

Schlussbericht

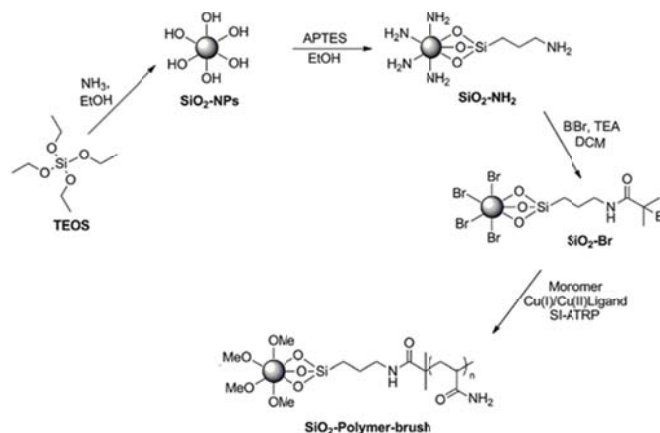
| |
|--|
| Universität Siegen, Physikalische Chemie I |
| Vorhabenbezeichnung: Nanopartikel-basierte Point-of-care Detektion von Antibiotika-resistenter Bakterien (NAPARBA) (01DP20005) |
| Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2020-31.10.2023 |

In diesem Bericht werden die im Rahmen des Forschungsvorhabens NAPARBA - *Nanopartikel-basierte Point-of-care Detektion von Antibiotika-resistenter Bakterien* (01DP20005) durchgeführten Arbeiten ausführlich erläutert. Die vorliegenden Arbeiten wurden durch den aus den Projektmitteln finanzierten Doktoranden Alexander Kleimann, M.Sc. in Chemistry, durchgeführt. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden für die genannten Synthesen, die Charakterisierung der Substanzen, Laborsicherheitsausstattung und Verbrauchsmaterialien für die Analysemethoden verwendet. Dies sind die **wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**.

In **WP1 (Synthese von funktionellen Silica-Nanopartikeln (NPs) und Quantenpunkten (QDs))** konnte die Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln und Quantenpunkten mit Polymerbürsten erfolgreich durchgeführt und für die verwendeten Partikelsysteme optimiert werden. Dabei spielt die erfolgreich realisierte und nachgewiesene Funktionalisierung der Partikel mit Polymerbürsten und die der Blockcopolymerbürsten mit terminaler DNA eine zentrale Rolle für die Funktionalität der Nachweismethode. Für die Funktionalisierung von NPs und QDs mit passivierenden Polymerbürsten und DNA wurden detaillierte SOPs erstellt (Deliverable D1).

Im ersten Arbeitspakets **WP1 (Task USiegen 1-1: Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln und Quantenpunkten mit Polymerbürsten)** wurden die Oberflächen der von den Partnern bereitgestellten Partikeln (Universität Koç, Türkei, KocU: InP@ZnS Quantenpunkte; Indonesisches Institut der Wissenschaft, LIPI: Rhodamin 6G dotierte SiO₂ und Fe₂O₃@SiO₂ Nanopartikel) mit passivierenden Polymerbürsten (durch *grafting-from* Polymerisation) ausgestattet, um die kolloidale Stabilisierung und chemische Inertheit für den Einsatz in komplexen biologischen Testlösungen zu gewährleisten. Weiter ermöglichen Polymerbürsten mit einem kurzen Polyacrylsäureblock durch die Carboxylsäuregruppen das Ankoppeln von DNA durch Carbodiimidreaktionen (EDC/NHS). Diese DNA-Stränge sind komplementär zu einem Teil der bakteriellen Ziel-DNA.

Insbesondere wurden die Syntheseprotokolle zunächst an SiO₂ Nanopartikeln etabliert, die nach Schema 1 von USiegen durch den Stöber-Prozess synthetisiert wurden. Diese Partikel dienten als Benchmark und skalierbare Plattform, die es ermöglichte, das Protokoll für die hochwertigen funktionalen Nanopartikel der Partner LIPI und KocU vor Bereitstellung gründlich zu testen.



Schema 1. Syntheseprotokoll für mit Polymerbürsten funktionalisierte SiO₂ Nanopartikel.

Es wurden Polymerbürsten aus passivierendem Polyacrylamid und Poly(oligoethylenglycolmethacrylat) hergestellt, die mit Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit dispersiver Röntgenanalyse (EDX), dynamischer Lichtstreuung (DLS) und thermogravimetrischer Analyse (TGA) vollständig charakterisiert wurden. Die Dicke der Polymerbürsten konnte über die Reaktionszeit und die Monomer-Konzentration kontrolliert werden, eine Blockcopolymerisation mit Acrylsäure war möglich und die erhaltene Nanopartikel bildeten für die Anwendung ausreichend stabile Dispersionen in wässrigen Medien.

Beispielhafte TEM und EDX Daten zeigen den siliziumhaltigen Kern und die kohlenstoffhaltige Schale der funktionalisierten SiO_2 Nanopartikel (Abbildung 1a, b). Darüber hinaus sind die Partikelgrößenverteilungen schmal (Abbildung 1c) und die Kinetik in dem beobachteten Zeitbereich für das Bürstenwachstum unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen linear (Abbildung 1d). Diese lineare Kinetik ermöglicht die genaue Einstellung der Bürstendicke.

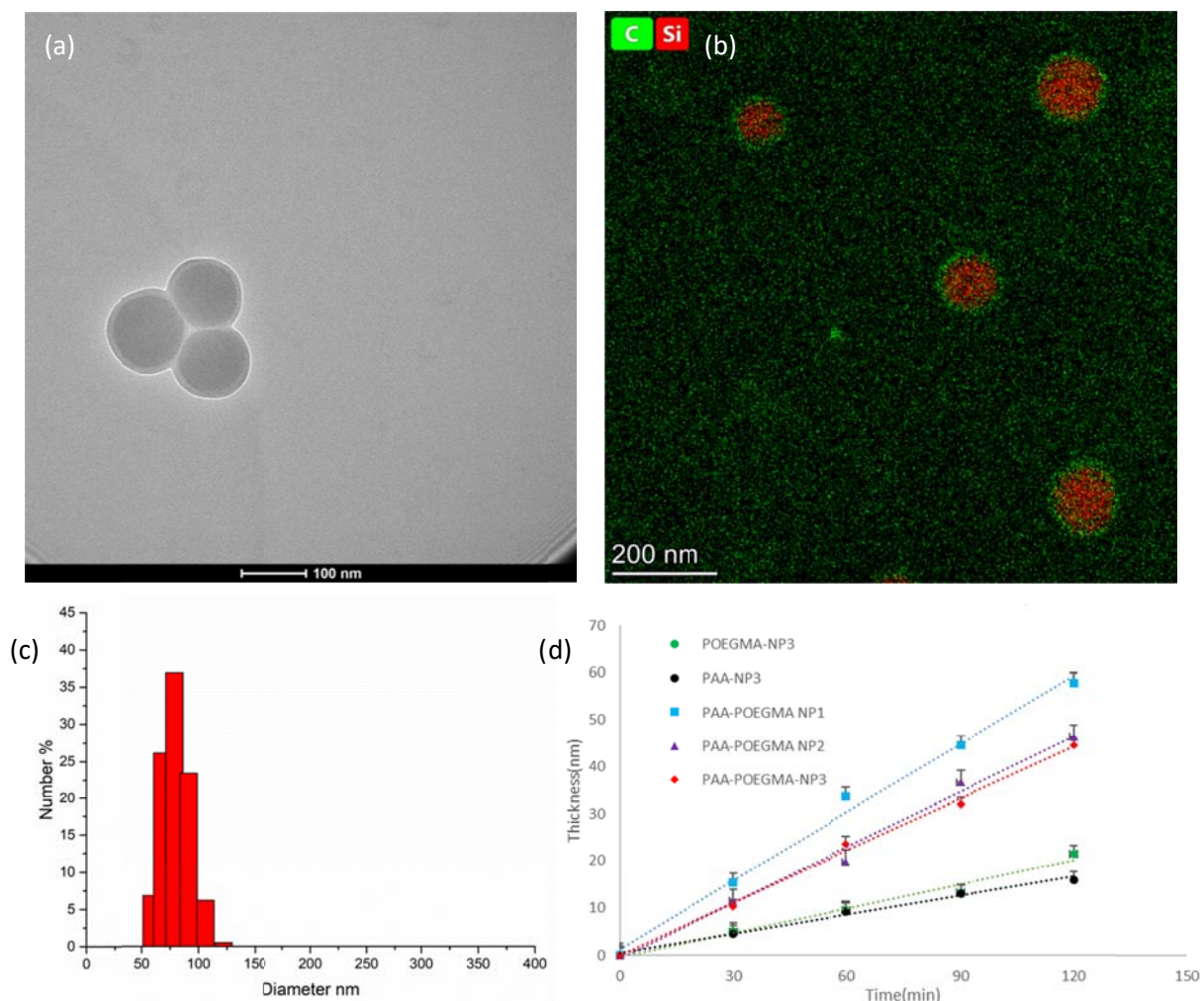


Abbildung 1. (a) TEM Daten, (b) EDX Daten von Polyacrylamid funktionalisierten SiO_2 Nanopartikeln, (c) DLS Daten, (d) berechnete Dicke der Bürsten anhand von Daten aus der TGA.

Die Herstellung einer chemisch zugänglichen Oberfläche für eine weitere Funktionalisierung mit einem „Catcher“ Oligonukleotid (einzelsträngigen DNA) wurde über das etablierte Protokoll für SiO_2 Partikel realisiert.

Sowohl für die mit Rhodamin 6G dotierten SiO_2 Partikel (LIPI) als auch für die ferromagnetischen $\text{Fe}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$ Partikel (LIPI) mussten keine weiteren Modifikationen des Syntheseprotokolls nach

Schema 1 vorgenommen werden. Die Bildung der SiO₂ Partikel aus TEOS im ersten beschriebenen Schritt kann aber in diesem Fall ignoriert werden.

Da die Oberflächenchemie der von dem Partner bereitgestellten SiO₂ basierten Partikeln mit den oben genannten Spezies vergleichbar war, konnte der Modellansatz für die Initiator-Applikation, die oberflächeninitiierte Atom-Transfer-Radikalpolymerisation (SI-ATRP) und die anschließende Blockcopolymerisation unverändert auf diese Partikel übertragen werden. Die Passivierung der Partikel wurde über Polyacrylamid (PAM) realisiert und eine weitere Blockcopolymerisation mit Polyacrylsäure (PAA) ermöglichte die Einführung des „*Catcher*“ Oligonukleotids über EDC/NHS Chemie. Die erhaltenen funktionalisierten SiO₂ basierten Partikel der Partner wurden mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie (FESEM), TEM, EDX sowie DLS, TGA, Messungen der optischen Dichte unter Berücksichtigung der Dispersionsstabilität in verschiedenen Medien, Fluoreszenzmessungen und zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPS) charakterisiert, sofern anwendbar. Die Dicke der Polymerbürsten entsprach dem zuvor erstellten Modell für reine SiO₂-Partikel, und ihre kolloidale Stabilität war mit der dieser Partikel in wässrigen Medien (insbesondere phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) vergleichbar.

Exemplarische XPS und TGA Daten zeigen die erreichte Funktionalisierung und weitere Blockcopolymerisation der Partikel von LIPI (Abbildung 2a bis d) und die Bürstendicke als Funktion der Reaktionszeit, das durch die vorher etablierte Synthese von SiO₂ Partikeln ermittelt wurde (Abbildung 2e und f).

