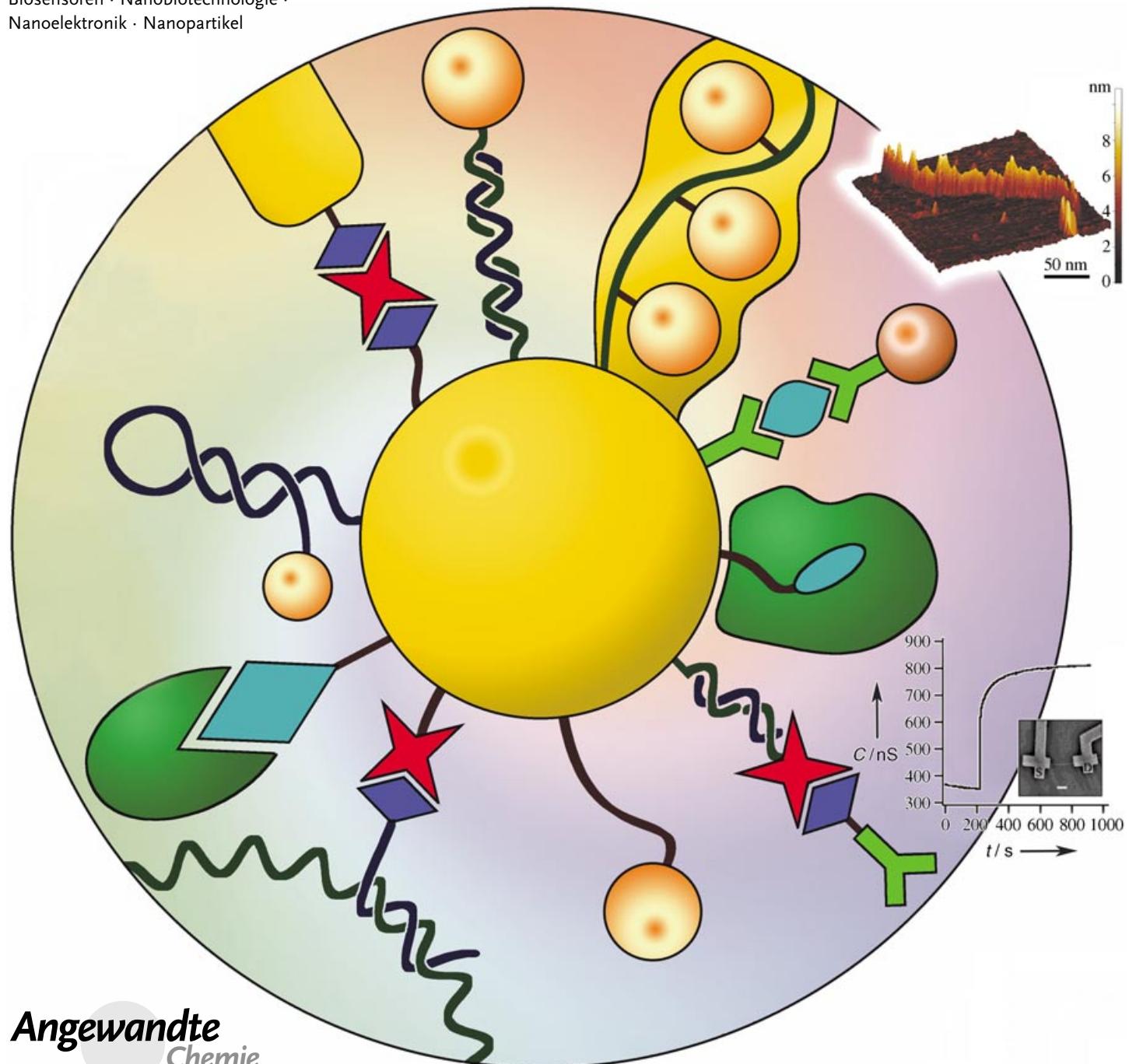


**Nanobiotechnologie****Integrierte Hybridsysteme aus Nanopartikeln und Biomolekülen: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen***Eugenii Katz und Itamar Willner\****Stichwörter:**

Biosensoren · Nanobiotechnologie ·

Nanoelektronik · Nanopartikel

**Angewandte  
Chemie**

**M**etall- oder Halbleiter-Nanopartikel und Nanostäbchen haben ähnliche Dimensionen wie Proteine (Enzyme, Antigene, Antikörper) oder DNA. Die Integration von Nanopartikeln (mit ihren besonderen elektronischen, photonischen und katalytischen Eigenschaften) mit Biomaterialien (mit ihren einzigartigen Erkennungsmechanismen sowie katalytischen und inhibierenden Fähigkeiten) ergibt hybride Nanobiomaterialien mit synergistischen Eigenschaften und Funktionen. Dieser Aufsatz beschreibt die aktuellsten Entwicklungen bei der Synthese von Hybridsystemen aus Biomolekülen und Nanopartikeln oder Nanostäbchen und deren Anwendung zum Aufbau von geordneten 2D- und 3D-Strukturen in Lösung und auf Oberflächen. Schwerpunkte sind der Einsatz von Biomolekül-Nanopartikel-Konjugaten für die Bioanalytik sowie zur Herstellung bioelektronischer Funktioneinheiten und Nanoleiterbahnen aus Metall, Halbleitern oder magnetischen Materialien.

## 1. Einleitung

Die einzigartigen elektronischen, optischen und katalytischen Eigenschaften von Nanopartikeln aus Metallen und Halbleitern (1–200 nm) und die Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln kontrollierter Form und Größe ergeben zusammen vielversprechende Bausteine für Assoziate, Strukturen und Funktionseinheiten im Nanomaßstab. In seinem visionären Vortrag „There is plenty of room at the bottom“<sup>[1]</sup> inspirierte der Nobelpreisträger Richard Feynman die Konzepte der sich explosionsartig entwickelnden Forschung in der Nanotechnologie, und das, obwohl der Begriff „Nanotechnologie“ seinerzeit noch nicht geprägt war: „What I want to talk about is the problem of manipulating and controlling things on a small scale ... What I have demonstrated is that there is room – that you can decrease the size of things in a practical way ... I will not discuss how we are going to do it, but only what is possible in principle ... We are not doing it simply because we haven't yet gotten around to it.“ Vier Jahrzehnte später können die Wissenschaftler Atome, Moleküle und Cluster auf Oberflächen manipulieren, und die Eigenschaften der Nanoobjekte werden von neuen fundamentalen physikalischen Prinzipien bestimmt.

Die Miniaturisierung von Strukturen durch konventionelle<sup>[2]</sup> und Elektronenstrahl-Lithographie<sup>[3]</sup> stößt heute an die theoretische Grenze von etwa 50 nm. Die weitere Miniaturisierung chemischer Objekte verlangt nach alternativen chemischen Verfahren. Feynmans Vision folgend sind Atome und Moleküle als Bausteine für den „Bottom-up“-Aufbau von Gebilden mit Nanometer-Dimensionen einsetzbar. Besonders Nanopartikel aus Metallen<sup>[4]</sup> (z.B. Au, Ag, Pt, Cu) oder Halbleitern<sup>[5]</sup> (z.B. PbS, Ag<sub>2</sub>S, CdS, CdSe, TiO<sub>2</sub>) sind für die Herstellung solcher Strukturen interessant. Die einzigartigen elektrischen Eigenschaften dieser Partikel<sup>[6]</sup> und ihre optischen und photophysikalischen Merkmale<sup>[7]</sup> – wie die großenabhängige Plasmonenabsorption, die photoneninduzierte Erzeugung von Elektron-Loch-Paaren und Fluoreszenz

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	6167
<b>2. Synthesen und Eigenschaften von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden</b>	6169
<b>3. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride zur Steuerung chemischer Reaktivität</b>	6174
<b>4. Aggregation von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden</b>	6176
<b>5. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride auf Oberflächen</b>	6185
<b>6. Oberflächengebundene Biomolekül-Nanopartikel-Hybride in der Sensorik</b>	6189
<b>7. Biomolekular funktionalisierte magnetische Partikel</b>	6205
<b>8. Biomolekulare Nanoschaltkreise</b>	6214
<b>9. Schlussfolgerungen</b>	6225

– ermöglichen es, die Partikel durch externe elektronische oder photonische Signale anzusteuern.

Es gibt inzwischen viele Synthesemethoden zur Herstellung von Nanopartikeln mit enger Größenverteilung.<sup>[4]</sup> Oft werden die Nanopartikel nasschemisch präpariert, wobei die Clusterung der Metallatome oder der Halbleitermoleküle in Gegenwart eines Liganden erfolgt, der die Oberfläche blockiert. Der Ligand bindet an die Metall- oder Halbleiter-Cluster, verhindert so ihre Aggregation zu großen Klumpen und bestimmt letztlich die Größe der Nanopartikel. Es gibt viele solcher Ligandsysteme, darunter hydrophobe Monolagen,<sup>[8]</sup> positiv oder negativ geladene hydrophile Monolagen<sup>[9]</sup> und Polymerlagen.<sup>[10]</sup> Durch Anbindung von molekularen Einheiten an die Nanopartikel werden chemische Funktionalitäten eingeführt, die Erkennungs- oder Affinitätswechselwirkungen zwischen modifizierten Partikeln ermöglichen und die Struktur der daraus resultierenden Aggregate diktionieren.<sup>[11]</sup> Aggregierte Nanopartikel können neue kollektive Eigenschaften wie gekoppelte Plasmonenabsorption, Energieübertragung zwischen den Partikeln und Elektronentransfer zeigen.<sup>[7]</sup>

Mithilfe der chemischen Funktionalitäten der Nanopartikel können zwei- und dreidimensionale Strukturen auf Oberflächen erzeugt werden.<sup>[7]</sup> Unter Anwendung der vielseitigen

[\*] Dr. E. Katz, Prof. I. Willner  
Institute of Chemistry  
The Hebrew University of Jerusalem  
Jerusalem 91904 (Israel)  
Fax: (+972) 2-6527-715  
E-mail: willnea@vms.huji.ac.il

Methoden der supramolekularen Chemie<sup>[12]</sup> wurden Nanopartikel mit einer Vielzahl mono- und dimolekularer Einheiten funktionalisiert und zu komplexen Hybridsystemen zusammengefügt. Auch Kompositsschichten und -aggregate aus molekularer oder makromolekularer vernetzten Nanopartikeln auf Oberflächen wurden hergestellt.<sup>[13]</sup> Realisiert wurden damit die spezifische Abtastung von Substraten,<sup>[13a]</sup> abstimmbare Elektrolumineszenz<sup>[13b]</sup> und verbesserte photoelektrochemische Eigenschaften.<sup>[14]</sup> Durch den Aufbau von Nanopartikel-Architekturen auf Oberflächen gelangte man auch zu nanoskaligen Komponenten wie Einzelelektronen-Transistoren,<sup>[15]</sup> molekularen Schaltern auf Basis von Nanopartikeln<sup>[16]</sup> und Metall/Isolator/Nanopartikel/Isolator/Metall-Kondensatoren (MINIMs).<sup>[17]</sup> Die neuesten Ergebnisse bezüglich der Synthese und Eigenschaften von Nanopartikeln<sup>[7,18]</sup> und der Integration komplexer Nanopartikelsysteme auf Oberflächen wurden in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst.<sup>[7,19]</sup>

Der aktuelle Trend zur Kombination von Biotechnologie und Nanotechnologie beschleunigt die Entwicklung von hybriden Nanomaterialien, die die hochselektiven katalytischen und Erkennungseigenschaften von Biomaterialien wie Proteinen, Enzymen und DNA mit den besonderen elektronischen, photonischen und katalytischen Merkmalen von Nanopartikeln vereinigen. Die Anbindung von Nanopartikeln und anderen Nanoobjekten (z.B. Nanostäbchen, Kohlenstoffnanoröhren) an Biomoleküle ist ein attraktives Forschungsfeld innerhalb der Nanobiotechnologie.<sup>[20,21]</sup> Die Evolution hat faszinierende makromolekulare Strukturen mit einmaligen Erkennungs-, Transport- und katalytischen Eigenschaften hervorgebracht. Durch Anbindung dieser Biomoleküle an Nanopartikel entsteht die Möglichkeit zur elektronischen oder optischen Transduktion biologischer Phänomene und somit zur Entwicklung neuer Biosensoren.<sup>[22]</sup>

Enzyme, Antigene, Antikörper und biomolekulare Rezeptoren befinden sich mit einer Größe von 2–20 nm im gleichen Größenbereich wie Nanopartikel, sodass beide Strukturtypen strukturell kompatibel sind. Mehrere grundlegende Charakteristika machen Biomaterialien zu künftig wichtigen Bausteinen für den Aufbau von Nanopartikel-Architekturen: 1) Biomaterialien gehen spezifische und starke komplementäre Wechselwirkungen ein (z.B. Antigene-Antikörper, Nucleinsäuren-DNA, Hormone-Rezeptoren). Die Funktionalisierung eines einzelnen Nanopartikels oder unterschiedlicher Typen von Nanopartikeln mit Biom-

lekülen könnte eine Biomolekül-Nanopartikel-Erkennung und damit Selbstorganisationsprozesse ermöglichen. 2) Viele Biomoleküle enthalten mehrere Bindungsstellen (z.B. zwei Fab-Stellen in Antikörpern oder vier Bindungsdome in Streptavidin und Concanavalin A), sodass Aggregate aus Nanopartikeln mehrdirektional verknüpft werden können. 3) Proteine können gentechnisch manipuliert und mit spezifischen Ankergruppen so modifiziert werden, dass eine geordnete Bindung an Nanopartikel oder die ortsspezifische Bindung des Biomaterials an Oberflächen verbessert wird. Auf diese Weise kann ein gerichtetes Wachstum von Strukturen aus Nanopartikeln erzwungen werden. Außerdem lassen sich andere Biomaterialien wie doppelsträngige DNA in komplexen starren Strukturen herstellen, die als Matrizen für die Assoziation von Nanopartikeln (durch Einlagerung, elektrostatische Bindung an Phosphatgruppen oder Bindung an funktionelle Gruppen an der DNA) fungieren können. 4) Durch Einsatz von Enzymen stehen katalytische Methoden für die Manipulation von Biomaterialien zur Verfügung. Durch Ligation von Nucleinsäuren oder Spaltung von Nucleinsäuren durch Endonucleasen können z.B. Form und Struktur von hybriden Biomolekül-Nanopartikel-Systemen gesteuert werden. Besonders interessant ist eine Verwendung natürlicher Biokatalysatoren zur Replikation von Biomolekül-Nanopartikel-Konjugaten mit festgelegten Formen und Zusammensetzungen.

Die moderne biotechnologische Forschung stützt sich auf kombinatorische Methoden zur Synthese neuer Biokatalysatoren und Wirkstoffe, und die simultane Analyse von Pathogenen, Mutanten oder therapeutischen Wirkstoffen ist eine zentrale Herausforderung in der bioanalytischen Chemie. Daher sind die einzigartigen optischen und elektronischen Eigenschaften von metallischen und Halbleiter-Nanopartikeln von großer Bedeutung für die Entwicklung von Hochdurchsatz-Techniken zur parallelen Multikomponentenanalyse. Aufgrund dieser Eigenschaften – und besonders wegen der Möglichkeit, sie über die Partikelgröße genau einzustellen – könnten Nanopartikel als vielseitige analytische Sonden genutzt werden. Bibliotheken aus größtenteils definierten Metall- und Halbleiter-Nanopartikeln als spezifische Analyt-Sonden haben ein großes Potenzial in der Biosensorik.

Die Bedeutung funktionalisierter Nanopartikel für biomedizinische Anwendungen ist kaum zu überschätzen. Ein wichtiges Forschungsthema ist z.B. die gezielte Aufnahme von Partikeln in Zellen.<sup>[23]</sup> Der Zellkern ist ein wichtiges



Itamar Willner, geboren 1947, promovierte 1978 an der Hebrew University in Jerusalem. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei M. Calvin an der University of California, Berkeley, wechselte er 1982 zurück an das Institut für Chemie an der Hebrew University, wo er 1986 zum Professor berufen wurde. Er erhielt den Kolthoff Award, den Max-Planck-Forschungspreis für internationale Zusammenarbeit, den Israel Chemical Society Award und den Israel Prize in Chemistry. Er ist Mitglied der Israelischen Akademie der Wissenschaften und der Europäischen Akademie der Wissenschaften.

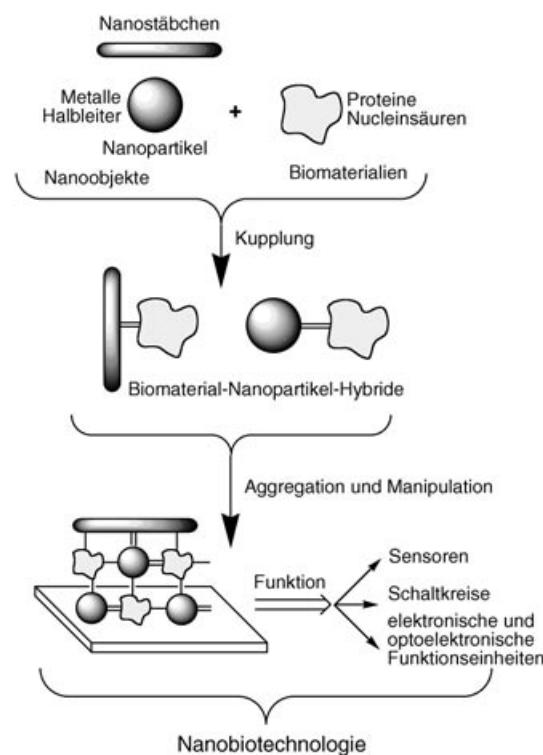


Eugenii Katz, geboren 1952 in Moskau, promovierte 1983 am Frumkin-Institut für Elektrochemie in Moskau und arbeitete bis 1991 als Senior Scientist am Institut für Photosynthese in Pushchino. 1991 wechselte er als Postdoc an die Hebrew University in Jerusalem und 1993 als Humboldt-Stipendiat an die Technische Universität München. 1994 schloss er sich der Arbeitsgruppe von I. Willner als Senior Research Associate an. Seine Forschungsinteressen umfassen elektroanalytische Chemie, funktionalisierte Monoschichten, funktionalisierte Nanopartikel, Biosensoren, Biobrennstoffzellen und Bioelektronik.

Target, da sich hier die genetische Information der Zelle und die Transkriptionsmaschinerie befinden. Der gerichtete Partikeltransport in den Zellkern ist ein technisch schwieriges Problem, da die Kernsonde folgende Minimalanforderungen zu erfüllen hat: Sie muss 1) in den Zellkern aufgenommen werden, z.B. durch receptorvermittelte Endozytose; 2) dem endosomalen oder lysosomalen Stoffwechselweg entkommen; 3) Signalsequenzen tragen, die mit dem nucleären Kernkomplex in Wechselwirkung treten; 4) hinreichend klein sein (<30 nm), um die Kernmembran zu passieren. Den effizientesten Weg zum Targeting von Zellkernen in der Biologie haben die Viren entwickelt, die gewöhnlich mithilfe von Peptiden durch die Zellmembran gelangen. Künstliche Systeme, die sich an diesem viralen Mechanismus orientieren, könnten auf Basis funktionalisierter Nanopartikel entwickelt werden. Zum Beispiel wurden in einem Modellsystem Gold-Nanopartikel (20 nm) mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet, das mit verschiedenen Targeting-Peptiden modifiziert war.<sup>[23b]</sup> Die so erhaltenen funktionellen Nanopartikel konnten biologische Membranen durchdringen und den Zellkern erreichen. Einige Arten von Nanopartikeln werden in der Krebsdiagnostik und -therapie genutzt, z.B. als Biomarker für Tumoren und zur gezielten Applikation von Tumortherapeutika.<sup>[24]</sup> Hybride aus Silber-Nanopartikeln und amphiphilen, stark verzweigten Makromolekülen wirken antimikrobiell und werden als Wirkstoffe eingesetzt.<sup>[25]</sup>

Eindimensionale Nanostrukturen – Drähte, Stäbchen, Bänder und Röhren – mit einer lateralen Ausdehnung von 1–100 nm gelten als potenzielle Komponenten für die Nanotechnologie und besonders für nanoelektronische Funktionseinheiten.<sup>[26]</sup> Eindimensionale Strukturen variabler Zusammensetzung können in größeren Mengen chemisch oder physikalisch hergestellt werden, und eine Vielzahl von außergewöhnlichen Eigenschaften (z.B. thermische, mechanische, elektronische, optoelektronische, optische, nichtlineare optische Eigenschaften und Feldemissionsverhalten) dieser Strukturen wurden entdeckt. Einige dieser Eigenschaften werden bereits in neuen Nanofunktionseinheiten genutzt. Die Kombination von 1D-Nanostrukturen mit Biomolekülen ergibt Perspektiven für neue nanobioelektronische Funktionseinheiten, z.B. zur Leitung bioelektronischer Signale durch eindimensionale Nanodrähte.

Die Kombination von Nanoobjekten, Nanoinstrumenten und Nanomatrizen<sup>[27–29]</sup> mit Biomolekülen birgt vielfältige Möglichkeiten für die Bioelektronik<sup>[30]</sup> und die Nanobioelektronik. In diesem Aufsatz beschreiben wir die Synthesen und Eigenschaften von Biomolekül-Nanopartikel/Nanostäbchen-Hybriden und die Organisation solcher Systeme zu Funktionseinheiten (Abbildung 1). Wir diskutieren ihre Eigenschaften und die Methoden zur Erzeugung zwe- und dreidimensionaler Strukturen auf Oberflächen, und wir beschreiben die Wirkungsweise dieser Nanopartikelaggregate als Funktionseinheiten. In erster Linie werden wir die Anwendungen solcher Systeme als Sensoren, als Bauelemente für elektronische Schaltkreise und als elektronische und optoelektronische Funktionseinheiten besprechen. Vor allem soll deutlich werden, dass die wissenschaftlichen Errungenschaften der letzten Jahre bereits die Kernelemente eines neuen Wissenschaftsgebietes erzeugt haben – der Nanobiotechnologie.



**Abbildung 1.** Prinzip der Herstellung von Konjugaten aus Biomolekülen und Nanopartikeln/Nanostäbchen und deren Organisation zu funktionellen Komponenten.

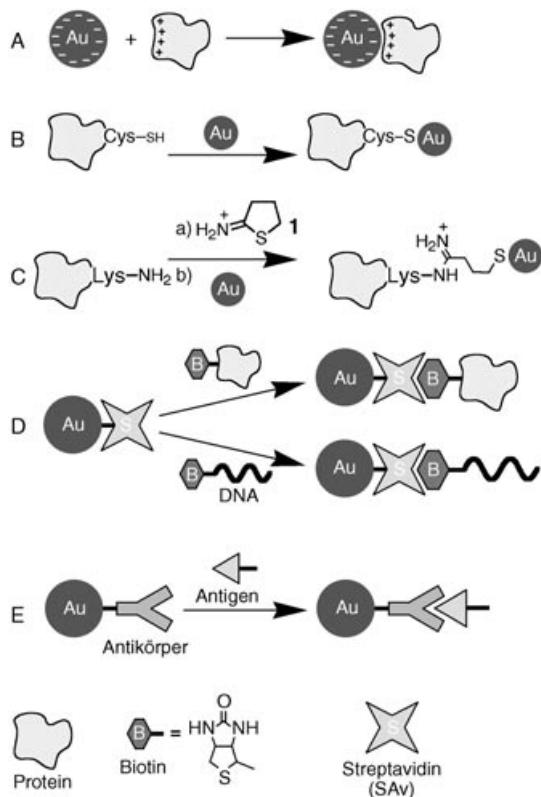
## 2. Synthesen und Eigenschaften von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden

Eine Vielzahl von Methoden, darunter physikalische Adsorption, elektrostatische Bindung, spezifische Erkennung und kovalente Kupplung, wurde zur Immobilisierung von biologischen Molekülen (Proteinen und Enzymen, Antigenen und Antikörpern, DNA und Oligonukleotiden) auf Polymermatrizen und anorganischen Trägermaterialien eingesetzt.<sup>[31,32]</sup> Die modifizierten Trägermaterialien fanden zahlreiche Anwendungen in der Biotechnologie, z.B. für Affinitätstrennungen und als Biosensoren, in der Bioreaktorteknik und bei der Konstruktion von Bio-Brennstoffzellen. In jüngster Zeit werden die genannten Immobilisierungstechniken, die ursprünglich zur Funktionalisierung makroskopisch großer Träger entwickelt wurden, auch zur Kupplung von Biomolekülen und Nanopartikeln eingesetzt.

### 2.1. Funktionalisierung von Nanopartikeln durch elektrostatische Adsorption von Biomolekülen

Die einfache Adsorption von Biomolekülen an Nanopartikel wird häufig angewendet, und das Spektrum an untersuchten Adsorbaten reicht von niedermolekularen organischen Substanzen (z.B. Vitamin C)<sup>[33]</sup> bis hin zu großen Proteinen und Enzymen.<sup>[34–37]</sup> Wenn die Nanopartikel durch anionische Liganden wie Carbonsäureanionen (Citrat, Tartrat, Liponat) stabilisiert sind, werden positiv geladene Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen adsorbiert

(Abbildung 2 A).<sup>[38–43]</sup> Zum Beispiel wurden Gold- und Silber-Nanopartikel durch Citratreduktion erzeugt und mit IgG-Molekülen (IgG = Immunglobulin G) bei pH-Werten knapp oberhalb des isoelektrischen Punktes des Citratliganden funktionalisiert.<sup>[38]</sup> Auf diese Weise wurde eine effektive



**Abbildung 2.** Herstellung von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden:  
A) Bildung eines Nanopartikel-Protein-Konjugats durch elektrostatische Wechselwirkungen. B,C) Bildung von Nanopartikel-Protein-Konjugaten durch Adsorption von Nanopartikeln an natürliche (B) und synthetische Thiolgruppen (C) des Proteins. D,E) Bildung von Nanopartikel-Protein-Konjugaten durch Bioaffinitätswechselwirkungen bei Streptavidin-Biotin-Komplexen (D) und bei Antikörper-Antigen-Komplexen (E).

Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten des Proteins und den negativ geladenen Citratgruppen des Kolloids hergestellt. Andere Beispiele für die Erzeugung von Proteinschichten durch Nutzung elektrostatischer Wechselwirkungen sind die direkte Adsorption von Häm-haltigen Redoxenzymen an Citrat-stabilisierte Silber-Nanopartikel<sup>[34,39]</sup> und die Bindung von basischen Leucin-Zipperproteinen an Liponat-stabilisierte CdSe<sub>Kern</sub>/ZnS<sub>Hülle</sub>-Halbleiterpartikel.<sup>[40]</sup> Mit einem negativ geladenen Phospholipid beschichtete Gold-Nanopartikel wurden durch Photoreduktion von NaAuCl<sub>4</sub> in Gegenwart von Dimyristoyl-L-α-phosphatidyl-D,L-glycerin hergestellt;<sup>[41]</sup> dieses vermittelt dann die Bindung positiv geladener Proteine, sodass das Modell einer Biomembran in Nanogröße entsteht. Die dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry, DSC) wurde eingesetzt, um die elektrostatische Natur der Proteinadsorption auf Silicat-Partikeln nachzuweisen und die thermodynamischen Bindungsparameter zu berechnen.<sup>[42]</sup> Es wurde ein Modell entwickelt, das die Struktur der

Metall<sub>Kern</sub>/Protein<sub>Hülle</sub>-Nanopartikel mit den experimentell erhaltenen Lichtstreuungsspektren korreliert.<sup>[37]</sup>

Durch schnelle Expansion einer überkritischen Lösung in ein flüssiges Lösungsmittel wurden monodisperse BSA-konjugierte Ag- und Ag<sub>2</sub>S-Nanopartikel erhalten.<sup>[43]</sup> Da die Assoziation und Dissoziation des freien Proteins vom pH-Wert der Lösung abhängt, können auch die BSA-Nanopartikel-Hybride durch pH-Änderungen reversibel zusammengeagert und aufgelöst werden. Mit Ethylenglycol-Monoschichten geschützte Nanopartikel wurden verwendet, um eine unspezifische Bindung biologischer Moleküle zu verhindern.<sup>[44]</sup> Gold-Nanopartikel wurden auch als Matrizen zur Kupplung von Peptiden zu De-novo-Proteinen auf dem Nanopartikelträger eingesetzt.<sup>[45]</sup>

Die elektrostatische Abscheidung von Biomolekülen, besonders Proteinen oder Enzymen, kann auch für die Erzeugung vielschichtiger Anordnungen genutzt werden.<sup>[46]</sup> Proteine, die elektrostatisch an die geladenen Nanopartikel binden, können als Grundlage für die weitere Anlagerung entgegengesetzt geladener Polyelektrolyt-Polymeren fungieren, auf die dann wiederum eine zweite Proteinschicht abgeschieden werden kann usw. Vielschichtige Filme von BSA,<sup>[47]</sup> IgG,<sup>[47]</sup> β-Glucosidase,<sup>[48]</sup> Glucoseoxidase (GOx),<sup>[49,50]</sup> Urease<sup>[51]</sup> und Meerrettichperoxidase (HRP)<sup>[50]</sup> sind auf diese Weise auf Polystyrol-Nanopartikel abwechselnd mit entgegengesetzt geladenen synthetischen Polyelektrolyten als Linkern aufgebracht worden. Zum Beispiel wurden Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) und Poly(natrium-4-styrolsulfonat) als positiv bzw. negativ geladene Polyelektrolyte verwendet. Die vielschichtige Protein/Polymer-Hülle konnte in der Dicke von einigen Nanometern bis zu mehreren hundert Nanometern variiert werden. Mit dieser Strategie lassen sich funktionelle Filme mit einer hohe Dichte an Enzymmolekülen auf Nanopartikeln erhalten. Durch eine dichtere Beladung von Nanopartikeln mit organischen Verbindungen erhöht sich die Empfindlichkeit der Nanopartikel in analytischen Verfahren. So wurden Polystyrolpartikel mit einem vielschichtigen Film von Polyelektrolyten versehen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff derivatisiert waren. Der Aufbau wurde mit einer IgG-Schicht abgeschlossen, sodass die modifizierten Partikel als Marker in der Fluoreszenz-Immunoanalyse verwendet werden konnten.<sup>[52]</sup> Durch Erhöhung der Farbstoffbeladung wurde ein stärkeres Fluoreszenzsignal und somit eine höhere Empfindlichkeit erhalten.

Die elektrostatische Adsorption negativ geladener DNA an positiv geladene Cd<sup>2+</sup>-reiche CdS-Nanopartikel wurde untersucht.<sup>[53–57]</sup> Die Photolumineszenz von Halbleiter-Quantenpunkten wurde genutzt, um den Einfluss der DNA-Struktur auf die DNA-Nanopartikel-Bindung zu analysieren.<sup>[53–55,58]</sup> Kristallographische und biochemische Untersuchungen ergaben, dass „geknickte“ Oligonukleotide mit einer Krümmung von etwa 3 nm an ähnlich gekrümmte Nanopartikel fester und schneller binden als gerade oder gebogene DNA.<sup>[53,54]</sup> Der Bindungsmodus und seine Aufschlüsselung in statische und dynamische Komponenten ist aktueller Gegenstand der Forschung.<sup>[59]</sup> Des Weiteren wurde gefunden, dass durch Substitution von Citrat-Ionen auf Gold-Nanopartikeln durch negativ geladene DNA eine DNA-Hülle erzeugt werden kann.<sup>[60]</sup>

## 2.2. Funktionalisierung von Nanopartikeln durch Chemisorption

### Thiol-derivatisierter Biomoleküle und durch kovalente Bindung von Biomolekülen durch bifunktionale Linker

Die Bindung von Thiolat-funktionalisierten Molekülen, z.B. Oligopeptiden, an Gold-Nanopartikel bietet sich als ein Weg zur kovalenten Verankerung von Biomolekülen an Nanopartikeln an. So wurden Gold-Nanopartikel mit L-Cystein funktionalisiert und das Konjugat anschließend durch Oligomerisierung in wässriger Lösung zu Oligopeptiden auf Gold-Nanopartikeln umgesetzt.<sup>[61]</sup> Des Weiteren wurde über die Beschichtung von CdS-Nanopartikeln mit Glutathion berichtet, wobei die starke Bindung der Thiolgruppen an die ionischen Cd<sup>2+</sup>-Positionen an der Oberfläche der Nanopartikel ausschlaggebend ist.<sup>[62]</sup>

Die starke Chemisorption von Proteinen auf Gold-Nanopartikeln wird in einigen Fällen durch die von Cysteinresten stammenden Thiolgruppen der Proteine vermittelt (z.B. bei Serumalbumin) (Abbildung 2B).<sup>[63]</sup> Wenn das native Protein keine Thiolgruppen enthält, können diese chemisch (z.B. mit Traut-Reagens, 2-Iminothiolan (**1**))<sup>[64]</sup> (Abbildung 2C) oder gentechnisch eingeführt werden.<sup>[65]</sup>

Einige Proteine und Enzyme behalten ihre native Struktur und ihre Aktivität, wenn sie direkt an Nanopartikel adsorbiert werden. Beispielsweise wurde das Vorliegen von nativem Hämoglobin auf citratstabilisierten Silberkolloiden durch oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS) nachgewiesen.<sup>[36]</sup> Dabei wurde die reversible Bindung von O<sub>2</sub> und von CO an die R-Konformation des Hämoglobins sowie der daraus resultierende Übergang in die T-Konformation beobachtet. Auch das Nicht-Häm-Eisenenzym Chlorcatechin-Dioxygenase wies nach physikalischer Adsorption an ein citratreduziertes Silberkolloid noch seine native Struktur und biokatalytische Aktivität auf.<sup>[34]</sup> Physikalisch adsorbierte Biomoleküle lösen sich allerdings leicht von der Oberfläche, und adsorbierte Proteine und Enzyme unterliegen oft der Denaturierung und verlieren dabei ihre biokatalytische Aktivität und ihre Fähigkeit zur biologischen Erkennung. Mit Circular dichroismus (CD), DSC und Fluoreszenzspektroskopie wurde bei Rinderfibrinogen nach Adsorption an TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel nachgewiesen, dass der  $\alpha$ -Helix-Gehalt des Proteins deutlich gesunken war.<sup>[35]</sup>

Eine reversible Bindung mit spezifischer Orientierung des Proteins gelang mit Pepsin als Modellenzym auf Aluminium-oxid-Nanopartikeln durch die Wechselwirkung zwischen einem Phosphorylrest (am Ser68-Rest in natürlichem Schweinepepsin) und der Aluminiumoxid-Oberfläche.<sup>[66]</sup> Die Kristallstruktur des Proteins lässt erkennen, dass sich der Ser68-Rest an der Oberfläche befindet, weit von den katalytischen Resten Asp32 und Asp215 entfernt. Die Phosphorylgruppe ist günstig positioniert und ermöglicht eine gerichtete Kupplung an die Oberfläche von einem definierten Punkt des Enzyms aus. Wässriges Phosphat konkurriert mit phosphorylierten Proteinen um die Aluminiumoxid-Oberfläche. So lässt sich ein hybrides Nanopartikel aufbauen, das unter regulierbaren Bedingungen (Zugabe von Phosphat) die gekuppelte biologische Komponente abgibt. Hieraus ergibt sich ein Ansatz für die In-vivo-Freisetzung von Biomolekülen, z.B. biopharmazeutischen Proteinen.

Durch die kovalente Bindung von Proteinen an Nanopartikel-Oberflächen können Probleme durch Instabilität und Inaktivierung umgangen werden.<sup>[46]</sup> Niedermolekulare Linker mit Ankergruppen zur Nanopartikel-Oberfläche und funktionellen Gruppen, die die Kupplung zum gewünschten Biomolekül herstellen, wurden vielfach zur kovalenten Verknüpfung von Biomolekülen und Nanopartikeln verwendet.<sup>[21a]</sup> Als Ankergruppen zur Bindung der bifunktionellen Linker an Gold-, Silber-, Cadmiumsulfid- und Cadmiumselenid-Nanopartikel werden häufig Thiole, Disulfide und Phosphane genutzt. Die Ankergruppen werden entweder durch Substitution schwach adsorbierter Moleküle auf der Nanopartikel-Oberfläche oder direkt während der Nanopartikel-Synthese eingeführt. Es resultieren Nanopartikel mit einer funktionalisierten Oberfläche, die für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Alkoxyilan- und Halogensilan-Gruppen werden für die kovalente Bindung bifunktioneller Linker an die Oberfläche von SiO<sub>2</sub> und anderen oxidischen Nanopartikeln verwendet. Berichtet wurde über die Synthese von Gold-Nanopartikeln, die mit Polysiloxan umhüllt und mit einer Vielzahl funktioneller Gruppen zur kovalenten Bindung von Biomolekülen versehen sind.<sup>[67]</sup> Als terminale funktionelle Gruppen steht eine große Zahl von Resten zur Verfügung. Am häufigsten genutzt werden Aminogruppen, aktive Ester und Maleimidgruppen, die mit der biologischen Komponente durch Carbodiimid-vermittelte Veresterung und Amidierung oder durch Reaktion mit Thiolgruppen kovalent gekuppelt werden.<sup>[21a]</sup> Einzelne funktionelle Gruppen (z.B. aktive Ester- oder Aminogruppen) auf Gold-Nanopartikeln werden durch einen statistischen Ansatz oder durch Modifizierung des chemisch definierten Clusters erhalten.<sup>[68]</sup> Mithilfe solcher Partikel können Nanopartikel erzeugt werden, die nur je ein einziges Target-Biomolekül tragen. Über eine vielseitige Festphasenmethode zur Monofunktionalisierung von L-Lysin-derivatisierten Gold-Nanopartikeln (ca. 2 nm) wurde kürzlich berichtet.<sup>[68d]</sup> Gold-Nanopartikel, die einen einzelnen L-Lysin-Rest tragen, wurden als Bausteine für eindimensionale Nanopartikel-Peptidketten vorgeschlagen.

Nucleinsäuren mit Alkanthiolresten sind durch Festphasen-Synthese aus den entsprechenden Phosphoramidat-Bausteinen zugänglich. Solche derivatisierten Nucleinsäuren sind bereits in vielen Fällen zur Herstellung von DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln<sup>[69]</sup> und CdSe<sub>Kern</sub>/ZnS<sub>Hülle</sub><sup>[70]</sup> oder CdS-Halbleiter-Nanopartikeln<sup>[56]</sup> verwendet worden. Mit einem Steroiddisulfid-Derivat funktionalisierte DNA bindet bereitwillig an Gold-Nanopartikel und weist eine höhere Adsorptionsstabilität auf, weil beide Schwefelatome der Disulfid-Ankergruppe am Bindungsvorgang beteiligt sind.<sup>[71]</sup> Die Bindung von Oligonukleotiden an CdS-Nanopartikel gelingt auch mit Phosphorthiolat-Ankergruppen.<sup>[72]</sup> Die Konformation einzelsträngiger DNA, die über Thiolgruppen an Gold-Nanopartikel gebunden ist, war abhängig von der Stranglänge und der Beladungsdichte. Um dies näher zu untersuchen, wurden thiolmodifizierte einzelsträngige Oligonukleotide unterschiedlicher Länge (8–135 Basen) an die Oberfläche von Gold-Nanokristallen von 10 nm Durchmesser bei unterschiedlichen DNA/Gold-Verhältnissen (1, 2, ..., Sättigung) gebunden.<sup>[73]</sup> Die elektrophoretische Beweglich-

keit dieser Konjugate wurde in 2-proz. Agarose-Gel gemessen und daraus der effektive Durchmesser der DNA-Gold-Konjugate abgeleitet. Dieser Durchmesser hängt von der Konformation der Oligonucleotide auf der Gold-Oberfläche ab. Bei niedriger Oberflächenbedeckung wickeln sich die DNA-Stränge ungeordnet um die Nanopartikel. Bei hoher Oberflächenbedeckung orientieren sich kurze Oligonucleotide vollständig ausgestreckt senkrecht zur Oberfläche. Bei langen Oligonucleotiden ist der innere Teil der Kette, der sich in der Nähe der Gold-Oberfläche befindet, vermutlich völlig gestreckt und steht senkrecht zur Oberfläche, während der äußere Teil in ein Zufallsknäuel übergeht.

