Schlussbericht

ProfilNT-Forschungsvorhaben

"Dynamik und Struktur magnetischer Nanopartikel in Polymermatrix an Oberflächen"

Zuwendungsempfänger:

Förderkennzeichen:

Fachhochschule Kaiserslautern

17PNT025

Laufzeit des Vorhabens:

09/2012 - 6/2015

Berichtszeitraum:

09/2012 - 6/2015

Autoren:

Prof. Dr. Hildegard Möbius, Prof. Dr. Karl-Herbert Schäfer, Dr. Holger Rabe, Alexander Krivcov, Dr. Anna Musyanovych, Dr. Veronika Beer, Prof. Dr. Werner Steffen

Zweibrücken, Dezember 2015

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium für Bildung und Forschung



Inhaltsverzeichnis

I. Kurzdarstellung
 Aufgabenstellung Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde Planung und Ablauf des Vorhabens Zusammenarbeit mit anderen Stellen Wissenschaftlich-technische Ausgangssituation
II. Detaildarstellung
 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen Herstellung und Verkapselung der Magnetitnanopartikel in Polymermatrix Herstellung von funktionalisierten PLLA Nanopartikel mit verbesserter Stabilität in Salzlösungen Herstellung von Schichten und insbesondere von Monolagen 3 Dynamisches Verhalten der Nanopartikel bei Anlagerung an Oberflächen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes 4 Dynamik der Nanopartikel bei Anlagerung an Goldoberfläche sowie Dynamik bei Anlagerung an Lipidschichten 5 Zellaufnahme der Nanopartikel 1.6 Nachweis der Nanopartikel auf Oberflächen mit der Magnetfeldkraftmikroskopie (MFM) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit Nutzung und Verwertung Fortschritte bei anderen Stellen Veröffentlichungen

Schlussbericht zu Vorhaben 17PNT025

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Ziel des BMBF-Projekts DYNAMO ("Dynamik und Struktur magnetischer Nanopartikel in Polymermatrix an Oberflächen") war die Untersuchung der Wechselwirkung von magnetischen Nanopartikeln in Polymermatrix mit biologischen Oberflächen (Zellmembranen) und deren Aufnahme in die Zelle. Die erhaltenen Ergebnisse sollen zum tieferen Verständnis dieser Interaktion im Hinblick auf den Einsatz in der Medizintechnik beitragen.

Zunächst sollte die Verkapselung von Magnetitnanopartikeln in einer Polymermatrix und deren Funktionalisierung durchgeführt werden. Diese Verkapselung der Partikel dient dazu, die Umhüllung der Partikel hydrophober zu gestalten als die bisher in kommerziellen Magnetitsuspensionen eingesetzten Hüllen. Dadurch wird gewährleistet, dass die Hülle nicht abgewaschen wird. Durch die Wahl der Polymere ist es möglich, die vorfunktionalisierte Oberfläche weiter zu funktionalisieren (Endfunktionalisierung) und Proteine anzubinden, die von biomedizinischem Interesse sind. Die hier für die Verkapselung vorgesehenen Polymere waren Polystyrol und Poly(L-Lactid).

Die Beweglichkeit von Nanopartikeln in Lösung wird durch die Anwesenheit einer Oberfläche oder festen Grenzfläche beeinflusst, wenn die Abstände zu den Grenzflächen von der Größenordnung der Dimensionen der Partikel sind. Diffusions- und Rotationsverhalten ändern sich hier und beeinflussen damit die Transporteigenschaften in der Nähe von Oberflächen wie beispielsweise Zellmembranen.

Diese dynamischen Prozesse können in einem vor kurzem entwickelten neuen Messverfahren, der Resonance Enhanced Dynamic Light Scattering (REDLS) verfolgt werden. Zusätzlich können mittels dynamischer Lichtstreuung bzw. in der depolarisierten dynamischen Lichtstreuung die Diffusionskoeffizienten von Nanopartikeln in Lösung jeweils für die translatorische und die rotatorische Diffusion vermessen werden. Die Ergebnisse dieser Methoden lassen sich kombinieren, um Aussagen über mögliche anisotrope Verteilungen der Magnetitpartikel in der Nähe der Grenzfläche bzw. in den Polymer-Nanopartikeln zu treffen.

Parallel zu den dynamischen Untersuchungen erlauben strukturelle Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop und der Röntgenreflexion Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit sowie die Schichtdicken der an den Oberflächen sich anlagernden Nanopartikelschichten. Durch Messungen der Magnetkraftmikroskopie lässt sich die Verteilung der magnetischen Nanopartikel auf der Oberfläche erfassen.

Zusätzlich sollten primäre enterische und spinale Nerven- und Gliazellen Nanopartikeln im Kulturmedium exponiert werden. In diesem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob die Zellen die Nanopartikel direkt aufnehmen. Dazu sollten die magnetischen Nanopartikel mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert werden. So kann die Aufnahme direkt und in Echtzeit verfolgt werden.

Das Projekt befasste sich im Wesentlichen mit den folgenden Arbeitsschwerpunkten:

- Herstellung und Verkapselung der Nanopartikel in Polymermatrix und Schichtherstellung (Monolagen)
- Dynamische Messungen Einfluss der Oberfläche auf Translation und Rotation und Anlagerung der Nanopartikel
- Messungen der Struktur der Nanopartikel auf Oberflächen und Nachweis der Nanopartikel mit der Magnetfeldkraftmikroskopie
- Untersuchung der Zellaufnahme der Nanopartikel

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Hildegard Möbius am Campus Zweibrücken der Fachhochschule beschäftigt sich seit 2009 mit Forschungs- und Entwicklungsarbeiten im Bereich magnetischer Nanopartikel in Polymermatrix.

Zunächst übernahm die Fachhochschule im BMBF-Projekt HOMAGE ("HOch-performante MAgnetische GEber mit neuer Hall-Sensorik und Technologie zur µm-genauen perpendikularen Magnetisierung von Polscheiben") die physikalische Analyse der magnetischen Materialien und Komponenten. Ziel des Projektbeitrags war es, physikalische Eigenschaften, Zuverlässigkeit und Alterung magnetischer Materialien, von Komponenten und von Sensoren (Hall, XMR) zu untersuchen. Die Ergebnisse flossen unmittelbar in die Entwicklungsarbeiten der Partner ein.

In den beide Projekten, HOMAGE und dem Folgeprojekt DYNAMO, wurde die gleiche Materialklasse untersucht. Es handelt sich in beiden Projekten um Nanopartikel in Polymer-Matrix. Im Projekt HOMAGE bestand die Trägermatrix aus NBR (Nitril Butadien Kautschuk). Als magnetischen Füller werden Hartferrite eingesetzt. Im Projekt DYNAMO sollten Magnetitnanopartikel, die in Polystyrol bzw. PLLA verkapselt sind, untersucht werden.

Das im Rahmen des Vorläuferprojekts HOMAGE aufgebaute magnetischen Prüflabor sowie die am Standort vorhandenen Großgeräte (REM, AFM, Röntgenreflektometer), die auch im Projekt HOMAGE zum Einsatz kamen, wurden auch im Projekt DYNAMO zu analytischen Untersuchungen genutzt.

