

2 Grundlagen laserbasierter Manipulation von Zellen mittels plasmoneninduzierter Effekte

Der Mechanismus der laserbasierten Zellmanipulation mittels plasmoneninduzierter Effekte nutzt die Auswirkungen der Interaktion von Laserstrahlung mit Goldnanostrukturen auf biologische Materialien. Da die Interaktion von den Laserparametern sowie den Eigenschaften der Goldnanostrukturen abhängt, ist das Verständnis ihrer optischen Eigenschaften, also ihr Verhalten bei Interaktion mit einer EM Welle, essentiell. Deswegen werden in diesem Kapitel zunächst die optischen Eigenschaften von AuNP und die durch Laserstrahlung an ihnen induzierten Effekte beschrieben. Es folgen kurze Einführungen in die für das Verständnis der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden benötigten biologischen Grundlagen und in die Wechselwirkung von Zellen mit Laserstrahlen oder AuNP sowie die Verwendung dieser Interaktion für die Zellmanipulation. Abschließend wird ein Überblick gegeben über Zellmanipulationsverfahren, welche die Interaktion von Lasern mit Partikeln nutzen und auf denen die in dieser Arbeit vorgestellten Ansätze basieren.

2.1 Effekte an laserbestrahlten Goldpartikeln und -strukturen

Nanopartikel (NP) können aus unterschiedlichen Materialien über verschiedene Verfahren hergestellt werden. Ihre Morphologie kann vielfältig sein und sich in Form, Größe, Längenverhältnis, Porosität und Oberflächenrauigkeit unterscheiden [13, 14]. Die Anziehungskräfte der einzelnen NP auf Grund der van-der-Waals-Kräfte müssen elektrostatisch kompensiert oder durch Moleküle, die sich an die NP anlagern, überwunden werden, damit die NP dispers bleiben [14]. Zusätzlich können ihre physikochemischen Eigenschaften modifiziert [14] und die NP durch Binden von Molekülen wie Liganden, die eine spezifische Bindung an Zellen ermöglichen, funktionalisiert werden [13]. Änderungen des Brechungsindex des die NP umgebenden Mediums verändert allerdings auch ihre optischen Eigenschaften, d. h. ihre Interaktion mit einer EM Welle [15–17].

Wegen der hohen Biokompatibilität und ihrer optischen Eigenschaften eignen sich NP oder dünne Schichten aus Gold (Au) für die laserbasierte Zellmanipulation besonders. Bei dem in Kapitel 3 beschriebenen Ansatz kamen kommerziell erhältliche, sphärische 200 nm¹ AuNP zum Einsatz. Für die Experimente in Kapitel 4 wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Barcikowski (Universität Duisburg-Essen) hergestellte 5–6 nm AuNP verwendet, die durch Funktionalisierung mit zellpenetrierenden Peptiden (CPP, engl. cell penetrating peptides) Agglomerate mit hydrodynamischen Durchmessern $d = 44\text{--}66\text{ nm}$

1 Sofern nicht anders vermerkt, bezieht sich diese Größenangabe immer auf den Durchmesser der NP.

bildeten. Die Herstellung der Primärpartikel erfolgte über „Pulsed Laser Ablation in Liquid“ (PLAL). Ein fokussierter, gepulster Laser abladiert NP von einem entsprechenden metallischen Festkörper. Die Größe der generierten NP hängt von den Laserparametern ab [18–23]. Im Vergleich zu chemischen Methoden werden die NP ligandenfrei in einem Medium wie Wasser ohne chemische Ausgangsstoffe hergestellt und ein nachträgliches Aufreinigen, um z. B. die Biokompatibilität zu erhöhen, ist überflüssig [20, 22]. Die in Kapitel 5 verwendeten (strukturierten) Oberflächen erhielten durch Sputtern eine dünne Goldschicht. Bei diesem Verfahren lagern sich durch Beschuss eines Goldkörpers mit hochenergetischen Ionen herausgeschlagene Atome ab.

2.1.1 Goldnanopartikel: Optische Eigenschaften und Plasmonenresonanzen

Durch die optischen Eigenschaften von Nanostrukturen aus Metallen wie Gold führt ihre Interaktion mit Laserstrahlung zu mikroskopischen Effekten, die von Größe und Form des Goldes sowie der dielektrischen Konstante des umgebenden Mediums abhängen [24]. Die homogene Ladungsverteilung von AuNP kann durch Wechselwirkung mit EM Strahlung ausgelenkt werden. Dabei wirkt die Coulomb-Anziehungskraft zwischen Elektronen und Kernen als Rückstellkraft und die freien Elektronen im Leitungsband beginnen gegen die positiven Ionenrümpfe zu schwingen [14, 16, 17]. Kohärente EM Strahlung kann Plasmonen, eine kollektive Schwingung aller Leitungsbandelektronen gegen die Ionenrümpfe, anregen. Dies entspricht einem mit der Frequenz der EM Strahlung angetriebenen harmonischen Oszillator. Die Frequenz, bei der die Energieabsorption durch die AuNP maximal und die effektive Dämpfung durch die Rückstellkraft minimal ist, entspricht der Resonanz des Systems. Es kommt zur **Plasmonenresonanz** (SPR, engl. surface plasmon resonance), bei der bereits ein EM Feld mit geringer Energie eine starke Oszillation anregen kann [16]. Die Frequenz der SPR liegt für metallische Festkörper im UV-Bereich. Bei Goldnanostrukturen wie dünnen Goldschichten und NP genügt zur Anregung der Resonanzübergänge eine Energie von wenigen Elektronenvolt, so dass dies auch mit Licht im sichtbaren oder nahinfraroten (NIR) Spektralbereich möglich ist [15].

Dämpfung, die sowohl strahlend als auch strahlungsfrei sein kann, verändert Amplitude und Frequenz der Schwingung [15, 16]. Bei der strahlungsfreien Dämpfung führt eine Dephasierung zur Absorption der eingestrahnten Energie, die in Wärme umgewandelt wird [16]. Strahlende Dämpfung verursacht durch das Aussenden von Photonen Energieverlust, so dass die Resonanzfrequenz rotverschoben ist. Der Resonanzpeak ist breiter, je schneller es zur Dephasierung der Elektronenoszillation durch Stöße mit anderen Elektronen, Phononen oder Defektelektronen kommt [15, 16, 25]. Eine Ursache für vermehrte Stöße sind höhere Temperaturen der NP. Mit welcher Frequenz die SPR am effektivsten angeregt werden kann hängt auch von Größe und Oberflächenladung der AuNP ab, da deren Polarisierbarkeit die Dämpfung beeinflusst [15, 16, 26]. Eine Schicht weniger nm mit höherer Polarisierbarkeit (Brechungsindex) schirmt die AuNP ab und der Resonanzpeak wird schmaler. Auch das die AuNP umgebende Medium beeinflusst

die effektive Rückstellkraft des Systems [16]. In NP deren Durchmesser kleiner als die mittlere freie Weglänge von Elektronen in Gold (40 - 50 nm) ist, stoßen die Elektronen verstärkt an der Partikeloberfläche [15, 16]. Bei größeren NP ist die effektive freie Weglänge größer, so dass die strahlende Dämpfung an Bedeutung gewinnt und Stöße an der Partikeloberfläche vernachlässigbar werden [27].

Diese frequenzabhängige Interaktion der AuNP mit einer EM Welle der Frequenz ω wird durch die **dielektrische Funktion** $\varepsilon(\omega)$ beschrieben. Ihr Realteil beschreibt die durch das Feld induzierte Änderung der Polarisierung der AuNP, der Imaginärteil den Energieverlust durch Absorption [25, 28]. Die angeregten Elektronen ändern durch unspezifisches Stoßen mit Gitterionen, Elektronen, Phononen u. a. mit der Rate γ_0 zufällig ihre Bewegungsrichtung [16, 29]. Die Stoßrate ist umgekehrt proportional zur Relaxationszeit τ der Elektronen und dämpft die Schwingung [16]. Zwischen den Stößen beschleunigt ein externes Feld die Elektronen. Unter der Annahme, dass nur die Leitungsbandelektronen zu ε beitragen (Drude-Sommerfeld Modell), gilt:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega}, \quad (2.1)$$

wobei $\omega_p^2 = (n e^2)/(\varepsilon_0 m_{eff})$ die Plasmafrequenz des Festkörpers mit effektiver Masse m_{eff} und Dichte n der Leitungselektronen, e die Elementarladung und ε_0 die dielektrische Konstante im Vakuum ist [16, 29]. Dies gilt für niedrige Energien, da hier lediglich die freien Elektronen, also die Intrabandübergänge, berücksichtigt werden. Für höhere Energien ($> 2,4$ eV) müsste noch der Anteil der Interbandanregungen von Elektronen aus tieferen Bändern ins Leitungsband mit einbezogen werden [16]. Für externe EM Felder mit Frequenzen unterhalb der Plasmafrequenz wird ε imaginär und die eingestrahlte Welle wird im Metall gedämpft. Bei größeren Frequenzen breitet sich das Feld ungedämpft durch das Metall aus und hängt nur von ε des umgebenden Mediums ab [16].

Die **Mie-Theorie** beschreibt die Streuung und Absorption EM Strahlung an metallischen, sphärischen, ungeladenen Nanopartikeln in einem homogenen Medium theoretisch durch Lösen der Maxwellgleichungen mit entsprechenden Randbedingungen [16, 24]. Mit den Lösungen können nicht nur durch das externe EM Feld angeregte dipolare, sondern auch multipolare Schwingungen der Elektronen in den NP beschrieben werden. Diese Schwingungen werden Plasmonenmoden genannt [26]. Die Effizienzen Q_{abs} bzw. Q_{str} sind die Anteile der von den AuNP absorbierten bzw. gestreuten Energie der eingestrahlten EM Welle. Sie summieren sich zur Extinktionseffizienz Q_{ext} [30]. Mit a_n und b_n als Mie-Koeffizienten, wobei n die Ordnung der Schwingung angibt ($n=1$: Dipolschwingung), NP Radius r und Wellenvektor k gilt:

$$Q_{str} = \frac{2}{(kr)^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2), \quad (2.2)$$

$$Q_{\text{ext}} = \frac{2}{(kr)^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (\text{Re}(a_n + b_n)), \quad (2.3)$$

$$Q_{\text{abs}} = Q_{\text{ext}} - Q_{\text{str}}. \quad (2.4)$$

Der Anteil der Streuung und der Absorption an der Extinktion hängt von der Partikelgröße ab [16]. Ersterer skaliert quadratisch mit dem Volumen der NP, letzterer ist proportional zu diesem [31]. Bei Anregung höherer Moden nimmt der Anteil der Absorption an der Extinktion ab und der relative Anteil der Streuung nimmt zu.

