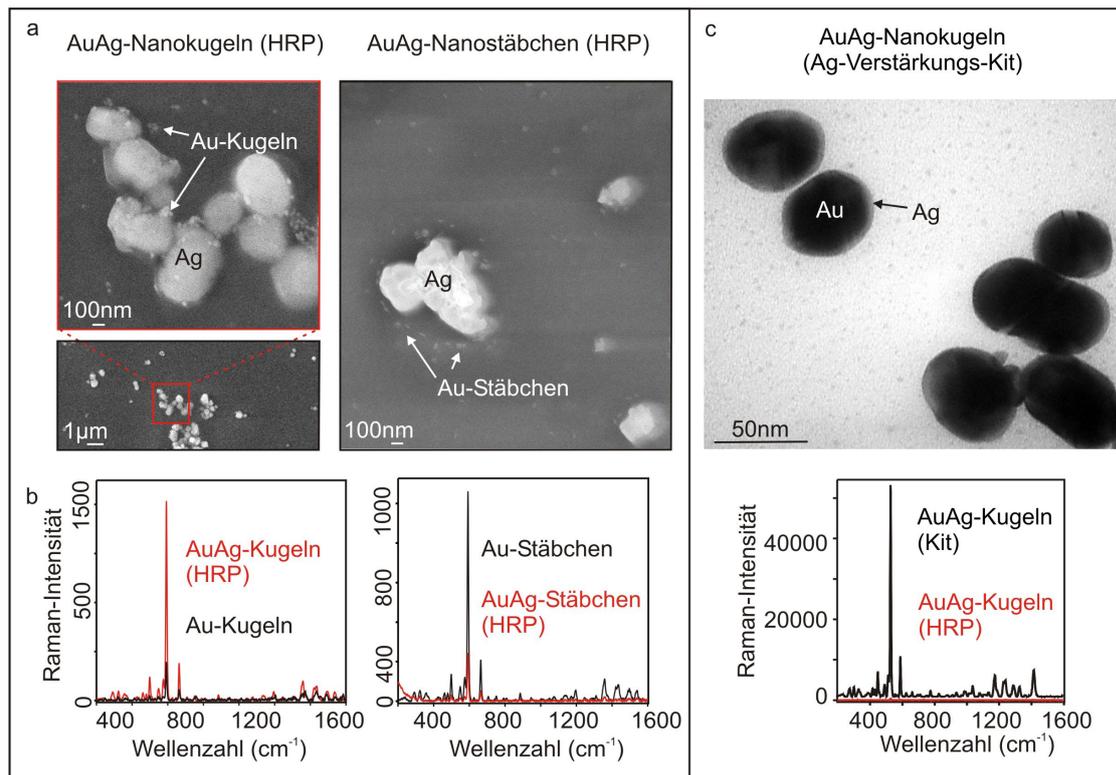
In einem anderen Versuch sollte die Silberhülle der Au-Nanokugeln und Au-Nanostäbchen in ihrer Struktur verändert werden. Das Enzym Meerrettichperoxidase



**Abbildung 4.5:** Graphische Darstellung der erwünschten Zielstruktur der Nanopartikel Konstrukte. TEM Aufnahmen der Ergebnisse: Siliciumdioxidpartikel umgeben von Au-Nanokugeln (a) und magnetische Nanopartikel (TurboBeads) eingehüllt von Au-Nanokugeln (b).

(HRP, *horseradish peroxidase*) katalysiert die Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber. Dabei werden Wüstenrosen-ähnliche Strukturen aus Silber erzeugt [113, 114]. Entsprechende Strukturen sind ideale Antennen und können aufgrund des „lightning-rod-effects“ das SERS-Signal verstärken. Nach der Adsorption des Enzyms HRP auf den Au-Nanokugeln erfolgte die Zugabe des EnzMet-Kits von Nanoprobes gemäß des Herstellerprotokolls. Die enzymatische Reaktion verlief sehr intensiv und innerhalb weniger Sekunden. Einige Au-Nanopartikel wurden vom Silber umschlossen und wuchsen zu größeren Konstrukten heran, welche wesentlich größer als die Au-Nanopartikel selbst waren (Abb. 4.6a). Eine Verringerung der Größe ließ sich nicht realisieren. SERS-Messungen in Suspension zeigten eine Steigerung des Signals nach der Silberreduktion bei Au-Nanokugeln und sogar eine Verschlechterung bei Au-Nanostäbchen (Abb. 4.6b). Da die gleiche Menge an Silbernitrat hinzu gegeben wurde, scheinen hier veränderte plasmonische Eigenschaften aufgrund der Kombination unterschiedlicher Nanopartikel eine Rolle zu spielen. Unter Verwendung des Silberverstärkungs-Kits von BBI international zeigten Au-Nanokugeln deutlich bessere SERS-Verstärkungen als bei Verwendung der HRP (Abb. 4.6c), da es hier nicht zur Verklumpung der Nanopartikel durch das Silber kam. Im Gegensatz zu den großen Strukturen (HRP) bildete sich mit dem Silberverstärkungs-Kit eine dünne Silberhülle um die Nanopartikel aus.

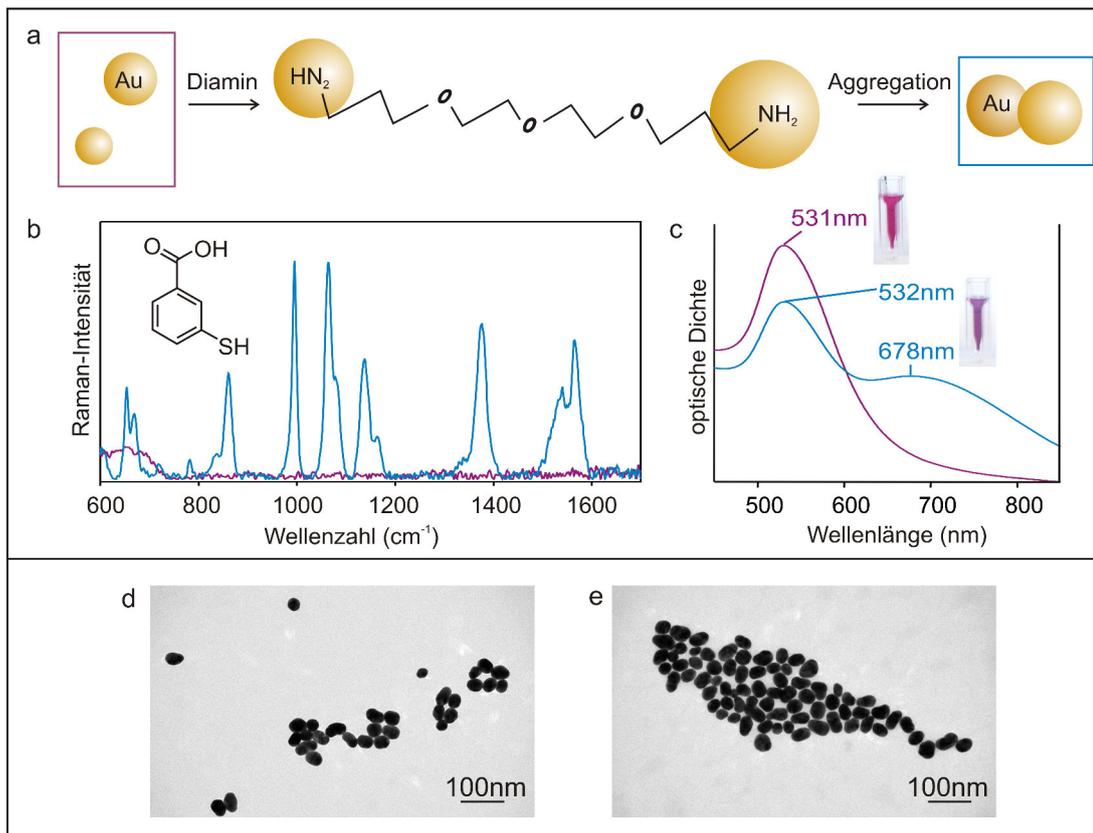
Des Weiteren erfolgten Versuche zur kontrollierten Aggregation von 45 nm großen Au-Nanokugeln mit Linkermolekülen. Um die spätere Anbindung von Raman-Reporter-Molekülen zu gewährleisten, müssen freie Bindungsstellen auf der Metalloberfläche zur Verfügung stehen. Daher konnten geeignete zur Aggregation führende Stoffe nur in sehr geringen Mengen zugesetzt werden. Zudem durften entsprechende Moleküle nach



**Abbildung 4.6:** REM Aufnahmen von Au-Nanokugeln und Au-Nanostäbchen nach der enzymatischen Silberabscheidung mittels HRP (a). SERS-Spektren einer wässrigen Suspension derselben Proben mit dem Raman-Reporter Nilblau vor (schwarz) und nach (rot) der Silberabscheidung ( $t=1$  s,  $P=40$  mW, 10x Objektiv) (b). Vergleich der SERS-Spektren von Au-Nanokugeln nach der Silberabscheidung mittels HRP (rot) und unter Verwendung eines Silberverstärkungs-Kits (schwarz) sowie eine entsprechende TEM-Aufnahme dieser Probe. AuAg-Nanokugeln zeigen unter Verwendung des Ag-Verstärkungs-Kits deutlich bessere SERS-Signale (c). ( $t=1$  s)

deren Konjugation auf der Metalloberfläche keine SERS Verstärkung zeigen. Primäre Amine und Thiole haben eine hohe Affinität zu Gold und eignen sich daher für diese Anwendung. Das Linkermolekül sollte aus diesem Grund endständig je eine Amino- oder Thiolgruppe aufweisen, um jeweils zwei Au-Nanokugeln miteinander verbinden zu können. Da die metallische Oberfläche ungleichmäßig ist, muss das Molekül linear und langkettig sein, um eine Kopplung zu ermöglichen. Eine kontrollierte Aggregation der Au-Nanokugeln konnte mittels des linearen sowie hydrophilen Moleküls 4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin, welches endständig jeweils eine primäre Aminogruppe besitzt, realisiert werden (Abb. 4.7a). Eine Aufnahme des SERS-Spektrums zeigt, dass erst nach Aggregation der Au-Nanokugeln mittels des Linkermoleküls Banden des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure zu erkennen sind (Abb. 4.7b).

Die Aggregation der Nanopartikel war sehr erfolgreich. Sie führte zu einer Veränderung des Absorptionsquerschnittes zu längeren Wellenlängen hin (Abb. 4.7c). Das Absorptionsspektrum weist zwei Hauptabsorptionsbanden bei 532 nm sowie

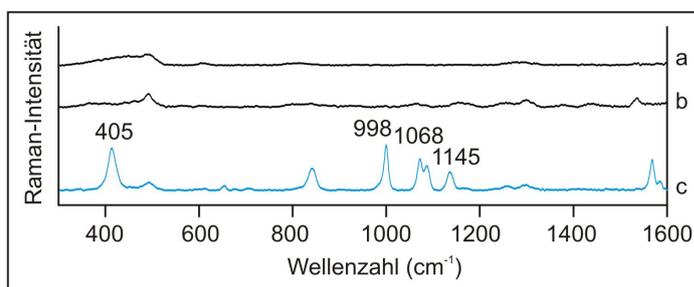


**Abbildung 4.7:** Graphische Darstellung der Aggregation von Au-Nanokugeln mittels 4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin (a), SERS-Spektren des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure (b) ( $t=1$  s,  $P=40$  mW, 10x Objektiv) sowie Absorptionsspektren (c) derselben Proben vor (lila) und nach (blau) der gezielten Aggregation. TEM-Aufnahmen der Au-Nanokugeln vor (d) und nach (e) der Aggregation.

bei 678 nm auf und liefert dadurch eine Aussage über die Größenverteilung der Aggregate (Abb. 4.7c). Im Vergleich hierzu zeigen einzelne unbearbeitete Au-Nanokugeln ein Absorptionsmaximum von 531 nm und eine durchschnittliche Größe von 45 nm. Hierbei kann es sich um Monomere und Polymere handeln (Abb. 4.3), wobei letztere wegen ihrer Lage zum eingestrahlt Licht nicht als solche erkannt werden können. Nur bei einer longitudinalen Ausrichtung ist dies möglich. Trotz Aggregation der Au-Nanokugeln und verschiedener Arten von Umhüllungen (mit Polymeren, Raman-Reportern und Silanen) werden immer wieder Absorptionswerte nahe diesem gemessen. Die Kurve der zweiten Bande ( $Abs_{max}=678$  nm) hingegen ist typisch für aggregierte Au-Nanokugeln. Diese zeigen eine gute SERS-Verstärkung bei Anregung im nah-infraroten Bereich [115, 116] mit 785 nm. Die guten plasmonischen Eigenschaften der Aggregate beruhen auf Lücken zwischen den Nanopartikeln, in welchen eine elektromagnetische Feldverstärkung zu beobachten ist. Die Stärke solcher so genannten "hot spots" [117, 83] hängt unter anderem von der Spaltbreite und Form der Nanopartikel ab [112]. Kurze Messzeiten bis zu wenigen Millisekunden

von an der Goldoberfläche adsorbierten Molekülen (Monolagen) resultieren daraus. Die Absorptionseigenschaften werden unter anderem von der Größe, Form, Aggregationsgrad, Größenverteilung und der Ausrichtung der Au-Nanokugel-Aggregate während der Messung bestimmt. Infolge dessen kann das Maximum des Absorptionsspektrums von Ansatz zu Ansatz und von Messung zu Messung leicht (um wenige nm) variieren. Eine optische Darstellung der Aggregate mittels TEM war für eine effektive Auswertung nicht nutzbar, da nicht zwischen Aggregaten und zusammen gelagerten Nanopartikeln differenziert werden kann (Abb. 4.7d, e).

Um spektrale Beiträge des über eine koordinative Bindung an die Goldoberfläche angelagerten primären Amins (4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin) zu vermeiden, wurde die Konzentration dieses Linkermoleküls so gering wie möglich gehalten. Die Raman-aktive CN-Valenzschwingung wäre möglicherweise sonst im Bereich von  $1065\text{ cm}^{-1}$  bis  $1090\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Eine Konzentration, die nahe einer theoretischen Monolage dieses Moleküls auf der Metalloberfläche liegt, erzielte deutliche Ergebnisse und zeigte keine störenden spektralen Beiträge des Linkermoleküls (Abb. 4.8). Dabei muss erwähnt werden, dass die stark reaktiven primären Amine an die Innenwände der Reaktionsgefäße binden und der Reaktion deshalb nicht mehr zur Verfügung stehen. Der Raman-Reporter 3-Mercaptobenzoessäure zeigte hingegen deutliche SERS-Banden. Eine Verstärkung anderer Banden wurde nicht beobachtet. Geringere Konzentrationen des Linkermoleküls spiegelten sich in geringeren bis fehlenden SERS-Signalen wieder, höhere Konzentrationen führten zur Präzipitation (Ausfällung) der Nanopartikel. Eine effektive Konjugation des Diamins an die Au-Nanokugeln und somit deren Aggregation wurde durch eine Erhöhung der Dichte der Au-Nanokugeln unterstützt.



**Abbildung 4.8:** Raman-Spektren von einzelnen Au-Nanokugeln (a), von Au-Nanokugeln nach der Aggregation durch das Diamin 4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin (b) sowie nach Zugabe des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure (c) ( $t=1\text{ s}$ ,  $P=40\text{ mW}$ ,  $10\times$  Objektiv).

Ansammlungen von Au-Nanokugel-Aggregaten, die eine bestimmte Größe überschreiten, sedimentieren aufgrund ihrer Masse sehr schnell und können daher für die Arbeit mit Zellen nicht genutzt werden. Um Verunreinigungen sowie größere Aggregate zu entfernen, wurde daher ein Spritzenvorsatzfilter aus Polyethersulfon (PES, Porengröße ca.  $220\text{ nm}$ ) herangezogen. Dieser gewährleistet einen geringen Probenverlust durch Vermeidung der Adsorption der Nanopartikel an der Filtermembranen, ist hydrolysefest und chemisch beständig. Um die Aggregation zu stoppen, wurden

die Au-Nanokugeln mit Polymeren stabilisiert, worauf unter anderem im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

### 4.5 Eigenschaften von Raman-Reporter-Molekülen

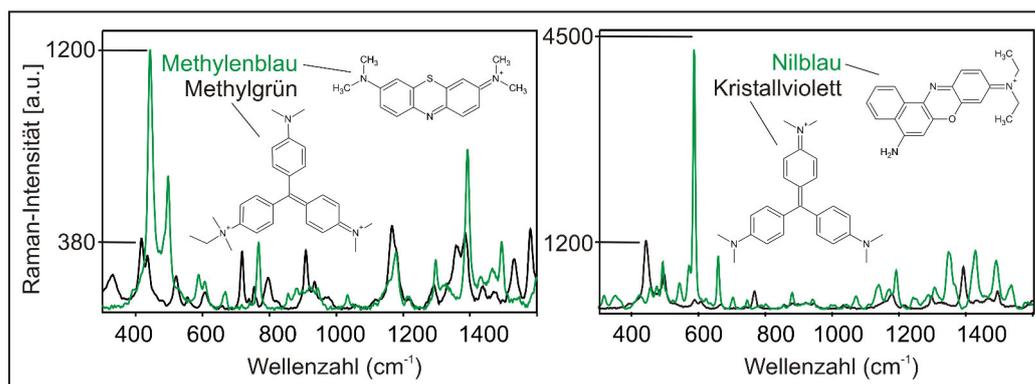
Die Intensität des SERS-Signals ist stark von der Art des Raman-Reporter-Moleküls bzw. dessen Affinität zur Oberfläche des metallischen Nanopartikels abhängig. Die Herstellung von stabilen Molekül-Gold-Komplexen hängt von mehreren Wechselwirkungen ab. Solche Komplexe können entweder über eine elektrostatische Anziehung zwischen den negativ geladenen Au-Nanopartikeln und den reichlich positiv geladenen Reporter-Molekülen oder mittels einer Adsorption hydrophober Strukturen der Reporter-Moleküle gebildet werden. Zudem sind chemische Bindungen wie beispielsweise eine kovalente Bindung von freien Thiolgruppen des Moleküls an Gold möglich.

Bei der Adsorption von Molekülen auf einer Metalloberfläche erhält man kein gleichmäßig verstärktes Raman-Spektrum, da sich die Auswahlregeln ändern. Dies geschieht aufgrund der Lage des Moleküls zur Oberfläche, welche je nach Art des Moleküls unterschiedlich ist. Es ergeben sich Änderungen der Intensitätsverhältnisse der Banden [118]. Die Adsorptionsgeometrie des Raman-Reporters sowie die Art der Metalloberfläche und folglich deren Verstärkungseffekte können die Intensitätsverhältnisse beeinflussen [119].

Eine Chemisorption von Molekülen an Metalloberflächen kann die Polarisierbarkeit des Moleküls beeinflussen und folglich zu einer weiteren Verstärkung des Raman-Spektrums beitragen. Ein solcher Verstärkungsmechanismus beruht auf der Übertragung von Ladungen zwischen dem Metall und dem chemisch adsorbierten Molekül [120, 121]. Bei solchen „*Charge-Transfer-Komplexen*“ kommt es zu einem Ladungstransfer, bei welchem das Molekül resonant mit der Anregungswellenlänge ist und folglich zu einem erhöhten Raman-Streuquerschnitt führen kann.

Bei anfänglichen Tests wurden Farbstoffe als Raman-Reporter verwendet. Bei diesen zeigten sich deutliche Unterschiede im SERS-Spektrum. Stark positiv geladene Farbstoffe wie Nilblau, Methylenblau, Methylgrün und Kristallviolett lieferten zum Teil sehr gute SERS-Intensitäten an 70 nm großen Au-Nanokugeln (Abb. 4.9), was auf eine starke Aggregation der Citrat-stabilisierten und folglich negativ geladenen Au-Nanokugeln zurückzuführen ist. Die stark positiv geladenen Farbstoffe führen zu einer Annäherung der auf der Oberfläche negativ geladenen Nanopartikel. Dies führt zur Aggregation dieser, welche mit der Farbstoffkonzentration zunimmt. Das beste SERS-Signal lieferte Nilblau, welches sich anhand der hohen Affinität der Aminogruppe zu Gold und der Bildung einer koordinativen Bindung des Stickstoffs zu Gold („*Charge-Transfer-Komplex*“) erklären lässt. Diese relativ schwache Bindung hat sich vermutlich wieder gelöst, da nach der Synthese der Siliciumdioxid-Hülle kein SERS-Signal mehr nachzuweisen war.

Die Spektren-Intensität war bei den unterschiedlichen Farbstoffen und Nanopartikeln von so vielen Faktoren abhängig (Raman-Reporter: funktionelle Gruppen,

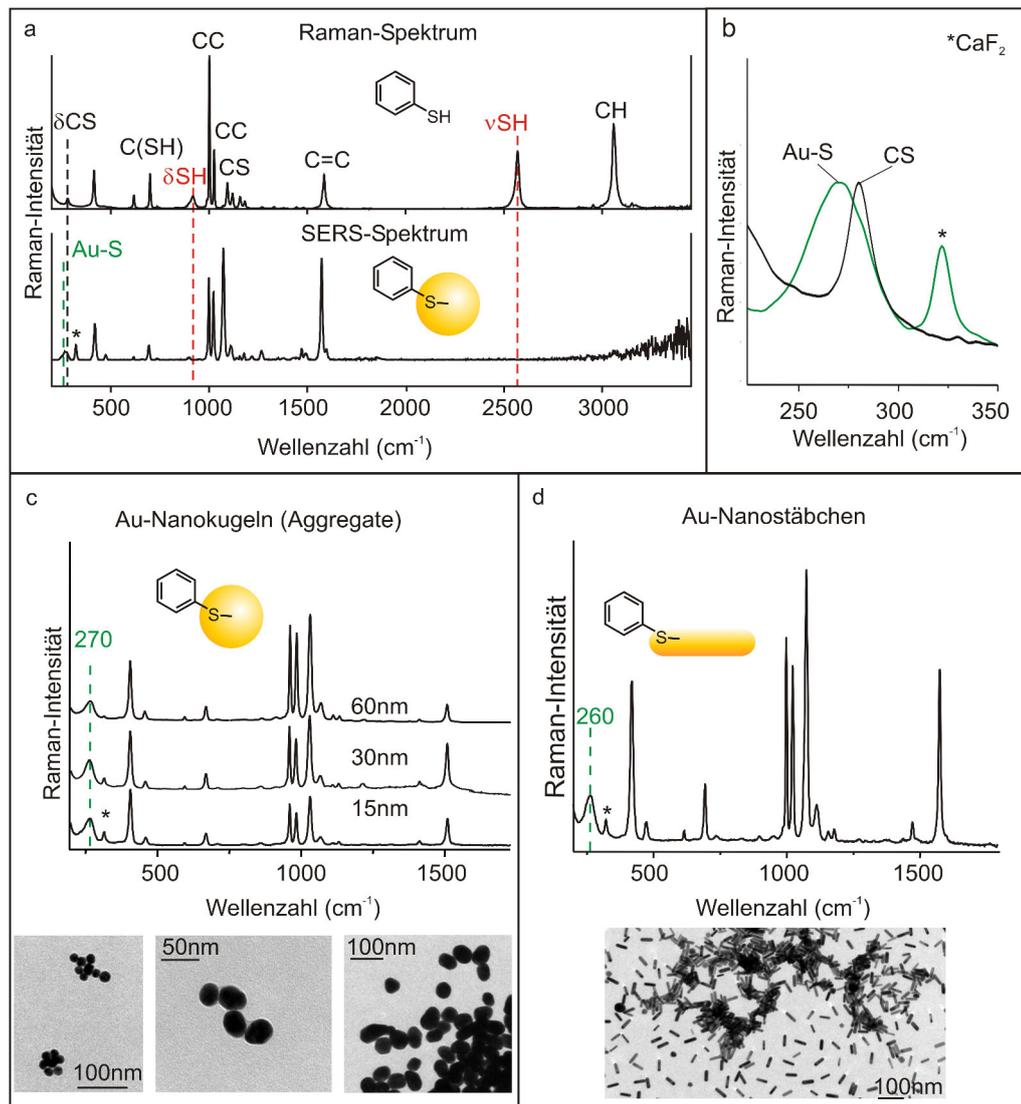


**Abbildung 4.9:** SERS-Spektren von verschiedenen Raman-Reportern (Farbstoffen) nach Inkubation mit 70 nm großen Au-Nanokugeln.

Molekülladung, Konzentration bzw. Nanopartikel: Art des Metalls, Form, Größe, Reduktionsmittel, Konzentration etc.), dass weiterhin keine einheitliche Aussage getroffen werden konnte. Raman-Reporter zeigten in Kombination mit verschiedenen Nanopartikeln mal gute SERS-Intensitäten und mal schlechte. Teilweise konnten Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Es ließ sich kein eindeutiges Schema erkennen. Fest stand jedoch, dass die molekularen Eigenschaften der Raman-Reporter sowie die Ladung und chemischen Eigenschaften der Nanopartikel, sowohl die Anregungswellenlänge und das Medium einen hohen Einfluss haben. Für eine genauere Betrachtung wurden Versuche mit relativ kleinen und einfach gebauten aromatischen Thiolen durchgeführt. Diese werden im Folgenden beschrieben und diskutiert.

Eine chemische Bindung („*Charge-Transfer-Komplex*“) bildet sich zwischen der funktionellen Gruppe des Raman-Reporter-Moleküls (z.B. Thiol- und Aminogruppen) und der Metalloberfläche aus, wobei die Affinität von Thiolgruppen gegenüber Aminogruppen zu Edelmetallen, insbesondere zu Gold, erhöht ist. Aminogruppen bilden eine relativ schwache koordinative Bindung aus, während bei Thiolgruppen eine starke Thiolat-Au-Bindung (kovalente Bindung) vorliegt. Ein spontaner Aufbau selbstorganisierender Monolagen (*self assembling monolayers*, SAM) des entsprechenden Raman-Reporters ist die Folge einer chemischen Bindung. Monolagen weisen insbesondere bei Thiolgruppen eine höhere Dichte auf. Chemische Bindungen lassen sich unter anderem anhand einer Verschiebung der Raman-Banden sowie Änderungen in den Intensitätsverhältnissen der Banden zueinander erkennen. Ein deutlicherer Nachweis lässt sich anhand des Fehlens der S-H-Deformations- und Streckschwingung ( $\delta\text{SH}$  und  $\nu\text{SH}$ ), was am Beispiel des Raman-Reporters Thiophenol zu erkennen ist, liefern (Abb. 4.10a).

Ein sehr gutes Indiz ist ebenfalls das Auftreten einer neuen Bande, der Gold-Schwefel (Au-S) Bande. Bei einer erfolgreichen Anbindung des Raman-Reporters, also einer Chemisorption an die Goldoberfläche von Au-Nanokugel-Aggregaten (aus 45 nm großen Au-Nanokugeln), wird diese Bande im SERS-Spektrum sichtbar. Sie erscheint bei  $270\text{ cm}^{-1}$  und ist ein Indiz für die erfolgreiche Konjugation des Moleküls Thiophenol an die Au-Oberfläche.