In den beiden Projekten wurde zwar die gleiche Materialklasse mit den gleichen Analysemethoden untersucht, aber mit ganz unterschiedlichen Fragestellungen. Im Projekt HOMAGE sind die Fragestellungen sehr anwendungsbezogen: Ziel der Untersuchungen der Hochschule war es, das Verhalten der neuen perpendikular magnetisierten Maßverkörperungen im Vergleich zur herkömmlichen longitudinalen Variante unter bestimmten Umwelteinflüssen zu spezifizieren und die jeweiligen Signifikanzen für das Gebersystem zu identifizieren. Im Projekt DYNAMO ging es um das prinzipielle Verständnis der Struktur und Dynamik magnetischer Nanopartikel an Oberflächen und die Zellaufnahme im Hinblick auf Anwendungen in der Medizintechnik

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde in folgende Arbeitspakete unterteilt, die bei den beteiligten Projektpartnern (Angabe in Klammern) durchgeführt wurden:

AP 1 Herstellung Nanopartikel (MPI)
AP 2 Aufbau Magneteinheit (HS/MPI)
AP 3 Messung der Struktur (HS)
AP 4 Messung der Dynamik (MPI)
AP 5 WW Dynamik und Struktur (MPI/HS)
AP 6 Herstellung simulierter Zellmembranen (HS)
AP 7 Präparation Nervenzellen (HS)

Alle Arbeitspakete sowie die gesetzten Meilensteine wurden erfolgreich abgeschlossen.

4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

- Im Rahmen des Projekts wurde insbesondere Kontakt zum BMBF-Projekt Nanokon aufgenommen und ein Treffen im Max-Planck-Institut f
 ür Polymerforschung organisiert (20.08.2012)
- Forschungsaufenthalt von V. Beer im Labor von Prof. Dr. Shin-ichi Yusa, University of Hyogo, Himeji, Japan(29.11.13-18.1.14)
- Zusammenarbeit mit Universität Hasselt, Belgien, und INESC-MN, Lissabon, Portugal zum Aufbau eines thematischen Netzwerks

5. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Stand der Technik - Magnetische Nanopartikel in der Medizin

Magnetische Nanopartikel gewinnen in der Medizintechnik zunehmend an Bedeutung. Die Einsatzmöglichkeiten reichen von der Diagnostik (z.B. Kontrastmittel in der Kernspintomographie, Mikrocomputertomografie, Magnetic Particle Imaging) bis zur Therapie (z.B. magnetisches Drug Targeting (MDT), magnetische Hyperthermie (MHT)).

- H. Rahn, I. Gomez-Morilla, R. Jurgons, Ch. Alexiou, S. Odenbach, Micro computed tomography analysis of ferrofluids used for cancer treatment, Journal of Condensed Matter, 2008, 20 (20)
- B. Gleich, J. Weizenecker, Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles, Nature Vol. 435 -30 (2005)
- N.A. Frey, S.P. Peng, K. Chemng, S. Sun, magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage, Che. Soc. Rev., 2009, 38, 2532-2542

Stand der Technik - Herstellung von magnetischen Polymer Kompositpartikeln

Magnetische Polymer-Kompositpartikel können entweder durch Beschichtung von magnetischen Nanopartikeln mit einer Polymerschicht oder durch Verkapselung von Eisenoxidpartikeln in einer Polymermatrix hergestellt werden, wobei verschiedene Syntheseansätze untersucht werden.

- A.M. Schmidt, Macromol. Rapid Commun., 2005, 26, 93–97
- J.L. Arias, V. Gallardo, S. A. Gomez-Lopera, R. C. Plaza, A. V. Delgado, J. Controlled Release 2001, 77, 309-321
- S.J. Lee, J.R. Jeong, S.C. Shin, J.C. Kim, Y.H. Chang, Y.M. Chang, J.D. Kim, J. Magn. Magn. Mater. 2004, 272–276, 2432.;
- R.A. Wassel, B. Grady, R.D. Kopke, K.J. Dormer, Colloids Surf., A 2007, 292, 125.; J. Gang, S. B. Park,
- W. Hyung, E.H. Choi, J. Wen, H.S. Kim, Y.G. Shul, S. Haam, S.Y. Song, J. Drug Targeting 2007, 15, 445.
- L.N. Okassa, H. Marchais, L. Douziech-Eyrolles, K. Herve, S. Cohen-Jonathan, E. Munnier, M. Souce, C. Linassier, P. Dubois, I. Chourpa, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007, 67, 31.
- M. Hamoudeh, H. Fessi, J. Colloid Interface Sci. 2006, 300, 584. ; J. Yang, S. B. Park, H. G. Yoon, Y. M. Huh, S. Haam, Int. J. Pharm. 2006, 324, 185.]
- F. Caruso, A. S. Susha, M. Giersig, H. Mohwald, Adv. Mater. 1999, 11, 950.
- D. Hoffmann, K. Landfester, M. Antonietti, Magnetohydro- dynamics 2001, 37, 217
- L.P. Ramirez, K. Landfester, Macromol. Chem. Phys. 2003, 204, 22.
- V. Holzapfel, M. Lorenz, C.K. Weiss, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailander, J. Phys.: Condens. Matter 2006, 18, 2581
- Xia, J. H. Hu, C. C. Wang, D. L. Jiang, Small 2007, 3, 1811

Stand der Technik – Resonance Enhanced Dynamic Light Scattering (REDLS)

Möchte man dynamische Prozesse in dünnen Filmen oder in der Nähe von Grenzflächen beobachten, kann man seit kurzem auf die neu entwickelten Techniken REDLS (Resonance Enhanced Dynamic Light Scatteringoder WEDLS (Waveguide Enhanced Daynamic Light Scattering) zurückgreifen. Diese beiden Methoden nutzen resonante Anregungen von Oberflächen-Moden wie z.B. Oberflächenplasmonpolaritonen bei REDLS oder Wellenleitermoden bzw. deren evaneszenten Anteile bei WEDLS als anregendes elektrisches Feld für die dynamische Lichtstreuung aus.

- M. A. Plum, W. Steffen, G. Fytas, W. Knoll and B. Menges, Opt. Express 17, 10365 (2009).
- M. A. Fluin, W. Stellen, G. Fylas, W. Kholi and B. Menges, Opt. Express 17, 10305 (20)
 Plum, M A, Rička, J, Butt H-J, and Steffen, W, New J. of Phys., 12, 102022 (2010).
- Plum, M.A., Menges, B., Fytas, G., Butt, H.-J., and Steffen, W., Rev. Sci., Inst, 82, 015102 (2011); doi:10.1063/1.3509408.
- Plum, M.A., Vianna, S.D.B., Unger, A., Roskamp, R.F., Butt, H.-J., Menges, B. and Steffen, W., Soft Matter, in press, advanced online publication (2011), DOI: 10.1039/C0SM00871K

Stand der Technik – Magnetische Kraftfeldmikroskopie (MFM) an Nanopartikeln

Sowohl die MFM-Messungen an magnetischen Nanopartikeln als auch deren Interpretation stellen eine technische und wissenschaftliche Herausforderung dar, an der derzeit intensiv gearbeitet wird. Man steht jedoch erst am Anfang, diese Technologie zum besseren Verständnis der Zellaufnahme magnetischer Nanopartikel nutzen zu können.