## 2.3. Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen durch spezifische Affinitätswechselwirkungen

Nanopartikel mit Gruppen hoher Affinität für die Bindung von Biomolekülen wurden zur spezifischen Kupplung von Proteinen und Oligonucleotiden verwendet. So wurden Streptavidin-funktionalisierte Gold-Nanopartikel über Affinitätswechselwirkungen mit biotinylierten Proteinen (z.B. Immunglobulinen und Serumalbuminen) oder biotinylierten Oligonucleotiden beladen (Abbildung 2D).<sup>[21a,74]</sup> Analog können biotinylierte CdSe<sub>Kern</sub>-CdS<sub>Hülle</sub>-Nanopartikel an Streptavidin gebunden werden.<sup>[75]</sup> Protein A auf Silber-Nanopartikeln ist ein vielseitiger Linker zur Bindung von Fc-Fragmenten verschiedener Antikörper.<sup>[76]</sup> Umgekehrt wurden Nanopartikel-Antikörper-Konjugate zur Affinitätsbindung der jeweiligen Antigene eingesetzt (Abbildung 2E).<sup>[77]</sup> Bemerkenswerterweise können an Nanopartikeln gebundene Antikörper höhere Bindungsaffinitäten für ihre jeweiligen Antigene haben als die freien Antikörper.<sup>[77b]</sup>

Über die Anbindung von Kohlenhydrat-Liganden an Metall-Nanopartikel wurde kürzlich berichtet.<sup>[78–81]</sup> Mithilfe solcher multivalenter Liganden werden globuläre Strukturen erhalten, auf deren Oberfläche Clusterbildung und Orientierungseffekte untersucht werden können.<sup>[79]</sup> Die Eigenschaften des Metallkerns können genutzt werden, um die molekulare Erkennung zwischen Kohlenhydraten und ihren jeweiligen Bindepoteinen zu untersuchen. Mit Mannose-stabilisierten Gold-Nanopartikeln wurden FimH-Proteine auf Typ-1-Pili von *Escherichia coli* elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht.<sup>[80a]</sup> Stabilisierte Kolloidsysteme für den kolorimetrischen Nachweis von Kohlenhydrat bindenden Proteinen wurden in weiterführenden Studien untersucht.<sup>[82]</sup>

Ein Mannose-Derivat wurde durch Selbstorganisation auf vorgefertigten Citrat-beschichteten wasserlöslichen Gold-Nanopartikeln aufgebracht. Durch Einsatz eines kurzen Kohlenwasserstoff-Linkers ( $C_2$ ) zwischen der Gold-Oberfläche und dem Mannose-Erkennungszentrum konnte ein selektiver, quantitativer und – nicht zu unterschätzen – schneller kolorimetrischer Nachweis des Kohlenhydrat bindenden Proteins Concanavalin A entwickelt werden. Auch mit Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Spektroskopie wurde die Erkennung zwischen Kohlenhydrat-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln und Concanavalin A verfolgt.<sup>[80b]</sup> Die multivalente Wechselwirkungen zwischen Gold-Nanopartikeln, die mit Galactosyl- und Glucosylkopfgruppen modifiziert waren,

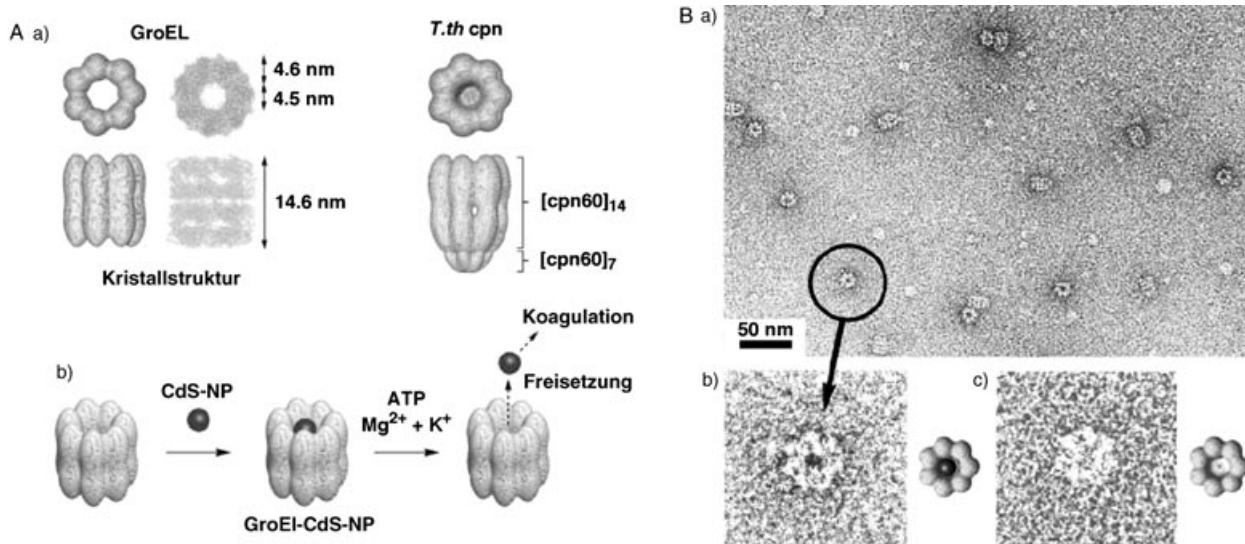
und dem HIV-assoziierten Glycoprotein gp 120 wurden untersucht.<sup>[83]</sup> Die Partikel wurden aus disulfidischen C-Glycosiden erhalten, die über eine Amidbindung mit Triethylenglycol verknüpft wurden (durch eine modifizierte Methode nach Brust et al.<sup>[8b]</sup>). Gold-Nanopartikel, die mit einer Monoschicht des Antibiotikums Vancomycin bedeckt sind, binden multivalent an Membranen Gram-negativer Bakterien und zeigen eine merkliche antimikrobielle Aktivität.<sup>[84]</sup>

Durch Affinitätsbindung gelang der Einschluss von Nanopartikeln in einige natürlich vorkommende Proteine. Die Chaperone GroEL (aus *Escherichia coli*) und *T.th* („*T.th* cpn“ aus *Thermus thermophilus* HB8) schließen denaturierte Proteine im Inneren einer zylindrischen Höhlung ein. Die eingeschlossenen Proteine werden durch ATP-induzierte Umfaltung der Höhlung freigesetzt. GroEL und *T.th* cpn können CdS-Halbleiter-Nanopartikel einschließen und ihnen dadurch hohe thermische und chemische Stabilität in wässrigem Medium verleihen.<sup>[85]</sup> Analog zum physiologischen Vorgang können die Nanopartikel durch ATP leicht aus dem Inneren der Chaperone freigesetzt werden. Durch Übertragung solcher biologischer Mechanismen auf die Materialwissenschaften könnten neue Konzepte für bioresponsive Komponenten entstehen.

GroEL besteht aus zwei supramolekularen Ringen, die zu einer Doppeldecker-Struktur zusammengelagert sind (Abbildung 3A,a). Jeder Ring enthält sieben Protein-Untereinheiten zu je 60 kDa. GroEL umschließt eine zylindrische Höhlung von 4.5 nm Durchmesser bei einer Wandstärke von 4.6 nm. *T.th* cpn besteht wie GroEL aus einem Tetradeamer (840 kDa) einer Protein-Untereinheit (cpn60 mit 60 kDa), das mit einem „Proteindeckel“ ([cpn10]<sub>7</sub> mit 70 kDa) abgeschlossen ist (Abbildung 3A,a). Innenvolumen und Wandstärke von *T.th* cpn (ca. 5 nm) und GroEL haben Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahmen zufolge ähnliche Abmessungen (Abbildung 3A,a). In Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> und K<sup>+</sup> durchlaufen Chaperone bei ATP-Bindung eine weiträumige Konformationsänderung, in deren Verlauf die umgefalteten Gastproteine aus dem Inneren freigesetzt werden (Abbildung 3A,b). Auch Komplexe aus *T.th* cpn und CdS-Nanopartikeln sprechen auf ATP an und setzen die eingeschlossenen Nanopartikel unter ähnlichen Bedingungen frei.

## 2.4. Synthese von Nanopartikeln in biochemischen und mikrobiellen Systemen

Die Verwendung von Bakterien in biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln befindet sich noch in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung. Gegenüber rein chemischen Herstellungsprozessen zeichnen sich biologische und besonders mikrobielle Reaktionen durch Selektivität und Präzision bei der Nanopartikelbildung<sup>[86]</sup> und durch umweltfreundliche Prozessbedingungen aus.<sup>[86f]</sup> Gewöhnlich baut man auf hoch spezifische Strukturen wie Enzymen und Proteinen auf der Bakterienmembran auf, die ihrerseits hoch spezifische Wechselwirkungen mit dem Kulturmedium eingehen. In solchen biologischen Prozessen könnten schnell große Mengen an Nanopartikeln entstehen,



**Abbildung 3.** A) Chaperone fungieren als ATP-abhängige fassförmige Wirtes zum Einschluss von Nanopartikeln. a) Ansicht von GroEL und *T.th* cpn von oben und von der Seite. b) Bildung von GroEL-CdS-Nanopartikel-Komplexen durch Einschluss von CdS-Nanopartikeln in die zylindrische Höhlung von GroEL und die durch ATP ausgelöste Freisetzung der Gastverbindung. B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Körnern aus *T.th* cpn und CdS-Nanopartikeln und von intaktem *T.th* cpn (a); b, c) vergrößerte Ausschnitte und Modelle. (Mit Genehmigung aus Lit. [85].)

viele biologische Details sind aber noch unklar. Aus elektrochemischer Sicht kann man sich die Bakterien als Elektroden vorstellen, die bei einem relativ konstanten Potential arbeiten. Die Bandbreite der anorganischen nanoskaligen Produkte ist mit dieser Vorstellung in Einklang. Die bakteriell hergestellten Nanopartikel konnten mit ihren Biomaterialhüllen isoliert werden, was belegt, dass Bakterien als „lebende Reaktoren“ für die Herstellung von Nanomaterialien tauglich sind.

Mikroorganismen, besonders Prokaryoten, sind oft extremen Umweltbedingungen ausgesetzt (z.B. der Einwirkung von toxischen Metallionen oder Metallen), die die Entwicklung spezifischer Abwehrmechanismen erzwingen. Die Toxizität von Metallionen wird durch Änderung des Redoxzustandes und/oder intrazelluläre Ausfällung als Metalle reduziert oder beseitigt. Dies bildet die Basis für viele wichtige Anwendungen von Mikroorganismen, wie bakterielle Erzaugung, Biosanierung, mikrobielle Korrasion und auch für die Synthese von Nanopartikeln. Viele biologische Systeme haben hochkomplexe Entgiftungsmechanismen durch Bioreduktion und Mineralisation von Edelmetallen entwickelt. Dabei bilden kleine Peptide und Proteine Kristallisierungskeime für die Anbindung des Metalls und die Stabilisierung der Nanopartikel. Silber-Nanopartikel wurden im Größenbereich von 2–5 nm extrazellulär durch den silbertoleranten Hefestamm MKY3 gebildet, wenn die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase 1 mM Ag<sup>+</sup>-Ionen ausgesetzt wurden.<sup>[86d]</sup> Auch in lebenden Pilzen und Pflanzen können metallische und Halbleiter-Nanopartikel gebildet werden.<sup>[87]</sup> Der Pilz *Fusarium oxysporum* synthetisiert halbleitende CdS-Nanopartikel extrazellulär durch einen rein enzymatischen Prozess.<sup>[87a]</sup> Ähnliches wurde über Bildung und Wachstum von Gold-Nanopartikeln in Alfalfa-Pflanzen berichtet.<sup>[87b]</sup> Halbleitende Nanopartikel wie CdSe und CdSe<sub>Kern</sub>-ZnS<sub>Hülle</sub> von regulierbarer Größe und einheitlicher Form wurden mit

genetisch hergestellten Proteinen erzeugt.<sup>[88]</sup> Die Biomineralisierung (besonders mithilfe von Ferritin) wird weithin für die Herstellung magnetischer Nanopartikel genutzt (siehe Abschnitt 7.1).

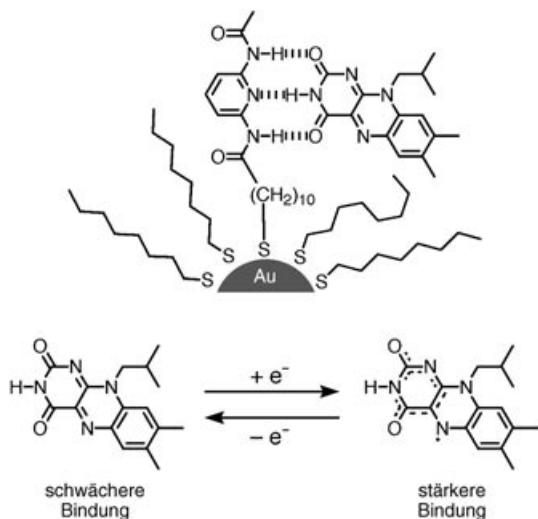
## 2.5. Eigenschaften hybrider Nanopartikel-Biomolekül-Systeme

Durch Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen verändern sich die Eigenschaften von Partikeln und ihre Wechselwirkungen mit der Umgebung. Zum Beispiel wird das Absorptionspektrum von Vitamin C bei Adsorption auf TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln um 1.6 eV rotverschoben. Das spektrale Verhalten beruht auf einem Ladungstransfer und geht auf eine spezifische Bindung des elektronenschiebenden Adsorbats an Defekten der Kristallecken auf der Oberfläche der Nanopartikel zurück.<sup>[33]</sup> Die Wasserlöslichkeit von Nanopartikeln kann durch Funktionalisierung der Oberfläche mit stark hydrophilen Biomolekülen stark erhöht werden.<sup>[9]</sup> Während Gold-Nanopartikel, die mit langketten Alkylthiolen modifiziert sind, nur in organischen Lösungsmitteln niedriger Polarität löslich sind, lösen sich Gold-Nanopartikel mit  $\omega$ -Carbonsäure-funktionalisierten Alkylthiolat-Hüllen bereitwillig in polaren organischen Solventien wie Ethanol und Aceton. Gold-Nanopartikel, die mit Biomolekülen wie Troponin oder Coenzym A modifiziert sind, lösen sich hervorragend in Wasser.<sup>[9c]</sup>

Eigenschaften von Biomolekülen können durch deren Bindung an Metall-Nanopartikel verändert werden. So wurde durch SERR-Spektroskopie nachgewiesen, dass die Schwingungen der biologisch aktiven prosthetischen Hämgruppe des Myoglobins oder Hämoglobins durch die Adsorption der Proteine an Metall-Nanopartikel selektiv verstärkt werden.<sup>[89]</sup>

Die chemischen Eigenschaften der Biomoleküle oder Biomolekül-Analoga, mit denen die Nanopartikel modifiziert

sind, können durch externe Signale (z.B. elektrische oder optische) verändert werden. Auf diese Weise lässt sich die Wechselwirkung der modifizierten Nanopartikel mit der Umgebung steuern. Als regulierbare Eigenschaften bieten sich die Bindungseigenschaften der modifizierenden Gruppe und das Aggregationsverhalten der Nanopartikel an. Als Beispiel wurde die Komplexbildung zwischen einem Diamidopyridin-Derivat und einem Flavin-Derivat auf der Oberfläche eines Gold-Nanopartikels untersucht.<sup>[90]</sup> Es zeigte sich, dass nach elektrochemischer Reduktion des Flavin-Derivats stabilere Wasserstoffbrücken gebildet werden (Abbildung 4). Damit ist es möglich, die Stärke der Bindung zwischen dem bioorganischen Molekül und der organisch funktionalisierten Hülle des Nanopartikels elektrochemisch zu schalten.



**Abbildung 4.** Elektrochemisch kontrollierte Erkennung von Flavin durch ein Diamidopyridin-funktionalisiertes Nanopartikel.

Durch photoinduzierte Anregung einer der Komponenten des Biomolekül-Nanopartikel-Hybrids kann eine Energie- und/oder Elektronenübertragung ausgelöst werden. Eine effiziente photoinduzierte Elektronenübertragung wurde z.B. in einem Hybridsystem bestehend aus einer Carotinoid-Hülle und einem TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel nachgewiesen.<sup>[91]</sup> In einem anderen System löste die Photoanregung von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln die Oxidation von Häm-Molekülen aus, die an den halbleitenden Partikelkern gebunden waren, was nachfolgend die Häm-katalysierte Oxidation organischer Halogenide induzierte.<sup>[92]</sup> Durch den effizienten Resonanzenergietausch von Tryptophanresten in Proteinen auf den Halbleiterkern des Nanopartikels (z.B. im BSA-CdTe-Konjugat)<sup>[93]</sup> wird die Fluoreszenz des Nanopartikels nach Photoanregung der Proteinhülle deutlich verstärkt.

### 3. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride zur Steuerung chemischer Reaktivität

Die Wechselwirkungen zwischen funktionalisierten Nanopartikeln und Biomaterialien oder die Wechselwirkungen innerhalb der Struktur von Biomaterialien können genutzt werden, um die chemische Reaktivität der Biomoleküle zu

steuern. Daneben können diese Wechselwirkungen auch als Indikator für den Zustand der Reaktion und der Reaktanten herangezogen werden, sodass eine externe Steuerung vorgenommen werden kann. Kleine Moleküle und Polymere können die chemische Reaktivität von Biomolekülen beeinflussen. Wenn es mehrere Konkurrenzreaktionen gibt, kann ein Promotor oder Inhibitor einer spezifischen chemischen Reaktion den im Gesamtprozess wirksamen Reaktionsweg und damit das biochemische System regulieren. Molekulare Marker (z.B. Fluoreszenzfarbstoffe) können den Zustand von Biomolekülen sichtbar machen und so die molekularen Veränderungen in ein Ausgangssignal umwandeln, das z.B. für diagnostische Zwecke genutzt werden kann. Funktionalisierte Nanopartikel können in gleicher Weise wirken und so den Zustand eines biologischen Promotors oder Inhibitors oder eines Reportermoleküls anzeigen. Gegenüber reinen Molekülmarkern zeichnen sie sich durch die besonderen photophysikalischen und elektronischen Eigenschaften der Nanopartikelkomponenten aus. Auch nanomechanische Funktionseinheiten auf der Basis von Biomolekül-modifizierten Nanopartikeln sind möglich.<sup>[94]</sup>

#### 3.1. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride zur Steuerung der Reaktivität von DNA

Enzymatische Umsetzungen von DNA-Molekülen auf der Oberfläche von Metall-Nanopartikeln, z.B. die Verlängerung der DNA-Kette, gelten als synthetisch anspruchsvolle Operationen. Die Verlängerung einer DNA-Kette erfordert zum einen die effiziente Hybridisierung der Matrize an den partikelgebundenen Primer, zum anderen muss das beteiligte Enzym, die DNA-Polymerase (das 68 kDa-Klenow-Fragment), zugänglich sein. Man muss davon ausgehen, dass die Kettenverlängerungsreaktion gegen sterische Einflüsse empfindlicher ist als die Hybridisierung. Bei DNA-Primern, die über einen HSC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-Linker an Gold-Nanopartikel gebunden waren, wurden Verlängerungseffizienzen von bis zu 100 % beobachtet.<sup>[95]</sup>

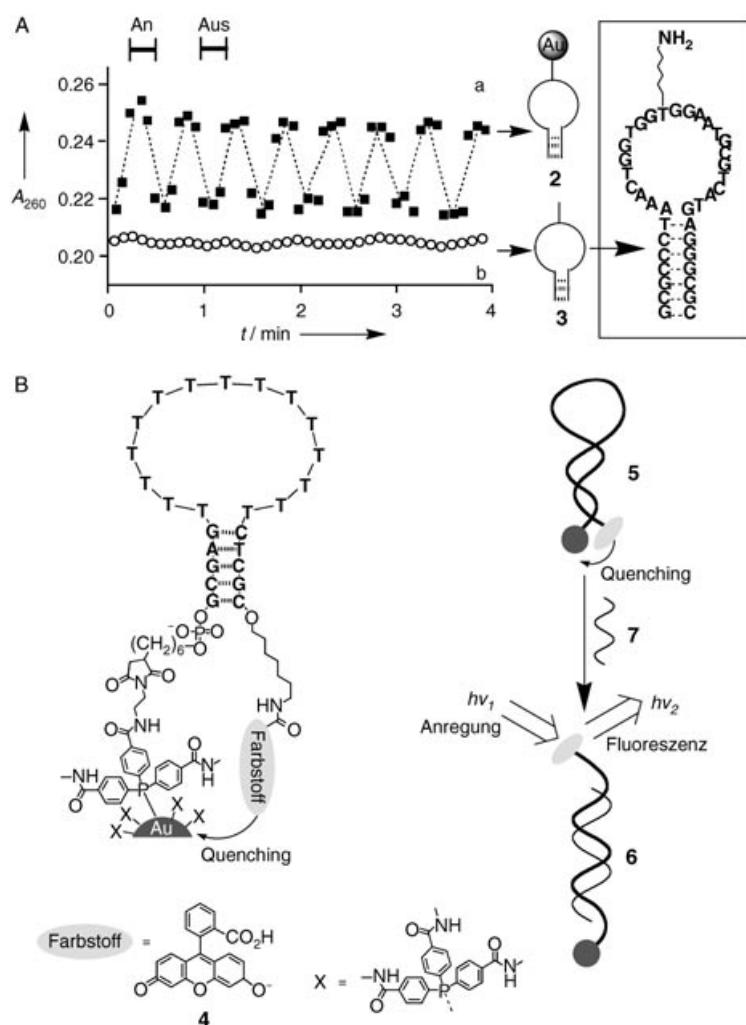
Biokatalytische Reaktionen an der DNA, wie Transkription oder Translation, erfordern die Komplexbildung von Enzymen mit der DNA-Kette. Die kompetitive Bindung anderer Moleküle an die DNA-Kette kann die Enzymbindung schwächen und den Prozess hemmen – sodass letztlich eine Genregulation möglich ist. Niedermolekulare Verbindungen,<sup>[96]</sup> Dendrimere<sup>[97]</sup> und Polymere<sup>[98]</sup> können effektiv an DNA binden und in einigen Fällen die Transkription hemmen. Ein entscheidender Punkt dieses Konzepts ist die Erzeugung einer geeignet präorganisierten Struktur, die eine kontrollierte Bindung an die DNA ermöglicht. Die besondere Herausforderung bei niedermolekularen Verbindungen besteht in der präzisen Synthese eines starren Gerüsts mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Bei Polymeren kommt es vor allem auf die genaue Positionierung der Substituenten entlang der Hauptkette und auf die makroskopische Konformation in Lösung an.

Eine ausgezeichnete Lösung bietet die Anwendung von Au-Clustern mit gemischten Monoschichten (mixed monolayer-protected clusters, MMPCs).<sup>[99]</sup> Ein solcher Überzug aus

einer selbstorganisierten Monoschicht stellt eine hochgeordnete Oberfläche für die Bindung von DNA bereit, die die gleiche Größenordnung hat (6–10 nm) wie DNA-bindende Proteine. Der zentrale Metallkern stabilisiert das Partikel und begrenzt die Zahl möglicher Konformationen des organischen Adsorbats. Wegen der Beweglichkeit der Thiole auf der Oberfläche der Nanopartikel kann die Bildung von Erkennungselementen in nachfolgenden Schritte gesteuert werden.<sup>[100]</sup> Hergestellt wurden Nanopartikel zur Erkennung doppelsträngiger DNA, indem Octanthiol auf der Goldoberfläche teilweise durch 11-Mercaptoundecyltrimethylammonium ersetzt wurde.<sup>[101]</sup> Die gemischte Monoschicht bindet negativ geladene DNA elektrostatisch über die an der Oberfläche fixierten positiv geladenen Ammoniumgruppen. Die Bindung von Enzymen, die an der Genregulation beteiligt sind, wird dagegen verhindert und so der biokatalytische Transkriptionsprozess gehemmt.

Eine einfache Methode zum Schutz vor DNA-Spaltung beruht auf der Anwendung von Konjugaten aus aminomodifizierten Siliciumdioxid-Nanopartikeln und Biomolekülen ( $45 \pm 4$  nm).<sup>[102]</sup> Negativ geladene DNA-Moleküle können auf der positiv geladenen Oberfläche der Nanopartikel angereichert werden und sind so gegen Abbau geschützt. Die DNA-Stränge lassen sich von den Nanopartikeln wieder ablösen und weisen dann die gleichen Eigenschaften wie freie DNA-Stränge auf.

Ein Konjugat aus einem Gold-Nanopartikel und einer Signalgeber-DNA („molecular beacon“) (**2**) wurde zur elektronischen „Fernsteuerung“ der DNA-Hybridisierung erprobt.<sup>[103]</sup> Durch induktive Kopplung eines Radiofrequenzfeldes (1 GHz) mit dem Gold-Nanopartikel (1.4 nm), das als Antenne fungiert, wird die lokale Temperatur der gebundenen DNA erhöht und dadurch die Denaturierung ausgelöst; die umgebenden Moleküle bleiben weitgehend unbeeinflusst. In Abbildung 5A, Kurve a, ist die Absorption einer Lösung des Gold-Nanopartikel-DNA-Komplexes **2** bei 260 nm als Funktion der Zeiten aufgetragen, während der das elektromagnetische Feld ein- und ausgeschaltet ist. Die Zunahme der Absorption zeigt die Denaturierung der DNA-Doppelhelix beim lokalen Erhitzen an, die Abnahme der Absorption nach Ausschalten des elektromagnetischen Feldes resultiert aus der Rehybridisierung. Der Übergang zwischen den beiden Zuständen ist vollständig reversibel. Im Kontrollexperiment mit einem DNA-Strang ohne Gold-Nanopartikel bleibt das elektromagnetische Feld ohne Wirkung (Abbildung 5A, Kurve b). Zwar wurden bereits andere Methoden zur induktiven Erwärmung von makroskopischen Proben beschrieben (z.B. zur Behandlung von Krebszellen durch elektromagnetisch induzierte Anregung biokompatibler superparamagnetischer Nanopartikel),<sup>[104]</sup> mithilfe der Gold-Nanopartikel-DNA-Konjugate lässt sich das Konzept aber entscheidend ausbauen. So können z.B. komplexe Operationen an spezifischen Stellen von Nucleinsäuren oder Proteinen (z.B. bei der Genregulation und spezifischen Aggregation von Biomolekülen) ausgelöst werden, während der Rest des Moleküls und benachbarte Spezies unbeeinflusst bleiben. Da es sich um kein optisches Anregungsverfahren handelt, ist diese Technik außerdem auch in stark streuenden Medien anwendbar.



**Abbildung 5.** A) Reversibler Übergang (a) zwischen der denaturierten und hybridisierten Konformation des Konjugats aus einem Gold-Nanopartikel und einem mit einem molekularen Signalgeber versehenen DNA-Strang **2**, induziert durch Ein- und Ausschalten des elektromagnetischen Radiofrequenzfeldes. Das freie DNA-Moleköl ohne Gold-Nanopartikel (**3**) wird vom elektromagnetischen Feld nicht beeinflusst (b). B) Steuerung der Fluoreszenz durch Übergang zwischen Haarnadel-Zustand **5** und gestrecktem Zustand **6** einer DNA-Kette bei Hybridisierung mit dem komplementären Oligonucleotid **7**. (Teil A mit Genehmigung aus Lit. [103].)

### 3.2. Biomoleköl-Nanopartikel-Hybride als Indikatoren für die Reaktivität von DNA

DNA-Moleküle, die an festgelegten Positionen mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher derivatisiert sind, können ein Fluoreszenzsignal erzeugen, das vom Abstand zwischen Farbstoff und Quencher abhängt. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Konformation der DNA-Kette ziehen. Gold-Nanopartikel können die Fluoreszenz von Chromophoren bis zu 100-mal besser dämpfen als molekulare Quencher und weisen auch höhere Quenchungswirkungen bei Farbstoffen auf, die im nahen Infrarot emittieren.

Ein DNA-Oligonucleotid wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein (**4**) oder Rhodamin 6G) am 3'-Ende funktionalisiert, und ein Gold-Nanopartikel, das mit einer einzelnen Maleimidgruppe funktionalisiert war, wurde kova-

lent an die  $(\text{CH}_2)_6\text{SH}$ -Gruppe am 5'-Ende der Nucleinsäure gekuppelt.<sup>[105]</sup> Das Molekül konnte zwei Konformationen einnehmen (Abbildung 5B): eine Stamm-Schleife-Konformation mit Fluorophor und Gold-Nanopartikel in unmittelbarer Nachbarschaft (Haarnadel-Zustand) und eine stäbchenförmige Konformation, bei der Fluorophor und Nanopartikel weit voneinander entfernt sind (offener Zustand). Der Haarnadel-Zustand (**5**) entsteht von selbst, da die komplementären Enden des DNA-Moleküls intramolekular einen Doppelstrang bilden. Der offene Zustand (**6**) wird hingegen erst durch Wechselwirkung und Hybridisierung mit einem zu analysierenden DNA-Molekül (**7**) erzeugt, das komplementär zum zentralen Teil des DNA-Moleküls ist. Dieses DNA-Molekül hybridisiert mit der modifizierten DNA, bildet eine ds-DNA, öffnet dadurch die Haarnadel-Struktur, vergrößert den Abstand zwischen Fluorophor und Nanopartikel und verstärkt damit die Fluoreszenz. Dieser Vorgang und das resultierende Signal kommen nur zustande, wenn die zu analysierende DNA komplementär zum zentralen Teil der Sensor-DNA ist. Das System wurde erfolgreich eingesetzt, um einzelne Basen-Fehlpaarungen zwischen DNA-Sequenzen aufzuspüren.<sup>[105]</sup> In kompetitiven Hybridisierungstests wurde gefunden, dass das beschriebene Nanopartikel-System achtmal mehr Punktmutationen nachweist als herkömmliche molekulare Signalgeber und die Nachweisempfindlichkeit auf das hundertfache steigt.

Auf der Basis von Gold-Nanopartikeln wurde eine neue Klasse von Nano-Biosensoren entwickelt, mit denen in einem homogenen Testsystem spezifische DNA-Sequenzen und Punktmutationen erkannt und nachgewiesen werden können.<sup>[106]</sup> An Gold-Nanopartikeln wurde einsträngige DNA fixiert, an deren anderem Ende ein organischer Farbstoff gebunden war. Durch die flexible DNA-Kette konnten sich Farbstoff und Gold-Nanopartikel auf einen geringen Abstand annähern, sodass die Fluoreszenz des Farbstoffs durch das Metall-Nanopartikel effizient gedämpft wurde. Die Hybridisierung der ss-DNA mit einem komplementären DNA-Analyten erzeugte einen starren Spacer zwischen Farbstoff und Gold-Nanopartikel, wodurch der Quenching-Prozess gehemmt wurde und die Fluoreszenz anstieg. Anders als konventionelle molekulare Signalgeber mit Stamm-Schleife-Struktur benötigen die Nanopartikel-Sonden keine Stamm-Komponente, und die Hintergrund-Fluoreszenz nimmt mit der Temperatur nur wenig zu.

### 3.3. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride zur Steuerung der Reaktivität von Enzymen

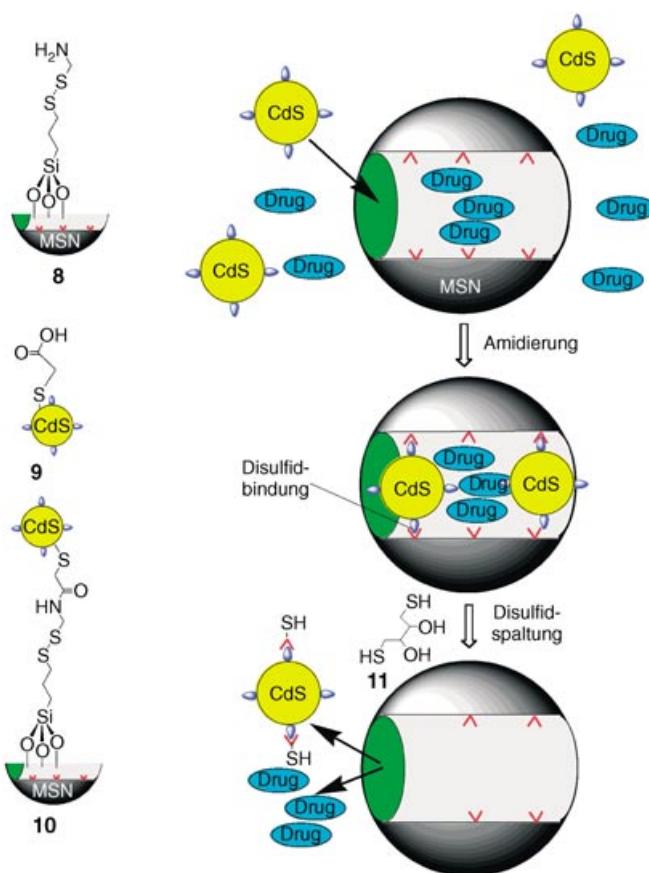
Funktionalisierte Nanopartikel können die Aktivität von Enzymen beeinflussen und z.B. enzymatische Reaktionen effizient inhibieren. So wirken etwa anionisch funktionalierte Nanopartikel nach einem zweistufigen Inaktivierungsmechanismus als hoch wirksame Inhibitoren von Chymotrypsin (ChT).<sup>[107]</sup> Die inhibierende Wirkung beruht auf der elektrostatischen Komplementarität zwischen den negativ geladenen Carboxyl-Endgruppen der Partikelhülle und den kationischen Resten, die in der Peripherie des aktiven Zentrums des Enzyms angeordnet sind. Im ersten, reversiblen

Inhibierungsschritt bildet sich ein Komplex zwischen Enzym und Nanopartikel. Im zweiten Schritt kommt es zur irreversiblen Denaturierung des am funktionalisierten Nanopartikel gebundenen Enzyms. Eine vollständige Inhibition der Enzymaktivität wurde bei einem Nanopartikel/ChT-Verhältnis von 1:5 gefunden, was sich durch die große Oberfläche des anionisch funktionalierten Nanopartikels erklärt (ca. 110 nm<sup>2</sup>). Diese „irreversible“ Inhibition von Chymotrypsin konnte durch Modifikation der Nanopartikel-Oberfläche *in situ* mit kationischem Tensid umgekehrt werden.<sup>[107b]</sup> Bis zu 50% der ursprünglichen Chymotrypsin-Aktivität wurde bei Zugabe eines langkettigen Tensids wiederhergestellt. Dynamische Lichtstreuungsexperimente zeigten, dass Chymotrypsin wieder von der Nanopartikel-Oberfläche abgelöst wurde.

Die kontrollierte Abgabe von Inhibitoren, Promotoren oder Cofaktoren in ein Reaktionsmedium kann als allgemeine Strategie zur Desaktivierung oder zur Aktivierung von Enzymen dienen. Auch die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen oder Neurotransmittern ist eine entscheidende Voraussetzung für die Regulation komplexer physiologischer biokatalytischer Vorgänge. Funktionalisierte CdS-Nanopartikel wurden verwendet, um Wirkstoffe und Neurotransmitter in Kanälen (Durchmesser ca. 2.3 nm) von mesoporösen Siliciumdioxid-Nanokügelchen (MSNs) vom Typ MCM-41 einzuschließen (Abbildung 6).<sup>[108]</sup> Diese Anordnung ermöglicht die kontrollierte Freisetzung von Substanzen. Die MSN-Kanäle wurden mit Vancomycin oder Adenosin-Triphosphat beladen und die MSN-Matrix mit einem aminoterminierten Linker derivatisiert. Dieser enthielt eine Disulfidgruppe und war über eine Siloxan-Ankergruppe mit der Matrix verbunden (**8**). Die so präparierte MSN-Matrix wurde mit Carbonsäure-modifizierten CdS-Nanopartikeln **9** inkubiert (ca. 2 nm). Die CdS-Nanopartikel passen genau in die Kanäle und werden kovalent mit den Aminogruppen der Matrix gekuppelt (**10**), sodass das Substrat eingeschlossen wurde. Die CdS-Nanopartikel wurden durch chemische Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den Nanopartikeln und der MSN-Matrix durch Dithiothreitol (**11**) entfernt, wobei die gespeicherten Substrate wieder freigesetzt wurden. Dieses MSN-System könnte eine wichtige Rolle für die Entwicklung der nächsten Generation ortsspezifischer Nanosysteme zur kontrollierten Freisetzung von Substanzen spielen.

### 4. Aggregation von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden

Die Erzeugung von zwei- und dreidimensionalen Strukturen aus anorganischen Nanopartikeln durch Organisation und Musterbildung ist eine Voraussetzung für den Aufbau chemischer, optischer, magnetischer und elektronischer Funktionseinheiten.<sup>[7]</sup> Eine durch spezifische biologische Wechselwirkungen induzierte Aggregation von Nanopartikeln ermöglicht den selbstorganisierten Aufbau komplexer Nanostrukturen mit neuen kollektiven Eigenschaften. Es gibt zahlreiche Ansätze zur Herstellung von 2D- und 3D-Arrays aus Metall- und Halbleiter-Nanopartikeln. Angewendet werden unter anderem: 1) Lösungsmittelverdampfung von hydrophoben Kolloiden,<sup>[109]</sup> 2) statistischer Einschluss von



**Abbildung 6.** System zur kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen und Neurotransmittern auf der Basis von mesoporösen Siliciumdioxid-Nanokugelchen (MSNs), die mit CdS-Nanopartikeln verschlossen sind. (Mit Genehmigung aus Lit. [108], Copyright American Chemical Society, 2003.)