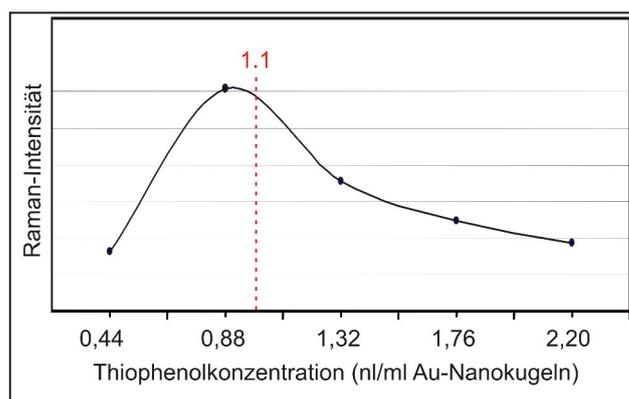


**Abbildung 4.10:** Raman-Spektrum von Thiophenol und SERS-Spektrum von Thiophenol auf Au-Nanokugel-Aggregaten mit 10 s bzw. 1 s Messzeit. Das Erscheinen der Au-S Bande und Verschwinden der S-H Banden ist dargestellt (a). Vergrößerte Darstellung der Raman-Bande C-S bei ( $280 \text{ cm}^{-1}$ ) und der Au-S Bande ( $270 \text{ cm}^{-1}$ ) des SERS-Spektrums nach Konjugation des Raman-Reporters (b). SERS-Spektren des Raman-Reporters Thiophenol nach Chemisorption an Au-Nanokugel-Aggregaten sowie die entsprechenden TEM-Aufnahmen von 15 nm, 30 nm und 60 nm großen Au-Nanokugeln (c). SERS-Spektren des Raman-Reporters Thiophenol nach Chemisorption an Au-Nanostäbchen sowie die entsprechende TEM-Aufnahme dieser Probe (d). Die mit einem Stern (\*) gekennzeichnete Bande stammt vom Calciumfluorid-Objektträger.

Im Raman-Spektrum von Thiophenol zeigt sich eine „*out-of-plane*“ Deformations-schwingung von C-S, sichtbar bei  $280\text{ cm}^{-1}$ . Diese Raman-Bande ist nach erfolgreicher Konjugation des Raman-Reporters nur noch als kleine Schulter erkennbar (Abb. 4.10b). Bei verschiedenen großen Au-Nanokugeln liegt sie um  $270\text{ cm}^{-1}$  und bei Au-Nanostäbchen um  $260\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 4.10c, d). Diese Unterschiede beruhen auf einer Änderung der Ausrichtung der Raman-Reporter-Moleküle zur Goldoberfläche unterschiedlich geformter und stabilisierter Nanopartikel. Deshalb variiert die Au-S-Bande je nach der Art des Raman-Reporter-Moleküls und Nanopartikels leicht.

Eine Chemisorption des Raman-Reporters auf der Goldoberfläche führte neben der elektromagnetischen Verstärkung auch zu einer chemischen Verstärkung und leistet damit einen Beitrag für ein intensiveres SERS-Signal. Da die Gesamtverstärkung sich aus dem Feldverstärkungsfaktor für die Anregungsstrahlung und dem für die Raman-Streustrahlung zusammensetzt und beide Felder nur in einem sehr schmalen Frequenzbereich in Resonanz zu den Oberflächenplasmonen des Metallpartikels stehen können, zeigen hochfrequente Schwingungen, z.B. C-H-Streckschwingungen im Bereich von  $3000\text{ cm}^{-1}$  im SERS-Spektrum deutlich geringere Intensitäten als niederfrequente Schwingungen. Daher sollte für den Nachweis einer Chemisorption nicht allein das Fehlen der hochfrequenten SH-Streckschwingung als Nachweis ausgewählt werden.

Bei einer ladungsabhängigen Adsorption und bei der chemischen Bindung spielen die elektrostatischen Ladungen des Nanopartikels sowie die des Raman-Reporters als auch dessen molekulare Eigenschaften eine entscheidende Rolle. Daher sind die Art der Präparation des Nanopartikels (Reduktionsmittel) sowie dessen Zusammensetzung wichtige Kriterien für die Auswahl geeigneter Raman-Reporter. Gut veranschaulichen lässt sich dies mittels des Aromaten Thiophenol. Sobald dieser über seine Schwefelgruppe an eine Au-Nanokugel bindet, verdrängt er die negativ geladenen Citratmoleküle, welche während der Synthese zur Bildung der kolloidalen Lösung beigetragen haben und nun die Aggregation der Nanokugeln mittels elektrostatischer



**Abbildung 4.11:** Mittelwerte der Intensitäten des SERS-Spektrums in Abhängigkeit von der Konzentration des Raman-Reporters Thiophenol. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den theoretisch errechneten Wert einer molekularen Monolage des Reporters auf der Au-Oberfläche von 32 nm großen Au-Nanokugeln.

Abstoßung verhindern. Da Thiophenol nach Konjugation keine geladenen Gruppen aufweist, führt dies bei der Bildung einer Monolage zum Verlust der abstoßenden Ladungen bzw. zu einer Destabilisierung und folglich zur Präzipitation (Ausfällung) der Au-Nanokugeln. Durch eine Verringerung der Konzentration, welche die Ausbildung einer Monolage des Raman-Reporter-Moleküls verhindert und somit eine teilweise Bedeckung mit Citrat-Molekülen ermöglicht, wird die Aggregation minimiert. Eine Verwendung von Polymeren stoppt ebenfalls diesen Effekt und ermöglicht die Zugabe höherer Konzentrationen von Thiophenol und anderen Raman-Reportern aufgrund sterischer Abstoßung. Das SERS-Maximum von Thiophenol liegt kurz vor dem theoretisch errechneten Wert einer molekularen Monolage auf der Metalloberfläche (Abb. 4.11, gestrichelte Linie). Dies lässt vermuten, dass die Thiophenolmoleküle nicht so dicht gepackt auf der Metalloberfläche liegen wie angenommen.

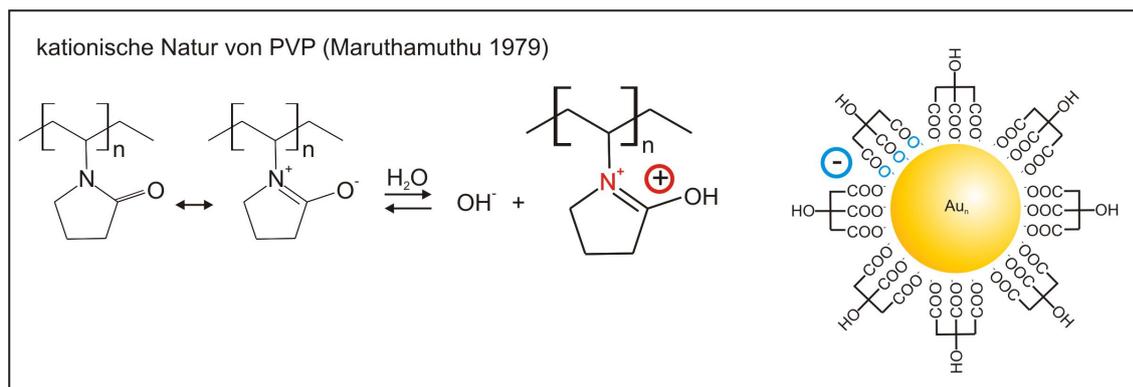
Die Menge des Thiophenols welche für die Ausbildung einer Monolage ausreicht, ergibt sich aus der Gesamtoberfläche der in einem Milliliter Probe befindlichen Nanopartikel ( $A_{NP}$ ), der aus dem Van-Der-Waals-Radius des Schwefels vom Thiophenol ermittelten Fläche ( $A_\omega$ ), der Masse eines Thiophenolmoleküls ( $m_T$ ) und der Dichte des reinen Thiophenols ( $\rho_T$ ):

$$V_T = \frac{\left(\frac{A_{NP}}{A_\omega}\right) \cdot m_T}{\rho_T}$$

Das Signal scheint mit der Höhe der Raman-Reporter-Konzentration erst zuzunehmen und später wieder abzufallen (Quenching). Vermutlich wird die kovalente Anbindung der Raman-Reporter-Moleküle an die Metalloberfläche aufgrund der höheren Konzentration beeinträchtigt. Wiederholt man diesen Test mit einem Molekül, welches eine negativ geladene Gruppe nach der kovalenten Anbindung aufweist, wie es beispielsweise bei 3-Mercaptobenzoessäure der Fall ist, bleiben die Au-Nanokugeln relativ stabil, da ihre elektrodynamische Stabilität durch die anionische Natur des Raman-Reporters gewährleistet bleibt. Hingegen führt die Zugabe von Molekülen mit einer überwiegend positiven Ladung zur Adhäsion der durch das Citrat negativ geladenen Nanokugeln und demzufolge zur Aggregation. Hierbei ist keine kovalente Bindung des Raman-Reporters erforderlich. Für die Herstellung von Nanopartikel-Aggregaten bietet dieser Mechanismus zwar eine einfache und schnelle Methode, er ist jedoch auf spezielle Moleküle begrenzt, schwer reproduzierbar und stark konzentrationsabhängig, wobei die Aggregate eine Mindestgröße sehr schnell bei weitem überschreiten würden. Meist ist allerdings das Verhalten solcher Komplexe nicht so eindeutig, da die Reaktionen größerer molekularer Strukturen und deren funktioneller Gruppen insbesondere in Abhängigkeit des Lösungsmittels oft nicht eindeutig vorhersagbar sind.

Während der Inkubation mit Reporter-Molekülen neigen die Nanopartikel zur Präzipitation. Die Stärke der Aggregation nimmt bei den getesteten aromatischen Thiolen in folgender Reihenfolge zu: 3-Mercaptobenzoessäure, 4-Mercaptobenzoessäure, Thiophenol, 2-Mercapto-4-methylthiazol-5-essigsäure, 6-Mercaptopyridin-3-carbonsäure, 4-Mercaptophenol. Dabei führen heterocyclische Carbonsäuren schneller als aromatische Carbonsäuren zur Aggregation. Dieser Prozess wird durch Erhöhung der Dynamik

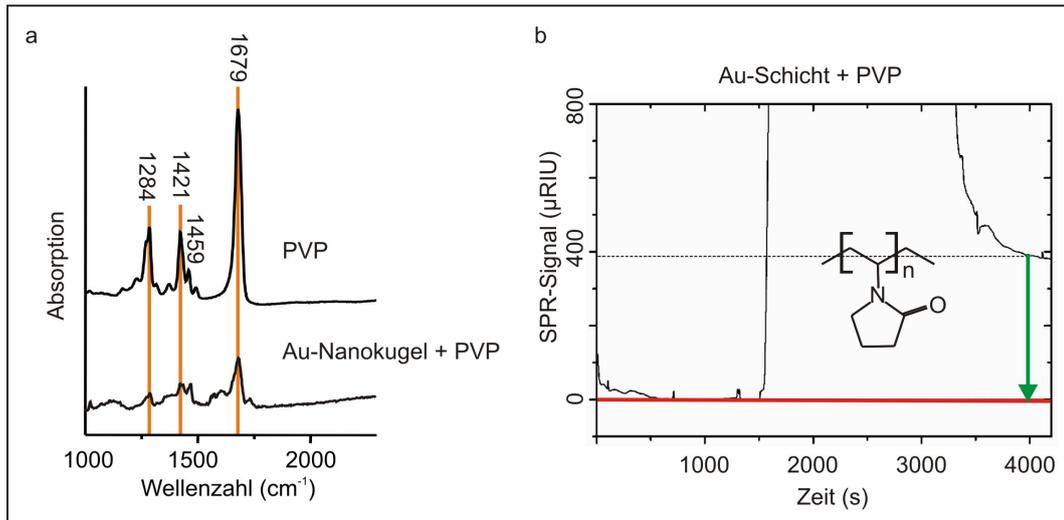
der Teilchen mittels Durchmischung oder Temperaturanstieg verstärkt. Aufgrund der instabilen Eigenschaften der meisten Nanopartikel in salzhaltigen Lösungen, wie beispielsweise biologischen Puffern oder Raman-Reporter-Molekülen, mussten diese sterisch stabilisiert werden. Hierfür wurde das Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) bereits erfolgreich eingesetzt [122]. Es absorbiert über hydrophobe Interaktionen an die Oberfläche von Nanopartikeln und bildet eine netzartige Struktur um die Nanopartikel aus, was zu einem sterischen Schutz dieser führt [123]. Das Vorhandensein einer negativen Ladung auf dem Substrat, wie es bei Citrat stabilisierten Au-Nanokugeln der Fall ist, führt im Allgemeinen zur Bildung eines Komplexes durch die kationische Natur des Stickstoffatoms des Pyrrolidonrings (Abb. 4.12) [123].



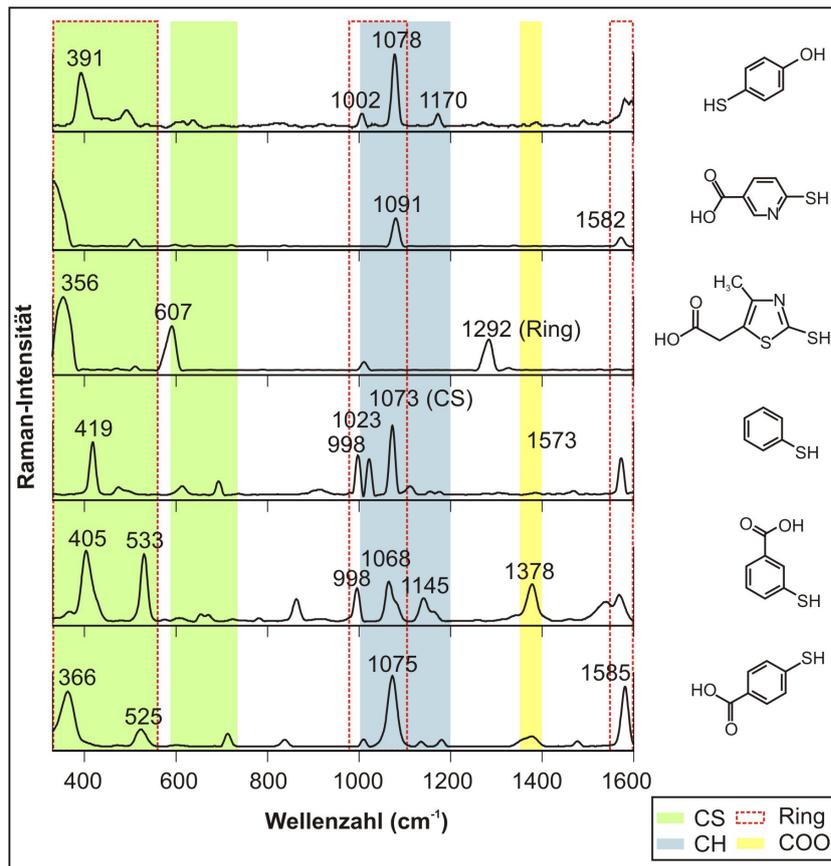
**Abbildung 4.12:** Ionische Wechselwirkungen entstehen zwischen dem Stickstoff des Polymers Polyvinylpyrrolidon (PVP) und der mit Citrat-Ionen stabilisierten Au-Nanokugel.

Eine erfolgreiche Umhüllung mit dem Polymer PVP führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 1 nm zu längeren Wellenlängen hin. Da eine solche Verschiebung auch durch geringe Aggregationen der Au-Nanokugeln oder durch das Medium selbst hervorgerufen wird, wurde der Nachweis der Adsorption des Polymers mit FT-IR Spektroskopie überprüft. Dieser zeigte ebenfalls ein deutliches Ergebnis. In Abb. 4.13a sind IR-Spektren von reinen PVP und mit PVP umhüllten Au-Nanokugeln nach mehrmaligem Waschen dargestellt. Die relevanten Banden liegen bei  $1677\text{ cm}^{-1}$ ,  $1421\text{ cm}^{-1}$  und  $1284\text{ cm}^{-1}$  und sind in beiden Spektren deutlich zu erkennen. Zusätzlich zeigte der Nachweis mittels Chromatographie eine erfolgreiche Adsorption von PVP auf mit Raman-Reportern beschichteten Goldoberflächen (Abb. 4.13b). Unter den getesteten Raman-Reportern erwiesen sich die aromatischen Thiole als sehr vielversprechend. Sie sind durch das Vorhandensein einer SH-Gruppe und eines Fünf- bzw. Sechsrings charakterisiert. Das Multiplexpotential konnte aufgrund der erfolgreichen Aggregation und Stabilisierung auf 6 verschiedene Raman-Reporter erhöht werden (Abb. 4.14). Weitere Raman-Reporter sind natürlich möglich. Da sich die SERS-Banden in ihrer Intensität und Lage von den Raman-Banden unterscheiden, ist eine Zuordnung schwierig. Folgende SERS-Banden können wegen ihrer Lage mit den Raman-Banden korrespondieren (Abb. 4.14).

## 4 Ergebnisse und Diskussion



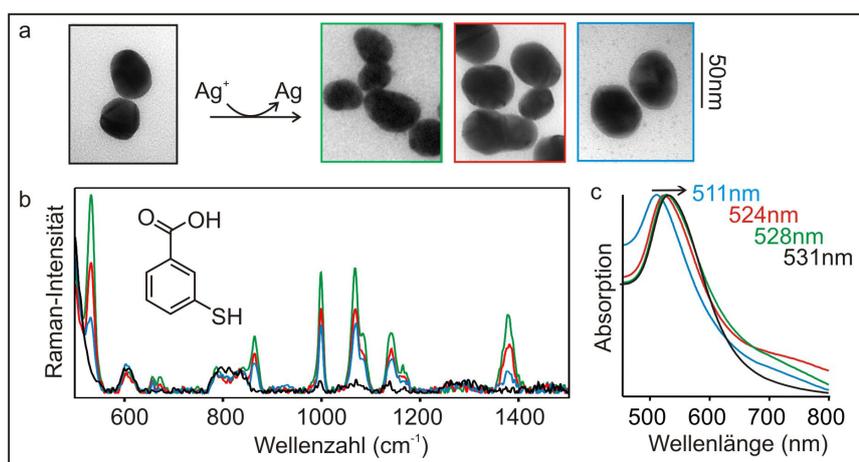
**Abbildung 4.13:** FT-IR-Spektren von reinem PVP und PVP nach Inkubation mit Au-Nanokugeln und dem Raman-Reporter Thiophenol (a). SPR-Analyse über das Wachstum von PVP auf einer mit Raman-Reportern (3-Mercaptobenzoessäure) versehenen Goldoberfläche (b).



**Abbildung 4.14:** Intensitätsnormierte SERS-Spektren von SERS-Markern (SM) mit verschiedenen Raman-Reporter-Molekülen und 1 s Messzeit.

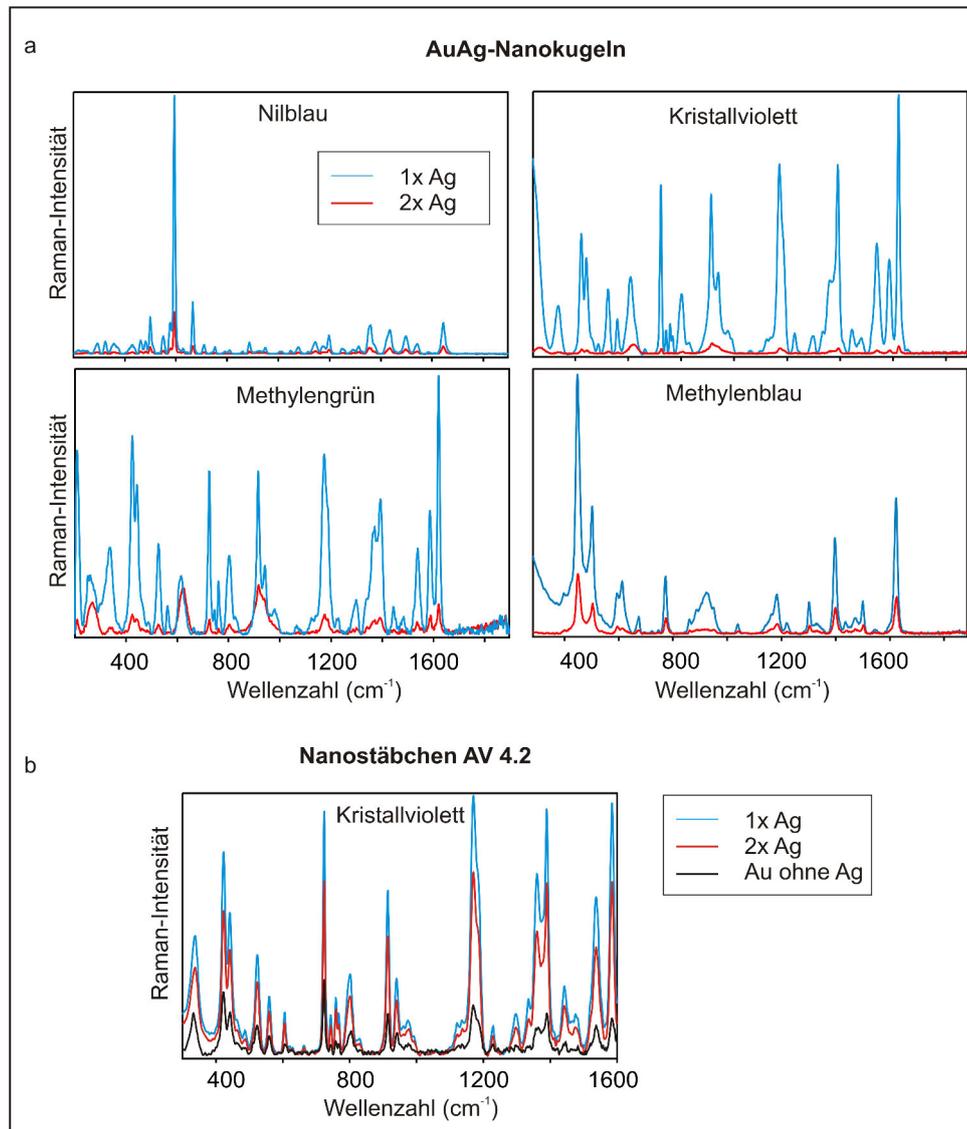
Die Banden im Bereich von  $980\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  und  $1550\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  lassen sich den aromatischen und heteroaromatischen Ring-Schwingungen zuordnen. CH-Deformationsschwingung in der Ringebene sind bei  $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Die symmetrische Valenzschwingung der Carbonsäuregruppe ist im Bereich  $1350\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. CS-Schwingungen sowie Ringschwingungen sind bei  $350\text{--}550\text{ cm}^{-1}$  und weitere CS-Schwingungen sind im Bereich  $590\text{--}735\text{ cm}^{-1}$  zu finden.

## 4.6 Ag-Abscheidung an Au-Nanokugel-Aggregaten



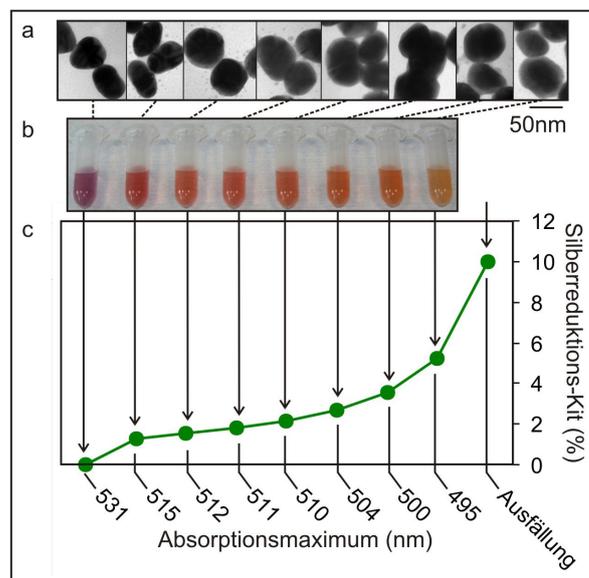
**Abbildung 4.15:** TEM-Bilder von Au-Nanokugeln und AuAg-Nanokugeln mit drei verschiedenen Stärken der Silberhülle, welche von links nach rechts zunimmt (a). Die entsprechenden SERS-Spektren des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure (b) und Absorptionsspektren der Nanokugeln (c) sind farblich kodiert.

Eine Umhüllung der mit einem Raman-Reporter konjugierten Au-Nanokugel-Aggregate mit Silber konnte mittels des Ag-Verstärkungs-Kits von BBC international erfolgreich realisiert werden (Abb. 4.15a). Sie zeigte eine Steigerung der plasmonischen Eigenschaften in Form einer höheren SERS-Intensität [124], welche vermutlich auf größere Verstärkungsfaktoren des Silbers zurückzuführen ist. Für einen genauen Nachweis wurden die Au-Nanokugeln zuvor nicht gezielt aggregiert, um eine deutliche Veränderung der SERS-Intensität durch die reduktive Silberabscheidung erkennen zu können. Die präparationsbedingten Aggregationen waren für diesen Versuch ausreichend. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung des SERS-Signals nach der Umhüllung mit Silber (Abb. 4.15b) auch unter Verwendung verschiedener Raman-Reporter (Abb. 4.16a). Gleiche Beobachtungen konnten nach der Silberumhüllung von Au-Nanostäbchen gemacht werden (Abb. 4.16b), deren SERS-Signal jedoch wesentlich geringer war, als das der AuAg-Nanokugel-Aggregate. Bei der Umhüllung mit Silber wurde deutlich, dass je konzentrierter das Reaktionsgemisch für die Silberabscheidung ist, desto schneller die reduktive Silberabscheidung erfolgte und



**Abbildung 4.16:** SERS-Spektren von AuAg-Nanokugeln hergestellt mit 2 verschiedenen Konzentrationen an Silbernitrat (1xAg und 2xAg) und folglich unterschiedlich starker Ag-Hülle. Als Raman-Reporter wurden die Farbstoffe Nilblau, Kristallviolett, Methylengrün und Methylenblau herangezogen (a). Au- bzw. AuAg-Nanostäbchen mit dem Raman-Reporter Kristallviolett (b) ebenfalls unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Silbernitrat während der Präparation der Silberhülle. Nanopartikel mit einer dünneren Ag-Hülle zeigen deutlich bessere SERS-Signale. ( $t=1$  s)

umso größer die entstehende Struktur wurde. Hierbei ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Stärke der Silberhülle. Verschiedene Tests ergaben, dass die Abnahme der SERS-Intensität mit der Stärke der Silberhülle korreliert (Abb. 4.15b). Ein Grund hierfür kann die abnehmende Durchlässigkeit für Strahlung durch die wachsende Silberhülle sein. Eine andere Möglichkeit besteht in der Erhöhung der Rauigkeit der Goldoberfläche aufgrund der Bildung eines „Flickenteppichs“ bei einer sehr dünnen Silberhülle. Am Wahrscheinlichsten ist jedoch, dass diese Korrelation aufgrund einer Verschiebung der Absorptionsbanden zu kürzeren Wellenlängen hin, bei Zunahme der Hüllenstärke, verursacht wird (Abb. 4.15c). Abb. 4.17a zeigt TEM-Aufnahmen von mit Silber umhüllten Au-Nanokugeln unter Verwendung unterschiedlicher Silberkonzentrationen. Fotos der entsprechenden Proben sind in Abbildung 4.17b dargestellt. Eine immer deutlichere orangene Färbung einhergehend mit der Zunahme der Silberhülle lässt sich visuell erkennen. Zudem konnte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nachgewiesen werden (Abb. 4.17c). Während der Abscheidung des Silbers bildet sich eine sehr dünne und nicht einheitliche Silberschale aus. Liegt die Konzentration des Silbers über 10%, führt dies zur Ausfällung der Nanopartikel (Abb. 4.17c).