- V. L. Mironov, D.S. Nikitushkin, C. Bins, A.B. Shubin, P.A. Zhdan, IEEE Transactions on Magnetics, Vol 42, No. 11, November 2011
- M. Rasa, B.W. M. Kuipers, A.P. Philipse, Journal of Colloid and Interface science 250, 303 -315 (2002)
- J. Pacifico, Y.M. van Leeuwen, M. S. Spuch-Calvar, A. Sánchez-Iglesias, L. Rodríguez-Lorenzo, J.Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, Nanotechnology 20 (2009)
- Y. Zhang, M. Zhang, M. Ozkan, C. Ozkan, Biotechnl. Prog. Vol, 25, No 4, 2009

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen

1.1 Herstellung und Verkapselung der Magnetitnanopartikel in Polymermatrix

Die Magnetitnanopartikel, deren Oberfläche zur Hydrophobisierung mit Ölsäure funktionalisiert ist, wurden nach einem in der Literatur beschriebenen Fällungsverfahren hergestellt und mittels Pulver-Röntgendifftraktometrie und thermogravimetrischer Analyse (TGA) charakterisiert (Abbildung 1, Abbildung 2) [1].



Abbildung 1. Pulver-Röntgendiffraktogramm der Magnetitnanopartikel.

Die Verkapselung der Magnetitnanopartikel in eine Poly-L-Lactid-Matrix (poly(lactic acid), PLLA) erfolgte in einer Kombination aus Miniemulsion und Lösungsmittelverdampfung wie in der Literatur beschrieben [2]. Die hydrophoben Magnetitpartikel wurden gemeinsam mit PLLA in Chloroform gelöst. Diese organische Phase wurde mit einer wässrigen Natriumlaurylsulfatlösung durch Ultraschall emulgiert. Durch Verdampfung des leicht flüchtigen Chloroforms aus den Öltröpfchen der Miniemulsion wurden PLLA-Nanopartikel erhalten, in denen die Magnetitnanopartikel verkapselt waren. Die Partikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und TGA charakterisiert.



Abbildung 2. Thermogravimetriekurven der Magnetit- und Kompositnanopartikel. Die Kompositnanopartikel enthalten demnach (37.0±0.3) Gew% Magnetit.



Abbildung 3. Mit DLS bestimmte Größenverteilung der Kompositnanopartikel.

Herstellung von funktionalisierten PLLA Nanopartikeln mit verbesserter Stabilität in Salzlösungen

Im Rahmen des Projekts wurden PLLA-basierte Nanopartikel mit erhöhter Oberflächenladung und deshalb verbesserter Stabilität in Salzlösungen sowie Nanopartikel mit kovalent und somit stabil gebundener Fluoreszenzmarkierung hergestellt. Hierfür wurde eine Kombination aus Miniemulsion und Lösungsmittelverdampfung eingesetzt. Im Unterschied dazu wurde in der Miniemulsion aber nicht nur vorpolymerisiertes PLLA sondern auch ein eigens synthetisiertes, milchsäurebasiertes Copolymer mit entweder geladenen oder fluoreszierenden Einheiten verwendet. Die Synthese dieses Copolymers erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurde nach einer publizierten Vorgehensweise ein Oligomilchsäuremolekül mit einer Doppelbindung an einem Ende (HEMA-OLA) in einer zinnkatalysierten, ringöffnenden Polymerisation synthetisiert [3]. Die Doppelbindung ermöglicht es, dieses Oligomilchsäuremolekül mit Methacrylsäure (MAA) zu copolymerisieren, um durch die Carboxylgruppen der Methacrysläure zusätzliche Ladungen in das entstehende Polymer einzubringen. Alternativ wurde auch ein BODIPY-Farbstoff (B612-MA, synthetisiert von A. Turchatov nach Nikiforow et al. mit der polymerisierbaren Oligomilchsäure in einer freien radikalischen Reaktion umgesetzt [4]. Beide Copolymere wurden nach Aufreinigung und Charakterisierung schließlich separat jeweils mit einem Anteil an vorpolymerisierten PLLA in einem Miniemulsion-Lösungsmittel-Verdampfungs-Verfahren zu Nanopartikeln umgesetzt.



Abbildung 4. Übersicht über die verschiedenen Verfahren, um die carboxyl- bzw. fluoreszenzfunktionalisierten Nanopartikel herzustellen. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Zusätzlich wurden auch Nanopartikel mit erhöhter Oberflächenladung hergestellt, bei denen die Copolymerisation der Oligomilchsäure und der Methacrylsäure in einem Schritt mit dem Miniemulsion-Lösungsmittelverdampfungs-Verfahren durchgeführt wurde. Sie sind wie die Nanopartikel die aus dem separat synthetisierten Copolymer synthetisiert wurden, im Vergleich mit unfunktionalisierten PLLA-Partikeln in Salzlösungen höherer Konzentrationen stabil (Abbildung 5).



Abbildung 5. Links: Exemplarische Autokorrelationsfunktionen bei verschiedenen Salzkonzentrationen, gemessen bei einem Streuwinkel von jeweils 90°. Rechts: Diffusionskonstanten der Nanopartikel bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Erste Zeile: Vergleichspartikel ohne Methacrylsäure. Mittlere Zeile: Carboxylfunktionalisierte Nanopartikel, bei denen die Copolymerisation und der Miniemulsion-Lösungsmittelverdampfungsprozess gleichzeitig durchgeführt wurden. Untere Zeile: Carboxylfunktionalisierte Nanopartikel, bei denen die Copolymerisation und der Miniemulsion-Lösungsmittelverdampfungsprozess separat durchgeführt wurden. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Die Stabilität der Bindung des Farbstoffs an den Nanopartikel wurde mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie gezeigt. Hierfür wurden Autokorrelationsfunktionen direkt nach der Partikelsynthese und 10 Tage später gemessen. Diese Kurven sind identisch, insbesondere zeigte die nach zehn Tagen gemessene keinen zweiten, schnellen Prozess, der auf aus dem Partikel ausgetretenen Farbstoff hindeuten würde (Abbildung 6).



Abbildung 6. Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen der farbstoffmarkierten Nanopartikel direkt (blau) und zehn Tage nach der Herstellung (orange). Abdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

1.2 Herstellung von Schichten und insbesondere von Monolagen

Versuche zur Herstellung von Monolagen mittels Langmuir-Blodgett-Technik und Tauchbeschichtung (Dip Coating) haben gezeigt, dass die Tauchbeschichtung von Silizium-Substraten vielversprechendere Ergebnisse als die Langmuir-Blodgett-Technik liefert.