Für NP mit $d \ll \lambda$ kann das eingestrahlte elektrische Feld der Wellenlänge λ über das gesamte NP als konstant angenommen werden [15, 17]. Bei dieser **quasistatischen Näherung** ($d < \lambda/10$) können Phasenverschiebungen und höhere Plasmonenmoden vernachlässigt werden [26]. Es tragen hauptsächlich Dipolschwingungen zu Q_{ext} bei. Da größere NP nicht mehr homogen polarisiert werden können, fließen bei ihnen auch Terme höherer Ordnung mit ein [15, 32]. Es kann zu Multipolschwingungen kommen, die ihr Maximum bei niedrigeren Energien haben. Die Resonanzfrequenz wird rotverschoben, ihr Peak breiter [15]. Über Größe und Form der NP kann die Frequenz ihrer SPR systematisch eingestellt werden [33]. Die Eigenmoden sphärischer NP sind auf Grund der Punktsymmetrie dreifach entartet. Durch Symmetriebrechung wird die Entartung aufgehoben, weshalb es bei nicht-sphärischen NP mehr als einen Resonanzpeak geben kann. Für Nanorods ist die SPR, z. B. im Vergleich zu der sphärischer AuNP, rotverschoben. Auf Grund der Topologie von Nanorods entsteht neben der rotverschobenen eine zweite, etwas blauverschobene SPR in transversaler Richtung [14, 31].

Für NP < 20 nm sind Streueffekte vernachlässigbar und die Absorption dominiert [16]. Gleichzeitig hängt ε von der Partikelgröße ab [34], da durch die höheren Anregungsenergien die Interbanddämpfung berücksichtigt werden muss (intrinsischer Größeneffekt) [15]. Die Breite des Resonanzpeaks ist umgekehrt proportional zur Partikelgröße [15]. In diesem Größenbereich besitzt das Extinktionsspektrum quasi nur ein Maximum der SPR bei um die 520 nm [27]. Die Plasmonenoszillation von NP < 5 nm ist stark gedämpft und ihre Absorption nimmt stark ab. Für NP < 2 nm verschwindet sie komplett, da die Elektronendichte im Leitungsband sehr klein wird [15].

Für NP > 20 nm kommt es mit zunehmender Größe zur Rotverschiebung der SPR und zur Verbreiterung des Resonanzpeaks durch vermehrte Strahlungsdämpfung [15, 16, 27]. Durch Streuung dephasiert die Elektronenoszillation innerhalb weniger Femtosekunden. Da der relative Anteil der Streuung für größere NP zunimmt (extrinsischer Größeneffekt), sinkt die Dephasierungszeit [15, 16, 35]. Bei NP > 40 -50 nm ist zudem die Dipolnäherung nicht mehr zulässig. Es entstehen vermehrt Schwingungen höherer Ordnung, da das eingestrahlte Licht die NP nicht mehr homogen polarisieren kann und es zu Phasenverschiebungen kommt [15, 17, 26]. ε hängt hauptsächlich von der Frequenz des eingestrahnten Feldes ab [34]. Für NP bis 100 nm steigt die Extinktion, darüber sinkt sie und wird unregelmäßig [27]. Für NP bis 140-160 nm verbreitert sich die SPR durch

Strahlungsdämpfung weiter [16, 27]. Bei breiteren Resonanzen kann die SPR ausgelöscht werden und sich das Spektrum dem eines metallischen Festkörpers annähern [14, 27].

Im Fernfeld ($R \geq 10r$) nimmt die Streuung eines eingestrahlten elektrischen Feldes mit $1/R$ ab, wobei R der Abstand zum Partikelzentrum ist. Q_{str} bleibt konstant [30]. Im Nahfeld der Partikel ist die einfallende planare Welle jedoch deutlich deformiert, um den Grenzbedingungen der Oberfläche zu genügen [30]. Aus diesem Grund muss im Nahfeld neben den zu den NP senkrechten Feldern noch eine radiale Komponente berücksichtigt werden. An der Partikeloberfläche ($R = r$) ist somit zusätzlich die wellenlängenabhängige **Nahfeldeffizienz** Q_{NF} zu berücksichtigen [30]:

$$Q_{\text{NF}} = \frac{R^2}{\pi r^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \vec{E}_S \cdot \vec{E}_S^* \sin \theta \, d\theta \, d\phi \Big|_{R=r}. \quad (2.5)$$

Dabei ist \vec{E}_S das gestreute elektrische Feld. Q_{NF} nähert sich im Fernfeld Q_{str} an [36]. Der Anteil von Q_{NF} , der nur durch das radiale Feld zustande kommt, ist Q_{R} [30]:

$$Q_{\text{R}} = \frac{2}{\pi r^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(n+1) n |a_n|^2 |h_n^{(2)}(kr)|^2. \quad (2.6)$$

$h_n^{(2)}$ ist die Hankelfunktion zweiter Ordnung. Auf der Partikeloberfläche macht Q_{R} ca. 67 % von Q_{NF} aus. Q_{NF} kann deutlich größer als Q_{str} sein. Das führt zu einer Verstärkung des Nahfeldes, da Q_{R} mit zunehmender Entfernung von der Partikeloberfläche schneller (mit $1/R^2$) abnimmt als Q_{str} . Das Verhältnis von Q_{NF} zu Q_{str} ist für kleinere Partikel deutlich höher als für größere bei Einstrahlung mit gleicher Wellenlänge. Ihre Nahfeldverstärkung ist entsprechend größer [36]. Bei – wie in dieser Arbeit genutzt – Anregung mit 532 nm ist Q_{NF} für AuNP mit $d = 50\text{--}60\text{ nm}$ maximal, da bei kleineren NP der intrinsische Größeneffekt Einfluss hat [26]. Die Wellenlänge, bei der die Nahfeldeffizienzen maximal sind, ist im Vergleich zu der, bei der Q_{str} maximal ist, leicht rotverschoben. Gleiches gilt für größere Wellenlängen bei gleichbleibender Partikelgröße, da das Verhältnis von der Relation des Partikelumfangs zur Wellenlänge abhängt [30, 36]. Bei NP, bei denen die Absorption dominiert, liegen die Nahfeldeffizienzen über der Extinktionseffizienz. Bei NP, bei denen $Q_{\text{str}} > Q_{\text{abs}}$, übersteigt die Nahfeldeffizienz die Extinktionseffizienz deutlich stärker [30]. Für 200 nm NP ist Q_{NF} ungefähr Q_{str} . Q_{str} nimmt proportional zu $1/\lambda^4$ ab [36]. Abbildung 1 in [26] zeigt anschaulich den Vergleich der Effizienzen (dargestellt als Wirkungsquerschnitte) für AuNP mit den Durchmessern 20 nm, 50 nm und 100 nm. Bei den 20 nm AuNP ist der Nahfeldwirkungsquerschnitt ungefähr zwei, bei den 100 nm AuNP nur eine Größenordnung größer als der Fernfeldstreuwirkungsquerschnitt [26].

AuNP sind folglich in der Lage Energie in ihrer Nähe zu konzentrieren und können als „**Nanolinsen**“ fungieren, die das Licht unterhalb der optischen Auflösungsgrenze fokussieren [12, 37]. Befindet sich ein AuNP in der Nähe eines zweiten AuNP oder auch einem Substrat, ändert sich die räumliche Verteilung des Nahfeldes und es kommt zu einer

ausgeprägteren Nahfeldverstärkung. Diese ist zwischen den beiden Oberflächen lokalisiert und beruht auf elektrischer Kopplung der beiden eng benachbarten Partikelladungen. Ablation von Material wie Silizium in AuNP Nähe durch Laserbestrahlung kann diese Effekte sichtbar machen. Unterscheidet sich der Materialabtrag für zirkular und linear polarisiertes Licht nicht, so ist der Nanolinsen-Effekt vernachlässigbar [12].

2.1.2 Plasmonische Interaktion von AuNP

Plasmonenmoden komplexer Nanostrukturen können als Interaktion der SPR der einzelnen Komponenten dargestellt werden [38]. Das elektrische Feld, das in so einer Struktur auf ein einzelnes NP wirkt, ist die Summe des eingestrahnten Feldes und der Nahfeldstreuung der umgebenden NP [33]. Einen Überblick über verschiedene Theorien, beispielsweise die Plasmonenhybridisierung [39] oder die Anregung von Fano-Resonanzen [40], mit denen die Interaktionen von Plasmonen diverser Nanostruktursysteme beschrieben werden können, ist bei Halas et al. [38] zu finden. Im Folgenden wird die Interaktion von für die Versuche dieser Arbeit verwendeten, sphärischen AuNP beschrieben. Ihre unmittelbare Nähe zueinander kann zur Kopplung der angeregten Plasmonenoszillation führen [12, 33].

Die **Interaktion zweier NP** hängt neben den bereits beschriebenen optischen Eigenschaften von ihrem Abstand s zueinander und der Polarisation des eingestrahnten Feldes ab. NP mit großem Abstand interagieren unabhängig voneinander mit dem eingestrahlichten Licht (s. o.). Je mehr sich die NP nähern, desto stärker wechselwirken sie miteinander [41]. Bei Plasmonenanregungen von NP mit $s < \lambda/4$ können die Felder des einen mit den Ladungen des anderen NP interagieren und so dessen Felder beeinflussen [31]. Diese Kopplung führt zum Mischen (Hybridisierung), Aufspalten und Verschieben der Plasmonen [42, 43]. Koppeln zwei Nahfelder, so wird die Symmetrie der Ladungsverteilung der einzelnen NP durch Mischen mit anderen Moden des Partikelpaares verzerrt [31]. Es kommt zu einer starken Lokalisierung der durch die EM Felder induzierten Ladung in der Partikellücke, den so genannten „**hot spots**“ [14, 33, 44]. Dabei wird das Licht auf eine Fläche, die vom Abstand der NP zueinander abhängt, unterhalb des Beugungslimits der klassischen Optik fokussiert [38]. Das Nahfeld in der Partikellücke kann Größenordnungen größer sein als an den Enden der interagierenden NP. Da die starke Kopplung in der Lücke die Rückstellkraft innerhalb der NP reduziert, ist die SPR des gekoppelten Partikelsystems rotverschoben [44]. Die Extinktion der einzelnen NP des Paares ist größer als die von Einzelpartikeln [45].

