

Halbleiter-Quantenpunkte als biologische Imaging-Substanzen**

Mark Green*

Stichwörter:

Bioanorganische Chemie · Cadmium · Imaging-Substanzen · Lumineszenz · Quantenpunkte

Hochwertige, in Lösung gezüchtete Nanomaterialien, die unter Beibehaltung ihrer Photolumineszenz wie typische Reagentien gehandhabt werden können, haben in jüngster Zeit besonders in der Biologie neue Anwendungen gefunden. Die Organometallchemie lieferte Synthesewege zu widerstandsfähigen, monodispersen, stark emittierenden Nanomaterialien wie CdSe, die anschließend zur elektronischen Passivierung der Oberfläche mit einer ZnS-Schicht bedeckt werden können. Die richtige Auswahl von Struktur, Bedeckungsmittel und Wachstumstemperatur kann Materialien mit Quantenausbeuten von bis zu 90 % liefern. Eine Abstimmung der emittierten Wellenlänge (und damit der beobachteten Farbe) innerhalb des sichtbaren Spektrums gelingt routinemäßig durch die Veränderung der Teilchengröße beim Wachstum. Das Emissionsprofil kann durch selektive Ausfällungsverfahren verschmälert werden, um eine Kreuzkopp lung von Signalen bei Mehrfarben-Anwendungen auszuschließen. Eine einzige Quelle kann zahlreiche Farbemissionen anregen und ermöglicht damit Multiplexing (mehrere Datenströme aus einer einzigen Anregungsquelle); die Materialien sind anders als herkömmliche Farbstoffe äußerst photostabil. We-

gen der hohen Lumineszenz-Lebensdauer können lebende Zellen ohne die Störung durch Hintergrund-Eigenfluoreszenz abgebildet werden.

Kürzlich berichteten Kim et al. über einen entscheidenden Fortschritt beim Krebs-Imaging.^[1] Kern-Schale-Materialien aus CdSe/ZnS sind hier bereits sehr effektiv, können aber auch durch ähnliche Substanzen ersetzt werden: Die als Typ-II-Quantenpunkte (quantum dots, QDs) bezeichneten CdTe/CdSe-Nanopartikel weisen eine andere Energiedifferenz zwischen Kern und Schale auf und emittieren im nahen Infrarotbereich. Die Teilchen wurden aus metallorganischen Ausgangsmaterialien hergestellt, und das während der Synthese abgeschiedene Bedeckungsmittel wurde gegen einen oligomeren, wasserlöslichen Phosphan-Liganden ausgetauscht. QDs mit einem Kerndurchmesser von 10 nm im festen Zustand (bestimmt mit Transmissions-Elektronenmikroskopie, TEM) wiesen einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 15 und 20 nm auf – wegen dieser Eigenschaft eignen sich die Partikel hervorragend zur Speicherung in Wächter-Lymphknoten (sentinel lymph nodes, SLNs).^[1] Eine 30-minütige Inkubation der QDs im Serum bei 37 °C führte nur zu einer geringen Abnahme der Emissionsintensität; das IR-emittierende Material sollte daher ein geeigneter Marker sein. Die QDs wurden bereits bei der Kartierung des Lymphsystems, einem wichtigen Verfahren bei Krebsoperationen, eingesetzt: Nach einer intrakutanen Injektion der QDs in die Pfote einer Maus konnten die im nahen IR-Bereich emittierenden QDs innerhalb von Minuten im lymphatischen System mithilfe eines intraoperativen Imaging-Systems nachgewiesen

werden. Bei der Injektion in ein größeres Tier (400 pmol in ein 35 kg schweres Schwein) konnte der Chirurg die QDs ca. 1 cm unter der Haut in Echtzeit bis zu den Wächter-Lymphknoten verfolgen. Die visuelle Führung durch die QD-Spur ermöglichte dem Chirurgen, die Größe aller erforderlichen Einstiche zu minimieren. Die QDs sammelten sich am äußersten Rand der Wächter-Lymphknoten. Das Imaging von Wächter-Lymphknoten in Echtzeit ohne die Verwendung eines herkömmlichen blauen Farbstoffs oder radioaktiven Markers ist ein bedeutender Durchbruch. Dank der Stabilität der QDs (verglichen mit den üblicherweise instabilen IR-emittierenden Farbstoffen) kann ein Chirurg sogar noch postoperativ beliebige Stellen untersuchen, um die erfolgreiche Entfernung der Lymphknoten zu gewährleisten. Bisher sind QDs bereits in niedriger Dosis angewendet worden, man könnte sie jedoch wegen ihrer hohen Stabilität wahrscheinlich auch in einer mindestens hundertfach niedrigeren Dosis einsetzen.