Nanopartikel in Gel- und Glasmatrizen,<sup>[110]</sup> 3) matrizengesteuerte Synthese an strukturierten Oberflächen,<sup>[111]</sup> in porösen Proteinkristallen<sup>[112,113]</sup> oder in bakteriellen Überstrukturen,<sup>[114]</sup> 4) chemische Kupplung in Lösung mithilfe bifunktionaler Linker;<sup>[115,116]</sup> ein Beispiel hierfür ist die Alkandithiol-gerichtete Aggregation von Gold-Nanopartikeln.<sup>[115,116]</sup>

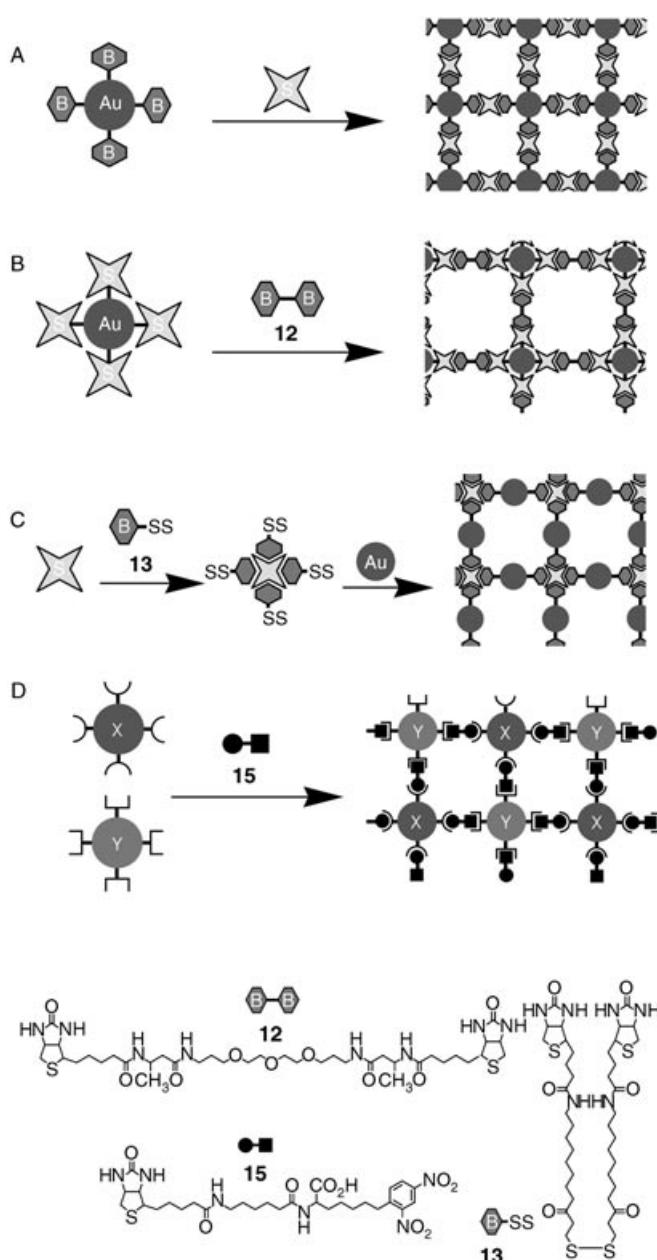
Es gibt mehrere gute Gründe, Biomoleküle als Bausteine von Nanopartikel-Strukturen einzusetzen: 1) Biomoleküle bieten eine große Auswahl von Bausteinen nahezu beliebiger Größe, Form und Funktionalität. 2) Es existieren zahlreiche chemische und biologische Methoden zur Modifizierung und Synthese von Biomolekülen (z.B. Synthese von Nucleinsäuren festgelegter Zusammensetzung und Form, Erzeugung monoklonaler Antikörper, gentechnische Modifikation von Proteinen), die zur gezielten Aggregation von Nanopartikeln genutzt werden können. 3) Biomaterialien können enzymatisch manipuliert werden. Proteinhydrolyse, Spaltung und Ligation von DNA-Strängen oder Replikation von Nucleinsäuren sind geeignete Methoden zur Erzeugung von Biomaterialien als Bausteine von Nanopartikel-Architekturen. 4) Natürlich vorkommende Reparaturmechanismen für Biomoleküle können zur Stabilisierung von Biomolekül-Nanopartikel-Strukturen genutzt werden. 5) Durch Vernetzung von Nanopartikeln mit Enzymen können biokatalytische

Anordnungen festgelegter Funktionalität erzeugt werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit zur Herstellung von Nanopartikeln mit regulierbaren physikalischen, chemischen und funktionalen Eigenschaften. Bei der Präparation vernetzter Nanopartikel sollten vorzugsweise zwei verschiedene Arten funktionalisierter Nanopartikel mit komplementären Einheiten eingesetzt werden. Zur Herstellung solcher komplementärer Biomolekül-Nanopartikel-Aggregate eignen sich biologische Wirt-Gast-Paare wie Biotin-Streptavidin,<sup>[117]</sup> Antigen-Antikörper<sup>[118]</sup> und komplementäre Oligonukleotide.<sup>[117,119,120]</sup> Eine Vielzahl vor allem optischer Methoden (z.B. differentielle Lichtstreuungsspektroskopie) wurde angewendet, um die biospezifische Aggregation von Nanopartikeln mit Proteinen und Oligonukleotiden zu untersuchen.<sup>[121]</sup> Kürzlich berichtet wurde über elektrophoretische und strukturelle Untersuchungen der DNA-gesteuerten Aggregation von Gold-Nanopartikeln.<sup>[122]</sup>

#### 4.1. Rezeptorinduzierte Aggregation von komplexierten Nanopartikeln

Proteinbasierte Erkennungssysteme können zur Organisation von anorganischen Nanopartikeln zu vernetzten Aggregaten genutzt werden. So wurde über die Wechselwirkung zwischen D-Biotin und dem biotinbindenden Protein Streptavidin (SAv) eine Nanopartikel-Aggregation induziert.<sup>[117]</sup> Die Erkennung zwischen wasserlöslichem Biotin und dem homotetrameren SAv erfolgt mit einer außergewöhnlich großen Affinitätskonstante von  $K_a > 10^{14} \text{ M}^{-1}$ . Es handelt sich damit um die stärkste gegenwärtig bekannte Ligand-Rezeptor-Bindung.<sup>[123]</sup> Ein weiterer Vorteil von SAv ist seine hohe chemische und thermische Stabilität. Die Anwendung des Biotin-Streptavidin-Systems zur Erzeugung supramolekularer Aggregate ist vor allem deshalb praktikabel, weil diverse Avidin-Analoga<sup>[124]</sup> und rekombinante SAv-Mutanten zur Verfügung stehen.<sup>[125]</sup> Ein weiter Bereich von Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten ( $K_a = 10^0 - 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) kann genutzt werden, was die Herstellung genau definierter Nanopartikel-Aggregate ermöglicht. Viele biotinylierte Materialien sind käuflich oder unter milden Bedingungen herstellbar. Zwei Methoden zur Aggregation von Nanopartikeln über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen stehen zur Verfügung: 1) Vernetzung von biotinylierten Nanopartikeln mit dem tetravalenten SAv-Rezeptor (Abbildung 7 A). 2) Vernetzung von SAv-modifizierten Nanopartikeln mit einem Dibiotin-Derivat (12) (Abbildung 7B). Zur Funktionalisierung von Metall- und Halbleiter-Nanopartikeln mit Biotin-Derivaten gibt es mehrere Synthesemethoden. Im einfachsten Fall werden Thiol- oder Disulfid-Derivate von Biotin direkt an den Metallnanopartikeln (z.B. aus Gold oder Silber) adsorbiert. Alternativ werden die Nanopartikel zuerst mit einer organischen „Hülle“ beschichtet (z.B. durch Polymerisation eines Trialkoxysilyl-Derivats oder durch Polymeradsorption) und dann kovalent mit Biotin modifiziert (z.B. durch Carbodiimid-Kupplung).

Gold-Nanopartikel, die mit Disulfid-derivatisierten Biotein-Einheiten funktionalisiert (13) und dann mit Streptavidin vernetzt wurden, bilden Aggregate mit den Biotin-SAv-

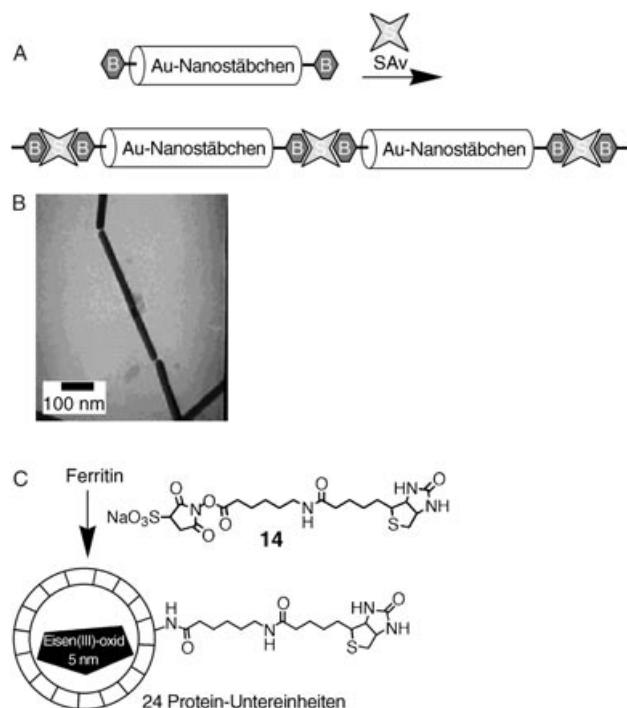


**Abbildung 7.** Bildung von Netzwerken mithilfe von Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen. A) Verknüpfung von Biotin-funktionalisierten Nanopartikeln mit Streptavidin; B) Verknüpfung von Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln mit Biotin-Dimeren; C) Bildung eines Netzwerks aus Streptavidin-verknüpften thiolderrivatisierten Biotineinheiten; D) Bildung eines Netzwerks aus zwei Arten von Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Erkennungsgruppen funktionieren und über einen bifunktionalen Linker aus einer Biotingruppe und einer Dinitrophenyl-Antigen-Einheit verbunden sind.

Erkennungspaaren zwischen den Nanopartikeln (Abbildung 7A).<sup>[117,126]</sup> Eine ähnliche Struktur kann auch in umgekehrter Reihenfolge aufgebaut werden, indem man SAv mit dem Disulfid-Biotin-Derivat umsetzt und den entstandenen Komplex mit Gold-Nanopartikeln reagieren lässt (Abbildung 7C).<sup>[126a]</sup> In beiden Fällen kommt es zu einer schnellen, spontanen Aggregation zu einem ungeordneten Netz aus Gold-Nanopartikeln. Dynamische Lichtstreuung, Kleinwin-

kel-Röntgenstreuung und Transmissionselektronenmikroskopie wurden zur Verfolgung des Prozesses und zur Produktcharakterisierung angewendet. Die Kinetik der Aggregationsbildung wurde mit einem modifizierten Aggregationsmodell nach Smoluchowski beschrieben.<sup>[126b]</sup> Anhand dieser kinetischen Analyse kann die Aggregatstruktur durch Optimierung der Bedingungen (molares Verhältnis zwischen Biotin-Nano-partikel-Hybrid und vernetzendem SAv) gesteuert werden.

Über eine verwandte SAv-induzierte Aggregation von Gold-Nanostäbchen wurde vor kurzem berichtet.<sup>[127]</sup> Die Stäbchen mit einem Seitenverhältnis von 18 wurden in Wasser in Gegenwart des formgebenden Tensids Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) hergestellt und dann mit einem Disulfidderivat von Biotin funktionalisiert. Bei Zugabe des Streptavidin-Linkers entstand ein unerwartet hoher Anteil an den Enden verbundener Stäbchen. Der Abstand zwischen den Stäbchen betrug etwa 4–5 nm, entsprechend der Größe eines Streptavidin-Moleküls (ca.  $4.5 \times 4.5 \times 5.8 \text{ nm}^3$ ). Auch die Winkel zwischen den Stäbchen entsprachen der Lage der vier Biotin-Bindestellen am Streptavidin-Molekül (Abbildung 8A).



**Abbildung 8.** A) Vernetzung Biotin-funktionalisierter Gold-Nanostäbchen an den Enden durch Streptavidin; B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Streptavidin-verknüpften Gold-Nanostäbchen; C) Biotin-funktionalisiertes Ferritin. (Teil B mit Genehmigung aus Lit.[127], Copyright American Chemical Society, 2003.)

Der Mechanismus, der zu der überproportionalen Verbrückung an den Enden der Stäbchen führt, ist noch unbekannt. Es gibt zwei mögliche Erklärungen: 1) Das Biotin-Disulfid kann das CTAB, das längs an den Gold-Nanostäbchen gebunden ist, nicht verdrängen und bindet daher bevorzugt an die {111}-Enden der Gold-Stäbchen; nach

Zugabe von SAv entstehen dann bevorzugt Bindungen zwischen den Enden. 2) Biotin bindet zwar von allen Seiten an die Stäbchen, Streptavidin kann aber aus sterischen Gründen nicht an den Längsseiten der Stäbchen koordinieren.

Gleich welcher Mechanismus zutrifft, beweisen die erhaltenen Nanostrukturen (Abbildung 8B), dass die Stäbchen nicht beliebig angeordnet sind, sondern durch chemische Bindungen organisiert wurden. Hieraus ergibt sich ein Ansatz für die Erzeugung von Aggregaten höherer Ordnung aus Nanomaterialien.

Als mögliche Vernetzungsagentien für Nanopartikel-Streptavidin-Hybride könnten künftig auch katalytische Proteine in Betracht gezogen werden. Zur Verbrückung der Gold-Stäbchen könnten andere Metalle wie  $\text{Ag}^0$  verwendet werden, wobei kontinuierliche Drähte resultieren würden.

Zur Herstellung eines weiteren Typs Biotin-Streptavidin-Nanopartikel wurde das native Protein Ferritin eingesetzt, das aus einer hohlen Polypeptidschale (8 nm Innen- und 12 nm Außendurchmesser) und einem Eisenoxid-Kern ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) von 5 nm Durchmesser besteht.<sup>[128]</sup> Der Eisenoxid-Kern lässt sich leicht reduktiv aus der Proteinhülle herauslösen, und der leere Apoferritin-Käfig kann anschließend in vitro mit anorganischen Oxiden, Sulfiden, Seleniden (z.B. MnO, FeS, CdS, CdSe)<sup>[129,130]</sup> oder auch komplexen Verbindungen wie Preußischblau remineralisiert werden.<sup>[131]</sup> Ein aktivierter Biotin-Succinimid-Ester **14** wurde kovalent mit Aminogruppen von Lysin aus der Polypeptidschale des Ferritins verbunden, sodass eine Biotin-funktionalisierte Proteinhülle mit einem Eisenoxid-Kern erhalten wurde (Abbildung 8C). Die funktionalisierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden dann durch Zugabe von SAv vernetzt und aggregiert.<sup>[132]</sup> Betrachtet man die Auswahl möglicher Nanopartikel für den Kern, ist dieses Ferritin-basierte Aggregat ein vielversprechendes Ausgangsmaterial für elektronische, magnetoelektronische und optoelektronische Funktionseinheiten.

Auch Antigen-Antikörper-Bindungen wurden zum Aufbau von Nanopartikel-Aggregaten genutzt.<sup>[38,118]</sup> In der einfachsten Version wurden Anti-DNP-IgE-Antikörper (DNP = Dinitrophenyl) auf 12 nm große Goldpartikel adsorbiert. Die Vernetzung erfolgte durch Zugabe eines synthetischen Antigens (Bis(*N*-2,4-dinitrophenyl)octamethylendiamin), das zwei durch einen Spacer getrennte DNP-Kopfgruppen enthält.

In einem komplexeren Ansatz können auch zwei unterschiedliche Arten von Nanopartikeln aggregiert werden. Hierzu werden Nanopartikel mit unterschiedlichen Biorezeptoren funktionalisiert (z.B. mit unterschiedlichen Antikörpern oder mit einem Antikörper und Streptavidin) und mit einem Liganden vernetzt, der zwei unterschiedliche Kopfgruppen enthält und für beide Rezeptoren affine Bindstellen bereitstellt. In einem Experiment wurden Gold-Nanopartikel funktionalisiert, und zwar eine Hälfte mit Anti-DNP-IgE, die andere mit SAv.<sup>[38,118]</sup> Der Linker (**15**) enthielt zur Vernetzung eine Biotin-Einheit, eine DNP-Gruppe und dazwischen einen Spacer (Abbildung 7D). Da jeder Ligand seinen jeweiligen Rezeptor erkennt (Biotin bindet an SAv, DNP an Anti-DNP-IgE), entsteht ein Netzwerk aus beiden Nanopartikeln.

Basierend auf der Aggregation von Nanopartikeln durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung in Lösung wurden Immunassays mit optischer Detektion entwickelt, z.B. ein lasergestütztes Doppelstrahlsystem zur Absorptionsmessung.<sup>[133,134]</sup> Der Assay basiert auf der Aggregation von Gold-Nanopartikeln, die mit Proteinantigenen beschichtet waren, durch die zugehörigen Antikörper. Die Aggregation der Gold-Nanopartikel führt zu einer Änderung in der Absorption (detektiert bei 635 nm). Die Nachweisgrenze für die Detektion der Antikörper liegt bei  $3 \times 10^{-8}\text{ M}$ .

Ein schnellerer Immunassay, mit dem sich der Analyt ohne Probenvorbereitung in komplexen biologischen Medien bestimmen lässt, basiert auf der Verwendung von Gold-Nano-hüllen, beschichteten Metall-Nanopartikeln und einem Di-elektrikum, dessen optische Resonanz eine Funktion der relativen Größe der Schichten ist.<sup>[135]</sup> Die Aggregation von Antikörper-Nanohülle-Konjugaten mit einem Extinktionspektrum im nahen Infrarot wurde spektroskopisch in Ge-genwart des Analyten verfolgt. Ein erfolgreicher Nachweis von Immunglobulinen gelang in Kochsalzlösung, Serum und sogar Vollblut.

Komplementäre Biokonjugate aus einem Antikörper-Antigen-Paar wurden auf lumineszierenden CdTe-Nanopartikeln (Quantenpunkten) unterschiedlicher Größe immobilisiert, und die Energieübertragung zwischen den Partikeln wurde untersucht.<sup>[136]</sup> Hierzu wurde das Antigen Rinderse-rumalbumin (BSA) mit rot emittierenden CdTe-Nanoparti-keln konjugiert, während der zugehörige Anti-BSA-Antikör-per, IgG, an grün emittierende CdTe-Nanopartikel gebunden war. Nach Bildung des BSA-IgG-Immunkomplexes trat ein resonanter Transfer von Fluoreszenzenergie (FRET) zwi-schen den beiden Nanopartikel-Typen auf. Die Lumineszenz der grün emittierenden Nanopartikel wurde gedämpft, wäh-rend die Emission der rot emittierenden Partikel zunahm. Durch Behandlung des Komplexes mit unmarkiertem Anti-gen wurde die Lumineszenz der grün emittierenden Quan-tenpunkte wiederhergestellt. Das Aggregat aus Antigen-Antikörper-CdTe-Nanopartikeln lässt sich daher als funk-tionale Überstruktur für den kompetitiven optischen Nachweis von Antigenen oder Antikörpern verwenden.

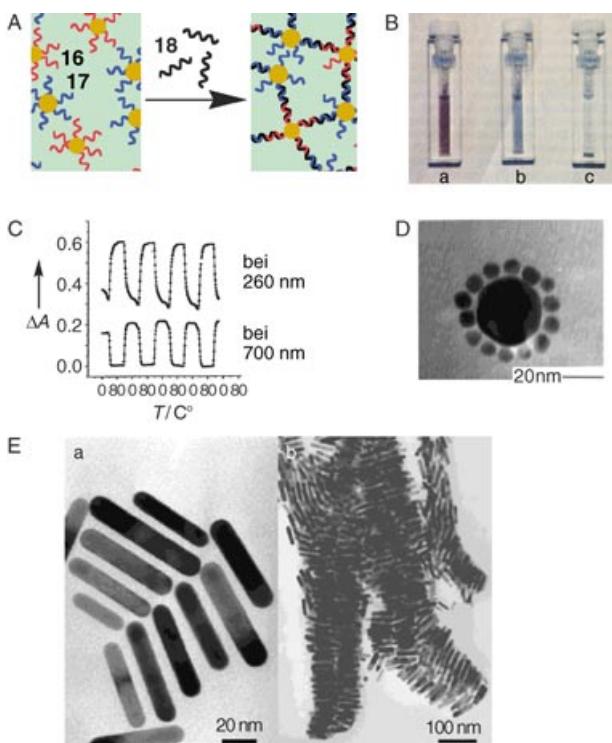
Ein neuer Ansatz zur Vernetzung von Nanopartikeln basiert auf der Verwendung von De-novo-Proteinen mit spezifischer Affinität zur Oberfläche anorganischer Kristalle.<sup>[21a]</sup> Diese Strukturen können direkt an unmodifizierte Oberflächen von Halbleiter-Nanopartikeln binden und sie so vernetzen. Ausgehend von einer kombinatorischen Biblio-thek von  $10^9$  statistisch zusammengesetzten Dodecapeptiden wurden De-novo-Proteine mit spezifischen Bindungsaffinitäten zu Einkristall-Halbleitern, darunter GaAs(100), GaAs(111), InP(100) und Si(100), entdeckt.<sup>[137]</sup>

#### 4.2. Nucleinsäure-Nanopartikel-Hybride zur Steuerung der Aggregatbildung

DNA-Moleküle sind wertvolle und vielseitige Linker für die gesteuerte Aggregation von Nanopartikeln.<sup>[119,120,138]</sup> Die Ketten können mit einstellbarer Länge und Zusammenset-zung erzeugt werden, und ihre Eigenschaften sind vorherseh-

bar. Mit doppelsträngiger DNA als starrem Spacer kann man den Abstand zwischen Nanopartikeln festlegen. Lange DNA-Ketten fungieren als Matrizen und können Nanopartikel mit komplementären DNA-Strängen in hoch geordneter Weise und mit definierten Abständen fixieren.

Um eine DNA-vermittelte Verknüpfung von Nanopartikeln nachzuweisen, wurden zwei Proben von Gold-Nanopartikeln (13 nm Durchmesser) mit zwei thioetherivatisierten, nicht komplementären DNA-Oligonucleotiden separat functionalisiert: Nanopartikel A mit 3'-SH-TACCGTTG-5' (**16**) und Nanopartikel B mit 5'-AGTCGTTT-3'-SH (**17**) (Abbildung 9A).<sup>[69a]</sup> Ein DNA-Linker **18** wurde konstruiert, der aus



**Abbildung 9.** A) Aggregation Oligonucleotid-funktionalisierter Gold-Nanopartikel durch Zugabe eines DNA-Strangs **18** mit Abschnitten, die zur DNA auf jedem Nanopartikel (**16**, **17**) komplementär sind. B) Küvetten mit den Gold-Nanopartikeln und dem zugegebenen DNA-Strang, der den Aggregationsprozess auslöst. a) DNA-funktionalisierte Nanopartikel bei 80 °C in unhybridisiertem Zustand; b) nach Abkühlen auf Raumtemperatur kommt es zur Assoziation der Nanopartikel; das Präzipitat hat sich noch nicht abgesetzt; c) Die aggregierten Nanopartikel haben sich am Boden der Küvette abgesetzt. C) Absorption der DNA-gekoppelten Nanopartikel-Netzwerke als Funktion der Temperatur. Die Änderungen spiegeln unterschiedliche Aggregationsgrade wider und werden durch die Assoziation (niedrige Temperatur) und Dissoziation (hohe Temperatur) der DNA ausgelöst. D) Ein „Satelliten-System“, das aus zwei unterschiedlich großen Nanopartikeltypen aufgebaut ist. E) TEM-Aufnahmen von Gold-Nanostäbchen, die durch DNA-Hybridisierung organisiert sind. (Teile A–C aus Lit. [69a], Teil D aus Lit. [142], Teil E aus Lit. [144] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.)

einer zentralen ds-DNA und zwei flankierenden einzelsträngigen Fragmenten besteht. Diese beiden einsträngigen Abschnitte waren komplementär zu den Oligonucleotiden an den Nanopartikeln A und B. Beim Mischen des Linkers mit

den beiden Nanopartikeln wurden die Partikel zu Aggregaten vernetzt. Diese sollten theoretisch eine gewisse Regelmäßigkeit aufweisen, da jedoch beide Partikelarten identische Kerne enthalten, konnte dies nicht nachgewiesen werden.

Bei der Aggregation änderte sich die Farbe der Lösung durch ein kollektives Phänomen, das von dem kleinen Abstand zwischen den Partikeln herrührt. Einzelne Gold-Nanopartikel sind aufgrund ihrer Plasmonenabsorption rot. Durch die Aggregation kommt es zur Plasmonenkopplung zwischen den Partikeln, die eine zusätzliche Absorptionsbande bei niedrigeren Energien verursacht (Abbildung 9B). Der Assoziationsprozess ist temperaturabhängig: Die aggregierten Gold-Nanopartikel dissoziieren bei Erhöhung der Temperatur reversibel (weil die Doppelstränge aufschmelzen) und assoziieren bei Temperatursenkung, wenn die Stränge wieder hybridisieren. Dies wird durch reversible Änderungen im Spektrum sichtbar (Abbildung 9C).

In einem Kontrollexperiment wurde das Partikelgemisch mit einem nichtkomplementären Linker versetzt – es wurde kein Farbumschlag sichtbar. Änderungen der optischen und elektronischen Eigenschaften von Nanopartikeln bei ihrer Aggregation ermöglichen es, den Assoziationsprozess zu verfolgen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zur Entwicklung optischer Biosensoren.<sup>[139–141]</sup> Ein Farbumschlag liegt auch dem von Mirkin et al.<sup>[139]</sup> entwickelten Northwestern-Spot-Test zugrunde – der einfachsten und wichtigsten Analysemethode für die Messung der Assoziation von Gold-Nanopartikeln. Mit dieser extrem empfindlichen Methode kann zwischen aggregierten und nichtaggregierten Gold-Nanopartikeln in wässriger Lösung unterschieden werden, wobei die Farbe bei Aggregation von Rot nach Blau umschlägt. Der Test wird so ausgeführt, dass ein Tröpfchen einer wässrigen Lösung der Partikel auf einer Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie-Platte verdampft wird. Ein blauer Fleck zeigt Aggregation an, ein roter Fleck frei dispergierte Partikel.

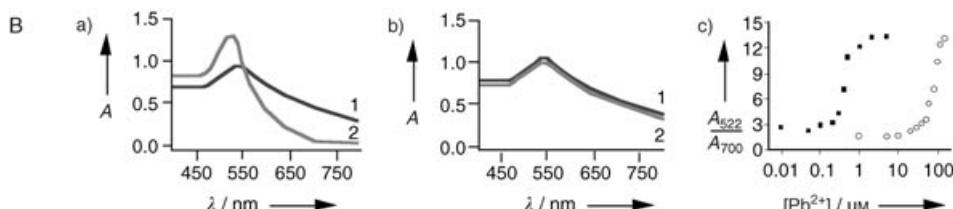
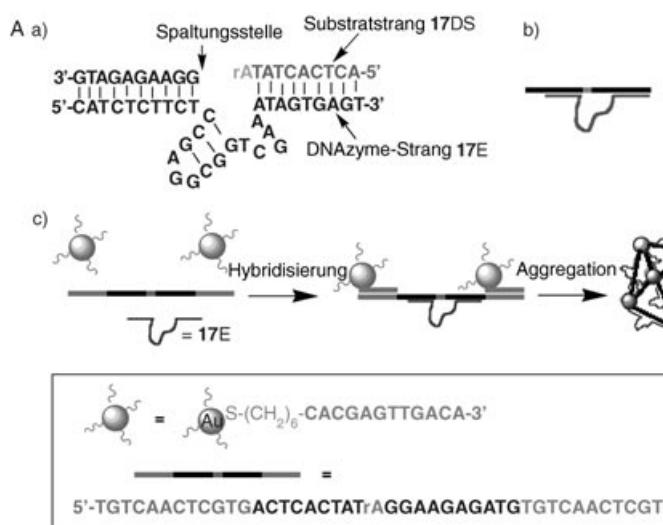
In einem komplexeren Experiment wurde eine Mischung DNA-funktionalisierter Gold-Nanopartikel mit Durchmessern von 40 nm (A) und 5 nm (B) mit einem DNA-Linker vernetzt.<sup>[142]</sup> Auf der Oberfläche der größeren Partikel (A) lagerten sich viele kleine Partikel (B) an, sodass ein „AB<sub>n</sub>-Satellitensystem“ entstand (Abbildung 9D). Durch Vernetzung dieser Satelliten-Aggregate entsteht ein dreidimensionales Netzwerk (AB<sub>n</sub>)<sub>m</sub>. Ein wichtiger Faktor für die optischen Eigenschaften des Netzwerkes ist die Länge der vernetzenden DNA-Oligonucleotid-Brücken. Sie bestimmt nicht nur die Abstände zwischen den Partikeln, sondern auch die Aggregationsgeschwindigkeit und damit die Zahl der Partikel je Aggregat.<sup>[143]</sup> In einem ähnlichen Ansatz wurden DNA-funktionalisierte CdSe/ZnS-Nanopartikel und Gold-Nanopartikel mit einem komplementären Linker zu einem binären Netzwerk verbunden.<sup>[70]</sup> Durch Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie wurden kooperative optische und elektronische Phänomene bei dem resultierenden Material nachgewiesen.

Aus DNA-funktionalisierten Gold-Nanostäbchen entstehen Mikrostäbchen aus vielen vernetzten Nano-Einheiten (Abbildung 9E).<sup>[144]</sup> Dieses Material hat ungewöhnliche anisotrope Eigenschaften.

Der Nachweis unterschiedlicher Aggregationszustände mit Gold-Nanopartikeln als kolorimetrischen Reporterkomponenten wird als Messprinzip in der DNA-Sensorik genutzt.<sup>[139–141]</sup> Die Empfindlichkeit und Selektivität dieser Methode kommt anderen, etablierten Methoden gleich, z.B. solchen auf Fluoreszenzbasis. Die Methode der Nanopartikel-Aggregation wurde auch zur Detektion von anderen Analyten als der DNA eingesetzt, z.B. von Schwermetallionen,<sup>[145]</sup> Kaliumionen<sup>[146]</sup> und Protein A.<sup>[134]</sup>

Kürzlich berichtet wurde über die kontrollierte Aggregation von Nucleinsäure-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln als Sonden für den Nachweis von  $Pb^{2+}$ -Ionen oder Adenosin durch DNAzyme.<sup>[147]</sup> Bei der Untersuchung katalytischer Desoxyribonucleinsäuren (katalytische DNAs oder DNAzyme) wurden spezifische DNAzyme, die  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  binden, durch kombinatorische In-vitro-Selektion aufgespürt.<sup>[148]</sup> Besonders das DNAzym „8-17“ zeigte hohe Aktivität und Spezifität für  $Pb^{2+}$ -Ionen.<sup>[149]</sup>

Die Nucleinsäuresequenz 17E bindet  $Pb^{2+}$  mit hoher Affinität. Der entstehende Komplex katalysiert spezifisch die Spaltung der komplementären Nucleinsäure 17DS, die als Basen Desoxyribonucleoside (sowie Adenosinribonucleosid (rA)) an der Spaltstelle enthält (Abbildung 10 A,a).<sup>[147a]</sup>



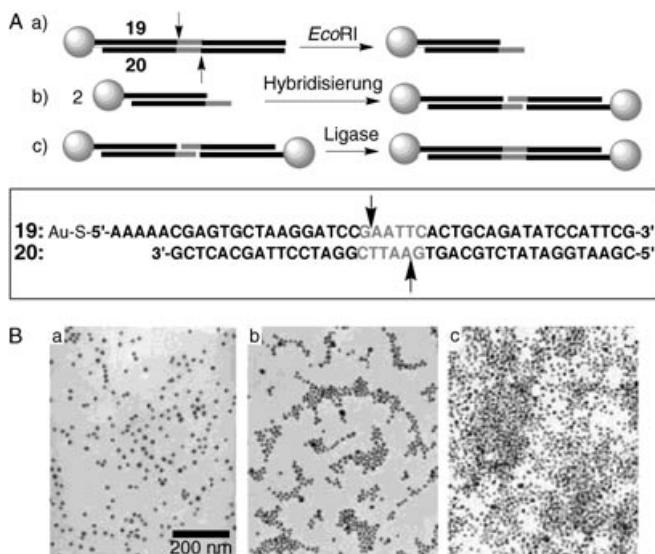
**Abbildung 10.** A) DNAzyme zur Analyse von Metallionen: a) Sekundärstruktur des DNAzym „8-17“, bestehend aus einem Enzymstrang (17E) und einem Substratstrang (17DS). Die Spaltstelle ist mit einem Pfeil markiert. Mit Ausnahme des Adenosin-Ribonucleosids (rA) an der Spaltstelle sind alle anderen Nucleoside Desoxyribonucleoside. b) Spaltung von 17DS durch 17E in Gegenwart von  $Pb^{2+}$ -Ionen. c) DNAzym-gezielte Assoziation von Oligonukleotid-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln und ihre Anwendung zum  $Pb^{2+}$ -Nachweis. B) UV/Vis-Absorptionsspektren des aktiven 17E-DNAzym-Nanopartikel-Sensors (a) und eines inaktiven 17Ec-DNAzym-Nanopartikel-Sensors (b) in Abwesenheit von  $Pb^{2+}$  (1) und in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$   $Pb^{2+}$  (2). c) Kalibrierkurven für die  $Pb^{2+}$ -Analyse, wenn als Enzymstrang nur der aktive 17E vorliegt (gefüllte Quadrate) und bei einem Verhältnis von 17E zu 17Ec von 1:20 (offene Kreise). (Mit Genehmigung aus Lit. [147], Copyright American Chemical Society, 2003.)

Durch die Spaltung der doppelsträngigen Nucleinsäure wird deren Schmelztemperatur erniedrigt, und die Einzelstränge lassen sich leicht voneinander trennen (Abbildung 10 A,b). Das Substrat des DNAzym (17DS) wurde mit Nucleinsäuren verlängert, die komplementär zu sekundären Nucleinsäure-markierten Gold-Nanopartikeln sind. Beim Mischen der drei Komponenten (des DNAzym 17E, des komplementären Nucleinsäure-Substrats 17DS und des Nucleinsäure-markierten Gold-Nanopartikels) hybridisieren die entsprechenden Nucleinsäureabschnitte und das System aggregiert unter Clusterbildung (Abbildung 10 A,c). Das Aggregat zeigte die charakteristische gekoppelte Plasmonenabsorption (Abbildung 10B,a, Kurve 1). Die Zugabe von  $Pb^{2+}$  löste die DNAzym-katalysierte Spaltung der komplementären Nucleinsäure 17DS aus, wobei die Gold-Nanopartikel-Aggregate getrennt wurden und die lokalisierte Plasmonenabsorption der nichtaggregierten Gold-Nanopartikel auftrat (Abbildung 10B,a, Kurve 2). Mit diesem Test konnten  $Pb^{2+}$ -Ionen im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 und 4  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Abbildung 10 B,c, gefüllte Quadrate). In einem Kontrollexperiment wurde belegt, dass das DNAzym als aktive Komponente beim  $Pb^{2+}$ -Nachweis fungiert: Der Thyminrest an Position 10 der Sequenz wurde gegen Cytosin ausgetauscht, sodass eine Komplementarität in der Schleifenregion des DNAzym entstand (17Ec). Als Folge sank die enzymatische Aktivität der Duplexstruktur in Gegenwart von  $Pb^{2+}$  (Abbildung 10B,b, Kurven 1 und 2) und damit auch die Empfindlichkeit des Systems (Abbildung 10B,c, offene Kreise).

Um die Methode auf ein breiteres Spektrum an Analyten anwenden zu können, wurde ein kolorimetrischer Adenosin-Biosensor konstruiert, der auf der Aptazym-gerichteten Assoziation von Gold-Nanopartikeln beruht.<sup>[147b]</sup> Das Aptazym leitete sich von dem DNAzym 8-17 mit einem Adenosin-Aptamer-Motiv ab, das die DNAzym-Aktivität durch allosterische Wechselwirkungen modulierte, die von der Anwen- senheit von Adenosin abhingen. Ohne Adenosin war das Aptazym inaktiv, und die Substratstränge vernetzten die DNA-funktionalisierten, 13 nm großen Goldpartikel (unter Blaufärbung). Mit Adenosin wurde das Aptazym aktiviert, der Substratstrang ge- spalten und die Bildung der

Nanopartikel-Aggregate unterbunden. Es zeigte sich die rote Farbe der einzelnen Gold-Nanopartikel. Adenosin-Konzentrationen bis zu 1 mm wurden halbquantitativ durch den Farbumschlag von Blau nach Rot oder quantitativ durch das Extinktionsverhältnis bei 520 und 700 nm bestimmt. Unter den gleichen Bedingungen blieb der Ansatz mit 5 mm Guanosin, Cytidin oder Uridin ausschließlich blau, was die gute Selektivität des Sensors bestätigt. Aptamere für zahlreiche Klassen wichtiger Analyte wurden bereits selektiert und können an das Aptazym-System durch rationales Design oder weitere Selektion angepasst werden. Basierend auf diesem Ansatz können kolorimetrische Sensoren für viele wichtige Analyte entwickelt werden, wobei es keine Rolle spielt, ob der Analyt direkt an der Spaltungsreaktion beteiligt ist oder nicht.

Biokatalytische Umwandlungen funktionalisierter Oligonucleotid-Aggregate wurden zur kontrollierten Assoziation von Nanopartikeln und zur Stabilisierung der Partikelaggregate genutzt.<sup>[150]</sup> Gold-Nanopartikel (15 nm) wurden mit einer thiolderivatisierten Einzelstrang-DNA (45 Basen, **19**) beladen (Abbildung 11 A). Die DNA wurde anschließend



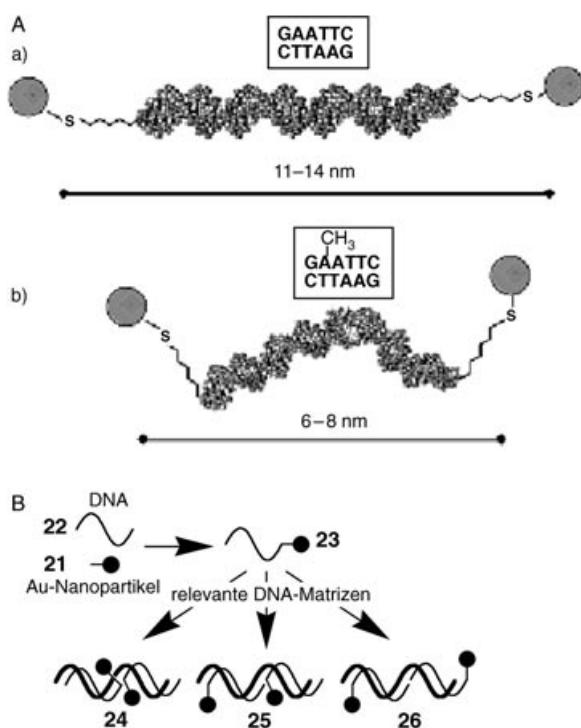
**Abbildung 11.** A) Kontrollierte Assoziation von Gold-Nanopartikeln durch biokatalytische Umwandlung von Oligonucleotiden: a) Gold-Nanopartikel, die mit ds-DNA modifiziert sind, werden mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt, das die DNA spaltet und kohäsive Enden hinterlässt (grau: Erkennungssequenz des Enzyms; Pfeile: Spaltstellen des Enzyms auf jedem Strang). b) Zwei kohäsive Enden hybridisieren und erzeugen eine schwache Assoziation der Partikel. c) Die DNA-Stränge werden an der Hybridisierungsstelle kovalent durch DNA-Ligase zu einem stabilen, 40 Basenpaare langen doppelsträngigen Linker zwischen den Partikeln verbunden. B) TEM-Analyse der DNA-Nanopartikel-Komplexe vor (a) und nach der Behandlung mit EcoRI (b) sowie nach der folgenden Ligase-Reaktion (c). (Mit Genehmigung aus Lit. [150].)

durch Hybridisierung mit einer komplementären Einzelstrang-DNA **20** in die Doppelstrangform überführt. Die DNA-Sequenz war so gewählt, dass die Doppelstränge auf den Partikeln Erkennungsstellen für eine Reihe von Restriktionsendonukleaseen enthalten. Nach der Hybridisierung ent-

hielt das System keinerlei Einzelstrang-DNA mehr, die weiter mit komplementären Linker-Strängen hätte hybridisieren können. Um reaktive Stellen zu erzeugen, wurden die Doppelstränge mit dem Restriktionsenzym EcoRI spezifisch gespalten; zurück blieb ein kohäsives Ende, das wieder hybridisieren konnte (Abbildung 11 A, Schritt a). Nach diesem ersten enzymatischen Schritt wurden die neu freigelegten kohäsiven Enden über die nur vier komplementären Basenpaare relativ labil zu einem schwach assoziierten Partikel-Aggregat hybridisiert (Abbildung 11 A, Schritt b). Der Prozess wurde mit TEM untersucht (Abbildung 11 B, Aufnahmen a und b). Die Bildung kleiner Aggregate lässt sich deutlich von der statistischen Verteilung einzelner Partikel vor der Enzymbehandlung unterscheiden. Um das System in diesem Stadium zu stabilisieren, wurden die Stränge an den hybridisierten Enden in einem zweiten enzymatischen Schritt durch die T4-DNA-Ligase kovalent verbunden (Abbildung 11 A, Schritt c). Im TEM wurden deutlich größere Aggregate beobachtet, die aufgrund der viel stärkeren Bindung zwischen den Partikeln durch den neu gebildeten, 40 Basenpaare langen doppelsträngigen Linker entstanden (Abbildung 11 B, Aufnahme c). In dieser Sequenz biokatalytischer Reaktionen werden die statistisch verteilten DNA-beschichteten Gold-Nanopartikel durch einfache, vorhersagbare Manipulationen mit DNA-prozessierenden Enzymen zuerst in schwach assoziierte Strukturen und dann in ein aggregiertes System überführt.