Versuche zur Oberflächenfunktionalisierung von InP@ZnS-MPA (MPA: Mercaptopropionsäure) Quantenpunkte, die von KocU zur Verfügung gestellt wurden, wurden abgeschlossen. Hier mussten die in Schema gezeigten Reaktionsschritte angepasst werden, indem ein anfänglicher Reaktionsschritt über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) mit verschiedenen Brückenbildern, wie 4-Amino-1-butanol oder Dopamin, in verschiedenen Lösungssystemen mit wässrigen Medien und aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt wurde. Nach dem Einbringen eines Initiators (α -Bromoisobutyrylbromid (BIBB)) und einer chemisch kompatiblen Endgruppe auf der Oberfläche wurden die Reaktionsschritte, wie in Schema 1 dargestellt, von da an auch auf die Quantenpunkte angewandt. Dies war ohne weitere Anpassungen der Synthese nicht von Erfolg und die schlussendliche Funktionalisierung mittels ATRP nicht ausreichend zu erreichen. Die bereitgestellten Quantenpunkte zeigten mehrere Probleme hinsichtlich der Partikelstabilität, und zwar während der Synthese selbst und auch in den folgenden Wasch- und Regenerationsschritten. Diese Probleme wurden teilweise gelöst, indem eine weitere Schale zur vorhandenen ZnS-Schale eingesetzt wurde. Für diesen Prozess mussten ölstabilisierte InP@ZnS Quantenpunkte, die mit Oleylamin Liganden bedeckt waren, den Stöber Prozess in Gegenwart eines nicht-ionischen Tensids in einer mehrheitlich aus Heptan bestehenden öligen Lösung durchlaufen (Schema 2a), wodurch sich der Durchmesser der Quantenpunkte auf etwa 25 nm verdoppelte.

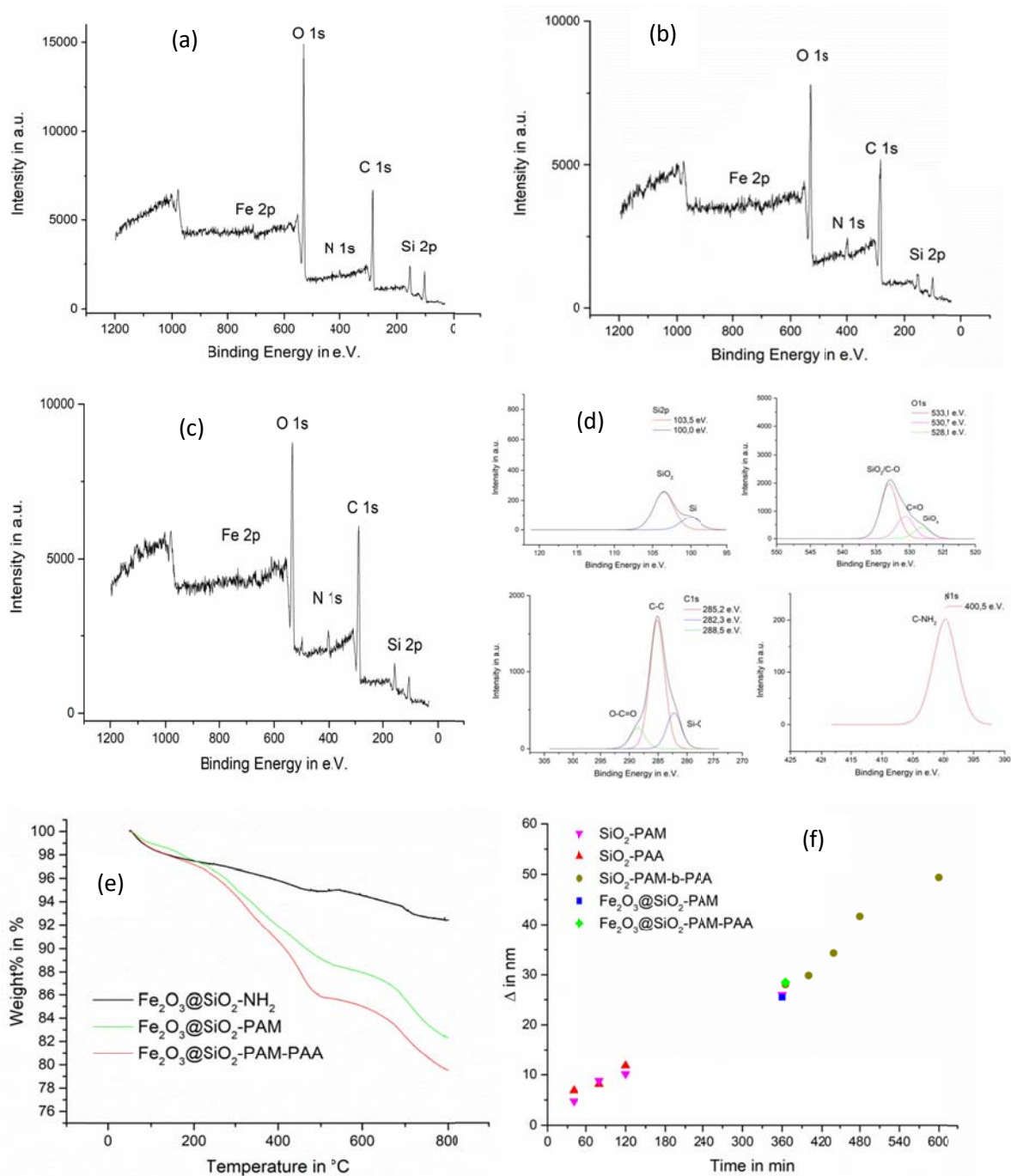
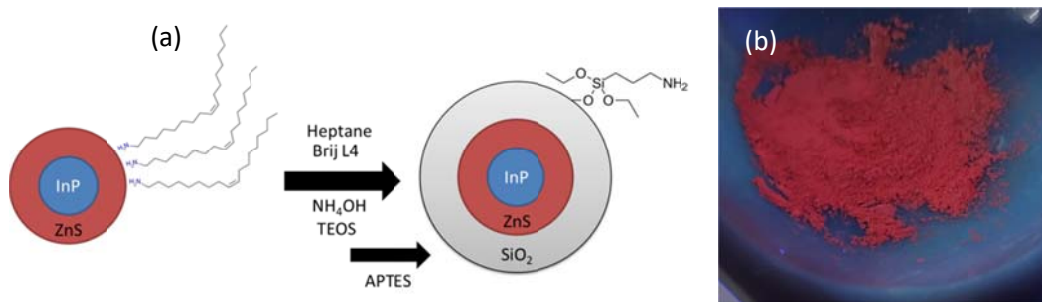


Abbildung 2. (a) XPS Daten von $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2-NH_2$, (b) XPS Daten von $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2-PAM$, (c) XPS Daten von $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2-PAM-PAA$, (d) hochauflösende XPS Daten von $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2-PAM-PAA$, (e) TGA Daten für die Funktionalisierungsschritte von $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ und (f) TGA Daten von Polymerbürstendicken für ausgewählte Partikel.



Schema 2. (a) SiO₂ Schalenbildung durch Reaktion in Mikroemulsion, (b) Foto von InP@ZnS@SiO₂-PAM Spezies unter Blaulichtlampe.

Durch die zusätzliche Hülle konnten Teile der Quantenpunkte, die als Ausgangsreagenz verwendet wurden, ihre intensive rote Emission während des gesamten Funktionalisierungsprozesses behalten (Schema 2b). Die so erhaltenen funktionalisierten InP@ZnS@SiO₂ basierten Quantenpunkte von KocU wurden mittels XPS, FESEM, TEM sowie DLS und ggf. Fluoreszenzmessungen charakterisiert. Exemplarische XPS und TEM Daten zeigen die erreichte Funktionalisierung und weitere Blockcopolymerisation der Partikel von KocU (Abbildung 3a, b) und die Bildung des mehrschichtigen Schalensystems (Abbildung 3c).

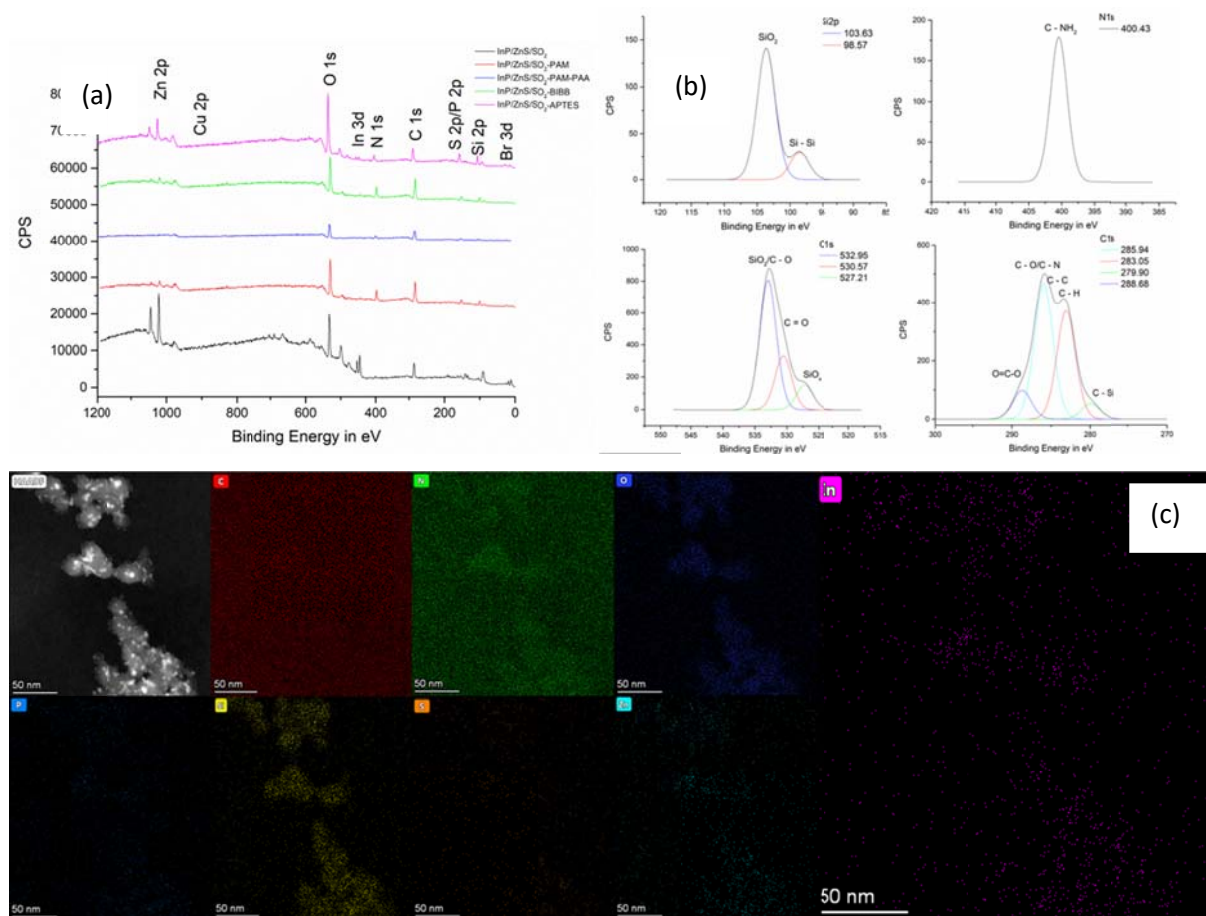
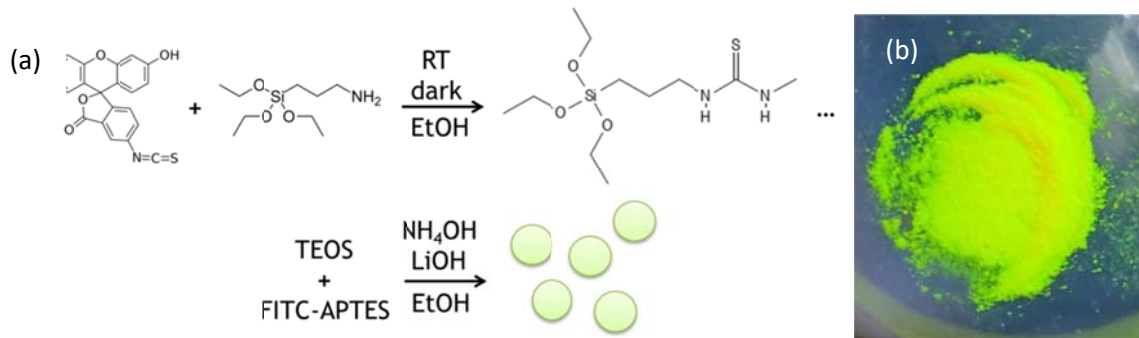


Abbildung 3. (a) XPS Übersichtsscans der verschiedenen Synthesestufen des Quantenpunktsystems InP@ZnS@SiO₂, (b) hochauflösende XPS Daten von InP@ZnS@SiO₂-PAM-PAA und (c) TEM Elementkartierung von InP@ZnS@SiO₂-PAM-PAA.