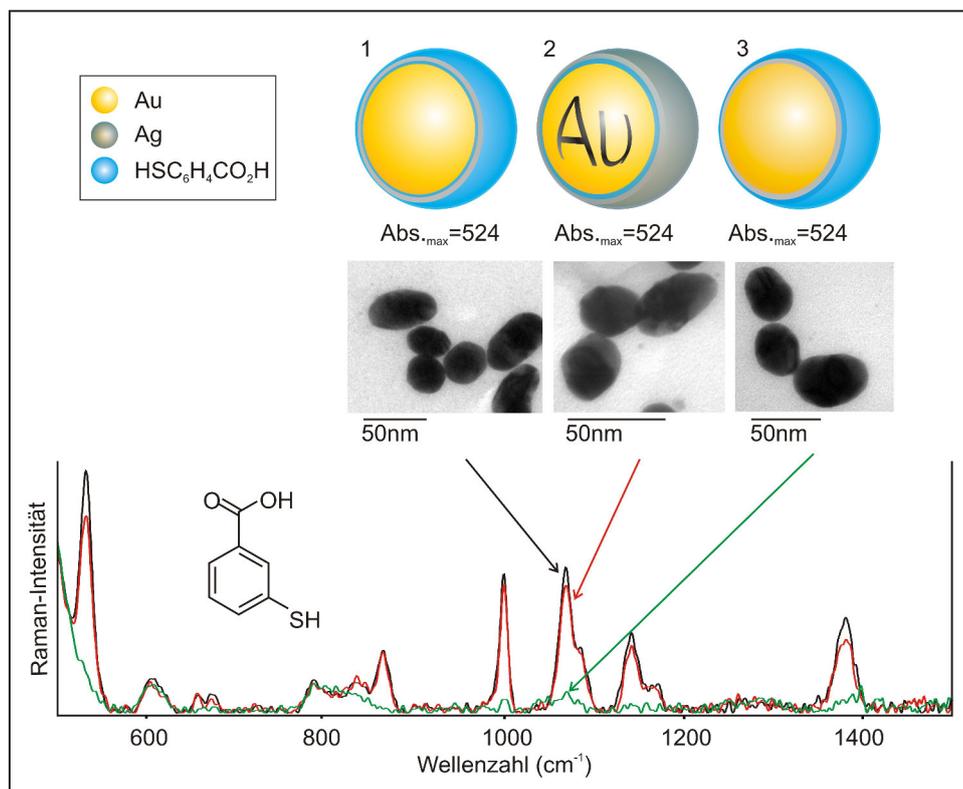


**Abbildung 4.17:** TEM Bilder (a) und Fotos (b) von Au-Nanokugeln mit zunehmender Silberhülle. Das Diagramm stellt die Verschiebung des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit von der Silberkonzentration dar (c).

Nicht nur die Stärke der Silberhülle, sondern auch die Platzierung des Raman-Reporter-Moleküls hat Auswirkungen auf die Intensität des SERS-Signals. Es konnte nachgewiesen werden, dass Raman-Reporter, welche sich zwischen dem Goldkern und der Silberhülle befanden, das beste Signal lieferten (Abb. 4.18 grün). Ursache kann eine Erhöhung des elektromagnetischen Feldes an der Grenzfläche zwischen Silber und Gold sein. Die Raman-Streustrahlung der in diesem Bereich kovalent gebundenen Raman-Reporter und die Anregungsstrahlung würde demnach zusätzlich verstärkt

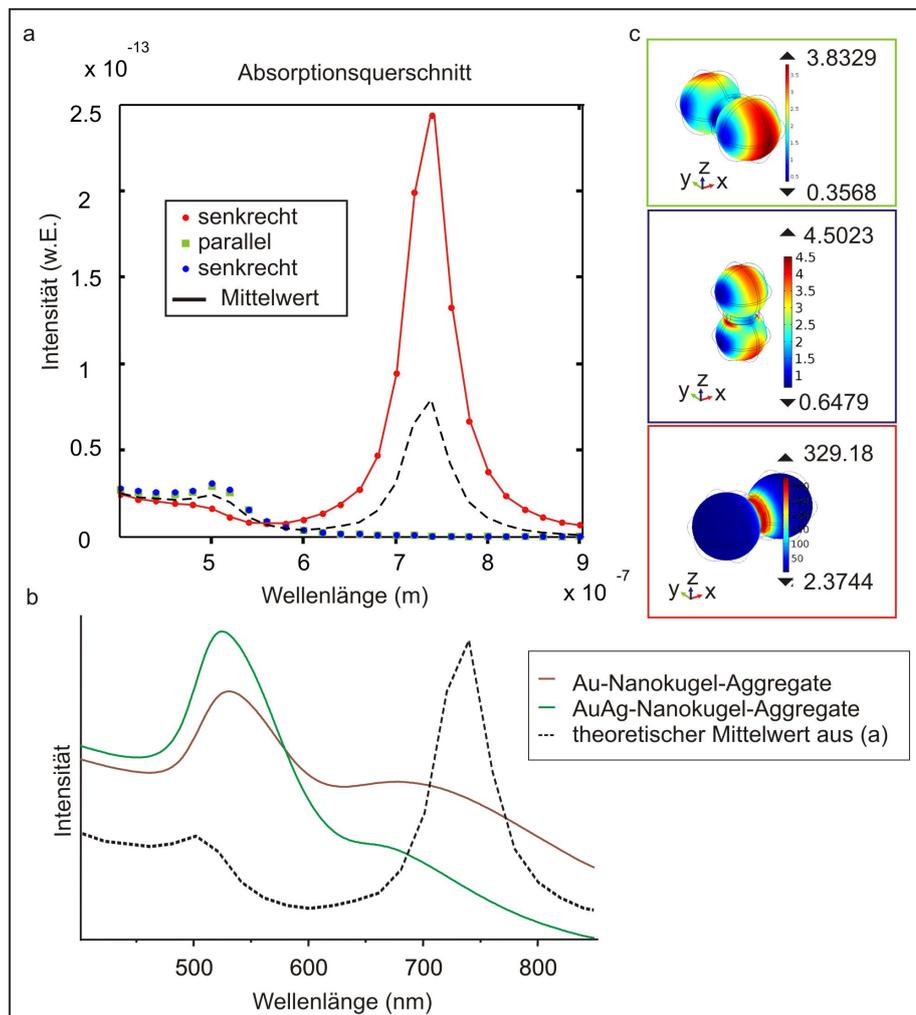
#### 4 Ergebnisse und Diskussion

werden. Eine nachträgliche Zugabe des Raman-Reporters nach der Silberreduktion ergab keine signifikante Verbesserung (Abb. 4.18 rot). Ein Test, bei welchem der Raman-Reporter einzig nach der Umhüllung mit Silber zu den Nanopartikeln hinzu gegeben wurde, zeigte insgesamt ein deutlich geringeres SERS-Signal (Abb. 4.18 schwarz). Dies kann ein Indiz für die höhere Affinität der Thiolgruppe des Raman-Reporter-Moleküls zu Gold sein.



**Abbildung 4.18:** Schematische Darstellung von AuAg-Kern-Hülle-Nanokugeln (>45 nm) mit dem Raman-Reporter 3-Mercaptobenzoessäure auf dem Au-Kern und der Ag-Hülle (1), nur auf dem Au-Kern (2) und nur auf der Ag-Hülle (3). Darunter sind die Maxima der Plasmonen-Resonanz-Wellenlängen und TEM-Aufnahmen der entsprechenden Proben abgebildet. Die dazugehörigen SERS-Spektren sind darunter dargestellt (t=1 s).

Theoretisch berechnete Absorptionsspektren eines AuAg-Kern-Hülle Nanopartikel-Dimers (Abb. 4.19a) stimmen mit den realen Werten der AuAg-Nanokugel-Aggregate (SERS-Marker) gut überein (Abb. 4.19b). Unterschiede resultieren daraus, dass sich in der realen Probe nicht nur Dimere befinden, sondern eine Vielzahl verschiedener Formen von Aggregaten. Zudem ist der Abstand zwischen den einzelnen Nanopartikeln nicht klar definiert und die Silberhülle nicht gleichmäßig homogen über die Nanopartikel verteilt. Das elektrische Feld zeigt bei der richtigen Orientierung des Au-Ag-Nanopartikel-Dimers zum Anregungslaser sehr gute Verstärkungen (Abb. 4.19c).

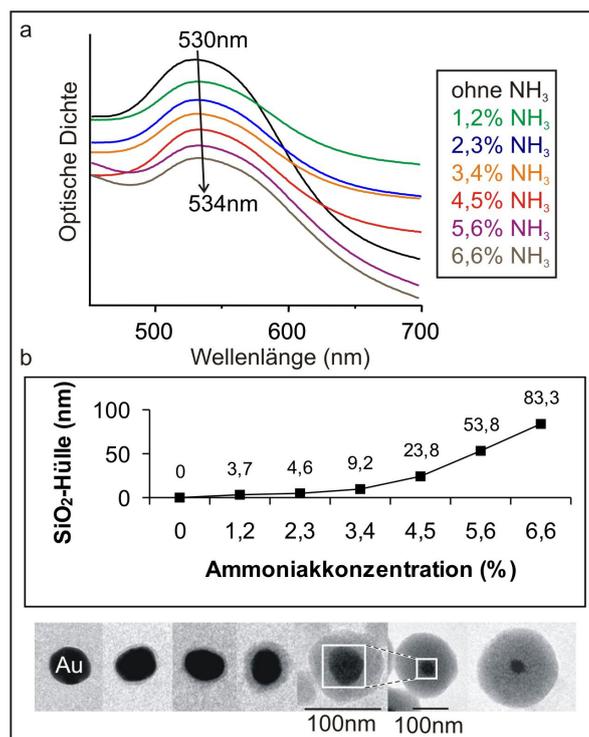


**Abbildung 4.19:** Theoretisch berechnetes Absorptionsspektrum eines AuAg-Dimers aus 45 nm großen Au-Nanokugeln und einer 3 nm starken Silberhülle. Beide Au-Nanokugeln stehen in direktem Kontakt zueinander (-1nm) und werden von der Silberhülle vollständig umschlossen (Medium =  $\text{H}_2\text{O}$ ) (a). Vergleich des theoretischen und realen Absorptionsspektrums der AuAg-Nanokugel-Aggregate sowie reale Absorptionsspektren von Au-Nanokugel-Aggregaten (b). Darstellung des elektrischen Feldes um das Nanopartikel-Dimer herum an den plasmonen Resonanzen für verschiedene Orientierungen des Anregungslichtes. Das elektromagnetische Feld propagiert in z-Richtung mit x-Polarisation (c).

Eine Umhüllung der SERS-Marker (SM) bringt neben dem Einbringen funktioneller Gruppen für die Konjugation von Biomolekülen weitere wichtige Vorteile. Diese liegen im Schutz vor Agglomeration und Zerfall durch Fremdstoffen und in der Möglichkeit von Multiplex-Anwendungen [125]. Des Weiteren erfolgt auf Grund der Abstandsabhängigkeit nur eine geringe selektive Verstärkung von Raman-Banden entfernter Moleküle ( $>20\text{\AA}$ ). Folglich beinhaltet das SERS-Spektrum des Raman-Reporters keine molekulare Information beispielsweise des Antikörpers oder anderer Biomoleküle. Für die Umhüllung eignet sich Tetraethylorthosilikat (TEOS) sehr gut. Die Synthese erfolgt über einen Sol-Gel-Prozess, den sogenannten Stöber-Prozess. Hier wird der Ausgangsstoff TEOS in Gegenwart des Katalysators Ammoniak zunächst hydrolysiert, wobei Kieselsäure entsteht. Die monomere Kieselsäure kondensiert anschließend unter Wasserabscheidung zu einer geschlossenen Siliciumdioxidhülle. Da diese Bildung beim Stöber-Prozess sehr schnell abläuft, entstehen amorphe Schalen um die Nanopartikel, die innerhalb ihrer Gerüststruktur aus  $[\text{SiO}_4]$ -Tetraedern auch Reste des Ausgangsstoffes oder der Hydrolysereaktionen aufweisen können. Ethanol erwies sich im Gegensatz zu Methanol, Propanol, Isopropanol und deren Mischungen als geeignetes Lösungsmittel für TEOS, um in kürzester Zeit (30 min) eine homogene Siliciumdioxidhülle zu gewährleisten. Siliciumdioxid ist chemisch sehr widerstandsfähig. Ausgenommen von Flußsäure, ist es gegenüber Wasser und Säuren resistent. Alkalischnmelzen bzw. wässrige Alkalilaugen jedoch lösen insbesondere amorphes Siliciumdioxid. Der Vorteil liegt neben der außerordentlich niedrigen thermischen Ausdehnung in der hohen Transparenz für ultraviolettes Licht. Zudem ist Siliciumdioxid nicht toxisch [126].

### 4.7 Silanisierung und Modifizierung von SERS-Markern

Die Stärke der Siliciumdioxidhülle korreliert mit der Konzentration des Ammoniaks. Dieser fungiert als Katalysator in Form einer Base, welcher schnelle Reaktionszeiten unter geringer Aktivierungsenergie ermöglicht. Abb. 4.20 zeigt die Abhängigkeit des Wachstums der Siliciumdioxidhülle von der Ammoniakkonzentration bei Raumtemperatur und 30 min Inkubationszeit. Das Wachstum der Siliciumdioxidhülle geht mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu längeren Wellenlängen einher (a). Bei der Inkubation von 1.2 bis 6.6 vol% Ammoniak korrelierte die Stärke der Schale aus Siliciumdioxid direkt mit der Ammoniakkonzentration (b). Hüllstärken zwischen 3 und 83 nm wurden realisiert. Höhere Ammoniakkonzentrationen führten wegen der erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit zur Bildung von reinen Siliciumdioxidpartikeln. Bei Citrat stabilisierten Au-Nanokugeln bildet sich schnell eine homogene Siliciumdioxidhülle aus. Unter Verwendung des an der Metalloberfläche gebundenen Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure erfolgt die Umhüllung mit Siliciumdioxid auf Grund der hydrophilen Carboxylgruppe ebenfalls sehr gut. Da hydrophile Stoffe eine hohe Affinität zueinander haben, können sich die OH- Gruppen der Orthokieselsäure

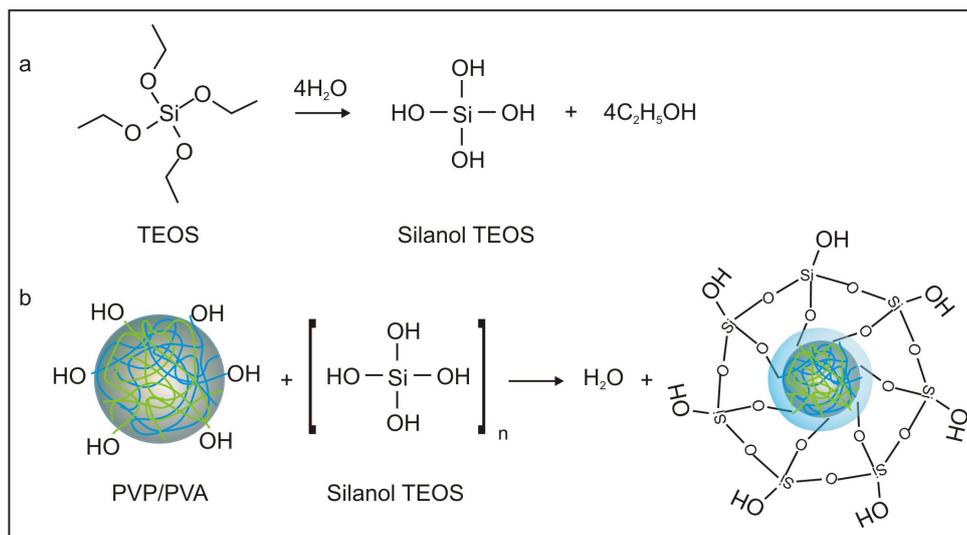


**Abbildung 4.20:** Das Wachstum der Siliciumdioxidhülle um Nanopartikel in Abhängigkeit von der Ammoniakkonzentration: Absorptionsspektren (a) sowie TEM-Bilder mit dazugehörigem Diagramm (b).

bzw. deren ersten Keime an die Metalloberfläche anlagern. Infolgedessen startete der Wachstumsprozess der Hülle direkt auf der Nanopartikeloberfläche. Leider weisen nicht alle Raman-Reporter diese Eigenschaften auf.

Nanopartikel zeigen nach der Konjugation der Raman-Reporter und Silberhülle veränderte Oberflächeneigenschaften. Dies macht eine weitere Umhüllung schwierig. Fast alle Raman-Reporter haben einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Siliciumdioxidschale. Aus diesem Grund mussten zusätzliche Polymere getestet werden, welche das Wachstum der Schale um die Nanopartikel ermöglichen. Die Zugabe von Polymeren kann das Wachstum der Hülle positiv beeinflussen und verhindert gleichzeitig Aggregationen zwischen den einzelnen Nanopartikeln. Folglich musste die Synthese entsprechend angepasst werden, um die Auswahl geeigneter Raman-Reporter für Multiplex-Anwendungen zu erhöhen. Hierfür wurden Kombinationen von Polymeren (PVP, PSS, PVA, PEG, PAH) mit verschiedenen Inkubationszeiten, Inkubationsbedingungen und Konzentrationen getestet. Es gab zwar einen positiven Zusammenhang zwischen der Verwendung des Polymeren Polyvinylpyrrolidone (PVP) und dem Wachstum der Siliciumdioxidhülle, aber nur unter Verwendung des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure, was vermutlich auf eine hohe Anzahl an Hydroxylgruppen (OH) durch das Polymer sowie durch den Raman-Reporter zurückzuführen ist. Das für die Silanisierung verwendete Tetraethoxysilan wird im basischen pH-Bereich schnell hydrolysiert und polymerisiert als Silanol, welches mit

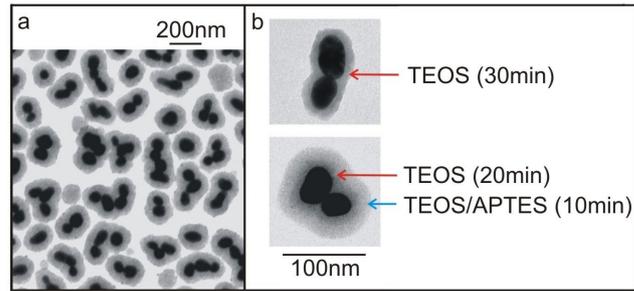
den OH-Gruppen an der Nanopartikeloberfläche durch eine Kondensationsreaktion reagiert (Abb. 4.21).



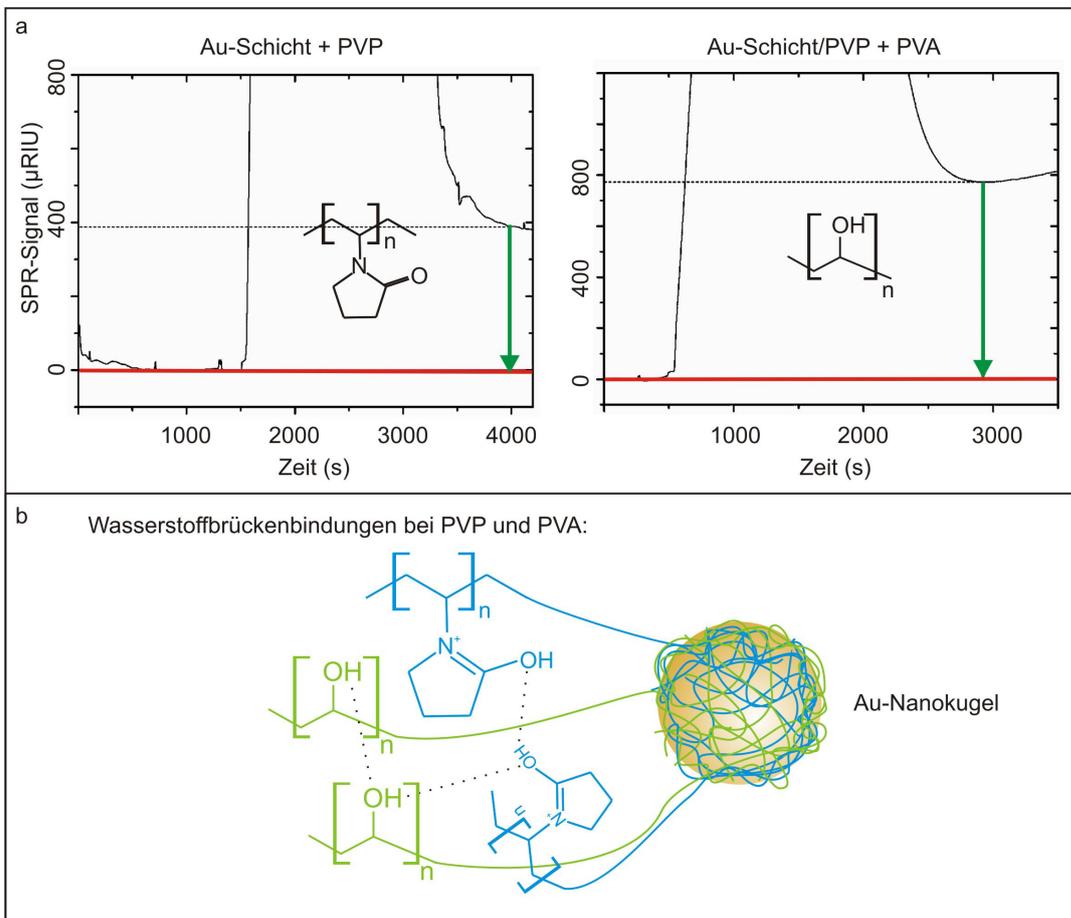
**Abbildung 4.21:** Schema der Polymerisationsreaktion von Tetraethoxysilan (a) sowie die Kondensationsreaktion des entstandenen Silanols mit OH-Gruppen auf der Oberfläche einer AuAg-Nanokugel (b).

Wird ein Raman-Reporter ohne OH-Gruppen heran gezogen (z.B. Thiophenol), ist unter gleichen Bedingungen kaum ein Wachstum der Siliciumdioxidhülle zu beobachten. Es kommt hingegen zur Bildung einzelner  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel. Eine Vermutung ist, dass das Wachstum des Polymeren PVP über Adsorption auf den AuAg-Nanokugel-Aggregaten stattfindet, was die erhöhte Stabilität dieser beweist, die Dichte der OH-Gruppen von PVP auf der Oberfläche dagegen zu gering ist, um eine schnelle und effektive Silanisierung zu ermöglichen. Eine Verwendung von PVP zusammen mit dem Polymer PVA resultiert in einer ausreichenden Bedeckung der metallischen Oberfläche mit Hydroxylgruppen. Eine Kombination beider Polymere initialisiert daher das Starten der Kondensationsreaktion direkt auf den AuAg-Nanokugel-Aggregaten. Folglich zeigte sich ein signifikantes gleichmäßiges Wachstum der Siliciumdioxidhülle (Abb. 4.22a) innerhalb kürzester Zeit auch unter Verwendung des Raman-Reporters Thiophenol. Durch ein Gemisch aus PVP und PVA erfolgt ein effektiveres Wachstum der Polymere um die Nanopartikel, als es bei der Verwendung nur eines Polymeren der Fall ist (Abb. 4.23a). Unterstützt wird dieser Prozess durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Polymeren (Abb. 4.23b). Das Resultat ist ein netzartiges Gebilde, welches die Nanopartikel sterisch stabilisiert und weitere Aggregationen verhindert. Daher kann ein zügiges und dichtes Wachstum der Siliciumdioxidhülle direkt auf der Partikeloberfläche erfolgen. Die Beschichtung der Nanopartikeloberfläche mit PVP wurde schon vielfach beschrieben [84, 127, 122]. In Kombination mit PVA ergeben sich neue Möglichkeiten. Dies erlaubt die Verwendung unterschiedlicher Raman-Reporter, ohne dass eine Beeinflussung des Wachstums der Schale aus Siliciumdioxid erfolgte.

#### 4.7 Silanisierung und Modifizierung von SERS-Markern



**Abbildung 4.22:** TEM-Bild von TEOS-silanisierten und APTES-modifizierten SERS-Markern (a). Darstellung der Siliciumdioxidhülle nach Zugabe von TEOS sowie TEOS in Kombination mit APTES (b).



**Abbildung 4.23:** SPR-Analyse über das Wachstum von PVP auf einer mit Raman-Reportern (3-Mercaptobenzoessäure) versehenen Goldoberfläche sowie über das Wachstum des Polymer Polyvinylalkohol (PVA) im Anschluss auf derselben Probe (a). Schema der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen und innerhalb der Polymere PVP und PVA (b).

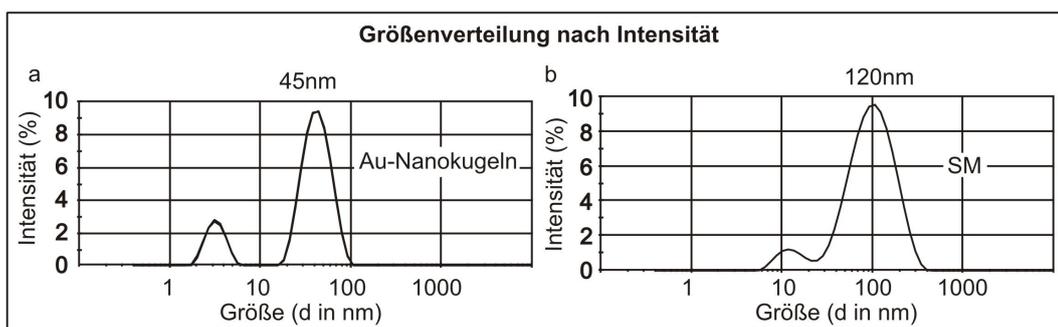
Alle getesteten Raman-Reporter konnten mit dieser Methode genutzt und mit einer Hülle aus Siliciumdioxid versehen werden.

Dieses System funktionierte nicht bei den übrigen Polymeren. Teilweise war die elektrostatische Anziehung so stark, dass sich beispielsweise aus PSS70 und PAH15 Polymerkugeln von mehreren 100 nm Durchmesser bildeten. Durch Veränderung der Volumenverhältnisse konnte ferner die Größe der Polymerpartikel variiert werden. Polymere stellen in dieser Form unter Verwendung einer Schicht auf Schicht Wachstums einen guten Ersatz für eine Siliciumdioxidhülle dar. Da die Schichtdicke jedoch schwer anzupassen und zudem zeitaufwändig ist, kommt dieses Verfahren nicht an die bereits erwähnten Vorteile einer Siliciumdioxidumhüllung heran. Des Weiteren ist eine weitere Funktionalisierung auf Grundlage einer Polymerhülle nur bedingt möglich. Die übrigen Polymere und deren Kombinationen zeigten keine Wirkung oder führten direkt zur Aggregation der Nanopartikel. Eine Vermutung liegt nahe, dass das Fehlen von OH-Gruppen bei PEG der Grund für eine mangelnde Silanisierung ist.

TEM-Bilder zeigten nach erfolgreicher Präparation der Siliciumdioxidhülle (innerhalb von 20 min) ein Wachstum um ca. 12 nm (Abb. 4.22b). Durch Variation der Ammoniakkonzentration, der Reaktionszeit oder der Temperatur konnte der Schalendurchmesser genau eingestellt werden.

Eine stabile Hülle bietet neben dem Schutz der Nanopartikel eine längere Lebensdauer dieser von mindestens 3 Monaten. Darüber hinaus wird bei Multiplex-Anwendungen die Anbindung fremder Reporter Moleküle sowie gleichzeitig der Verlust eigener Raman-Reporter-Moleküle verhindert.