Proteine wie bakterielle DNA-Methyltransferasen (M.EcoRI und M.HhaI) oder Restriktionsendonukleasen (R.EcoRI) können DNA binden und spezifische Konformationsänderungen hervorrufen. M.EcoRI erkennt die Sequenz GAATTC und methyliert das zweite Adenin, indem die DNA um etwa 55–59° gebogen und das Zieladenin aus dem DNA-Duplex herausgeklappt wird. Durch diesen Vorgang kann der Abstand zwischen Nanopartikeln, die mit ds-DNA vernetzt sind, gezielt verändert werden. In einem Experiment wurde ein 40mer-Duplex mit einer entsprechenden Zielsequenz (GAATTC) als starrem Spacer zwischen zwei Gold-Nanopartikeln (Durchmesser 1.4 nm) eingebaut, woraus sich ein Abstand von 11–14 nm ergibt (Abbildung 12 A, Struktur a).<sup>[151]</sup> Bei Zugabe von M.EcoRI zu einer Lösung des ds-DNA-Gold-Nanopartikel-Hybrids kommt es zu einer Bindung des Proteins und einer biokatalytischen Methylierung der Adeninbase. Der Abstand zwischen den Gold-Nanopartikeln nimmt drastisch auf 6–8 nm ab (Abbildung 12 A, Struktur b) und korreliert mit den erwarteten topologischen Änderungen, die durch die Bindung von M.EcoRI an die DNA ausgelöst werden.

Lange DNA-Moleküle, die in der Lage sind, komplementäre DNA-Fragmente in unterschiedlichen Domänen des Strangs zu koordinieren, fungieren als Matrizen für den spezifischen Aufbau von linearen Aggregaten.<sup>[152,153]</sup> Um eine Vernetzung von Nanopartikeln in mikroskopischem Maßstab zu verhindern, wurden Gold-Nanopartikel mit einer einzelnen Maleimidgruppe (**21**) funktionalisiert und mit thiolderivatisierten DNA-Oligonucleotiden (**22**) umgesetzt. Die mit einer einzelnen DNA funktionalisierten Gold-Nanopartikel (**23**), die auf diese Weise erhalten wurden, wurden mit den komplementären Domänen auf der DNA-Matrize hybridisiert.



**Abbildung 12.** A) Enzymgesteuerter Abstand zwischen DNA-verbrückten Gold-Nanopartikeln: a) ds-DNA-Gold-Nanopartikel-Hybrid mit der Erkennungsstelle für *M.EcoRI*; b) das Hybrid mit einer 59°-Biegung nach der Bindung des Enzyms *M.EcoRI*. B) Kontrollierter Aufbau von Mehrteilchenkonjugaten durch Hybridisierung auf einem DNA-Templat. (Teil A mit Genehmigung aus Lit. [151], Copyright American Chemical Society, 2002.)

siert (Abbildung 12B). Durch individuelle Platzierung der Nanopartikel an spezifischen komplementären Domänen der Matrize gelingt es, die Abstände zwischen den Nanopartikeln zu steuern und unterschiedliche Typen von Nanopartikeln (verschiedene Größen, Materialien) kontrolliert auf der Matrize zu positionieren. Auf diese Weise können unterschiedliche Eigenschaften der Nanopartikel-Aggregate eingestellt werden. Beispielsweise können zwei DNA-funktionalisierte Gold-Nanopartikel in drei unterschiedlichen Orientierungen zueinander auf einer DNA-Matrize positioniert werden: Kopf-Kopf (**24**), Kopf-Schwanz (**25**) und Schwanz-Schwanz (**26**). Je nach Anordnung resultieren unterschiedliche Abstände zwischen den Nanopartikeln.

Kürzlich berichtet wurde über die vernetzungsfreie Aggregation von DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln, induziert durch Hybridisierung einer Ziel-DNA.<sup>[154]</sup> Die Gold-Nanopartikel (15 nm) wurden mit einzelsträngiger DNA modifiziert (ca. 200 DNA-Moleküle je Partikel). Während die unbeschichteten Gold-Nanopartikel in 0.1M NaCl sofort aggregierten, blieben die DNA-funktionalisierten Partikel in Gegenwart von bis zu 2.5M NaCl unverändert. In diesem Falle stabilisierte die an der Partikeloberfläche immobilisierte DNA die Nanopartikel-Dispersion. Die Dispersion wurde nun mit einer äquivalenten Menge komplementärer DNA versetzt, die mit der immobilisierten DNA auf den Nanopartikeln hybridisierte. Bei NaCl-Konzentrationen

oberhalb von 0.5M kam es zum schnellen Farbumschlag (<3 min) nach Purpur, der die Partikel-Aggregation anzeigen.

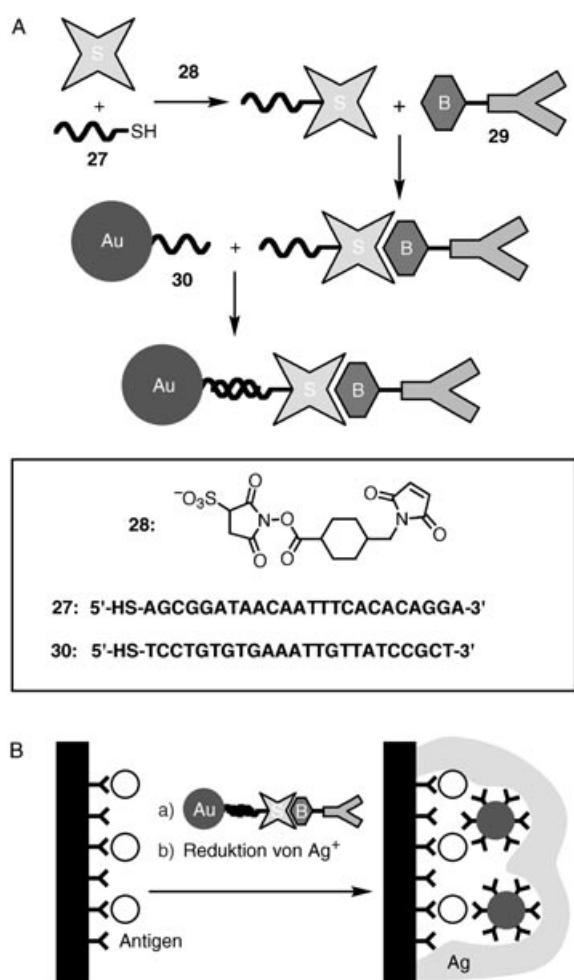
Der Mechanismus dieses Vorgangs ist gegenwärtig nicht vollständig verstanden. Wahrscheinlich spielt der Konformationsübergang der immobilisierten DNA eine entscheidende Rolle. Die Bildung eines Duplex zwischen immobilisierter Sonde und zugegebener DNA stabilisiert und verstift diese Konformation. So werden möglicherweise zwei Arten abstoßender Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln verringt: 1) Die elektrostatische Abstoßung kann durch den Abschirmungseffekt verringert werden, wenn die dichte Konformation die Bindung mit den Gegenionen verstärkt. 2) Die sterische Abstoßung nimmt ab, wenn die Versteifung der DNA den Entropieeffekt reduziert. Wenn die Abstoßung durch die Bildung von Doppelsträngen an der Oberfläche deutlich reduziert wird, verbleibt die London-Van-der-Waals-Anziehung zwischen den Nanopartikeln als die treibende Kraft für die Aggregation. Die Anziehungskräfte wirken über weite Entfernung und verursachen die schnelle Aggregation.

Auch Peptid-Nucleinsäuren (PNAs) – DNA-Analoga, in denen das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat durch ein Polypeptid-Rückgrat ersetzt wurde – können die Aggregation steuern.<sup>[155]</sup> Gold-Nanopartikel ( $13 \pm 1.2$  nm) wurden mit unterschiedlichen PNA-Primern verknüpft und zur selbstorganisierten Aggregation durch Hybridisierung komplementärer PNA-Sequenzen eingesetzt. PNA-Komplexe haben drei besondere Vorteile für die Synthese von Nanomaterialien: 1) Sie sind stabiler als DNA-Duplex, besonders bei kurzen Sequenzen. 2) Sie sind empfindlicher für Fehlpaarungen. 3) Anders als ein Zucker-Phosphat-Rückgrat kann ein Polypeptid leicht modifiziert werden, z.B. durch Ersatz von Glycin durch eine andere Aminosäure. Auf diese Weise lassen sich die strukturellen und elektrostatischen Eigenschaften des Moleküls justieren, sodass die Dynamik der Assoziation regulierbar wird.

Neben ihren Anwendungen bei der Nanofertigung kommen PNA-Nanopartikel insbesondere für einen Einsatz in der Nanosensorik infrage. Die hohe Empfindlichkeit der PNA für Fehlpaarungen einzelner Basen könnte zu besser diskriminierenden Sensoren für eine Zielsequenz vor einem unspezifischen Hintergrund führen.

#### 4.3. Kompositaggregate aus Nucleinsäuren, Proteinen und Nanopartikeln

Die Kombination der Syntheseverfahren für biomolekulare funktionisierte Nanopartikel (siehe Abschnitte 2.1–2.3) mit der Verwendung von Proteinen mit spezifischen Affinitäten (z.B. Streptavidin, Antikörper), Oligonucleotiden und Nanopartikeln als Bausteine ermöglicht die Konstruktion ausgefeilter Biomolekül-Nanopartikel-Hybridcluster (Abbildung 13A).<sup>[21a]</sup> Zur Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit Antikörpern wurde ein mehrstufiges Verfahren entwickelt.<sup>[156]</sup> 5'-Thiolmodifizierte Oligonucleotide (**27**) wurden kovalent über den heterobifunktionalen Linker Sulfoxuccinimidyl-4-(maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure (**28**) an Streptavidin gebunden. Das entstehende Kon-



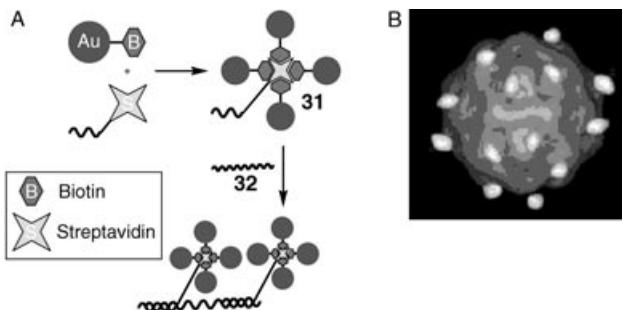
**Abbildung 13.** A) Bildung eines Konjugats aus einem Gold-Nanopartikel und dem IgG-Antikörper. B) Verwendung des Konjugats zum Aufspüren von Antigenen.

jugat hat vier Bindestellen für Biotin-Liganden und eine Nucleinsäure-Funktion. Die Streptavidin-Rezeptorstellen wurden mit biotinylierten Antikörpern (**29**) gegen Maus-IgG ( $\alpha\text{M}-\text{IgG}$ ) oder Kaninchen-IgG ( $\alpha\text{R}-\text{IgG}$ ) zu DNA-markierten Antikörper-Konjugaten umgesetzt, die mit der einen Seite an komplementäre DNA, mit der anderen Seite an die zugehörigen Antigene binden. Diese Aggregate wurden mit Gold-Nanopartikeln umgesetzt, die mit zur DNA-Markierung komplementären Oligonucleotiden (**30**) funktionalisiert waren. Es wurden Gold-Nanopartikel erhalten, die mit den Antikörper-Molekülen modifiziert waren. Dieses Konjugat wurde als Marker in einem Immunassay der zugehörigen Antigene verwendet, die an eine Oberfläche adsorbiert waren. Die Verknüpfung der Gold-Nanopartikel mit dem Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch die stromlose Abscheidung von Silber auf den Gold-Nanopartikeln weiter verstärkt (Abbildung 13B).<sup>[156]</sup>

Eine Kombination aus Rezeptorproteinen und Oligonucleotiden als Brückenelementen für die gerichtete Aggregation von Nanopartikeln ermöglicht die komplexe Strukturierung von Aggregaten.<sup>[157]</sup> So entstand bei der Reaktion von Streptavidin mit biotinylierter DNA ein Konjugat von SAv

mit vier DNA-Einheiten.<sup>[157a]</sup> Mit diesem Konjugat als Baustein für die Aggregation von DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln erhielt man ein Netzwerk, dessen Grundmotiv sich von der Anordnung unterscheidet, die bei der direkten Aggregation DNA-funktionalisierter Nanopartikel durch komplementäre Oligonukleotide erhalten wurde.

Eine noch interessantere Form der Aggregation wird beobachtet, wenn man Gold-Nanopartikel zunächst mit SAv zu Nanostrukturen kombiniert und diese anschließend auf einer DNA-Matrize anordnet (Abbildung 14 A).<sup>[158]</sup> In diesem Ex-



**Abbildung 14.** A) Aufbau von Clustern aus vier Nanopartikeln und deren Anordnung zu linearen Konjugaten entlang eines DNA-Templats. B) Elektronendichtekarte des Kuherbsen-Mosaikvirus, markiert mit Goldclustern von 1.4 nm. (Teil B mit Genehmigung aus Lit. [159].)

periment wurden 1.4 nm große Gold-Nanopartikel, an denen ein einzelner Aminosubstituent angebracht war, mit einer Biotingruppe derivatisiert. Am Biotinrest wurden dann die Nanocluster zu einer tetraedrischen Überstruktur organisiert, die durch die Geometrie der Biotin-Bindestellen des Streptavidins definiert war. Vor der Clusterbildung wurde SAv mit einem einzelnen DNA-Moleköl derivatisiert. Die tetraedrischen Cluster aus vier Gold-Nanopartikeln (**31**) – jedes mit einem einzigen DNA-Schwanz – wurden auf einer DNA-Matrize angeordnet (**32**), wobei Positionen und Abstände durch die Sequenz der Matrize diktiert wurden. Dieser Ansatz könnte die Erzeugung fast beliebiger Strukturen aus Nanopartikeln jeder Größe und jedes Materials möglich machen.

Nanopartikel wurden auch für die ortsspezifische Markierung von komplexen biologischen Einheiten wie Viren eingesetzt. So wurde das Kuherbsen-Mosaikvirus (cowpea mosaic virus, CPMV), mit einer Hülle von 30 nm Durchmesser, mit Gold-Nanopartikeln von 1.4 nm versehen (Abbildung 14B).<sup>[159]</sup>

Zu einer kristallographischen Steuerung der anorganischen Nanostrukturen wurden synthetische biomolekulare Matrizen aus anionischer DNA und kationischen Lipidmembranen eingesetzt. Diese bilden eine multilamellare Struktur, in der ein periodisches eindimensionales Gerüst paralleler DNA-Ketten zwischen geschichteten zweidimensionalen Lipidebenen fixiert ist.<sup>[160]</sup> Positiv geladene  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen wurden elektrostatisch in den Poren zwischen den DNA-Helices koordiniert und dann mit  $\text{H}_2\text{S}$  zu  $\text{CdS}$  umgesetzt. Das  $\text{CdS}$  wurde in Form von Nanostäbchen kontrollierbarer Länge und kristallographischer Orientierung erhalten. Die starken elek-

trostatischen Wechselwirkungen richten das matrizegebundene CdS in polaren Ebenen (002) parallel zu dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-DNA-Rückgrat aus und bewirken damit, dass die anorganischen Nanostrukturen den biomolekularen Matrizen aufgeprägt werden.

## 5. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride auf Oberflächen

Die Immobilisierung von Biomolekülen auf Umformungselementen wie Elektroden, piezoelektrischen Kristallen oder Feldeffekt-Transistoren ist für die Biosensorik und für Forschungen an bioelektronischen Komponenten interessant.<sup>[161–165]</sup> Es wurden bereits mehrere Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung von elektronischen Bauelementen entwickelt. Es stehen Verfahren zur Verfügung, um die aktiven Zentren von Enzymen oder die Erkennungsprozesse von Biomaterialien mit elektronischen Bauelementen zu kombinieren, sodass die biologischen Ereignisse elektronisch umgewandelt werden können. Biosensoren,<sup>[166]</sup> Biobrennstoffzellen<sup>[167]</sup> und optobioelektronische Systeme<sup>[168]</sup> wurden bereits konstruiert. In ähnlicher Weise ist das Anbringen von Biomaterialien auf nichtleitenden Oberflächen (z.B. Kunststoffen, Gläsern) und speziell die Erzeugung definierter Muster auf solchen Oberflächen mithilfe von Biomaterialien<sup>[165,169]</sup> von großem Interesse für die Fertigung von Protein- und DNA-Chips für Proteom- und Genomanalysen. Daneben wurden Methoden zur Anordnung von 2D- und 3D-Nanopartikelstrukturen auf Oberflächen entwickelt. Anwendungen solcher Systeme zur Herstellung photoelektrochemischer Zellen (z.B. Solarzellen), Leuchtdioden, elektrochromer Systeme, Computerkomponenten und auch zur Organisation nanometrischer Einelektron-Funktionseinheiten sind schon diskutiert worden.<sup>[7a]</sup>

Die Integration von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden mit Oberflächen ebnet den Weg zu geordneten Architekturen mit neuen Funktionalitäten. Die besonderen photonischen Eigenschaften von Nanopartikeln lassen sich möglicherweise zur Entdeckung und Untersuchung biologischer Erkennungsprozesse auf Oberflächen nutzen. Die spektroskopischen Eigenschaften molekularer Adsorbate auf der Oberfläche von Nanopartikeln – Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) und oberflächenverstärkte Fluoreszenz – können zur Analyse von Biomaterialien auf Oberflächen herangezogen werden. Auch die speziellen elektronischen und katalytischen Eigenschaften von Nanopartikeln können zur Elektronenübertragung von oder zu Redoxzentren in Enzymen oder zur Verstärkung chemischer Reaktivität von Biomaterialien genutzt werden.

Auch in einer anderen Hinsicht bieten oberflächengebundene Biomaterialien einen einzigartigen Zugang zu Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden. Geordnet angebrachte Biomaterialien (Nucleinsäuren, Streptavidin-Biotin- oder Antigen-Antikörper-Komplexe) auf Oberflächen fungie-

ren als Matrizen für die Immobilisierung von Nanopartikeln und können durch enzymatische Katalyse manipuliert werden. Nucleinsäuren spezifischer Länge und Zusammensetzung sind durch Ligation, Spaltung oder Polymerisation zugänglich. Somit lassen sich durch genetische Manipulation von Biomaterialien, durch die Synthese von Nucleinsäuren und durch die biokatalytische Behandlung von Biomaterialien auf Oberflächen komplexe Strukturen aus Biomaterialien erzeugen. Durch Einbau und Integration von Nanopartikeln in die oberflächenfixierten biologischen Matrizen sind neue funktionale Materialien erhältlich. Beispielsweise entstehen durch die katalytische Abscheidung von Metallen auf Nanopartikelkeimen Leiterbahnen in der Form der Biomaterialien. Biomolekül-Nanopartikel-Hybride auf Oberflächen sind funktionale Schnittstellen, die für bioelektronische, elektronische, optobioelektronische und photonische Anwendungen wichtig werden könnten.

Als treibende Kraft für die Assoziation funktionalisierter Nanopartikel und Biomaterialien mit festen Phasen und Grenzflächen (flüssig/flüssig oder flüssig/gasförmig) kommen Ladungswchselwirkungen<sup>[170]</sup> oder spezifische Bioaffinitätsbindungen<sup>[21a]</sup> in Frage. In den nachfolgenden Abschnitten erörtern wir Methoden zur Organisation von Hybridsystemen auf Oberflächen und diskutieren, wie solche Systeme für sensorische und photoelektrochemische Anwendungen und elektronische Schaltkreise eingesetzt werden können.

### 5.1. Organisation von geschichteten Nanopartikel-Protein-Arrays auf Oberflächen

Vielschichtige trägerfixierte Systeme aus Proteinen und Nanopartikeln,<sup>[171]</sup> z.B. Schichten aus Cytochrome c (Cyt c) und TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln,<sup>[171a]</sup> wurden durch schichtweise Abscheidung der biologischen und der anorganischen Komponente hergestellt. Die TiO<sub>2</sub>-Nanopartikelschichten<sup>[171a]</sup> wurden aus wässriger Lösung durch Borsäure-katalysierte Hydrolyse von Hexafluoritanat-Ionen abgeschieden (Abbildung 15 A) (liquid phase deposition, LPD).<sup>[172]</sup> Mit der LPD-Technik lassen sich TiO<sub>2</sub>-Schichten ohne Verwendung organischer Lösungsmittel herstellen, was von großer Bedeutung für die nachfolgende Abscheidung des Biomaterials ist. Die auf der Oberfläche aufgebrachten TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel sind negativ geladen. Bei der anschließenden Abscheidung des positiv geladenen Proteins Cyt c (isoelektrischer Punkt pI = 10.1) wirken elektrostatische Anziehungskräfte zwischen den

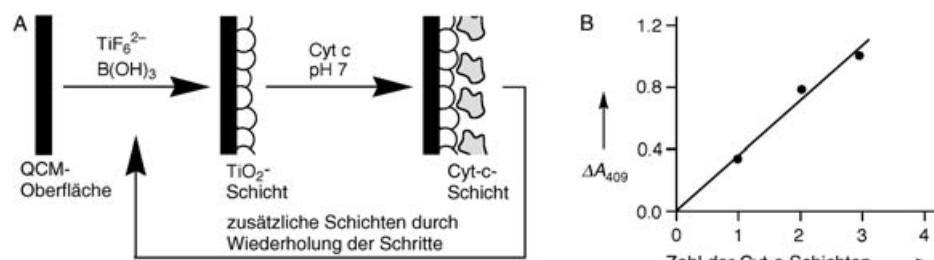


Abbildung 15. A) Methode zum Aufbau einer TiO<sub>2</sub>/Cyt c-Mehrfachschicht auf einer QCM-Elektrode. B) Optische Absorption von Aggregaten unterschiedlicher Dicke bei 409 nm; der Aufbau der Cyt c-Schichten lässt sich damit verfolgen. (Teil B mit Genehmigung aus Lit. [171].)

$\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln und dem Protein, sodass der Aufbau mehrerer Schichten möglich wird. Die Ablagerung der Schichten wurde mit einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) mikrogravimetrisch verfolgt; die Masse nahm mit jeder Doppelschicht von  $\text{TiO}_2/\text{Cyt c}$  linear zu, was sich auch durch Absorptionsspektroskopie bestätigen ließ (Abbildung 15B).

Die LPD-Methode könnte auf andere Protein-Metall-oxid-Schichtsysteme übertragen und zur Herstellung photo-funktionaler Übergitter aus Protein und anorganischem Material eingesetzt werden. In einem weiteren Ansatz wurden Komplexe aus Polyurethan<sub>Kern</sub>-Gold<sub>Hüll</sub>-Nanopartikeln als durchlässige Träger mit großer Oberfläche zur Immobilisierung von Enzymen (z.B. Pepsin) verwendet; sie bieten den Substratmolekülen leichten Zugang zum aktiven Zentrum der Enzyme in dem vielschichtigen Enzym-Aggredit.<sup>[173]</sup>

Proteinchips wurden quantitativ mit Rasterelektronenmikroskopie untersucht.<sup>[174]</sup> Als Modellsysteme wurden Biotin/Streptavidin und Antikörper/Antigene untersucht. Die mit dem Target beschichteten Gold-Nanopartikel, die spezifisch mit den auf einem behandelten Glasplättchen aufgebrachten Proteinen reagieren, wurden anhand der Rückstreuung von Elektronen gezählt. Damit war es möglich, die absolute Zahl der Biomoleküle auf dem Chip zu bestimmen (statt nur der relativen Anteile).

## 5.2. Nucleinsäure-Nanopartikel-Architekturen auf Oberflächen

Wie in Abschnitt 4.2 bereits diskutiert wurde, können Nucleinsäuren als Matrizen fungieren und DNA-funktionalisierte Nanopartikel über komplementäre Segmente binden. Wenn DNA-Matrizen an der Oberfläche eines festen Trägers fixiert sind, kann eine Anordnung von Nanopartikeln entstehen, deren Muster entweder von der Form der DNA-Matrice selbst abhängt oder von dem Muster, in dem die Matrize immobilisiert wurde.

Eine natürliche einsträngige langkettige Virus-DNA **33** (der M13mp18-Phagen mit 7249 Basen) wurde mit einem biotinylierten kurzkettigen Oligonucleotid **34** hybridisiert, das komplementär zu einem spezifischen Segment der Virus-DNA war (Abbildung 16A).<sup>[175]</sup> Dabei muss beachtet werden, dass die virale DNA-Matrice **33** mehr als eine komplementäre Domäne tragen und daher mehr als eine biotinylierte DNA-Kette binden kann. Die hybridisierte DNA mit den Biotin-Einheiten, **35**, wurde dann mit Streptavidin-beschichteten Gold-Nanopartikeln **36** (5 nm) umgesetzt. Der negativ geladene Komplex **37** aus Gold-Nanopartikeln und markierter DNA-Matrice wurde auf der Oberfläche eines positiv geladenen  $\text{Mg}^{2+}$ -beschichteten Glimmer-Plättchens adsorbiert und mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) vermessen (Abbildung 16B). Auf den Bildern kann man deutlich die gebundenen Gold-Nanopartikel erkennen, allerdings war die Zahl der Gold-Nanopartikel pro DNA-Kette nicht genau definiert. Dies deutet entweder auf eine unvollständige Hybridisierung zwischen der DNA-Matrice und dem biotinylierten Oligonucleotid hin oder auf eine unvollständige Assoziation der Streptavidin-funktionalisierten Gold-Partikel mit den biotinylierten Domänen. Da verschiedene bio-

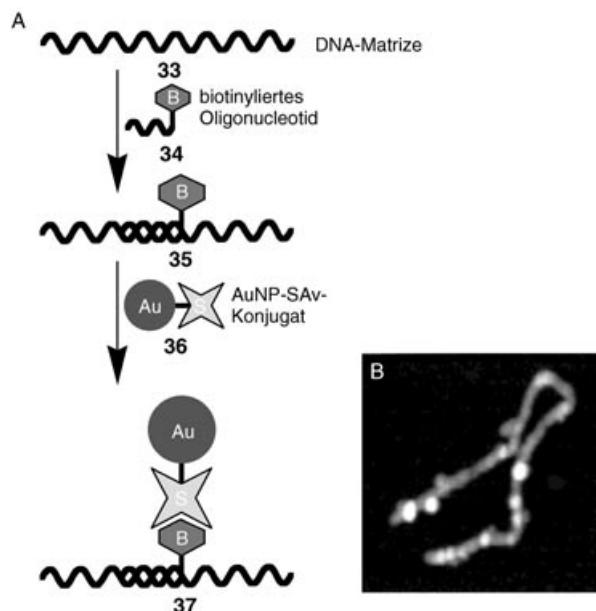
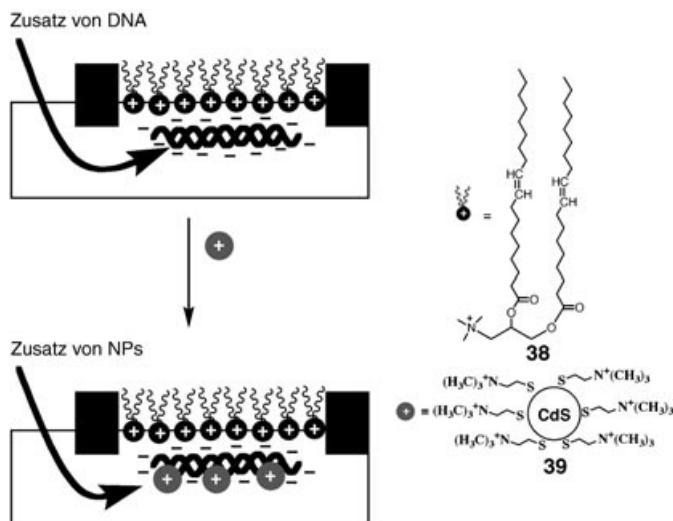


Abbildung 16. A) Gesteuerte Assoziation eines SAv-beschichteten Gold-Nanopartikels an ein ss-DNA-Templat mithilfe einer biotinylierten ss-DNA, die mit der Ziel-DNA hybridisiert. B) AFM-Bild eines DNA-Strangs mit Gold-Nanopartikeln, die aufgrund der Biotin-SAv-Wechselwirkung spezifisch an das Templat binden. (Teil B mit Genehmigung aus Lit. [175].)

tinylierte Nucleinsäure-Segmente mit der M13mp18-DNA hybridisieren können, lässt sich im Prinzip die gesamte virale DNA mit Streptavidin-Goldpartikeln versehen. Mit einem solchen Experiment wurde auch gezeigt, dass die Gold-Nanopartikel-funktionalisierte virale DNA auf dem festen Träger gebildet wird.

Die elektrostatische Koordination von CdS-Nanopartikeln an DNA wurde als treibende Kraft für die Bildung eines Halbleiter-Nanopartikel-DNA-Drahts auf einer Oberfläche genutzt.<sup>[176]</sup> Negativ geladene ds-DNA-Moleküle ordnen sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche an, wenn das Wasser kationische Detergentien enthält (z.B. Dioleyltrimethylammoniumpropan (**38**)) (Abbildung 17). Die Molekül-Lage an der Grenzschicht wurde nach der Langmuir-Blodgett-Technik komprimiert, um eine dichte Packung der DNA-Moleküle zu erreichen. Positiv geladene CdS-Nanopartikel (3 nm), die mit Thiocholin (**39**) versiegelt waren, wurden dann der wässrigen Phase zugegeben, worauf sie mit der DNA aggregierten. Diese DNA-CdS-Aggregate wurden auf einen festen Träger gebracht; die Bildung dicht gepackter CdS-Nanopartikel entlang der DNA-Matrice ließ sich elektronenmikroskopisch nachweisen. Die so erzeugten Ketten bestehen aus halbleitenden Nanopartikeln mit einem Durchmesser von etwa 3 nm und einem durchschnittlichen Abstand zwischen den Zentren benachbarter Partikel von etwa 3.5 nm.

Andere Methoden zur Erzeugung von hybriden DNA-Halbleiter- und DNA-Metall-Nanostrukturen auf Oberflächen wurden beschrieben. Die ringförmige doppelsträngige Plasmid-DNA pUCLeu4 (3455 Basenpaare lang) wurde mit  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen umgesetzt und durch Spin-Coating auf Polylysinschichteten Glasplättchen aufgebracht. Die komplexierten



**Abbildung 17.** Elektrostatische Abscheidung von Cds-Nanopartikeln auf einer DNA-Kette an der Luft-Wasser-Grenzfläche mit der Langmuir-Blodgett-Technik.

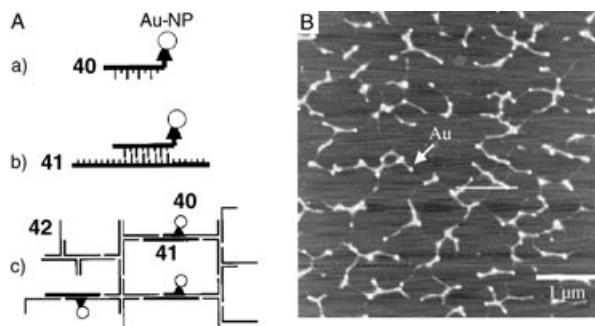
$\text{Cd}^{2+}$ -Ionen wurden mit  $\text{S}^{2-}$  in  $\text{CdS}$  umgewandelt. Auf elektronenmikroskopischen Bildern erkennt man, wie die Bildung von  $\text{CdS}$ -Nanopartikeln der Ringform der DNA-Matrize folgt.<sup>[177]</sup>

In einem anderen Beispiel wurden positiv geladene, mit Lysin versiegelte Gold-Nanopartikel auf einer Oberfläche abgeschieden, die mit einem dicken, negativ geladenen DNA-Film überzogen war.<sup>[178,179]</sup> Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiven Ladungen der Gold-Nanopartikel und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA führte zu einer Anordnung der Nanopartikel zu einer linearen Überstruktur. Die DNA-Stränge, die vor der Zugabe der Lysin-beschichteten Gold-Nanopartikel in einer relativ starren Struktur fixiert waren, wurden durch die Solvatation beim Aufbringen der Nanopartikel-Lösung auf der Oberfläche des DNA-Films beweglich. Dies erleichterte ihre Reorganisation zu sehr regelmäßigen linearen Nanopartikel-Überstrukturen während der elektrostatischen Komplexierung.

Die Visualisierung oberflächenfixierter DNA mit AFM und STM kann durch Zugabe von Gold-Nanopartikeln, die mit komplementärer DNA funktionalisiert sind, erheblich verbessert werden. Zum einen werden gut sichtbare Gold-Cluster eingeführt, die mit der auf der Oberfläche liegenden DNA assoziiert sind, zum anderen kann die Orientierung der langen DNA-Moleküle auf der Oberfläche so verändert werden, dass die DNA-Ketten hervorstehen, anstatt flach aufzuliegen.<sup>[180]</sup> Beide Effekte erleichtern die Visualisierung von DNA-Molekülen an Oberflächen.

Positiv geladene Metallionen können durch negativ geladene DNA-Moleküle komplexiert und anschließend zum Metall reduziert werden; auf diese Weise entsteht ein Metalldraht entlang der DNA-Matrize. Zum Beispiel erhält man durch Beladen einer DNA-Matrize mit  $\text{Pd}^{2+}$ -Ionen und nachfolgende Reduktion nanoskalige Pd-Cluster auf der DNA.<sup>[181]</sup> Je nach Dauer des Reduktionsprozesses bilden sich deutlich separierte Pd-Cluster oder ein quasikontinuierlicher Pd-Draht mit einer körnigen Struktur.

Um eine Strukturkontrolle über größere Entfernungen zu erlangen, wurde ein kontinuierliches Netzwerk mit DNA als Linker untersucht (Abbildung 18A).<sup>[182]</sup> Drei Arten von Oligonucleotiden wurden verwendet: 1) Das 17 Basen lange



**Abbildung 18.** A) Zweidimensionale Assoziation von Gold-Nanopartikeln mithilfe von DNA: a) Ein Gold-Nanopartikel wird mit dem Oligonukleotid **40** über eine Gold-Thiol-Brücke verknüpft; b) das Oligonukleotid **41** wird mit dem Oligonukleotid **40**, das eine komplementäre Basensequenz trägt, hybridisiert; c) die Komponenten werden in ein DNA-Netzwerk, bestehend aus dem Oligonukleotid **42** eingebaut. B) AFM-Bild des zweidimensionalen Gold-Nanopartikel-DNA-Netzwerks. (Mit Genehmigung aus Lit. [182].)

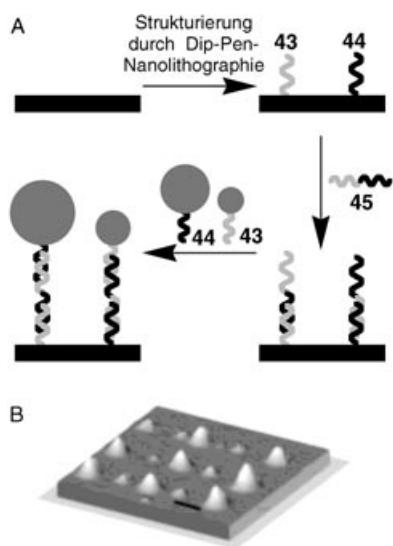
Oligonukleotid **40** mit einer Thiolgruppe am 3'-Ende (5'-GTAAAACGACGGACGCCAGT-SH-3'); 2) das 57 Basen lange Oligonukleotid **41** mit einem zentralen Sequenzabschnitt, der zu **40** komplementär ist, und mit Flanken aus alternierenden A- und T-Basen; 3) das 50 Basen lange poly(dAdT)-Oligonukleotid **42**, das eine Netzwerkstruktur bildet und bei Kontakt mit **41** hybridisiert. Alle drei Oligonukleotide wurden mit Gold-Nanopartikeln (5 nm) gemischt. Das Netzwerk wurde auf einer Glimmer-Oberfläche adsorbiert und mit AFM abgebildet (Abbildung 18B). Die Bilder ähneln einem Nanoschaltbild, es fehlt aber die Organisation und der direkte Kontakt zwischen den Gold-Nanopartikeln.

Um echte mikroskalige Drähte entlang von DNA-Matrizen zu erhalten, wurden durch elektrochemische Metallabscheidung hergestellte Mikrodrähte in einer porösen Aluminiumoxid-Membran an thiolmodifizierte DNA-Moleküle gebunden und mit einer festen Phase, die mit komplementären DNA-Oligonukleotiden funktionalisiert war, umgesetzt.<sup>[183]</sup> Die Hybridisierung zwischen der oberflächenkoordinierten DNA und der DNA, die an die Mikrodrähte gebunden war, ergab doppelsträngige DNA-Brücken, die die Mikrodrähte an der Oberfläche fixierten. Bemerkenswert an diesem Verfahren ist, dass die DNA-Moleküle als „molekularer Leim“ genutzt werden, um anstelle individueller Nanopartikel mikroskalige vorgefertigte Drähte auf der Trägeroberfläche zu fixieren. Damit ist ein entscheidender Fortschritt hin zur Fertigung mikroskaliger Schaltkreise gelungen.

Ein anderer Ansatz für die direkte Positionierung von Nanopartikeln auf festen Trägern mithilfe von DNA beruht auf der Mikrostrukturierung einer Oberfläche mit DNA-Molekülen. Das Verfahren ermöglicht die spezifische Bindung von Nanopartikeln, die mit komplementärer DNA funktionalisiert wurden, an definierten Domänen des Mu-

ters. Ein aminoderivatisiertes Oligonukleotid wurde auf einer chemisch modifizierten Glasoberfläche nach einem festen Muster mit einem Nanoliter-Dispenser aufgetragen und dann kovalent fixiert.<sup>[184]</sup> Anschließend wurden Gold-Nanopartikel (34 nm), an denen komplementäre Oligonukleotide angebracht waren, auf das DNA-Muster aufgetragen, sodass das Muster der Gold-Nanopartikel dem der DNA entsprach.