Auf Grundlage der beobachteten Farbstoffabgabe (Ausbluten / *leaching*) in wässrigen Medien der mit Rhodamin 6G beladenen SiO₂ Partikel von Partner LIPI (hier wurde ein starker Abfall der Emission

nach Abschluss der vollständigen Funktionalisierung beobachtet) wurde eine andere Variante fluoreszierender SiO₂ Nanopartikel hergestellt. Anstatt die Partikel in Gegenwart eines fluoreszierenden Farbstoffs (über passive Beladung) herzustellen, wurde in USiegen versucht den Farbstoff während der Bildung der Partikel über eine Thiocyanat Gruppe und APTES kovalent und somit stabil an das Siliziumdioxidnetzwerk zu binden (Schema 3a).

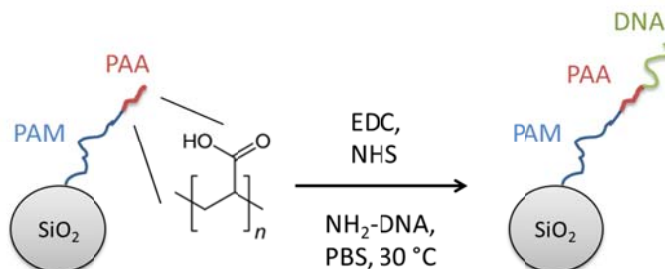


Schema 3. (a) Syntheseprotokoll für fluoreszierende SiO₂ Nanopartikel durch kovalente Bindung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in das entstehende Siliziumdioxidnetzwerk mittels APTES, (b) Foto der FITC SiO₂-PAM-PAA Partikel unter einer Blaulichtlampe.

Die erhaltenen fluoreszierenden SiO₂ Partikel wurden auch mittels XPS, FESEM, TEM sowie DLS, TGA, Messungen der optischen Dichte unter Berücksichtigung der Dispersionsstabilität in verschiedenen Medien, Fluoreszenzmessungen und zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPS) charakterisiert, soweit zutreffend. Die Polymerbürstendicke entsprach dem zuvor erstellten Modell für reine SiO₂-Partikel, und ihre kolloidale Stabilität war mit der dieser Partikel in wässrigen Medien (insbesondere PBS) vergleichbar.

Im Laufe des Vorhabens wurde die Oberflächenfunktionalität von Carboxylgruppen, die durch die Blockcopolymersation über Acrylsäure eingeführt wurden, als möglicher kovalenter Anker für die einzelsträngige DNA mit einer endständigen Aminogruppe ausgewählt. Ihre Viabilität wurde durch ein Experiment mit SiO₂ Partikeln und einer komplementären einzelsträngigen DNA mit Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen (**Task USiegen 1-2: Funktionalisierung der Polymerbürsten mit terminaler DNA**).

Die verwendete EDC/NHS Chemie beinhaltet die kovalente Bindung der endständigen Aminogruppe an die Acrylsäurefunktionalität der Polymerbürsten oder MPA gemäß Schema 4.



Schema 4. Kovalente Anbindung des DNA Moleküls mit Aminogruppe an PAA.

Dieses Konzept wurde dann in Folge auf die Partikel der Partner angewandt, die unser Zielsystem von fluoreszierenden Spezies (Rhodamin 6G SiO₂ (LIPI), FITC SiO₂ (USiegen), InP@ZnS-MPA (KocU) und InP@ZnS@SiO₂ (KocU, USiegen)) und magnetischen Spezies (Fe₂O₃@SiO₂ (LIPI)) von Partikeln, die über eine komplementäre einzelsträngigen DNA verbunden wurden, beinhalteten.

Obwohl die Funktionalisierung der InP@ZnS-MPA Quantenpunkte von KocU während des Vorhabens nicht erreicht werden konnte, wurden sie dennoch in folgenden Versuche einbezogen, da ihr MPA Ligand die kovalente Bindung von einzelsträngiger DNA unabhängig von ihrer kolloidalen Stabilisierung durch ein passivierende Polymerbürste ermöglichen würde.

Die genaue DNA Sequenzen, die verwendet wurden, um die Viabilität der Partikel als ein durch Hybridisierung verbundenes sensorisches System festzustellen, waren wie folgt: NH₂-C₆H₁₂-GGGTGGCGAAGGGCGTGCGGGGATAA, CGGCGGTGGGACCGGGCAGTATTTA-C₆H₁₂-NH₂ NH₂-C₆H₁₂-

TCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAA CTAGGTGTTGGTGAA und GATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCA AACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCT-C₆H₁₂-NH₂ für die Bindung an die jeweiligen Partikel Spezies und

TAAATACTGCCCCGGTCCCACGCCGAATTATCCCGCACGCCCTTCGCCACCC und TAA TATTCATTATCTAAATTTTTGTTTGAAATTTGAGCATTATAAAATGGATAATCACTTGGTA TATCTTCACCAACACCTAGTTTTTTTCATGCCTTTTTCAAATTTCTTACTGCCTAATTCGAGT GCTACTCTAGC als „Linker“ DNA zwischen den magnetischen und fluoreszierenden Partikeln.

Außerdem wurden GGGTGGGCGAAGGGGCGTGCGGATAACGGGGCGGGGGCAGTATTTA und GACAAACTGCAACGGTCCCACGCCGCGTTATCGCGCCCGCCCAACGCTACCC als nicht komplementäre bzw. als teilweise komplementäre DNA als Kontrolle verwendet.

Durch die Hybridisierung zweier Partikelspezies über den komplementären DNA „Linker“, die anschließende Anreicherung und Konzentrierung der Partikel über ein Magnetfeld und den direkten Vergleich mit verschiedenen Kontrollen (Lösungen ohne komplementären DNA „Linker“, DNA „Linker“, der mit der auf den Partikeln immobilisierten DNA ein völliger Mismatch ist, und ein DNA „Linker“ der in 20% seiner Basenpaarpositionen unpassend ist) über Fluoreszenzmessungen wurde die erfolgreiche Bildung eines "Hybridisierungssandwichs" als sensorische Nachweiseinheit zwischen einer magnetischen Spezies und einer fluoreszierenden Spezies nachgewiesen werden.

In **WP2 (Charakterisierung und Optimierung von NPs basierend auf Tests)** wurden die Nanopartikel und Quantenpunkte detailliert mikroskopisch und spektroskopisch charakterisiert und die Polymerbürstenbeschichtungen identifiziert, die in den durchgeführten Untersuchungen der kolloidalen Stabilität zu der notwendigen Stabilität der Teilchen führt. Ebenso konnte der Nachweis der DNA-medierten Bindung der Partikel erfolgreich gezeigt werden. Die beiden Meilenstein von USiegen (MS 3 Stabilisierte NPs im bakteriellen Lysemedium, MS 4 DNA Nachweis in gepufferten Medien) wurden erreicht und ein Bericht über die Eigenschaften von Nanopartikeln und Quantenpunkten mit passivierenden Polymerbürsten und DNA (Deliverable D2) verfasst.

Für die Grundlage des zweiten Arbeitspaketes **WP2 (Task USiegen 2-1: Mikroskopischer und spektroskopischer Charakterisierung von Nanopartikeln und Quantenpunkten)** und künftiger Optimierungsbemühungen, mussten definierte Standardzusammensetzungen der Oberflächenchemie und Fluoreszenzspezies in wässrigen Medien charakterisiert werden. Diese Basisproben umfassten SiO₂ Partikel, die mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oberflächenbehandelt und mit Carboxylgruppen funktionalisiert waren, sowie weitere Rhodamin 6G dotierte Varianten dieser beiden SiO₂ Proben (LPI), ferromagnetische Fe₂O₃@SiO₂ Partikel, InP@ZnS Quantenpunkte mit MPA und Oleylamin Liganden (KocU) und deren weitere Funktionalisierung, soweit realisiert.

Alle erfolgreich funktionalisierten Partikelvarianten wurden über ihre Synthesestufen hinaus auch in wässrigen Medien charakterisiert. Es wurden Variationen von Partikeln synthetisiert, die mit PAM und PAA Polymerbürsten und Blockcopolymerbürsten dieser beiden Polymere funktionalisiert wurden. Dazu gehörten FESEM, TGA, DLS, XPS, UV/Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und TCSPC.

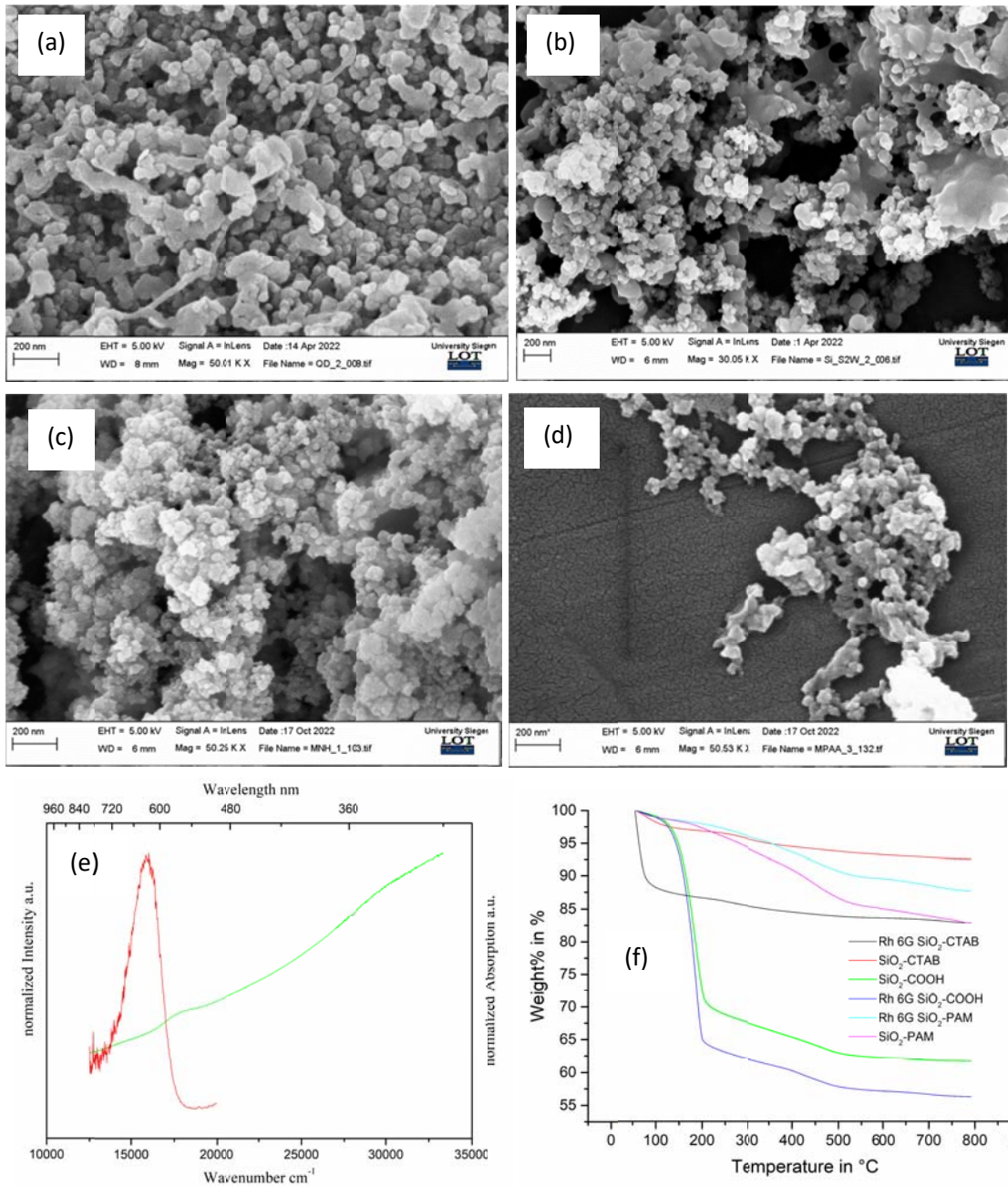


Abbildung 4. (a) FESEM Daten von InP@ZnS-MPA, (b) FESEM Daten von SiO₂ CTAB Partikeln, (c) FESEM Daten von Fe₂O₃@SiO₂, (d) FESEM Daten von Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA FESEM (e) Emissions- (red; $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) und Absorptionsspektren (grün) von MPA gekapten InP-ZnS in PBS und (f) TGA Daten für ausgewählte SiO₂ Nanopartikelvarianten.