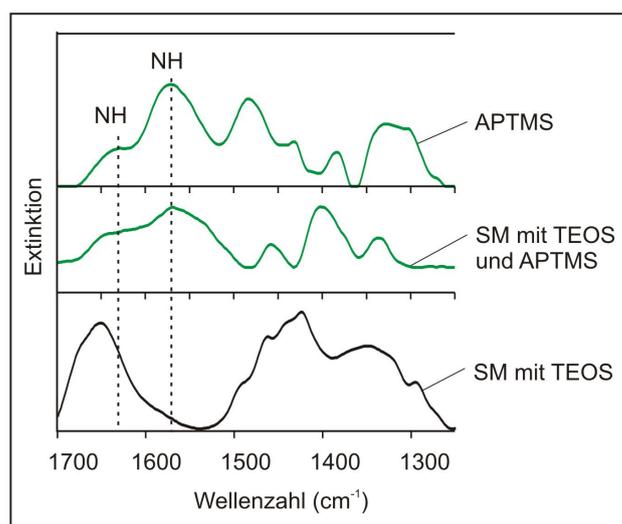
Die silanisierten Nanopartikel-Aggregate wurden filtriert (0.22 µm Porengröße) und im Anschluss der mittlere Radius mit dem Zetasizer bestimmt (Abb. 4.24). Abbildung 4.24 zeigt die Größenverteilung nach Intensität der 45 nm großen Au-Nanokugeln (a) und der mit einer Siliciumdioxidhülle versehenen im Durchschnitt 120 nm großen AuAg-Nanokugel-Aggregate (SERS-Marker).



**Abbildung 4.24:** Größenverteilung nach der Intensität: einzelne Au-Nanokugeln (a) und den daraus präparierten SERS-Markern (SM) (b).

Anschließend wurden unterschiedliche Alkoxysilane zur Konjugation an die mit Siliciumdioxid umhüllten AuAg-Nanokugeln getestet. Wichtig war das Vorhandensein einer geeigneten funktionellen Gruppe, welche die Konjugation von Antikörpern

(IgG), welche in der FC Region (fragment crystallizable region) exponierte primäre Aminogruppen aufweisen, ermöglicht. Nach der Silanisierung mit Triethoxysilylbutyraldehyd (TESBA), (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES), (3-Aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS) oder 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPS) durch Verwendung speziell angepasster Protokolle wurde eine kovalente Bindung von Biomolekülen an die funktionellen Gruppen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper überprüft. Bei der Hälfte der Silane erfolgte nur eine Adsorption der Antikörper, welche nach mehrmaligem Waschen mit Puffer wieder gelöst wurden. APTES sowie APTMS zeigten bei Verwendung verschiedener modifizierter Protokolle sowie nach mehrmaligem Waschen der Proben eine erfolgreiche Konjugation der Antikörper. Zudem konnte eine erfolgreiche Silanisierung mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (Abb. 4.22b) und FT-IR-Spektroskopie (Abb. 4.25) bestätigt werden. Die beiden typischen NH-Schwingungsbanden sind bei purem APTMS im Bereich  $1630$  und  $1569\text{ cm}^{-1}$  [128] im IR-Absorptionsspektrum gut zu erkennen. Diese Banden sind charakteristisch für die  $\text{NH}_3^+$ -Deformationsschwingung. Mit TEOS/APTMS beschichtete SM zeigen diese Schwingung ebenfalls, im Gegensatz zu nur mit TEOS beschichteten SM. Die Betrachtung weiterer Banden bot keine exakten Ergebnisse, da sich diese mit Banden von TEOS überlappten.

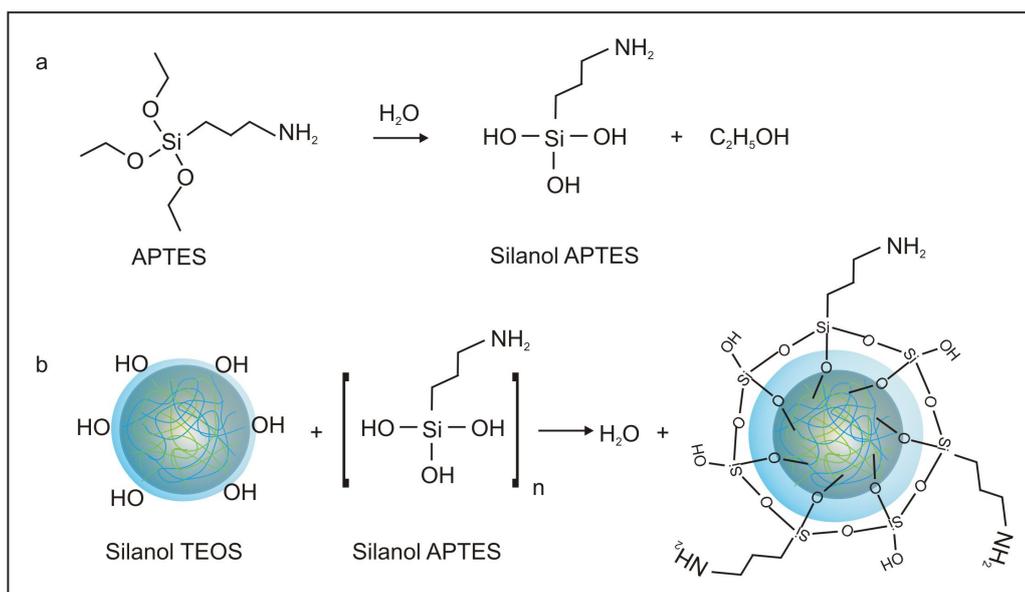


**Abbildung 4.25:** IR-Spektren von purem APTES sowie von SERS-Markern silanisiert mit TEOS und APTES sowie nur mit TEOS.

Aufgrund der geringeren Reaktivität von APTES im Gegensatz zu APTMS wurde APTES für weitere Versuche eingesetzt, da die geringere Reaktionsgeschwindigkeit ein exakteres Arbeiten und kontrollierbareres Wachstum der Alkoxysilan-Hülle (funktionalisiertes Organosilan) ermöglichte. APTES-modifizierte Oberflächen wurden als nicht-toxisch [129] und daher als gute und effiziente Substrate für die Konjugation von Biomolekülen beschrieben.

Durch Hinzufügen von APTES für 10 min nach erfolgreicher Silanisierung mit TEOS ergab sich ein signifikantes Wachstum der Hülle um 10 nm auf insgesamt 22 nm

(Abb. 4.22b). Im Vergleich zu den zuvor erreichten 12 nm innerhalb von 20 min zeigt sich die höhere Reaktivität von APTES im Vergleich zu TEOS. Zudem ist bekannt, dass in einer Reaktionsmischung, in welcher TEOS und APTES gemeinsam vorliegen, eine effektivere Modifizierung der entsprechenden Strukturen erfolgt [130]. Dabei erfolgen Kondensationsreaktionen zwischen TEOS und APTES (Abb. 4.26). Nach Bagwe et al. sollten die Silane in einem Abstand von 20-30 min nacheinander zugegeben werden. APTES wird an zweiter Stelle dazu pipettiert, da sonst aufgrund der schnelleren Kondensationsreaktion die meisten Moleküle im Inneren der Hülle eingeschlossen werden und somit für die Modifizierung der Nanopartikeloberfläche nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen würden. Aufgrund umfangreicher Experimente konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

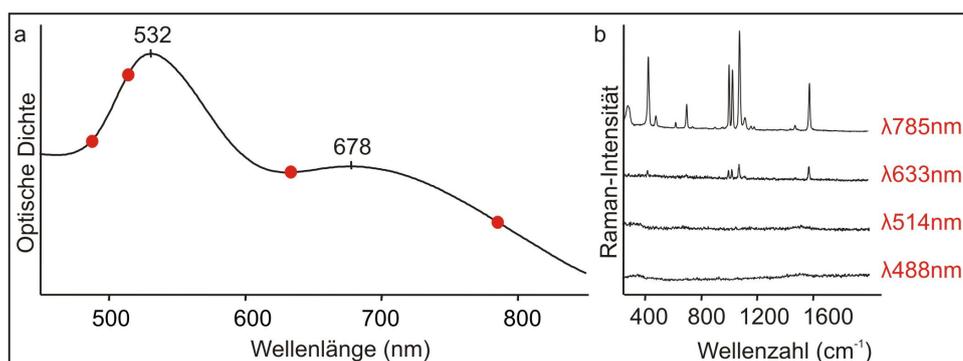


**Abbildung 4.26:** Schema der Polymerisationsreaktion von APTES (a) sowie die Kondensationsreaktion des aminierten Silanols mit dem Silanol TEOS (b).

## 4.8 SERS-Aktivität modifizierter SERS-Marker

SERS-Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten, welche einen geringen Untergrund zeigten und eine einheitliche Eindringtiefe in die Probe gewährleisteten. Das Probenvolumen konnte dadurch auf 10  $\mu$ l minimiert werden. Für Vergleichsmessungen wurde ein und dieselbe Probe mit dem Raman-Reporter Thiophenol herangezogen, um ein eindeutiges Ergebnis zu erzielen.

Die mit Siliciumdioxid umhüllten und aggregierten AuAg-Nanokugeln (SERS-Marker, SM) wurden mit verschiedenen Wellenlängen (785 nm, 633 nm, 488 nm, 514 nm) gemessen und die Intensitäten ihrer SERS-Spektren verglichen. Das Plasmonen-Resonanz-Spektrum in Abb. 4.27a zeigt zwei Hauptabsorptionsbanden bei 532 nm

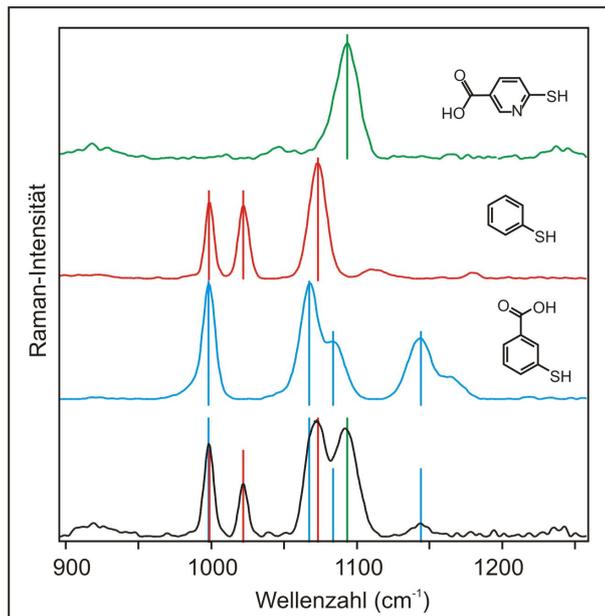


**Abbildung 4.27:** Plasmonen-Resonanz-Wellenlängen (Absorptionsbereich) der SERS-Marker (a). Die Verwendung vier verschiedener Anregungswellenlängen zeigt deutliche Unterschiede im SERS-Spektrum des Raman-Reporters Thiophenol ( $t=1$  s, 10x Objektiv) (b).

und 678 nm. Erstere zeigt den Absorptionsbereich einzelner Au-Nanokugeln bei transversaler Anregung der SM. Das Absorptionsmaximum im längerwelligen Bereich ist typisch für aggregierte Au-Nanokugeln bei longitudinaler Anregung. Werden die SM mit einem nah-infraroten Laser in diesem Bereich angeregt, kommt es zur Entstehung von „hot-spots“ (EM-Feld Erhöhung) an den Spalten zwischen den Au-Nanokugeln. Im Vergleich zu kürzeren Anregungswellenlängen lieferten die SM daher bei Anregung mit 785 nm das intensivste SERS-Signal (Abb. 4.27b). Unter Verwendung eines 633 nm Lasers zeigte sich im Vergleich ein relativ niedriges SERS-Signal. Da sich die beiden Absorptionsbanden in diesem Bereich überlappen, ist nicht ersichtlich wie stark die Nanokugel-Aggregate in dieser Region absorbieren. Vermutlich werden die Oberflächenplasmonen nur schwach angeregt. Bei einer Anregung mit kürzeren Wellenlängen (488 nm, 514 nm) wurden die Oberflächenplasmonen einzelner Nanokugeln innerhalb der SM angeregt. Eine Erhöhung bzw. Kopplung des EM-Feldes war hier folglich nicht zu erwarten.

Mit einer Belichtungszeit von 1 s bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm wurden verschiedene Raman-Reporter verglichen. Die aromatischen Ringstrukturen der ausgewählten Raman-Reporter-Moleküle zeigen intensive und gut aufgelöste Banden, welche für Multiplex-Anwendungen geeignet sind. Dieses Multiplexpotential stellt eines der wichtigsten Vorteile für die Differenzierung einzelner Zellen dar [125]. Ein Mischspektrum aus drei Raman-Reportern zeigt deutliche spektrale Beiträge von jedem einzelnen Reportermolekül im spektralen Bereich von 300–1600 cm<sup>-1</sup> (Abb. 4.28). Die für den jeweiligen Raman-Reporter spezifischen Spektren sind ähnlich wie bei einem Barcode und können den jeweiligen Reporter-Molekülen zugeordnet werden. Daher kann in einer Mischung aus verschiedenen Raman-Reportern jeder einzelne identifiziert werden. Die jeweiligen Spektren unterscheiden sich in der Anzahl, der Position und der relativen Intensitäten der Banden. Unterschiede im Signal-Rausch-Verhältnis können durch Anpassung der Raman-Reporter-Konzentration sowie des Aggregationsgrads während der Synthese angepasst werden. Dieser Vor-

gang erfordert mehrere Konzentrationsreihen zur Abstimmung verschiedener Raman-Reporter aufeinander. Erst dann ist der Einsatz in Multiplex-Versuchen möglich.



**Abbildung 4.28:** Spektren von SERS-Markern mit verschiedenen Raman-Reportern sowie ein Mischspektrum aus einer Suspension aller drei SERS-Marker zusammen. ( $t=1$  s, 10x Objektiv)

Unter den getesteten Raman-Reportern erwiesen sich 3-Mercaptobenzoessäure und 4-Mercaptobenzoessäure als sehr effektiv. Ihr Vorteil liegt in sehr guten SERS-Intensitäten, welche im Gegensatz zu den anderen untersuchten Raman-Reportern einfacher zu erzielen sind. Dies liegt an der Tatsache, dass wie bereits im Kapitel 4.5 erwähnt, deren molekulare Eigenschaften weniger zur Aggregation der Nanopartikel beitragen. Die Einstellung der Konzentration für die Inkubation ist wesentlich einfacher und kann ohne Problem etwas höher sein. Ein anderes Beispiel ist Thiophenol. Dieser Raman-Reporter zeigt durchaus sehr gute SERS-Intensitäten. Aufgrund seiner Struktur führen aber schon geringe Mengen zu starker Aggregation der Nanopartikel. Bei einer optimalen Einstellung der Konzentration erhält man beachtliche SERS-Intensitäten, welche noch intensiver als bei 3-Mercaptobenzoessäure und 4-Mercaptobenzoessäure sein können. Ist die Thiophenol-Konzentration zu hoch, führt dies zur Präzipitation der Nanopartikel. Die Vermutung liegt nahe, dass bei Thiophenol keine geschlossene Monolage entstehen darf, um die Annäherung der Nanopartikel zueinander zu verhindern.

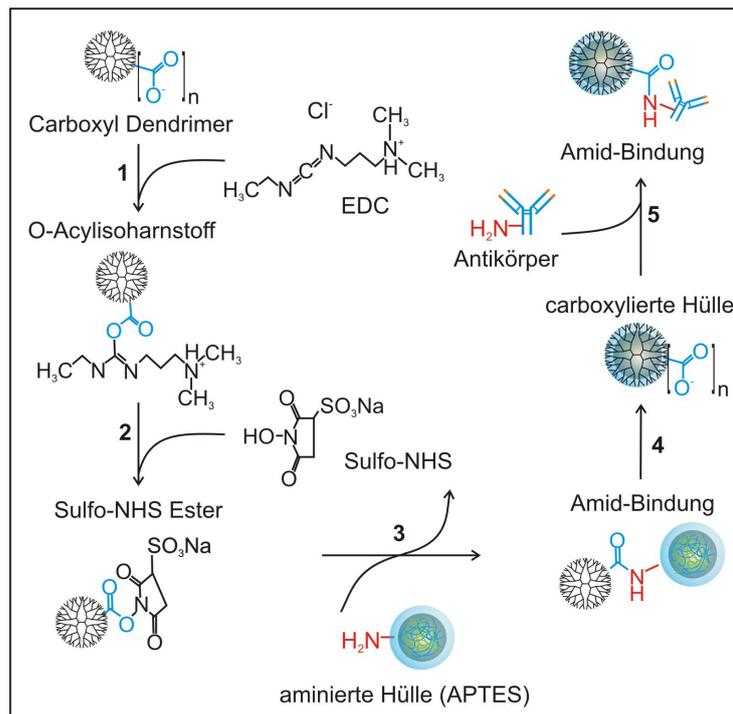
SERS-Spektren der Raman-Reporter-Moleküle können viele Banden aufweisen. Diese beschränken sich jedoch bei Verwendung sehr kurzer Messzeiten von wenigen Millisekunden auf die intensivsten Banden (Ringschwingungen im Bereich  $980-1100\text{ cm}^{-1}$ ), welche dann noch gut erkennbar sind. Durch diese Verringerung der Anzahl auf deutlich sichtbare Banden wird die Differenzierung zwischen verschiedenen Raman-

Reporter-Spektren erleichtert. Zu diesen Banden zählen (vergleiche mit Abb. 4.14) die bei  $998\text{ cm}^{-1}$  und  $1068\text{ cm}^{-1}$ , welche indikativ für 3-Mercaptobenzoessäure sind. Die Bande bei  $1091\text{ cm}^{-1}$  ist typisch für 6-Mercaptopyridin-3-carbonsäure und für Thiophenol sind die Banden bei  $998\text{ cm}^{-1}$ ,  $1023\text{ cm}^{-1}$  und  $1073\text{ cm}^{-1}$  charakteristisch. Für 4-Mercaptophenol und 2-Mercapto-4-Methylthiazol-5-essigsäure sind es die Banden bei  $1078\text{ cm}^{-1}$  bzw. bei  $1292\text{ cm}^{-1}$ . Die Bande  $1075\text{ cm}^{-1}$  hingegen ist spezifisch für 4-Mercaptobenzoessäure. Intensive Banden der Ringschwingung und CS-Schwingung im Bereich  $350\text{-}550\text{ cm}^{-1}$  sind breiter und variieren leicht. Für einen Vergleich verschiedener Raman-Reporter sind sie daher nicht geeignet. Obwohl es zur Überlappung verschiedener Banden kommt, ist aufgrund des spezifischen Fingerabdruckes jedes Spektrums eine Unterscheidung möglich. Statistische Datenanalysen können in unklaren Fällen für eine Auswertung verwendet werden.

## 4.9 Biologische Funktionalisierung von SERS-Markern

Um eine kovalente Bindung zwischen Antikörpern und der Aminogruppe von APTES zu ermöglichen, wurde Glutaraldehyd als Linker zwischen den primären Aminen getestet. Die Verlinkung sollte über die Bildung einer Schiff'schen-Base erfolgen. Als Resultat ergab sich eine starke Agglomeration der Partikel sowie Adsorption an den Reaktionsgefäßen, welche konzentrationsunabhängig immer wieder auftrat. Zudem war die Effizienz der Antikörperbindung sehr gering. Um diesen Schritt zu optimieren, wurde mit dem Dendrimer Poly(amidoamin) gearbeitet. Solche Dendrimere wurden in ähnlicher Weise bereits erfolgreich für die Konjugation von Biomolekülen eingesetzt [106]. Sie haben zudem einen positiven Effekt auf die Stabilität und Aggregation der Nanopartikel. Das PAMAN 4.5 Dendrimer besitzt einen Ethylendiamin Kern, von welchem wiederholt sich verzweigende Moleküle ausgehen, ähnlich wie bei einem Baum, an deren Enden sich insgesamt 128 Carboxylgruppen befinden. Der Vorteil liegt hier in der Vergrößerung der Oberfläche und demzufolge der erhöhten Anzahl funktioneller Carboxylgruppen, welche mögliche Bindungsstellen für Antikörper darstellen (Abb. 4.29).

Eine gut etablierte Technik für die leichtere Reaktion zwischen Carbonsäuren und Aminen zu stabilen Amidn erfolgt üblicherweise durch die Zugabe eines Carbodiimids. Die Carbonsäuren des Dendrimers sind weniger reaktiv als Aldehydgruppen und können über eine 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC Hydrochlorid) vermittelte Reaktion an die primären Aminogruppen der Antikörper gekoppelt werden. EDC selbst ist jedoch nicht besonders effizient bei der Vernetzung, weil sich ein instabiler O-Acylisoharnstoff-Ester bildet. Dieser ist anfällig für eine schnelle Hydrolyse, was zu einer Regenerierung der Carboxylgruppen führt. Die Effizienz einer EDC vermittelten Reaktion wird durch die Verwendung von *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (NHS) und der Bildung eines Sulfo-NHS-Esters als Zwischenprodukt erhöht. Diese reaktive und halbstarile Verbindung führt bei der Reaktion mit primären Aminen zu einer höheren Ausbeute von Amidbindungen in saurem Milieu. Ein optimales molekulares Verhältnis von EDC zu sulfo-NHS liegt im



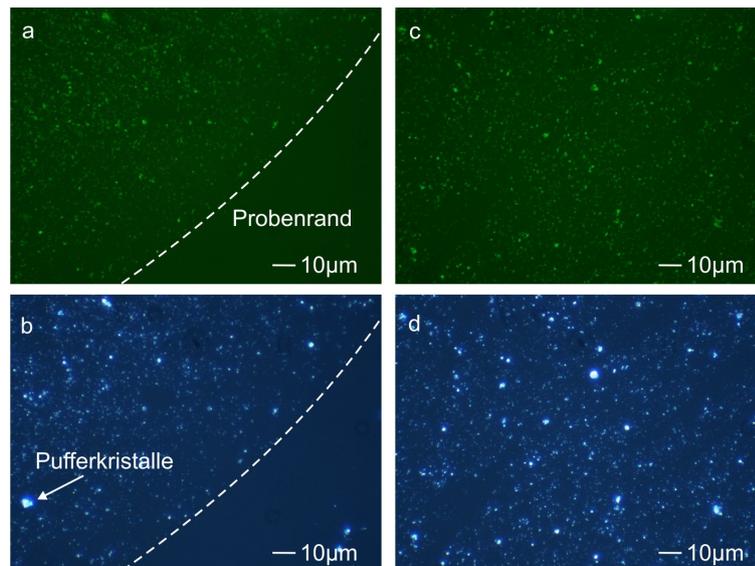
**Abbildung 4.29:** Schematische Übersicht über die Konjugation von Antikörpern an die aminierte Hülle der SERS-Marker. Zur Erhöhung der Anzahl funktioneller Gruppen und als Linkermolekül dient ein Carboxyl-Dendrimer. Die Effizienz der Reaktion wird unter Verwendung einer Kombination von EDC und sulfo-NHS erhöht. Aufgrund der besseren Reaktivität des sulfo-NHS-Esters mit Aminen nimmt die Anzahl stabiler Amid-Bindungen zu.

Bereich von 4:1 [106]. Das Carboxyl-Dendrimer G4.5 stellte sich in allen Versuchen als sehr effizient heraus.

Die erfolgreiche Konjugation der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper wurde mittels eines Fluoreszenzmikroskops an eingetrockneten ISM überprüft. Erst bei einer 50x Vergrößerung der Nanopartikel konnte ein Fluoreszenzsignal der Antikörper auf den Nanopartikeln detektiert werden (Abb. 4.30).

Ein Vergleich der Dunkelfeld- und Fluoreszenzbilder zeigt die Kolkalisierung der ISM und bestätigt folglich deren erfolgreiche Funktionalisierung. Andere Methoden zum Nachweis einer effektiven Antikörperbindung an die mit APTES modifizierte Nanopartikel, wie ein enzymatischer Nachweis mittels des Enzyms HRP und dem umzusetzenden Stoff TMB, waren zu ungenau. Bindungsversuche an Zellen konnten ebenfalls nicht zur Überprüfung einer erfolgreichen Konjugation der Antikörper herangezogen werden, da zu viele Faktoren, wie der Zustand der Zellen, Einfluss haben können und das ideale Medium, die Inkubationszeit sowie die ISM-Konzentration noch nicht ermittelt werden konnten.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll die Anwendung von ISM an verschiedenen Zelllinien und Zelltypen getestet werden. Dazu zählt die Überprüfung der spezifischen und unspezifischen Bindungen von funktionalisierten (ISM) und nicht funktionalisier-



**Abbildung 4.30:** Fluoreszenzbild (a, c) und Dunkelfeldbild (b, d) der ISM (50x Objektiv) nach der Konjugation der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor<sup>®</sup>488) markierten Antikörper.

ten (SM) Nanopartikeln an Zellen des Mammakarzinoms (MCF-7) und Blutzellen (Leukozyten). Hierfür wurde der Antikörper anti-EpCAM-Alexa-Fluor<sup>®</sup>488 verwendet. Aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Antigens für EpCAM bei Leukozyten und menschlichen Vorhautfibroblasten (HFF) wurden diese als Referenzen herangezogen. Für Spezifitätstests wurden zudem die Mammakarzinom-Zelllinien BT-20 und SKBR3 verwendet. Eine subzelluläre Verteilung von ISM wurde mit Raman-Bildgebung und Dunkelfeld-Mikroskopie nachgewiesen. Im Anschluss wurden Viabilitätstests mit lebenden Tumorzellen durchgeführt, welche die geringe Toxizität der ISM veranschaulichen.

Ein weiteres interessantes Thema, welches bearbeitet wurde, waren die Messungen von ISM-markierten Zellen in einem Mikrofluidikchip. Dieser Ansatz soll die Möglichkeiten der ISM in der Anwendung zur schnellen Detektion von CTCs wiedergeben. Die Unterscheidung von Tumorzellen und Leukozyten war mit sehr kurzen Messzeiten möglich.

## 4.10 Auswahl geeigneter Zellen und Antikörper

Aufgrund der Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (EpCAM) sind die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, BT-20 und SKBR3 bestens als Modell für zirkulierende Tumorzellen und für die Anwendung des gleichnamigen Antikörpers geeignet. EpCAM ist ein Glykoprotein, das in epitheliale Gewebe exprimiert wird. In den meisten Karzinomen ist es überexprimiert. Dieses Molekül ist für die Adhäsion von Zellen verantwortlich und nimmt an wichtigen Prozessen wie der Zell-

Signalisierung, Zellmigration, Proliferation und Differenzierung teil. Deshalb spielt EpCAM in klinischen Studien zur Immuntherapie an soliden Tumoren sowie bei der Erkennung und Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen eine bedeutende Rolle [85].

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) sind mesenchymalen Ursprungs und exprimieren kein EpCAM. Sie werden daher für Tests zur Spezifität eingesetzt. Fibroblasten machen den Hauptbestandteil des Bindegewebes aus. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese der Interzellulärsubstanz, welche zum Aufbau der Extrazellulärmatrix benötigt wird. So dienen zum Beispiel das so gebildete Kollagen und die Proteoglykane der Festigkeit der Extrazellulärmatrix. Fibroblasten sind daher von großer Bedeutung bei der Wundheilung.