Chan und Nie sowie Bruchez et al. veröffentlichten wegweisende Arbeiten über das QD-Bioimaging.^[2,3] Der entscheidende Schritt beim Einsatz von in organischen Lösungsmitteln hergestellten QDs ist ein erfolgreicher Phasenübergang zu Wasser bei minimalem Emissionsverlust unter Erhaltung der bioaktiven Oberfläche. Bruchez et al. ließen dazu eine Siliciumdioxid-Schale um die CdSe/ZnS-Nanopartikel wachsen und verknüpften mit dieser Schale Liganden, die für Kupplungsreaktionen genutzt wurden. Die resultierenden Materialien (die weiterverarbeitet eine maximale Quantenausbeute von 21 % zeigten)

[*] Dr. M. Green

Department of Physics
King's College London
The Strand, London WC2R 2LS (Großbritannien)
Fax: (+44) 20 7451 2692
E-mail: mark.a.green@kcl.ac.uk

[**] Der Autor dankt *Science* und *Nature Biotechnology* für die Genehmigung zum Abdruck von Abbildung 1 und 2 bzw. Abbildung 3.

ten) fungierten als Marker in Mausfibroblasten (Abbildung 1). Die Marker waren deutlich photostabiler als her-

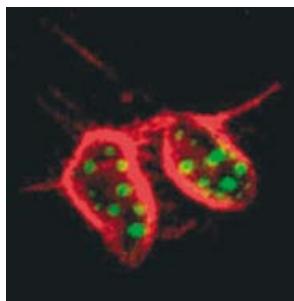


Abbildung 1. Mit QDs markierter Maus-3T3-Fibroblast.^[2] Die roten Partikel markieren die F-Actinfilamente, während die grünen Partikel den Zellkern färben.

kömmliche Farbstoffe: Bei konstanter Anregung bioaktiver QDs über 4 h mit einem 488-nm-Ar+-Laser wurde eine gleich bleibende Emission beobachtet, anders als bei Rhodamin-6G-Farbstoffen, die innerhalb von 10 min. verblassen.^[2]

Chan und Nie nutzten eine einfachere Methode, um CdSe/ZnS-Partikel wasserlöslich und bioaktiv zu machen. Ein Austausch der organischen Ligan- den auf der QD-Oberfläche gegen Thioessigsäure in Lösung ergab lösliche Partikel mit einer angehängten Carboxygruppe für Kupplungen. Chan und Nie beobachteten auch die rezeptorvermittelte Endozytose der lumineszenten Partikel nach der Inkubation mit HeLa-Zellen. In Konjugaten aus QDs und Immunglobulin-G, die mit Bovin-Serum-Albumin (BSA) und einem spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert wurden, neigten die QDs zur Aggregation, sobald der Antikörper das Fab-Fragment des Immunoglobulin G erkannte.^[3]

Die Arbeiten blieben nicht auf ein statisches Imaging beschränkt: So wurden Phagokinistikstudien zur Motilität menschlicher Brustepithel-Tumorzellen und gesunder Zellen durchgeführt.^[4] Wegen der Photobleichung können herkömmliche Farbstoffe hierfür nicht verwendet werden; die früher verwendeten, großen Submikrometer-Goldpartikel hatten dagegen die Zellmotilität gestört. Daher wurden nun vor der

Plattierung der Zellen dünne Schichten von Siliciumdioxid-bedecktem CdSe/ZnS auf Kollagen-beschichteten Substraten abgeschieden. Während eine Zelle die Substratschicht passierte, wurde ihre Substrataufnahme mithilfe der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie gemessen. In weniger als 3 Stunden nahmen die Tumorzellen Nanokristalle auf, die sich im Cytoplasma, vermutlich in den Vesikeln, anhäuften. Weitere Experimente zeigten, dass die Nanopartikel auf das Cytoplasma begrenzt und nicht in den Zellkern eingedrungen waren. Die Wanderungswege der Tumorzellen konnten durch das Substrat-Imaging und anhand der Bereiche, die infolge der Substrataufnahme frei von Nanokristallen waren, verfolgt werden. Gesunde Zellen zeigten unter den gleichen Bedingungen nur eine geringe Motilität. Dies bestätigt, dass Krebszellen nicht nur invasiv sind, sondern auch wesentlich beweglicher als gesunde Zellen.