Mit nicht geplantem Aufwand wurde die Funktionalisierung von InP@ZnS bewerkstelligt. Dazu war es nötig eine zweite Schale mittels SiO₂ Erzeugung in einer Mikroemulsion um die Quantenpunkte herzustellen.

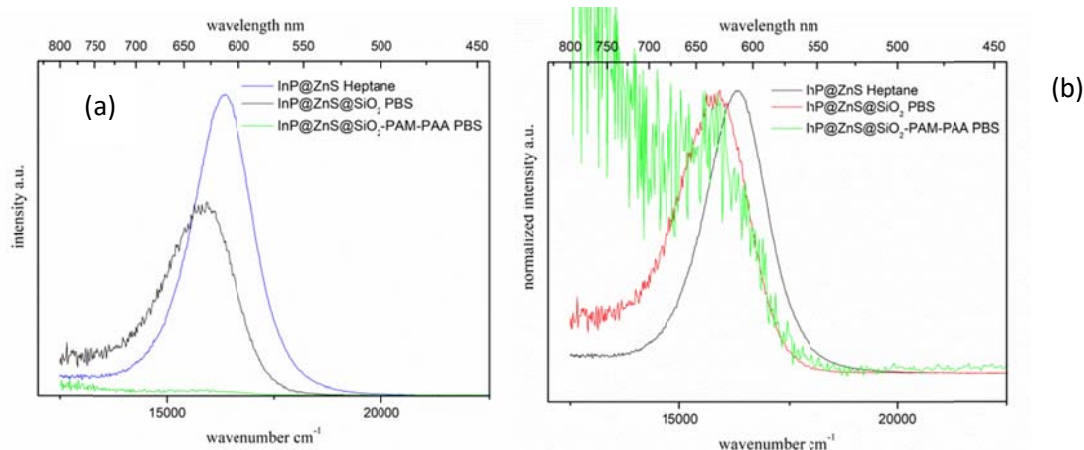


Abbildung 5. (a) Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) der Quantenpunkte in den Hauptstufen in verschiedenen spezifischen Lösungsmitteln bei Konzentration von 1 mg pro ml, (b) normalisierte Emissionsspektren.

Durch die Schale selbst (Abbildung 5a) wurde eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen ($\sim 20 \text{ nm}$) und ein Rückgang der Emission von etwa 35% bei gleicher Massenkonzentration beobachtet. Dieser Intensitätsverlust sollte zum Teil auf die größeren Partikel zurückzuführen sein, die zu unterschiedlichen molaren Konzentrationen führen, aber Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) durch die SiO_2 Schale wurde als Teilerklärung für das beobachtete Verhalten nicht ausgeschlossen. Außerdem wurde ein steiler Abfall der Gesamtintensität nach der Funktionalisierung mit PAM und PAA beobachtet (Abbildung 5a). Die noch sichtbare Emission (Abbildung 5b) stammte wahrscheinlich von einer Population an Quantenpunkten, bei denen die Abschirmung durch die SiO_2 Schale der Reaktionsumgebung der ATRP-Lösung standhielt.

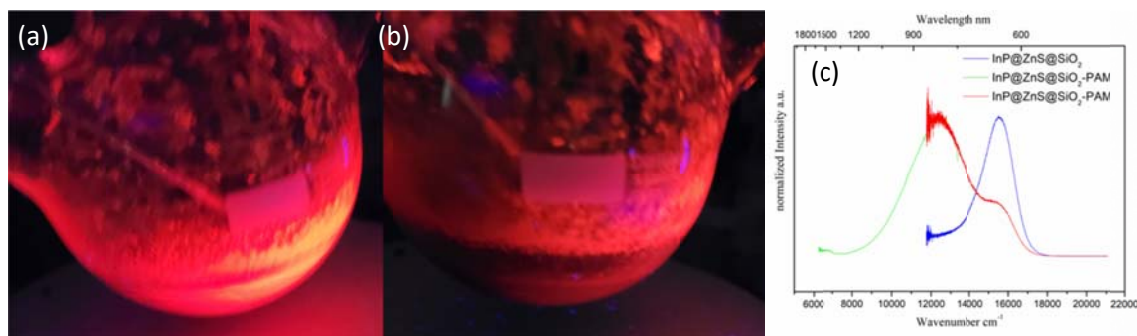


Abbildung 6. (a) Foto der Emission von $\text{InP@ZnS@SiO}_2\text{-BIBB}$ in der ATRP-Lösung unter einer Blaulichtlampe vor der Zugabe von CuBr , (b) nach der Zugabe von CuBr und (c) Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$) von InP@ZnS@SiO_2 vor und nach dem Kontakt mit CuBr während der ATRP.

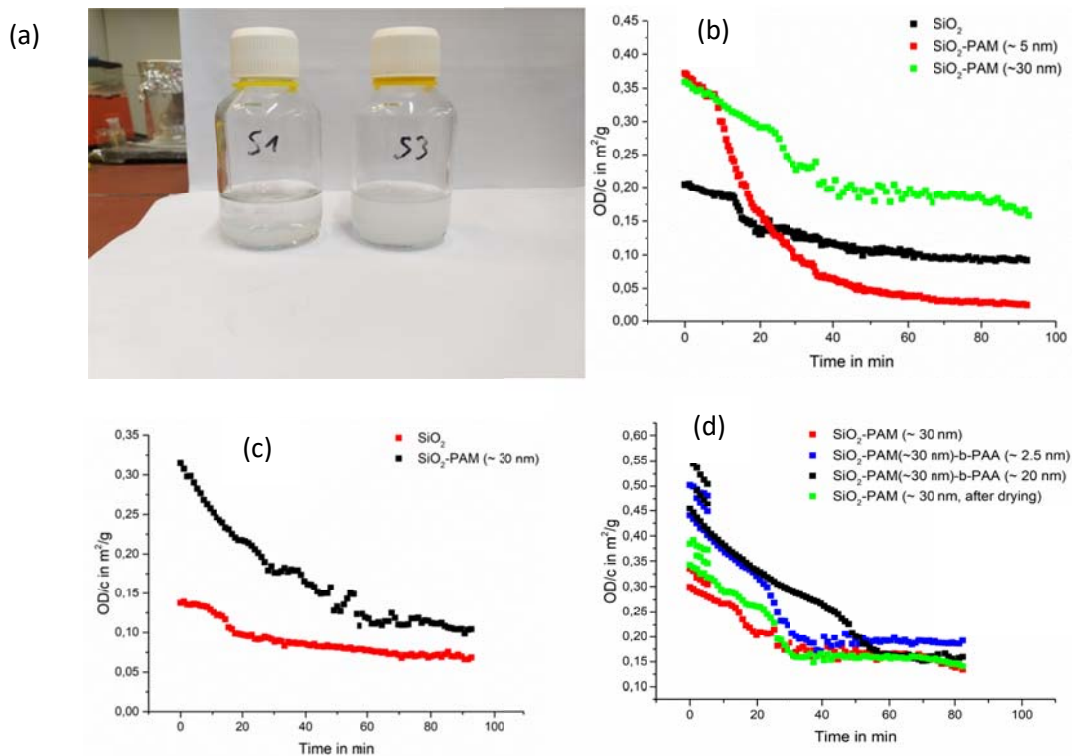
Nach Prüfung aller an der ATRP Reaktion beteiligten Komponenten wurde festgestellt, dass CuBr zu dem beobachteten Rückgang der Emissionsintensität führte (Abbildung 6a, b). Dies könnte auf einen Dotierungsprozess von Kupfer in den Quantenpunktkern zurückzuführen sein, der zu einer erheblichen Verschiebung in den Nahinfrarotbereich führt (Abbildung 6c). Daher wurden Experimente mit diesen Quantenpunkten durchgeführt, um ein brauchbares Testsystem auf DNA herzustellen. Das resultierende Signal war aber leider nicht ausreichend, um nach der Anreicherung und Konzentrierung mit einem Magnetfeld und der Redispergierung in frischem Medium nachgewiesen zu werden.

Ein theoretisch möglicher Funktionalisierungsweg, der keine Übergangsmetalle einbezog, wurde nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde jedoch versucht, kleinere Quantenpunkte der gleichen

Zusammensetzung zu nutzen. Diese würden im Falle eines vergleichbaren Dotierungsverhaltens eine Verschiebung der Emission von grüner zu roter Emission zeigen. Versuche dahingehend wurden durchgeführt aber blieben erfolglos. Die Herstellung der SiO₂ Schale war zwar möglich, aber weitere Anpassungen wurden nötig, da die ATRP für diese Variante an Quantenpunkten zu nicht leuchtenden Teilchen ohne messbare Emission führte. Da in diesem Fall auch keine Emission im Nahinfrarot messbar war, wurde die Arbeit an diesen Quantenpunkten im Rahmen dieses Vorhabens eingestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde FITC dotiertes SiO₂-PAM-PAA als vielversprechendste fluoreszierende Partikel Variante weiter verwendet.

Wie für **WP1** wurden die SiO₂ Nanopartikel von USiegen verwendet, die mit verschiedenen Polymeren und Blockcopolymeren funktionalisiert wurden, um die kolloidale Stabilität solcher Partikelsysteme zu untersuchen und einen Vergleichswert insbesondere für die Leistung der Bereitgestellten Partikel im direkten Vergleich zu erhalten (**Task USiegen 2-2: Untersuchung der kolloidalen Stabilität**).

Zur Bestimmung des Kolloid- und Dispersionsverhalten wurden qualitative Experimente (Abbildung 7a), DLS-, Zetapotential und optische Dichtemessungen (OD) in verschiedenen wässrigen Medien, hauptsächlich PBS und Tris-HCl, für verschiedene Polymerbürstendicken, Blockcopolymerzusammensetzungen und nach Redispergierung aus einem getrockneten Zustand durchgeführt. Wie in Abbildung 7b zu sehen ist, mussten bestimmte Bürstenlängen erreicht werden, damit eine sterische Stabilisierung bei einem pH-Wert von 7,4 in der Dispersion beobachtet wurde. Im Vergleich dazu zeigten selbst kurze Bürsten einen Stabilisierungseffekt bei temperaturinduzierter Agglomeration (Abbildung 7a). Blockcopolymerbürsten zeigten ein vergleichbares Verhalten wie reine PAM-Bürsten über einen Zeitraum von 80 Minuten und die Redispergierung nach Trocknung bei 60°C im Vakuum über Nacht führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (Abbildung 7d). Die Partikel der Partner zeigten auch eine Erhöhung der Dispersionsstabilität nach Funktionalisierung (Abbildung 7e) im gegebenen wässrigen Medium.