Die mittels Tauchbeschichtung hergestellten Schichten wurden mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) charakterisiert (Abbildung 7, Abbildung 8). Es wurden Partikeldispersionen mit verschiedenen Feststoffgehalten untersucht (1,2 Gew%, 0,6 Gew%; 0,3 Gew%). In allen Fällen wurden nahezu geschlossene Schichten gebildet.



Abbildung 7. REM-Abbildung einer Schicht aus PLLA-Nanopartikeln (aus 1,2 wtGew% Partikeldispersion). Zum Schutz des PLLAs vor Schmelzen im Elektronenstrahl wurden 5 nm Platin aufgesputtert.



Abbildung 8. AFM-Messung: Topographie einer PLLA-Schicht (1,2 wtGew%).

Es wurden Schichten sowohl mit PS als auch mit PLLA-Partikeln hergestellt. Durch Optimierung der Parameter konnte die Dicke der Schicht schrittweise reduziert werden bis, wie in Abbildung **9** zu sehen, eine Flächenbedeckung zustande kam, die einer Monolage entspricht.



Abbildung 9. Unterschiedliche Vergrößerungen einer über Dip Coating hergestellten Schicht aus PS-Partikel mit 500nm/sec gezogen

Herstellung von Polystyrol-basierten Nanopartikeln (Probe: AM-ASS5-PM)

5,85 g Styrol, 0,15 g Acrylsäure, 3 mg Fluoreszenzfarbstoff Perylenmonoimid (PMI), 100 mg Initiator, V59 und 250 mg Hexadecan werden zusammengemischt. Diese Lösung wird mit einer Lösung von 72 mg SDS in 24 g H₂O vermischt und 1 Stunde lang magnetisch bei höchster Geschwindigkeit gerührt. Anschließend wird durch Ultraschall (2 min, 90% Amplitude, 10 mm-Spitze) unter Eiskühlung bei 0 °C die Miniemulsion hergestellt und dann bei 72 °C über Nacht polymerisiert. Die erhaltenen Latexpartikel werden abfiltriert, Feststoffgehalt und Teilchengröße werden gemessen. Die Partikel werden durch Dialyse über eine Größenausschlussmembran (MWCO 100000 Da) gewaschen, um SDS von der Oberfläche der Teilchen zu entfernen. Es wird solange dialysiert, bis die Leitfähigkeit des Waschwassers $\sigma < 3 \,\mu$ S/cm beträgt.

1.3 Dynamisches Verhalten der Nanopartikel bei Anlagerung an Oberflächen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes

Um die Reaktion des dynamischen Verhaltens von Polymernanopartikeln auf ein extern angelegtes Feld zu untersuchen, wurde ein Messstand für die plasmonenresonanzverstärkte dynamische Lichtstreuung (resonance enhanced dynamic light scattering, REDLS) entwickelt, mit dem ein elektrisches Feld an die Partikeldispersion angelegt werden kann. Dies wird dadurch ermöglicht, dass sie sich zwischen einer Goldschicht und einer Indium-Zinn-Oxid-Schicht (indium tin oxide, ITO) befindet, die auf die Küvette aufgebracht wurde (

Abbildung). Beide Schichten sind über Federkontakte mit einem Funktionsgenerator verbunden. Da der Abstand zwischen den beiden Elektrodenschichten nur 163 μ m beträgt, ist die benötigte Probenmenge gering und auch beim Anlegen niedriger Spannungen im Bereich von Zehntelvolt werden bereits hohe elektrische Feldstärken im kV/m-Bereich erreicht.,



Abbildung 10. Schemazeichnung des Aufbaus für REDLS-Messungen im elektrischen Feld. Die Goldschicht (gelbe Linie) unten ist einerseits notwendig für die Anregung des Oberflächenplasmons, andererseits dient sie auch als Elektrode und Dichtung. Die blau dargestellte Quartzglasküvette wird auf sie aufgepresst. Auf die Innenseite der Küvette wurde eine ITO-Schicht aufgebracht, die als Gegenelektrode dient. Durch das Kontaktieren der Gold- und der ITO-Schicht über die Federkontakte (C) mit einem Funktionsgenerator (FG) können Wechselspannungen angelegt werden. Ein Kaptonband (K) dient als Isolation zwischen beiden Elektroden.

Bei der REDLS-Methode wird ein Oberfächenplasmon in einem Metallfilm, in unserem Fall der Goldschicht, die auch als Elektrode dient, erzeugt. Das Oberflächenplasmon ist eine der elektromagnetische Metall-Proben-Grenzfläche Welle, die entlang propagiert. Das elektromagnetische Feld dieser Welle klingt senkrecht zur Goldfläche exponentiell ab, die Eindringtiefe im Falle wässriger Dispersionen beträgt etwa 200 nm. Partikel, die sich innerhalb dieses evaneszenten Feldes befinden, streuen es. Der vorliegende Aufbau erlaubt die Detektion und zeitabhängige Korrelation der Intensität des Streulichts simultan bei vier verschiedenen Winkeln gleichzeitig (Abbildung 11). Die Kollimatoren, durch die der Detektionswinkel definiert wird, sind auf einem Goniometer montiert, so dass der Winkel des Ensembles frei gewählt werden kann. Die gleichzeitige Detektion bei mehreren Streuwinkeln erlaubt auch Messungen von instabilen oder sich verändernden Proben, da die für verschiedene Winkel erhaltenen Informationen jeweils zum gleichen Zeitpunkt aufgenommen wurden.



Abbildung 11. Schemazeichnung des REDLS-Aufbaus. Im durch die rote Linie dargestellten Strahlengang befinden sich Spiegel (M), Irisblenden (PH), Filter (F), und eine Linse (L) zur Justage,

Abschwächung und Fokussierung des Strahls. Über Kollimatoren (K) wird das Streulicht bei vier verschiedenen Winkeln gleichzeitig in Lichtwellenleiterfasern eingekoppelt.

Die Autokorrelationsfunktionen, die in REDLS-Messungen bei angelegtem externen Feld gemessen wurden, unterscheiden sich deutlich von denjenigen, die im feldfreien Fall erhalten wurden. Die im feldfreien Fall erhaltene Autokorrelationsfunktion kann durch eine gestreckte Exponentialfunktion beschrieben werden, wobei die Abklingrate direkt mit dem Diffusionskoeffizienten der Partikel zusammenhängt. Wurde eine Rechteckspannung angelegt, zeigte die Autokorrelationsfunktionen einen zweiten, periodischen Prozess im Bereich der höheren Latenzzeiten. Dieser ließ sich mit einer gedämpften Cosinusfunktion beschreiben, wobei die Abklingrate wiederum durch die Diffusion der Partikel bestimmt wird. Die Periodizität rührt daher, dass lediglich die Partikel, die sich innerhalb des Probenvolumens, das vom evaneszente elektromagnetische Feld des Oberflächenplasmons durchdrungen wird, dieses Feld streuen können. Durch das Anlegen eines Wechselfelds senkrecht zum Goldfilm bewegen sich die Nanopartikel periodisch in dieses Volumen hinein und aus ihm heraus. Dadurch fluktuiert auch die Intensität des Streulichts periodisch. Da die Autokorrelationsfunktion einer periodischen Funktion immer dieselbe Periodizität wie diese besitzt, spiegelt ihre Frequenz diejenige der angelegten Wechselspannung wider (Abbildung 12).