Durch diese **Nahfeldkopplung** kann es bei Partikelpaaren – ähnlich wie bei Nanorods – zur Anregung von zwei Resonanzfrequenzen kommen [14, 16, 31]. Je nach Orientierung des Paares zur eingestrahlichten EM Welle ist die eine stärker ausgeprägt als die andere [31]. Ist das eingestrahlichte Licht parallel zur Interpartikelachse, bilden sich zwei longitudinale Dipole aus, die zur genannten Rotverschiebung der SPR führen. Diese Frequenzverschiebung ist für kleinere Partikelabstände größer. Bei orthogonaler Polarisierung ist die SPR blauverschoben, allerdings deutlich geringer als die beschrie-

bene Rotverschiebung [33, 38]. Die Verschiebung des Extinktionsspektrums, also die Kopplungsstärke, steigt nahezu exponentiell mit Verringerung des Partikelabstands [33].

Die Feldverstärkung in einem Abstand zum NP $< 0,5 \text{ nm}$ wird durch klassische Berechnungen überschätzt, da in diesem Bereich die ausgeschlagenen Elektronen die lokalen elektrischen Felder abschirmen [38, 46]. Zur korrekten Beschreibung der optischen Eigenschaften von NP müssen quantenmechanische Effekte berücksichtigt werden [38]. Bei zwei NP mit $s < 1 \text{ nm}$ kann die Kopplung der Plasmonen, also die Feldverstärkung in der Lücke, durch **Elektronentunneln** verringert werden, da der Elektronenstrom zum Kurzschluss der Partikellücke führt [38]. Durch die Umverteilung der Oberflächenladung entsteht eine neue Plasmonenmode, ein Ladungstransferplasmon (LTP) [40]. Die Energie des LTP ist proportional zur induzierten Leitfähigkeit des Partikelzwischenraums. Bei einer so gekoppelten SPR ist die Rotverschiebung gesättigt und durch die verringerte Plasmonenkopplung kommt es zu einer Blauverschiebung der SPR mit kleineren NP Abständen [31, 38, 41]. Berühren sich die NP nur an einem Punkt, kommt es zu einer starken Ladungsansammlung an den Rändern des Kontaktpunktes. Überschneiden sich die NP, ist die SPR des Gesamtsystems blauverschoben [41]. Bei Partikelketten sind transversale und longitudinale Moden nicht länger um die NP lokalisiert, sondern können entlang der Kette propagieren [38]. Die Spaltung der Plasmonenmoden nimmt mit steigendem Seitenverhältnis zu. Ab ungefähr zehn NP ist die Verschiebung gesättigt, da das Nahfeld der NP mit d^{-3} abnimmt [38]. Bei großen Abständen ($s > 5d$ für $d = 50 \text{ nm}$) kann die Interaktion somit vernachlässigt werden [36].

Die Interaktion von NP in **Agglomeraten**, die durch ihre räumliche Nähe nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, ist komplizierter, da die gestreuten EM Felder aller interagierenden NP berücksichtigt werden müssen. Der Wirkungsquerschnitt einer Anzahl (N) willkürlich angeordneter, sphärischer NP hängt außer von der Größe dieser Primärpartikel von der Größe und Topologie des Agglomerats, dem Partikelmateriale sowie der Polarisation und Ausbreitungsrichtung der einfallenden EM Welle ab [17, 36]. Je mehr NP sich in einem Agglomerat befinden, also je größer es ist, desto ausgeprägter ist die Rotverschiebung bei leicht verringerter Q_{str} [28, 45]. Der Partikelabstand bestimmt wie viele NP über ihre Nahfelder miteinander wechselwirken können [33]. Durch konstruktive Interferenz aller gestreuten Felder bilden sich die bereits erwähnten „hot spots“ [36]. Die Verstärkung der Streuung im Agglomerat kann durch $Q_{\text{str}}(N)/(N \cdot Q_{\text{str}}(1))$ beschrieben werden. Durch die Kopplung spaltet sich die SPR der Primärpartikel in mehrere, neue Resonanzen, deren Anzahl proportional zur Anzahl der NP ist [36]. Nach außen verhält sich das Agglomerat ähnlich wie ein einzelnes, größeres NP. Eine Veränderung der Umgebung der koppelnden NP kann die Frequenz der SPR verschieben, die Nahfeldverstärkung aber nicht dramatisch verändern [44]. Je kleiner der Abstand der Partikel, desto sensibler reagiert die Frequenz der SPR auf Änderungen des Brechungsindex der Umgebung [33].

Nanolöcher in einem dünnen Goldfilm verhalten sich analog [47]. Durch Ausbreitung von Oberflächenplasmonen entlang des Goldfilms kommt es an den Rändern der Löcher

zu lokalisierter SPR. Deren Frequenz verschiebt sich mit größeren Lochdurchmessern oder Brechungsindices des umgebenden Mediums zum Langwelligeren. Die Ausbreitungsrichtung der Plasmonen hängt von der Polarisierung des Lichtes ab, das sie induziert hat [47, 48]. Sie klingen mit $1/R^2$ ab. Verringert sich der Abstand zweier Nanoporen können die Plasmonen über die die Poren verbindende, dünne Goldschicht koppeln. Die angeregten SPR haben eine kürzere Lebenszeit, also ein breiteres Spektrum, und das Extinktionsspektrum ist blauverschoben [47, 48]. Bei einer dünnen Goldschicht (kleiner als die Eindringtiefe) koppeln die Plasmonen von beiden Seiten des Goldfilms direkt miteinander. Bei dickeren Schichten können sie nur in den Nanolöchern mit denen der anderen Seite koppeln [48].

2.1.3 Elektronendynamik und durch Wärmeeintrag induzierte Effekte

Die Menge der während des Bestrahlens von den AuNP absorbierten Energie hängt neben den optischen Eigenschaften von Gold auch von der eingestrahlten Laserenergie sowie vom Volumen und Absorptionsquerschnitt des Absorbers (d. h. den AuNP) ab [49]. Die Elektronendynamik und wie Absorption die AuNP und ihre Umgebung erwärmt, wird im Folgenden beschrieben.

Wird ein NP mit einem sehr kurzen Laserpuls bestrahlt, kommt es in weniger als 100 fs zu einer **nicht-thermischen Anregung** der Leitungsbandelektronen [15, 31]. Diese relaxieren in weniger als 1 ps und die absorbierte Energie wird durch Elektronen-Elektronen-Stöße mit kalten Leitungsbandelektronen in thermische Energie umgewandelt [10, 15, 26]. Es stellt sich ein **thermisches Gleichgewicht** ein [26, 49]. Da die Wärmekapazität von Leitungsbandelektronen niedrig ist, kann es zu Temperaturen bis zu einigen tausend Kelvin kommen [31]. Innerhalb weniger ps wird die Energie zudem durch **Elektronen-Phononen-Kopplung** auf das Gitter der NP übertragen, welches wiederum mit dem die NP umgebenden Medium wechselwirkt [15, 25]. Bei sehr kleinen AuNP kann die Wärme ins umgebende Medium abgeleitet werden bevor sich das Elektronen-Phononen-Gleichgewicht eingestellt hat [15, 50]. In Agglomeraten von NP kühlen die Elektronen schneller ab, d. h. ihre Elektronen-Phononen-Relaxationszeit (τ_{e-ph}) sinkt, da es durch die Plasmonenkopplung zwischen interagierenden NP zu verstärkter Streuung im Partikelzwischenraum und zu einer Delokalisierung der Elektronen kommt [33, 51]. Höhere Laserleistungen führen zu höheren Temperaturen und längeren Elektronen-Phononen-Kopplungszeiten [46, 52]. Dadurch kommt es zu höheren Gittertemperaturen, die zur Expansion der AuNP führen [46, 52]. Wird das Gitter sehr schnell erwärmt, können sich **akustische Gitterschwingungen** ausbilden, die zur Modulation des gesamten Partikelvolumens führen [31, 46, 52, 53]. Dadurch ändert sich die Elektronendichte periodisch und führt zu einer Änderung der Frequenz der SPR [31, 52]. Für AuNP mit $d \leq 10$ nm steigt der Energieaustausch zwischen Elektronen und Gitter stark an, so dass es zu einer schnelleren Relaxation kommt [31, 54]. Durch diese **Phononen-Phononen-Wechselwirkung** kühlen die NP – abhängig von der Wärmeleitung ins Medium – binnen einiger zehn oder hunderter von ps auf die Umgebungstemperatur ab

[26, 31]. Die thermische Relaxationszeit (τ_T) der AuNP ist umso länger, je geringer die thermische Leitfähigkeit des umgebenen Mediums [46] und je größer das AuNP ist [10].

Der aus der Absorption resultierende **Wärmeeintrag** in das die AuNP umgebende Medium lässt sich über den Wärmefluss mit Hilfe von Wärmetransfergleichungen beschreiben [55, 56]. Bei Pulsdauern, die kürzer oder gleich der thermischen Relaxationszeit sind, findet quasi kein Wärmeaustausch mit dem Medium statt [10, 11]. Die Lasereinstrahlung bleibt auf die AuNP beschränkt und führt zu deren schneller Erwärmung [7, 12]. Es kommt zu einem räumlich selektiveren Wärmeeintrag als bei längeren Pulsdauern (ns) [57, 58]. Deswegen können Wärmeverluste durch Diffusion in das Medium vernachlässigt werden. Das gilt für kleine AuNP und ps- bzw. fs-Pulse, aber auch für die Wechselwirkung von ns-Pulsen mit relativ großen AuNP [10]. Allerdings bleibt auch bei ns-Pulsen der Großteil der Energie um die AuNP lokalisiert, da die für eine signifikante Wärmeleitung von den NP weg benötigte Zeit im Bereich von Mikrosekunden liegt [14]. Partikelagglomerate generieren durch Verstärkung des elektrischen Feldes in den „hot spots“ mehr Wärme als Einzelpartikel [59, 60].

Zur Berechnung der induzierten Temperatur über die Zeit muss die Wärmeleitfähigkeit der Elektronen sowie der Gitterphononen berücksichtigt werden [61]. Bei Laserpulsen, bei denen die Pulsdauer die Relaxationszeit übersteigt, kommt es bereits während der Einstrahlung zum Wärmeaustausch des AuNP mit seiner Umgebung [7, 11]. Hier kann eine einheitliche Temperatur im NP angenommen werden, so dass das System über die Wärmeleitung durch Phononen gut beschrieben wird [50, 61]. Neben diesen Modellen den Wärmeeintrag zu berechnen, gibt es je nach Parametern weitere Methoden [17, 50]. Die Absorption der Energie sowie der Wärmeaustausch zwischen AuNP und Medium kann durch folgende Wärmeleitungsgleichung beschrieben werden [11]:

$$c_i \rho_i \frac{\partial T_i}{\partial t} = \frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 k_i \frac{\partial T_i}{\partial R} \right) + q_i, \quad (2.7)$$

wobei T die Temperatur und t die Zeit ist. Weiter sind c_i die Wärmekapazität, ρ_i die Dichte und k_i die thermische Leitfähigkeit innerhalb der AuNP ($R \leq r$, $i = 0$) bzw. im umgebenden Medium ($R > r$, $i = 1$). Die Leistungsdichte der Wärmequelle q_i ist für das Medium gleich null. Im absorbierenden Gold hängt sie von der Strahlungsintensität, der Absorptionseffizienz sowie dem Partikelradius und -volumen ab [11].