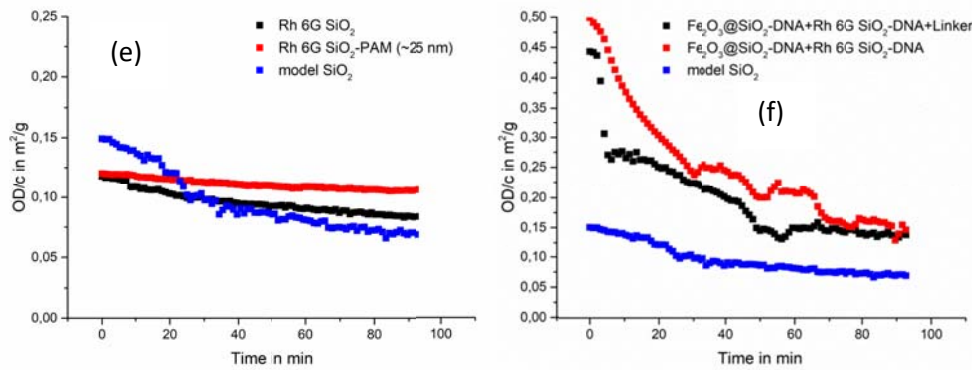


Abbildung 7. (a) Foto von (S1, links) 50 ml Milli-Q Wasser + 50 mg SiO₂-NH₂ und (S3, rechts) 50 ml Milli-Q Wasser + 50 mg SiO₂-PAM (~5 nm) nach einstündiger Temperaturbehandlung bei 50 °C, (b) Absorption bei 750 nm über einen Zeitraum von 90 Minuten nach Herstellung der Dispersion (10 mg Partikel auf 10 ml PBS; pH-Wert 7,4), (c) Absorption bei 750 nm über einen Zeitraum von 90 Minuten nach der Herstellung der Dispersion (10 mg Partikel auf 10 ml Tris-HCl; pH-Wert von 8,2), (d) Absorption bei 750 nm über einen Zeitraum von 80 Minuten nach Herstellung der Dispersion (10 mg Partikel auf 10 ml PBS; pH 7,4), (e) Absorption bei 750 nm über einen Zeitraum von 90 Minuten nach Herstellung der Dispersion (1 mg Partikel auf 10 ml PBS; pH 7,4) und (f) Absorption bei 750 nm über einen Zeitraum von 90 Minuten nach Herstellung der Dispersion und Zugabe des DNA-Linkers 72 Stunden zuvor (0,3 mg Partikel jeder Art auf 1 ml PBS; pH-Wert 7,4).

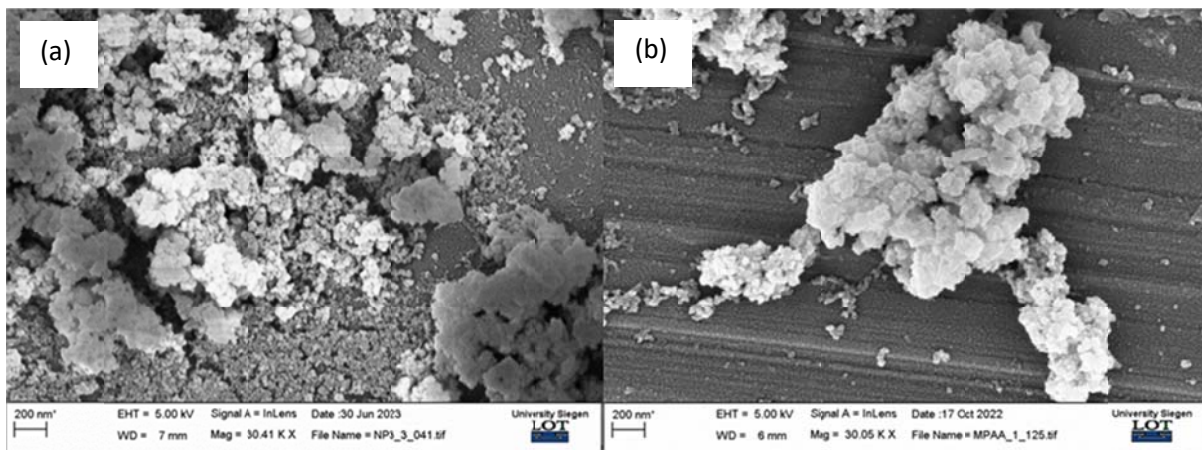


Abbildung 8. (a) Fe₂O₃@SiO₂-CTAB FESEM Daten nach Ultraschallbehandlung und (b) Fe₂O₃@SiO₂-CTAB FESEM Daten ohne jegliche Behandlung.

Die Verwendung von FITC dotierter SiO₂-PAM-PAA-ssDNA Partikelspezies und Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA-ssDNA Partikelspezies mit Polymerbürstenlängen von etwa 30 nm führte zu der Beobachtung, dass nach der Konzentrierung, dem Waschen und der Redispersierung der magnetischen Spezies über mehrere Waschstufen unter dem Einfluss eines Magnetfelds auch ohne die Zugabe von DNA *Linkern* große Mengen an fluoreszierenden Partikeln (durch Adhäsion) vorhanden waren. Während das Vorhandensein des DNA *Linkers* über Emissionsquenching und die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer gemessen wurde, war ein qualitativer Unterschied (*on/off*) mit dem bloßen Auge nicht zu erzielen. Eine weitere Optimierung der Partikelpassivierung und Partikelstabilisierung in der Dispersion wurde durch die Verlängerung der Polymerbürsten vorgenommen, nachdem bei FESEM Messungen zuvor Clusterbildung aller Fe₂O₃@SiO₂ Varianten festgestellt wurde (Abbildung 8b). Dies wurde durch die Verwendung und Optimierung des Ultraschallprotokolls vor jedem

Reaktionsschritt und die Optimierung der Polymerbürstenlänge auf etwa 50 bis 100 nm je nach Partikelspezies erreicht (Abbildung 8a und 9).

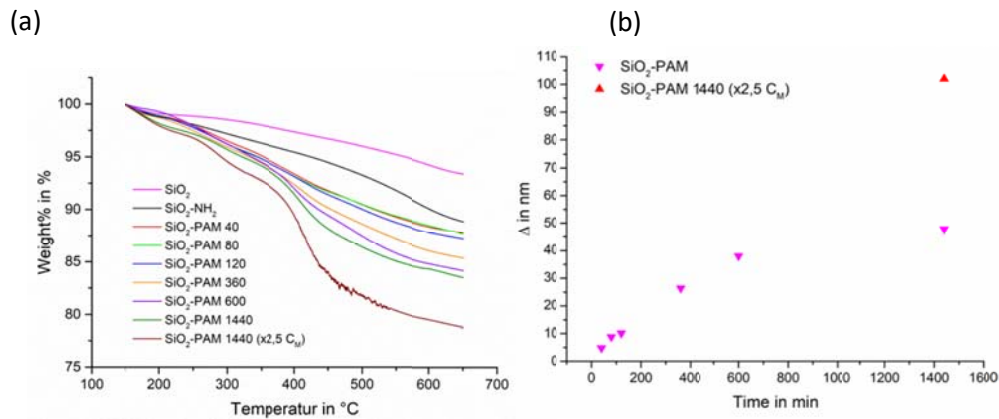
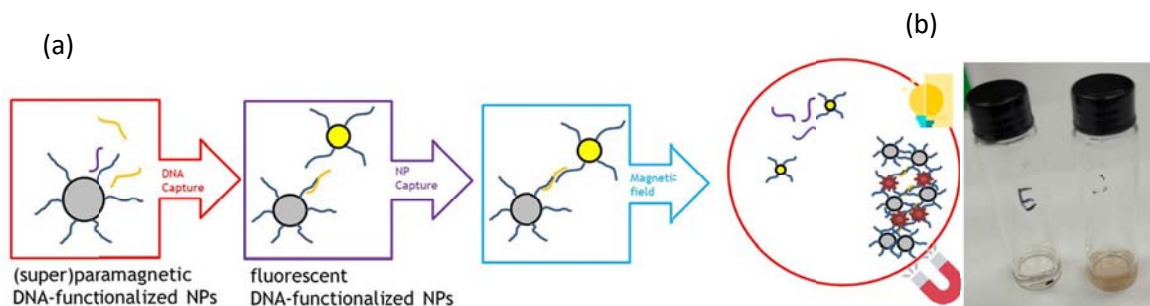


Abbildung 9. (a) TGA Daten für das Wachstumsverhalten von PAM auf SiO₂ Partikeln mit zunehmender Reaktionszeit und Monomerkonzentration und (b) Polymerbürstendicke kalkuliert durch TGA Daten für ausgewählte Reaktionszeiten und Monomerkonzentrationen.

Die schlussendlichen Bemühungen bezüglich der Optimierung der in diesem Vorhaben beschriebenen Partikel wurden auf die Interaktionen zwischen den Hauptkomponenten des Systems konzentriert (**Task USiegen 2-3: Nachweis der DNA-meditierten Bindung der Partikel**). Hierbei standen die fluoreszierenden und magnetischen Partikelspezies, die über einen komplementären DNA *Linker* interagieren (DNA-Hybridisierung) und spezifische DNA Moleküle in PBS Medium „einfangen“, die kovalent an den vorhandenen Polymerbürsten oder Liganden auf der Partikeloberfläche verankert sind. Die Inkubationszeiten die getestet wurden waren 1 Stunde bis 24 Stunden (über Nacht) auf dem Schüttler. Um zu überprüfen, ob dieses "Hybridisierungssandwich" gebildet wurde, wurde zunächst DLS eingesetzt, wobei aber keine schlüssigen Ergebnisse im Falle von InP@ZnS-MPA und Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA festgestellt wurden. Beide zeigten die gleichen hydrodynamischen Radien, obwohl das Experiment in Theorie eine Zunahme durch die Bindung kleiner Quantenpunkte (~12 nm) an die großen ferromagnetischen Partikeln von Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA (~200 nm) zeigen sollte. Zur weiteren Verdeutlichung wurden Fluoreszenzexperimente durchgeführt, bei denen die Partikel durch ein Magnetfeld (Dauermagnet) konzentriert und die Fluoreszenzaktivität der Lösung gemessen wurde (Abbildung 10c), wobei kein Unterschied zwischen dem Experiment und der Kontrolle festgestellt wurde. Dies erlaubte die Schlussfolgerung, dass die Quantenpunkte *ohne* Passivierung durch Polymerbürsten als fluoreszierende Spezies im schlussendlichen System nicht geeignet waren (Abbildung 10a und b).



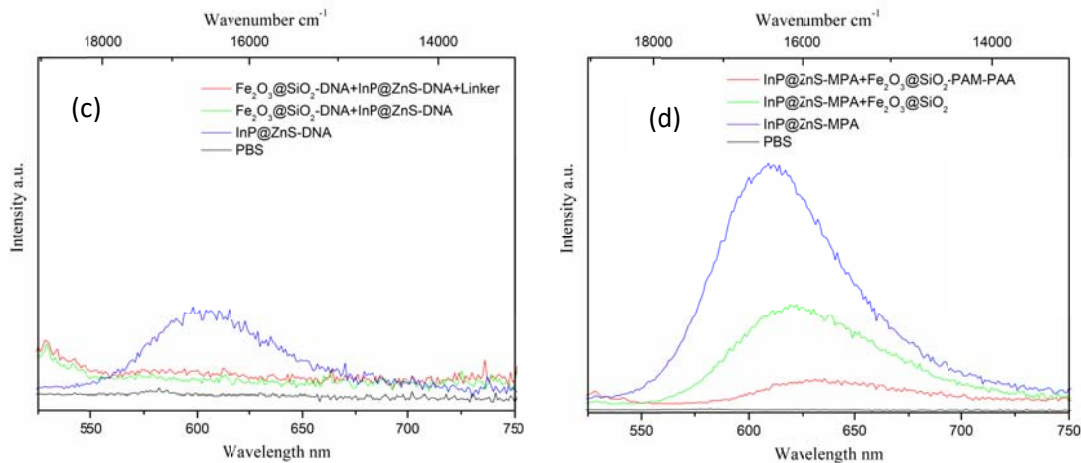


Abbildung 10. (a) Schematischer Ablauf der beschriebenen Experimente mit mehreren Schritten der Konzentrierung, des Waschens und der Redispergierung, (b) Fluoreszenzaktivität bei $\lambda_{em} = 520$ nm ($\lambda_{ex} = 485$ nm) von gegebenen Partikelmischungen in PBS (7,4 pH) bei 25 °C (0,5 mg/ml für FITC SiO₂-PAM-PAA-c2-DNA, 0,25 mg/ml für Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA-c1-DNA und 60 - 70 µg/mL DNA Linker) nach fünfter Redispergierung für verschiedene DNA Linker (Link: komplementärer DNA Linker; Cont. Link: kein DNA Linker vorhanden; LinkRev.: nicht-komplementärer DNA-Linker; LinkD20%: komplementärer DNA Linker, der zufällig für 20% seiner Basenpaare verändert wurde) und (c) Fluoreszenzaktivität bei $\lambda_{em} = 520$ nm ($\lambda_{ex} = 485$ nm) der Ausgangsdispersion nach Konzentration und Entfernung der magnetischen Spezies in PBS (7,4 pH) bei 25 °C für verschiedene DNA Linker.