Abbildung 12. Frequenz des periodischen Teils der Autokorrelationsfunktion f_{cos} im Vergleich zur Frequenz der angelegten Rechteckspannung f_{AC} . Die grau eingezeichnete Linie markiert den Fall $f_{cos} = f_{AC}$.

Neben der Frequenz des langsam abklingenden, periodischen Teils der Autokorrelationsfunktion hängt auch deren Abklingrate von der Frequenz der angelegten Wechselspannung ab. Dies wurde in einem Fluoreszenzkorrelationsexperiment gezeigt. Hierbei wurden entsprechend fluoreszenzmarkierte Nanopartikel, die in Größe und Oberflächenladung äguivalent zu den in den Streulichtexperimenten verwendeten waren, genutzt. Die Detektion von Fluoreszenz anstelle von Streulicht war notwendig, da in der DLS-Autokorrelationsfunktion bei Frequenzen ab 10 Hz kein periodischer Prozess mehr beobachtbar ist, vermutlich da er durch den schnellen Prozess überlagert wird. In den Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen ist der schnelle Prozess vollständig unterdrückt, so dass der periodische Prozess auch bei hohen Frequenzen der Wechselspannung sichtbar ist. Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, steigt die Abklingrate des langsamen Prozesses mit der Frequenz der Wechselspannung. Das bedeutet, dass die thermisch aktivierte Bewegung der Partikel bei hohen Frequenzen weniger eingeschränkt ist als bei niedrigen. Dies ist damit zu begründen, dass bei längeren Perioden in denen das Feld in die gleiche Richtung zeigt, die Konzentration der Partikel an der Grenzfläche höher ist als bei geringeren Perioden – Berechnungen ergeben einen Volumenanteil der Nanopartikel von bis zu 0.33 im Vergleich zu einem Volumenanteil von 0.001 bei einer gleichmäßigen Verteilung der Nanopartikel in der Küvette. Ein derart erhöhter Volumenanteil von Nanopartikeln führt zu einer verminderten Diffusionsgeschwindigkeit an Grenzflächen, wie Michailidou et al. bereits zeigten [5].



Abbildung 13. Abklingrate Γ_{cos} des langsamen, periodischen Prozesses in Abhängigkeit von der Frequenz des angelegten Feldes. Ergebnisse aus REDLS-Messungen sind grün, diejenigen aus Fluoreszenzkorrelationsmessungen violett dargestellt.

Auch die Amplitude der Wechselspannung hat einen Einfluss auf die Dynamik der Nanopartikel an der Grenzfläche: Abbildung 14 zeigt, dass die Amplitude des langsamen, periodischen Prozesses der Autokorrelationsfunktion im Vergleich zu deren Gesamtamplitude mit Erhöhung der Frequenz der Rechteckspannung steigt. Die Amplitude hängt bei einem heterodynen Lichtstreuexperiment, wie es hier vorliegt, von der Anzahl der Partikel im Streuvolumen ab. Je höher die Spannung, desto grösser die Anzahl der vom elektrischen Feld beeinflussten Partikel. Dies ist damit zu begründen, dass das Potential nahe der Elektrode exponentiell abfällt. Je höher nun das Potential direkt an der Elektrodengrenzfläche ist, desto weiter von ihr entfernt liegt der Punkt, an dem das Potential vorliegt, das mindestens erforderlich ist, um eine deutlich gerichtete Bewegung der thermisch diffundieren Partikel hervorzurufen.



Abbildung 14. Amplitudenanteil des langsamen, periodischen Prozesses A_{cos} an der Gesamtamplitude der Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit von der angelegten Spannung.

Im Allgemeinen wurde gezeigt, dass die Manipulation von Nanopartikeln mit externen Feldern, hier einem elektrischen Feld, möglich ist und diese mit der REDLS-Methode studiert werden kann. Die vorgestellten Beispiele zeigen einerseits, wie die Partikelbewegung der Ausrichtung des externen Feldes folgt, andererseits auch wie sich Nanopartikel an einer festen Oberfläche konzentrieren, wenn sie von einem externen Feld dorthin gezwungen werden.

1.4. Dynamik der Nanopartikel bei Anlagerung an Goldoberfläche sowie Dynamik bei Anlagerung an Lipidschichten

Die Dynamik der PLLA-Nanopartikel mit verkapseltem Magnetit im feldfreien Fall wurde mit REDLS einerseits an einer Goldschicht und andererseits an einer Lipidschicht gemessen. Die Goldschicht wurde hierfür zuvor mit 11-Mercaptoundecansäure funktionalisiert um eine Anlagerung der Nanopartikel zu unterbinden. Die Lipidschicht wurde nach der von J. B. Hubbard et al. publizierten Methode aus einem Alkanthiol und einen Phosphocholin (1,2-Dimyristoyl-**sn**-Glycero-3-

Phosphocholin) hergestellt (Abbildung 15, Abbildung 16) [6]. Die Ausbildung der Hybridmembran wurde mittels SPR überprüft (Abbildung17).



Abbildung 15. Strukturformel von 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin.



Abbildung 16. Schematische Darstellung der Herstellung der Hybridmembran. Zunächst wird das Goldsubstrat mit Octadecanthiol funktionalisiert. Dieses hat etwa die gleiche Länge wie DMPC, das im nächsten Schritt als Vesikel zu der Goldschicht gegeben wird.



Abbildung 17. Reflektivitätskurven der alkanthiol-funktionalisierten Goldschicht. Die Vergrößerung des Bereichs um den Resonanzwinkel des Oberflächenplasmons zeigt, dass sich eine zusätzliche Schicht auf dem Substrat bildet, die sich auch mit Pufferlösung nicht abwaschen lässt. Ein Fit der Reflektivitätskurven ergab, dass es sich dabei um eine zusätzlich ca.15 Å dicke Schicht mit dem Brechungsindex einer Lipidmembran hat, was dem erwarteten Wert entspricht [7].

Eine Anlagerung der Nanopartikel an diese Membran wurde mit einer weiteren SPR Messung überprüft (Abbildung 18).



Abbildung 18. Reflektivitätskurven der Goldschicht mit Hybridmembran in Pufferlösung und in Partikeldispersion. Die Nanopartikel lagern sich nicht an der Membran an, dies würde zu einer stärkeren Verschiebung des SPR-Winkels nach rechts führen.