Nachfolgend werden die Auswirkungen des Wärmeeintrags auf die NP und das umgebende Medium beschrieben. Erwärmt sich das Gitter schneller als es abkühlt, kann das Gold **schmelzen** und sich die Form der AuNP ändern [11, 26, 62]. Gleichzeitig dehnen sich die AuNP leicht aus, da die Dichte geschmolzener AuNP geringer ist. Der Schmelzpunkt von Gold ist bei $\sim 1063^\circ\text{C}$ [10, 11]. Dieser ist für sphärische AuNP invers von der Größe der AuNP abhängig und für AuNP kleiner 20 nm gut beobachtbar [14, 63]. AuNP mit einem Durchmesser von 20 nm besitzen eine Schmelztemperatur von $\sim 327^\circ\text{C}$ [63].

Bei einem Wärmeeintrag oberhalb des Siedepunktes von Gold (2710°C) können AuNP **verdampfen** [10]. Es bildet sich eine Golddampfblase um die AuNP, durch die der AuNP-Durchmesser verringert wird. Sie kann expandieren, pulsieren und kollabieren. Durch Kondensation des verdampften Goldes können sich flüssige Goldtropfen bilden, die nach dem Abkühlen zu kleinen Partikelfragmenten werden [10, 11]. Die Dampfblase entsteht innerhalb weniger Nanosekunden. Sie verändert die optischen Eigenschaften der AuNP durch verstärkte Streuung und verringert somit deren Absorption und Erwärmung [11].

Bei hohen eingestrahnten Energien gibt es weitere Effekte, die zum **Fragmentieren** der AuNP führen können [15]. Ein hoher Wärmeeintrag ($T \geq 10^4^\circ\text{C}$) kann zur **thermischen Explosion** des überhitzten AuNP führen, wenn die Menge der absorbierten Energie höher ist als für das Verdampfen des kompletten AuNP nötig wäre [10]. Letfullin et al. fanden einen Schwellwert für die thermische Partikelexplosion von $25\text{--}40\text{ mJ/cm}^2$ [10]. Die Partikelexplosion kann von der Bildung eines optischen Plasmas begleitet werden. Ist die Gittertemperatur noch unterhalb des Siedepunktes, aber die Elektronentemperatur ausreichend groß, um Elektronen thermisch zu emittieren, kann es durch Coulomb-Abstoßung geladener, kleiner Partikelteile spontan zu einer nicht-thermischen Spaltung der AuNP, der **Coulomb-Explosion** kommen [11, 26, 49]. Das passiert, wenn hohe Laserenergien durch Multiphotonenionisation zu einer hohen Dichte freier Elektronen führen, so dass ein optischer Durchbruch und so ein Plasma innerhalb oder an der Oberfläche der AuNP induziert wird. Welcher der beiden Explosionsmodi eintritt hängt von der Pulsdauer ab. Pulse (fs), die kürzer als τ_{e-ph} sind, führen zur Coulomb-Explosion. Pulsdauern (ns) deutlich größer als τ_{e-ph} bewirken das Verdampfen der AuNP. Bei Anregung mit Pulsdauern im ps-Bereich können beide Effekte auftreten [49]. Ist der Abstand zweier hochenergetischer ns-Pulse kürzer als die Relaxationszeit, werden die AuNP schneller erwärmt als sie abkühlen können und fragmentieren ebenfalls [15].

Diese Änderungen der AuNP verändern nicht nur deren optische Eigenschaften. Sie haben auch Auswirkungen auf das die AuNP umgebende Medium. Durch thermische Expansion der AuNP kann sich eine akustische Welle im Medium ausbreiten. Die Wärmediffusion von den AuNP in das sie umgebende Medium induziert dort bereits bei Temperaturen unterhalb der Schmelztemperatur von Gold weitere Effekte [26]. Ein Medium, das in direktem Kontakt mit den AuNP ist, kann durch einen schnellen, starken Temperaturanstieg schlagartig verdampfen. Die Temperatur zum Verdampfen oder schlagartigen Sieden von Flüssigkeiten liegt bei $\sim 100^\circ\text{C}\text{--}374^\circ\text{C}$ [11]. Sobald der Dampfdruck die Oberflächenspannung des Mediums überwunden hat, entsteht eine **Dampfblase**, die schnell expandiert [7] und zum Aussenden einer **akustischen Druckwelle** führt [11].

Auch durch während des Schmelzens und Verdampfens der AuNP generierte Golddampfblasen können **Stoßwellen** hoher kinetischer Energie entstehen, die sich in das umgebende Medium ausbreiten [11, 64]. Dabei expandiert das Medium innerhalb weniger Nanosekunden, um den durch optischen Durchbruch und Plasmabildung entstandenen Druck im Medium um die AuNP zu kompensieren [57, 64]. Die Stoßwelle reißt das Medi-

um auf, bis die kinetische Energie des Plasmas verbraucht ist [65]. Nach ca. 30 - 50 ns hat sie sich zu einer akustischen Welle verlangsamt [64]. Durch das Aufreißen entsteht 50 - 150 ns nach dem Laserpuls ein dampfgefüllter Hohlraum, eine **Kavitationsblase** [11, 64, 65]. Die Lebensdauer der Blase hängt von ihrem maximalen Radius [7], dieser wiederum von der eingestrahnten Pulsenergie und -dauer, ab [26]. Die Blasen ändern die optischen Eigenschaften, z. B. den Brechungsindex, des Mediums. Dadurch kann es – bei längeren Pulsdauern bereits während des Einstrahlens – zu einer deutlich verringerten Absorption und möglicherweise thermischen Isolation der AuNP kommen [26, 49].

Durch das Ausdehnen einer Blase sinkt ihr innerer Druck, der Dampf kühlt ab, kondensiert und die Blase kollabiert, wenn der äußere Druck des Mediums den Blaseninnendruck übersteigt. Das von außen nachströmende Medium komprimiert die Blase stärker als bis zum Druckgleichgewicht, so dass Druck und Temperatur in der Blase wieder ansteigen. Es kommt zu einem erneuten Aufschwingen der Blase mit Aussenden einer Stoßwelle [64, 66, 67]. Diese **Blasendynamik** wiederholt sich mit kleiner werdenden Radien bis die Temperatur der AuNP unter den Schwellwert der Blasenbildung gesunken ist [26]. Die gesamte Dynamik findet innerhalb einiger hundert Mikrosekunden statt [64] und kann mit Hilfe der Rayleigh-Plesset-Gleichung beschrieben werden [68].

In der Nähe einer Begrenzung kollabiert die Blase asymmetrisch. Das Medium kann auf der Seite der Begrenzung nicht ungehindert nachströmen, ein Unterdruck entsteht. Dadurch wird das Medium von der gegenüberliegenden Seite in diese Richtung beschleunigt [69, 70]. Bei jedem Kollabieren der Blase entsteht ein zu dieser Grenze gerichteter **Wasserjet** [64, 71]. Je geringer der Abstand der kollabierenden Blase zu dieser Begrenzung ist, desto höher sind Druck und Geschwindigkeit des Jets in Richtung der Grenzfläche [72]. Durch den hohen Druck auf dieser kann sich zusätzlich ein Counter-Jet ausbilden, der von der Grenzfläche in Richtung der Blase zeigt [70, 73].

Interagieren zwei oder mehr räumlich nicht getrennte Kavitationsblasen miteinander, kann es zu ähnlichen Effekten kommen, die von Größe und Energie der einzelnen Blasen abhängen. Je geringer die Blasenabstände sind, desto stärker ausgeprägt sind die Effekte [74]. Beim Kollabieren können sich, wie im Fall der Grenzfläche, Flüssigkeitsjets in Richtung der Begrenzung – in diesem Fall der anderen Blase – ausbilden. Gleichzeitig kann eine weitere, sich zwischen den beiden initialen Blasen befindliche Blase entstehen [75]. Zwei Blasen unterschiedlicher Energien und somit verschiedener Blasendynamik (z. B. auf Grund ihrer Größe) bzw. einer Phasenverschiebung der Oszillation (z. B. durch Blasenbildung zu verschiedenen Zeitpunkten) führen zu einem komplizierteren, asymmetrischen Interaktionsverhalten. Eine oder beide Blasen können gespalten werden, in mehrere, kleinere Blasen fragmentieren, sich ausdehnen oder die andere Blase mitziehen [76, 77].

Bevor die Anwendung dieser, durch Bestrahlen von AuNP entstandenen, Effekte zur Manipulation von Zellen in Abschnitt 2.3 näher beschrieben wird, werden die Grundlagen von Zellen sowie ihre Interaktion mit Nanopartikeln und Lasern einzeln dargestellt.

2.2 Zellen und ihre Manipulation mit Partikeln oder Laserstrahlung

Damit Wirkstoffe oder genetisches Material in Zellen gelangen, müssen sie zelluläre Hindernisse wie Membranen überwinden und in einer kritischen Menge eingebracht werden, um ihre Wirkung zu entfalten [13, 78]. Therapeutika wirken zumeist im Zytoplasma [13], wohingegen z. B. exogene DNA neben der Zellmembran die Kernhülle überwinden muss, um im Zellkern transkribiert werden zu können. Im Folgenden wird zunächst die Struktur prokaryotischer und eukaryotischer Zellen sowie deren Aufnahmemechanismen für extrazelluläre Moleküle, die für die Zellfunktion elementar sind, mit denen aber auch AuNP in Zellen gelangen, beschrieben. Darauf folgt eine Übersicht der Wechselwirkung von Zellen mit Partikeln oder Lasern sowie deren Anwendung zur Zellmanipulation.