Dieses Experiment wurde auch für die Kombination von Rhodamin 6G SiO₂-PAM-PAA und Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA Partikeln durchgeführt. Hier wurde das Experiment direkt durch Messung der Fluoreszenzaktivität der Lösung nach Konzentrierung und Entfernung der magnetischen Partikelspezies (und im Falle einer erfolgreichen Hybridisierung auch der fluoreszierenden Spezies) durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Partikelmischung vor der Zugabe des DNA Linkers und eine parallele Dispersionsmischung mit denselben Konzentrationen, aber ohne den DNA Linker gemessen. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde nur eine geringe Abnahme der Lösungsintensität gemessen, die nach einer erneuten Messung nach 72 Stunden Inkubation auf einem Schüttler auf ein Minimum abfiel (Abbildung 11a).

Um festzustellen, ob diese Abnahme der Fluoreszenzaktivität auf die Hybridisierung der beiden Partikelspezies DNA Linker zurückzuführen war, wurde die Dispersion über die Schmelztemperatur (ca. 86°C) des resultierenden hybridisierten DNA Strangs erhitzt. Die resultierende Dispersion wurde im heißen Zustand von den magnetischen Partikelspezies getrennt und nach dem Abkühlen gemessen. Durch einen leichten Anstieg der Fluoreszenzaktivität (Abbildung 11b) konnte festgestellt werden, dass sich das System wie vorhergesagt verhielt. Nach Inkubation aller Komponenten für 24 Stunden wurde das anfängliche Fluoreszenzmaximum wieder über eine Abnahme der Fluoreszenzaktivität reproduziert (Abbildung 11b).

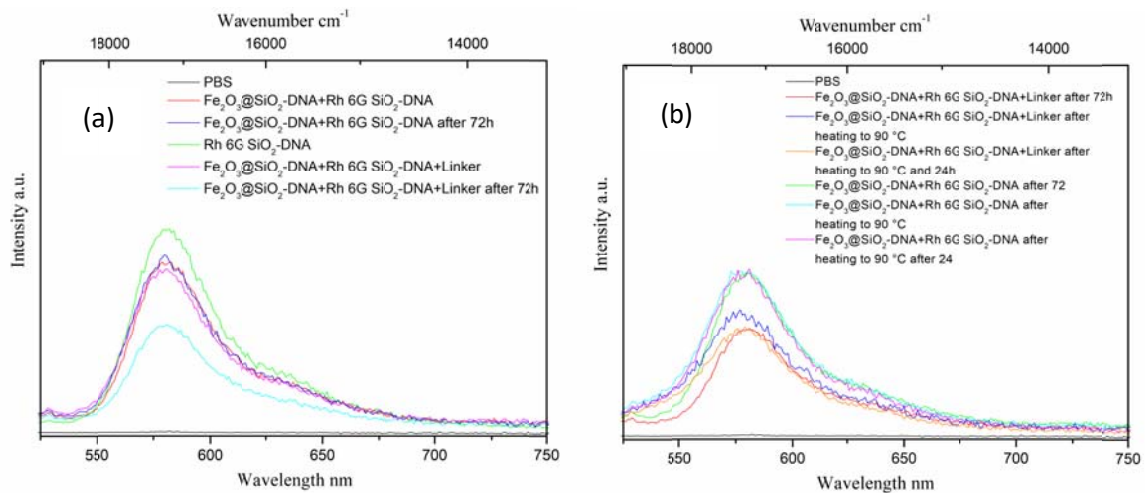


Abbildung 11. (a)(b) Fluoreszenzaktivität ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) der gegebenen Partikelmischungen in PBS (7,4 pH) bei 25 °C (0,3 mg/ml für alle Komponenten außer DNA *Linker* (165 $\mu\text{g/mL}$)) nach Exposition durch ein Magnetfeld.

In weiteren Versuchen wurden FITC SiO_2 -PAM-PAA und InP@ZnS@SiO_2 -PAM-PAA als fluoreszierende Spezies eingesetzt, die mit den etablierten magnetischen Spezies über DNA *Linker* wechselwirken sollten. Anstatt alles nach einer Inkubationszeit zu messen, konzentrierten, wuschen und dispergierten wir die eingesetzten $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -PAM-PAA über ein Magnetfeld und entfernten die vorhandene Dispersion mehrfach (fünfmal), um sicherzustellen, dass nur fluoreszierende Partikel vorhanden waren, die nach einer vorgegebenen Inkubationszeit von 24 Stunden auf einem Schüttler an die magnetischen Spezies gebunden waren (Abbildung 12a). Aus diesen Schritten wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Partikeldispersionen hergestellt, die anhand ihrer Emissionsstärke und später teilweise anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer mittels TCSPS charakterisiert wurden. Zur weiteren Bestätigung, dass die Beobachtungen dem Einfluss des vorliegenden DNA *Linkers* zuzuschreiben waren, wurden zwei weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Hier wurde ein nicht-komplementärer DNA *Linker* und ein DNA *Linker*, der auf dem komplementären Strang basierte (mit nicht komplementären Unterschieden bei 20 % der vorhandenen Basenpaare) verwendet.

Die Kombination von Quantenpunkten und magnetischen Spezies erwies sich erneut als nicht erfolgreicher Versuch, da die Gesamtemissionsstärke nicht hoch genug war, um klare Unterschiede zwischen den beschriebenen Fällen zu messen, was bei allen vier Varianten zu einer kaum nachweisbaren Emission führte. Aus diesem Grund konzentrierten sich alle folgenden Versuche auf die Kombination von FITC SiO_2 -PAM-PAA und $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -PAM-PAA. In beiden Fällen, in denen die Hybridisierung vollständig oder zumindest teilweise stattfinden sollte, konnten wir eine Abnahme der Emissionsstärke um etwa 40 bis 50 % beobachten (Abbildung 12b).

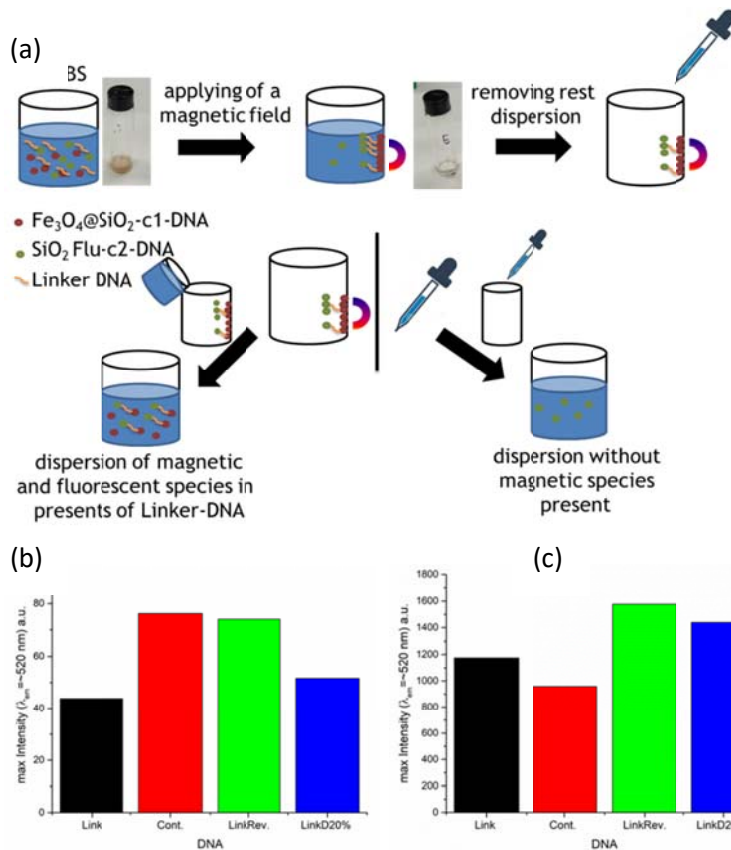


Abbildung 12. (a) Schematischer Ablauf der beschriebenen Experimente mit mehreren Schritten der Konzentrierung, des Waschens und der Redispergierung, (b) Fluoreszenzaktivität bei $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$) der angegebenen Partikelmischungen in PBS (7,4 pH) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0,5 \text{ mg/ml}$ für FITC $\text{SiO}_2\text{-PAM-PAA-c2-DNA}$, $0,25 \text{ mg/ml}$ für $\text{Fe}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2\text{-PAM-PAA-c1-DNA}$ und $60 - 70 \text{ } \mu\text{g/ml}$ DNA *Linker*) nach fünfter Redispergierung für verschiedene DNA *Linker* (*Link*: komplementärer DNA *Linker*; *Cont. Link*: kein DNA *Linker* vorhanden; *LinkRev.*: nicht-komplementärer DNA *Linker*; *LinkD20%*: komplementärer DNA *Linker*, der an 20% seiner Basenpaare nicht komplementär war) und (c) Fluoreszenzaktivität bei $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$) der Ausgangsdispersion nach Konzentration und Entfernung der magnetischen Spezies in PBS (7,4 pH) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ für verschiedene DNA *Linker*.

Wie in den vorangegangenen Experimenten mit Rhodamin 6G $\text{SiO}_2\text{-PAM-PAA}$ konnten wir eine Emissionsabschwächung beobachten, die durch die Bildung eines "Hybridisierungssandwichs" verursacht werden. Diese Beobachtung wurde auch durch eine Abnahme der gemessenen Lebensdauer von $3,6 \text{ ns}$ auf $2,85 \text{ ns}$ für FITC $\text{SiO}_2\text{-PAM-PAA}$ und $\text{InP@ZnS@SiO}_2\text{-PAM-PAA}$ bestätigt, wenn ein *Linker* vorhanden war. Zur weiteren Bestätigung, dass der vorliegende *Linker* und damit die Bildung eines "Hybridisierungssandwichs" der Grund für die beobachtete Emissionsabschwächung ist, wurde versucht, den *Linker* bei Hitze über dem Schmelzpunkt der vorliegenden DNA (ca. $86 \text{ }^\circ\text{C}$) zu entfernen (Abbildung 13a).