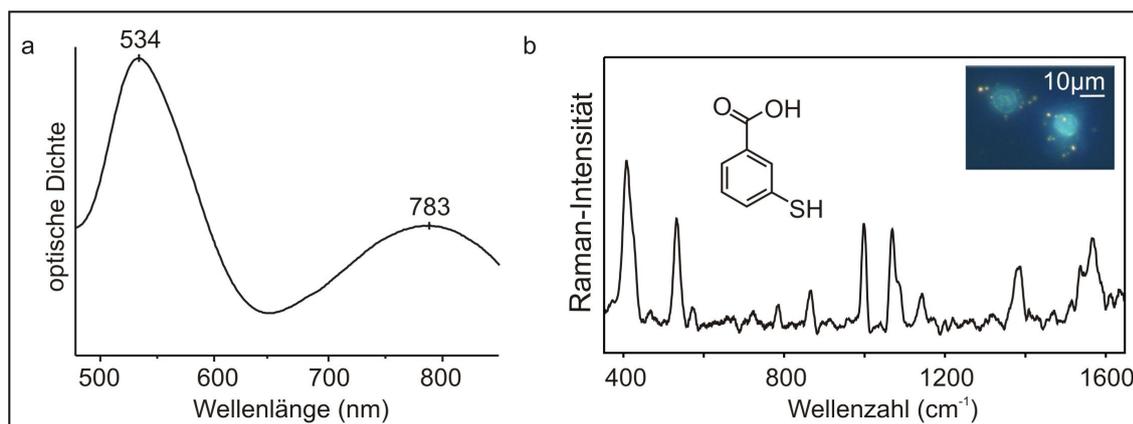
Leukozyten (griechisch für „Weiße Zellen“) sind kernhaltige Zellen des Blutes, die keinen Blutfarbstoff (Hämoglobin) tragen. Sie werden unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Knochenmark aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet (Leukopoese) und gelangen von dort aus in den Blutstrom. Sie spielen im Körper eine wichtige Rolle des Immunsystems. Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der Erkennung körpereigener und -fremder Strukturen, der Bildung von Antikörpern und der Phagozytose von Krankheitserregern wie Bakterien und Viren sowie körpereigener Abbauprodukte. Leukozyten besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktion sehr differenzierte morphologische Eigenschaften. Da sie zu den mesenchymalen Zellen gehören, exprimieren sie wie die HFF kein EpCAM und können neben der eigentlichen Anwendung für Spezifitätstests genutzt werden.

### 4.11 Detektion von Tumorzellen mittels ISM

ISM eignen sich aufgrund ihrer Resonanzbedingungen sehr gut für die Anregung mit 785 nm (Abb. 4.31a). Im Vergleich zu SM lässt sich eine Verschiebung beider Absorptionsmaxima aufgrund der Konjugation der Antikörper um wenige Nanometer zu längeren Wellenlängen hin erkennen. Das SERS-Spektrum ermöglicht bei Messungen einzelner Zellen bereits innerhalb von 50 ms eine Identifizierung von Zellen des Mammakarzinoms. Eine erfolgreiche Detektion lässt sich teilweise schon im Dunkelfeldbild erkennen (Abb. 4.31b).

Für die Detektion von vitalen Tumorzellen ist es notwendig, die Spezifität und Sensitivität der ISM zu überprüfen. Hierfür ist die Auswahl geeigneter Zelllinien sehr wichtig. Bekannte Mammakarzinom-Zelllinien wie MCF-7, BT-20 und SKBR-3 sind gut etablierte Untersuchungsobjekte. Ihre unterschiedlich starke Expression von Antigenen wie z.B. HER2/neu (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) und EpCAM (EpCAM = *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), welche als Tumormarker immer mehr an Bedeutung zunehmen, sowie ihre einfache Kultivierbarkeit und folglich ständige Verfügbarkeit, machen sie zu optimalen Testobjekten.

Eigene Nachforschungen haben ergeben, dass noch nicht über die Verwendung von anti-EpCAM-Antikörpern in Kombination mit ISM berichtet wurde, obwohl sich im Verlauf dieser Arbeit gezeigt hat, dass dieser Antikörper zuverlässiger arbeitet als



**Abbildung 4.31:** Absorptionsspektrum von ISM in einer Suspension (a). SERS-Spektrum einer mit ISM markierten MCF-7 Zelle in Suspension ( $t=50$  ms, 40x Objektiv). Als Raman-Reporter wurde 3-Mercaptobenzoessäure verwendet (Vergleiche mit Abb. 4.14). Dunkelfeldaufnahme von einer auf einem Objektträger aufgewachsenen und markierten Zelle. Jeder gelbe Punkt stellt mehrere ISM dar (b).

es bei HER2/neu der Fall ist. Da die Anbindung des puren Antikörpers HER2/neu an Zellen des Mammakarzinoms sehr gut funktioniert, liegt der Verdacht nahe, dass dessen Funktionalität nach der Anbindung an die ISM eingeschränkt ist.

Die Antikörper-Antigen-Bindung erfolgt zwischen Epitopen und Paratopen über viele nicht kovalente Kräfte wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Bindungen, Van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Unspezifische Bindungen kommen wegen derselben schwachen und nicht-kovalenten Wechselwirkungen zustande. Sie können zwischen Proteinen oder zwischen Proteinen und Festphasenoberflächen entstehen. Diese ungewollten Interaktionen können in der Regel mit entsprechenden Blockpuffern, die richtige Wahl des Antikörpers und dessen Konzentration minimiert werden.

Um unspezifische Bindungen sowie Internalisierungen der ISM durch Tumorzellen zu verhindern, müssen Inkubationszeiten und Konzentrationen der ISM genau eingestellt werden. Zur Verdeutlichung signifikanter Unterschiede wurden bis zu 100 einzelne Zellen pro Versuch gemessen.

Erste Untersuchungen zur Einstellung der Konzentration wurden an nicht mit Antikörpern funktionalisierten SERS-Markern (SM) durchgeführt, um zu überprüfen, ob und wann die stark proliferierenden Tumorzellen die Nanopartikel über Endozytose internalisieren. Zum Vergleich wurden die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und aus Patientenblut aufgereinigte Leukozyten herangezogen, um einer späteren Anwendung auf Patientenblut so nah wie möglich zu kommen.

Wegen der fehlenden Antikörper ist keine oder nur eine unspezifische Bindung der SM an die Zellen zu erwarten, welche über Raman-Messungen überprüft werden kann. Zellen, an welche SM gebunden haben, sollten folglich das Spektrum des Raman-Reporter-Moleküls zeigen. Die folgenden Prozentwerte geben den Anteil der gemessenen Zellen an, welche ein SERS-Signal lieferten, was ein Indiz für die unspezifische

Bindung der SM ist. Nach der Inkubation der MCF-7 Zellen für 1 h mit einer SM Konzentration ( $OD_{532nm} = 0.11$ ) konnte keine unspezifische Bindung nachgewiesen werden. Bei Verwendung einer höheren SM-Konzentration ( $OD_{532nm} = 0.15$ ) zeigten 70% der Tumorzellen ein SERS-Signal (unspezifische Bindung) des Raman-Reporters (Abb. 4.32). Im Gegensatz hierzu lieferten die Leukozyten in beiden Fällen keine messbaren SERS-Signale des Raman-Reporter-Moleküls (Abb. 4.32). Zu erklären ist dies mit einer geringeren Proliferationsrate der Leukozyten im Vergleich zu den sich stark vermehrenden Tumorzellen. Ein Vorteil liegt hier in der möglichen Detektion von Tumorzellen, deren relevante Antigene nicht oder nur teilweise exprimiert werden. Diese würden schneller mit den SM interagieren als die weißen Blutzellen und könnten somit von diesen Raman-spektroskopisch differenziert werden. Dabei ist zu beachten, dass Leukozyten nach längeren Inkubationszeiten und sehr hohen Konzentrationen ebenfalls mit der Internalisierung der SM beginnen.

$OD_{534}$	SM		ISM	
	MCF-7	Leukozyten	MCF-7	Leukozyten
0.11	0%	0%	75%	0%
0.13			100%	0%
0.15	70%	0%	100%	0%

**Abbildung 4.32:** Anzahl der mit SM und ISM markierten Zellen bei Verwendung unterschiedlicher Nanopartikel-Konzentrationen

Bei dem Prozess der Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen kommt es zuerst zu einer Anlagerung der Partikel an die Zellmembran. Dies erfolgt über Wechselwirkungen zwischen Molekülen auf der Nanopartikel-Oberfläche und der Plasmamembran. Im Anschluss kommt es zu einer endozytotischen Aufnahme der Partikel und deren Ansammlung in Membran-umschlossene Kompartimente (Phagosom, Lysosom). Die Endozytoserate variiert in Abhängigkeit von der Temperatur, Nanopartikel-Konzentration, Größe und Oberflächenbeschaffenheit sowie deren Interaktion mit der Zellglykokalix (Schicht aus Zuckerresten an der Außenfläche der Zellmembran), aber auch vom Zustand der Zellen und dem verwendeten Puffer [58].

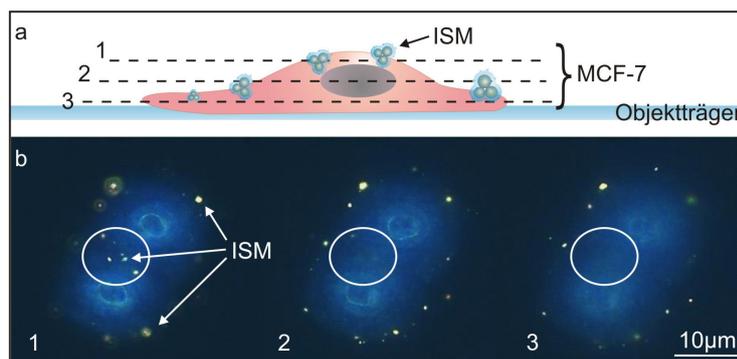
Zur Vermeidung einer endozytotischen Aufnahme der Nanopartikel durch die Zellen wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei geringen Temperaturen verringert sich die Flexibilität der Fluid-Mosaik-Struktur der Zellmembran, wobei alle Membran-gekoppelten Mechanismen auf ein Minimum reduziert werden.

Im weiteren Verlauf wurden mit anti-EpCAM funktionalisierte ISM getestet. Deren Spezifität zur Detektion von Tumorzellen wurde in analoger Weise geprüft. EpCAM wird in MCF-7 Zellen exprimiert, daher ist eine spezifische Bindung der ISM an diese Zellen zu erwarten. Bei einer Konzentration der ISM ( $OD_{534nm} = 0.11$ ) konnten an 75 % der MCF-7 Zellen nach erfolgreicher Antikörper-Antigen-Bindung die SERS-Spektren des Reporter-Moleküls erfasst werden (Abb. 4.32). Verglichen mit den Ergebnissen der SM erfolgte hier eine richtig-positive Zellerkennung. Nach Erhöhung der Konzentration auf ( $OD_{534nm} = 0.15$ ) konnten bei allen MCF-7 Zellen (100%) SERS-Spektren der ISM aufgenommen werden. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse

ist dies wahrscheinlich die Folge spezifischer sowie unspezifischer Bindungen der ISM an die Membran der MCF-7 Zellen.

Einerseits wurden nur 75 % der MCF-7 Zellen mit einer Konzentration der ISM von  $OD_{534nm} = 0.11$  erfasst, auf der anderen Seite war diese Detektion der Zellen sehr spezifisch. Um die Anbindung an alle Zellen zu gewährleisten (Spezifität von 100 %) muss die ISM Konzentration erhöht werden. Dabei sollte die ISM-Konzentration unterhalb ( $OD_{534nm} = 0.15$ ) bleiben, um unspezifische Wechselwirkungen mit der Zellmembran zu vermeiden. Aufgrund dieser Resultate und Überlegungen wurde in weiteren Experimenten eine Konzentration mit einer optischen Dichte von ( $OD_{534nm} = 0.13$ ) verwendet. Nach Einstellen der Konzentration und unter Verwendung einer Inkubationszeit von 1 h konnte bei allen (100 %) der 106 gemessenen MCF-7 Zellen eine erfolgreiche Bindung nachgewiesen werden (Abb. 4.32). Ob diese wirklich spezifisch ist, wurde nicht wie zuvor mit nicht funktionalisierten SERS-Markern überprüft, sondern aus Gründen einer höheren Genauigkeit mit ISM sowie einer EpCAM negativen Zelllinie (Vorhautfibroblasten). Hierauf wird etwas später noch eingegangen.

Inkubationszeiten von 1 h erwiesen sich als sehr effektiv und ausreichend. Ein Test zu längeren Inkubationszeiten ergab, dass selbst nach 2h keine Aufnahme von ISM ( $OD_{534nm} = 0.13$ ) in das Zytoplasma der Zellen erfolgte. Dunkelfeld-Bilder von drei verschiedenen Ebenen einer MCF-7 Zelle zeigten das Vorhandensein von ISM nur an der oberen Zellmembran, hingegen nicht im Zytoplasma und der dem Objektträger zugewandten unteren Zellmembran (Abb. 4.33b 1-3). Zwischen einer spezifischen Bindung und einer beginnenden Endozytose kann hier jedoch nicht unterschieden werden. Die Größe der ISM von ca. 120 nm kann der Grund dafür sein, dass die ISM wesentlich langsamer durch die Zellen internalisiert werden. Kürzere Inkubationszeiten von einer halben Stunde führten zu unvollständigen Bindungen der ISM an MCF-7 Zellen, was zu ähnlichen Ergebnissen wie bei Verwendung niedriger ISM Konzentrationen ( $OD_{534nm} = 0.11$ ) führte.



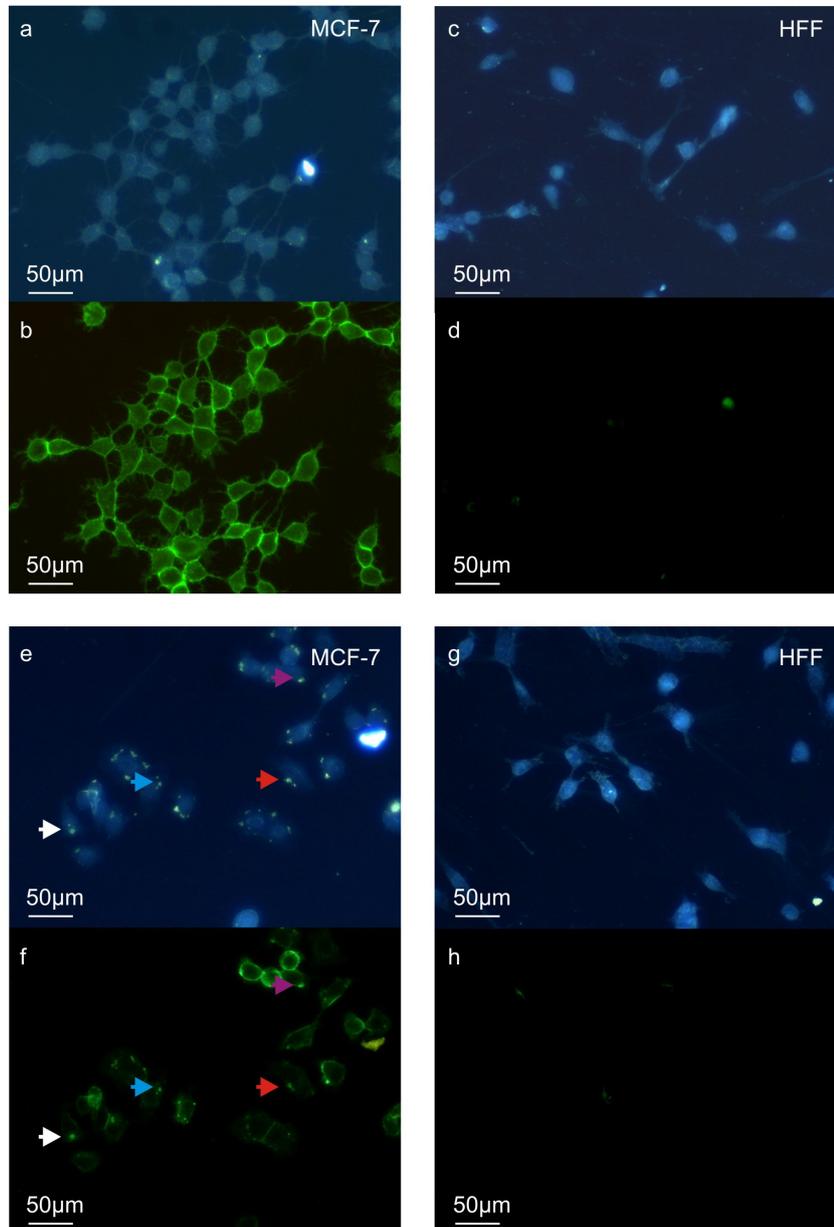
**Abbildung 4.33:** Graphische Darstellung der Fokusebenen durch eine MCF-7-Zelle (a). Dunkelfeld-Aufnahmen einer MCF-7-Zelle in drei unterschiedlichen Ebenen nach Inkubation mit Immun-SERS-Markern (ISM) für 2 h ( $OD_{534nm} = 0.13$ ) (b1-3). Die Kreise umranden ISM auf der oberen Zellmembran (1), nicht aber im Zytoplasma (2) und aufgrund der Orientierung der Zelle nicht an der unteren Membran (3).

Für die Unterscheidung von Tumorzellen und Blutzellen in einer vorbehandelten Blutprobe musste die Spezifität der ISM zusätzlich an Leukozyten getestet werden. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen der ISM ( $OD_{534nm} = 0.11; 0.13; 0.15$ ) mit Leukozyten für eine Dauer von 1 h inkubiert. Aufgrund der fehlenden Expression von EpCAM-Antigenen sollte keine Bindung der ISM erfolgen. Das Auftreten möglicher unspezifischer Bindungen wurde mittels SERS-Spektroskopie überprüft. Für alle drei untersuchten ISM-Konzentrationen konnten keine unspezifischen Bindungen an der Leukozyten-Membran (Abb. 4.32) beobachtet werden.

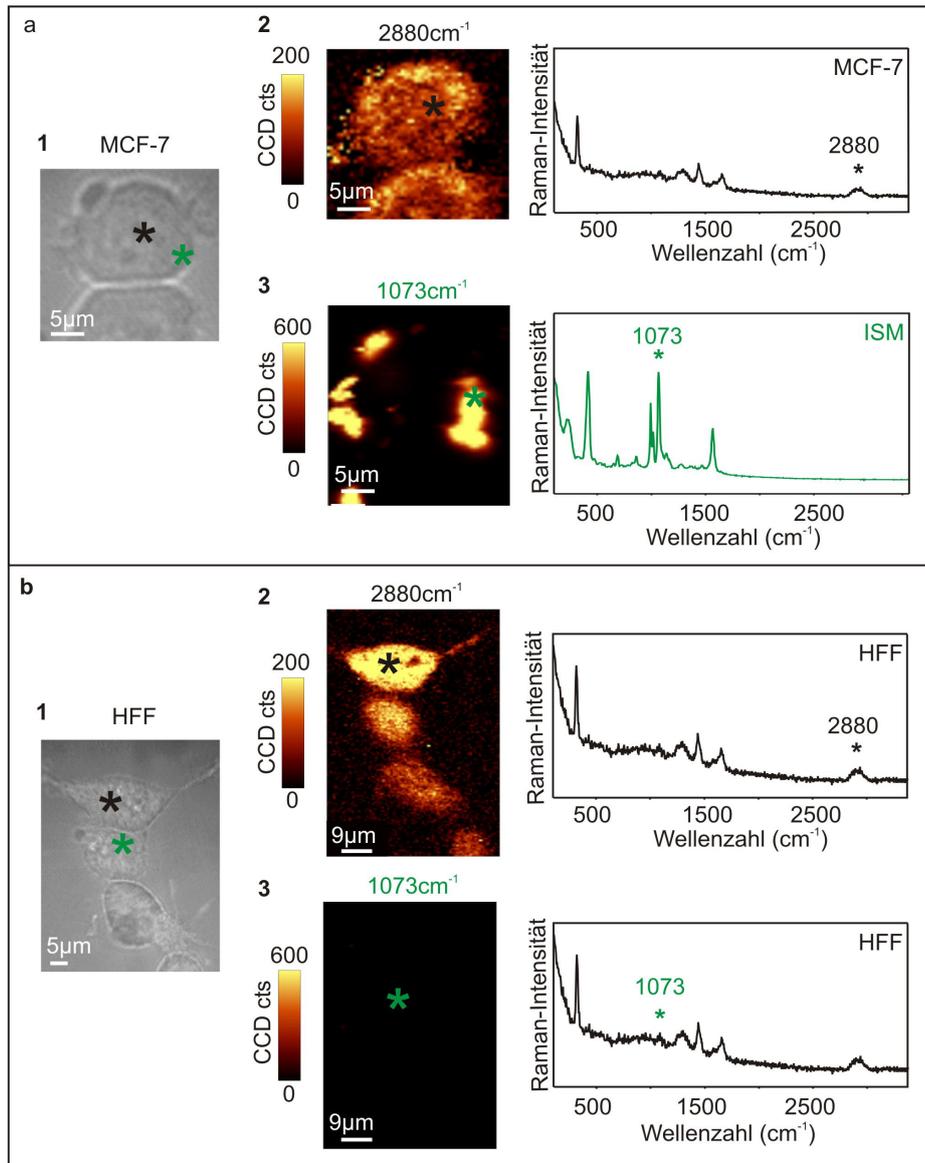
Neben den nicht-adhären wachsenden Leukozyten wurden auch adhären Zellen für Spezifitätstests eingesetzt. Mesenchymale Vorhautfibroblasten (HFF) exprimieren wie die Leukozyten keine EpCAM-Antigene. Sie eignen sich daher hervorragend als Model. HFF und MCF-7 wurden auf  $CaF_2$ -Objektträgern gezüchtet und mit dem reinen fluoreszenzmarkierten anti-EpCAM Antikörper (AlexaFluor<sup>®</sup>488) oder mit ISM inkubiert (Abb. 4.34). Der Vergleich von Dunkelfeld- und Fluoreszenzbildern zeigt die Bindung von anti-EpCAM Antikörpern an MCF-7 Zellen, nicht aber an HFF (a-d). Die mit ISM behandelten Proben zeigen im Dunkelfeld- und Fluoreszenzbild eine erfolgreiche Anbindung dieser an MCF-7 (e, f). Hingegen konnten keine ISM an den HFF (g, h) nachgewiesen werden.

Leider war dieser schnelle und einfache Nachweis der ISM nicht bei allen lebenden Zellen möglich, da das Fluoreszenzsignal aufgrund der geringeren Anzahl von ISM und deren Kontrast zu den Zellen nicht ausreichte. Zudem machte die inhomogene Zelloberfläche eine Darstellung der ISM schwierig. Einzig Cluster von ISM zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal nach der Anbindung auf der Zielzelle (Abb. 4.34f). Für eine genauere Charakterisierung und deutlichere Analyse der Verteilung der ISM wurden die Zellen mittels Raman-Spektroskopie vermessen (Abb. 4.35). Hiermit wurden auch die ISM detektiert, welche unter den hier verwendeten Parametern fluoreszenzmikroskopisch nicht visualisierbar waren. Raman-Messungen erlauben die Darstellung von Molekülschwingungen mittels einer chemischen Kartierung. Die Verteilung der CH-Streckschwingung [131] beider Zelltypen (Abb. 4.35a, b (2)) konnte entsprechend dargestellt werden und ein Abbild der Zelle schaffen. Alle Zell-Spektren wurden hierfür in der gleichen Intensitätsstärke dargestellt. Dies gilt ebenso für die Spektren des Raman-Reporter-Moleküls Thiophenol, welches eine markante Bande bei  $1072\text{ cm}^{-1}$  besitzt. MCF-7 Zellen zeigten deutliche und starke Signale des Reporter Moleküls Thiophenol (Abb. 4.35a (3)). Dies ist ein Indiz für die spezifische Bindung der ISM auf der Zellmembran. Die chemische Kartierung mittels der typischen Thiophenol Bande bei  $1072\text{ cm}^{-1}$  zeigte bei den HFF so geringe Signale, dass diese eindeutig dem Rauschen zuzuordnen sind und daher die Abwesenheit der ISM bewiesen ist (Abb. 4.35b (3)). Die Verteilung der ISM auf der Zellmembran ist inhomogen und konzentriert sich stärker auf die Randbereiche der Zelle. Dies scheint jedoch ähnlich wie bei den Fluoreszenzbildern eine Folge der Fokussierung zu sein. Das typische Raman-Spektrum der MCF-7 Zellen (Abb. 4.35a (2)) wird durch die spektralen Beiträge des Reporter Moleküls Thiophenol (Abb. 4.35a (3)) dominiert.

Zum Vergleich zeigt ein typisches Raman-Spektrum der HFF (Abb. 4.35b (2)) spektrale Beiträge von Proteinen und Lipiden, jedoch keine des Reportermoleküls (Abb. 4.35b (3)).



**Abbildung 4.34:** Dunkelfeld- und Fluoreszenzbilder von MCF-7 (a, e und b, f) und HFF (c, g und d, h) nach Inkubation mit anti-EpCAM-Antikörpern (a-d) und ImmunsERS-Markern (ISM) (e-h). Die Pfeile markieren ISM im gleichen Bereich von Dunkelfeld- und Fluoreszenz-Aufnahmen (e, f). (vitale Zellen in Puffer, 20x Objektiv)

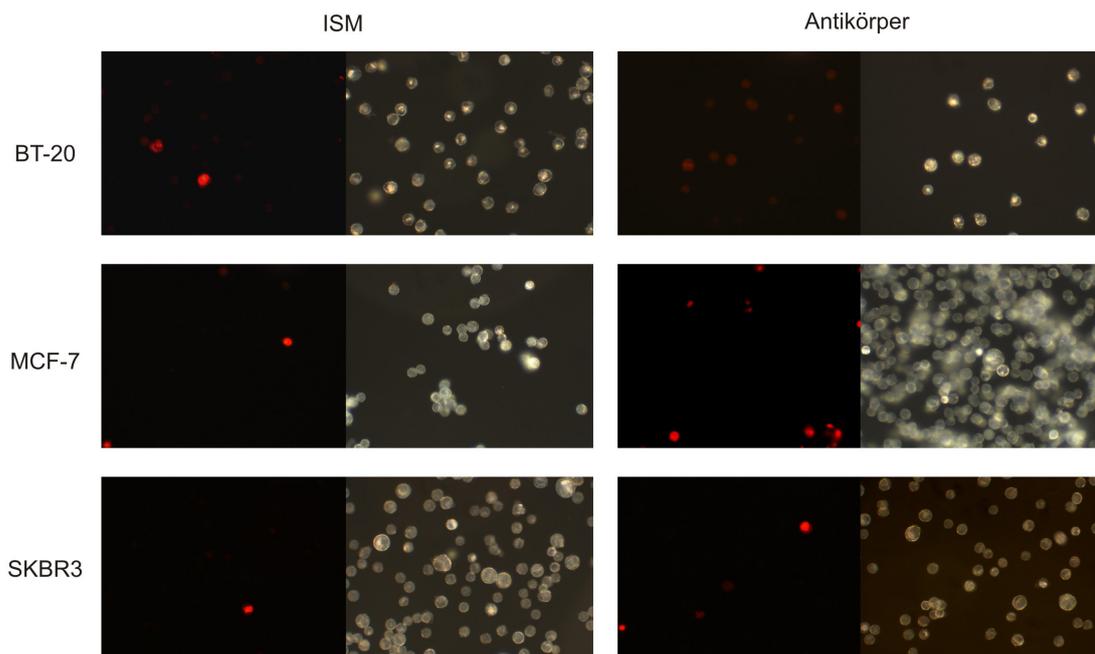


**Abbildung 4.35:** Hellfeldbild von MCF-7 Zellen und HFF (1). Chemische Karte der Verteilung der CH-Streckschwingung bei  $3020\text{ cm}^{-1}$  von MCF-7 und HFF (2) sowie das entsprechende Raman-Spektrum beider Zelltypen. Die Sterne markieren die Bereiche der Zelle, in welchen das dargestellte Spektrum aufgenommen wurde. Verteilung der Bande des Raman-Reporters Thiophenol bei  $1073\text{ cm}^{-1}$  auf MCF-7 und HFF (3) sowie repräsentative Raman-Spektren aus den mit einem grünen Stern markierten Bereichen. (60x Wasserimmersions-Objektiv, Messzeit: 0.5 s, Schrittweite:  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ )

## 4.12 Immun-SERS-Marker und Zellviabilität

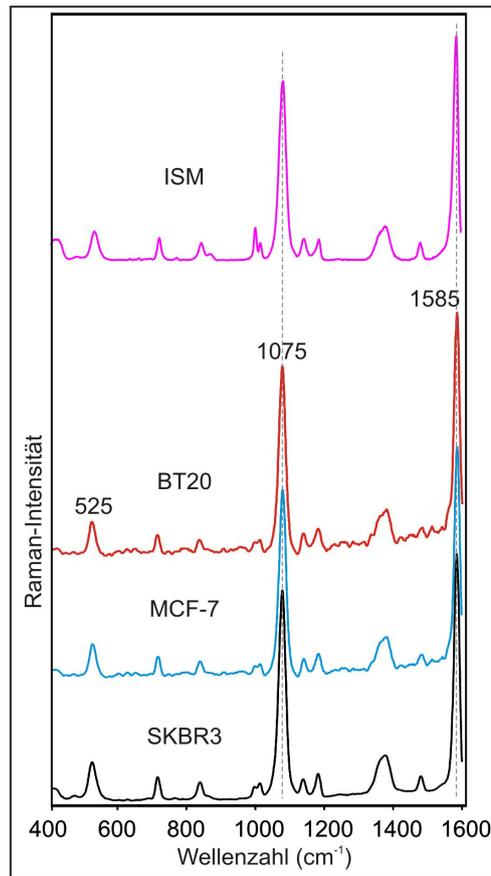
Nanopartikel-Aggregate zeigen direkte und indirekte Vorteile für die Arbeit mit vitalen Proben, welche im Folgenden beschrieben werden. Eine Optimierung der Au-Nanokugeln für die Anregung mit einem nah-infraroten Laser setzt deren Aggregation voraus. Unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 785 nm und kurzen Messzeiten erfolgt keine Photodegradation in lebenden Zellen, welche bei der Anregung mit sichtbarem Licht beobachtet wurde [82]. Auch die Größe der Nanopartikel-Aggregate spielt eine wichtige Rolle für biologische Anwendungen. Yu et al. [132] berichteten über zytotoxische Eigenschaften amorpher Siliciumdioxid-Nanopartikel mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm. Folglich ist die Größe der Nanopartikel entscheidend für mögliche zytotoxische Effekte. Diese Hypothese wurde in einer toxikologischen Studie an Mäusen mit SERS-aktiven Nanopartikeln mit einer Größe von 100 nm im Durchmesser bestätigt [133]. Daher sollten die synthetisierten Nanopartikel-Aggregate einen größeren Durchmesser als 100 nm aufweisen. Da die Trägheit der Partikel mit deren Größe und Masse zunimmt, wurde die maximale Größe anhand der Sedimentationsgeschwindigkeiten ermittelt. Dies erfolgte anhand eines einfachen visuellen Testes. Dazu wurden die Nanopartikel-Aggregate für 1 h bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Dies entspricht der ermittelten optimalen Inkubationszeit der ISM mit den Tumorzellen. Nanopartikel, welche während dieser Zeit sedimentieren, lagern sich auf den Zellen oder am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Dies würde zu unspezifischen Interaktionen zwischen den Zellen und Nanopartikeln führen. Des Weiteren würden sich die Nanopartikel durch Sedimentation der Reaktion entziehen, was zu einer Konzentrationsveränderung führt. Aus diesen Gründen darf es während dieser Zeit zu keiner Sedimentation der Nanopartikel kommen. Wenn es zu Ansammlungen der Aggregate am Boden des Reaktionsgefäßes gekommen wäre, hätte man dies deutlich erkannt. Nanopartikel mit einer Größe von etwa 120 nm zeigen dieses Verhalten nicht. Neben dem Durchmesser der Nanopartikel-Aggregate spielt die Umhüllung eine wichtige Rolle für Versuche mit vitalen Zellen. Siliciumdioxid wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Umhüllung und Stabilisierung von Nanopartikeln für biologische Anwendungen eingesetzt [84].