2.2.1 Aufbau prokaryotischer und eukaryotischer Zellen

Zellmembranen bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, bei der die hydrophile Seite der amphipathischen Moleküle nach außen zeigt. Ähnliche Membranen umgeben einzelne Organellen. Diese fließende, dynamische, überwiegend impermeable Lipid-Doppelschicht ist ca. 5 nm dick und kann kleinere Defekte wieder verschließen. Die Eigenschaften von Membranen unterscheiden sich durch spezifische Proteine. **Prokaryotische Zellen** wie Bakterien haben eine äußere Membran und eine Zellwand aus Proteinen und Polysacchariden, aber keine membranumhüllten Kompartimente. Bei – in dieser Arbeit verwendeten – gram-positiven *Bacillus subtilis*-Bakterien befindet sich die Membran auf der Innenseite einer dicken Zellwand. Sie können praktisch alle organischen Moleküle als Nahrung verwerten, sind stäbchenförmig und relativ klein (Zellvolumen eines *Escherichia coli* Bakteriums: $2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3$) im Vergleich zu eukaryotischen Zellen (Säugetierzelle ca. $4 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3$). [79]

Bakterien existieren als Einzelzellen (planktonische Zellen), leben aber häufig in komplexen, hoch kommunikativen und strukturierten Verbänden, den **Biofilmen** [79, 80]. Diese schützen die einzelnen Zellen und ermöglichen Bakterien, in diversen Umgebungen zu überleben [81]. *Bacillus subtilis* sind als nicht-pathogene Bakterien ein verbreitetes Modellsystem, um Biofilme zu untersuchen [82]. Sie können sowohl an der Grenzfläche von Luft und Agarose, Luft und Wasser (Pellikula) oder, bei bestimmten Bakterienstämmen, auch submers (an der Grenzfläche flüssig-fest) Biofilme bilden [82]. Die Oberfläche der Biofilme ist meist sehr hydrophob und somit impermeabel für wässrige Flüssigkeiten oder organische Substanzen [82].

In Biofilmen übernehmen Bakterien verschiedene Aufgaben, sind aber genetisch gleich und nicht final zu einem speziellen Typ differenziert und passen sich so den Umgebungsbedingungen an [82]. Sie bilden eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) wie Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA [80]. Die Matrix fungiert u. a. als Radikalfänger für ROS und kann verschiedene Antibiotika binden und neutralisieren [80]. Gleichzeitig kann eine Antibiotikaexposition bei vielen Bakterien die Matrix- oder Biofilmbildung verstärken und durch Differenzieren einer Subpopulation oder Verändern

der Mikroumgebung Resistenzen entwickeln [83]. Der Phenotyp antimikrobiell-sensitiver, planktonischer Zellen kann sich im Biofilmverbund so verändern, dass Bakterien eine **Antibiotikaresistenz** oder -toleranz ausbilden. Anders als bei resistenten Zellen, die trotz antimikrobieller Substanzen ungehindert wachsen, können tolerante Zellen dies in Gegenwart des Wirkstoffes nicht, sterben aber auch nicht [80]. Antibiotika zielen auf aktive biologische Prozesse ab, so dass sie bei Zellen in der stationären Phase, wie sie auch in Biofilmen existieren, nicht wirken [80, 84]. Zusätzlich ist die Wirtktiefe in Biofilmen vermindert [80].

Aus Biofilmen herausgelöste Zellen reagieren i. d. R. wieder auf Antibiotika, so dass das Aufbrechen der Biofilmstruktur eine mögliche Therapie darstellt [84]. Es wurde gezeigt, dass das Spalten der eDNA zu einer verstärkten Eindringtiefe und somit zur Wirkung von Antibiotika führt, die eine Reduktion der Biofilmmasse und Anzahl der CFU (koloniebildende Einheiten, engl. colony forming units) bewirken [85]. Dies ist klinisch relevant, da sich in geschädigtem Gewebe oder an medizinischen Implantaten Biofilme ausbilden können, die eine Entzündung hervorrufen [80].

Der Aufbau **eukaryotischer Zellen** ist komplexer. Das Zytoplasma, das ein Zytoskelett besitzt, besteht aus Zytosol (pH 7,2) – etwa 50 % des Zellvolumens – und verschiedenen membranumschlossenen Lumen (Organellen) mit spezifische Aufgaben. Im Zellkern, in dem sich das Genom befindet, werden Nukleinsäuren hergestellt. Das endoplasmatische Retikulum produziert Membranproteine und Lipide, die von den Golgi-Apparaten an verschiedene Ziele befördert werden. Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zellen. In Lysosomen werden überflüssige, auf endozytotischem Weg dort gelangte Moleküle mit Verdauungsenzymen abgebaut. Intrazelluläre Proteine werden von Sortiersignalen gelenkt, die von Rezeptorproteinen erkannt werden [79]. Der Transport zwischen Zytosol und Zellkern z. B. wird durch Kernporen (NPC, engl. nuclear pore complex) selektiv und bidirektional gesteuert. Kleine Moleküle (bis 50 kDa bzw. $d = 9$ nm) diffundieren hindurch, größere Moleküle (maximal $d = 30$ nm [86]) werden aktiv hindurch transportiert [79]. Kernlokalisierungssequenzen (NLS, engl. nuclear localization sequences), die nur in für den Kern bestimmten Proteinen vorhanden sind, steuern die Selektivität des Kerntransports. [79]

Die **Proliferationsfähigkeit** der meisten Wirbeltierzellen ist begrenzt, da sich ihre Telomere (Chromosomenenden) bei jedem Teilungszyklus verkürzen. Humane Fibroblasten können sich in Kultur 25-40 Mal teilen. Deswegen werden häufig immortalisierte Zelllinien verwendet, die unbegrenzt proliferieren. Zum Immortalisieren kann z. B. ein Gen in Zellen eingebracht werden, das die Telomerase instand hält. Einfacher können Zelllinien aus Tumorzellen gewonnen werden, die oft stark proliferieren, auch ohne Oberflächenanhaftung wachsen, keine Kontaktinhibition (stoppt bei „normalen“ Zellen das Wachstum sobald sie Membranen benachbarter Zellen berühren) haben und in Kultur

sehr eng und auch übereinander wuchern. Häufig ist die Apoptose¹ bei Tumorzellen gehemmt. Können beschädigte Zellen diesen geordneten Prozess nicht mehr einleiten kommt es zur Nekrose². [79]

Anders als bei prokaryotischen Zellen, die Moleküle direkt über die Zellmembran aufnehmen, erfolgt der Transport exogener Makromoleküle in eukaryotische Zellen über ein ausgeklügeltes System. Kleinere Moleküle gelangen durch Diffusion oder mittels Transportproteinen in die Zelle [79]. Makromoleküle oder tote Zellen werden durch **Endozytose** aufgenommen. Sie werden von einem Teil der Plasmamembran umschlossen, die sich erst einstülpt und dann von der Zellmembran abschnürt [79]. Dieser Prozess ist energieabhängig und findet bei einer Temperatur unter 4°C nicht mehr statt [87].

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose (Clathrin-vermittelte Endozytose) binden Makromoleküle an passende Rezeptorproteine, die sich durch Diffusion in der Membran an einer Stelle konzentrieren können. Im Zellinneren bildet sich eine Hülle aus Adapterproteinen und Clathrin [79]. Die Form des Clathrin führt letztlich zur Einstülpung der Zellmembran mit einem minimalen Krümmungsradius von 50 nm [88] und das Vesikel löst sich von der Plasmamembran [79]. Innerhalb von einer Minute geht die Clathrinhülle verloren und es entstehen die frühen Endosomen (FE), in denen das aufgenommene Material sortiert wird [79]. Ein Teil, z. B. die Rezeptoren, wird recycelt, während der Rest nach ca. 5 - 15 Minuten an die späten Endosomen (SE, pH ~ 6) übergeben wird, die sich näher am Nukleus und den Golgi-Kompartimenten befinden. In ihnen beginnt der hydrolytische Abbau. Der pH-Wert sinkt kontinuierlich, während die SE zu Endolysosomen (EL) und Lysosomen (L) (pH 4,5), den Hauptorten der Verdauung, heranreifen und mehr hydrolytische Enzyme von den Golgi-Apparaten erhalten [79, 89]. Unverdaubare Reste verbleiben in den Lysosomen und können durch Exozytose, dem Umkehrprozess der Endozytose, aus der Zelle ausgeschleust werden [79, 90]. Elektronenmikroskopisch unterscheiden sich die verschiedenen Reifestadien: FE besitzen ein helles vakuoläres Lumen, das von einer Membran umschlossen ist. Die Bildung intraluminärer Vesikel beginnt. Reifere Endosomen sind i. d. R. relativ rund und enthalten mehrere dieser Vesikel. Das Lumen von Lysosomen besteht aus Material höherer Elektronendichte und erscheint dunkler. Da EL durch Fusion von SE und Lysosomen entstehen, besitzen sie multilamellare Membranen und viele Vesikel [90].

2.2.2 Nanopartikel als Wirkstofftransporter

NP eignen sich zum Einbringen von Molekülen, da sie für eine zielgerichtete Aufnahme in Zellen optimiert werden können. Je nach Anwendung ist auch die Aufnahme der NP selber erwünscht. Einzubringende Moleküle können dabei entweder von außen an

1 Die Apoptose ist der programmierte Zelltod, der normalerweise dafür sorgt, dass beschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen einen kontrollierten Selbstmord einleiten: Die Zelle schrumpft und wird durch proteolytische Enzyme abgebaut ohne Nachbarzellen zu schädigen. Nach wenigen Stunden können morphologische Änderungen wie Blasenbildung (engl. blebbing) detektiert werden.

2 Bei der Nekrose schwillt die Zelle an, platzt und kann durch Verschütten ihres Inhalts über Nachbarzellen Entzündungen hervorrufen.

die NP konjugiert oder in diesen versteckt werden, um sie vor äußeren Einflüssen zu schützen, bevor sie ihr Ziel erreicht haben [13]. Zusätzlich können mehrere Moleküle parallel eingebracht oder Phänomene der Multi Drug Resistance überwunden werden [13, 91].

Zur Zellmanipulation werden NP unterschiedlicher Materialien (u. a. (an)organisch, polymerbasiert), Formen (u. a. sphärisch, würfel-, stäbchen-, sternförmig), Größen und Oberflächeneigenschaften (u. a. Ladung, Modifizierung z. B. mit Liganden wie Peptiden, Antikörpern oder Aptameren) eingesetzt [13, 78]. Diese physikochemischen Eigenschaften beeinflussen die Größe, ihre Interaktionsfläche mit der Zellmembran, – im Zusammenspiel mit dem Zelltyp – die **Aufnahme** (i. d. R. über Endozytose) und ihren intrazellulären Verbleib [13, 78, 92–94].

Elektrostatische Anziehungskräfte erhöhen die Adhäsion der NP an der Zellmembran, wobei die Adhäsionskraft größerer NP meist stärker ist. Ist diese stark genug, um die Membran zu krümmen, werden die NP umhüllt und schließlich aufgenommen [93, 95, 96]. NP mit positivem Zetapotential können stärker mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren und so ihre Aufnahme beschleunigen [88, 94]. Hydrophobe, nicht geladene NP interagieren kaum mit der Membran [93]. Sphärische NP mit $d = 50 - 60$ nm haben die optimale Größe zur Aufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose und akkumulieren so verstärkt in der Zelle. Wegen begrenzter Verfügbarkeit der Rezeptoren werden größere NP langsamer oder nur teilweise von der Membran umhüllt. $NP < \sim 40$ nm haben eine zu geringe Adhäsionsenergie, können ihre Aufnahme durch Clustern aber erleichtern [88, 92, 97]. Bei Interaktion mit einem biologischen System kann sich in < 30 Sekunden eine Korona aus Biomolekülen (z. B. Serumproteinen) um die NP bilden [98–100]. Da für verschiedene Moleküle mehr Rezeptoren bereitstehen, kann dies die NP-Aufnahme verstärken [94].