Abbildung 19 zeigt zwei exemplarische Autokorrelationsfunktionen, die jeweils bei einem Streuvektor $q = 1.87 \times 10^{-7}$ m an der carboxylierten Goldschicht bzw. der Hybridmembran gemessen wurden. Die Abklingrate der beiden Autokorrelationsfunktionen und damit der Diffusionskoeffizient der Nanopartikel sind nahezu gleich für die beiden Grenzflächen. Im Vergleich zur Diffusion der Partikel im freien Volumen wo ein Diffusionskoeffizient von $4.4 \times 10^{-12} (s^{-1} \cdot m^{-2})$ gemessen wird, ist sie jedoch mit einem Diffusionskoeffizienten von $3.1 \times 10^{-12} (s^{-1} \cdot m^{-2})$ stark eingeschränkt. Dies ist auf die hydrodynamischen Wechselwirkungen der Partikel mit der Oberfläche zurückzuführen. Es hat keinen Einfluss auf die Diffusion der Partikel, ob die Goldschicht negativ geladen ist wie im Fall der Carboxylfunktionalisierung oder ob sie wie die Lipidschicht elektrisch neutral ist.



Abbildung 19. Normierte Autokorrelationsfunktion der Partikeldiffusion an einer negativ funktionalisierten Goldschicht und der Hybridmembran. Gemessen wurde bei einem Streuwinkel $\theta = 90^{\circ}$ bzw. $q = 1.87 \times 10^{-7}$ m.

Die Diffusionsgeschwindigkeit der Nanopartikel wird also durch die Anwesenheit einer festen Grenzfläche stark verringert – hierbei spielt die exakte chemische Zusammensetzung der Grenzfläche in den untersuchten Beispielen keine Rolle.

Die in Abschnitt 1.2 beschriebene Arbeit wurde veröffentlicht:

V. Beer, K. Koynov, W. Steffen, K. Landfester, A. Musyanovych, *Macromol. Chem. Physics* **2015**, *216*, 1774.

Literaturverzeichnis

[1] L. P. Ramirez, K. Landfester, Macromol Chem Physic 2003, 204, 22.

[2] M. Urban, A. Musyanovych, K. Landfester, Macromol Chem Physic 2009, 210, 961.

[3] K. Ishimoto, M. Arimoto, T. Okuda, S. Yamaguchi, Y. Aso, H. Ohara, S. Kobayashi, M. Ishii, K.

Morita, H. Yamashita, N. Yabuuchi, Biomacromolecules 2012, 13, 3757.

[4] I. Nikiforow, J. Adams, A. M. König, A. Langhoff, K. Pohl, A. Turshatov, D. Johannsmann, *Langmuir* **2010**, *26*, 13162.

[5] V. N. Michailidou, G. Petekidis, J. W. Swan, J. F. Brady, Phys Rev Lett 2009, 102.

[6] J. B. Hubbard, V. Silin, A. L. Plant, *Biophysical Chemistry* 1998, 75, 163.

[7] C. W. Meuse, S. Krueger, C. F. Majkrzak, J. A. Dura, J. Fu, J. T. Connor, A. L. Plant, *Biophysical Journal* **1998**, *74*, 1388.

1.5 Zellaufnahme der Nanopartikel

Die Aufnahme magnetischer Polylaktide-Nanopartikel (PLLA-MNP) in biologische Zellen wurde an HEK293T Zellen untersucht. Dazu wurden in allen Versuchen 100 µg/ml Nanopartikel eingesetzt, die nach dem Standardprotokoll gelöst wurden. Da mittlerweile in der Literatur gut beschrieben ist, dass gelöste Proteine eine Korona um Nanopartikel (NP) bilden, die eine deutliche Veränderung der NP-Aufnahme in Zellen bewirkt, wurde in Vorversuchen der Einfluss der FCS-Konzentration im Medium auf die NP-Aufnahme und -Abgabe untersucht (Abb.20).



Abbildung 20. Zusammenspiel der PLLA-MNP mit der FCS-Konzentration im Kulturmedium. A) Abhängigkeit der Aufnahme in HEK293T Zellen. Mit steigender FCS-Konzentration wird die NP-Aufnahme in die Zellen schlechter. B) Abhängigkeit der Abgabe aus den Zellen. Bei "0"% FCS verbleiben die NPs deutlich länger in den Zellen.

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der FCS-Konzentration im Medium und der PLLA-MNP Aufnahme in HEK239 Zellen (1A). Bei einer Konzentration von 3% FCS ist keine signifikante Verringerung an NPs in den Zellen feststellbar, wohingegen ab 5% die Menge an intrazellulären NPs mit steigender FCS-Konzentration abnimmt. Eine dazu reziproke Beziehung zeigt sich in der NP-Ausschleusung aus den Zellen (1B). Während nach 80 Minuten bei 10% FCS im Medium ungefähr 90% der NPs aus den Zellen wieder ausgeschleust wurden, sind bei 0-1% FCS nach 800 Minuten noch ungefähr 40% der aufgenommenen NPs in den Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Eigenschaft von HEK293T Zellen auch bei geringen FCS-Konzentration im Zellkulturmedium zu wachsen, haben wir für die folgenden Versuche die FCS-Konzentration von 10% auf 1% reduziert.

In den folgenden Versuchsreihen wurden Aufnahme und Lokalisation der PLLA-MNPs in Zellen näher charakterisiert. Dazu wurde zunächst die Lokalisation der grün fluoreszierenden NPs mit Hilfe eines Fluoreszenz Mikroskop mit Apotome-Technik (Zeiss Cell-Observer) in der Regel nach 4 h, 8 h, 24 h und in einigen Fällen exemplarisch nach 48 h bestimmt. Zur Orientierung und besseren Lokalisation wurden die Zellmembran mit Wheat germ Agglutinin (WGA, 0,05 mg/ml) rot markiert und die Zellkerne mit DAPI blau markiert (Abb 21). Um alle physiologischen Prozesse zu stoppen, wurden die Präparate nach der jeweiligen NP-Inkubationszeit mit 4% Paraformaldehyd fixiert.



Abbildung 21. Lokalisation der fluoreszierenden PLLA-MNPs (grün) in HEK293 Zellen nach 4h (A, A1), 8h (B, B1), 24h (C, C1) und 48h (D, D1). Zur besseren Lagebestimmung der NPs wurde der Zellkern mit DAPI gefärbt (blau) und die Zellmembran mit WGA markiert (rot).

Die repräsentativen Beispiele zeigen deutlich, dass die NPs in die Zellen aufgenommen werden. Weiterhin ist ein Maximum an grüner Fluoreszenz in den Zellen bei 8h zu erkennen, während nach 24h die grüne Fluoreszenz der NPs in den Zellen Cluster bildet. Nach 48h ist kaum mehr Grün-Fluoreszenz feststellbar. Möglicherweise wurden die PLLA-MNPs in den Zellen abgebaut und damit der Farbstoff denaturiert, oder die NPs wurden aus den Zellen ausgeschleust. Nachdem feststand, dass PLLA-MNPs in HEK293T Zellen aufgenommen werden und für einige Stunden im Zytoplasma bleiben, wurde der Aufnahme Mechanismus der NPs untersucht. Mittlerweile ist bekannt, dass NPs über verschiedene Endozytosewege in Zellen aufgenommen werden können. Während nur eine kleine Gruppe von spezialisierten Zellen (z.B. Makrophagen) über den Weg der Makrozytose größere Partikel aufnehmen können, sind andere Formen der Endozytose weit verbreitet. Im Folgenden haben wir daher zwei generelle Blocker für diese Wege eingesetzt, die jedoch an unterschiedlicher Stelle im Endozytoseprozess eingreifen. Der grundsätzliche Versuchsablauf blieb zu den obigen unverändert. Die Substanz 5(-N-Ethyl-N-Isopropanol)Amilorid (150 µM) inhibiert viele verschiedene Transportprozesse über die Membran. Clopromazin (50 µM) hingegen behindert die Chlatrin vermittelte Endozytose, indem es die Chlatrin-Lattice Bildung verhindert und so die endozytotische "Falle" auf der Zellmembran zerstört. In der Abbildung 22 sind jeweils repräsentative Ergebnis-Beispiele dargestellt.