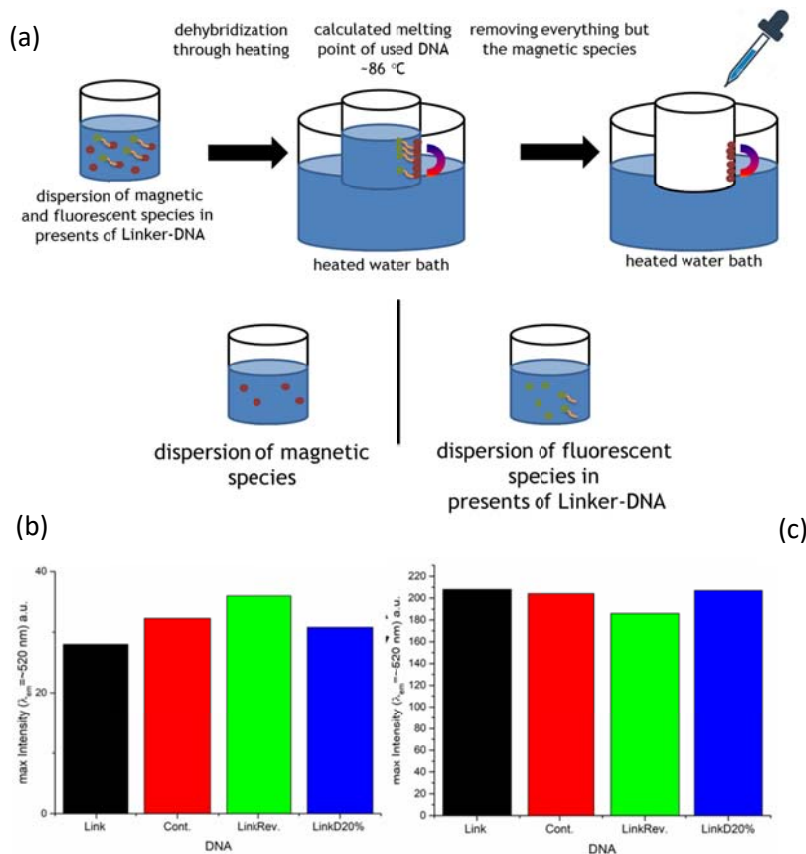


Abbildung 13. Schematischer Ablauf des Experiments, das die Beseitigung des hybridisierten Zustands und die Entmischung der Partikelspezies beinhaltet, (b) Fluoreszenzaktivität bei $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 485\text{ nm}$) der hergestellten Dispersion von magnetischen Partikeln in PBS (7,4 pH) bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für verschiedene DNA *Linker* (Abbildung 12b) und (c) Fluoreszenzaktivität bei $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 485\text{ nm}$) der hergestellten Dispersion der fluoreszierenden Partikel in PBS (7,4 pH) bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für verschiedene DNA *Linker*.

In der Folge wurde für keine der vorgestellten Dispersionen (Abbildung 13b, c) ein signifikanter Unterschied zwischen den nachgewiesenen Emissionsstärken festgestellt, ohne dass die Komponenten (der *Linker* und beide Partikelspezies), die zur Bildung eines durch Hybridisierung überbrückten Systems erforderlich sind, vorhanden waren. Durch dieses Messergebnis wurde unsere Annahme, dass die beobachtete Emissionsabschwächung aus der Bildung eines "Hybridisierungssandwichs" resultierte, bestätigt.

Während diese Folgeexperimente mit den beschriebenen Partikeln die Viabilität für einen emissionsbasierten Detektionsprototyp zeigten, wurde eine weitere Optimierung in Bezug auf die Selektivität der gesamten Partikelinteraktion mit längeren Polymerbürsten und einer definierten Partikelbehandlung nach und vor jedem Reaktionsschritt erreicht. Wie bereits vorher beschrieben (**Task USiegen 2-2**) waren die resultierenden Polymerbürstendicken, die für die schlussendlichen Experimente benutzt wurden, 50 bis 100 nm, je nach Partikeltyp.

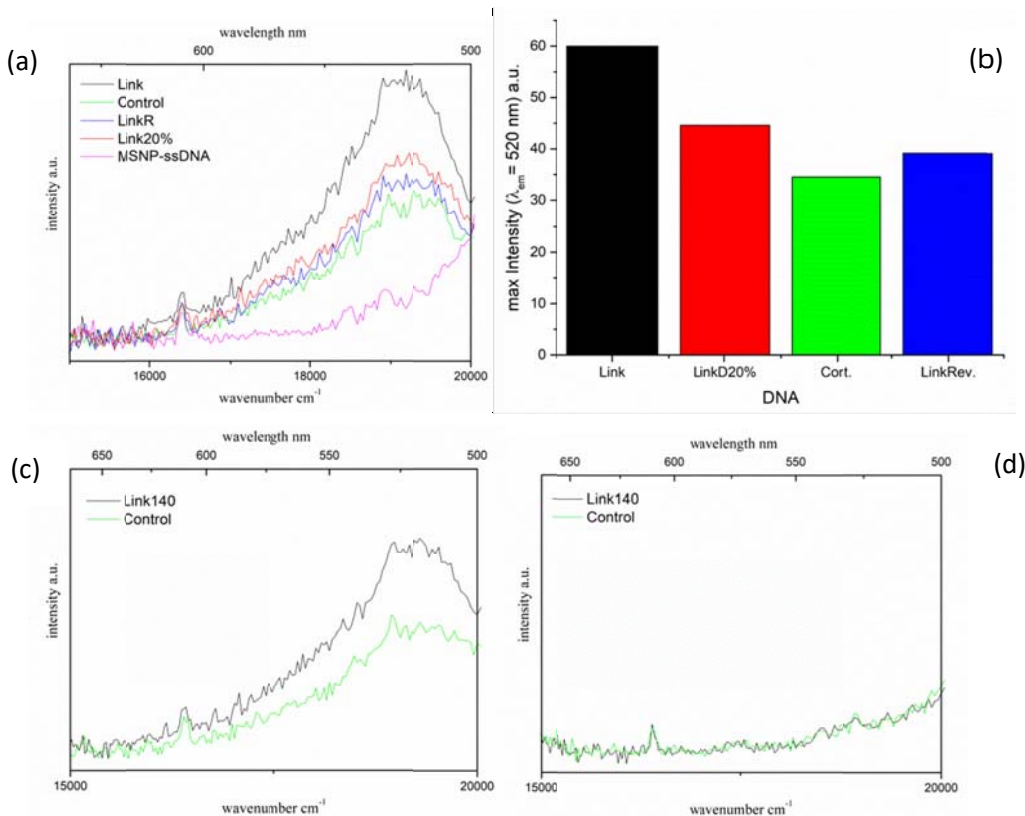


Abbildung 14. (a), (b) Fluoreszenzaktivität ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) und maximaler Emission ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) der angegebenen Partikelmischungen in PBS (7.4 pH) bei 25 °C (0,5 mg/ml für FITC SiO₂-PAM-PAA-c2-DNA (~100 nm PAM), 0,25 mg/ml für Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA-c1-DNA (~50 nm PAM) und 60 - 70 µg/ml DNA *Linker*) nach dritter Redispergierung für verschiedene DNA *Linker* (*Link*: komplementärer DNA *Linker*; *Cont. Link*: kein DNA *Linker* vorhanden; *LinkRev.*: nicht-komplementärer DNA *Linker*; *LinkD20%*: komplementärer DNA *Linker*, der an 20% seiner Basenpaare nicht komplementär war), (c) Fluoreszenzaktivität ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) der angegebenen Partikelmischungen in PBS (7.4 pH) bei 25 °C (siehe (a); mit 140 Basenpaaren *Linker* DNA und 75 Basenpaaren ssDNA) nach dritter Redispergierung für DNA *Linker* und Kontrolle und (d) Fluoreszenzaktivität ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) der angegebenen Partikelmischungen in PBS (7.4 pH) bei 25 °C nach Beseitigung des hybridisierten Zustands und der Entmischung der Partikelspezies.

Nach Optimierung der Polymerbürstendicken wurden Hybridisierungsexperimente mit diesen neuen Partikeln durchgeführt, wie in Abbildung 12 beschrieben. Die erste Beobachtung war, dass das vorher beobachtete Quenching der Emission in Präsenz von DNA *Linker* nicht mehr zu beobachten war (Abbildung 14a). Dieses Verhalten wurde durch eine gleichbleibende Lebensdauer, die etwa bei 3,65 ns lag, für alle charakterisierten Proben bestätigt. Im Vergleich zu den Partikelspezies aus Abbildung 12 und 13 wurde nun eine direkte Zunahme des Emissionssignals im Falle des Vorliegens von DNA *Linker* in der Dispersion beobachtet. Die Kontrolle und der nicht kompatible *Linker* zeigten immer noch ein Emissionssignal der fluoreszierenden Partikelspezies, jedoch fiel diese beobachtete Hintergrundemission eindeutig schwächer aus als die von dem DNA *Linker* System. Mit der Beseitigung des Quenchings durch die bessere Abschirmung der fluoreszierenden Partikelspezies wurde das angestrebte Verhalten des Systems realisiert. Bei Zunahme der Wechselwirkung zwischen den Partikelspezies durch DNA Hybridisierung zu einer direkt Zunahme der beobachtete Emission. Dieses Verhalten wurde in mehreren Experimenten reproduziert.

In einer Variation wurden längere DNA Stränge von 140 Basenpaaren als *Linker* verwendet (siehe Abbildung 14 c). Auch in dieser Variation wurde das gleiche Verhalten zwischen DNA *Linker* und

Kontrolle festgestellt. Um sicher zu gehen, dass das beobachtete Verhalten auch wirklich auf der durch DNA-Doppelstrang-Bindung der Partikel basierte, wurden der Doppelstrang durch das Erhitzen über 90°C geschmolzen und die Partikel anschließend durch ein Magnetfeld getrennt. Die resultierenden Spektren zeigten keine Emission und nur noch ein leichtes Hintergrundsignal bei Anregung bei 485 nm (siehe Abbildung 14 d). Dieser Abfall der Emission zu einem absoluten Minimum liess auch darauf schließen, dass selbst wenn kein DNA *Linker* vorhanden war, die einzelstränge DNA, die auf den Partikeln immobilisiert wurden, untereinander wechselt wirkten und weniger effizient Partikel miteinander überbrückten.

WP3 (Entwicklung eines prototypischen Demonstrators) wurde ebenfalls bearbeitet, jedoch konnte noch kein funktionsfähiger Prototyp trotz Nachweis der Machbarkeit in nicht-biologischen Medien (siehe WP2) getestet werden.

Durch die Probleme bezüglich der Funktionalisierung bestimmter Partikelspezies der von den Partnern gelieferten Partikel und der nötige kleinschrittigen Optimierung des Systems bis zur beschriebenen Reife konnte im Rahmen dieses Vorhabens wegen Zeitmangels nicht mehr vollständig wie geplant an der Entwicklung eines prototypischen Demonstrator **WP3** gearbeitet werden. Ein essentieller Punkt der dennoch realisiert wurde war ein Funktionstest unter Lyse Bedingungen des „Hybridisierungssandwiches“ (**Task USiegen 3-2: Funktionstest**).

Um zu zeigen, dass die hergestellten Partikelspezies rudimentär bereits für einen Prototyp einzusetzen waren, wurden sie in der Biomatrix der durch die Lyse eines MRSA-Stamms (*Staphylococcus aureus* SA N315 (MRSA)) resultierenden Dispersion und in der aufbereiteten DNA des Bakteriums dem wie schon beschriebenen DNA Linker Experiment unterzogen. Zur Lyse der Bakterien und Aufreinigung und Anreicherung der bakteriellen DNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit benutzt (*ROTI® Prep gDNA Mini 2.0* von Carl Roth®). Statt auf die DNA, die im *mecA* Gen präsent ist, zu testen wurden beide Dispersionsansätze, mit der bereits unter **Task 1-2** beschriebenen DNA gespickt und auf diese in dieser spezifischen und für den Prototypen relevanten Umgebung getestet.