Eine noch präzisere Positionierung der Gold-Nanopartikel wird durch die Dip-Pen-Nanolithographie ermöglicht, die zur exakten Anordnung der primären DNA auf der Oberfläche verwendet wird.<sup>[185]</sup> Zwei Arten aminoderivatisierter DNA-Oligonukleotide – TCTCAACTCGTAA<sub>10</sub> (**43**) und A<sub>10</sub>CGCATTTCAGGAT (**44**) – wurden auf eine mit 1,16-Mercaptohexadecansäure modifizierte Goldoberfläche aufgebracht und dort kovalent verknüpft (Abbildung 19 A). Die Abscheidung wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten



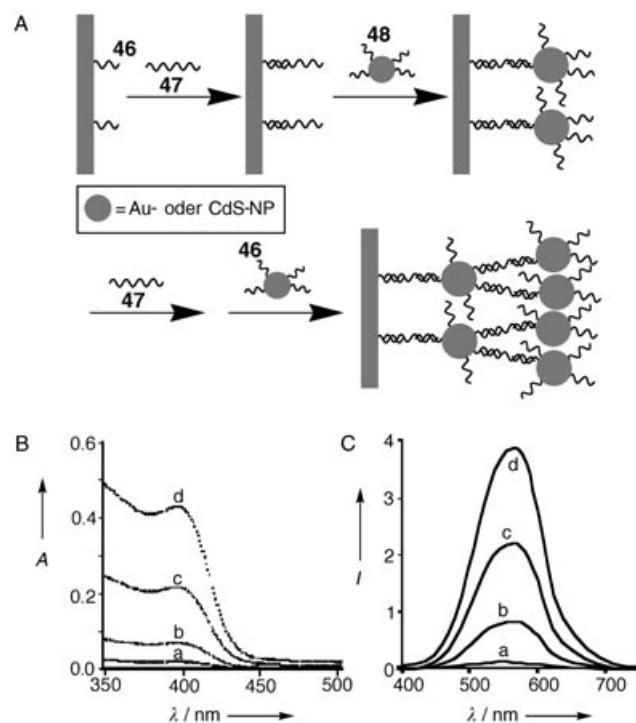
**Abbildung 19.** A) Herstellung eines definierten Musters aus Nanopartikeln mit Dip-Pen-Lithographie und DNA. B) AFM-Bild des aus großen und kleinen Nanopartikeln bestehenden Aggregats; der Maßstab beträgt 1 μm. (Teil B mit Genehmigung aus Lit. [185].)

ausgeführt, sodass ein Muster aus Punkten beider Oligonukleotide erhalten wurde. Dieses primäre Muster wurde mit einem Oligonukleotid **45** der Sequenz TA-CGAGTTGAGAATCCTGAATGCG umgesetzt. Dieses Oligonukleotid besteht aus zwei Domänen: eine ist komplementär zu **43**, die andere zu **44**. Die so vorbereitete DNA-funktionalisierte Oberfläche trägt komplementäre DNA-Ketten für zwei Arten DNA-funktionalisierter Gold-Nanopartikel: **43-Au** (13 nm) und **44-Au** (31 nm).

Das Muster auf der DNA-modifizierten Oberfläche ließ sich mit AFM sichtbar machen. Die **43-Au**-Nanopartikel banden spezifisch an das Hybrid **44-45**, die **44-Au**-Nanopartikel hingegen an **43-45**, sodass auf dem festen Träger ein periodisches Muster entstand (Abbildung 19 B). Mit einem ähnlichen Verfahren wurde eine Oberfläche durch direkte Dip-Pen-Nanolithographie mit einem regelmäßigen Muster von funktionalisierten Gold-Nanopartikeln versehen, in

diesem Falle basierend auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Erkennung.<sup>[186]</sup>

Die Komplementarität der DNA kann auch genutzt werden, um vielschichtige Nanopartikel-Systeme auf festen Trägern aufzubringen.<sup>[187]</sup> Hierzu wurde eine Glasoberfläche mit einer Monolage des Oligonukleotids **46** beschichtet und dann mit dem Oligonukleotid **47** hybridisiert, das aus zwei Domänen besteht (eine komplementär zu **46**, die andere komplementär zu einem anderen Oligonukleotid, **48**). Mit **48** funktionalisierte Gold-Nanopartikel (13 nm) wurden zugegeben, sodass eine Monolage doppelsträngiger DNA (ds-**47/48**) mit angebundenen Gold-Nanopartikeln erhalten wurde (Abbildung 20 A). Nach der Reaktion der mit **48** funktionalisier-



**Abbildung 20.** A) DNA als Linker zum Aufbau mehrschichtiger Nanopartikel-Aggregate auf Oberflächen. B, C) Absorptions- und Fluoreszenzspektren der mehrschichtigen CdS-Nanopartikel-Aggregate; a-d) 1–4 Schichten. (Teile B und C mit Genehmigung aus Lit. [188].)

isierten Gold-Nanopartikel mit der oberflächengebundenen DNA **47** bleiben viele DNA-Ketten **48** nichtumgesetzt. Diese können in einem Folgeschritt mit freien komplementären Oligonukleotid-Domänen **47** weiter umgesetzt werden, woraus wiederum Bindestellen für **46** entstehen. So konnte ein zweiter Typ von Gold-Nanopartikeln, nun funktionalisiert mit **46**, mit der ersten Schicht verknüpft werden. Die wiederholte schrittweise Abscheidung von Gold-Nanopartikeln, die abwechselnd mit **46** und **48** modifiziert sind, führt letztlich zu einer vielschichtigen Aggregation von Gold-Nanopartikeln. Jede hybridisierte Gold-Nanopartikel-Schicht vertieft die rote Farbe auf dem Substrat. Auch ein schichtweises Auftragen unterschiedlicher Nanopartikel (hinsichtlich Größe und chemischer Zusammensetzung, z.B. Ag, CdS, CdSe) ist möglich (Abbildung 20 A).

Ein ähnlicher Ansatz wurde gewählt, um eine mehrschichtige Struktur von CdS-Nanopartikeln (2.6 nm) auf einem Glasträger zu erzeugen.<sup>[188]</sup> Absorption und Fluoreszenz der Nanopartikel-Struktur nahmen mit der Zahl der aufgebrachten Schichten zu (Abbildung 20B,C). Gold-Nanopartikel, die mit mehreren thiolmodifizierten Oligonucleotiden beladen waren, konnten so komplementäre Sequenzen für mehr als eine DNA-Kette bereithalten.<sup>[189]</sup> Solche vielfach derivatisierten Gold-Nanopartikel wurden verwendet, um DNA-Arrays mit Oligonucleotid-Bibliotheken zu analysieren.<sup>[189a]</sup>

Gold-Nanopartikel, die zwei unterschiedliche Oligonucleotide tragen, wurden als Bausteine mit zwei unabhängig ansprechbaren DNA-Sequenzen genutzt. Über eine der Sequenzen wurde das Gold-Nanopartikel am Träger fixiert, während über die andere Sequenz laterale Verbindungen zwischen den benachbarten immobilisierten Nanopartikeln aufgebaut wurden.<sup>[189b]</sup> Mit AFM konnte die Vernetzung zwischen den Partikeln nachgewiesen werden, die eine verbesserte Bedeckung der Oberfläche mit dem einschichtigen DNA/Gold-Nanopartikel-Aggregat bewirkte. Die Methoden zur Organisation von Nanopartikel-Schichten auf Oberflächen können wahrscheinlich auch auf andere Nanopartikel übertragen werden und spielen daher eine wichtige Rolle beim Design aktiver elektronischer, photonischer und photoelektrochemischer Sensoren (siehe Abschnitte 6.2 und 6.3).

## 6. Oberflächengebundene Biomolekül-Nanopartikel-Hybride in der Sensorik

Die besonderen Eigenschaften von Nanopartikeln machen Konjugate aus Biomolekülen und Nanopartikeln zu interessanten Materialien für die Sensorik. Optische und elektronische Sensoren auf der Basis oberflächenfixierter Biomaterialien sind gängige Funktionseinheiten in der analytischen Biochemie. Daher ist mit der Immobilisierung von Biomolekül-Nanopartikel-Konjugaten auf Trägern ein allgemeiner Weg zur Entwicklung optischer oder elektronischer Biosensoren vorgezeichnet. Metall-Nanopartikel wie Gold- oder Silber-Nanopartikel haben Plasmonenabsorptionsbänder im sichtbaren Spektrum, die von der Größe der entsprechenden Partikel abhängen. Zahlreiche Arbeiten berichten über die Markierung von Bioassays und die Anfärbung von biologischen Geweben mit Metallpartikeln zur Visualisierung biologischer Prozesse.<sup>[190]</sup> Die spektralen Verschiebungen, die von benachbarten oder aggregierten Metall-Nanopartikeln herrühren, finden zunehmend Interesse bei der Entwicklung optischer Biosensoren aus Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden.<sup>[139–141]</sup>

Verwendet man z. B. zwei Arten Nucleinsäure-funktionalisierter Nanopartikel, die komplementär zu zwei Segmenten des DNA-Analyten sind, werden durch die Hybridisierung der Nanopartikel mit dem DNA-Analyten Aggregate gebildet, die sich anhand der rotverschobenen Plasmonenabsorption des Nanopartikel-Aggregates nachweisen lassen.<sup>[69a]</sup> Ein anderer Ansatz für die optische Detektion von biologischen Erkennungsprozessen beruht auf der Verwendung von Metall-Nanopartikeln als lokalen Fluoreszenzquenchern.

Trägt eine Markierungs-DNA an ihren Enden beispielsweise ein Gold-Nanopartikel und einen Farbstoff, wird die Fluoreszenz des Farbstoffs unterdrückt. Öffnet man nun die DNA-Struktur durch Hybridisierung mit einem DNA-Analyten, wird die Fluoreszenz des Farbstoffs wegen der räumlichen Trennung von Nanopartikel und Farbstoff wiederhergestellt.<sup>[105]</sup> In ähnlicher Weise zeigen auch Halbleiter-Nanopartikel großenabhängige, regulierbare Fluoreszenz.

Die hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute der Halbleiter-Nanopartikel, ihre Lichtbeständigkeit und die regulierbaren Fluoreszenzbanden gaben Anlass für intensive Forschungen mit dem Ziel, solche Halbleiter-Nanopartikel als Fluoreszenzmarker für biologische Erkennungsprozesse nutzbar zu machen.<sup>[75]</sup> Der vielfache Gebrauch von Metall- und Halbleiter-Nanopartikeln für Biosensoren lässt erwarten, dass die besonderen katalytischen und photoelektrochemischen Eigenschaften der Nanopartikel auch für die Entwicklung elektronischer Biosensoren geeignet sind.<sup>[191]</sup> So könnten durch katalytische stromlose Abscheidung von Metallen auf hybriden Nanopartikel-Markern leitende Domänen und Oberflächen hergestellt werden, wobei die Leitfähigkeit des Systems zur Wandlung des biologischen Signals dient.<sup>[156]</sup> Funktionalisierte Nanopartikel werden häufig in der bioelektroanalytischen Chemie eingesetzt.<sup>[192]</sup> Auch das lokalisierte Plasmon von Metall-Nanopartikeln als Marker für Biokonjugate könnte mit dem Oberflächenplasmon eines Goldträgers wechselwirken<sup>[193]</sup> und so die biologischen Erkennungsprozesse an der Oberfläche verstärken.

Weiterhin können Ladungen, die durch biologische Transformationen entstehen, Störungen der Oberflächen-Plasmonenresonanzspektren (SPR) verursachen. Solche Effekte lassen sich vielleicht zur Entwicklung neuer Methoden für die Wandlung von Signalen aus Biotransformationen an Grenzflächen nutzen. Die folgenden Abschnitte fassen neuere Fortschritte bei der Anwendung von Biomolekül-Nanopartikel-Konjugaten als aktiven Komponenten in bioelektronischen Systemen und Biosensoren zusammen.

### 6.1. Bioelektronische Sensoren mit Nanopartikel-Enzym-Hybriden

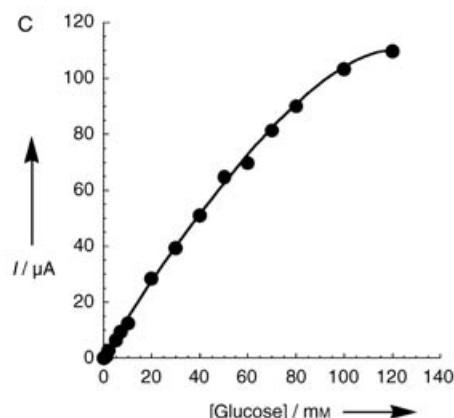
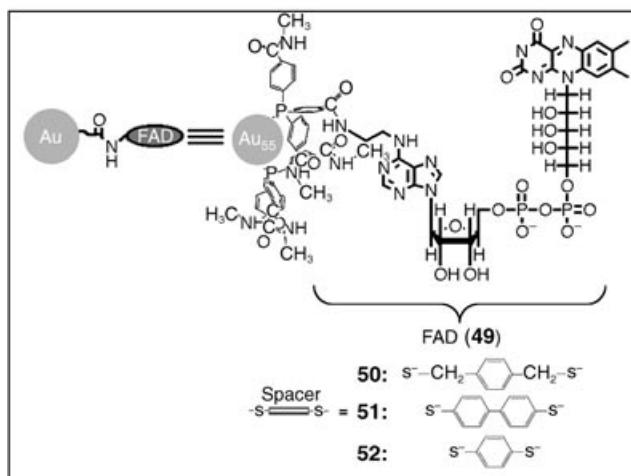
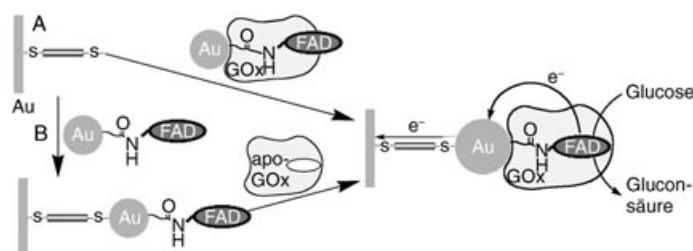
Die Herstellung elektrischer Kontakte zwischen Redox-Enzymen und Elektroden ist ein Schlüsselschritt bei der Entwicklung von Enzym-Elektroden für bioelektronische Anwendungen wie Biosensoren<sup>[162, 165, 194]</sup> und Biobrennstoffzellen.<sup>[167]</sup> Redoxenzyme gehen normalerweise keine direkte elektrische Wechselwirkung mit Elektroden ein,<sup>[165]</sup> sodass mehrere Techniken zur Herstellung einer elektronischen Kommunikation entwickelt wurden, z. B. durch diffusive Elektronenmediatoren,<sup>[195]</sup> durch Anbringen von Redox-Relays am Protein<sup>[196]</sup> und durch Immobilisierung der Enzyme in redoxaktiven Polymeren.<sup>[163, 197]</sup>

Der elektrische Kontakt zwischen Enzym und Elektrode bleibt allerdings sehr ineffizient, wenn die Enzyme durch die Redox-Einheiten nicht optimal modifiziert wurden<sup>[196f]</sup> oder die Enzyme nicht passend auf den Elektroden angeordnet sind. Eine sehr effiziente elektrische Verbindung zwischen Redox-Proteinen und Elektroden wurde erhalten, wenn die

Apo-Enzyme auf Monoschichten der leitenden, mit den Elektroden assoziierten Cofaktoren rekonstituiert wurden.<sup>[198–200]</sup> So wurde Apo-Glucoseoxidase auf einer Transfer-FAD-Schicht rekonstituiert<sup>[198, 199a]</sup> und Apo-Glucosedehydrogenase wurde auf einen mit Pyrrolochinolinchinon (PQQ) modifizierten Polyanilinfilm aufgebracht, der mit der Elektrode verbunden war.<sup>[199b]</sup> Man beobachtete eine effektive elektrische Kommunikation zwischen den Redoxzentren der Biokatalysatoren und den Elektroden und entsprechend eine hohe Elektronentransfersgeschwindigkeit von den Redoxzentren zur Elektrode. Dieses effektive elektrische Zusammenspiel zwischen Redoxenzymen und Elektrode wurde auf die Anordnung der Proteine auf den Elektroden und auf die optimale Position der zwischen den Redoxzentren und die Elektrode eingeschalteten Elektronentransfereinheiten zurückgeführt.

Einige biokatalytische Elektroden wurden für Anwendungen in der Biosensorik durch gemeinsame Abscheidung von Redoxenzymen/Proteinen und Gold-Nanopartikeln auf dem Elektrodenträger hergestellt.<sup>[201, 202]</sup> So wurde die direkte Elektronenübertragung zwischen Hämoglobin und einer Glaskohlenstoffelektrode durch lipidgeschützte Gold-Nanopartikel vermittelt.<sup>[202]</sup> Die biokatalytischen Elektroden funktionierten zwar ohne Elektronentransfer-Mediatoren, aber die statistische, nicht optimierte Positionierung der Redoxproteine auf den leitenden Nanopartikeln ließ keinen effizienten Elektronenfluss zwischen den aktiven Zentren der Enzyme und dem Elektrodenträger zu. Ein effizienter elektrischer Kontakt mit dem Redoxenzym Glucoseoxidase (GOx) über ein einzelnes Gold-Nanopartikel wurde erhalten, wenn das Apo-Flavoenzym (Apo-Glucoseoxidase, Apo-GOx) auf einem 1.4 nm großen Au<sub>55</sub>-Nanopartikel, das mit N<sup>6</sup>-(2-Aminoethyl)flavinadenindinucleotid (**49**; Aminoderivat des FAD-Cofaktors) funktionalisiert war, rekonstituiert wurde. Das Konjugat wurde auf einer thiolmodifizierten Monoschicht mit unterschiedlichen Dithiolen **50–52** als Linkern fixiert (Abbildung 21 A).<sup>[203]</sup> Alternativ kann auch das FAD-funktionalisierte Gold-Nanopartikel auf eine thiolmodifizierte Monoschicht aufgebracht werden, die mit einer Elektrode verbunden ist. Anschließend wird Apo-GOx auf den funktionalen Nanopartikeln rekonstituiert (Abbildung 21 B).

Die Enzymelektroden, die auf diesen beiden Wegen hergestellt wurden, zeigten eine ähnliche Oberflächenbedeckung durch Protein von etwa 10<sup>12</sup> mol cm<sup>-2</sup>. Die Schicht aus Nanopartikeln und rekonstituierter Glucoseoxidase hatte ohne zusätzliche Mediatoren einen elektrischen Kontakt zur Elektrode, und das Enzymaggregat stimulierte die bioelektrokatalytische Oxidation von Glucose (Abbildung 21 C). Die resultierenden Elektroden aus Nanopartikeln und rekonstituiertem Enzym zeigten eine beispiellos effiziente elektrische Kommunikation zwischen Katalysator und Elektrode (Elektronenübertragungsgeschwindigkeit ca. 5000 s<sup>-1</sup>). Diese elektrische Kontaktierung macht die Enzymelektrode unempfindlich gegen Sauerstoff oder andere oxidierbare Verbindungen wie Ascorbinsäure. Geschwindig-



**Abbildung 21.** Elektrische „Verdrahtung“ von Glucoseoxidase (GOx) durch Rekonstitution des Apoenzyms mit einem Gold-Nanopartikel, das mit einer einzelnen FAD-Cofaktor-Gruppe funktionalisiert war. A) Rekonstitutionsprozess in Lösung mit anschließender Adsorption des Komplexes an einer dithiolmodifizierten Goldelektrode. B) Adsorption eines Gold-FAD-Konjugats an einer dithiolmodifizierten Goldelektrode und anschließende Rekonstitution von Apo-GOx an der Grenzfläche. C) Kalibrierkurve des elektrokatalytischen Stroms, der durch die rekonstituierte GOx-Elektrode in Gegenwart unterschiedlicher Glukosekonzentrationen erzeugt wird.

keitsbestimmend für die Elektronenübertragung vom aktiven Zentrum des Enzyms durch das Gold-Nanopartikel ist der molekulare Dithiol-Linker, der das Partikel an die Elektrode bindet. Das konjugierte Phenyl-dithiol **52** erwies sich als der effizienteste Elektronenüberträger unter den Linkern **50–52**. Molekulare Drähte wie Oligophenylacetylen-Einheiten könnten den elektrischen Kontakt noch effizienter machen.

Im oben beschriebenen System wird das Metall-Nanopartikel als Nanoelektrode eingesetzt, die das Redoxzentrum des

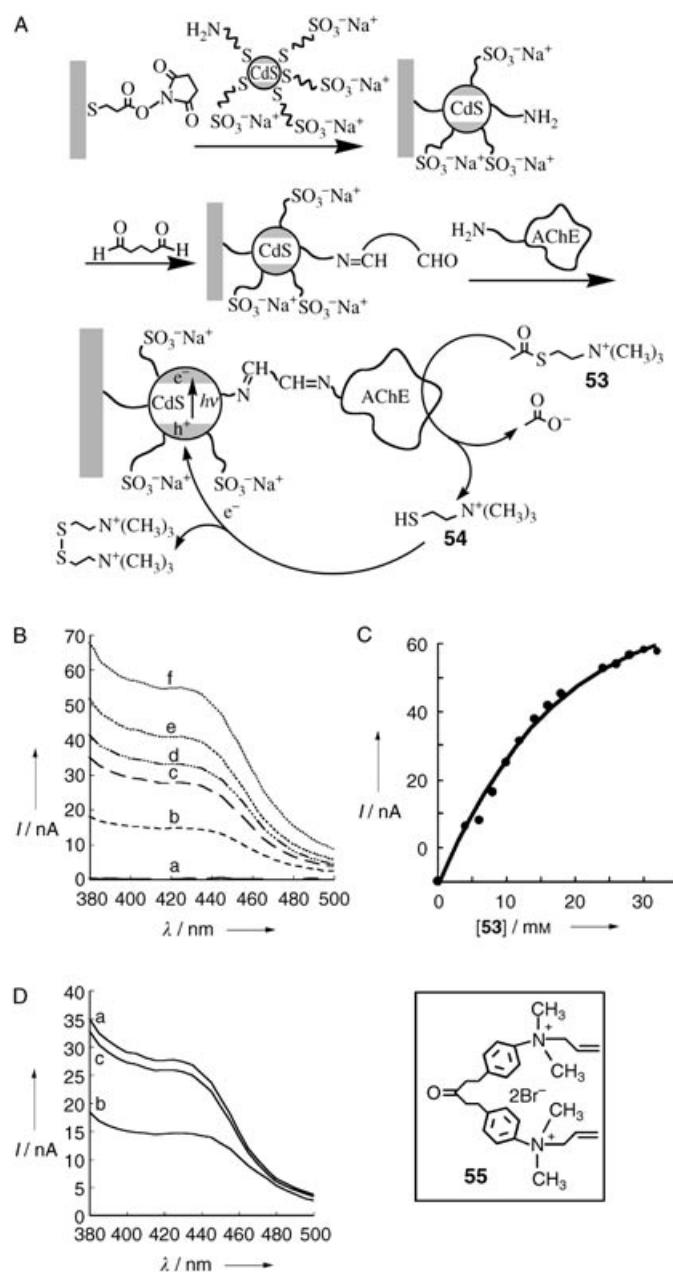
Enzyms elektronisch mit der makroskopischen Elektrode verbindet. Es lassen sich aber auch hybride Enzym-Nanopartikel-Systeme konstruieren, in denen das Produkt, das durch den biokatalytischen Prozess gebildet wurde, die Funktionen des Nanopartikels aktiviert. Dies wurde jüngst an einer hybriden Monoschicht aus Acetylcholinesterase (AChE) und CdS-Nanopartikeln auf einer Goldelektrode gezeigt.<sup>[204]</sup> Das CdS-AChE-Hybrid auf der Goldelektrode wurde hergestellt, indem zuerst Cystamin-funktionalisiertes CdS an die Elektroden adsorbiert und anschließend das Enzym AChE über eine sekundäre kovalente Bindung an die Partikel gekuppelt wurde (Abbildung 22 A). Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Acetylthiocholin (53) zu Thiocholin (54) und Acetat. Die Photoanregung des CdS-Halbleiters erzeugt ein Elektron-Loch-Paar im Leitungs- bzw. Valenzband. Das vom Enzym gebildete Thiocholin 54 wirkt als Elektronendonator für Löcher im Valenzband. Das Auffüllen der Valenzbandlöcher führt dazu, dass Elektronen im Leitungsband angesammelt und zur Elektrode abgeleitet werden. Hierdurch entsteht ein Photostrom (Abbildung 22 B,C). Die Zugabe von Enzyminhibitoren wie 1,5-Bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-on dibromid (55) blockiert die biokatalytische Funktion des Enzyms und verhindert die Erzeugung des Photostroms (Abbildung 22 D). Auf diese Weise bietet das CdS-AChE-Hybrid eine funktionelle Schnittstelle zum Nachweis von AChE-Inhibitoren (z. B. in chemischen Kampfstoffen) durch Messung eines Photostroms.

Über ein ähnliches System, das aus photoaktivierbaren CdS-Nanopartikeln und coimmobilisierter Formaldehyd-Dehydrogenase besteht und Formaldehyd als Elektronendonator benötigt, wurde berichtet.<sup>[205]</sup> Bei diesem Hybrid werden die Elektronen direkt vom aktiven Zentrum des Enzyms zu den photogenerierten Elektronenlöchern in CdS übertragen. Der Photostrom im Fließgleichgewicht hängt direkt von der Substratkonzentration ab.

## 6.2. Bioelektrische Sensorsysteme auf Nanopartikel-Basis zum Nachweis von Erkennungereignissen

Die ungewöhnlichen optischen,<sup>[206]</sup> photophysikalischen,<sup>[7a]</sup> elektronischen<sup>[6,207]</sup> und katalytischen<sup>[208]</sup> Eigenschaften von Metall- und Halbleiter-Nanopartikeln machen diese zu idealen Sonden für Erkennungs- und Biosensorprozesse. So wird das einzigartige Plasmonenabsorptionsverhalten von Gold-Nanopartikeln und speziell die gekoppelte Plasmonenabsorption konjugierter Partikel vielfach für die Analyse von DNA<sup>[209]</sup> und Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen<sup>[210]</sup> genutzt. In ähnlicher Weise fungiert das regulierbare Fluoreszenzverhalten der Halbleiter-Nanopartikel zum photonischen Nachweis von biologischen Erkennungsvorgängen.<sup>[21a,75]</sup> Auch elektrochemische Methoden kommen zum Einsatz, um biomolekular gebundene Nanopartikel-Marker zu verfolgen. Beispielsweise wird die differentielle Pulsvoltammetrie (ca. 1.2 V), die die Oxidation von Gold-Nanopartikel-Markern misst, die an eine Ziel-DNA gebunden sind, zur elektrochemischen DNA-Analyse genutzt.<sup>[211]</sup>

An Biomaterialien gekoppelte Metall- und Halbleiter-Nanopartikel ergeben solubilisierte Einheiten, dennoch ent-



**Abbildung 22.** A) Aufbau des CdS-Nanopartikel-AChE-Hybrids für den photoelektrochemischen Nachweis der Enzymaktivität. B) Photostrom-Aktionsspektren, gemessen in Gegenwart von Acetylthiocholin (53): a) 0 mM, b) 6 mM, c) 10 mM, d) 12 mM, e) 16 mM, f) 30 mM. C) Kalibrierkurve für den Photostrom bei  $\lambda = 380$  nm bei unterschiedlichen Konzentrationen von 53. D) Photostrom-Spektren des CdS-AChE-Hybrids in Gegenwart von 10 mM 53: a) ohne Inhibitor, b) nach Zugabe von  $1 \times 10^{-6}$  M Inhibitor 55, c) nach Abspülen des Systems, Entfernen des Inhibitors und Zusatz von 53 (10 mM).

halten sogar nanoskalige partikuläre Clustersysteme viele Atome oder Moleküle im Cluster. Die Löslichkeit der Biomolekül-Nanopartikel-Strukturen ermöglicht Waschschritte auf Oberflächen, die eine sensorische Grenzfläche aufweisen, wodurch sich unspezifische Adsorptionsprozesse vermeiden lassen. Andererseits ermöglicht die spezifische Bindung von Biomolekül-Nanopartikeln auf Sensor-Oberflächen die nachgelagerte Ablösung der gebundenen Nanopar-

tikel; dadurch kann die Detektion des jeweiligen Analyten durch die Freisetzung vieler Ionen oder Moleküle als Folge eines einzelnen Erkennungsvorgangs verstärkt werden.

Die meisten der eingesetzten Nachweisschemata stützen sich auf eine hochempfindliche elektrochemische Stripping-Technik mit nachfolgender Messung des Indikatormetalls. Die Stripping-Voltammetrie ist eine vielseitige elektroanalytische Technik zur Detektion von Spurenmetallen.<sup>[212]</sup> Die außergewöhnliche Empfindlichkeit kommt durch den „eingebauten“ Vorkonzentrationsschritt zustande, in dem die Metalle auf der Arbeitselektrode gesammelt werden. Die Nachweisgrenzen sind um drei bis vier Größenordnungen tiefer als bei den Pulsvoltammetrie-Techniken, die früher zur Detektion der DNA-Hybridisierung eingesetzt wurden. Die Cluster können mit zusätzlichen Markern beladen werden, darunter mit redoxaktiven Resten. So wurden Siliciumdioxid-Nanopartikel, die mit Tris(2,2'-bipyridyl)cobalt(III)<sup>[213]</sup> oder Ferrocen-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln beladen waren,<sup>[214]</sup> zur Markierung von DNA und zum elektrochemischen DNA-Nachweis auf der Basis der redoxaktiven Komplexe eingesetzt.

Vielseitige elektrochemische DNA-Hybridisierungstests mit Nanopartikeln wurden mit Au, Ag, Cu oder In als Metalltracer entwickelt.<sup>[215–219]</sup> Der Vorgang beruht auf dem Anbinden der Gold-,<sup>[215,216]</sup> Silber-<sup>[217]</sup> oder Cu<sub>Kern</sub>-Au<sub>Hülle</sub>-Nanopartikel<sup>[218]</sup> oder der Indium-Nanodrähte<sup>[219]</sup> am Hybridisierungs-Target, gefolgt von einer anodischen elektrochemischen Stripping-Messung des Metall-Tracers. Die Immobilisierung von Sonde oder Target erfolgte direkt auf Kohlenstoff- oder Indium-Zinnoxid(ITO)-Elektroden.<sup>[220,221]</sup> Auch über eine Kupplung über Streptavidin-beschichtete Magnetkugelchen<sup>[215]</sup> oder die Adsorption an die Wände von Polystyrol-Mikrotiterplatten<sup>[216]</sup> wurde berichtet. Die DNA-funktionalisierten Kugelchen wurden auf der Elektrodenoberfläche gesammelt, wodurch der elektrochemische Nachweis pikomolarer Mengen des DNA-Analyten gelang.

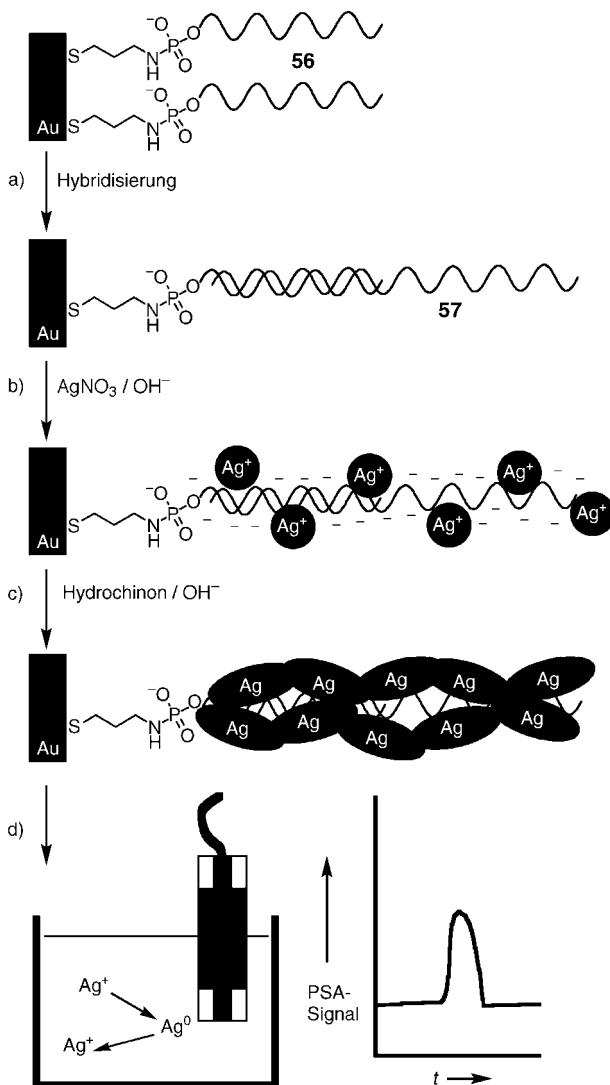
Die 406 Basen lange Sequenz des menschlichen Cytomegalievirus (HCMV-DNA) wurde mit einem Nachweissystem auf der Basis von Gold-Nanopartikeln elektrochemisch quantifiziert.<sup>[216]</sup> Die HCMV-DNA wurde in einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einem Gold-Nanopartikel mit einem Oligonukleotid komplementärer Sequenz hybridisiert. Der gesamte Komplex wurde mit HBr/Br<sub>2</sub> behandelt, wodurch die Goldpartikel durch Oxidation aufgelöst wurden. Die Au<sup>3+</sup>-Ionen wurden elektrochemisch reduziert, sammelten sich auf der Elektrode und wurden durch anodische Stripping-Voltammetrie mit einer Sandwich-Elektrode (SPMBE) detektiert. Die Kombination aus der empfindlichen Detektion der Au<sup>3+</sup>-Ionen an der SPMBE (durch den nichtlinearen Massentransport der Ionen) und der Freisetzung einer großen Zahl von Au<sup>3+</sup>-Ionen beim Auflösen der Partikel infolge eines einzelnen Erkennungsprozesses führt zu einem außergewöhnlichen Verstärkungsfaktor, der den Nachweis der HCMV-DNA bis hinab zu einer Konzentration von  $5 \times 10^{-12}$  M ermöglicht. Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit wurde durch die katalytische Vergrößerung der Gold-Tracer, die an die doppelsträngige DNA gebunden sind, durch die Abscheidung von Gold<sup>[215]</sup> oder Silber erzielt.<sup>[222]</sup> Kombiniert man eine solche Vergrößerung der Metall-Partikel-

Markierung mit der inhärenten Verstärkung durch die elektrochemische Stripping-Analyse, kann man die Nachweisgrenzen bis in den subpikomolaren Bereich drücken.

Ein elektrochemisches Protokoll zum Nachweis der DNA-Hybridisierung, das auf der Ablagerung von Metallclustern entlang des DNA-Rückgrates beruht (anstatt am Ende des Duplex), wurde vor kurzem veröffentlicht.<sup>[223]</sup> Es beruht auf der durch die DNA-Matrize induzierten Erzeugung leitender Nanodrähte als Ergebnis der DNA-Hybridisierung. Die Verwendung der DNA als metallisierbare Matrize<sup>[224]</sup> hat umfangreiche Forschungsarbeiten zur Erzeugung leitender Nanodrähte und zur Konstruktion funktionaler Stromkreise ausgelöst.<sup>[181,225–227]</sup> Mit einem solchen Ansatz wurden Cluster aus Silber,<sup>[225,226]</sup> Palladium<sup>[181]</sup> und Platin<sup>[227]</sup> auf DNA-Matrizen erzeugt.

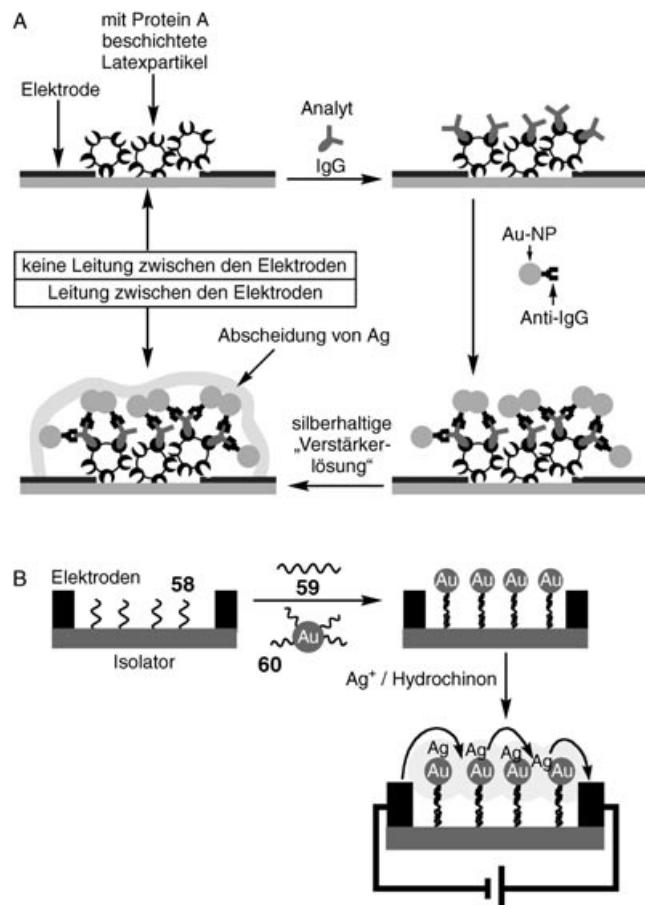
Teilschritte dieser Methoden zur Erzeugung von Metall-Nanoleitern auf DNA-Matrizen wurden angepasst, um Nachweisverfahren für DNA zu entwickeln (siehe Abbildung 23). Der kurze DNA-Primer **56** an der Elektrode hybridisiert mit der Ziel-DNA **57** (Schritt a). Die Phosphatgruppen des langen DNA-Stranges **57** lagern durch elektrostatische Wechselwirkungen Ag<sup>+</sup>-Ionen aus der Lösung an (Schritt b). Die gebundenen Ag<sup>+</sup>-Ionen werden mit Hydrochinon reduziert und bilden Aggregate aus metallischem Silber entlang der DNA (Schritt c). Die hybridisierte DNA wird schließlich durch die Auflösung der Silberaggregate und deren elektrochemische Detektion durch Stripping-Voltammetrie nachgewiesen. Der kurze DNA-Primer kann ebenfalls Ag<sup>+</sup>-Ionen binden und so ein gewisses Hintergrundsignal verursachen. Dieses lässt sich vermeiden, wenn man als Primer für die Hybridisierung der Ziel-DNA Peptid-Nucleinsäuren (PNA) verwendet, die keine Phosphatgruppen tragen und daher keine Ag<sup>+</sup>-Ionen binden.