Viabilitätstests wurden an adhärent wachsenden Zellen des Mammakarzinoms (BT-20, MCF-7 und SKBR3) während der Inkubation mit ISM ( $OD_{534nm} = 0.13$ ) durch Zugabe von Propidiumiodid durchgeführt. Propidiumiodid wirkt als Nucleinsäureinterkalator. Der Farbstoff durchdringt die perforierte Zellmembran von toten Zellen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen. Die Einlagerung des Moleküls in die Nucleinsäuren führt zu einer deutlichen Rotfärbung des Nucleus (Zellkern) der Zellen. Durch die flachen aromatischen Ringsysteme des Propidiumiodides kann sich dieses zwischen die Basen der DNA einschieben. Ionische Wechselwirkungen, durch eine positiv geladene Gruppe am Interkalator und das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA, stabilisieren den sich bildenden Komplex. In Folge dessen färbt sich der Nucleus nekrotischer und apoptotischer Zellen. Die Mehrheit der Zellen zeigt keine Fluoreszenz (Abb. 4.36), was die geringe Toxizität der ISM bei einer Konzentration von  $OD_{534nm} = 0.13$  bestätigt.



**Abbildung 4.36:** Zellviabilitätstest mit Propidiumiodid. Fluoreszenz- und Dunkelfeldbilder der Mammakarzinom-Zelllinien BT-20, MCF-7 und SKBR3 nach Inkubation mit ISM bzw. anti-EpCAM Antikörpern. Der Zellkern toter Zellen fluoresziert rot.

Bis auf BT-20 zeigten nur wenige Zellen einen deutlich rot fluoreszierenden Zellkern, wobei kein signifikanter Unterschied in deren Anzahl bei der Inkubation mit ISM oder reinem EpCAM-Antikörpern besteht und auf die notwendige Behandlung der Zellen schließen lässt. Im Vergleich zeigten die BT-20 Zellen einen höheren Anteil rot fluoreszierender Zellkerne in beiden Proben, was auf eine allgemeine Beeinträchtigung der Zellen zurückzuführen ist. In nicht-synchronisierten Zellkulturen ist dies immer zu erwarten, da sich die Zellen in verschiedenen Phasen ihres Lebenszyklus befinden. Parallel wurden Zellen aus der gleichen Probe Raman-spektroskopisch vermessen, um den Nachweis zu erbringen, dass die ISM tatsächlich daran gebunden haben. Hierfür wurden jeweils 60 Zellen pro Zelllinie gemessen. Es zeigte sich eine erfolgreiche Markierung aller gemessenen Mammakarzinom-Zelllinien. Abbildung 4.37 zeigt ein Mittelwert-Spektrum des Raman-Reporters 4-Mercaptobenzoessäure vor und nach der Anbindung der ISM an die verschiedenen Zelllinien.

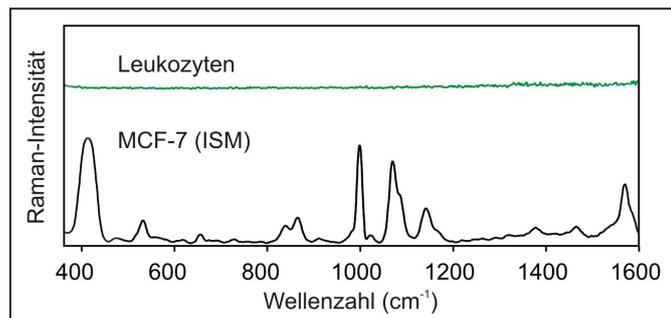


**Abbildung 4.37:** SERS-Spektrum von ISM in Suspension sowie Mittelwertspektren von je 60 MCF-7, BT-20 und SKBR3 Zellen nach der Inkubation mit ISM und Propidiumiodid für 1 h unter Verwendung des Raman-Reporters 4-Mercaptobenzoessäure ( $t=25$  ms, 40x Objektiv).

## 4.13 Differenzierung von Tumorzellen und Leukozyten im Mikrofluidikchip

Der Anwendung in einem mikrofluidischen System ging folgender Test voraus. MCF-7 Zellen und Leukozyten wurden mit ISM ( $OD_{534nm} = 0.13$ ) bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. SERS-Messungen zeigten die erfolgreiche Markierung der Zelllinie MCF-7 nach Zugabe der ISM. Der Antikörper Anti-EpCAM zeigte eine spezifische Bindung an MCF-7, nicht aber an Leukozyten. Dementsprechend erzeugten alle der gemessenen 100 MCF-7 Zellen ein SERS-Signal des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure (Abb. 4.38). Von den 100 ebenfalls mit den ISM inkubierten Leukozyten zeigte keine ein SERS-Signal.

Mit diesen Proben (Abb. 4.39a) konnte nun die Differenzierung zwischen den Tumorzellen und den weißen Blutzellen (Leukozyten) in einem Chip mit kontinuierlichem Fluss realisiert werden (Abb. 4.39b).



**Abbildung 4.38:** SERS-Mittelwertspektren von 100 MCF-7 Zellen und 100 Leukozyten nach der Inkubation mit ISM für 1h unter Verwendung des Raman-Reporters 3-Mercaptobenzoessäure ( $t=1$  s, 40x Objektiv).

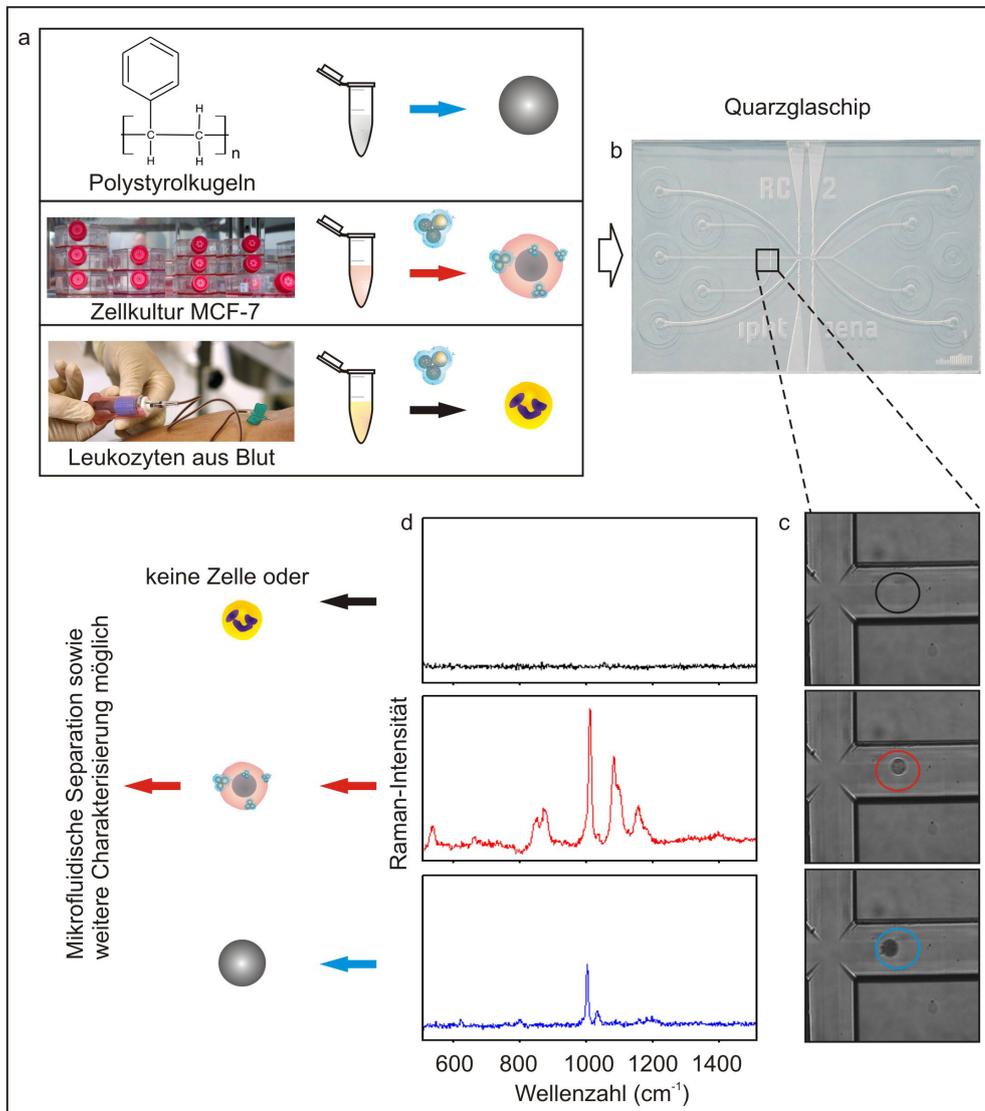
ISM eignen sich nicht zur Unterscheidung unterschiedlich stark exprimierter Proteine (z.B. HER2/neu), wie es bei MCF-7, BT-20 und SKBR3 der Fall ist. Ihre Inhomogenität und demzufolge variierenden plasmonischen Eigenschaften beeinflussen die Gesamtintensität des SERS-Signals sehr stark. Da sich verschiedene Zelltypen visuell nicht eindeutig voneinander unterscheiden lassen und die erwähnten Tumorzellen sich nur in der Intensität der Expression ihrer Antigene unterscheiden, wurden neben Leukozyten nur MCF-7 Zellen für den Versuch herangezogen.

Zusätzlich wurden Polystyrolkugeln dem Zellgemisch zugegeben, um eine weitere Zelllinie zu simulieren (Abb. 4.39a). Die sphärischen, etwa  $20\ \mu\text{m}$  großen Partikel sind sehr homogen und erscheinen im Lichtbild wesentlich kontrastreicher als die Zellen (Abb. 4.39c). Daher sind sie in einem Zellgemisch leicht zu identifizieren. Aufgrund ihrer molekularen Struktur zeigen sie intensive Banden im selben spektralen Bereich, wie der Raman-Reporter 3-Mercaptobenzoessäure, welcher für diesen Versuch ausgewählt wurde (Abb. 4.39d). Polystyrolkugeln dienen hier der Überprüfung einer möglichen Differenzierung sehr ähnlicher SERS-Spektren (Multiplexpotential). Neben der Ähnlichkeit zum SERS-Spektrum des Raman-Reporters zeigen die Polystyrolkugeln eine vergleichbare Größe zu den Zellen.

Quarzglas weist keine störenden Raman-Banden auf und ist daher sehr gut für die Fertigung eines Mikrofluidikchips zur Messung mit ISM markierter Zellen geeignet. Darüber hinaus sollten auch andere Materialien (z.B. Glas, Polymere), aufgrund des intensiven SERS-Signals, in diesem Bereich Anwendung finden. Bei einer Geschwindigkeit von  $0.5\ \text{nl/s}$  und Messzeiten von  $25\ \text{ms}$  bei einer eingestellten Leistung von  $100\ \text{mW}$  konnten schnellstmögliche Messungen der im Fluss befindlichen Zellen durchgeführt werden. Aufgrund zellulärer Eigenschaften kam es bei den Versuchen zu starken Agglutinationen der Zellen (MCF-7 und Leukozyten). Einzelzellmessungen konnten trotz allem durchgeführt werden. Die Funktionalisierung der ISM mit anti-EpCAM Antikörpern führte zu einer sehr spezifischen Bindung dieser an die Zellmembran der MCF-7 Zellen und ermöglichte einen schnellen und spezifischen Nachweis dieser. Dies zeigt eine vielversprechende Möglichkeit, der Anwendbarkeit eines mikrofluidischen Systems in Kombination mit Immun-SERS zur Detektion tumorverdächtiger Zellen aus einer Blutprobe.

#### 4.13 Differenzierung von Tumorzellen und Leukozyten im Mikrofluidikchip

Weiterhin erfolgte eine sehr gute Trennung der Polystyrolkugeln von den MCF-7 Zellen. Hierfür wurden über ein bilineares Modell die intensivsten Banden bei  $1003\text{ cm}^{-1}$  [134] und  $1068\text{ cm}^{-1}$  zur Unterscheidung herangezogen. Hiermit konnte noch einmal das gute Multiplexpotential verdeutlicht werden.



**Abbildung 4.39:** Übersicht über die Messungen im Mikrofluidikchip. Polystyrolkugeln sowie mit ISM inkubierte MCF-7 Zellen und Leukozyten werden zusammen in den Chip gefüllt und in diesem Raman-spektroskopisch vermessen ( $t=25\text{ ms}$ ,  $40\times$  Objektiv,  $P=100\text{ mW}$ ). Raman-Messungen zeigen kein Signal bei den Leukozyten (schwarz), ein SERS-Signal der ISM bei den MCF-7 Zellen (rot) und ein Raman-Signal der Polystyrolkugeln (blau). Entsprechend der Spektren kann eine Separierung der Tumorzellen erfolgen mit anschließender weiteren Charakterisierungen.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden erfolgreich Immun-SERS-Marker synthetisiert und für die Detektion von Tumorzellen eingesetzt. Für diesen Zweck stellten sich 45 nm große Au-Nanokugeln nach deren Aggregation und Ag-Umhüllung als sehr effizient für die Anregung mit einem 785 nm Laser heraus. Erfolgreich verwendete Raman-Reporter weisen einen aromatischen Ring verbunden mit einer Thiolgruppe auf und liefern das molekülspezifische SERS-Spektrum, ähnlich einem Fingerabdruck. Sechs verschiedene Raman-Reporter (3-Mercaptobenzoessäure, 4-Mercaptobenzoessäure, 4-Mercaptophenol, Thiophenol, 6-Mercaptopyridin-3-carbonsäure, 2-Mercapto-4-methylthiazol-5-essigsäure) wurden für die Synthese der ISM eingesetzt, was Multiplex-Ansätze ermöglicht. ISM wurden weiterhin mit einer Schale aus Siliciumdioxid beschichtet. Die Siliciumdioxid-Hülle erhöht die chemische Stabilität und Lebensdauer der ISM. Sie sind daher über mehrere Monate stabil. Zudem wurden auf dieser Schale mittels APTES Aminogruppen aufgebracht, welche bei einer Konjugation von Biomolekülen erforderlich sind. Eine Funktionalisierung mit anti-EpCAM Antikörpern für die spezifische Bindung an Zellen des Mammakarzinoms wurde im Anschluss realisiert. Anti-EpCAM Antikörper sind vielversprechende Tumorantigene. ISM dienen somit dem sensitiven und spezifischen Nachweis von Zellen des Mammakarzinoms und anderen Tumorzellen.

ISM weisen eine Größe von durchschnittlich 120 nm auf, sie werden daher erst bei sehr hohen Konzentrationen und langen Inkubationszeiten von Blutzellen internalisiert. Ihre Struktur ermöglicht die Aufnahme von SERS-Spektren innerhalb weniger Millisekunden nach der Anregung mit einem nah-infraroten Laser. Diese Eigenschaften tragen zu einer niedrigen laserinduzierten Fotodegradation in den Zellen und einer geringen Toxizität der ISM bei. Darüber hinaus bietet die kurze Belichtungszeit einen erhöhten Durchsatz in der Raman-aktivierten Zellsortierung in einer mikrofluidischen Umgebung. Die hierfür genutzten Mikrochips können aus Quarz oder Glas bestehen. Dies wird durch das intensive SERS-Signal und die scharfen Banden ermöglicht.

ISM haben keinen negativen Einfluss auf die Viabilität von MCF-7, BT-20 und SKBR3 Tumorzellen. Bei einer Konzentration der ISM von  $OD_{534nm}=0.13$  während der Inkubation ermöglichen sie eine spezifische Trennung der Tumorzellen von den Leukozyten. Es erfolgt keine unspezifische Bindung an die EpCAM-negativen Leukozyten und HFF.

In Zukunft sollen Tumorzellen nach deren Differenzierung von Blutzellen mittels einer kontrollierten Strömung in einen bestimmten Kanal des mikrofluidischen Chips separiert werden. Der Chip wurde aus Quarzglas, welches im Vergleich zu anderen Substraten nur schwache und breite Raman-Signale zeigt, die mit Raman-Spektren vieler Proben nicht überlappen, gefertigt. Der Nachweis und die Quantifizierung

mehrerer spektraler Banden ist daher sehr gut möglich. Eine große Anzahl an Raman-Reportern kann folglich aufgrund ihrer spektralen Signatur erkannt und voneinander getrennt werden. ISM zeigen ein hohes Potenzial für Multiplex-Anwendungen, wie sie für den Nachweis und die Separation von Tumorzellen mit hoch und herunter regulierten Genen notwendig sind. Nicht immunologisch detektierbare Tumorzellen könnten, wie bereits erwähnt, über eine Markierung der Leukozyten von diesen separiert und Raman-spektroskopisch untersucht werden. Weitere Charakterisierungen dieser Zellen beispielsweise mittels PCR sind im Anschluss möglich und notwendig. Insbesondere die Tatsache des Absterbens vieler CTCs im Blut macht eine Untersuchung des Serums notwendig. In diesem vorkommende Zellfragmente und intrazelluläre Substanzen lassen sich durch molekularbiologische Verfahren nachweisen. In Zukunft könnten diese Informationen mit in die Analyse eingehen, da sie eine weitere Aussage über die Anzahl an CTCs im Blut liefern. Verschiedene wissenschaftliche Studien ([10, 17, 19]) konnten bereits zeigen, dass die Menge an CTCs im Blut Informationen über die Stärke der Erkrankung geben kann. Eine Veränderung der Anzahl von CTCs im Blut ist demzufolge ein Indiz dafür, ob eine Therapie effektiv ist oder nicht. Ein auf dieser Grundlage rechtzeitig erkannter notwendiger Wechsel der Therapie kann das Überleben eines Patienten signifikant verbessern.

Für eine solche diagnostische Anwendung sind ISM sehr gut geeignet. Ihre klinische Akzeptanz ist für diesen Einsatz essentiell, welche mittels klinischer Studien erzielt werden muss. Trotz der vielversprechenden Resultate der Immun-SERS-Spektroskopie tragen auch andere Methoden einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen bei. In Zukunft wird möglicherweise die erfolgreiche Zusammenarbeit vieler Methoden „Krebs“ besiegen können.

Die Verwendung von Immun-SERS-Markern beruht nicht nur allein auf der Detektion von Tumorzellen. Insbesondere durch die biologische Kopplung an Zielmoleküle über Antikörper [135], Enzyme, Aptamere oder DNA ist ihr mögliches Einsatzgebiet sehr groß [71]. Sie sind daher in einem breiten Spektrum von medizinischen, biologischen sowie chemischen Anwendungen nutzbar. Aus diesen Gründen können ISM neben der Detektion von eukaryotischen Zellen (Tumorzellen) [136] für den Nachweis verschiedener Mikroorganismen oder einzelner Proteine/Moleküle genutzt werden. Demnach können alle immunologisch detektierbaren Biomoleküle wie Glucose und Insulin [71] sowie Mikroorganismen wie Bakterien [137] erkannt werden. Darüber hinaus ist ein Nukleinsäure-Nachweis mittels DNA-Hybridisierung möglich [135]. Des Weiteren wurde bereits ein sinnvoller Einsatz von Nanopartikeln in einem kompetitiven Immun-Assay vorgestellt [138].

Die in dieser Arbeit präparierten ISM haben somit nicht nur großes Potential für den Nachweis zirkulierender Tumorzellen sondern auch für andere relevante Einsatzgebiete. Versuche mit Mammakarzinom-Zelllinien waren, wie gezeigt, bereits erfolgreich. Die Anwendung der ISM in klinischen Studien ist daher sehr sinnvoll. Hierfür müssen Patientenproben getestet werden, um die Spezifität und Sensitivität der ISM unter realen Bedingungen zu prüfen. Eine eventuell notwendige Anpassung der ISM auf die neuen Bedingungen ist dann entsprechend problemlos möglich.

# Anhang



# **A Geräte, Materialien und Chemikalien**

**Tabelle A.1:** verwendete Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung/Anbieter</b>
<b><i>Messgeräte:</i></b>	
Absorptionsspektrometer	UV/VIS, V-670/Jasco (Japan)
Fluoreszenzmikroskop	AxioImager A1/Zeiss (DE)
Infrarotspektrometer	FT-IR 670/ Mikroskop 620/Agilent (USA)
Oberflächenplasmonen- resonanzspektrometer	SR 7000 DC/Reichert
pH-Meter	FE20 FiveEasy pH/Mettler Toledo (DE)
Raman-Spektrometer	RXN1 Kaiser/Kaiser Optical Systems inc., USA
Raman-Spektrometer	WITec (DE)
Rasterelektronenmikroskop	JSM 6700 F/JEOL (Germany)
Transmissionselektronen- mikroskop	CEM 902A/Zeiss (DE)
Zetasizer	6.20/Malvern Instruments (UK)
<b><i>Geräte für die Synthese:</i></b>	
Hulamixer	Hulamixer™, PRS-4/12 (Rotor)/Invitrogen
Magnetrührer	Variomag Poly 15/Thermo Scientific (USA)
Thermoschüttler	Bioshake IQ/Quantifoil Instruments GmbH (Jena)
Ultraschallgerät	Sonorex/Bandelin (DE)
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17/Thermo Scientific (DE)
Zentrifuge	UniGen 15DR/Herolab GmbH (DE)
<b><i>sonstige Geräte:</i></b>	
Spritzenpumpensystem	Cetoni (DE)

**Tabelle A.2:** verwendete Materialien

<b>Materialien</b>	<b>Bezeichnung/Anbieter</b>
Küvetten	Quarzglas Küvetten/IPHT (eigene Produktion) (Jena)
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf Protein LoBIND S/L Tubes, 2.0 ml/Sigma-Aldrich (DE)
Netze	300 mesh-Netzchen, Formvar-Kohle Film/Plano GmbH (Wetzlar)
Objektträger	Calciumfluorid/Crystal GmbH (Berlin)
Polystyrolkugeln (19.6 µm)	PS-F-19.5, Microparticles GmbH (DE)
Quarzglaschip	IPHT (Jena)
Spritzen	Hamilton (USA)
Spritzenvorsatzfilter	Rotilabo <sup>®</sup> , Polyethersulfon, steril (0.22 µm)/Carl Roth (DE)
UV-Küvette	Mikroküvette/Carl Roth (DE)

Tabelle A.3: verwendete Chemikalien für die Synthese der SERS-Marker

Chemikalie	Anbieter
<b><i>Polymere:</i></b>	
Polyallylamin Hydrochloride (PAH, Mw 15.000)	Sigma-Aldrich (DE)
Polyethylenglycol (PEG, Mw 400-40.000)	Sigma-Aldrich (DE)
Polynatrium-4-styrolsulfonat (PSS, Mw 70.000)	Sigma-Aldrich (DE)
Polyvinylalkohol (PVA, Mw 30.000-70.000)	VWR International GmbH
Polyvinylpyrrolidon (PVP, Mw 10.000)	Sigma-Aldrich (DE)
Polyvinylpyrrolidon (PVP, Mw 55.000)	Sigma-Aldrich (DE)
<b><i>Raman-Reporter:</i></b>	
3-Mercaptobenzoessäure	Sigma-Aldrich (DE)
4-Mercaptobenzoessäure	Sigma-Aldrich (DE)
2-Mercapto-4-methylthiazol-5-essigsäure	Sigma-Aldrich (DE)
4-Mercaptophenol	Sigma-Aldrich (DE)
6-Mercaptopyridin-3-carbonsäure	Sigma-Aldrich (DE)
Thiophenol	Sigma-Aldrich (DE)
<b><i>Silane:</i></b>	
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Sigma-Aldrich (DE)
3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS)	Sigma-Aldrich (DE)
3-Glycidylpropyltrimethoxysilan (GOPS)	Sigma-Aldrich (DE)
Tetraethylorthosilikat (TEOS)	Wako Chemicals GmbH (DE)
Triethoxysilylbutyraldehyd, 90% (TESBA)	ABCR GmbH (DE)
<b><i>Sonstige:</i></b>	
Ammoniak (30 wt%)	Sigma-Aldrich (DE)
EnzMet-Kit	Nanoprobes (DE)
Ethanol (99.8%)	Sigma-Aldrich (DE)
Natriumcitrat	Alfa Aesar (DE)
TurboBeads (50 nm)	Amine coated, Schweiz
Meerrettichperoxidase (HRP)	IPHT, T. Schüler
Silberverstärkungs-Kit	BBI international (DE)
Siliciumdioxidnanopartikel	IPHT, A. Csáki
Tetrachloridogoldsäure	Sigma-Aldrich (DE)
4.7.10-Trioxatridecan-1.13-diamin	Sigma-Aldrich (DE)

**Tabelle A.4:** verwendete Chemikalien für die Funktionalisierung mit Antikörpern

<b>Chemikalie</b>	<b>Anbieter</b>
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (DE)
EpCAM (VU1D9) mouse mAb (Alexa Fluor <sup>®</sup> 488)	New England BioLabs GmbH (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich (DE)
Ethanolamin	Sigma-Aldrich (DE)
Glutaraldehyd, 70%	Sigma-Aldrich (DE)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (DE)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (DE)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (DE)
<i>N</i> -3-Dimethylaminopropyl- <i>N</i> -ethylcarbodiimide (EDC hydrochlorid)	AppliChem GmbH (DE)
<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz	Sigma Aldrich (DE)
2- <i>N</i> -Morpholinoethansulfonsäure	Sigma-Aldrich (DE)
PAMAM Dendrimer (Polyamidoamin) Generation G4.5	Sigma Aldrich (DE)
PE-Puffer	am IPHT hergestellt
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	am IPHT hergestellt
Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich (DE)

**Tabelle A.5:** verwendete Chemikalien für die Zellkultivierung und Bearbeitung

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller/Anbieter</b>
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich (DE)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies GmbH (DE)
Erythrozyten-Lysepuffer	Quiagen GmbH (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Life Technologies GmbH (DE)
fötale Rinderserum (FCS)	Biochrom AG (DE)
<i>N</i> -Morpholinoethansulfonsäure Puffer	am IPHT hergestellt
PE-Puffer	am IPHT hergestellt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	am IPHT hergestellt
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies GmbH (DE)
Propidiumiodid Lösung (1 mg/ml H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich (DE)
Tween20 (viscous liquid)	Sigma Aldrich (DE)
Trypsin	Biochrom AG (DE)



# B SERS-Spektren

Erklärung zu den im Anhang B dargestellten SERS-Spektren:

## **Namenskodierung:**

- Metall \_\_ Größe oder Form der Nanopartikel \_\_ Raman-Reporter \_\_ Nr.