Wie lange die Aufnahme dauert, hängt ab von der benötigten Energie und der Geschwindigkeit, mit der eine für die Endozytose ausreichende Zahl an Rezeptoren durch die Membran zur richtige Stelle diffundieren kann. Sind zu wenig Rezeptoren verfügbar, wird die NP-Aufnahme verlangsamt und kann nach anfänglichem Anstieg ein Plateau erreichen [87, 92, 97]. Die Exozytose kann diesen Prozess stützen oder gar zur Verringerung der intrazellulären NP-Anzahl führen. Kleinere NP gelangen schneller und in größerer Anzahl aus der Zelle als größere, da sie weniger mit Rezeptoren interagieren [92]. Werden die NP nicht exozytiert, verbleiben sie in der Zelle, da sie nicht abgebaut werden können [13, 91].

Neben der Funktionalisierung [101] kann die Wahl der **Liganden** die NP-Aufnahme durch die Zelle erhöhen oder, durch Binden an spezifische Zellen, für eine selektive Aufnahme in gemischten Zellkulturen sorgen [102, 103]. Liganden sind u. a. die aus einer kurzen Peptidsequenz bestehenden CPP [104–108], die für diese Arbeit verwendet wurden (Kapitel 4). Sie können größere Moleküle schnell in Zellen schleusen ohne zytotoxisch zu wirken oder die Zellmembran signifikant zu schädigen, da sie natürliche Aufnahmemechanismen wie Endozytose und direktes Penetrieren (abhängig von der

genauen Peptidsequenz) nutzen [104, 109]. Sie sind allerdings nur in wenige Fällen zelltypspezifisch, obwohl das Targeting subzellulärer Strukturen z. B. mit NLS möglich ist [103]. Obwohl NLS i. d. R. zur Akkumulation im Zellkern führen, ist dies nicht immer der Fall und hängt von CPP und Zelltyp ab [108–111]. Werden die CPP mit den einzubringenden Molekülen oder NP über Endozytose aufgenommen, müssen sie eine weitere Barriere – die Endosomenmembran – überwinden, um ihren Wirkort zu erreichen und nicht nur in den Endosomen zu akkumulieren [89, 110, 111].

Um ihr Ziel zu erreichen, müssen die Moleküle aus den Endosomen gezielt freigesetzt werden, bevor sie in ihnen abgebaut werden [89, 109]. Das **Öffnen der Endosomen** kann selbstinduziert sein oder extern ausgelöst werden. Zu ersterem zählen Mechanismen, die die Endosomenmembran mittels spezifischer Enzyme oder durch den veränderten pH-Wert permeabel machen [13, 112–115]. Extern kann die Endosomenmembran durch Strahlung, (Laser-)Licht (mittels photoinduzierter Radikale oder Erwärmen) [112, 116, 117], magnetische Wechselfelder (Interaktion mit magnetischen NP, Wärmeeintrag) oder Ultraschall (mechanisch) [118] durchbrochen werden [115]. Wie die Interaktion von NP mit Laserstrahlung zum Überwinden einer Membran führt, wird in Abschnitt 2.3 beschrieben.

Die Eigenschaften der NP beeinflussen auch deren **Zytotoxizität**. Obwohl Gold als Festkörper chemisch inert ist, besitzen AuNP durch ihre große und bioaktive Oberfläche großes Oxidationspotential [91, 119, 120]. Da zu viele Faktoren die Reaktivität der NP mit biologischen Materialien beeinflussen, um eine generelle Aussage treffen zu können, wird ihre Biokompatibilität in der Literatur kontrovers diskutiert [120–122] und muss fallweise untersucht werden. Grob zusammengefasst führen längere Wechselwirkungszeiten und höhere Konzentrationen ($> 10^{12}$ NP/mL) zu stärkeren Zellschädigungen wie der verstärkten Bildung von Vakuolen [122, 123]. Viele NP beeinflussen durch ihr intrazelluläres Volumen auch die Morphologie und das Zytoskelett von Zellen [119]. Sehr kleine AuNP ($d < 4\text{--}5$ nm) können in den Zellkern gelangen und dort durch Interkalieren mit der DNA toxisch wirken [119]. AuNP mit $d = 1,4$ nm sind stark zytotoxisch, da sie perfekt in die Gruben der DNA passen [121, 124]. Größere AuNP (bis 100 nm) gelten i. d. R. als weniger toxisch [123]. Zudem bilden Zellen chemisch aktive, sauerstoffhaltige Moleküle, die ROS, wenn sie umweltbedingtem Stress wie bei der Interaktion mit NP ausgesetzt sind. Mit vorübergehenden, kleineren ROS-Mengen können Zellen umgehen größere dauerhafte Exposition führt jedoch zu Schädigungen bis hin zum Zelltod [119].

Die **Interaktion von NP mit Biofilmen** ist weniger erforscht, wird aber ebenfalls durch die Eigenschaften der NP und das Umgebungsmedium beeinflusst. Sobald NP an die EPS-Matrix gebunden haben, gelangen sie durch Diffusion weiter in den Biofilm [125–127]. Die Diffusionsgeschwindigkeit hängt von der Größe der NP sowie der Poren des Biofilms, der Hydrophobizität des Mediums und dem chemischen Gradienten innerhalb des Biofilms ab [126]. Die negativ geladene Biofilmmatrix führt zu einer stärkeren Bindung von kationischen NP [125, 128], die dadurch effizienter als andere in den Biofilm penetrieren können [127]. Hydrophobe NP verteilen sich gleichmäßiger als ihre

hydrophilen Pendants [127]. Bislang wurde insbesondere die antimikrobielle Wirkung (= Toxizität) von NP aus Silber, Kupfer oder Metalloxiden auf Biofilme genutzt, um u. a. Prothesen und Implantate mit diesen Materialien zu beschichten [129, 130]. Durch entsprechende Funktionalisierung der Oberfläche können wenig toxische NP ebenfalls genutzt werden, um gezielt an die EPS-Matrix oder die Zellen zu binden und so Enzyme oder Antibiotika einzubringen [127].

2.2.3 Auswirkung der Bestrahlung von Zellen mit Lasern

Die Interaktion von Zellen mit Laserstrahlung hängt von den Laserparametern, den optischen Eigenschaften der Zellen sowie der Wärmekapazität und -leitfähigkeit des Mediums ab [64]. Durch Absorption werden thermische Effekte in Zellen analog zu denen der Wechselwirkung von Lasern mit AuNP (2.1.3) induziert und Zellen transient oder permanent geschädigt. Dazu werden höhere Energieeinträge als bei AuNP oder zusätzliche Absorber wie z. B. Farbstoffe [6] benötigt, da Wasser Hauptbestandteil von Zellen ist und wie die anderen Zellbestandteile weniger Energie pro Volumen absorbiert als Gold. Im diagnostischen Fenster (600 - 1200 nm) ist die Absorption verhältnismäßig gering und somit die Eindringtiefe von Laserstrahlung in biologisches Gewebe besonders hoch [64, 131]. Bei verschiedenen Laserleistungen werden unterschiedliche Wechselwirkungszeiten, die im Wesentlichen der Einstrahlungs- bzw. Pulsdauer entsprechen, benötigt, um einen Effekt zu induzieren. Charakteristische Energiedichten sind dabei 1 - 100 J/cm² [64, 131].

Photochemische Effekte entstehen bei Einstrahlung mit cw-Lasern oder Wechselwirkungszeiten > 1 Sekunde mit Bestrahlungsstärken im Bereich von 1 W/cm² [64]. Es entstehen z. B. freie Radikale wie ROS, die Zellen schädigen [132]. Dies wird u. a. in der photodynamischen Therapie (PDT)¹ genutzt [64]. Sehr geringe Bestrahlungsstärken können aber auch das Zellwachstum stimulieren und so z. B. die Wundheilung oder das Wachstum von Stammzellen beschleunigen [64, 133]. Allerdings sind die Ergebnisse umstritten und hängen außer vom Zelltyp von der verwendeten Wellenlänge (i. d. R. > 600 nm) ab [64, 133]. Zudem können photochemische Effekte chemische Verbindungen generieren und Moleküle vernetzen [132].

Bestrahlung mit 10 - 10⁶ W/cm² zwischen 1 ms und 1 min induziert **thermische Effekte**, deren Auswirkungen je nach Temperatur bis zur Nekrose reichen [64, 131]. Je höher die generierte Temperatur, desto schneller ist die Schädigung irreversibel [64]. Temperaturen > 42°C führen zu Konformationsänderungen und > 60°C zum Denaturieren von Molekülen (u. a. Proteinen, Lipiden, Kollagen) und somit zur Koagulation. Bei Temperaturen > 100°C kommt es zum Verdampfen und zur Ablation bis zum Karbonisieren des Materials [64, 131]. Durch Wärmetransfer innerhalb des Mediums (s. 2.1.3)

1 Bei der PDT werden Photosensibilisatoren (Katalysatoren = Chromophore, die durch Bestrahlen chemische Reaktionen auslösen) in die Zellen gegeben, um die chemischen Effekte zu verstärken. Durch Bestrahlen kommt es nur an den Orten des Sensibilisators zu oxidativen Effekten, welche die Zellen irreversibel schädigen und zu ihrem Tod führen [64].

werden auch angrenzende Bereiche außerhalb des Laserfokus erwärmt oder thermisch geschädigt [132].

Bei der **Photoablation** ($10^7 - 10^{10} \text{ W/cm}^2$, $\tau_{\text{Puls}} = 1 \text{ ns} - 1 \mu\text{s}$) werden hochenergetische Photonen, vor allem von UV-Lasern, absorbiert, dadurch Molekülbindungen aufgebrochen und Material abladiert [64, 132]. Es entstehen keine nekrotischen Schädigungen [131].