Die katalytischen Eigenschaften der Metall-Nanopartikel, die die stromlose Abscheidung von Metallen auf den Nanopartikel-Clustern ermöglicht, können auch zur Vergrößerung der Partikel zu leitenden, untereinander in Kontakt stehenden Einheiten genutzt werden. Die Bildung leitender Domänen als Ergebnis einer biologischen Erkennung liefert einen Ansatz für die elektrische Detektion des biologischen Erkennungsprozesses. Das Funktionsprinzip wurde an einem miniaturisierten Immunsensor auf Basis von Gold-Nanopartikeln und ihrer katalytischen Eigenschaften demonstriert (Abbildung 24 A).<sup>[228]</sup> Latexpartikel wurden durch eine anionische Schutzschicht stabilisiert und dann durch ein ungleichförmiges elektrisches Wechselfeld in die Lücke zwischen zwei Gold-Mikroelektroden gezogen (Dielektrophorese). Nach Entfernung der Schutzschicht von den Latexpartikeln durch einen entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten aggregierten die Latexpartikel und wurden in der Lücke fixiert. Durch Adsorption von Protein A an die Latexooberfläche wurde eine sensorische Oberfläche erzeugt, die spezifisch auf die Assoziation von humanem Immunglobulin-Antigen anspricht. Das Immunglobulin wurde mit einem goldmarkierten Anti-Human-IgG-Antikörper als Sonde koordiniert. Zuletzt wurde durch katalytische Abscheidung eine Silberschicht auf den Gold-Nanopartikeln aufgebracht. Die Silberschicht bildet eine Art Leiterbahn und überbrückt die Lücke zwischen den beiden Mikroelektroden. Typische Widerstände



zwischen den Mikroelektroden betragen  $50\text{--}70\ \Omega$ . In Kontrollexperimenten, in denen die spezifische katalytische Vergrößerung der Domäne durch die Gold-Nanopartikel-Antikörper-Konjugate fehlte, wurden Widerstände von  $>10^3\ \Omega$  gemessen. Humanes IgG kann mit dieser Methode mit einer Nachweisgrenze von ca.  $2 \times 10^{-13}\text{ M}$  analysiert werden.

Ein ähnliches DNA-Nachweisschema wurde mit Mikroelektroden auf einem Silicium-Chip entwickelt (Abbildung 24B).<sup>[229]</sup> Eine als Sonde fungierende Nucleinsäure (**58**) wurde auf der  $\text{SiO}_2$ -Grenzfläche in der Lücke zwischen den Mikroelektroden immobilisiert.<sup>[229a]</sup> Das Ziel-Oligonukleotid (27-mer; **59**) wurde mit der Sonde auf dem Chip



hybridisiert, anschließend wurde ein Gold-Nanopartikel, das mit der Nucleinsäure **60** funktionalisiert war, mit dem freien 3'-Ende der Ziel-DNA-hybridisiert. Die Gold-Nanopartikel katalysierten die Reduktion von  $\text{Ag}^+$ -Ionen mit Hydrochinon unter Bildung einer Silberschicht, wodurch der Widerstand zwischen den Elektroden sank. Punktmutanten des Analyten **59** wurden von der Sonde **58** durch Puffer mit geeigneter Ionenstärke weggewaschen. Die Widerstände, die mit der Ziel-DNA und ihrer Mutante gemessen wurden, unterscheiden sich um einen Faktor  $10^6$ . Die Widerstände zwischen den Mikroelektroden hängen von der Konzentration der Ziel-DNA ab, und die Nachweisgrenze liegt bei etwa  $5 \times 10^{-13}\text{ M}$ . Dies entspricht etwa  $1\ \mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$  humaner genomischer DNA oder ca.  $0.3\ \text{ng}\ \mu\text{L}^{-1}$  DNA aus einem kleinen Bakterium. Damit lässt sich wahrscheinlich vermeiden, aus Pathogenen extrahierte DNA vor der Analyse in Polymerasekettenreaktionen amplifizieren zu müssen. Nach einem ähnlichen Verfahren wurde die DNA-Hybridisierung auf einem Chip durch Kapazitätssmessungen analysiert.<sup>[229b]</sup> Die parallele Analyse von 42 Ziel-DNA-Sequenzen gelang mit einem Chip mit 42

Elektrodenlücken und den entsprechenden unterschiedlichen Nucleinsäure-Sonden zwischen den Lücken.<sup>[230]</sup>

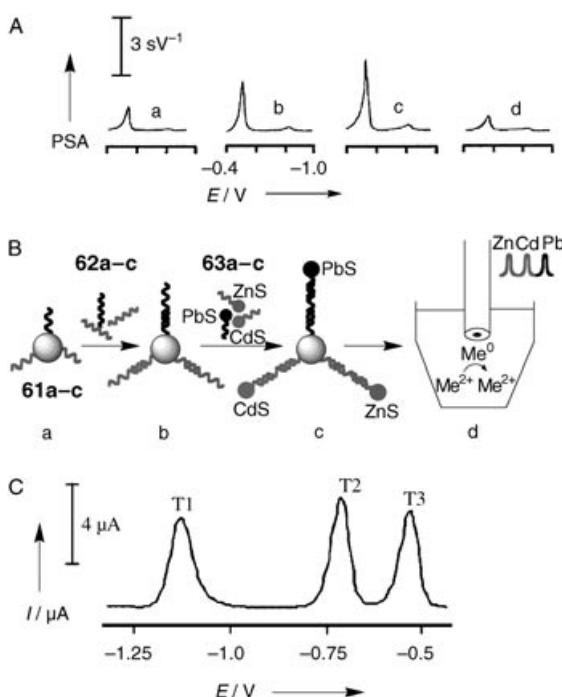
Durch die Immobilisierung von Nanopartikeln auf Oberflächen gelingt auch die Herstellung von Elektroden mit großer Oberfläche,<sup>[231]</sup> die eine entsprechend größere Kapazität für die Hybridisierung haben.<sup>[232]</sup> Ein solcher Nanopartikelfilm wurde durch Selbstorganisation von Gold-Nanopartikeln mit 16 nm Durchmesser auf einer mit Cysteamin modifizierten Goldelektrode präpariert. Auf diese Weise wurden Oberflächendichten von  $4 \times 10^{14}$  Oligonukleotid-Molekülen pro cm<sup>2</sup> erhalten. Die empfindliche Detektion des Ferrocencarboxaldehyd-Markers, der mit der Ziel-DNA verknüpft war, führt zu einer Nachweisgrenze von 500 pmol.

Durch Aufrauen eines Gold-Quarz-Kristalls mit einer Monolage aus Gold-Nanopartikeln konnte eine verbesserte mikrogravimetrische Analyse von DNA durchgeführt werden.<sup>[233]</sup> Ähnlich wurden Elektrodenoberflächen mit Gold- oder Siliciumdioxid-Nanopartikeln aufgeraut und als Plattformen für erweiterte Immunassays genutzt. Gemessen wurden mikrogravimetrische, amperometrische und Impedanzsignale.<sup>[234]</sup>

Ebenfalls entwickelt wurden effiziente Methoden zur Herstellung von Halbleiter-Nanopartikeln (z.B. CdS, CdSe, PdS, ZnS) und die Funktionalisierung mit Biomolekülen.<sup>[235]</sup> Mit diesen Nanopartikeln wurden Biomaterialien in biologischen Erkennungsprozessen markiert (etwa als DNA-Sensoren). Zum Beispiel wurden CdS-Halbleiter-Nanopartikel mit Nucleinsäuren modifiziert und als Marker für den Nachweis von DNA-Hybridisierungen eingesetzt.<sup>[236]</sup> Auflösen des CdS (mit 1M HNO<sub>3</sub>), elektrochemische Reduktion von Cd<sup>2+</sup> zu Cd<sup>0</sup> (das sich auf der Elektrode ansammelt) und Ablösen des erzeugten Cd<sup>0</sup> (unter Reoxidation zu Cd<sup>2+</sup>) generierte das elektrische Signal für die DNA-Analyse. In Abbildung 25 A sind die Chronopotentiogramme gezeigt, die sich bei der Analyse unterschiedlicher Konzentrationen der komplementären Ziel-DNA mit CdS-Nanopartikeln als Markern ergeben.

In einer Weiterentwicklung dieses Verfahrens wurden magnetische Partikel eingesetzt, die mit der Sensor-Nucleinsäure funktionalisiert waren. Die CdS-Nanopartikel waren mit den komplementären Oligonukleotiden markiert. Die Hybridisierung der komplementären Nucleinsäuren ermöglichte die Trennung der Doppelhelices aus der Reaktionsmischung und ihre Aufkonzentration auf der Elektrodoberfläche mit nachfolgendem elektrochemischem Nachweis. Die CdS-Nanopartikel konnten durch stromlose Abscheidung von Cd<sup>0</sup> vergrößert werden, was sich auf das elektrochemische Signal auswirkt und die Nachweisgrenze auf 100 fmol Analyt-DNA verringerte.

Eine interessante Perspektive ergibt sich aus der Kombination unterschiedlicher Metall- oder Halbleiter-Marker mit unterschiedlichen Nucleinsäuren für die parallele Hochdurchsatz-Analyse einer Bibliothek von Ziel-DNA-Sequenzen an unterschiedlichen magnetischen Kugelchen. Bei diesem Ansatz<sup>[237]</sup> werden Nucleinsäure-Sonden, die zu einer Serie von Ziel-DNAs komplementär sind, mit unterschiedlichen magnetischen Partikeln gekuppelt. In ähnlicher Weise wurden unterschiedliche Halbleiter- oder Metall-Nanopartikel-Marker, die zu Segmenten der Ziel-DNAs kom-



**Abbildung 25.** A) Stripping-Potentiogramme bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen; die analysierte DNA ist an Magnetpartikel gebunden und mit CdS-Nanopartikeln markiert: a) 0.2, b) 0.4, c) 0.6 mg L<sup>-1</sup>; d) Kontrollversuch mit nichtkomplementärer DNA (0.6 mg L<sup>-1</sup>). B) Paralleler elektrochemischer Nachweis von DNA-Analysen mit unterschiedlichen nanokristallinen Markern: a) Anbringen von Sondenmolekülen an den Magnetkugelchen; b) Hybridisierung mit der Ziel-DNA; c) zweite Hybridisierung mit Nanopartikel-markierten Sonden; d) Auflösen der Nanopartikel und elektrochemische Detektion. C) Stripping-Voltammogramme, aufgenommen bei der parallelen Analyse dreier unterschiedlicher DNA-Targets (60-mer), die mit dem Brustkrebs-Gen BRCA1 (je 54 nm) verwandt sind. Die DNA-Moleküle sind markiert mit: ZnS-Nanopartikeln (T1), CdS-Nanopartikeln (T2) und PbS-Nanopartikeln (T3). (Teil A aus Lit. [236], Teile B und C aus Lit. [237] mit Genehmigung, Copyright American Chemical Society, 2003.)

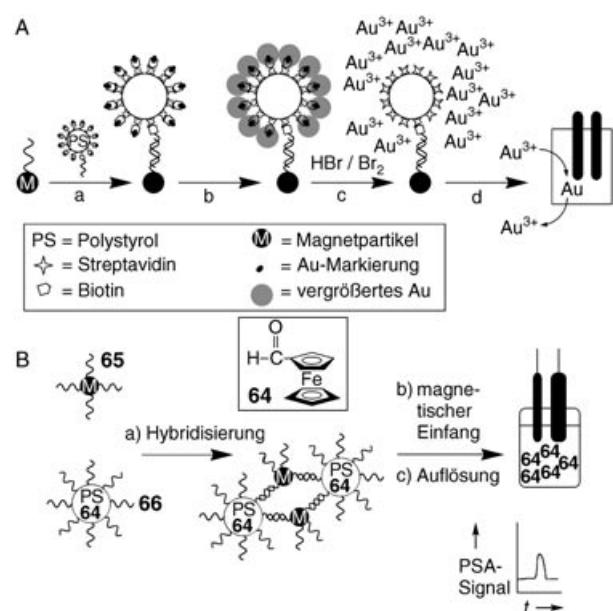
plementär sind, als Amplifizierungseinheiten im primären Hybridisierungsvorgang eingesetzt. Die Hybridisierung der Nucleinsäure-funktionalisierten Halbleiter- oder Metallpartikel mit der spezifischen Ziel-DNA, gefolgt vom Auflösen der Nanopartikel, der elektrochemischen Akkumulation und dem Ablösen der Metalle ermöglicht die Detektion der in der Probe vorliegenden spezifischen Ziel-DNAs. Die für das Ablösen des Metalls charakteristischen Potentiale sind elektrochemische Indikatoren für die Natur der analysierten DNA. Das nachfolgend beschriebene Modellsystem beruht auf diesem Prinzip.<sup>[237]</sup>

Drei Arten magnetischer Partikel, modifiziert mit drei unterschiedlichen Nucleinsäuren **61a-c**, wurden zunächst mit den komplementären Analyt-Nucleinsäuren **62a-c** hybridisiert. Im nächsten Schritt erfolgte Hybridisierung mit drei Arten von Halbleiter-Nanopartikeln (ZnS, CdS und PbS), die mit Nucleinsäuren funktionalisiert waren (**63a-c**), die zu den freien Enden der Analyt-DNA komplementär waren (Abbildung 25B). Wegen der magnetischen Eigenschaften der Partikel kann die Analytprobe leicht transportiert und gereinigt werden, und die Halbleiter-Nanopartikel liefern nichtüber-

lappende elektrochemische Signale mit einer für die hybridisierte DNA spezifischen Signatur. Durch Stripping-Voltammetrie der Metalle aus den Halbleiter-Nanopartikeln werden genau definierte und gut aufgelöste Peaks erhalten, z.B. bei  $-1.12\text{ V}$  (Zn),  $-0.68\text{ V}$  (Cd) und  $-0.53\text{ V}$  (Pb) (gemessen gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode). Auf diese Weise lassen sich mehrere DNA-Analyten, die mit Halbleiter-Nanopartikeln markiert sind, simultan elektrochemisch analysieren.

Abbildung 25C zeigt die Voltammogramme für eine Lösung mit drei DNA-Proben, die mit ZnS-, CdS- und PbS-Nanopartikeln markiert waren. Durch Funktionalisierung der Nanokristallmarker mit thiolderivatisierten Oligonukleotid-Sonden erhält man voltammetrische Signaturen mit charakteristischen elektrischen Signalen für die entsprechenden Ziel-DNAs. Position und Größe der resultierenden Stripping-Peaks liefern die gewünschte Information hinsichtlich Natur und Menge der Ziel-DNAs. Der parallele DNA-Nachweis wurde mit der Amplifizierung durch Stripping-Voltammetrie gekoppelt (was die Nachweigrenzen in den fmol-Bereich verschiebt) sowie mit einer effizienten magnetischen Entfernung nichthybridisierter Nucleinsäuren (was Empfindlichkeit und Selektivität erhöht). Fünf bis sechs DNA-Sequenzen können so simultan in einem einzigen Lauf mit ZnS, PbS, CdS, InAs und GaAs als Halbleiter-Nanopartikeln detektiert werden. Durch Weiterentwicklung zu hoch parallelen Ansätzen (durch Mehrfachmessungen in Vertiefungen von Mikrotiterplatten oder mit Mehrkanalmikrochips) könnte man so zu einer Hochdurchsatz-Analyse von DNA gelangen.

Die oben diskutierten Amplifizierungsmöglichkeiten für die elektrochemische DNA-Analyse beruhen darauf, dass pro Hybridisierungseignis auf eine einzelne Reporter-Einheit zugegriffen wird, z.B. auf ein Metall- oder Halbleiter-Nanopartikel. Die Empfindlichkeit kann weiter gesteigert werden, indem man mehrere Marker je Bindungseignis aktiviert.<sup>[238,239]</sup> Hierzu müssen die Erkennungseinheiten mit polymeren Mikrokügelchen gekuppelt werden, die entweder extern (d.h. an ihrer Oberfläche) oder intern (verkapselt) unterschiedliche Redoxmarker tragen. Das Prinzip dieses Verfahrens wird anhand eines dreifach amplifizierenden Bioassays aufgezeigt. Dieser kombiniert die Anwendung von Amplifikationseinheiten auf Carrierkügelchen (die mit zahlreichen Gold-Nanopartikel-Markern beladen sind) mit den „eingebauten“ Vorkonzentrierungseigenschaften der Stripping-Voltammetrie und der katalytischen Vergrößerung der Gold-Partikel (Abbildung 26 A).<sup>[238a]</sup> Die goldmarkierten Kügelchen wurden durch Kupplung von biotinylierten Gold-Nanopartikeln an Streptavidin-beschichtete Polystyrol-Kügelchen hergestellt. Diese Kügelchen wurden mit einem einsträngigen Oligonukleotid functionalisiert, das mit einem komplementären Oligonukleotid hybridisiert wurde, an dem ein Magnetpartikel gekuppelt war (Abbildung 26 A, Schritt a). Die so erhaltenen Gold-Nanopartikel-Marker, die mit einem doppelsträngigen Oligonukleotidpaar assoziiert waren, wurden durch stromlose Goldabscheidung vergrößert (Abbildung 26 A, Schritt b) und mithilfe der Magnetpartikel zum Elektroden-Array transportiert. Das Goldaggregat wurde mit HBr/Br<sub>2</sub> aufgelöst und durch elektrochemische Abscheidung mit nachfolgender Stripping-Voltammetrie ana-



**Abbildung 26.** A) Amplifizierter DNA-Nachweis mit Nucleinsäure-Gold-nanopartikel-funktionalisierten Kugelchen M als Markern und stromloser katalytischer Goldabscheidung auf den Nanopartikeln. a) Hybridisierung der Nucleinsäure-Goldnanopartikel-funktionalisierten Kugelchen mit der Ziel-DNA, die an ein Magnetkügelchen gebunden ist; b) katalytisch verstärkte Goldabscheidung auf den Nanopartikeln; c) Auflösung der Goldcluster; d) Nachweis der Au<sup>3+</sup>-Ionen durch Stripping-Voltammetrie. B) Amplifizierter DNA-Nachweis mit Polystyrol-Kügelchen, die mit einem Ferrocen-Redoxmarker beladen sind.

lysiert (Abbildung 26 A, Schritte c und d). Durch diese dreifache Amplifikation wurde eine drastische Steigerung der Empfindlichkeit erreicht.

In einem anderen Ansatz wurden als Marker für die DNA-Hybridisierung Kohlenstoff-Nanoröhren eingesetzt, die mit CdS-Nanopartikeln beladen waren.<sup>[238b]</sup> Die gebundenen CdS-Nanopartikel wurden mit 1M HNO<sub>3</sub> aufgelöst, und die freigesetzten Cd<sup>2+</sup>-Ionen erzeugten ein verstärktes Signal für die Hybridisierung.

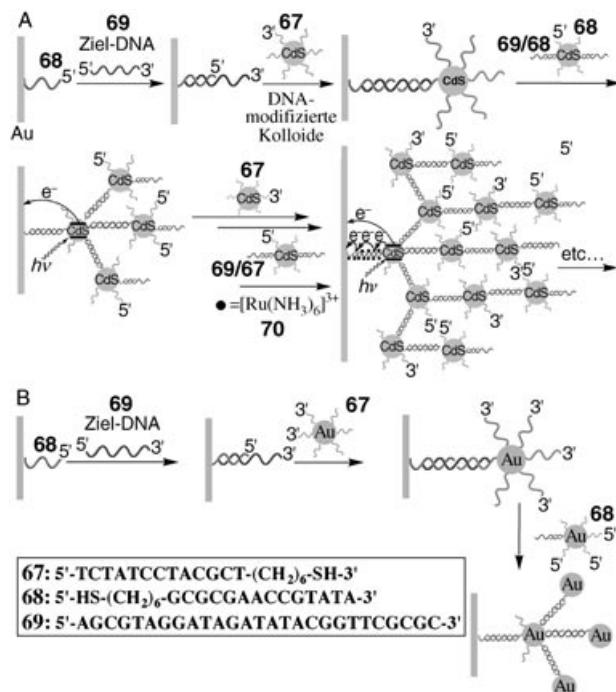
Eine alternative Möglichkeit zur Markierung der Sonden ist die interne Verkapselung elektroaktiver Marker in den Carrier-Kügelchen. Dieser Ansatz kann einige Vorteile gegenüber der externen Markierung der Sonden mit Nanopartikeln bieten. So wurde über einen ultraempfindlichen elektrochemischen DNA-Nachweis auf der Basis von Polystyrol-Kügelchen, die mit dem Redoxmarker Ferrocencarboxaldehyd (64) imprägniert waren, berichtet (Abbildung 26 B).<sup>[239a]</sup> Die DNA-Sonden 65 waren an Magnetpartikel gebunden und die Polystyrolkügelchen mit der komplementären Nucleinsäure 66 functionalisiert. Die komplementären Stränge wurden hybridisiert und gesammelt, die Kügelchen in einem organischen Lösungsmittel gelöst und die an den Kügelchen gebundenen Redoxmarkierungen 64 freigesetzt. Mit diesem Verfahren gelingt der chronopotentiometrische Nachweis der Ziel-DNA mit einer Empfindlichkeit von etwa  $5.1 \times 10^{-21}\text{ mol}$  ( $\approx 31\,000$  Molekülen), und das unter experimentellen Bedingungen, die 20 Minuten Hybridisierungszeit und die „Freisetzung“ der Marker durch Auflösen der modifizierten Kügelchen in organischen Medium einschließen. Das verstärkte

elektrochemische Auslesesignal wurde mit bemerkenswerter Diskriminierung gegen einen großen Überschuss ( $10^7$ fach) nichtkomplementärer Nucleinsäuren registriert.

Weitere Studien galten der Verkapselung von redoxaktiven Nanopartikeln (ZnS, GaAs, CdS, InAs) in Polystyrol-Wirten. Auf diese Weise wurden Bibliotheken mit elektrochemisch lesbarer Codierung erzeugt, die eine parallele DNA-Detektion ermöglichen.<sup>[239b]</sup> Andere Ansätze zur Verkapselung von Markern bieten vielversprechende Perspektiven für den elektrischen DNA-Nachweis. Besonders attraktiv sind kürzlich entwickelte nanoverkapselte mikrokristalline Partikel, die schichtweise aufgebaut sind und sich durch große Marker/Biomolekül-Verhältnisse auszeichnen und hochamplifizierte Bioassays ermöglichen.<sup>[240]</sup> Verwandte analytische Verfahren, die mehrfache Amplifizierungsschritte auf der Basis enzymfunktionalisierter Liposomen mit der Akkumulation der Produkte aus der biokatalytischen Reaktion kombinieren, wurden für hochempfindliche DNA-Tests entwickelt.<sup>[241]</sup> Die Funktion dieser Testsysteme beruht auf der großen Oberfläche der Liposomen, die eine große Zahl von Enzymmolekülen tragen. Der Nachweis des akkumulierten Produkts erfolgt chronopotentiometrisch.

Zur photoelektrochemischen Transduktion von DNA-Erkennungsprozessen wurden Halbleiter-Nanopartikel (CdS) eingesetzt, die mit Nucleinsäuren modifiziert waren.<sup>[188]</sup> Die Nanopartikel ( $2.6 \pm 0.4$  nm) wurden mit einer von zwei thiolderivatisierten Nucleinsäuren (**67** oder **68**) funktionalisiert, die komplementär zum 5' bzw. 3'-Ende der Ziel-DNA **69** sind. Ein schichtweises Hybridisierungsverfahren wurde anschließend eingesetzt, um auf einer Goldelektrode ein Array von CdS-Nanopartikelschichten aufzubauen (Abbildung 27 A). Eine primäre thiolderivatierte DNA-Monoschicht von **68** wurde auf eine Goldelektrode aufgebracht. Die Ziel-DNA **69** fungierte nun als Vernetzungselement für die Assoziation der mit **67** modifizierten CdS-Nanopartikel an der Elektrode. Anschließend wurden die mit **68** modifizierten CdS-Partikel an die ersten, mit **67** modifizierten CdS-Partikel hybridisiert, wodurch eine zweite Generation von CdS-Partikeln entstand. Durch schrittweises abwechselndes Aufbringen der beiden Typen Nucleinsäure-funktionalisierter CdS-Partikel (durch Hybridisierung mit **69**) wurde letztlich ein Array mit einer kontrollierten Zahl von Nanopartikel-Generationen auf der Elektrode aufgebaut. Der Array wurde spektroskopisch (Absorption, Fluoreszenz, siehe Abbildung 20B,C) und durch mikrogravimetrische Quarzkristall-Mikrowaagen-Analyse charakterisiert.

Durch Bestrahlung des Arrays wird ein Photostrom induziert, der mit der Zahl der CdS-Nanopartikel-Generationen auf der Elektrode zunimmt. Die Aktionsspektren des Photostroms entsprechen den Absorptionseigenschaften der CdS-Nanopartikel, was darauf hinweist, dass der Photostrom durch Photoanregung der CdS-Nanopartikel zustandekommt. Somit induziert die Photoanregung des Halbleiters den Transfer von Elektronen in das Leitungsband und die Bildung eines Elektron-Loch-Paars. Die Ableitung der Leitungsbandelektronen zur Arbeitselektrode und der gleichzeitige Transfer von Elektronen von einem OpferElektronendonator zu den Valenzbandlöchern hält den Photostrom in einem Fließgleichgewicht aufrecht. Die Leitungsbandelektronen werden



**Abbildung 27.** A) Konstruktion von Überstrukturen aus CdS-Nanopartikel-DNA-Konjugaten und ihre Anwendung zur Erzeugung von Photostrom. B) Dendritisch verstärkte DNA-Sensorik mit Oligonukleotid-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln auf einer Quarzkristall-Mikrowaagen-Elektrode (QCM).

über Nanopartikel im Kontakt mit dem Elektrodenträger in die Elektrode geschleust. Diese Deutung wird durch den Befund gestützt, dass  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplexe **70** ( $E^\circ = -0.16$  V gegen SCE), die elektrostatisch an die DNA koordinieren, den Photostrom von DNA-CdS-Arrays verstärken. Die  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplexe wirken wie Elektronenleiter und erleichtern das Elektronen-Hopping von Leitungsbandelektronen aus CdS-Partikeln, die nicht über DNA-Stränge mit der Elektrode verknüpft sind. Das System demonstriert die Anwendung von photoelektrochemischen Methoden als Übertragungsverfahren für die DNA-Sensorik und ist zugleich ein Beispiel für ein Nano-Engineering mit organisierten DNA-bestückten Halbleiter-Nanopartikeln auf leitfähigen Trägern. Diese Strukturen sind ein erster Schritt hin zu elektronischen Nano-Schaltkreisen (siehe die Diskussion in Abschnitt 8.2).

Nanopartikel als Komponenten von Metall-Nanopartikel-Nucleinsäure-Hybriden haben ein hohes Molekulargewicht, was die Konjugate zu idealen Markern für die mikrogravimetrische Quarzkristall-Analyse von biologischen Erkennungsprozessen auf der Oberfläche von piezoelektrischen Kristallen macht. Da Nanopartikel außerdem als Katalysatoren für die Abscheidung von Metallen wirken, können noch größere Massenänderungen induziert werden, was eine weitere Verstärkung mikrogravimetrischer Signale bei biologischen Erkennungsprozessen ergibt. Bei einem piezoelektrischen Quarzkristall (AT-Schnitt) ändert sich die Kristall-Resonanzfrequenz um  $\Delta f$ , wenn sich die Masse auf dem

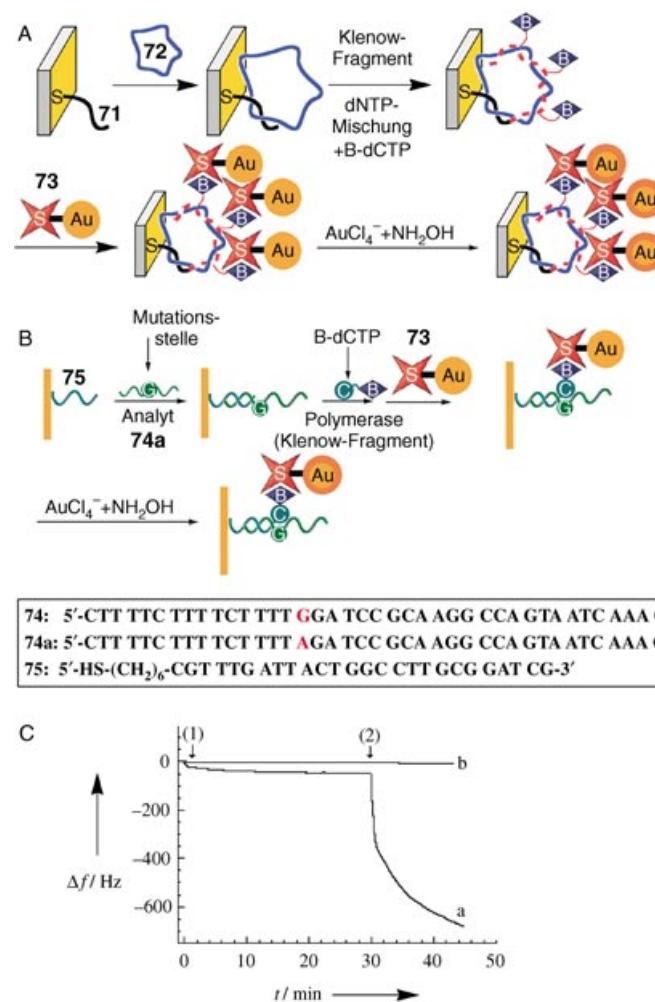
Kristall um  $\Delta m$  ändert [siehe die Sauerbrey-Gleichung (1);  $f_0$  ist die Basisfrequenz des Quarzkristalls,  $\Delta m$  die Massenänderung,  $A$  die piezoelektrisch aktive Fläche,  $\rho_q$  die Dichte von Quarz ( $2.648 \text{ g cm}^{-3}$ ) und  $\mu_q$  der Schermodul ( $2.947 \times 10^{11} \text{ dyn cm}^{-2}$  für Quarz im AT-Schnitt).<sup>[242]</sup>]

$$\Delta f = -2f_0^2 \frac{\Delta m}{A (\mu_q \rho_q)^{1/2}} \quad (1)$$

Zum mikrogravimetrischen DNA-Nachweis mit Nucleinsäure-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln als „Nano-Ge wichten“ wurde eine Ziel-DNA **69** mit einem Gold-Quarzkristall hybridisiert, der mit einer Oligonucleotid-Sonde **68** modifiziert war. Anschließend wurde die Grenzfläche zwischen Gold-Nanopartikeln, die mit einer zum freien 3'-Segment der Ziel-DNA **69** komplementären DNA **67** functionalisiert waren, hybridisiert (Abbildung 27B).<sup>[243]</sup> Das Signal wurde weiter amplifiziert durch ein sekundäres Gold-Nanopartikel, das mit der Nucleinsäure **68** functionalisiert ist. Dieses ist komplementär zum 5'-Segment der Ziel-DNA **69** und ermöglicht so eine schichtweise Auflage von Gold-Nanopartikeln. Die Hybridisierung der mit **68** modifizierten Gold-Nanopartikel mit der zu analysierenden DNA **69**, gefolgt von der Hybridisierung des Komplexes an die primäre Nanopartikel-Schicht ergab eine zweite Generation von Gold-Nanopartikeln, die an das Wachstum von Dendrimeren erinnert.<sup>[243b,244]</sup> Konzentrationen bis hinab zu  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  konnten durch diese Amplifizierung der Ziel-DNA durch Nucleinsäure-funktionalisierte Gold-Nanopartikel-Markierungen nachgewiesen werden. Das Größenwachstum der Gold-Nanopartikel-Markierungen von 10 nm bis auf ca. 40–50 nm erzeugt ein verstärktes  $\Delta f$ -Signal und vergrößert damit den Amplifikationsfaktor bei der DNA-Analyse.<sup>[245]</sup> Eine weitere Vergrößerung der Gold-Nanopartikel verursacht nur noch kleinere Änderungen des mikrogravimetrischen Signals, weil bei zu großem Umfang des Markierungspartikels die Analyt-DNA unvollständig hybridisiert.

Eine weitere Methode zur amplifizierten mikrogravimetrischen Quarzkristall-Mikrowaagen-Analyse von DNA verwendet die katalytische Metallabscheidung auf den Markierungspartikeln.<sup>[246]</sup> Abbildung 28A zeigt die Signalverstärkung beim Nachweis der 7249 Basen langen M13mp18-DNA durch katalytische Abscheidung von Gold auf einem Gold-Nanopartikel-Konjugat.<sup>[247]</sup> Der DNA-Primer **71** wurde auf einem Gold-Quarz-Kristall aufgebracht. Nach Hybridisierung mit M13mp18-DNA (**72**) wurde der doppelsträngige Komplex mit einer Mischung von Nucleotiden (dNTP-Mischung: dATP, dGTP, dUTP, biotinyliertes dCTP [B-dCTP]) und der DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) repliziert. Die entstandene biotinmarkierte DNA wurde mit einem Streptavidin-Gold-Nanopartikel-Konjugat **73** zu einer goldmarkierten DNA-Replika umgesetzt. Diese wurde einer Gold-Nanopartikel-katalysierten Abscheidung von Gold durch  $\text{NH}_2\text{OH}$ -stimulierte Reduktion von  $\text{AuCl}_4^-$  unterzogen.

Der Replikationsprozess ist der primäre Amplifikations schritt. Er steigert die Masse des Kristalls und erzeugt gleichzeitig eine große Zahl von Biotin-Markierungen, die zur Assoziation der Streptavidin-Gold-Nanopartikel-Konjugate dient. Der sekundäre Amplifikationsschritt bei der



**Abbildung 28.** A) Signalverstärkung beim Nachweis der 7249 Basen langen M13mp18-DNA durch katalytische Abscheidung von Gold auf einem Gold-Nanopartikel-Konjugat. B) Analyse einer einzelnen Fehlpaarung in der DNA durch katalytische Abscheidung von Gold auf einem Gold-Nanopartikel-Konjugat. C) Mikrogravimetrischer Nachweis einer Punktmutation, verstärkt durch katalytische Abscheidung von Gold auf einem Gold-Nanopartikel-Konjugat. Aufgetragen sind die Kristallfrequenzen, die mit der Mutante (a) und mit einer normalen DNA-Sequenz (b) gemessen wurden. Pfeil (1) markiert die Anbindung des SAu-Au-Konjugats, Pfeil (2) die katalytische Abscheidung von Gold auf den Gold-Nanopartikeln. (Mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry aus Lit. [247].)

Analyse der M13mp18-DNA ist die Bindung des Nanopartikel-Konjugats. Der dritte Schritt, die katalytische Abscheidung des Metalls und die damit verbundene Massenzunahme des Gold-Nanopartikels, leistet den größten Beitrag zum Amplifikationsfaktor. Die M13mp18-DNA konnte mit dieser Methode bis zu einer Nachweigrenze von ca.  $1 \times 10^{-15} \text{ M}$  detektiert werden.

Das beschriebene Amplifikationsverfahren wurde auch für die Analyse von Fehlpaarungen einzelner Basenpaare in der DNA angewendet. Im Beispiel (Abbildung 28B) ist die Analyse der DNA-Mutante **74a** gezeigt, in der ein Adenin des normalen Gens **74** gegen ein Guanin ausgetauscht ist. Zur Analyse der Mutation wurde die DNA-Sonde **75** – die zum normalen Gen **74** ebenso komplementär ist wie zu der

Mutante **74a** (mit Ausnahme der einen Base an der Mutationsstelle) – auf dem Gold-Quarzkristall immobilisiert. Durch Hybridisierung des normalen Gens oder der Mutante mit dieser Sonde und anschließende Replikation des einsträngigen DNA-Segments mit biotinyliertem dCTP (B-dCTP) in Gegenwart der Polymerase (Klenow-Fragment) wurde die Biotin-Markierung ausschließlich in den Komplex mit der Mutante **74a** eingeführt. Die nachfolgende Assoziation des Streptavidin-Gold-Konjugats **73** und die katalytische Abscheidung von Gold auf den Gold-Nanopartikeln verstärkte das Signal für die Analyse der Fehlpaarung in **74a**. In Abbildung 28C, Kurve a, ist der mikrogravimetrische Nachweis der Mutante **74a** mit dieser Methode dargestellt. Bei dem normalen Gen **74** ändert sich die Frequenz des Kristalls hingegen nicht (Abbildung 28C, Kurve b). Mit dieser Methode konnte eine Nachweisgrenze von  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$  erreicht werden.

### 6.3. Nanopartikel-Biomolekül-Konjugate für die optische Sensorik und Analytik

An Biorezeptoren gekoppelte Metall- oder Halbleiter-Nanopartikel wirken als markierte Konjugate und können zur optischen Verfolgung biologischer Erkennungsprozesse an biosensorischen Oberflächen eingesetzt werden. Die Adsorption von Nanopartikeln auf Biochips wurde mit mehreren optischen Methoden nachgewiesen, z.B. durch Lichtstreuungsmessungen, Oberflächenplasmonenresonanz, resonanzverstärkte Absorption durch Nanopartikel, Nanopartikel-Fluoreszenz und verstärkte Raman-Streuung.

In einem typischen Aufbau wird ein modifizierter Glästräger auf den Objekttisch eines Mikroskops montiert und in der Ebene des Trägers mit weißem Licht beleuchtet. In dieser Konfiguration fungiert der Glästräger als planarer Wellenleiter, der durch Totalreflexion verhindert, dass Licht das Objektiv des Mikroskops erreicht. Wo immer Nanopartikel-Sonden an der Oberfläche anhaften, wird evaneszent gekoppeltes Licht aus dem Träger gestreut und als helle farbige Flecke sichtbar. Auf diese Weise gelang der Nachweis von Gold-Nanopartikel-markierten DNA-Molekülen, die spezifisch an eine DNA-funktionalisierte Oberfläche gebunden waren.<sup>[248]</sup> Die Vergrößerung der Gold-Nanopartikel durch katalytische Reduktion von Silberionen und die Abscheidung von metallischem Silber auf den Gold-Nanopartikeln ergab eine 100fache Verstärkung des Signals.<sup>[248a,d]</sup> Zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen konnten simultan nachgewiesen werden, wenn zwei Gold-Nanopartikel unterschiedlicher Größe zur Markierung unterschiedlicher Oligonukleotide eingesetzt wurden.<sup>[248c]</sup> Flecken unterschiedlicher Farben, die die primäre Assoziation von zwei Arten von Gold-Nanopartikeln anzeigen, konnten auf dem Glästräger nachgewiesen werden, wenn Domänen, die mit unterschiedlichen DNA-Sonden funktionalisiert waren, mit der entsprechenden komplementären DNA (markiert mit Gold-Nanopartikeln von 50 und 100 nm Durchmesser) umgesetzt wurden. Die Methode wurde zur Detektion von Fehlpaarungen einzelner Basen in Oligonukleotiden eingesetzt, die mit an unterschiedlichen Domänen des Glästrägers immobilisierten DNA-

Sonden hybridisiert waren.<sup>[248a]</sup> Die hohe analytische Empfindlichkeit wurde durch die Abscheidung von Silber erreicht, die Selektivität wurde anhand des Schmelzprofils der Flecken eruiert (die Flecken mit der Fehlpaarung wiesen wegen der niedrigeren Assoziationskonstanten die niedrigere Schmelztemperatur auf).

Die Schmelzeigenschaften von DNA-gebundenen Nanopartikel-Aggregaten werden durch mehrere Faktoren beeinflusst, einschließlich der Oberflächendichte der DNA, der Nanopartikelgröße, des Abstands zwischen den Partikeln und der Salzkonzentration.<sup>[249]</sup> Ein theoretisches Modell zur Beschreibung dieses Prozesses wurde vor kurzem entwickelt.<sup>[249a]</sup> Die Schärfe des Schmelzprofils hängt stark von der Größe der Nanopartikel ab. Mit 50 nm großen Gold-Nanopartikeln wurde ein Schmelzbereich von nur 1 K beobachtet.<sup>[249b]</sup> Da die Schärfe des Schmelzbereichs direkt mit der Selektivität korreliert, ergibt sich hieraus ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Selektivität von DNA-Nachweissystemen auf Nanopartikel-Basis.