## **Raman-Reporter:**

- KV=Kristallviolett
- NB=Nilblau
- MB=Methylenblau
- 3MB=3-Mercaptobenzoessäure
- TP=Thiophenol

## **Farbkodierung=SERS-Intensitäten im Vergleich:**

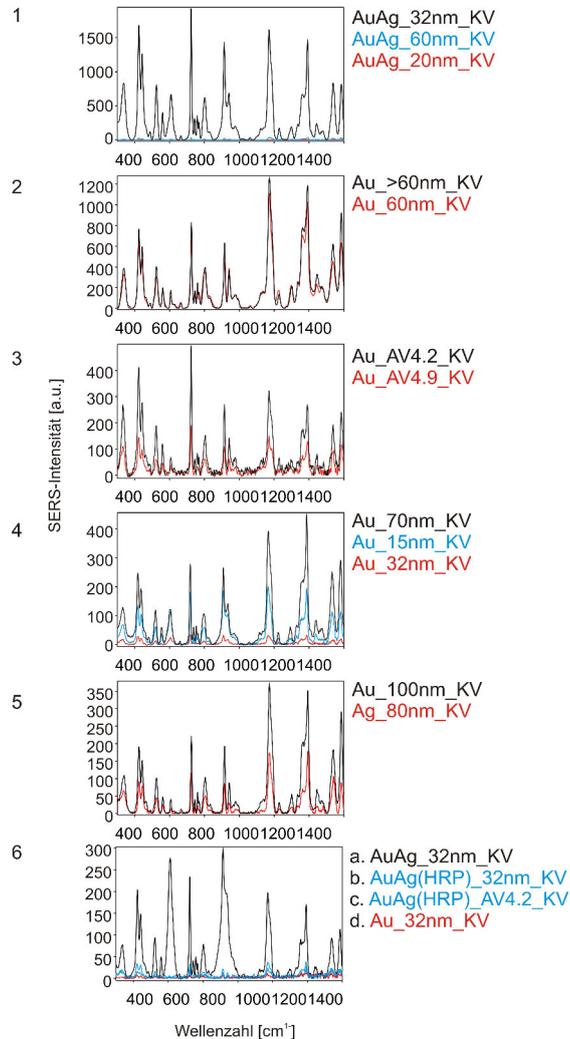
- rot=gering
- blau=mittel
- schwarz=hoch

## B SERS-Spektren

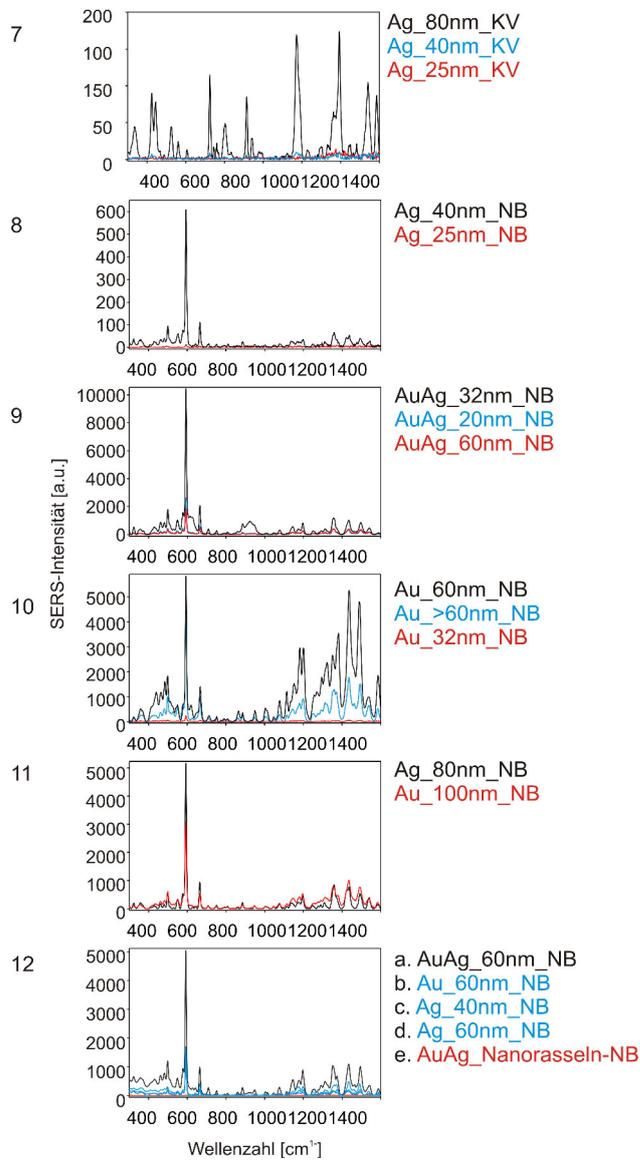
**Namenskodierung:** Metall\_Größe (Nanokugel) und/oder Form des Nanopartikels\_Raman-Reporter\_Nr.

**KV** = Kristallviolett, **NB** = Nilblau, **MB** = Methyleneblau, **3MB** = 3-Mercaptobenzoessäure, **TP** = Thiophenol

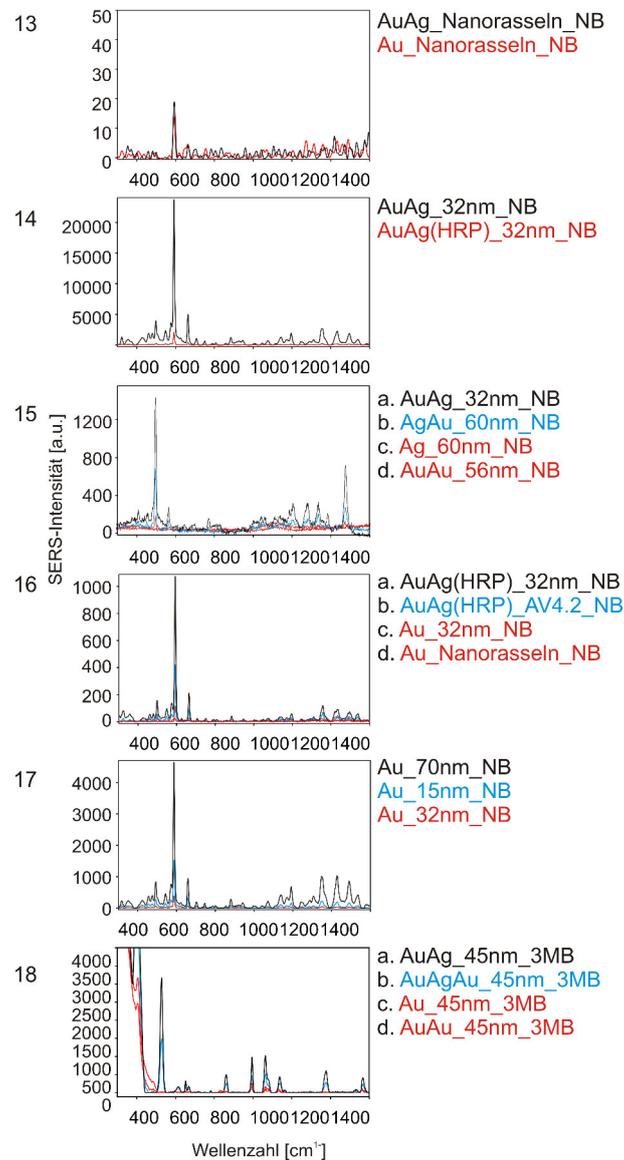
**Farbkodierung** = SERS-Intensitäten im Vergleich: **rot** = gering, **blau** = mittel, **schwarz** = hoch



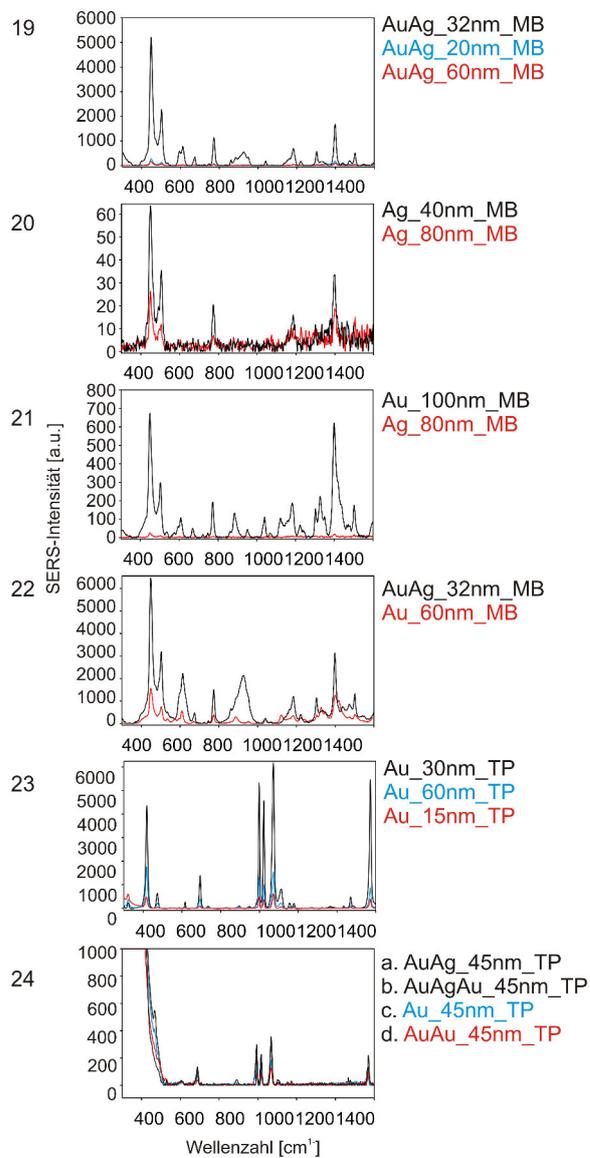
**Abbildung B.1:** Die dargestellten Spektren sind von verschiedenen Nanopartikeln, welche mit den Raman-Reporter Kristallviolett (KV) inkubiert wurden. Die einzelnen Abbildungen vergleichen jeweils verschiedene Nanopartikel miteinander. Die Beschriftung der Spektren ist auf Seite 99 erläutert. Die Spektren sind in der Reihenfolge ihrer Intensitäten dargestellt. Das oberste Spektrum (schwarz) zeigt das intensivste SERS-Signal, das unterste Spektrum (rot) zeigt demnach das schwächste -SERS-Signal.



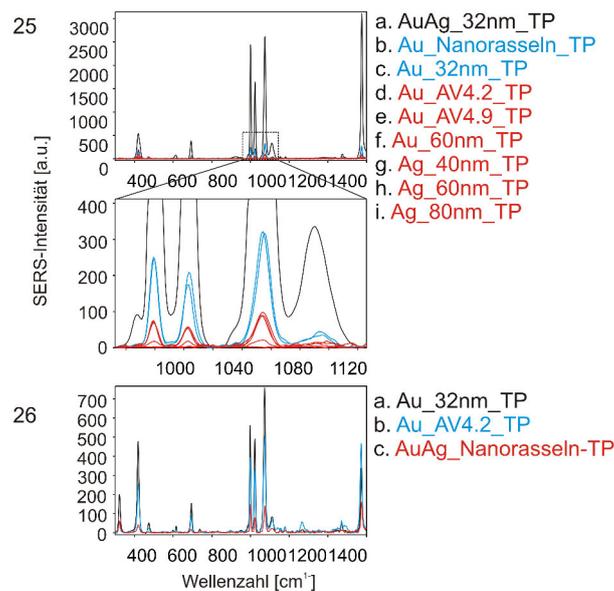
**Abbildung B.2:** Die dargestellten Spektren sind von verschiedenen Nanopartikeln, welche mit den Raman-Reportern Kristallviolett (KV) bzw. Nilblau (NB) inkubiert wurden. Die einzelnen Abbildungen vergleichen jeweils verschiedene Nanopartikel mit dem selben Raman-Reporter miteinander. Die Beschriftung der Spektren ist auf Seite 99 erläutert. Die Spektren sind in der Reihenfolge ihrer Intensitäten dargestellt. Das oberste Spektrum (schwarz) zeigt das intensivste SERS-Signal, das unterste Spektrum (rot) zeigt demnach das schwächste -SERS-Signal.



**Abbildung B.3:** Die dargestellten Spektren sind von verschiedenen Nanopartikeln, welche mit den Raman-Reportern Nilblau (NB) bzw. 3-Mercaptobenzoessäure (3MB) inkubiert wurden. Die einzelnen Abbildungen vergleichen jeweils verschiedene Nanopartikel mit dem selben Raman-Reporter miteinander. Die Beschriftung der Spektren ist auf Seite 99 erläutert. Die Spektren sind in der Reihenfolge ihrer Intensitäten dargestellt. Das oberste Spektrum (schwarz) zeigt das intensivste SERS-Signal, das unterste Spektrum (rot) zeigt demnach das schwächste -SERS-Signal.



**Abbildung B.4:** Die dargestellten Spektren sind von verschiedenen Nanopartikeln, welche mit den Raman-Reportern Methylenblau (MB) bzw. Thiophenol (TP) inkubiert wurden. Die einzelnen Abbildungen vergleichen jeweils verschiedene Nanopartikel mit dem selben Raman-Reporter miteinander. Die Beschriftung der Spektren ist auf Seite 99 erläutert. Die Spektren sind in der Reihenfolge ihrer Intensitäten dargestellt. Das oberste Spektrum (schwarz) zeigt das intensivste SERS-Signal, das unterste Spektrum (rot) zeigt demnach das schwächste -SERS-Signal.



**Abbildung B.5:** Die dargestellten Spektren sind von verschiedenen Nanopartikeln, welche mit den Raman-Reporter Thiophenol (TP) inkubiert wurden. Die einzelnen Abbildungen vergleichen jeweils verschiedene Nanopartikel miteinander. Die Beschriftung der Spektren ist auf Seite 99 erläutert. Die Spektren sind in der Reihenfolge ihrer Intensitäten dargestellt. Das oberste Spektrum (schwarz) zeigt das intensivste SERS-Signal, das unterste Spektrum (rot) zeigt demnach das schwächste -SERS-Signal.

# Literatur



# Literaturverzeichnis

- [1] M. Harz, M. Kiehntopf, S. Stöckel, P. Rösch, E. Straube, T. Deufel, and J. Popp. Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-raman spectroscopy. *J Biophotonics*, 2(1-2):70–80, Feb 2009.
- [2] S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, and J. Popp. Raman spectroscopic detection of anthrax endospores in powder samples. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(22):5339–5342, May 2012.
- [3] C. Krafft, B. Dietzek, and J. Popp. Raman and cars microspectroscopy of cells and tissues. *Analyst*, 134(6):1046–1057, Jun 2009.
- [4] U. Neugebauer, T. Bocklitz, J. Clement, C. Krafft, and J. Popp. Towards detection and identification of circulating tumour cells using raman spectroscopy. *Analyst*, 135(12):3178–3182, 2010.
- [5] J. Haberland, U. Wolf, B. Barnes, J. Bertz, S. Dahm, A. Laudi, and K. Kraywinkel. German short-term cancer mortality predictions up until 2015. *UMID - Umwelt und Mensch - Informationsdienst*, 3:16–23, 2012.
- [6] J. Wolters, C. Vay, S. A. Topp, C.F. Eisenberger, S. E. Baldus, W. T. Knoefel, and N. H. Stoecklein. Esophageal squamous cell carcinoma - prognostic marker and potential therapeutic target. *Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*, 38:123–124, 2009.
- [7] J. Knudson. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, 45(4):1437–1443, Apr 1985.
- [8] M. S. Wicha and D. F. Hayes. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol*, 29(12):1508–1511, Apr 2011.
- [9] B. Hong and Y. Zu. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics*, 3(6):377–394, 2013.
- [10] L. Döbrössy. Observations on tumour cells in the circulating blood before and after chemotherapy. *Eur J Cancer*, 3(6):531–535, Jan 1968.
- [11] X. Y. Zhong. [the detection of tumor cells in the bone marrow, peripheral blood and leukapheresis products in breast carcinoma patients]. *Dtsch Med Wochenschr*, 125(27):840–844, Jul 2000.

- [12] K. Pachmann, P. Heiss, U. Demel, and G. Tilz. Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (lsc). *Clin Chem Lab Med*, 39(9):811–817, Sep 2001.
- [13] J. Bischoff, R. Rosenberg, M. Dahm, W. Janni, and K. Gutschow. Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer. *Recent Results Cancer Res*, 162:135–140, 2003.
- [14] K. Pantel, V. Müller, M. Auer, N. Nusser, N. Harbeck, and S. Braun. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9(17):6326–6334, Dec 2003.
- [15] H. Taubert, K. Blümke, U. Bilkenroth, A. Meye, A. Kutz, F. Bartel, C. Lautenschläger, E. J. Ulbrich, N. Nass, H.-J. Holzhausen, H. Koelbl, and A. Lebrecht. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol*, 92(1):256–261, Jan 2004.
- [16] B. K. Rack, C. Schindlbeck, U. Andergassen, A. Schneeweiss, T. Zwingers, W. Lichtenegger, M. Beckmann, H. L. Sommer, K. Pantel, and Janni W. Use of circulating tumor cells (ctc) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The success trial. *J Clin Oncol*, 28(15s) ASCO Annual Meeting 2010. (suppl, abstr 1003), 2010.
- [17] M. Cristofanilli, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W. M. Terstappen, and D. F. Hayes. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351(8):781–791, Aug 2004.
- [18] M. Wallwiener, A. Daniel Hartkopf, I. Baccelli, S. Riethdorf, S. Schott, K. and Pantel, F. Marmé, C. Sohn, A. Trumpp, B. Rack, B. Aktas, E.-F. Solomayer, V. Müller, W. Janni, A. Schneeweiss, and T. N. Fehm. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 137(2):503–510, Jan 2013.
- [19] M. Wallwiener, A. D Hartkopf, S. Riethdorf, M. Sprick, C. W. Domschke, S. Schott, I. Baccelli, C. Modugno, B. Schoenfish, B. Burwinkel, F. Marme, J. Heil, C. Sohn, K. Pantel, A. Trumpp, and A. Schneeweiss. Prognostic impact of changes in circulating tumor cells (ctc) in metastatic breast cancer (mbc). *J Clin Oncol*, 31, 2013 (suppl; abstr 11012), 2013.
- [20] S. Riethdorf, H. Fritsche, V. Müller, T. Rau, C. Schindlbeck, B. Rack, W. Janni, C. Coith, K. Beck, F. Jänicke, S. Jackson, T. Gornet, M. Cristofanilli, and K. Pantel. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cellsearch system. *Clin Cancer Res*, 13(3):920–928, Feb 2007.

- [21] E. Amir, N. Miller, W. Geddie, O. Freedman, F. Kassam, C. Simmons, M. Oldfield, G. Dranitsaris, G. Tomlinson, A. Laupacis, I. F. Tannock, and M. Clemons. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*, 30(6):587–592, Feb 2012.
- [22] B. Aktas, V. Müller, M. Tewes, J. Zeitz, S. Kasimir-Bauer, C. R. Loehberg, B. Rack, A. Schneeweiss, and T. Fehm. Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients. *Gynecol Oncol*, 122(2):356–360, Aug 2011.
- [23] S. Meng, D. Tripathy, S. Shete, R. Ashfaq, B. Haley, S. Perkins, P. Beitsch, A. Khan, D. Euhus, C. Osborne, E. Frenkel, S. Hoover, M. Leitch, E. Clifford, E. Vitetta, L. Morrison, D. Herlyn, L. W. M. Terstappen, T. Fleming, T. Fehm, T. Tucker, N. Lane, J. Wang, and J. Uhr. Her-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25):9393–9398, Jun 2004.
- [24] A. A. Ross, B. W. Cooper, H. M. Lazarus, W. Mackay, T. J. Moss, N. Ciobanu, M. S. Tallman, M. J. Kennedy, N. E. Davidson, and D. Sweet. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*, 82(9):2605–2610, Nov 1993.
- [25] Christoph A. Klein, Thomas J F. Blankenstein, Oleg Schmidt-Kittler, Marco Petronio, Bernhard Polzer, Nikolas H. Stoecklein, and G. Riethmüller. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*, 360(9334):683–689, Aug 2002.
- [26] S. Braun, F. Hepp, H. L. Sommer, and K. Pantel. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer*, 84(1):1–5, Feb 1999.
- [27] T. Nakagawa, S. R. Martinez, Y. Goto, K. Koyanagi, M. Kitago, T. Shingai, D. A. Elashoff, X. Ye, F. R. Singer, A. E. Giuliano, and D. S B. Hoon. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes. *Clin Cancer Res*, 13(14):4105–4110, Jul 2007.
- [28] A. Zippelius, P. Kufer, G. Honold, M. W. Köllermann, R. Oberneder, G. Schlimok, G. Riethmüller, and K. Pantel. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol*, 15(7):2701–2708, Jul 1997.
- [29] P. J. Bostick, S. Chatterjee, D. D. Chi, K. T. Huynh, A. E. Giuliano, R. Cote, and D. S. Hoon. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 16(8):2632–2640, Aug 1998.

- [30] A. E. Ring, L. Zabaglo, M. G. Ormerod, I. E. Smith, and M. Dowsett. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer*, 92(5):906–912, Mar 2005.
- [31] V. V. Iakovlev, R. S. Goswami, J. Vecchiarelli, N. C R. Arneson, and S. J. Done. Quantitative detection of circulating epithelial cells by q-rt-pcr. *Breast Cancer Res Treat*, 107(1):145–154, Jan 2008.
- [32] J. J. Vredenburgh, O. Silva, C. Tyer, K. DeSombre, A. Abou-Ghalia, M. Cook, L. Layfield, W. P. Peters, and RC Bast, Jr. A comparison of immunohistochemistry, two-color immunofluorescence, and flow cytometry with cell sorting for the detection of micrometastatic breast cancer in the bone marrow. *J Hematother*, 5(1):57–62, Feb 1996.
- [33] C. Panabières, J. Vendrell, O. Pellé, X. Rebillard, S. Riethdorf, V. Müller, M. Fabbro, and K. Pantel. Identification of biologically active cancer cells in blood and bone marrow of cancer patients. *J Clin Oncol*, 25(18s) (June 20 Supplement):1001, 2007.
- [34] X. Wang, X. Qian, J. Beitler, Z. G. Chen, F. R. Khuri, M. M. Lewis, H. J. C. Shin, S. Nie, and D. M. Shin. Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced raman scattering nanoparticles. *Cancer Res*, 71(5):1526–1532, Mar 2011.
- [35] A. de Albuquerque, S. Kaul, G. Breier, P. Krabisch, and N. Fersis. Multimarker analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of metastatic breast cancer patients: A step forward in personalized medicine. *Breast Care (Basel)*, 7(1):7–12, Feb 2012.
- [36] U. Neugebauer, J. H. Clement, T. Bocklitz, C. Krafft, and J. Popp. Identification and differentiation of single cells from peripheral blood by raman spectroscopic imaging. *Journal of biophotonics*, 3(8-9):579–587, 2010.
- [37] M. Becker-Putsche, T. Bocklitz, J. Clement, P. Rösch, and J. Popp. Toward improving fine needle aspiration cytology by applying raman microspectroscopy. *J Biomed Opt*, 18(4):047001, Apr 2013.
- [38] I. R. Nabiev, K. V. Sokolov, and M. Manfait. Surface-enhanced raman spectroscopy and its biomedical applications, in advances in spectroscopy (wiley & sons, chichester). *Eds.: Clark, Hester*, 20:267–338, 1993.
- [39] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and McQuillan A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2):163–166, 1974.
- [40] X. Qian, X.-H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, and S. Nie. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced raman nanoparticle tags. *Nat Biotechnol*, 26(1):83–90, Jan 2008.

- [41] B. D. Moore, L. Stevenson, A. Watt, S. Flitsch, N. J. Turner, C. Cassidy, and D. Graham. Rapid and ultra-sensitive determination of enzyme activities using surface-enhanced resonance raman scattering. *Nat Biotechnol*, 22(9):1133–1138, Sep 2004.
- [42] Nie and Emory. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering. *Science*, 275(5303):1102–1106, Feb 1997.
- [43] W. E. Smith and C. Rodger. Surface-enhanced raman scattering, in handbook of vibrational spectroscopy (wiley & sons, chichester). *Eds.: Chalmers, Griffiths*, 1:775–784, 2002.
- [44] C. L. Haynes, C. R. Yonzon, X. Zhang, and R. P. Van Duyne. Surface-enhanced raman sensors: early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection. *J. Raman Spectrosc.*, 36:471–484, 2005.
- [45] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Single molecule detection using surface-enhanced raman scattering (sers). *Phys. Rev. Lett.*, 78(9):1667–1670, 1997.
- [46] C. L. Haynes and R. P. Van Duyne. Plasmon-sampled surface-enhanced raman excitation spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 107:7426–7433, B 2003.
- [47] D. Cialla, J. Petschulat, U. Hübner, H. Schneidewind, M. Zeisberger, R. Mattheis, T. Pertsch, M. Schmitt, R. Möller, and J. Popp. Investigation on the second part of the electromagnetic sers enhancement and resulting fabrication strategies of anisotropic plasmonic arrays. *Chemphyschem*, 11(9):1918–1924, Jun 2010.
- [48] A. D. McFarland, M. A. Young, J. A. Dieringer, and R. P. Van Duyne. Wavelength-scanned surface-enhanced raman excitation spectroscopy. *J Phys Chem B*, 109(22):11279–11285, Jun 2005.
- [49] S. Link and M. A. El-Sayed. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem*, 54:331–366, 2003.
- [50] E. S. Brandt and T. M. Cotton. Surface-enhanced raman scattering, in physical methods of chemistry series (wiley & sons, new york). *Eds.: Rossiter, Baetzold*, pages 633–718, 1993, 9B.
- [51] T. M. Cotton. The application of surface-enhanced raman scattering to biochemical systems, in advances in spectroscopy (wiley & sons, chichester). *Eds.: Clark, Hester*, 16:91–153, 1988.
- [52] J. Kottmann, O. Martin, D. Smith, and S. Schultz. Spectral response of plasmon resonant nanoparticles with a non-regular shape. *Opt Express*, 6(11):213–219, May 2000.