In einer der ersten In-vivo-Studien mit QDs wurden mit Thioessigsäure bedeckte CdSe/ZnS-Partikel eingesetzt, die mit thiolierten Peptiden zur Passivierung der QD-Oberfläche inkubiert wurden.^[5] Drei Peptide wurden verwendet: CGFECVRQCPERC (GFE) (bindet an eine Membran-Dipeptidase der Endothelzellen in Blutgefäßen der Lunge), F3 (bindet an Blutgefäße und Tumorzellen in bestimmten Tumoren) und LyP-1 (bindet an lymphatische Gefäße und Tumorzellen in bestimmten Tumoren). Lediglich die an F3 gekoppelten QDs neigten zur Aggregation – dieser wurde durch Copassivierung mit thioliertem Polyethylenglycol (PEG) entgegengewirkt. Bekanntermaßen minimiert dies die molekularen Wechselwirkungen, erhöht die kolloidale Stabilität und inhibiert die Bildung unspezifischer Bindungen. Die QDs wurden in die Schwanzvenen von spezifisch xenotransplantierten Mäusen injiziert, und nach einer Einwirkungsdauer von bis zu 20 Minuten wurde eine Gewebeprobe entnommen. Wie angenommen fand man mit GFE passivierte QDs in den Lungen und mit F3 und LyP-1 bedeckte QDs in den Zieltumoren. Das subzelluläre Fluoreszenzmuster deutete darauf hin, dass die QDs in die Zellen inkorporiert worden waren. GFE-bedeckte QDs waren in Tumoren nicht nachweisbar. Die QDs konnten nicht in Gehirn,

Herz, Niere oder Haut nachgewiesen werden, sie wurden aber – unabhängig vom verwendeten Peptid – in Leber und Milz beobachtet (solange sie nicht mit PEG copassiviert waren, was die Coadsorption um 95 % verringerte).^[5]

Es gibt nach wie vor Hindernisse bei der Anwendung spezifisch bedeckter QDs als Biomarker: So führt der einfache, von Chan und Nie^[2] beschriebene Austausch des Bedeckungsmittels nur zu einem Material mit verringriger Emissionsleistung und geringer kolloidaler Stabilität. Das von Bruchez et al.^[3] beschriebene Absetzen von Siliciumdioxid auf den Partikeln ergibt zwar ein stabiles Material, ist jedoch schwierig durchzuführen, schlecht steuerbar und zeitaufwändig. Zudem weist das resultierende Material eine niedrigere Quantenausbeute auf. Ein größeres Problem der nach beiden Methoden hergestellten QD-Biomarker ist ihre Neigung zur Aggregation und unspezifischen Absorption nach der Aufnahme in die Zellen. Lösungsansätze sind die Anlagerung kleiner, polymerer Spezies an die Oberfläche von Siliciumdioxid-bedeckten QDs oder die Nutzung elektrostatischer Wechselwirkungen zur Adsorption eines Proteins als verbrückendes Agens an der QD-Oberfläche.

Zur Herstellung bioaktiver QDs ohne nachteilige Eigenschaften, z.B. die unspezifische Bindung, verkapselten Dubertret et al. die Nanopartikel in Phospholipidmicellen, deren äußere Schicht Biomoleküle abstößt.^[6] An diese Außenschicht wurde DNA gekuppelt, was eine Bindungsstelle zur Biokonjugation durch Hybridisierung lieferte. Idealerweise sollten die QDs etwas größer als das Micellinnere sein, um die Micelle zu stabilisieren. Sind die Teilchen zu klein, ist die Stabilität der Micelle beeinträchtigt, und mehrere QDs können eine einzelne Kavität einnehmen. Einfache QD-Micellen wurden in *Xenopus*-Embryos injiziert und bei In-vivo-Studien eingesetzt. Die Micellen schienen zellautonom zu sein, wirkten nur schwach toxisch auf die Zellen und waren in vivo vier Tage stabil, ohne zu aggregieren. Sie wurden erfolgreich zur Markierung zahlreicher Zellarten eingesetzt und blieben trotz Pigmentierung und Hintergrund-Fluoreszenz während der embryonalen Entwicklung lumineszent.

CdSe/ZnS, das mit Octylamin-modifizierter Polyacrylsäure bedeckt war, wurde auch beim In-vivo-Imaging von Tiefengewebe und der Blutflusskontrolle verwendet.^[7] Die Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte (ein Maß für die Helligkeit des Imaging) betrugen bis zu 47 000 Goeppert-Mayer(GM)-Einheiten. Dies liegt um eine Größenordnung höher als bei organischen Molekülen, die für ähnliche biologische Funktionen entwickelt wurden, und nahe am für CdSe-QDs geschätzten theoretischen Maximum von 50 000 GM. Die QDs waren monatelang stabil, und der Wirkungsquerschnitt blieb konstant, allerdings bei einem großen Anteil nicht fluoreszierender QDs. Es wurden keine Anzeichen von „Blinking“ (Fluktuation der Strahlungsintensität) beobachtet; wahrscheinlich mittelt sich dieses Phänomen heraus und ist kein Problem für das Nanopartikel-Imaging. Die Größe von QDs ähnelt der von fluoreszten Dextranen, was sie ideal für die Angiographie erscheinen lässt. Zur Untersuchung von Haut und adipösem Gewebe, die jeweils stark streuen und sehr unterschiedliche Brechungsindices haben, wurden intravenöse Injektionen bei lebenden Mäusen durchgeführt. Das Blutgefäßsystem war bis zu einer Tiefe von 250 µm durch die unversehrte Haut hindurch deutlich wahrnehmbar. Gegenüber Abbildungen mit ähnlichen Imaging-Substanzen wie fluoreszten Dextranen zeigen QD-Bilder wegen des großen Wirkungsquerschnitts bei geringerer Leistung deutlich mehr Details (siehe Abbildungen 2A und D). Abbildung 2 zeigt Bilder, die unterschiedliche Strukturen hervorheben (die blaue Farbe stammt von der Eigenfluoreszenz von Kollagen). Die Mäuse wiesen keine durch den cadmiumhaltigen Marker verursachten Krankheitssymptome auf. Derzeit finden weitere Studien zur Eignung schwermetallhaltiger Marker statt.