Ultrakurze Pulse ($\tau_{\text{Puls}} < 1 \text{ ns}$) und höhere Leistungsdichten ($10^{10} - 10^{13} \text{ W/cm}^2$) können in für Laserstrahlung normalerweise transparenten Medien zu nichtlinearer Absorption, der **Multiphotonenabsorption**, und zum sogenannten **optischen Durchbruch** führen [131, 134]. Durch gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen werden Elektronen ins Kontinuum angeregt und induzieren durch Multiphotonen- oder Tunnelionisation große freie Elektronendichten. Die freien Elektronen können weitere Photonen linear absorbieren und durch Stöße mit anderen Atomen weitere freie Elektronen generieren (inverse Bremsstrahlung) [64, 134]. Durch diese Kaskadenionisation steigt die Anzahl freier Elektronen schnell an [64, 135]. Übersteigt sie eine kritische Dichte von 10^{21} cm^{-3} kann sich ein **Plasma** bilden, welches auch einige ns nach Pulsende noch existiert, bis die freien Elektronen aus dem Fokus diffundiert sind [64, 65]. Durch den schlagartigen, adiabatischen Anstieg der Temperatur expandiert das Plasma. Dabei wird eine **Schockwelle** ausgesendet, die nach 30 - 50 ns auf die Geschwindigkeit einer akustischen Welle verlangsamt ist. Zusätzlich kann durch das Verdampfen von Material 50 - 150 ns nach dem Laserpuls eine **Kavitationsblase** entstehen, die einige Male auf- und zuschwingt [64]. Bereits nach dem ersten Schwingungszyklus hat sie 84 % ihrer Energie verloren [67]. Während des Kollabierens in der Nähe einer Grenzfläche kann zudem ein **Wasserjet** entstehen [64]. Diese Effekte können biologisches Material mechanisch schädigen.

Bei ns-Pulsen bilden nur Bestrahlungsstärken oberhalb des Grenzwertes für den optischen Durchbruch freie Elektronen, welche die Kaskadenionisation initialisieren und ein hochionisiertes Plasma erzeugen können [65]. Bei kürzeren Pulsen kann sich bereits unterhalb der Schwelle für den optischen Durchbruch ein sogenanntes „**low-density-plasma**“ ausbilden, da die Multiphotonenabsorption dominiert. Dadurch ist immer eine ausreichende Anzahl freier Elektronen im Fokusbereich verfügbar, um die Kaskadenionisation zu initiieren [65]. Außerdem sind bei kürzeren Interaktionszeiten die thermomechanischen Schädigungen reduziert, da die Wärmeleitung während dieser Zeitskala vernachlässigt werden kann und der Großteil der Energie zum Verdampfen des Mediums im Plasmavolumen benötigt wird. Somit sind maximaler Druck und Geschwindigkeit des Plasmas bzw. der induzierten Blase ebenfalls geringer. Dadurch können Schädigungen des Materials lokal begrenzt und die Effekte zur gezielten **Photodisruption** verwendet werden [64, 131, 132, 136].

2.2.4 Optische Verfahren zur Manipulation von Zellen

In der **Nanochirurgie** wird die plasmainduzierte Ablation genutzt, um subzelluläre Strukturen wie Organellen oder Chromosomen hochpräzise (unterhalb des Beugungslimits) mit Schnitten unter 200 nm zu versehen ohne den Rest der Zelle zu schädigen.

Häufig werden dafür stark fokussierte fs-Laser im NIR genutzt, da diese nur im Fokusbereich absorbiert werden [137–140]. Weiter ist es möglich durch Lasereinstrahlung zwei Zellen zu fusionieren [141]. Wird mit dem Laser die Zellmembran perforiert, kann exogenes Material in die Zelle diffundieren. Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten die Membran transient zu öffnen.

Mit der **Optoinjektion** können einzelne Zellen – auch empfindlichere Primär- und Stammzellen – gezielt und kontaktlos manipuliert werden [142, 143]. Ein auf die Zellmembran fokussierter Laser perforiert diese, so dass extrazelluläres Material in die Zelle diffundieren kann. Es werden ca. 40 % des Zellvolumens ausgetauscht, bevor die Perforation durch die Zelle wieder verschlossen wird [144–146]. So transfizierten Tsukakoshi et al. mit einem gepulsten Laser ($\lambda = 355 \text{ nm}$, $\tau_{\text{Puls}} = 5 \text{ ns}$) 0,6 % der Zellen [2]. Mit verschiedenen Parametern konnten höhere Effizienzen erzielt und gleichzeitig eine hohe Zellviabilität gewährleistet werden [144, 146, 147]. Hosokawa et al. zeigten, dass die Transfektionseffizienz gesteigert werden kann, wenn neben der Zell- auch die Kernmembran perforiert wird [148].

Um mehrere Zellen gleichzeitig zu manipulieren, wird bei der **Optoporation** eine Energiedichte verwendet, die gezielt eine Schockwelle im Medium generiert. Deren Druck schädigt Zellen in der Nähe des Laserfokus irreversibel. In einem gewissen Abstand zum Fokus werden die Zellen erfolgreich temporär permeabilisiert [145, 149, 150]. Die Perforationseffizienz ist ähnlich der der Optoinjektion, allerdings ist die Gesamtviabilität geringer, da die Zellen im Zentrum des Laserfokus sterben [134, 149].

Mit einem weniger stark fokussierten Laser ermöglicht die **Laserfektion** die zeitgleiche Manipulation mehrerer Zellen mit hoher Viabilität. Die Energiedichte des Lasers darf nicht zu hoch sein, um die Zellen nicht irreversibel zu schädigen [134, 150]. Die Zugabe absorbierender NP zu den Zellen erlaubt ihre Perforation mit hohem Durchsatz, gezielterem Targeting und die Verwendung niedrigerer Laserleistungen.

2.3 Goldnanopartikel und -strukturen für die laserbasierte Zellmanipulation

Durch Wechselwirkung von Laserstrahlung mit Goldnanostrukturen (s. Abschnitt 2.1) entstehen in wässrigen Medien Effekte (s. Abschnitt 2.1.3), die Zellschädigungen analog der ausschließlich durch Laserbestrahlung induzierten verursachen (s. Abschnitt 2.2.3). Da Gold EM Strahlung stärker als Wasser und somit als Zellen absorbiert, sind die für Zellmanipulationen mit Goldnanostrukturen benötigten Laserparameter anders und hängen von den optischen Eigenschaften der verwendeten Strukturen ab (s. Abschnitte 2.1.1, 2.1.2). Für die Perforation können Energiedichten genutzt werden, die ohne AuNP keine Auswirkungen auf die behandelten Zellen haben. Nur in unmittelbarer Nähe der AuNP kommt es zu hoch lokalisierten Schädigungen wie der selektiven Denaturierung von Proteinen [11]. Bei entsprechender Parameterwahl können die induzierten Effekte gezielt zum Tod einzelner Zellen führen [11]. Im Vergleich zu den rein laserbasierten Methoden ist mit AuNP gezielteres Targeting der Zellen bei gleichzeitig hohem Durchsatz möglich [145].

Um exogene Moleküle einzuschleusen, werden sie zu den AuNP ins extrazelluläre Medium gegeben, damit sie durch die perforierte Membran ins Zytoplasma diffundieren [9, 151]. Alternativ können die einzubringenden Moleküle direkt an die AuNP oder deren Liganden konjugiert und nach Aufnahme in die Zellen durch Laserbestrahlung freigesetzt werden. Hohle Nanostrukturen können die Moleküle einkapseln und erst am Zielort durch Laserbestrahlung intrazellulär freisetzen [13]. Ferner können photothermische Effekte zum thermischen Deaktivieren von Enzymen [58] oder zum Aktivieren von thermosensitiven Zytokinen, um z. B. murine Karzinome zu behandeln, genutzt werden [152].

Zudem können die Nanostrukturen in der Theranostik (Therapie + Diagnostik) eingesetzt werden. Hier dienen NP mit einzigartigen optischen oder magnetischen Eigenschaften als Kontrastverstärker in bildgebenden Verfahren wie CT (Computertomographie), SERS (oberflächenverstärkte Raman-Streuung, engl. Surface-Enhanced Raman Scattering) oder Multiphotonenmikroskopie (s. 4.2). Gleichzeitig ermöglichen sie Zellmanipulationen mittels Strahlen-, Chemo-, photothermischer oder photodynamischer Therapie [13, 153–157].

2.3.1 Laser-Partikel-Wechselwirkungssysteme

Viele Anwendungen zum Perforieren oder Zerstören von Membranen basieren auf der Interaktion **sphärischer AuNP** mit Laserstrahlung. Ziel ist, exogene Moleküle einzuschleusen bzw. freizusetzen oder – bei entsprechender Wahl der Parameter – ganze Zellen zu zerstören. Krpetic et al. nutzen photochemische Effekte, um subzelluläre Strukturen aufzubrechen oder den Zelltod herbeizuführen. Das Bestrahlen von mittels Endozytose aufgenommener AuNP (15 nm) mit einem cw-Laser ($\lambda = 514 \text{ nm}$, 20 W/cm^2 , 1 min) führte zu einem Temperaturanstieg um 1°C . Dies reichte, um einen deutlichen Anstieg der ROS zu detektieren und die Membran der Endosomen aufzubrechen. Höhere Laserleistungen (55 W/cm^2 , 2 min) führten zum Zelltod, obwohl der Temperaturanstieg mit 4°C deutlich unter dem anderer Veröffentlichungen lag [117]. Minai et al. beobachteten auch bei Interaktion ultrakurzer Pulse (50 fs) mit AuNP das Entstehen von ROS, die zum Zelltod führten. Die Anzahl der getöteten Zellen konnte durch Zugabe von Ascorbinsäure auf das Ausmaß von ohne AuNP bestrahlten Zellen reduziert werden [158]. Huang et al. zeigten, dass Temperaturen um 75°C Zellen photothermisch zerstören können. Sie erreichten diese Temperatur bei 40 nm Antikörper-konjugierten AuNP mit 19 W/cm^2 (4 min) bzw. ohne AuNP mit 104 W/cm^2 [159].

Durch die geringere Wechselwirkungszeit mit gepulsten Lasern berechneten Pitsillides et al. bei 30 nm AuNP mit $0,5 \text{ J/cm}^2$ ($\tau_{\text{Puls}} = 20 \text{ ns}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$) einen lokal beschränkten Wärmeeintrag von bis zu 2500 K. Dadurch konnten sie auf Basis photothermischer Effekte selektiv Proteine ausschalten oder die Membran von Zellen vorübergehend öffnen, so dass membranimpermeable Moleküle in die Zelle gelangten. Mit Laserfluenzen, bei denen sich Kavitationsblasen ausbilden, kommt es zum Zelltod [7]. Yao et al. untersuchten mit 15 nm und 30 nm AuNP die Effizienz der Membranperforation bei verschiedenen

Pulsenergien (Laser: $\tau_{\text{Puls}} = 20 \text{ ns}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$). Sie konnten in bis zu 68 % der Zellen erfolgreich 10 kDa FITC-Dextrane einbringen (30 nm AuNP, 5 Pulse mit 15 mJ). Bei höheren Laserenergien stieg der Anteil toter Zellen. Durch Induzieren von Temperaturen bis zu 3600 K vermuten sie das Entstehen von Blasen als Ursache der lokalisierten Permeabilisierung [8].