- [53] G. J. Puppels, J. H. F. Olminkhof, G. M. J. Segers-Nolten, C. Otto, F. F. M. de Mul, and J. Greve. Laser irradiation and raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: Sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. *Experimental Cell R*, 195:361–367, 1991.
- [54] C. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann. Surface-enhanced raman scattering. *J. Phys., Condens, Matter* 4, pages 1143–1212, 1992.
- [55] M. Moskovits and J. S. J. Suh. Surface selection rules for surface-enhanced raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced raman spectrum of phthalazine on silver. *J. Phys. Chem.*, 88(23):5526–5530, 1984.
- [56] F. F. Mandy, M. Bergeron, and T. Minkus. Principles of flow cytometry. *Transfus Sci*, 16(4):303–314, Dec 1995.
- [57] P. T. Went, A. Lugli, S. Meier, M. Bundi, M. Mirlacher, G. Sauter, and S. Dirnhofer. Frequent epcam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35(1):122–128, Jan 2004.
- [58] J. H. Clement, M. Schwalbe, N. Buske, K. Wagner, M. Schnabelrauch, P. Gönert, K. O. Kliche, K. Pachmann, W. Weitschies, and K. Höffken. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132(5):287–292, May 2006.
- [59] S. Dochow, C. Krafft, U. Neugebauer, T. Bocklitz, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert, and J. Popp. Tumour cell identification by means of raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments. *Lab on a Chip*, 11(8):1484–1490, 2011.
- [60] U. Neugebauer, S. Dochow, C. Krafft, T. Bocklitz, J. H. Clement, and J. Popp. Diagnostics of tumor cells by combination of raman spectroscopy and microfluidics. *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II*, pages Proceedings of SPIE, 8087(Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II), 80870J (2011), 2011.
- [61] P. Wu, Y. Gao, Y. Lu, H. Zhang, and C. Cai. High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high sers active aptamer–silver–gold shell–core nanostructures. *Analyst*, 138(21):6501–6510, 2013.
- [62] S. Schlücker. Sers microscopy: nanoparticle probes and biomedical applications. *ChemPhysChem*, 10(9-10):1344–1354, 2009.
- [63] K. C. Bantz, A. F. Meyer, N. J. Wittenberg, H. Im, O. Kurtulus, S. H. Lee, N. C. Lindquist, S.-H. Oh, and C. L. Haynes. Recent progress in sers biosensing. *Phys Chem Chem Phys*, 13(24):11551–11567, Jun 2011.

- [64] Q. Tu and C. Chang. Diagnostic applications of raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(5):545–558, 2012.
- [65] W. Cheung, I. T. Shadi, Xu Y., and R. Goodacre. Quantitative analysis of the banned food dye sudan-1 using surface enhanced raman scattering with multivariate chemometrics. *J. Phys. Chem. C*, 114:7285–7290, 2010.
- [66] K. Hartmann, M. Becker-Putsche, T. Bocklitz, K. Pachmann, A. Niendorf, P. Rösch, and J. Popp. A study of docetaxel-induced effects in mcf-7 cells by means of raman microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 403(3):745–753, May 2012.
- [67] R. G. Pearson. Hard and soft acids and bases. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85:3533–3539, 1963.
- [68] M. R K. Ali, S. R. Panikkanvalappil, and M. A. El-Sayed. Enhancing the efficiency of gold nanoparticles treatment of cancer by increasing their rate of endocytosis and cell accumulation using rifampicin. *J Am Chem Soc*, 136(12):4464–4467, Mar 2014.
- [69] P. Wu, Y. Gao, Y. Lu, H. Zhang, and C. Cai. High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high sers active aptamer-silver-gold shell-core nanostructures. *Analyst*, 138(21):6501–6510, Nov 2013.
- [70] S. Lee, H. J. Kim, S. Y. Kim, M.-K. Kwon, S. Kim, A. Cho, M. Yun, J.-S. Shin, and K.-H. Yoo. Drug-loaded gold plasmonic nanoparticles for treatment of multidrug resistance in cancer. *Biomaterials*, 35(7):2272–2282, Feb 2014.
- [71] m. Culha, B. Cullum, N. Lavrik, and C. K. Klutse. Surface-enhanced raman scattering as an emerging characterization and detection technique. *Journal of Nanotechnology*, pages 1–15, 2012.
- [72] R. C. Bast, D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland, and E. Frei, editors. *Holland-Frei Cancer Medicine, 5th edition*. Cancer Medicine, 5th ed., Canada: BC Decker Inc; 2000.
- [73] A. Samanta, K. K. Maiti, K.-S. Soh, X. Liao, M. Vendrell, U. S. Dinish, S.-W. Yun, R. Bhuvaneshwari, Hyori Kim, S. Rautela, J. Chung, M. Olivo, and Y.-T. Chang. Ultrasensitive near-infrared raman reporters for sers-based in vivo cancer detection. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(27):6089–6092, Jun 2011.
- [74] J. Nyagilo, M. Xiao, X. Sun, and D. P. Davé. Multi-color raman nanotags for tumor cell biomarker detection. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009:6314–6317, 2009.

- [75] M. Schütz, D. Steinigeweg, M. Salehi, K. Kömpe, and S. Schlücker. Hydrophilically stabilized gold nanostars as sers labels for tissue imaging of the tumor suppressor p63 by immuno-sers microscopy. *Chem Commun (Camb)*, 47(14):4216–4218, Apr 2011.
- [76] Michael Y. Sha, Hongxia Xu, and R. Natan, Michael J. and Cromer. Surface-enhanced raman scattering tags for rapid and homogeneous detection of circulating tumor cells in the presence of human whole blood. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:17214–17215, 2008.
- [77] J.-H. Kim, J.-S. Kim, H. Choi, S.-M. Lee, B.-H. Jun, K.-N. Yu, E. Kuk, Y.-K. Kim, D. H. Jeong, M.-H. Cho, et al. Nanoparticle probes with surface enhanced raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting. *Anal. Chem.*, 78(19):6967–6973, 2006.
- [78] H. Park, S. Lee, L. Chen, E. K. Lee, S. Y. Shin, Y. H. Lee, S. W. Son, C. H. Oh, J. M. Song, S. H. Kang, and J. C. Sers imaging of her2-overexpressed mcf7 cells using antibody-conjugated gold nanorods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(34):7444–7449, 2009.
- [79] L. Sun, K.-B. Sung, C. Dentinger, B. Lutz, L. Nguyen, J. Zhang, H. Qin, M. Yamakawa, M. Cao, Y. Lu, et al. Composite organic-inorganic nanoparticles as raman labels for tissue analysis. *Nano letters*, 7(2):351–356, 2007.
- [80] S. Lee, H. Chon, M. Lee, J. Choo, S. Y. Shin, Y. H. Lee, I. J. Rhyu, S. W. Son, and C. H. Oh. Surface-enhanced raman scattering imaging of her2 cancer markers overexpressed in single mcf7 cells using antibody conjugated hollow gold nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7):2260–2263, 2009.
- [81] A. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small*, 5(6):701–708, Mar 2009.
- [82] I. Notingher, S. Verrier, H. Romanska, A. E. Bishop, J. M. Polak, and Hench L. L. In-situ characterization of living cells by raman spectroscopy. *Spectrosc. Int. J.*, 16:43–51, 2002.
- [83] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. I. Schmitt, and J. Popp. Surface-enhanced raman spectroscopy (sers): progress and trends. *Anal Bioanal Chem*, 403(1):27–54, Apr 2012.
- [84] B. Küstner, M. Gellner, M. Schütz, F. Schöppler, A. Marx, P. Ströbel, P. Adam, C. Schmuck, and S. Schlücker. Sers labels for red laser excitation: Silica-encapsulated sams on tunable gold/silver nanoshells. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(11):1950–1953, 2009.

- [85] W. A. Osta, Y. Chen, K. Mikhitarian, M. Mitas, M. Salem, Y. A. Hannun, D. J. Cole, and W. E. Gillanders. Epcam is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer research*, 64(16):5818–5824, 2004.
- [86] C. J. de Boer, J. H. van Krieken, C. M. Janssen-van Rhijn, and S. V. Litvinov. Expression of ep-cam in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*, 188(2):201–206, Jun 1999.
- [87] J. Zorzos, A. Zizi, A. Bakiras, D. Pectasidis, D. V. Skarlos, H. Zorzos, J. Eleme-noglou, and M. Likourinas. Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody aua1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol*, 28(3):251–254, 1995.
- [88] M. Balzar, M. J. Winter, C. J. de Boer, and S. V. Litvinov. The biology of the 17-1a antigen (ep-cam). *J Mol Med (Berl)*, 77(10):699–712, Oct 1999.
- [89] A. S. High, P. A. Robinson, and C. E. Klein. Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein mh99 (ks 1/4) in oral mucosal dysplasias. *J Oral Pathol Med*, 25(1):10–13, Jan 1996.
- [90] C. Pauli, M. Münz, C. Kieu, B. Mack, P. Breinl, B. Wollenberg, S. Lang, R. Zeidler, and O. Gires. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule epcam in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, 193(1):25–32, Apr 2003.
- [91] R. B. Poczatek, R. B. Myers, U. Manne, D. K. Oelschlager, H. L. Weiss, D. G. Bostwick, and W. E. Grizzle. Ep-cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Urol*, 162(4):1462–1466, Oct 1999.
- [92] J. Shetye, B. Christensson, C. Rubio, M. Rodensjö, P. Biberfeld, and H. Mellstedt. The tumor-associated antigens br55-2, ga73-3 and gica 19-9 in normal and corresponding neoplastic human tissues, especially gastrointestinal tissues. *Anticancer Res*, 9(2):395–404, 1989.
- [93] G. Spizzo, G. Gastl, D. Wolf, E. Gunsilius, M. Steurer, D. Fong, A. Amberger, R. Margreiter, and P. Obrist. Correlation of cox-2 and ep-cam overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer*, 88(4):574–578, Feb 2003.
- [94] S. Braun, F. Hepp, C. R. Kentenich, W. Janni, K. Pantel, G. Riethmüller, F. Willgeroth, and H. L. Sommer. Monoclonal antibody therapy with edre-colomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res*, 5(12):3999–4004, Dec 1999.

- [95] G. Riethmüller, E. Holz, G. Schlimok, W. Schmiegel, R. Raab, K. Höffken, R. Gruber, I. Funke, H. Pichlmaier, H. Hirche, P. Buggisch, J. Witte, and R. Pichlmayr. Monoclonal antibody therapy for resected dukes' c colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*, 16(5):1788–1794, May 1998.
- [96] P. Li, Z. S. Stratton, M. Dao, J. Ritz, and T. J. Huang. Probing circulating tumor cells in microfluidics. *Lab Chip*, 13(4):602–609, Feb 2013.
- [97] J. H. Kang, S. Krause, H. Tobin, A. Mammoto, M. Kanapathipillai, and D. E. Ingber. A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells. *Lab Chip*, 12(12):2175–2181, Jun 2012.
- [98] D. Issadore, J. Chung, H. Shao, M. Liang, A. A. Ghazani, C. M. Castro, R. Weissleder, and H. Lee. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector. *Sci Transl Med*, 4(141):141ra92, Jul 2012.
- [99] U. Dharmasiri, S. K. Njoroge, M. A. Witek, M. G. Adebisi, J. W. Kamande, M. L. Hupert, F. Barany, and S. A. Soper. High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system. *Anal Chem*, 83(6):2301–2309, Mar 2011.
- [100] S. Wang, K. Liu, J. Liu, Z. T-F. Yu, X. Xu, L. Zhao, T. Lee, E. K. Lee, J. Reiss, Y.-K. Lee, L. W. K. Chung, J. Huang, M. Rettig, D. Seligson, K. N. Duraiswamy, C. K-F. Shen, and H-R. Tseng. Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(13):3084–3088, Mar 2011.
- [101] S. Dochow, C. Beleites, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert, J. Clement, C. Krafft, and J. Popp. Quartz microfluidic chip for tumour cell identification by raman spectroscopy in combination with optical traps. *Anal Bioanal Chem*, 405(8):2743–2746, Mar 2013.
- [102] I. Freitag, U. Neugebauer, A. Csaki, W. Fritzsche, C. Krafft, and J. Popp. Preparation and characterization of multicore sers labels by controlled aggregation of gold nanoparticles. *Vibrational Spectroscopy*, 60:79–84, 2012.
- [103] G. Frens. Controlled nucleation for regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*, 241(105):20–22, 1973.
- [104] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday. Soc.*, 11:55–75., 1951.
- [105] W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn. Controlled growth of monodispersed spheres in the micron size range. *J. Colloid and Interface Sci.*, 26:62–69, 1968.

- [106] Vladimir Gubala, Xavier Le Guevel, Rob Nooney, David E. Williams, and Brian MacCraith. A comparison of mono and multivalent linkers and their effect on the colloidal stability of nanoparticle and immunoassays performance. *Talanta*, 81(4-5):1833–1839, Jun 2010.
- [107] C. M. MacLaughlin, N. Mullaithilaga, G. Yang, S. Y. Ip, C. Wang, and G. C. Walker. Surface-enhanced raman scattering dye-labeled au nanoparticles for triplexed detection of leukemia and lymphoma cells and sers flow cytometry. *Langmuir*, 29(6):1908–1919, 2013.
- [108] J. M. Kelly, G. Keegan, and M. E. Brennan-Fournet. Triangular silver nanoparticles: Their preparation, functionalisation and properties. *Acta Physica Polonica, A*, 122:337–345, 2012.
- [109] A. Knauer, A. Csáki, W. Fritzsche, C. A. Serra, Leclerc N., and J. M. Köhler. Micro continuous flow-through synthesis of triangular silver nanoprisms and their incorporation in complexly composed polymer microparticles. *Chemical Engineering Journal*, 227:191–197, 2013.
- [110] Y. Khalavka, J. Becker, and C. Sönnichsen. Synthesis of rod-shaped gold nanorattles with improved plasmon sensitivity and catalytic activity. *J Am Chem Soc*, 131(5):1871–1875, Feb 2009.
- [111] F. Theil, L. Zedler, A. Ma?rz, W. Xie, C. Csa?ki, W. Fritzsche, D. Cialla, M. Schmitt, J. Popp, and B. Dietzek. Evidence for sers enhancement in the spectra of ruthenium dye- metal nanoparticle conjugates. *J. Phys. Chem. C*, 117(2):1121–1129, 2013.
- [112] K. L. Wustholz, A-I. Henry, J. M. McMahon, R. G. Freeman, N. Valley, M. E. Piotti, M. J. Natan, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne. Structure-activity relationships in gold nanoparticle dimers and trimers for surface-enhanced raman spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 132(31):10903–10910, Aug 2010.
- [113] T. Schüler, A. Steinbrück, G. Festag, R. Möller, and W. Fritzsche. Enzyme-induced growth of silver nanoparticles studied on single particle level. *J Nanopart Res*, 11(4):939–946, 2008.
- [114] H. Schneidewind, T. Schüler, K. K. Strelau, K. Weber, D. Cialla, M. Diegel, R. Mattheis, A. Berger, R. Möller, and J. Popp. The morphology of silver nanoparticles prepared by enzyme-induced reduction. *Beilstein J Nanotechnol*, 3:404–414, 2012.
- [115] K. Kneipp, H. Kneipp, and J. Kneipp. Surface-enhanced raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates from single-molecule raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. *Accounts of chemical research*, 39(7):443–450, 2006.

- [116] J. Kneipp, H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown, and K. Kneipp. In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. *Nano Letters*, 6(10):2225–2231, 2006.
- [117] A. Indrasekara, B. J. Paladini, D. J. Naczynski, V. Starovoytov, P. V. Moghe, and L. Fabris. Dimeric gold nanoparticle assemblies as tags for sers-based cancer detection. *Advanced healthcare materials*, 2(10):1370–1376, 2013.
- [118] M. Moskovits. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.*, 57:783–826, Jul 1985.
- [119] J. A. Creighton. Spectroscopy of surfaces. *Ed.: R.J. Clark und R.E. Hester, John Wiley & Sons: New York*, 37, 1988.
- [120] B. N. J. Persson. On the theory of surface-enhanced raman scattering. *Chemical Physics Letters*, 82(3):561–565, 1981.
- [121] H. Ueba. Surface enhanced raman scattering, ed.: R.k. chang und t.e. furtak. *Plenum Press, NewYork*, 173, 1982.
- [122] M. Gellner, K. Kömpe, and S. Schlücker. Multiplexing with sers labels using mixed sams of raman reporter molecules. *Anal Bioanal Chem*, 394(7):1839–1844, Aug 2009.
- [123] M. Maruthamuthu and M. Sobhana. Hydrophobic interactions in the binding of polyvinylpyrrolidone. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 17(10):3159–3167, 1979.
- [124] S. Pande, S. K. Ghosh, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Basu, S. Jana, A. Pal, T. Tsukuda, and T. Pal. Synthesis of normal and inverted gold-silver core-shell architectures in  $\beta$ -cyclodextrin and their applications in sers. *Journal of Physical Chemistry C.*, 111(29):10806–10813, 2007.
- [125] S. Lee, H. Chon, J. Lee, J. Ko, B. H. Chung, D. W. Lim, and J. Choo. Rapid and sensitive phenotypic marker detection on breast cancer cells using surface-enhanced raman scattering (sers) imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 51:238–243, 2014.
- [126] C. Beck, W. Härtl, and R. Hempelmann. Kovalente oberflächenfunktionalisierung und selbstorganisation von siliciumdioxid-nanopartikeln. *Angewandte Chemie*, 111:1380–1382, 1999.
- [127] C. G. Wang, T. T. Chen, Y. and Wang, Z. F. Ma, and Z. M. Su. Monodispersed gold nanorod-embedded silica particles as novel raman labels for biosensing. *Adv. Funct. Mater.*, 18(2):355–361, 2008.

- [128] R De Palma, S. Peeters, M.J. Van Bael, H. Van den Rul, K. Bonroy, W. Laureyn, J. Mullens, G. Borghs, and G. Maes. Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. *Chem. Mater.*, 19:1821–1831, 2007.
- [129] A. Natarajan, C. Chun, J. Hickman, and P. Molnar. Growth and electrophysiological properties of rat embryonic cardiomyocytes on hydroxyl- and carboxyl-modified surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(10):1319–1331, 2008.
- [130] R. P. Bagwe, L. R. Hilliard, and W. Tan. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir*, 22(9):4357–4362, Apr 2006.
- [131] D. Graham, B. J. Mallinder, D. Whitcombe, N. D Watson, and W. E. Smith. Simple multiplex genotyping by surface-enhanced resonance raman scattering. *Analytical Chemistry*, 74(5):1069–1074, 2002.
- [132] K. O. Yu, C. M. Grabinski, A. M. Schrand, R. C. Murdock, W. Wang, B. Gu, J. J. Schlager, and S. M. Hussain. Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *J. Nanopart. Res.*, 11(1):15–24, 2009.
- [133] A. S. Thakor, R. Luong, R. Paulmurugan, F. I. Lin, P. Kempen, C. Zavaleta, P. Chu, T. F. Massoud, R. Sinclair, and S. S. Gambhir. The fate and toxicity of raman-active silica-gold nanoparticles in mice. *Sci Transl Med*, 3(79):79ra33, Apr 2011.
- [134] S. Dochow, M. Becker, R. Spittel, C. Beleites, S. Stanca, I. Latka, K. Schuster, J. Kobelke, S. Unger, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert, M. Rothhardt, C. Krafft, and J. Popp. Raman-on-chip device and detection fibres with fibre bragg grating for analysis of solutions and particles. *Lab Chip*, 13(6):1109–1113, Mar 2013.
- [135] S. Pahlow, A. März, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kämmer, R. Böhme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, and J. Popp. Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced raman spectroscopy. *Engineering in Life Sciences*, 12:131–143, 2012.
- [136] P. Wu, Y. Gao, H. Zhang, and C. Cai. Aptamer-guided silver-gold bimetallic nanostructures with highly active surface-enhanced raman scattering for specific detection and near-infrared photothermal therapy of human breast cancer cells. *Anal Chem*, 84(18):7692–7699, Sep 2012.
- [137] E. Temur, I. H. Boyaci, U. Tamer, H. Unsal, and N. Aydogan. A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced raman scattering for escherichia coli enumeration. *Anal Bioanal Chem*, 397(4):1595–1604, Jun 2010.

- [138] G. Zhu, Y. Hu, J. Gao, and L. Zhong. Highly sensitive detection of clenbuterol using competitive surface-enhanced raman scattering immunoassay. *Anal Chim Acta*, 697(1-2):61–66, Jul 2011.

# Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit möchte ich mich hiermit bei allen bedanken, welche mich auf dem manchmal recht steinigen Weg hin zu meiner Dissertation mit Rat und Tat begleitet haben. Zu besonderem Dank bin ich Prof. Dr. Jürgen Popp und Dr. Christoph Krafft verpflichtet, welche großes Vertrauen in mich gesetzt und mir die Möglichkeit zur Promotion gegeben haben. Ohne ihren wertvollen akademischen Rat wäre diese Arbeit nicht entstanden. Des Weiteren danke ich Dr. Christoph Krafft für die vielseitige Unterstützung bei der Bearbeitung dieses außerordentlich interessanten Forschungsthemas und seiner jederzeit offenen Tür und Diskussionsbereitschaft während der Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihm zudem recht herzlich für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen Konferenzen.

Meiner Arbeitsgruppe „Spektroskopie und Bildgebung“, insbesondere meinen jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen Dr. Sebastian Dochow, Dr. Norbert Bergner, Dr. Christian Matthäus, Dr. Claudia Beleites, Dr. Ute Neugebauer sowie Dr. Sarmiza Stanca danke ich für die vielfältige Unterstützung, die vielen nützlichen Ideen, die interessanten Diskussionen und das in allen Belangen tolle Arbeitsklima. Zudem danke ich Dr. Claudia Beleites für die sorgfältige statistische Auswertung meiner Daten.

Dr. Karina Weber und Dr. Dana Cialla-May danke ich außerordentlich für die weitere finanzielle Unterstützung, für ihre Hilfe und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Prof. Dr. Sebastian Schlücker, Dr. Mohammad Salehi, Dr. Mathias Lakatos, Prof. Dr. Carsten Sönnichsen, Yuriy Khalavka sowie Dr. Robert Müller danke ich für die Bereitstellung verschiedener Nanopartikel sowie für die sehr gute Unterstützung bei Fragen und Problemen. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Sebastian Schlücker und Dr. Mohammad Salehi für die Möglichkeit des Einblicks in die Synthese funktionalisierter Nanopartikel.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern des Universitätsklinikums Jena, Dr. Joachim Clement und Cornelia Jörke für die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen sowie für die freundliche Unterstützung bei zahlreichen Zellexperimenten sowie der Bereitstellung unterschiedlichster Zellkulturen. Ohne ihre Kooperation und Mitwirkung wären die zahlreichen Experimente nicht möglich gewesen.

Frank Theil und Dr. Andrea Steinbrück danke ich für die gewissenhafte und maßgebliche Präparation zahlreicher Nanopartikel. Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Andrea Csáki für Ihre Hilfe und Ratschläge jeglicher Art bedanken. Ich danke ihr für ihr jederzeit offenes Ohr sowie für die hervorragende materielle Unterstützung. Ganz besonders danke ich Dr. Robert Noony vom „Biomedical Diagnostics Institute“ in Dublin für die sehr gute Beratung und die wertvollen Tipps zur Funktionalisierung der Nanopartikel mit Antikörpern. Dr. Ondrej Stranik danke ich ganz herzlich für

die theoretischen Berechnungen der Absorptionsspektren und des EM-Feldes. Ein herzlicher Dank geht auch an Susanne Pahlow und Dr. Barbara Seise für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und Anregungen. Wolfgang Ludwig danke ich für die Hilfe bei der Planung und der geduldigen Anfertigung einer Vielzahl an Küvetten aus Quarzglas. Für unzählige REM- und TEM-Aufnahmen und Probenpräparationen danke ich ganz besonders Franka Jahn.

Benita Göbel möchte ich für ihre fleißigen Bemühungen bei der jederzeit sehr zügigen und erfolgreichen Literaturrecherche bedanken sowie für ihre mentale Unterstützung. Für die gewissenhafte Durchsicht und zahlreichen Anregungen meiner Arbeit möchte ich außerordentlich Prof. Dr. Jürgen Popp, Dr. Christoph Krafft, Dr. Karina Weber, Dr. Christian Matthäus und Susanne Pahlow danken.

Vielen Dank für die tolle und freundschaftliche Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Leibniz-Institutes für Photonische Technologien, des Institutes für Physikalische Chemie, der AG-Popp und des Universitätsklinikums Jena!

Meiner Schwester Melanie danke ich ganz besonders für Ihren Einsatz und Ihr Vertrauen sowie für die zahlreichen Tipps und Ratschläge. Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Mann und meinem Sohn für ihre Geduld und ihr großes Verständnis bedanken. Ich weiß, dass es nicht immer leicht mit mir war. Danke für Eure Unterstützung und dass Ihr immer für mich da ward. Danke auch an meine Familie, welche mir den Weg hierfür geebnet und mir diese Arbeit erst ermöglicht hat.

# Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift der Verfasserin



# curriculum vitae

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Freitag, Isabel (geb. Putsche)  
Geburtsdatum, Ort: 06.08.1982, Apolda  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind  
Staatsangehörigkeit: deutsch

Kontaktdaten: Rudolf-Breitscheid-Straße 10  
99510 Apolda (Germany)

IsabelFreitag@gmx.de  
Tel. 03644-515478

## **Berufliche Praxis**

12/2008 - 06/2014	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Photonische Technologien, Abteilung Spektroskopie und Bildgebung sowie am Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller Universität in Jena.
08/2008 - 10/2008	Wissenschaftliche Angestellte am Universitätsklinikum in Ulm, Sektion Neurophysiologie.
10/2005 - 06/2007	Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena, Abteilung Biochemie.
10/2004 - 09/2005	Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena, Abteilung Bioorganische Chemie.

## **Ausbildung**

12/2008 - 06/2014	Doktorandin am Institut für Photonische Technologien, Abteilung Spektroskopie und Bildgebung sowie am Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller Universität in Jena.
02/2008	Erwerb des akademischen Grades „Magistra Scientiarum“.
04/2007	Magisterarbeit: Zur Homologie der Thoracopoden der „Conchostraca“ (Branchiopoda) mit Augenmerk auf die Klammerorgane.
10/2001-02/2008	Magister Studiengang an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (Hauptfach: Biologie, Nebenfächer: Psychologie und biologische Anthropologie).
06/2001	Abitur am Gymnasium Apolda
1993 - 2001	Gymnasium Apolda
07/1999	Externer Realschulabschluss an der Regelschule Wormstedt.
1989-1993	Dr.-Theodor-Neubauer-Grundschule in Apolda

## **Sonstige Kenntnisse**

Führerschein:	Klasse B
Fremdsprachen:	Englisch
EDV - Kenntnisse:	MS Office, MS Power Point, Excel, Adobe Photoshop, CorelDraw, Grams, Origin, Opus, Latex, GIS, OpenOffice