Weitere bedeutende Fortschritte sind das Imaging des Krebsmarkers Her2^[8] und die Entwicklung QD-dotier-

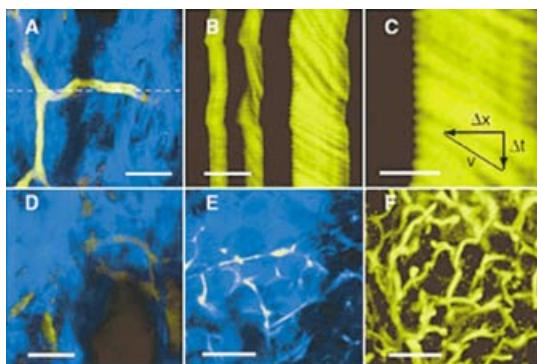


Abbildung 2. Imaging des Tiefengewebes eines Gefäßsystems.^[7] A) CdSe-QDs in Kapillaren an der Hautbasis (100 µm tief), B) Linienscan zur Messung der Blutgeschwindigkeit, C) Vergrößerung von Bild (B), D) fluoreszente Dextrane unter gleichen Bedingungen wie bei Bild (A), E) Bild von adipösem, das Ovarium umgebendem Gewebe, F) Kapillarstruktur von adipösem Gewebe (250 µm tief). Maßstab: A, B, D=20 µm; C=10 µm; E, F=50 µm.

CdSe-QDs an primären, Metallothionein-reichen Hepatozyten, die als Modell für die Leber fungierten, dass QDs unter bestimmten Bedingungen cytotoxisch sind. Diese Eigenschaft wurde der Freisetzung von Cd²⁺-Ionen durch Oxidation zugeschrieben,^[10] allerdings sind noch weitere Toxizitätsstudien erforderlich. Dennoch ist der Einsatz von QDs für das Imaging hochinteressant, und das Potenzial dieser Methode ist noch lange nicht ausgeschöpft.

Online veröffentlicht am
20. Juli 2004

ter Polystyrolkugelchen, die für Assays entworfen wurden (Abbildung 3).^[9] Die Kugelchen sind besonders bemerkenswert, da sie ohne einen Oberflächenaustausch in den Kugelkern aufgenom-

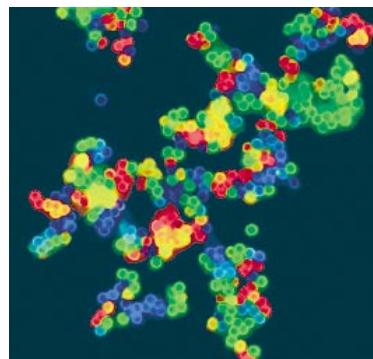


Abbildung 3. Mikrokugelchen mit unterschiedlichem Gehalt an CdSe/ZnS-QDs.^[9]

men werden und daher ihre Lumineszenz behalten. Da dieser Vorgang gut steuerbar ist, konnte ein auf QD-Stäben beruhender Assay entwickelt werden.

Die Fortschritte auf diesem Gebiet sind also zahlreich, aber auch Rückschläge sind zu verzeichnen: So erwies sich bei Toxizitätsuntersuchungen von

- [1] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 93.
- [2] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, 281, 2013.
- [3] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, 281, 2016.
- [4] W. J. Parak, R. Boudreau, M. Le Gros, D. Gerion, D. Zanchet, C. M. Michelet, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, C. Larrabell, *Adv. Mater.* **2002**, 14, 882.
- [5] M. E. Åkerman, W. C. W. Chan, P. Lakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12617.
- [6] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science* **2002**, 298, 1759.
- [7] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, W. W. Webb, *Science* **2003**, 300, 1434.
- [8] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 41.
- [9] M. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 631.
- [10] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, 4, 11.