Abbildung 22. Einfluss von Endozytose-Hemmer auf die Aufnahme fluoreszierenden PLLA-MNPs (grün) in HEK293 Zellen nach 4h (A, A1) und 8h (B, B1). In Spalte A wurde Cloppromazin inkubiert, in B 5(-N-Ethyl-N-Isopropanol)Amilorid. Zur besseren Lagebestimmung der NPs wurde der Zellkern mit DAPI gefärbt (blau) und die Zellmembran mit WGA markiert (rot).

Im Vergleich mit den jeweiligen Zeitpunkten aus Abb. 22 ist deutlich zu erkennen, dass Clopromazin keinen Einfluss auf die Aufnahme der PLLA-MNPs in HEK Zellen hat. Damit kann für diesen Zelltyp ein Chlatrin vermittelter Aufnahmeprozess ausgeschlossen werden. Dem gegenüber hat die Substanz 5(-N-Ethyl-N-Isopropanol)Amilorid einen starken Einfluss auf die NP-Aufnahme. Dieser Einfluss ist nach 4 h am deutlichsten ausgeprägt, was sich darin zeigt, dass die NPs überwiegend in Clustern auf der Außenseite der Zellmembranen sichtbar sind, während in den Zellen kaum NPs erkennbar sind. Nach 8 h Inkubationszeit gleichen sich die Bilder mit und ohne Substanz langsam an. Nach 24 h ist kein Unterschied zwischen 5(-N-Ethyl-N-Isopropanol)Amilorid behandelten Zellen und unbehandelten Zellen mehr erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass PLLA-MNPs zunächst an der Zellmembran adsorbieren, bevor sie in die Zellen aufgenommen werden können. Weitere Versuche mit Endozytose Modulatoren unterschiedlicher Spezifität sind notwendig, um eine genaue Aussage über den zellulären Aufnahmeweg machen zu können.

1.6 Nachweis der Nanopartikel auf Oberflächen mit der Magnetfeldkraftmikroskopie (MFM)

Experimentelles

Die MFM/AFM-Messungen wurden mit einem AFM (Digital Instruments, Dimension 3100, Nanoscope Quadrex, Nanoscope IIIa) mit einer ASYMFM Spitze (Si mit CoCr-Beschichtun, Asylum Research, Radius 47+/-7 nm; Resonanzfrequenz 67-73 kHz) durchgeführt. Für Vergleichsmessungen wurde eine unmagnetische AFM-Spitze (AC160TS, Radius 9 +/- 2 nm) eingesetzt. Alle Messungen wurden im AFM-Tappingmode gefolgt von einer MFM-Messung im dynamischen Lift Mode in Luft durchgeführt.

Ergebnisse

Zu Beginn des Projektes vorliegende Publikationen zur Magnetkraftfeldmikroskopie (MFM) an magnetischen Nanopartikeln [8,9,10,11] zeigen, dass mit MFM-Messungen im Prinzip magnetische Nanopartikel lokalisiert und charakterisiert werden können. In Bezug auf superparamagnetische Nanopartikel steht man jedoch erst am Anfang, diese Technologie zum besseren Verständnis der Nanopartikel nutzen zu können. Durch Optimierung des Substrates und durch ein neuartiges Messund Auswerteprinzip konnten in diesem Projekt 10 nm große superparamagnetische Partikel im MFM sichtbar gemacht werden, ohne zusätzliche externe Magnetfelder zu benötigen.

Theoretische Berechnungen basierend auf Magnetisierungskurven (VSM) der eingesetzten Nanopartikel und der Dipol-Dipol-Wechselwirkung haben gezeigt, dass unter Idealbedingungen das Magnetfeld der Spitze ausreicht, das magnetische Moment der superparamagnetischen Partikel auszurichten und zu stabilisieren. Die theoretisch ermittelte zu erwartende Frequenzverschiebung liegt am Rande des gerade noch messbaren Bereichs. Um das Messsignal zu verbessern, wurden folgende Ansätze verfolgt:

- Um die häufig auftretende Überlagerung elektrostatischer Kräfte zu minimieren, wurde der Einfluss des Substrates auf das MFM-Signal untersucht
- Um die magnetische Wechselwirkungskraft zwischen Spitze und Nanopartikel sowie die räumliche Auflösung zu erhöhen, wurde mit der MFM-Spitze im AFM-Mode (Lifthöhe 0 nm) gemessen. Die dabei auftretende Überlagerung magnetischer und nicht-magnetischer Kräfte führte zu Messsignalen, die eindeutig den superparamagnetischen Nanopartikeln zugeordnet werden konnten.

Minimierung der elektrostatischen Kräfte

In der Literatur findet man immer wieder eine Widerspiegelung der Topografie im MFM-Bild aufgrund elektrostatischer Effekte [8,12]. Beispielsweise zeigt sich bei in PLLA verkapselten Magnetitpartikeln auf einem Siliziumsubstrat im MFM-Bild die Oberflächentopografie, wie in Abb. 23 zu sehen. Die elektrostatischen Kräfte sind offenbar so stark, dass dadurch die schwachen magnetischen Signale der superparamagnetischen Magnetitpartikel vollständig überdeckt werden.



Abbildung 23. a) Topographie einer Siliziumprobe mit in PLLA eingebetteten Magnetitnanopartikeln; b) MFM-Phasenverschiebung der gleichen Stelle in einer Lifthöhe von 100nm

Es gibt verschiedene Ansätze, die elektrostatischen Kräfte zu unterdrücken. In der Arbeit von T. M. Nocera /4/ wurde beispielsweise zwischen Spitze und Probe ein elektrisches Gegenfeld angelegt, so dass auf diese Weise die elektro-statischen Kräfte minimiert werden konnten.

In diesem Projekt wurde die elektrostatische Aufladung durch eine gezielte Substratwahl minimiert. Hierzu wurden verschiedene Materialien und Oberflächen mit einer ASYMFM-Spitze in verschiedenen Abständen von der Oberfläche (Lifthöhe) vermessen und jeweils eine mittlere Rauhigkeit der Phasenverschiebung ermittelt (RMS der gemessenen Phasenwerte). Abbildung 24 zeigt die mittlere Rauhigkeit normiert auf die jeweilige Substratrauhigkeit, die aus der AFM-Messung ermittelt wurde für verschiedene Substrate. Die Messwerte wurden mit potentieller Regression gefittet. Da für die MFM-Messungen ein Lifthöhen-Bereich zwischen 20 und 100 nm von Interesse ist, zeigt Abb. 25 den entsprechenden, vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 24.