Um viele Zellen effizient zu perforieren, scannten Heinemann et al. den Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$, 20,25 kHz, $\tau_{\text{Puls}} = 0,85 \text{ ns}$) über Zellen an deren Membran 200 nm AuNP angelagert waren. Durch Bestrahlen mit 20 mJ/cm^2 transfizierten sie bis zu 88 % der Zellen mit siRNA. Sie ermittelten, dass sich die AuNP dabei auf 650 K erwärmten und es zur Multiphotonenabsorption kam [9]. Ähnliche Effizienzen (90 %) erzielten Schomaker et al. im NIR ($\lambda = 796 \text{ nm}$; $\tau_{\text{Puls}} = 120 \text{ fs}$) – außerhalb des Resonanzmaximums sphärischer AuNP. Bei diesen Laserparametern werden vermutlich Partikelcluster benötigt, um Feldverstärkungen zu erzielen, die mittels Multiphotonenabsorption einen optischen Durchbruch induzieren [160]. Sie fanden zudem, dass mit 40 fs-Pulsen Kavitationsblasen bereits mit niedrigeren Bestrahlungsdichten als mit 1 ps-Pulsen (beide: $\lambda = 800 \text{ nm}$) induziert werden. Die Lebensdauer der mit dem fs-Laser generierten Blase ist für $155\text{--}440 \text{ mJ/cm}^2$ nahezu konstant bei um die 500 ns, wohingegen sie für den ps-Laser mit höheren Fluenzen ansteigt [151]. Vorteil im NIR ist wegen der geringen Absorption der niedrige Wärmeeintrag, der die Zellen weder direkt noch indirekt durch mögliche Partikelfragmente schädigt und so eine geringe Zytotoxizität impliziert [161]. Das Einbringen von Molekülen wird durch deren Größe sowie die der Zellen limitiert. Die negative Ladung von DNA erschwert ihre Aufnahme und verringert die Transfektionseffizienz [162]. Neben ausführlichen Parameterstudien an Zelllinien stellten beide erste Perforationsergebnisse für Primärzellen vor [160, 163].

Durch Applikation mehrerer Pulse, z. B. bei scannenden Verfahren, und willkürlich angeordnete AuNP können sich thermische Effekte akkumulieren oder aufeinander folgende Blasen miteinander wechselwirken und so Zellen stärker schädigen [56]. Die **Interaktion mehrerer AuNP** verringert die Schwellfluenz zum Entstehen von Blasen. Das nutzten Zharov et al., um Zellen irreversibel zu zerstören, indem sie Antikörperkonjugierte AuNP (40 nm) – idealerweise mit einem Abstand von 1–1,6 μm zueinander – selektiv an die Membran anvisierter Zellen anlagerten und mit $0,5 \text{ J/cm}^2$ ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $\tau_{\text{Puls}} = 12 \text{ ns}$) bestrahlten [164]. Auch die Anzahl der CFU gram-positiver *Staphylococcus aureus* Bakterien konnten sie mit diesem Ansatz durch Bestrahlen mit 3 J/cm^2 signifikant verringern [165]. Jedoch fehlt eine genaue Beschreibung der Untersuchung der Viabilität.

Lukianova-Hleb et al. nutzten mit spezifischen Antikörpern konjugierte AuNP und Wirkstoffe, die gemeinsam an Zielzellen selektiv agglomerierten und endozytiert wurden. Das Bestrahlen der Partikelagglomerate induzierte Blasen, die bei entsprechenden Parametern neben dem Zelltod zum Aufreißen der Membran und Freisetzen des Inhalts von Liposomen und Endosomen führten [156, 166, 167]. Durch die Antikörper akkumulieren die AuNP vorwiegend in Tumorzellen, so dass nur dort eine für die Blasenbildung notwendige Anzahl AuNP vorliegt [157]. Die Wirksamkeit von so eingebrachtem Doxil

(Zytostatikum) erhöhte sich um das 31fache, so dass niedrigere Dosen benötigt und die unspezifische Toxizität in anderen Zellen verringert wird. Das unmittelbare Freisetzen der gesamten Wirkstoffmenge ermöglichte auch die Behandlung resistenter Zellen [167]. Zudem kombinierten sie ihre Methode mit Röntgenstrahlen, deren Wirkung ebenfalls durch die akkumulierten AuNP verstärkt wird, und zeigten die Behandlung von Maustumoren *in vivo* [157]. Gleichzeitig nutzen sie die Visualisierung der Blasen zur Diagnostik *in vitro* und *in vivo* [156].

2.3.2 Weitere auf plasmoneninduzierten Effekten basierende Ansätze

Außer den bisher beschriebenen Nanostrukturen werden zum Einschleusen von Molekülen weitere auf plasmoneninduzierten Effekten basierende Ansätze erforscht.

Mit zellspezifischen Peptiden funktionalisierte **Goldnanoschalen** (engl. hollow gold nanoshells) können endozytiert und an sie konjugierte Moleküle durch Bestrahlen mit ihrer Resonanzfrequenz von 800 nm thermisch abgelöst werden. Gleichzeitig entstehen Blasen, die die Endosomen aufbrechen und ihren Inhalt ins Zytoplasma freilassen. Dadurch ist ein zeitlich und räumlich gezieltes Einbringen von Molekülen möglich [168–170]. Huang et al. konnten so 85% der Zellen mit siRNA transfizieren ($\tau_{\text{Puls}} = 120$ fs, 1 kHz, $2,4 \text{ W/cm}^2$, 10 s). Eine ähnliche Effizienz erzielten sie mit der zehnfachen Menge siRNA in der Positivkontrolle mit Lipofektamin [169].

Goldnanokäfige (engl. gold nanocages) mit Polymeren, die sich beim Erwärmen zusammenziehen und so Lücken in der Käfigwand freigeben, können mit Molekülen beladen werden. Sie bleiben eingeschlossen bis sie durch Bestrahlen mit einem NIR-Laser über photothermische Effekte an ihrem Wirkort freigegeben werden. Yavuz et al. gelang es so, mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin gezielt Brustkrebszellen zu töten [171]. Wie bei sphärischen AuNP können auch die plasmoneninduzierten Effekte an den Nanokäfigen zum direkten Zerstören von Zellen genutzt werden [172].

Strukturierte Oberflächen besitzen das Potential, Zellen ohne möglicherweise toxische Goldrückstände zu manipulieren. Wu et al. generierten durch Schmelzen einer dünnen Goldschicht mittels Laserbestrahlung ($\tau_{\text{Puls}} = 6$ ns, $\lambda = 532$ nm, 10 Hz) immobilisierte AuNP inhomogener Größenverteilung. Durch Bestrahlen mit demselben Laser mit 84 mJ/cm^2 bildeten sich Blasen, mit Hilfe derer, bei einer Zellviabilität von 86 %, in 58 % der auf den AuNP gewachsenen HeLa Zellen Calcein eingebracht werden konnte [173]. Die Perforationseffizienz für HEK293T Zellen war mit 98 % ($n = 1$) höher [173]. Wu et al. beobachteten mit zunehmender Anzahl applizierter Pulse weniger Blasen [173], so dass intrazelluläre Goldfragmente nicht ausgeschlossen werden können. Courvoisier et al. nutzten symmetrisch angeordnete, hohle Goldpyramiden ohne Spitzen, an denen das Feld durch Bestrahlen mit fs-Pulsen im NIR bis zu 100fach verstärkt werden kann. Dadurch reichen $6,6 \text{ mJ/cm}^2$, um Calcein erfolgreich in HeLa Zellen einzuschleusen [174]. Ob sich bei diesen Parametern Blasen bilden, welche die Pyramiden schädigen [175] und so ggf. Goldfragmente in die Zellen gelangen, ist unklar.

Bei den bisher vorgestellten Verfahren gelangen die einzubringenden Moleküle passiv, z. B. durch Diffusion, ins Zellinnere. Durch ihre geringere Diffusionsgeschwindigkeit ist die Anzahl größerer Moleküle, die während der Membranöffnung in die Zelle gelangen, geringer [173]. Durch **aktiven Molekültransport** brachten Wu et al. größere Moleküle, Kugeln bis zu $2\mu\text{m}$ und ganze Bakterien in Säugetierzellen ein. Dazu nutzen sie eine Silikonstruktur mit Nanoporen, die zur Hälfte mit einer dünnen Titanschicht ausgekleidet waren. An deren Rändern kam es wie bei Gold zu plasmonischen Effekten. Laserinduzierte Kavitationsblasen perforierten die Membran von auf der Struktur wachsenden Zellen und ein extern angelegter Druck katapultierte die einzubringenden Moleküle aus einem Reservoir unterhalb der Struktur in die Zellen [176]. Yuan et al. nutzten zwei Goldnanoscheiben als Absorber, an denen durch Bestrahlen Kavitationsblasen generiert wurden. Die Phasen ihrer Schwingungszyklen wurden so variiert, dass sie asymmetrisch kollabierten, einen Jet bildeten, der die Zelle perforierte und Moleküle in sie einbringen konnte [177, 178]. Ein solcher Jet induziert in der Zellmembran Poren zwischen 200 nm und $2\mu\text{m}$ [179].

Die dargestellten Methoden zeigen eine Auswahl der vielfältigen Verfahren zum Manipulieren von Zellen mittels der Wechselwirkungen von Laserstrahlung und Goldnanopartikeln bzw. -strukturen. Laser im sichtbaren Wellenlängenbereich eignen sich besonders zum Anregen des Resonanzmaximums sphärischer NP. Dieses lässt sich durch andere Partikelformen auch ins NIR verschieben und ermöglicht so größere Eindringtiefen in biologisches Gewebe. Abhängig von der Einstrahlungsdauer werden insbesondere photothermische Effekte und induzierte Blasen und Druckwellen verwendet, um Zellen zu manipulieren. Die applizierte Laserenergiedichte beeinflusst deren Auswirkungen auf die Zellen und liegt bei den meisten Methoden im Bereich von mJ/cm^2 . Zum gezielten, selektiven Einbringen von Molekülen werden lediglich lokale, reversiblen Schäden induziert ohne dabei die Lebensfähigkeit der Zellen signifikant zu verringern. Mit höheren Energien oder Einwirkungsauern eignen sich die meisten Systeme gleichzeitig zum gezielten Zerstören von Zellen. In den folgenden Kapiteln werden drei neuartige Verfahren dargestellt, die mit AuNP, AuNP-Agglomeraten und Goldnanostrukturen Zellen manipulieren können.

Neuartige Ansätze für die laserbasierte Manipulation
von Zellen mit Hilfe plasmoneninduzierter Effekte

Krawinkel, J.

2017, XVI, 157 S. 49 Abb., 12 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-17706-5