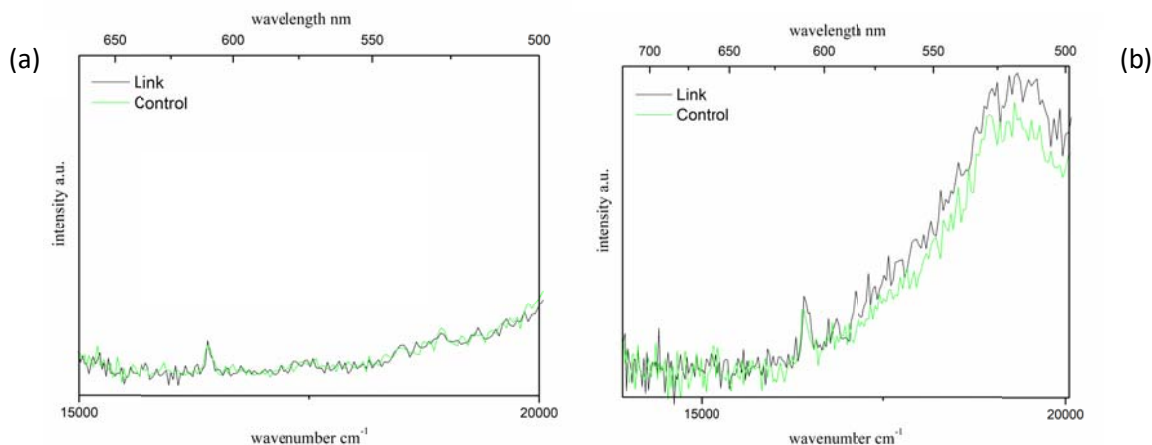


Abbildung 15. (a) Fluoreszenzaktivität ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$) der angegebenen Partikelmischungen in PBS (7.4 pH) bei 25 °C (0,5 mg/ml für FITC SiO₂-PAM-PAA-c2-DNA (~100 nm PAM), 0,25 mg/ml für Fe₂O₃@SiO₂-PAM-PAA-c1-DNA (~50 nm PAM) und 60 - 70 µg/ml DNA *Linker*) nach dritter Redispersierung für verschiedene DNA *Linker* (*Link*: komplementärer DNA *Linker*; *Cont. Link*: kein DNA *Linker* vorhanden) mit 100 µl konzentrierter Bakteriolyse und (b) mit 100 µl angereicherter und gereinigter bakterieller DNA ((*Staphylococcus aureus* SA N315 (MRSA))).

Im Falle der vollständigen durch die Lyse produzierten Biomatrix wurde sowohl für die Kontrolle, als auch das System mit DNA *Linker* Präsenz keine deutlich messbare Emission der fluoreszierenden Partikelspezies beobachtet (siehe Abbildung 15a). Dies wurde auf Teilkomponenten der Lyse als auch

auf die Biomatrix selbst und die dadurch verursachte Lichtstreuung zurückzuführen. Selbst das vorher beobachtete minimale Signal der Kontrolle wurde nicht festgestellt, was darauf schließen lassen würde, dass möglicherweise alle Vektoren für Adhäsion zwischen den beiden Partikelspezies blockiert wurden. Durch die Verwendung der von der Biomatrix aufgereinigten und angereicherten bakteriellen DNA wurde das vorher in anderen Experimenten beobachtete Verhalten reproduziert (Abbildung 15b). Dabei wurde aber ein kleinerer Unterschied zwischen Kontrolle und DNA *Linker* Experiment festgestellt, was möglicherweise auf die vorher angesprochene (siehe **Task 2-3**) unspezifische DNA-Wechselwirkungen zurückgeführt wurde. Zwar wurde die Funktionsweise erfolgreich und unter verschiedenen Bedingungen reproduzierbar dargestellt dennoch benötigt der gezeigte Ansatz weiterer Optimierung bevor eine volle Formulierung eines Prototypens möglich würde. Dabei sollte besonders auf die Länge der eingesetzten DNA Stränge, die genaue Formulierung von *Catcher* und *Target* DNA (*mecA* Gen) und die eingesetzten Mengen in Partikelspezies und DNA geachtet werden.

Die bis hier hin beschriebenen Ergebnisse im Rahmen des Vorhabens sind für zukünftige Veröffentlichungen, nach Absprache mit den Partnern LIPI und KocU trotz nicht vollständiger Formulierung eines Prototypens geplant. Final wird in Folge auf ein Teilergebn eingegangen werden, welches unter **WP2** fällt (**USiegen Task 2-3**) und einen anderen Detektionsweg für das „Hybridisierungssandwichs“ beschreibt.

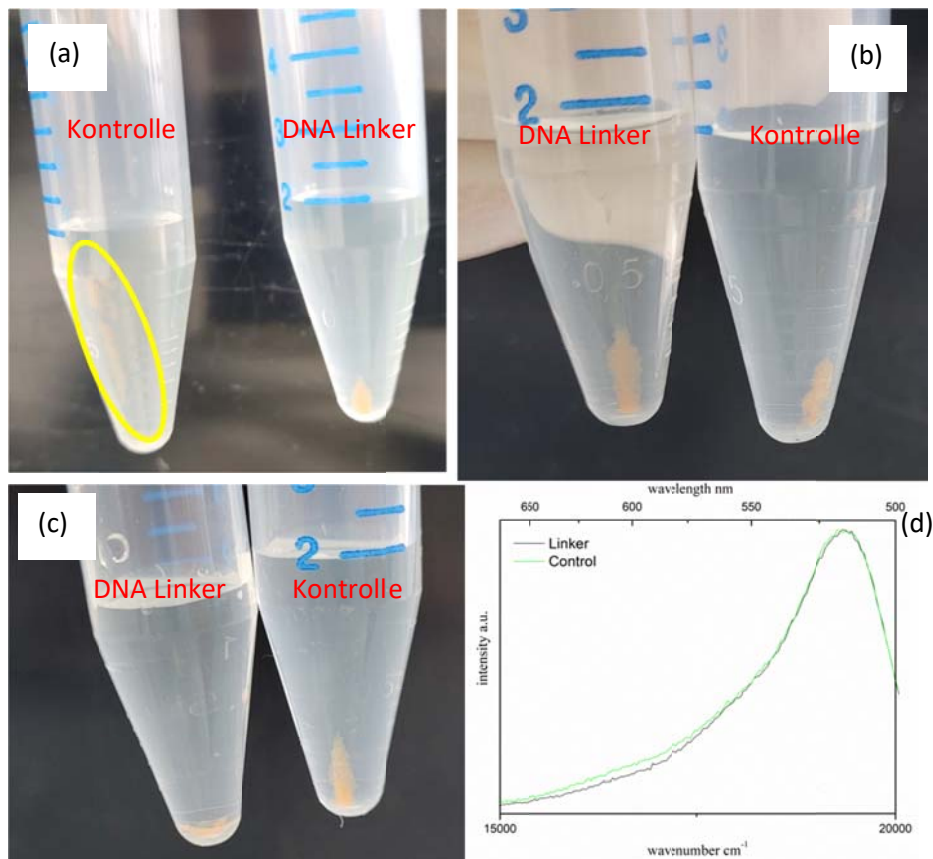


Abbildung 16. (a) Sedimentationsverhalten nach Zentrifugation (15 Minuten bei 6000 Umdrehungen die Minute) zweier fluoreszierender Partikelspezies (0,5 mg/ml für FITC SiO₂-PAM-PAA-c2-DNA (~100 nm PAM), 0,5 mg/ml für InP@ZnS-MPA-c1-DNA und 60 - 70 µg/ml DNA *Linker*) in PBS (7.4 pH), (b) Sedimentationsverhalten nach Erhitzen der Proben aus (a) für 3 Minuten bei ~90 °C, (c) Sedimentationsverhalten nach einer Stunde Inkubationszeit auf einem Rüttler bei Raumtemperatur der Probe aus (b) und (d) Fluoreszenzaktivität ($\lambda_{ex} = 485$ nm) der angegebenen Partikelmischungen in PBS (7.4 pH) bei 25 °C (0,5 mg/ml für FITC SiO₂-PAM-PAA-c2-DNA (~100 nm PAM), 0,5 mg/ml

für InP@ZnS-MPA-c1-DNA und 60 - 70 µg/ml DNA *Linker*) für verschiedene DNA *Linker* (*Linker*: komplementärer DNA Linker; *Control*: kein DNA Linker vorhanden).

Auf Grundlage verschiedener Dichten und Partikelgrößen wurde getestet ob präsenzte *Linker* DNA zu einem veränderten Sedimentationsverhalten nach Zentrifugation führe und ob dies in Theorie als qualitativer Test dienen könnte bakterielle DNA zu detektieren. Die in Abbildung 16 eingesetzten Partikelspezies waren beides fluoreszierende Partikel, die bereits vorher beschrieben wurden (siehe **Task 1-1**). Nach Zusammenführung und Zentrifugation wurde für die zwei verschiedenen Proben ein klarer Unterschied beobachtet der mit vorhergesagten Verhalten übereinstimmte. Die Kontrolle zeigte eine klare Aufteilung der vorhandenen Partikel nach ihrer Größenverteilung über den beobachtet Raum und die DNA *Linker* Probe starke Agglomeration um die schwerer Partikelspezies in der Spitze des benutzten Behälters (siehe Abbildung 16a). Auch hier wurde um zu zeigen, dass es sich um ein DNA-meditiertes Verhalten handelt, bis zur Auflösung der Hybridisierung, erhitzt und noch in der Hitze zentrifugiert. Durch die Auflösung der Hybridisierung zeigten beide Proben das gleiche Verhalten, dass durch einen Zwischenzustand der vorher beobachten Sedimentierung beschrieben wurde (siehe Abbildung 16b). Nach Inkubationszeit auf einem Rüttler wurde der Ausgangszustand für die DNA *Linker* Probe wiederhergestellt aber die Kontrolle zeigte keine weitere Veränderung mehr (siehe Abbildung 16c). Dies wurde mit der kolloidalen Stabilität der nicht funktionalisierten Quantenpunkte in Hinblick auf die eingesetzten Temperaturen begründet, da die Reproduzierbarkeit des Anfangszustandes vor Erhitzung durch leichtes Schütteln und Redispergierung möglich war. Weitergehend wurde auch hier, wie schon vorher für andere Partikel beschrieben, das *Quenching* der Emission für die nicht funktionalisierten Quantenpunkte in Präsenz des DNA *Linkers* festgestellt (siehe Abbildung 16d). Für eine vollständige Bewertung der Viabilität des hier beschriebenen Detektionsweg müssen noch folge Experimente mit verschiedenen DNA *Linkern* durchgeführt werden. Jedoch sind die hier beschriebenen Ergebnisse ein erstes Indiz für die Machbarkeit.

Fortgeschriebenen Verwertungsplan: Die ersten 4 der 5 Meilensteine des Projekts (MS1: Synthese stabiler fluoreszierender und magnetisch separierbarer NPs (LIPI) M18, MS2: Synthese und Charakterisierung von InP NPs mit hoher Quantenausbeute (KocU) M24, MS3: Stabilisierte NPs im bakteriellen Lysemedium (USiegen) M18, MS4: DNA Nachweis in gepufferten Medien, (alle Partner) M24) wurden erreicht. Der abschließende Meilenstein MS5 (Prototyp testfertig (M30) (alle Partner) M30) konnte aus den o.g. Gründen nicht vollständig umgesetzt und erreicht werden. Trotzdem konnte im Projekt gezeigt werden, dass die neuartige Methodik unter Laborbedingungen reproduzierbar funktionierte und dass relevante DNA Sequenzen ohne Verwendung von PCR in geringen Konzentrationen nachweisbar sind. Mit stärker leuchtenden und stabileren Nanopartikeln wäre zukünftig die Entwicklung eines Prototyps möglich. Dazu wären weitere Forschungs- und Entwicklungsarbeiten notwendig

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen: In der Projektlaufzeit wurden keine neuen Publikationen oder auch Schutzrechte oder Schutzrechtsanmeldungen veröffentlicht, die einer späteren Verwertung der Projektergebnisse entgegenstehen.

Geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses. Die im Projekt erarbeiteten Ergebnisse zu den Nanopartikelfunktionalisierungen und dem Nachweis von DNA werden gemeinsam mit den Projektpartnern LIPI und KocU in mindesten zwei internationalen Peer Review Publikationen veröffentlicht werden. Dabei werden die im Konsortialvertrag getroffenen Regelungen eingehalten. Des Weiteren werden mögliche Folgeprojekte eruiert, um das unter Laborbedingungen funktionierende Nachweissystem zu verbessern und hinsichtlich möglicher zukünftiger Verwendung weiter zu entwickeln.