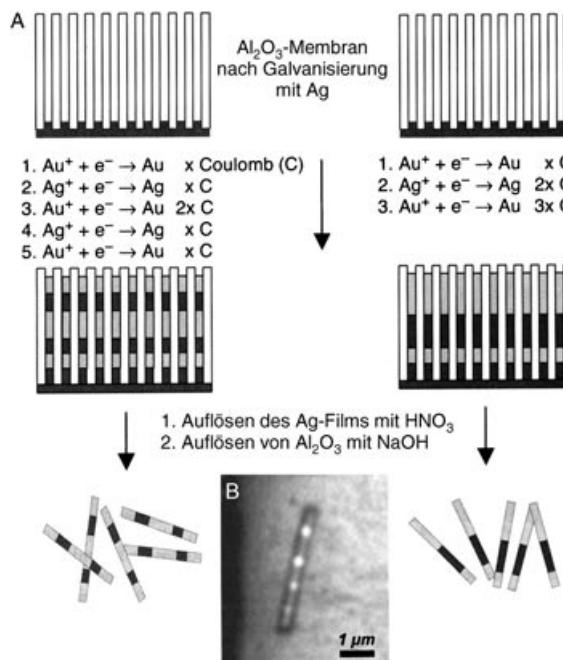
Silber-Nanopartikel wurden auf ähnliche Weise als Antikörper-Marker zum Nachweis von Antigenen verwendet. Mit diesem Nachweisschema wurde eine ausreichende Empfindlichkeit zur Ausführung von Immunassays erhalten, die auf dem Nachweis eines einzelnen Targets beruhen.<sup>[250]</sup> In einem Experiment zur Detektion von Pestiziden mit Gold-Nanopartikel-markierten Antikörpern diente ein einfacher Flachbett-Scanner dazu, Signale von der immunsensorischen Oberfläche auszulesen.<sup>[251]</sup> In einem anderen Versuch wurde ein preiswerter Bildanalysator eingesetzt, um die von den evaneszenten Wellen induzierte Lichtstreuung an den silberverstärkten Gold-Nanopartikel-Markierungen zu erfassen.<sup>[248d]</sup>

Über eine Echtzeit-Nachweismethode für DNA wurde kürzlich berichtet. Das Verfahren beruht auf der Verwendung von Gold-Nanopartikel-Sonden mit konjugierter Einzelstrang-DNA und mikrostrukturierten chemoresponsiven Beugungsgittern, die simultan bei mehreren Laserwellenlängen abgetastet werden.<sup>[252]</sup> Das Verfahren kombiniert die hohe Empfindlichkeit und Selektivität der Nanopartikel-Sonden mit dem einfachen experimentellen Aufbau der Beugungstechnik. Es ermöglicht eine wellenlängenabhängige Resonanzverstärkung und verfügt über ein beträchtliches Miniaturisierungspotential.

Die Resonanzverstärkung der optischen Absorptionseigenschaften von Metall-Nanopartikeln bei biologischen Erkennungsprozessen wurde auch als effektive Methode in der Biosensorik genutzt.<sup>[253]</sup> Silber-Nanopartikel fungierten als Träger für die weitere Erkennung von Biomolekülen;<sup>[253b]</sup> Metall-Nanopartikel (Ag, Au, Pt), die durch biologische Erkennung an die aktive Sensor-Schnittstelle binden, wurden als Marker eingesetzt.<sup>[253b]</sup> Durch die gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und der erweiterten Mie-Theorie ergab sich ein theoretischer Ansatz zur quantitativen Bestimmung der gebundenen Biomoleküle.<sup>[253c]</sup> Die besonderen optischen Eigenschaften der Gold-Nanopartikel wurden zur Entwicklung eines Trockenstreifen-Biosensors eingesetzt, der den visuellen Nachweis von doppelsträngiger DNA innerhalb von Minuten ermöglicht.<sup>[254]</sup> Auch über die Detektion von Immunglobulin G mit bloßem Auge durch Vergrößerung von Gold-Nanopartikeln wurde berichtet.<sup>[255]</sup>

Gold-Nanopartikel wurden als spektroskopische Verstärker für In-vitro-Untersuchungen an einzelnen Viren genutzt.<sup>[256]</sup> Extrinsiche Parameter wie die dielektrischen Eigenschaften der unmittelbaren Umgebung des Partikels (Nanoumgebung) oder Ladungsverteilungen beeinflussen die Position der Plasmonenresonanzen der Nanopartikel entscheidend.<sup>[257]</sup> Protein- oder DNA-Bindungereignisse verursachen eine Änderung des Brechungsindex der Nanoumgebung eines Gold-Nanopartikel und damit eine Verschiebung seiner Plasmonenresonanz. Die Verschiebung wurde zur Detektion biologischer Erkennungsprozesse an einem einzelnen Nanopartikel herangezogen.<sup>[258]</sup>

Über die interessante Anwendung submikrometergroßer metallischer „Strichcodes“<sup>[259]</sup> zur Analyse von Biomaterialien wie DNA oder Antigenen ist kürzlich berichtet worden.<sup>[259b]</sup> Strichcodes einer Breite von wenigen hundert Nanometern und einer Länge von mehreren Mikrometern wurden durch elektrochemische Abscheidung unterschiedlicher Metalle (Pt, Pd, Ni, Co, Ag, Cu, Au) in eine poröse  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Membran hergestellt (Abbildung 29 A). Die Länge der Metallsegmente wird durch die Ladung bestimmt, die wäh-

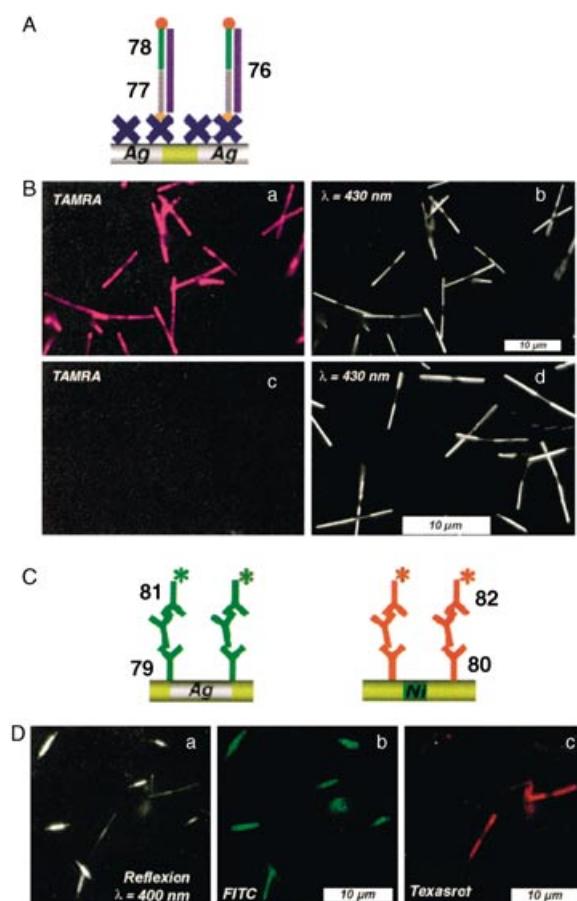


**Abbildung 29.** A) Herstellung von gemischten Metall-Strichcodes in einer Aluminiumoxid-Membran. B) Optische Aufnahme eines mehrstreifigen Au-Ag-Strichcodes. (Mit Genehmigung aus Lit. [259b].)

rend des elektrochemischen Prozesses übertragen wird. Die Struktur des Strichcodes konnte durch optische Reflexionsmessung oder Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie bestimmt werden. Abbildung 29 B zeigt die optische Aufnahme eines mehrstreifigen Au-Ag-Strichcodes, bestehend aus 240, 170, 110 und 60 nm breiten Silberstreifen, die durch ca. 550 nm breite Goldstreifen getrennt sind. Es wurde veranschlagt, dass bei der erreichbaren optischen Auflösung und einer Codelänge von 6.5 μm mit zwei Metallen 4160 und mit drei Metallen  $8 \times 10^5$  lesbare Strichcodes möglich sind. Die

Anwendung einer Sammlung von Strichcodes, von denen jeder ein spezifisches Biomolekül identifiziert, könnte die parallele Analyse zahlreicher Komponenten in biologischen Mischungen ermöglichen. Hiermit steht ein Ansatz auf der Basis von Nanopartikeln zur Verfügung, der mit der Anwendung von Chip-Arrays und kodierten Mikrokugelchen konkurriert.

Die Identifizierung von Strichcodes kann optisch erfolgen, sodass die Möglichkeit besteht, Fluoreszenzsignale zur Charakterisierung eines biologischen Erkennungsvorgangs zu nutzen.<sup>[259b]</sup> Abbildung 30 A zeigt das Prinzip der Fluoreszenzdetektion am Beispiel einer Analyt-DNA **76** durch eine Primer-Nucleinsäure **77**, die an die Ag-Streifen eines Ag-Au-Ag Strichcodes fixiert ist. Eine mit einem Fluorophor (Tetramethylrhodamin, TAMRA) markierte Nucleinsäure **78** hybridisiert mit dem freien Segment der Analyt-DNA. Abbildung 30 B zeigt das Fluoreszenzbild (a) und das Reflexionsbild (b) des fluoreszenzmarkierten DNA-Komplexes, der an dem Ag-Au-Ag-Strichcode immobilisiert wurde. Das erste Bild charakterisiert das Bindungereignis, das zweite identi-



**Abbildung 30.** A) Prinzip des DNA-Nachweises mit Strichcodes. B) Fluoreszenz- (a) und Reflexionsbilder (b) von Strichcodes mit gebundener fluoreszierender DNA; Fluoreszenz- (c) und Reflexionsbilder (d) von Strichcodes ohne Analyt-DNA. C) Prinzip paralleler Immunsays mithilfe von Strichcodes. D,a) Reflexionsbild, b) Fluoreszenzbild, erzeugt durch Fluorescein-markiertes Anti-hIgG, c) Fluoreszenzbild, erzeugt durch Texasrot-markiertes Anti-Kaninchen-IgG. (Mit Genehmigung aus Lit. [259b].)

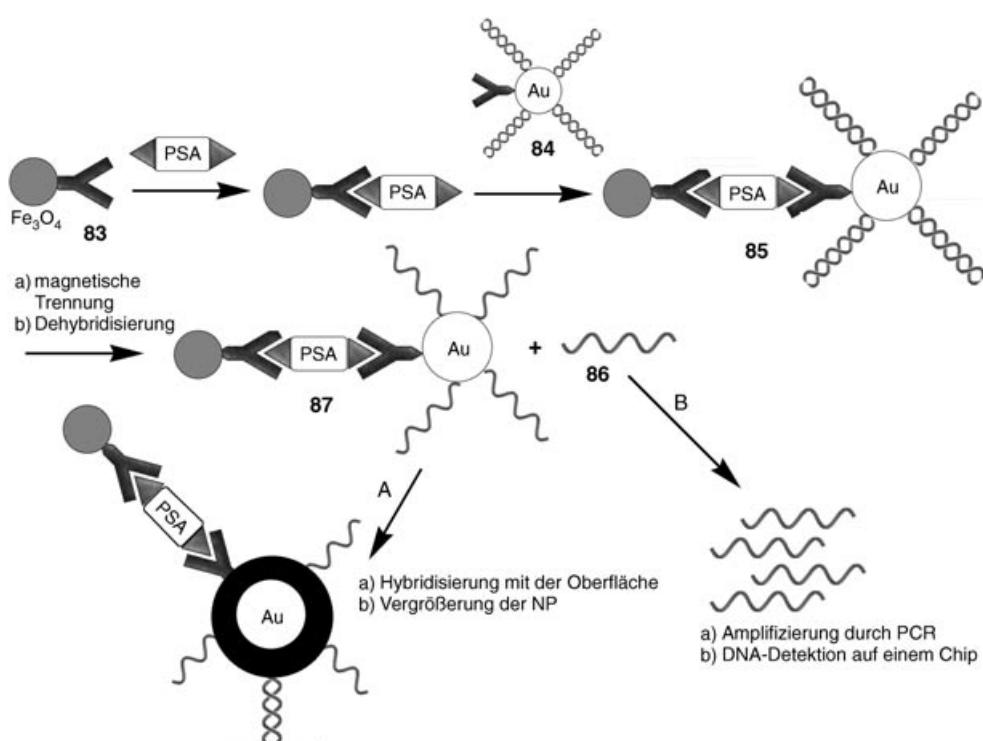
fiziert den Strichcode und die daran gebundene DNA-Sonde. In einem Kontrollexperiment ohne Analyt-DNA erkennt man nur eine sehr schwache Hintergrundfluoreszenz (c), und die Partikel sind nur im Reflexionsbild (d) zu sehen.

Mit einem ähnlichen System gelang die simultane Analyse biologischer Analyte in einem Immunassay mit humanem IgG und Kaninchen-IgG.<sup>[259b]</sup> Zwei unterschiedliche Strichcodes wurden verwendet: Au-Ag-Au (4 µm lang) und Au-Ni-Au (8 µm lang). Der Silberstreifen des Au-Ag-Au-Strichcodes war mit einem Anti-hIgG-Antikörper **79** beladen, die Goldstreifen des Au-Ni-Au-Strichcodes mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper **80** (Abbildung 30C). Die beiden Strichcodes wurden der Antigen-Mischung ausgesetzt

und die Antikörper mit Fluorescein-markiertem Anti-hIgG **81** und Texasrot-markiertem Anti-Kaninchen-IgG **82** markiert. Nach dieser Behandlung konnten die jeweiligen Strichcodes optisch detektiert und die beiden Antigene anhand der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Abbildung 30D zeigt das Bild der beiden Arten von Strichcodes in optischer Reflexion (a) sowie die spezifische Fluorescein-Fluoreszenz der Au-Ag-Au-Strichcodes (b) und die spezifische Texasrot-Fluoreszenz der Au-Ni-Au-Strichcodes (c).

In einem anderen Experiment wurde die selektive nicht-kovalente Bindung von Proteinen an spezifische Domänen von Ni-Au-Dimetallnanostäbchen nachgewiesen.<sup>[259c]</sup> Die Goldoberflächen der Dimetallnanostäbchen wurden mit Alkanthiolen funktionalisiert und die Enden mit Hexa(ethyleneglycol)-Gruppen blockiert, sodass die Adsorption von Proteinen verhindert wird. Die Nickeldomänen wurden mit Palmitinsäure funktionalisiert, was eine effiziente Adsorption von Proteinen ermöglicht. Solche „Tests in Lösung“ mithilfe hochgradig codierbarer und chemisch diverser Nanostäbchen sind ein vielversprechender Ansatz für die Analytik komplexer biologischer Proben (z. B. in den Genomics und Proteomics).

Die codierenden Marker für die Analyse von Biomolekülen können auf unterschiedliche Weise angebracht werden. Nanopartikel-Markierungen, die mit DNA-Molekülen codiert sind, können für die ultraempfindliche parallele Immunsensorik von Multianalyt-Proben genutzt werden.<sup>[260]</sup> Das Verfahren wurde anhand der Analyse des prostataspezifischen Antigens (PSA) getestet (Abbildung 31). Zur Erzeugung der primären Sensorschnittstelle wurde ein Antikörper



**Abbildung 31.** Anwendung von DNA-codierten Gold-Nanopartikel-Markierungen in einem Immunsensor auf prostataspezifisches Antigen (PSA) mit Verstärkung des Messsignals.

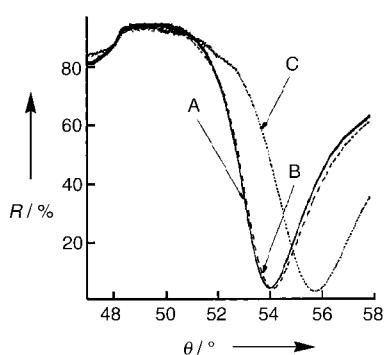
gegen PSA an Magnetkugelchen gekuppelt (**83**). Nach Koordination von PSA an die Sensoroberfläche wurde ein Gold-Nanopartikel, das mit einem zweiten Antikörper (gegen eine andere Domäne von PSA) sowie mit doppelsträngigen Nucleinsäuren **84** funktionalisiert war, an den Magnetkugelchen-Antikörper-PSA-Komplex gebunden. Es resultiert eine Dreikomponenten-Sandwich-Konfiguration **85**. Das Aggregat wurde durch einen externen Magneten abgetrennt, und alle unspezifisch adsorbierten Verbindungen wurden abgespült. Nachfolgende thermische Dissoziation der Nucleinsäure-Doppelhelix brachte die freien Nucleinsäuren **86** in Lösung, wobei Gold-Nanopartikel, die mit einsträngigen Oligonucleotiden **87** funktionalisiert sind, zurückblieben. Die Assays können auf zweierlei Weise analysiert werden: 1) Die Gold-Nanopartikel, an denen die Assay-Komponenten **87** anhafteten, werden auf der Oberfläche eines Chips hybridisiert, der mit den komplementären Oligonucleotiden funktionalisiert ist. Anschließend werden die Gold-Nanopartikel durch stromlose Abscheidung von Ag vergrößert und mit optischen Verfahren weiter analysiert (Abbildung 31, Weg A). 2) Die freien Oligonucleotide **86**, die von den funktionalisierten Gold-Nanopartikeln abgelöst wurden, werden durch Polymerasekettenreaktion vervielfältigt und durch Bindung an eine Chipoberfläche analysiert. Die Sequenzanalyse der dissozierten Nucleinsäuren liefert ein spezifisches Markierungssignal für das analysierte Antigen (Abbildung 31, Weg B). Dieses Analyseprotokoll enthält einen intrinsischen Amplifikationsschritt, da bei der thermischen Dehybridisierung zahlreiche Nucleinsäure-Strichcodes als Ergebnis einer einzelnen PSA-Erkennung freigesetzt werden. Durch die nach-

folgende Polymerasenkettenreaktion wurde das PSA-Signal weiter verstärkt, sodass das Antigen mit einer bis dahin unerreichten Empfindlichkeit von 3 attomol nachweisbar war. Ein paralleler Immunassay ist möglich, wenn jedes spezifische Antigen mit einer eigenen Oligonukleotid-Sequenz codiert wird.

Die nanopartikelverstärkte Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) durch Gold-Nanopartikel wurde vielfach für den Nachweis von biologischen Affinitätsbindungen genutzt.<sup>[261]</sup> Eine drastische Zunahme der SPR-Signale wurde bei Immunsensor-Assays<sup>[210b,c]</sup> und bei der DNA-Detektion beobachtet, wenn Gold-Nanopartikel als Marker verwendet wurden.<sup>[209]</sup> Auf einer Sensoroberfläche, die mit Antikörpern modifiziert war, wurden die komplementären Antigenkomponenten angebracht und der gebildete Affinitätskomplex über einen sekundären Antikörper mit einem Gold-Nanopartikel markiert. Während die Assoziation des Antigens an die antikörperfunktionalisierte Oberfläche nur eine kleine Verschiebung im SPR-Spektrum erzeugte, wurde nach Bindung des sekundären Antikörpers mit dem Gold-Nanopartikel eine deutliche Verschiebung registriert. Da der sekundäre Antikörper nur dann mit der modifizierten Oberfläche reagiert, wenn das Antigen an die Sensoroberfläche gebunden ist, generiert der Gold-Nanopartikel-markierte Antikörper einen Amplifikationsschritt für den primären Erkennungsprozess. Die Bindung des Gold-Nanopartikels an die Immunsensor-Oberfläche bewirkt eine große Verschiebung des Plasmonenwinkels, eine verbreiterte Plasmonenresonanz und eine Zunahme des minimalen Reflexionssignals. Das Antigen lässt sich in pikomolaren Mengen nachweisen.

Ähnlich wurde eine Erhöhung der Empfindlichkeit um etwa drei Größenordnungen bei der DNA-Analyse erzielt, wenn Gold-Nanopartikel-funktionalisierte DNA-Moleküle als Sonde eingesetzt wurden (Abbildung 32).<sup>[209]</sup> Polypeptide wurden mit Gold-Nanopartikeln markiert, und die Aggregation eines De-novo-Proteins aus den Polypeptid-Fragmenten wurde mit der SPR-Technik verfolgt.<sup>[262]</sup>

Durch Modifikation des nichtplattierten Teils einer optischen Faser mit selbstorganisierenden Gold-Nanopartikeln wurde eine neue Klasse faseroptischer Sensoren mit evanes-

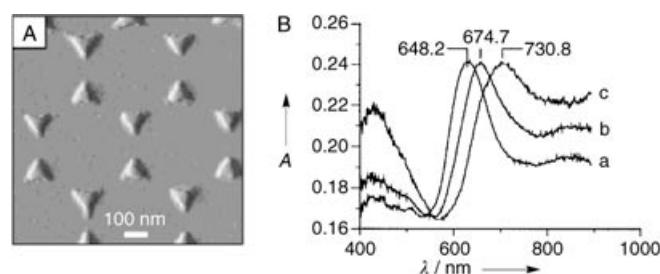


**Abbildung 32.** Durch Gold-Nanopartikel verstärkte SPR-Spektroskopie zur DNA-Analyse ( $R$  = Reflektivität): a) SPR-Spektrum der mit DNA-Primern funktionalisierter Oberfläche; b) SPR-Spektrum nach Hybridisierung mit den Analyt-DNA-Molekülen; c) SPR-Spektrum nach Hybridisierung mit Analyt-DNA-Molekülen, die mit Gold-Nanopartikeln konjugiert sind. (Mit Genehmigung aus Lit. [209], Copyright American Chemical Society, 2000.)

zenten Wellen entwickelt. Die Nanopartikel waren mit Biomolekülen funktionalisiert und erzeugten so die Selektivität für die Bindung der Substratmoleküle an die Sensoroberfläche.<sup>[263]</sup> Die optischen Eigenschaften und insbesondere das abgeschwächte Totalreflexionsspektrum der selbstorganisierten Gold-Nanopartikel auf der Faser ändern sich mit dem Brechungsindex der Umgebung der Gold-Nanopartikel. Entsprechend ändern biologische Erkennungsprozesse auf den Nanopartikeln den Brechungsindex der Sensoroberfläche, was sich in einer Änderung des Totalreflexionsspektrums des Systems widerspiegelt. In einem Modellsystem ermöglichte die Oberflächenmodifikation der Gold-Nanopartikel mit Biotin die Detektion von Streptavidin mit einer Nachweisgrenze von etwa  $9.8 \times 10^{-11}$  M.

Ein anderer DNA-Sensor beruht auf der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie mit verstärkter Transmission (ET-SPR-Spektroskopie).<sup>[264]</sup> Diese Technik nutzt die hohe Umgebungsabhängigkeit der Oberflächenplasmonenabsorptionsbande der Gold-Nanopartikel. Hiervon ausgehend wurde mithilfe von Gold-Nanoinseln auf Glasträgern ein Verfahren entwickelt, mit dem Änderungen des Mediums (z.B. Luft gegen Wasser) ohne großen Kostenaufwand erfasst sowie adsorbierte oder chemisch gebundene Moleküle detektiert werden können. Die ET-SPR-Spektren reagierten auf die Hybridisierung der mit Gold-Nanopartikeln markierten DNA mit dem komplementären DNA-Primer, der auf den Gold-Nanoinseln immobilisiert war.

Dreieckige, etwa 100 nm breite und 50 nm hohe Silber-Nanopartikel (Abbildung 33 A) zeigen außergewöhnliche optische Eigenschaften (Abbildung 33 B).<sup>[265]</sup> Speziell die Wellenlänge des Absorptionsmaximums ( $\lambda_{\max}$ ) im lokalisierteren Oberflächenplasmonenresonanz(LSPR)-Spektrum reagiert unerwartet empfindlich auf Größe, Form und die lokale (ca. 10–30 nm) externe dielektrische Umgebung. Diese Abhängigkeit von  $\lambda_{\max}$  von der Nanoumgebung ermöglichte die Entwicklung einer neuen Klasse von Affinitäts-Nanobiosensoren.<sup>[256]</sup> Die auf der LSPR-Spektroskopie beruhenden Biosensoren funktionieren ganz analog zu den SPR-Sensoren, indem sie kleine Änderungen des Brechungsindex



**Abbildung 33.** Nanobiosensor auf der Basis lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) mit dreieckigen Silber-Nanopartikeln zur Markierung des Biomaterials. A) AFM-Aufnahme der dreieckigen Silber-Nanopartikel. B) Amplifizierte LSPR-Analyse von Streptavidin mithilfe der dreieckigen Silber-Nanopartikel: a) Silber-Nanopartikel nach Modifikation mit 1 mM Biotin, b) biotinylierte Silber-Nanopartikel nach Reaktion mit 100 nm Streptavidin, c) Streptavidin-beladene Silber-Nanopartikel nach Reaktion mit biotinylierten Gold-Nanopartikeln. (Mit Genehmigung aus Lit. [265a], Copyright American Chemical Society, 2002.)

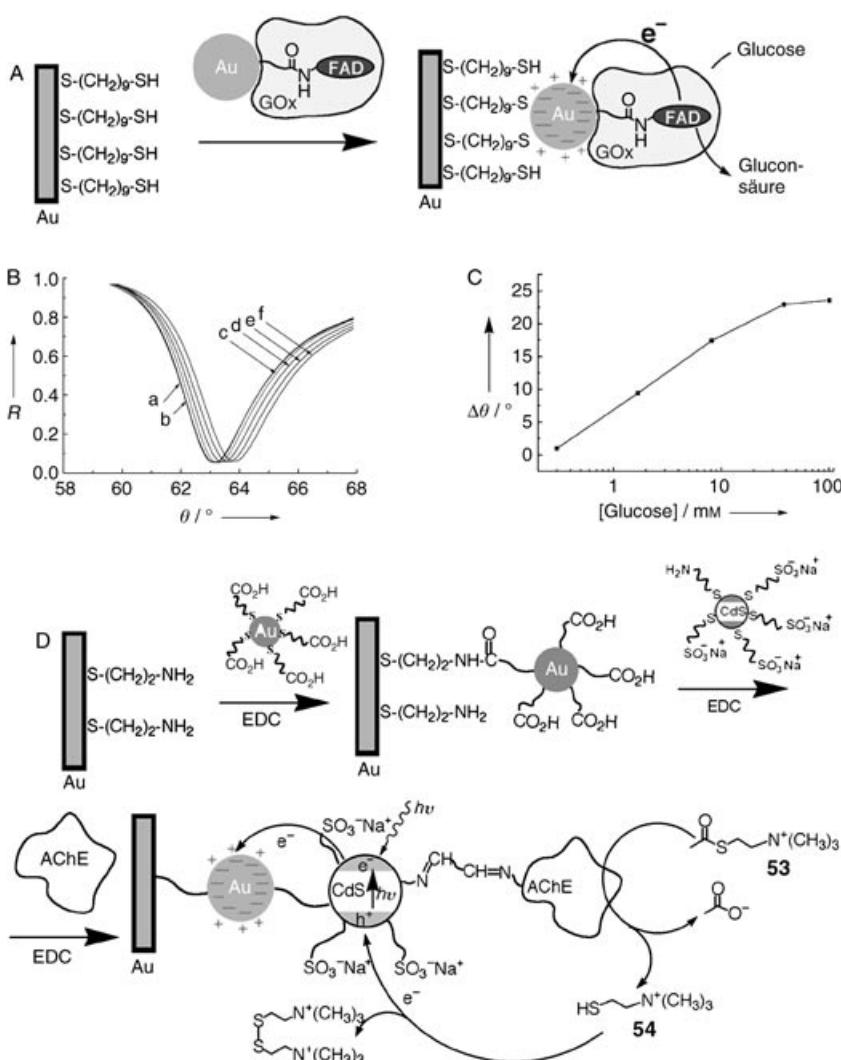
nahe der Edelmetalloberfläche in eine messbare Verschiebung der Wellenlänge umwandeln.

Die LSPR-Technik wurde anhand des Streptavidin-Biotin-Systems getestet.<sup>[265a]</sup> Die dreieckigen Silber-Nanopartikel wurden mit Biotineinheiten funktionalisiert und die Änderungen der LSPR während der Bindung von Streptavidin-Molekülen verfolgt (Abbildung 33B). Eine weitere Verstärkung des LSPR-Signals wurde durch die sekundäre Kupplung biotinylierter Gold-Nanopartikel an die Streptavidin-gesättigte Oberfläche erreicht. Basierend auf der gleichen Methode wurde auch ein Immunsensor entwickelt.<sup>[265b]</sup>

Die SPR-Spektroskopie wurde zur Untersuchung biokatalytischer Reaktionen mit Verstärkung durch Gold-Nanopartikel eingesetzt. Gold-Nanopartikel, die mit *N,N*-Bipyridinium(Viologen)-Einheiten funktionalisiert waren, die kovalent an die Thioprozin-Schale binden, wurden an den Redoxschritt der NAD<sup>+</sup>/NADH-Cofaktoren gekoppelt.<sup>[266]</sup> Die Viologen-Schale-Einheiten wurden biokatalytisch mit NADH als Cofaktor in Gegenwart von Diaphorase reduziert. Die reduzierten Viologeneinheiten wurden auf einer SPR-Platte adsorbiert, wodurch die Goldkörner dichter an die Sensorschnittstelle gebracht wurden. Die Plasmonenkopplung zwischen der Gold-SPR-Platte und den Gold-Nanopartikeln verursachte eine verstärkte Veränderung des SPR-Spektrums in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration. Bei einem umgekehrten Aufbau wurden die Viologen-Schale-Einheiten elektrochemisch reduziert und auf der SPR-Elektrode abgeschieden. In Gegenwart des Cofaktors NAD<sup>+</sup> und Diaphorase wurden die reduzierten Viologeneinheiten durch NAD<sup>+</sup> reoxidiert und wieder aufgelöst. Die Abnahme der Beladung mit Gold-Nanopartikeln auf der SPR-Elektrode führte zu einer verstärkten Veränderung des SPR-Spektrums in Abhängigkeit von der NAD<sup>+</sup>-Konzentration. Angemerkt werden soll hier noch, dass die Verwendung von molekularem Viologen, das nicht an die Gold-Nanopartikel gekuppelt ist, unter den gleichen Bedingungen nur geringfügige Änderungen des SPR-Spektrums hervorrief, die keinen Nachweis der NAD<sup>+</sup>/NADH-Cofaktoren zuließen.

Die Aufladung von Gold-Nanopartikeln auf einer SPR-Sensoroberfläche verändert die SPR-Spektren abhängig vom Ausmaß der elektrischen Ladung auf den Gold-Nanopartikeln. Verbindet man daher eine biokatalytische Reaktion mit einer Elektronenübertragung auf die Gold-Nanopartikel (wodurch diese aufgeladen werden), ergibt sich die Möglichkeit, eine SPR-Analyse des Vorgangs durchzu-

führen.<sup>[267]</sup> Zu diesem Zweck wurden Gold-Nanopartikel (1.4 nm) mit *N*<sup>6</sup>-(2-Aminoethyl)flavinadenindinucleotid (Aminoderivat des FAD-Cofaktors; **49**) funktionalisiert, mit Apo-Glucoseoxidase (apo-GOx) rekonstituiert und dann unter Selbstorganisation auf einem dünnen Goldfilm (SPR-Elektrode) abgeschieden. Als Linker fungierte eine Monoschicht des langkettigen Dithiols HS(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>SH, die die biokatalytische GOx in einer festgelegten Konfiguration an die Gold-Nanopartikel fixierte (Abbildung 34 A).<sup>[267a]</sup> Durch die biokatalytische Oxidation von Glucose wurde der reduzierte Cofaktor FADH<sub>2</sub> gebildet. Unter Ausschluss von Sauerstoff, dem natürlichen Elektronenacceptor der GOx, wandern die Elektronen vom reduzierten Cofaktor auf die Gold-Nanopartikel, die dadurch aufgeladen werden. Die langkettige



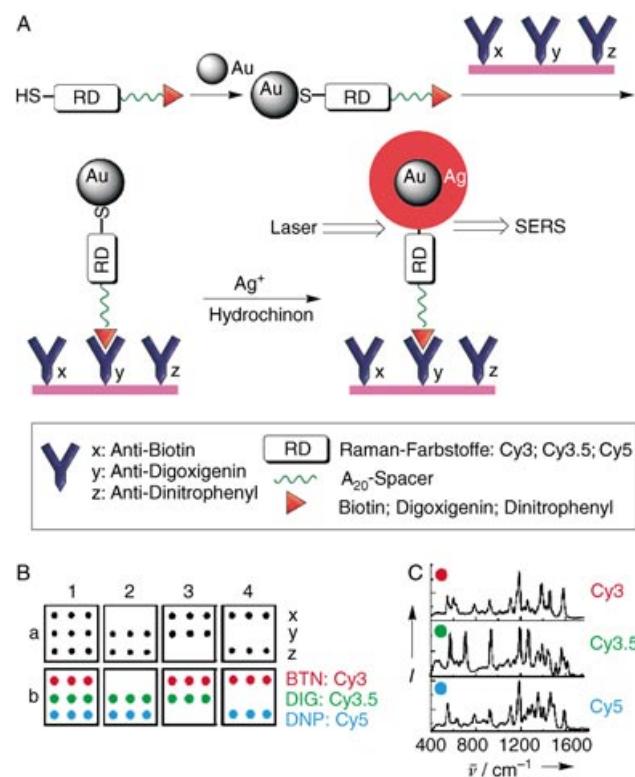
**Abbildung 34.** A) Anordnung von Gold-Nanopartikel-gebundener rekonstituierter Glucoseoxidase (GOx) an einer Dithiol-Monoschicht auf einer SPR-aktiven Oberfläche und biokatalytische Aufladung der Gold-Nanopartikel in Gegenwart von Glucose. B) SPR-Spektren des Gold-Nanopartikel/GOx-Hybridsystems bei Zugabe von Glucose: a) 0 mM, b) 0.3 mM, c) 1.6 mM, d) 8 mM, e) 40 mM, f) 100 mM. C) Kalibrierkurve der minimalen Verschiebung der SPR-Spektren als Funktion der Glucosekonzentration. D) Anordnung des Gold-Nanopartikel/CdS-Nanopartikel/Acetylcholin-Hybridsystems auf einer SPR-aktiven Oberfläche. Die photochemische Aufladung der Gold-Nanopartikel wird durch die biokatalytische Reaktion gesteuert. EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid.

Dithiol-Monoschicht bildet eine Barriere gegen das Tunneln der Elektronen von den Gold-Nanopartikeln hin zum Gold-Träger und isoliert so die generierte elektrische Ladung auf den Gold-Nanopartikeln. Die Plasmonenkopplung zwischen den geladenen Gold-Nanopartikeln und dem Gold-Träger verschiebt das SPR-Spektrum abhängig von der auf den Nanopartikeln erzeugten Ladung (Abbildung 34B). Da die Aufladung von der Geschwindigkeit der biokatalysierten Reaktion abhängt, wird die SPR-Verschiebung durch eine Steigerung der Glucosekonzentration verstärkt (Abbildung 34C). Die optische Transduktion der Glucosekonzentration durch das biologische „Pumpen“ der Elektronen in die Gold-Nanopartikel ist ein neues Konzept in der Biosensorik.

In einem verwandten System wurden Acetylcholinesterase-Inhibitoren über die photoelektrochemische Aufladung von Gold-Nanopartikeln durch CdS-Nanopartikel nachgewiesen.<sup>[267b]</sup> Eine Doppelschicht aus Gold-Nanopartikeln, die kovalent an CdS-Nanopartikel gebunden waren, wurde auf einer SPR-aktiven Goldoberfläche mit einer Cysteamin-Monoschicht als Linker aufgebracht (Abbildung 34D). Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) wurde kovalent an die CdS-Nanopartikel gekuppelt, wobei das biokatalytische Gold/CdS-Nanopartikel/AChE-Enzym-Aggregat gebildet wurde. Bei der Hydrolyse von Acetylthiocholin (**53**) durch das Enzym entsteht *in situ* Thiocholin (**54**), das als Elektronendonator wirkt. Durch Photoanregung der CdS-Nanopartikel werden Elektron-Loch-Paare im Leitungsband bzw. im Valenzband erzeugt. Der *in situ* vom Enzym freigesetzte Elektronendonator **54** fängt die Löcher im Valenzband ab, sodass die Elektronen im Leitungsband zu den Gold-Nanopartikeln transportiert werden können. Da die Cysteamin-Linker als Tunnelbarriere für die zusätzliche Elektronenübertragung zum Gold-Träger wirken, wird die Ladung auf den Gold-Nanopartikeln fixiert, wodurch sich das SPR-Spektrum des Systems verändert. Die Veränderungen des SPR-Spektrums hängen vom Ausmaß der Aufladung der Nanopartikel ab, die durch die Konzentration des *in situ* erzeugten Elektronendonors **54** bestimmt wird. AChE-Inhibitoren wie 1,5-Bis(4-Allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-on dibromid (**55**) hemmen die biokatalytische Bildung des Elektronendonors mit steigender Konzentration des Inhibitors. Dies führt wiederum zu einer Veränderung der elektrischen Aufladung der Gold-Nanopartikel und der resultierenden SPR-Spektren des Systems. Auf diese Weise lässt sich die AChE-Aktivität optisch testen, und Enzyminhibitoren können quantitativ bestimmt werden.

Mit der oberflächenverstärkten Raman-Streuung von Nanopartikel-gebundenen Substraten lassen sich molekulare Schwingungsspektren bis zu  $10^5$ fach verstärken.<sup>[21a, 268]</sup> In einigen frühen Studien konnten verstärkte Raman-Spektren von Cytochrom c auf Gold-Nanopartikeln, die mit aggregierten Silberclustern assoziiert waren, detektiert werden.<sup>[269]</sup> Auch von Hämoglobin an Silber-Nanopartikeln wurden verstärkte Raman-Spektren aufgenommen.<sup>[36]</sup> Durch Modifikation von Metall-Nanopartikeln mit Raman-aktiven Farbstoffen könnten mehrfach codierte Nanopartikel hergestellt werden.<sup>[270]</sup> Denkbar sind Systeme mit tausenden von Codes, die durch oberflächenverstärkte Raman-Spektrosko-

pie geschrieben und gelesen werden können, ohne dass eine räumliche Auflösung der Komponenten des Codes erforderlich wäre.<sup>[270a]</sup> Die Eignung der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS) zur Analyse von biologischen Erkennungsprozessen wurde in Experimenten mit Gold-Nanopartikeln nachgewiesen, die mit Raman-aktiven Farbstoffen und Erkennungselementen funktionalisiert waren.<sup>[270b,c]</sup> Die Bildung des komplementären Erkennungskomplexes auf der Sensoroberfläche, gefolgt von der stromlosen Abscheidung von  $\text{Ag}^+$ -Inseln auf den Gold-Nanopartikeln, ermöglichte den Nachweis der Erkennungsprozesse über ihr SERS-Signal. Das Konzept wurde auf den parallelen Nachweis von Analyten auf Oberflächen in einem Array angewendet. Hierzu wurden drei unterschiedliche thiolfunktionalisierte Raman-aktive Farbstoffe (Cy3, Cy3.5 und Cy5) durch einen aus 20 Basen bestehenden Nucleinsäure-Spacer ( $\text{A}_{20}$ ) mit den drei niedermolekularen Verbindungen Biotin, Digoxigenin und Dinitrophenyl gekuppelt.<sup>[270b]</sup> Diese funktionellen Einheiten wurden mit Gold-Nanopartikeln (13 nm) verknüpft, wodurch drei Arten von mit Raman-aktiven Farbstoffen markierten Gold-Nanopartikeln erhalten wurden (Abbildung 35 A). Mit diesen markierten Nanopartikeln wurden dann spezifische Wechselwirkungen zwischen den



**Abbildung 35.** A) Anwendung von Gold-Nanopartikeln, die mit Raman-aktiven Farbstoffen funktionalisiert sind, zur verstärkten parallelen Immunsensorik. B) Flachbett-Scans von silberverstärkten Mikroarrays in einer Immunsensoranordnung mit unterschiedlichen Antikörpern. Die Antikörper sind mit Gold-Nanopartikeln beladen, an denen die jeweiligen Antigene und unterschiedliche Raman-aktive Farbstoffe befestigt sind. C) Typische Raman-Spektren, die den farbigen Punkten im Immunsensor-Array entsprechen. (Teile B und C mit Genehmigung aus Lit. [270b], Copyright American Chemical Society, 2003.)

komplementären Antikörpern (monoklonale Maus-Antikörper gegen Biotin, Digoxigenin und Dinitrophenol) nachgewiesen. Die unterschiedlichen Antikörpertypen wurden durch Spotting auf eine Oberfläche aufgetragen und die spezifische Bindung von Gold-Nanopartikeln nach stromloser Abscheidung von  $\text{Ag}^0$  auf den Gold-Nanopartikeln mit SERS verfolgt (Abbildung 35B). Die selektive Analyse der drei unterschiedlichen Gold-Nanopartikel-Markierungen mithilfe der vorher erzeugten Antikörpermuster auf der Oberfläche des Sensors ist in Abbildung 35C dargestellt.