Abbildung 24. RMS-Rauhigkeit der Phase des MFM-Signals normiert auf die jeweilige Substratrauhigkeit (RMS des AFM-Topografiesignals) als Funktion der Lifthöhe für verschiedene Substrate. Die gefitteten Kurven wurden mit Hilfe potentieller Regression ermittelt.



Abbildung 25. Ausschnitt aus Abbildung 24 für den Lifthöhenbereich von 0 bis 120 nm

Die geringsten Werte der Rauhigkeit wurden hierbei mit einem Cu-Substrat erzielt, das daher für alle weiteren MFM-Messungen ausgewählt wurde.

Einzelnachweis der 10 nm großen superparamagnetischen Nanopartikel

Um einzelne Partikel mit dem MFM nachweisen zu können, wurden Proben mit sehr hoher Verdünnung (1:100 in Isopropanol) erzeugt, bei denen sich einzelne Magnetitpartikel (Durchmesser etwa 10 nm) an der Oberfläche anlagern. Zunächst wurden AFM-Messungen mit einer unmagnetischen Spitze durchgeführt (Abbildung 26). Man erkennt deutlich die Nanopartikel auf der Oberfläche in Form heller Flecken in der AFM-Aufnahme bzw. von Erhebungen im Amplitudenbild-Bild mit einem durchschnittlichen Radius von 40 nm in den Messdaten. Eine Entfaltung mit der Größe des Spitzenradius ergibt eine Partikelgröße von etwa 13 nm.



Abbildung 26. AFM Messung mit unmagnetischer Spitze

Um die Wechselwirkung zwischen Spitze und Nanopartikel zu erhöhen, wurden die MFM-Messungen nicht wie üblich mit einer Lifthöhe, sondern im AFM-Tapping-Modus mit einer magnetischen Spitze durchgeführt. Dies führt dazu, dass sich anziehende magnetische Kräfte mit den in einer AFM-Messungen auftretenden weiteren Kräften überlagern und so am Ort der Nanopartikel das Topografiebild eine scheinbare Vertiefung (Krater) in Abbildung 27 und Abbildung 28 aufweist. Das AFM-Bild zeigt daher nicht mehr die reale Topografie, sondern ein Messsignal, das die sich überlagernden Kräfte widerspiegelt. Die Nanopartikel erscheinen in diesen Messungen als dunkle Flecken im AFM-Bild (Abb. 27a) bzw. als Vertiefung (Abb. 27b) im Querschnitt und in der 3D-Darstellung (Abbildung 28). Mit Hilfe der MFM-Messungen bei einer Lifthöhe von 50 nm an der gleichen Stelle (Abbildung 27 b) und c)), konnten die Vertiefungen im Topografiebild eindeutig den superparamagnetischen Nanopartikeln zugeordnet werden.







Abbildung 27. 10 nm Magnetit-Partikel auf einem Cu-Substrat a) Topografie (AFM) und c) Phasenbild (MFM, Lifthöhe: 50 nm; ASYMFM-Spitze) sowie Schnitt durch c) durch das Topografiebild (Linie 1 und 2) und d) durch das Phasenbild (Linie 1 und 2)



Abbildung 28. Topografie (AFM) mit AYSMFM-Spitze (10 nm Magnetitpartikel auf einem Cu-Substrat).

Es ist gelungen, erstmals ohne äußeres Feld superparamagnetische 10 nm Nanopartikel auf einem Substrat ortsaufgelöst zu vermessen. Die Methode des Nachweises durch eine Topografiemessung

mit einer MFM-Spitze und der dadurch sehr viel stärkeren magnetischen Wechselwirkung als bei einer Messung im Liftmode erlaubt es jetzt, die 10 nm großen superparamagnetischen Nanopartikel auch dann nachzuweisen zu können, wenn sie nicht unmittelbar an der Oberfläche sitzen. Messungen verkapselter Nanopartikel und ortsaufgelöste Messungen in Zellen werden dadurch ermöglicht.

[8] V. L. Mironov, D.S. Nikitushkin, C. Bins, A.B. Shubin, P.A. Zhdan, *IEEE Transactions on Magnetics*, Vol 43, No 11, 3961-3963 (2011)

[9] M. Rasa, B. W. M. Kuipers, A.P. Philipse, *Journal of Colloid and Interfaces Science* 250. 303-315 (2002) [10] B. Torre, G. Bertoni, D. Fraguli, A. Falqui, M. Salerno, A. Diaspro, R. Cingolani, A. Athanassiou,

Scientific Reports 1, article 202 (2011)

[11] S. Schreiber, M. Savla, D. V. Pelekhov, D. F. Iscru, C.Selcu, P. C. Hammel, G. Agarwal, Small , 2, 270-278 (2008)

[12] T. Nocera, J. Chen, C. B. Murray, G. Agarwal, Nanotechnology, 23, 495704 (8pp) (201

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der größte Anteil des zahlenmäßigen Nachweises sind die Personalkosten für die drei Doktoranden sowie die Stellen für wissenschaftliche Hilfskräfte. Da die bestehende hervorragende messtechnische Ausstattung der Hochschule und des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung genutzt werden konnte, fielen an Sachleistungen im wesentlichen Verbrauchsmaterialien an.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Die durchgeführten Arbeiten erfolgten gemäß der detaillierten Projektplanung im Projektantrag. Zusätzliche Ressourcen waren zur erfolgreichen Durchführung des Projektes nicht notwendig.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Das Projekt trug wesentlich zu einer Verzahnung der Mikrosystem- und Nanotechnologie und der Applied Life Sciences am Standort Zweibrücken bei, die sich bereits in weiteren gemeinsamen Projekten niederschlägt. Durch das Projekt konnte ein internationales Netzwerk erfolgreich beantragt werden (DAAD). Die Ergebnisse des Projekts fließen unmittelbar in Vorlesungen ein.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Es wurden regelmäßig Literaturrecherchen mit "Web Of Knowledge" sowie "Google Scholar" durchgeführt.

Für die geleisteten Forschungsarbeiten besonders relevante Publikationen:

- Mariano Licciardi, Cinzia Scialabba, Calogero Fiorica, Gennara Cavallaro, Giovanni Cassata, and Gaetano Giammona, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, 10, 4397–4407.

- Tanya Nocera, Jun Chen, Christopher B Murray, Gunjan Agarwal, Nanotechnology 23, 2012, 495704-495712

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses Publikationen:

V. Beer, K. Koynov, W. Steffen, K. Landfester, A. Musyanovych, *Macromol. Chem. Physics* 2015, 216, 1774.

Eine gemeinsame abschließende Publikation ist in Vorbereitung .