Ein ähnliches Konzept wurde auch bei der Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen angewendet. Hierbei wurden Gold-Nanopartikel eingesetzt, die mit spezifischen Antikörpern funktionalisiert und mit spezifischen Raman-Farbstoffen codiert waren.<sup>[270b]</sup> Die Weiterentwicklung der SERS-Technik führte zu hochempfindlichen Immunassays,<sup>[271]</sup> z.B. zum Nachweis des prostataspezifischen Antigens PSA im femtomolaren Bereich mit Gold-Nanopartikeln, die mit einem entsprechenden Antikörper beladen waren.<sup>[271a]</sup>

Halbleiter-Nanopartikel (z.B. CdS, CdSe, ZnS) können als Fluoreszenzmarkierungen für Immun- und DNA-Sensoren fungieren. Sie zeichnen sich durch eine veränderliche Wellenlänge, schmale Emissionspeaks und eine 100fach höhere Stabilität als organische Fluoreszenzfarbstoffe aus.<sup>[21a, 75, 272]</sup> Zum Beispiel wurden  $\text{CdSe}_{\text{Kern}}\text{-ZnS}_{\text{Hüll}}$ -Nanopartikel mit Avidin funktionalisiert und als Fluoreszenzmarkierungen für biotinylierte Antikörper verwendet. Mit Fluoroimmunassays auf der Basis dieser Antikörper-konjugierten Nanopartikel gelang es, Proteintoxine (Staphylococcus-Enterotoxin B, Cholera-Toxin) nachzuweisen.<sup>[272f]</sup>

Vier unterschiedlich große  $\text{CdSe}_{\text{Kern}}\text{-ZnS}_{\text{Hüll}}$ -Nanopartikel mit nicht überlappenden Emissionswellenlängen im Bereich von 530 bis 640 nm wurden zur Modifizierung von vier unterschiedlichen Nucleinsäuren verwendet.<sup>[272g]</sup> Die modifizierten Nucleinsäuren wurden selektiv durch spezifische Hybridisierung mit einem Array der komplementären DNA gesammelt und anhand eines Fluoreszenzbildes des Arrays analysiert. Über einen weiteren Ansatz für DNA-Hybridisierungs-Assays mit metallverstärkter Fluoreszenz wurde vor kurzem berichtet.<sup>[273]</sup> Thiolderivatisierte Oligonukleotide wurden an Silber-Nanopartikel konjugiert, die ihrerseits auf einem Glassubstrat fixiert waren. Bei der Hybridisierung mit dem komplementären Fluorescein-markierten Oligonukleotid wurde in Gegenwart der Silber-Nanopartikel eine 12fach verstärkte Fluoreszenz beobachtet. Die verstärkte Fluoreszenz im Fließgleichgewicht wurde der verkürzten Lebenszeit des Farbstoffes in der Nähe der Silber-Nanopartikel zugeschrieben. Damit war es gelungen, die Hybridisierung anhand der Zerfallskinetik der Farbstoffemission zu detektieren. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Silberpartikel vielseitige Marker zum verbesserten Nachweis der DNA-Hybridisierung sind. In analoger Weise wurde die durch Silber-Nanopartikel verstärkte Fluoreszenz für einen Immunassay von Insulin im Serum genutzt.<sup>[274]</sup>

$\text{CdSe}_{\text{Kern}}\text{-ZnS}_{\text{Hüll}}$ -Nanopartikel als photochemische Zentren wurden zur Untersuchung der Dynamik von DNA-Replikationen und DNA-Telomerisationen eingesetzt. Die Detektion beruht auf dem resonanten Transfer von Fluoreszenzenergie (FRET) auf Farbstoffmoleküle, die in die neu

replizierte DNA oder das Telomer eingebaut werden.<sup>[275]</sup>  $\text{CdSe}_{\text{Kern}}\text{-ZnS}_{\text{Hüll}}$ -Nanopartikel wurden mit dem Primer **88** funktionalisiert, der zu einem Abschnitt der M13mp18-DNA komplementär ist. Die Hybridisierung der M13mp18-DNA an der Nanopartikel-Oberfläche, gefolgt von der Replikation des Aggregats durch die zugegebene Polymerase (Klenow-Fragment) mit einer Nucleotid-Mischung (dNTP), die Texasrot-derivatisiertes dUTP (**89**) enthielt, verlief unter gleichzeitigem Einbau der Farbstoffmarkierung in die neu replizierte DNA (Abbildung 36 A, Weg a). Der FRET-Prozess vom Halbleiter-Nanopartikel zum eingebauten Farbstoff resultiert in einer Emission vom Farbstoff bei gleichzeitigem Quenching der Nanopartikel-Fluoreszenz (Abbildung 36 B).

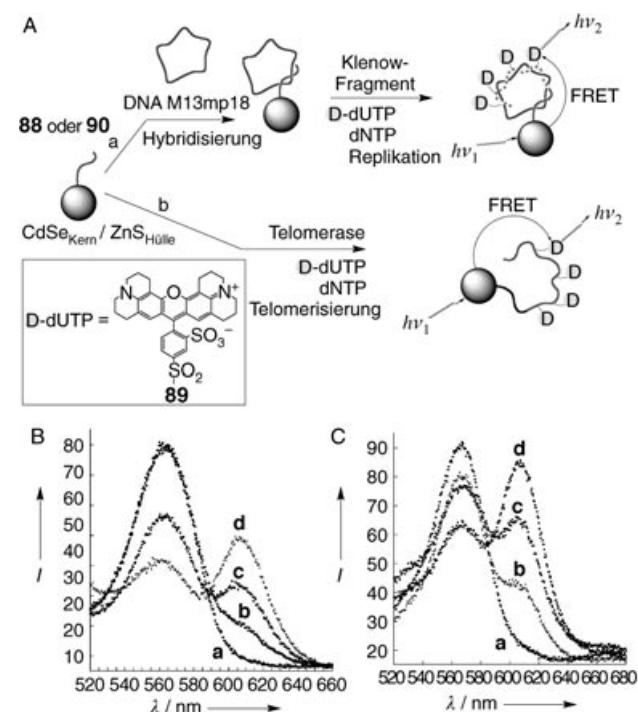


Abbildung 36. A) Replikation (Weg a) und Telomerisation (Weg b) an Nucleinsäure-funktionalisierten  $\text{CdSe}_{\text{Kern}}\text{-ZnS}_{\text{Hüll}}$ -Nanopartikeln mit Einbau von Texasrot-markiertem dUTP und anschließendem FRET von den photoangeregten Quantenpunkten zu den eingebauten Farbstoffmolekülen. B) Emissionsspektren der zeitaufgelösten DNA-Replikation: a) 0 min, b) 10 min, c) 30 min, d) 60 min. C) Emissionsspektren der zeitaufgelösten Telomerisation: a) 0 min, b) 10 min, c) 30 min, d) 60 min.

Mit der gleichen Methode wurden Telomerase-Aktivitäten in Krebszellen bestimmt.<sup>[275]</sup> Die  $\text{CdSe}_{\text{Kern}}\text{-ZnS}_{\text{Hüll}}$ -Nanopartikel wurden mit der Nucleinsäure **90** funktionalisiert, die von der Telomerase erkannt wird. Behandelt man die Nanopartikel mit einem HeLa-Tumorzellextrakt in Gegenwart der dNTP-Mischung (einschließlich des Texasrot-markierten dUTP **89**), wird der Primer telomerisiert und gleichzeitig die Farbstoffmarkierung eingebaut (Abbildung 36 A, Weg b). Es findet ein FRET-Prozess vom angeregten Halbleiter-Nanopartikel zu den Farbstoffzentren statt. Die zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzemission des Farbstoffes wurde als Messsignal für die Dynamik der Telomerisierung und zur

Bestimmung der Telomerase-Aktivität in den Tumorzellen ausgewertet (Abbildung 36C). Ähnlich konnte mit dem FRET-Prozess die Bindung farbstoffmarkierter Proteine an die CdSe<sub>Kern</sub>-ZnS<sub>Hülle</sub>-Nanopartikel sichtbar gemacht werden,<sup>[276]</sup> womit der Weg für einen FRET-basierten Immunsensor geebnet wurde.

Die Funktionalisierung eines Protein-Rückgrats mit photoisomerisierbaren, photochromen Einheiten ergab ein Hybridsystem, in dem die FRET-Effizienz durch den Isomeriezustand des Photochroms gesteuert wird, sodass die Fluoreszenzintensität des gebundenen Nanopartikels moduliert werden kann.<sup>[277]</sup>

Farbstoffdotierte SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel als Marker für bioanalytische Anwendungen wurden kürzlich vorgestellt.<sup>[278]</sup> Die SiO<sub>2</sub>-Partikel mit Durchmessern zwischen 2 und 100 nm fungieren als vielseitige Matrix zur Immobilisierung von Biomaterialien wie Proteinen oder DNA. Die eingeschlossenen Fluorophore sind stabiler gegen Ausbleichen als die freien Moleküle. Daneben ergibt sich durch die Ansammlung vieler eingeschlossener Fluoreszenzmarker in einem einzelnen SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel eine Möglichkeit zur Signalverstärkung, da ein einzelnes biologisches Erkennungereignis durch Emission zahlreicher Fluorophormoleküle abgebildet wird.

## 7. Biomolekular funktionalisierte magnetische Partikel

Magnetische Partikel (Mikrokügelchen, Nanokügelchen, Ferrofluids) werden intensiv erforscht und vielfach in der Biologie und Medizin eingesetzt, z.B. für magnetisches Targeting (von Wirkstoffen, Genen, Radiopharmazeutika), Magnetresonanz-Bildgebung, Diagnostik, Immunassays, RNA- und DNA-Reinigung, Gen-Klonierung, Zelltrennung und -reinigung.<sup>[279]</sup> Die magnetischen Partikel liegen meist als Kern-Hülle-Spezies vor, in denen die biologische Komponente (Zellen, Nucleinsäuren, Proteine) über organische Linker als polymere Hülle an den magnetischen Kern gebunden ist.<sup>[280]</sup> Die Koordination von Biomaterial an die primäre organische Hülle ist mit einer Reihe von Techniken analysiert worden (z.B. durch Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion).<sup>[280a]</sup> Hybride aus Biomaterial und magnetischen Partikeln werden vor allem zur Konzentrierung, Trennung, Regenerierung, mechanischen Translokation und zum Targeting von Biomaterialien eingesetzt. Mit Phospholipid beschichtete magnetische Nanopartikel mit einem etwa 8 nm messenden Magnetikkern wurden beispielsweise zur Sammlung und Trennung von Proteinen aus Proteinmischungen verwendet.<sup>[280b]</sup> Mit einem Konjugat aus synthetischen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Magnetpartikeln und daran adsorbierten Antikörpern konnten Zellen nach spezifischer Bindung durch ein äußeres Magnetfeld getrennt werden.<sup>[281]</sup> Magnetische Nanopartikel (FePt, ca. 4 nm im Durchmesser), die mit Vancomycin (Van) funktionalisiert waren, adsorbieren selektiv Gram-positive Bakterien durch molekulare Erkennung zwischen Vancomycin und dem terminalen Peptid D-Ala-D-Ala auf der Oberfläche der Zellen.<sup>[282]</sup> Es wurde unerwarteterweise festgestellt, dass die Van-modifizierten magnetischen Nanopartikel auch an Gram-negative Bakterien binden. Die adsorbierten *E. coli*-Zellen wurden gereinigt und mithilfe eines äußeren Magnetfelds transportiert.

en wie *E. coli* binden. Die adsorbierten *E. coli*-Zellen wurden gereinigt und mithilfe eines äußeren Magnetfelds transportiert.

Eine magnetische Nanofalle wurde für die Trennung und Sammlung von Spuren von DNA/mRNA aus Gemischen und Tumorzellen entwickelt. Die entscheidende Komponente der Nanofalle war ein Magnetnanopartikel als Carrier, das mit einem molekularen Signalgeber als DNA-Sonde für die Generkennung und -sammlung gekuppelt wurde.<sup>[283]</sup> Eine hohe Nachweisempfindlichkeit für molekulare Erkennungsprozesse wurde mit magnetisch markierten Biomolekülen und magnetoresistiven Sensoren erzielt.<sup>[284]</sup> Durch schichtweise Ablagerung von Enzymen und magnetischen Partikeln wurde ein Bioreaktor hergestellt, der die Möglichkeit bietet, deaktivierte biokatalytische Schichten mit einem externen Magneten herauszuziehen und durch neue aktive Biokatalysatorschichten zu ersetzen.<sup>[285]</sup>

Durch Verwendung magnetischer Nanopartikel lassen sich magnetoelektronische Materialien und Funktionseinheiten mit verbesserten Eigenschaften entwickeln. Biomaterialien können als Template für die Synthese von magnetischen Nanopartikeln fungieren. So wurden monodisperse magnetische Co/Pt-Nanopartikel im Inneren der Apo-Ferritin-Höhlung erzeugt und dann selbstorganisierend in Form eines dünnen Films auf einen Glasträger aufgezogen. Man erhält ein magnetisches Speichermedium mit einer möglichen Speicherdichte im Bereich von Terabit pro Inch<sup>2</sup>.<sup>[286]</sup>

Einige aktuelle Forschungsarbeiten befassen sich mit der Kopplung von funktionalen Magnetpartikeln mit Biomaterialien. Ziel ist die Entwicklung von Biomaterial-Magnetpartikel-Hybriden mit magnetisch regulierbaren Funktionen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

### 7.1. Synthese von biomolekular funktionalisierten Magnetpartikeln

Magnetische Partikel enthalten im Allgemeinen einen Kern aus Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Magnetit) oder γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Maghämít). Die primäre Modifikation mit einer organischen Hülle wird entweder durch Adsorption eines organischen Polymers oder durch kovalente Anbindung eines funktionalisierten Organosilanfilms realisiert. Praktikable Synthesen zur Herstellung von Magnetpartikeln mit festgelegter Größe und Magnetisierung wurden entwickelt.<sup>[287,288]</sup> Zu nennen wäre etwa die Synthese von Magnetit-Nanopartikeln definierter Größe in organischen Lösungsmitteln.<sup>[289]</sup> Goldbeschichtete Eisen-Nanopartikel mit einem spezifischen magnetischen Moment von 145 emug<sup>-1</sup> und einer Koerzivität von 1664 Oe wurden präpariert und für biomedizinische Anwendungen getestet.<sup>[290]</sup> Die Goldhülle ermöglicht weitere Modifikationen der magnetischen Nanopartikel mit Biomolekülen. Auch Siliciumdioxidpartikel mit magnetischen Nanopartikeln als Kern wurden für die Bindung von Proteinen an die äußere Sphäre der anorganischen Kugelchen und zur Biokatalyse eingesetzt.<sup>[291]</sup>

Organische funktionelle Gruppen in der äußeren Hülle, die mit diesen Methoden eingeführt wurden, können mit

Biomolekülen gekuppelt werden,<sup>[292]</sup> und eine Reihe von Syntheseansätzen wurde bereits beschrieben. Kürzlich berichtet wurde z.B. über die Herstellung und Charakterisierung magnetischer Nanopartikel mit organischen Hüllen für die kovalente Immobilisierung von Enzymen (z.B. Meerrettich-Peroxidase oder Lipase).<sup>[293]</sup> Die Immobilisierung von Enzymen auf magnetischen Partikeln ergibt biokatalytisch aktive Partikel. In einem Beispiel wurde Alkoholdehydrogenase kovalent an Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Magnetpartikel gebunden; das immobilisierte Enzym wies hohe katalytische Aktivität auf.<sup>[294]</sup> Enzymmodifizierte Magnetpartikel zeigten auch bioelektrokatalytische Aktivität, wenn sie mit einer Elektrodenoberfläche kontaktiert wurden.<sup>[293d]</sup> Die reversible Assoziation von Proteinen gelang mit negativ geladenen magnetischen Fe<sub>3</sub>O<sub>4,Kern</sub>-Polyacryl<sub>Hülle</sub>-Partikeln.<sup>[295]</sup> Die Bindung von Proteinen wurde durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der negativ geladenen Hülle gesteuert. Die Proteinmoleküle, die bei niedrigen pH-Werten (pH < pI, dem isoelektrischen Punkt) positiv geladen waren, wurden durch die negativ geladene Hülle elektrostatisch angezogen, während bei höheren pH-Werten (pH > pI) die negativ geladenen Proteinmoleküle von den funktionalisierten Magnetpartikeln abgestoßen wurden. Die reversible Assoziation/Dissoziation der Proteine an die Magnetpartikel bzw. von den Magnetpartikeln weg wurde zum Sammeln, Reinigen und Transportieren von Proteinen genutzt.

DNA-Moleküle wurden mit einer Mischung von Fe<sup>2+</sup>- und Fe<sup>3+</sup>-Ionen umgesetzt, die elektrostatisch an die DNA-Ketten anlagerten.<sup>[296]</sup> Die Eisen-Ionen wurden chemisch zu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Magnetitpartikeln umgewandelt, die nun mit den DNA-Molekülen konjugiert waren. Die markierte DNA konnte mit komplementären Oligonucleotiden hybridisieren, und die mit den DNA-Molekülen verbundenen Magnetpartikel ermöglichten eine Trennung der markierten DNA von nichtmarkierten Strängen.

Die kooperative Aggregation von magnetischen Nanopartikeln in Gegenwart von Aminosäurepolymeren wurde näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Blockcopolypeptiden und Nanopartikeln die Organisation der Komponenten steuern.<sup>[297]</sup> Die Zugabe von Polyasparaginsäure initiierte die Aggregation von Maghämít-Nanopartikeln zu Clustern, ohne dass es zur Ausfällung kam. Die Zugabe des Blockcopolypeptids Poly(EG<sub>2</sub>-Lys)<sub>100</sub>-b-poly(Asp)<sub>30</sub> induzierte eine kontrollierte Organisation von magnetischen Nanopartikeln. Ursache ist möglicherweise die Bildung von kernhaltigen Micellen, bestehend aus elektrostatisch an die Polyasparaginsäure-Enden des Blockcopolypeptids gebundenen Nanopartikeln. Auf diese Weise können die Poly(EG<sub>2</sub>-Lys)-Enden der Copolymeren die Hülle der Micelle bilden und so die Cluster stabilisieren und ihre Größe bestimmen. Durch Variieren der Zusammensetzung des Blockcopolypeptids sollte es möglich sein, Größe und Stabilität der dispersen Nanopartikel-Cluster gezielt zu steuern, woraus sich breite Perspektiven für die Anwendung solcher kooperativ assoziierter Nanokonjugate ergeben.

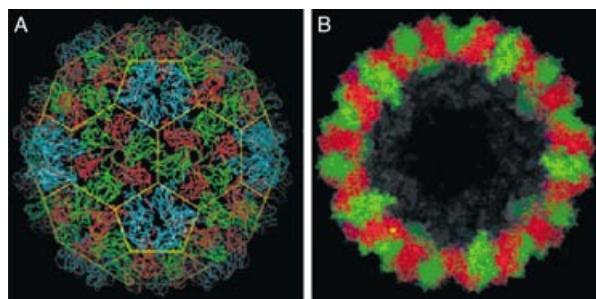
Anorganische Nano- und Mikropartikel, einschließlich magnetischer Partikel, können mit biochemischen Methoden erzeugt werden. Die Forschungen zur Biomineralsation

haben Möglichkeiten aufgezeigt, Materialien mithilfe der molekularen Wechselwirkungen zwischen supramolekularen organischen oder bioorganischen Aggregaten und anorganischen Materialien zu synthetisieren.<sup>[21a, 298]</sup> Proteinkäfige,<sup>[299]</sup> insbesondere virale,<sup>[299d-f]</sup> fungieren als strukturell begrenzte „Nanoreaktoren“ für die Synthese anorganischer Nanomaterialien. Käfige aus viralen Proteinen gibt es in vielen Größen und Formen. Sie sind in der Lage, Strukturübergänge einzugehen, die einen kontrollierten Zugang zum Inneren des Proteinkäfigs zulassen.<sup>[299f]</sup> Noch mehr Flexibilität in der Synthese erhält man durch gentechnische und chemische Modifikation dieser Template.<sup>[299g]</sup>

Das natürliche Protein Ferritin stellt einen strukturell begrenzten Reaktionsraum für die Synthese von natürlichen und synthetischen anorganischen Nanomaterialien zur Verfügung.<sup>[129, 299a-c, 300]</sup> Ferritin ist besonders geeignet, um magnetische Partikel definierter Größe und Form in der Proteinöhrlung zu erzeugen.<sup>[301]</sup> Dazu wird der nichtmagnetische Kern aus 5Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O chemisch aus der Proteinöhrlung entfernt und ein künstlicher magnetischer Kern aus Magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sup>[129c]</sup> oder Magnetit/Maghämít (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sup>[302]</sup> in die Höhlung des Apoferritins gebracht. Laut elektrochemischer Untersuchung von Ferritin auf einer ITO-Elektrode ist der Eisenoxidkern des Ferritins elektrisch mit der Elektrode kontaktiert.<sup>[303]</sup> Durch reduktive Entfernung des Eisenoxidkerns entsteht Apoferritin. Durch gentechnische Manipulation des Ferritin-Gens wurde die Größe der Höhlung so variiert, dass monodisperse Magnetit-Nanopartikel unterschiedlicher Größe erzeugt werden konnten.<sup>[304]</sup>

Das ungewöhnliche Ferritin-ähnliche Protein aus dem Bakterium *Listeria innocua* bildet eine sehr kleine Käfigstruktur aus zwölf Untereinheiten, die eine Höhlung von 5 nm Durchmesser umfassen.<sup>[305]</sup> Der Käfig hat eine Aufnahmekapazität von nur 500 Eisenatomen in Form eines Nanopartikels aus Eisen(III)-oxyhydroxid.<sup>[306]</sup> Mit diesem System, das ein neues Größenregime erschließt, ergibt sich ein vielversprechender Ansatz für die gezielte Abstimmung größenabhängiger Materialeigenschaften.

Die natürliche Proteinöhre der Nanopartikel stellt funktionelle Gruppen für die kovalente Bindung von Biomolekülen bereit. Das gut beschriebene CCM-Virus (cowpea chlorotic mottle virus) in nucleinsäurefreiem Zustand wurde als Ausgangsmaterial für die Herstellung eines Käfigs mit spezifischer chemischer Funktionalität genutzt (Mimetikum des Eisenspeicherproteins Ferritin).<sup>[307]</sup> Die CCMV-Proteinkäfige bestehen aus 180 identischen Untereinheiten von 20 kDa, die sich zu einer leeren Virushülle mit Ikosaedersymmetrie zusammenlagern (Abbildung 37a). Eine Strukturanalyse zeigt, dass der virale Proteinkäfig für kleine Moleküle durch Poren zugänglich ist, die an den Berührungsstellen zwischen den Proteinuntereinheiten entstehen. Der leere Proteinkäfig hat einen Außendurchmesser von 28 nm und einen Innendurchmesser zwischen 18 und 24 nm (Abbildung 37b). Die Höhlung des CCM-Virus ist also doppelt so groß wie die des Ferritins. Das CCMV-Hüllprotein wurde gentechnisch modifiziert, indem neun basische Reste am N-Terminus durch Glutaminsäure ersetzt wurden. Die Mutante aggregierte bereitwillig zu einer Käfigstruktur, die der des Wildtyps ähnelte. Dieser elektrostatisch veränderte virale Proteinkäfig



**Abbildung 37.** a) Bänderdarstellung des 180 Untereinheiten enthaltenden Proteinkäfigs des CCM-Virus; b) Schnittbild, das die zentrale Höhlung des Proteinkäfigs zeigt. (Mit Genehmigung aus Lit. [307].)

katalysiert jedoch zusätzlich die schnelle Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$ , wodurch ein räumlich eingegrenztes Eisenoxid-Nanopartikel von  $24.0 \pm 3.5 \text{ nm}$  im Inneren des Käfigs erhalten wird.

Viele mikro- und nanostrukturierte magnetische Materialien, eingebettet in biologische Strukturen, sind durch Biomineralisation zugänglich.<sup>[308]</sup> Einige Bakterien (z.B. *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1,<sup>[309]</sup> *Magnetospirillum* sp. MGT-1,<sup>[310]</sup> *Magnetospirillum* sp. AMB-1<sup>[311]</sup> und *Magnetospirillum gryphiswaldense*<sup>[312]</sup>) produzieren natürliche magnetische Partikel ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $50\text{--}100 \mu\text{m}$ ), die in Ketten aufgereiht in eine Lipidmembran eingehüllt sind.<sup>[313]</sup> Solche umhüllten Partikel konnten aus den entsprechenden Bakterien isoliert<sup>[314]</sup> und mit Biomolekülen über bifunktionelle Linker (z.B. Glutardialdehyd) gekuppelt werden. Sie wurden als aktive Komponenten in Fluoroimmunassays,<sup>[315]</sup> Chemilumineszenz-Immunoassays,<sup>[316]</sup> zur mRNA-Isolierung<sup>[317]</sup> und als DNA-Carrier<sup>[318]</sup> eingesetzt.

## 7.2. Antigen- und Antikörper-funktionalisierte Magnetpartikel in Immunsensoren

Mit Antigenen oder Antikörpern funktionisierte Magnetpartikel fanden in mehreren Immunassay-Verfahren Verwendung.<sup>[319]</sup> In den meisten Fällen wurden die Partikel zur Isolierung und Konzentrierung der Sensormaterialien sowie zur Regenerierung der Sensorschnittstelle nach Beendigung der Analyse eingesetzt. So wurden magnetische Nanopartikel mit Antigenen oder Antikörpern gekuppelt, mit einem externen Magneten zu einer Quarzkristall-Mikrowaage dirigiert und als Immunsensor verwendet.<sup>[319a]</sup> Die Methode ermöglicht die schnelle Regeneration der Sensoroberfläche durch einfachen Austausch der modifizierten Magnetpartikel. In einem anderen Fall wurden Gold-Nanopartikel mit Dinitrophenyl-derivatisierten Mercaptodextranen beschichtet. Diese binden spezifisch an magnetische Kugelchen, die den passenden DNP-Antikörper tragen.<sup>[320]</sup> Die Immunerkennungsreaktionen konnten anhand der Absorptionsspektren der Gold-Nanopartikel-Marker verfolgt werden. Die Magnetpartikel ermöglichen eine einfache Reinigung und Konzentrierung der Analyt-Proben. Magnetpartikel mit einer Codierung (eingeführt durch die Funktionalisierung des Partikels) wurden für parallele Immunassays

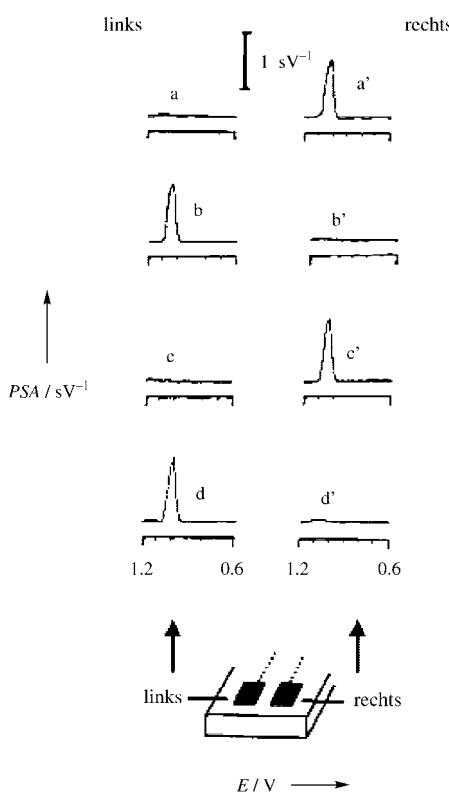
von Analyten eingesetzt. Bei den Untersuchungen wurde ein adressierbarer Mikropartikel-Array auf einem Chip eingesetzt.<sup>[321]</sup>

Die intrinsischen magnetischen Eigenschaften der Partikel können als Messgröße in der Biosensorik genutzt werden. Zum Beispiel wurden Adenoviren (ADVs) mit Anti-ADV-beladenen magnetischen Nanopartikeln zu einem Aggregat vernetzt.<sup>[322]</sup> Das Konjugat aus ADV und magnetischen Nanopartikeln wurde anhand der Relaxationszeit  $T_2$  von Wasser detektiert. Bereits fünf Viruspartikel reichten für einen Nachweis aus.

## 7.3. DNA-Analyse mit Oligonucleotid-derivatisierten Magnetpartikeln

Trennungs- und Reinigungsschritte vor der elektrochemischen DNA-Analyse werden vereinfacht, wenn man die DNA-Analyten an Magnetpartikeln anbringt.<sup>[323]</sup> Eine reversible, magnetisch gesteuerte Oxidation der DNA gelang mithilfe Nucleinsäure-derivatisierter Magnetpartikel.<sup>[324]</sup> Avidin-modifizierte Magnetpartikel wurden mit der biotinylierten Nucleinsäure-Sonde beladen und anschließend mit der komplementären DNA hybridisiert. Zwei Elektroden aus Kohlenstoffpaste wurden auf einer Oberfläche aufgebracht und als Arbeitselektroden geschaltet. Die räumliche Abscheidung der funktionalisierten Magnetpartikel an der rechten (R) oder linken Elektrode (L) ermöglichte die magnetisch gesteuerte Oxidation der DNA in chronopotentiometrischen Experimenten (Potentialpulse von 0.6 V bis 1.2 V) (Abbildung 38). Die DNA-Oxidation wurde durch Verschieben des unterhalb der planar aufgedruckten Elektroden befindlichen Magneten an- und ausgeschaltet, wobei die DNA-funktionalisierten Magnetpartikel angezogen bzw. abgestoßen wurden. Eine solche magnetische Steuerung der DNA-Oxidation erscheint vielversprechend für die Analyse von DNA-Arrays.

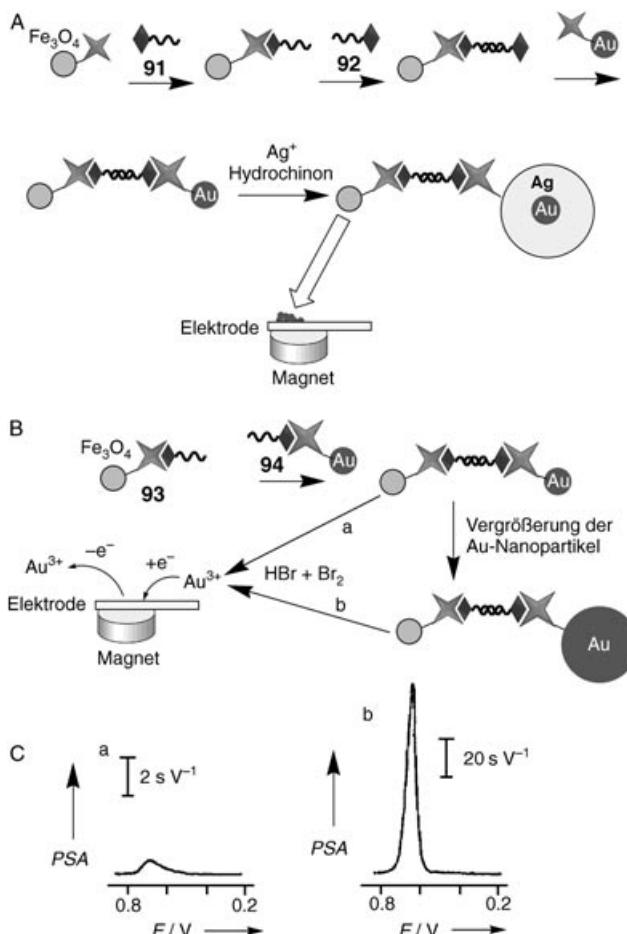
Bei mehreren Verfahren zum DNA-Nachweis wurde die inhärente Signalverstärkung durch die Stripping-Analyse mit einer effizienten Unterscheidung von nichthybridisierter DNA kombiniert.<sup>[215,239a]</sup> Magnetpartikel ermöglichen die Isolierung des Duplex und ergeben darüber hinaus einen eleganten Ansatz zur Ansteuerung und Regelung eines elektrischen DNA-Nachweises.<sup>[324,325]</sup> Ein interessantes Verfahren ist das „magnetische“ Sammeln von Magnetpartikel/DNA-Hybrid/Metall-Tracer-Aggregaten auf einer Transducer-Elektrode.<sup>[325]</sup> Bei diesem Ansatz wurde eine biotinylierte Nucleinsäure an Avidin-modifizierte Magnetpartikel gebunden, die als Sammelpartikel fungierten. Nach der Hybridisierung der zu analysierenden DNA mit der sammelnden Nucleinsäure folgte als zweiter Schritt die Hybridisierung mit einer an Metall- oder Halbleiter-Nanopartikel konjugierten Nucleinsäure, die ihrerseits komplementär zu einem freien Segment der zu analysierenden DNA war. Bei Bindung der Nanopartikel-Marker an den Bioassay resultierten signalverstärkende Cluster, die beim Auflösen zahlreiche Ionen freisetzen. Außerdem können die Metall-Nanopartikel auf der Sensoroberfläche als katalytisch aktive Stellen für die stromlose Abscheidung anderer Metalle wirken. Der amplifizierte DNA-Nachweis beruht also entweder auf der vor-



**Abbildung 38.** Chronopotentiometrie der DNA-Oligomer-funktionalisierten Magnetpartikel mit einer Anordnung aus zwei Elektroden aus Kohlenstoffpaste: a–d) Potentiogramme der linken Elektrode, a'–d') Potentiogramme der rechten Elektrode. Die Potentiogramme a, b', c, d' wurden ohne externen Magneten aufgenommen, während die Potentiogramme a', b, c', d in Gegenwart eines externen Magneten unterhalb der Elektroden erhalten wurden. (Mit Genehmigung auf Lit. [324].)

übergehenden Akkumulation von Metallen, die nachfolgend abgelöst werden, oder auf der Erzeugung einer größeren Menge gelösten Produkts, das elektrochemisch analysierbar ist.<sup>[223,326]</sup>

In Abbildung 39A ist der amplifizierte DNA-Nachweis durch Nucleinsäure-funktionalisierte Magnetpartikel und Gold-Nanopartikel als katalytische Keimbildungszentren für die Abscheidung von Silber dargestellt.<sup>[325]</sup> Eine biotinylierte Nucleinsäure **91** wurde auf Avidin-beladenen Magnetpartikeln immobilisiert und mit der komplementären biotinylierten Nucleinsäure **92** hybridisiert. Das Konjugat wurde mit dem Gold-Nanopartikel-Avidin-Konjugat umgesetzt, und die hybridisierten Aggregate wurden durch einen externen, separierenden Magneten aufkonzentriert. Durch Behandlung des Magnetpartikel/DNA/Gold-Nanopartikel-Konjugats mit Ag<sup>+</sup>-Ionen in Gegenwart von Hydrochinon wurde stromlos Silber auf den katalytisch wirkenden Gold-Nanopartikeln abgeschieden. Hierin besteht der amplifizierende Schritt, denn die katalytische Abscheidung von Silber auf den Gold-Nanopartikeln geht auf ein einzelnes DNA-Erkennungsergebnis zurück. Der Strom, der beim Ablösen des abgeschiedenen Silbers von der Elektrode fließt, liefert das elektronische Signal für den Nachweis der Ziel-DNA.



**Abbildung 39.** Elektrochemische Analyse von DNA durch Anbringen von DNA-Molekülen an Magnetpartikeln und anschließende Aggregation mit Gold-Nanopartikeln. A) Die Gold-Nanopartikel werden als katalytische Zentren zur Silberabscheidung genutzt und die DNA durch elektrochemisches Silber-Stripping analysiert. B) Die Gold-Nanopartikel werden chemisch aufgelöst, die freigesetzten Au<sup>3+</sup>-Ionen elektrochemisch reduziert und das abgeschiedene Gold elektrochemisch von der Elektrode gelöst (Weg a). Durch Vergrößerung der Gold-Nanopartikel wird eine weitere Signalverstärkung erzielt (Weg b). C) Effekt der Au-Partikel-Vergrößerung auf das Signal der Analyt-DNA: a) nichtverstärktes Stripping-Signal vor der Abscheidung von Gold auf den Gold-Nanopartikeln und b) nach zehnminütiger Abscheidung. (Teil C mit Genehmigung aus Lit. [215], Copyright American Chemical Society, 2001.)

In einem vergleichbaren System (Abbildung 39B)<sup>[215]</sup> wurden Gold-Nanopartikel als elektroaktive und katalytische Marker zum elektrochemischen DNA-Nachweis eingesetzt. Die biotinylierte Primer-Nucleinsäure **93** war über eine Avidin-Brücke mit den Magnetpartikeln verbunden. Die Hybridisierung der Nucleinsäure **94**, die mit dem Gold-Nanopartikel gekuppelt war, wurde durch Auflösen der Gold-Nanopartikel mit einer HBr/Br<sub>2</sub>-Lösung und anschließende elektrochemische Reduktion der Au<sup>3+</sup>-Ionen auf der Elektrode detektiert. Zum Schluss wurde das auf der Oberfläche abgeschiedene Gold elektrochemisch abgelöst (Abbildung 39B, Prozess a). Das entstehende Signal konnte durch Abscheidung von Gold auf den Gold-Nanopartikeln weiter verstärkt werden (Abbildung 39B, Prozess b). Durch den

höheren Goldgehalt entsteht ein höheres chronopotentiometrisches Signal. In Abbildung 39 sind die bei der Ablösung des Golds von der Elektrode erhaltenen Potentiogramme zusammengestellt. Verglichen sind Prozess a (5 nm Goldpartikel) und Prozess b (5 nm Goldpartikel nach zehnminütiger Abscheidung von Gold auf den Gold-Nanopartikeln).

Auch die Eisenkomponente von Magnetpartikeln wurde zum Nachweis der DNA-Hybridisierung durch Stripping-Voltammetrie genutzt.<sup>[327]</sup> In einem verwandten Experiment wurden Sonden bestehend aus Kern<sub>Fe</sub>-Hülle<sub>Ag</sub>-Nanopartikeln eingesetzt. In beiden Fällen wurden die konjugierten eisenhaltigen Partikel nach der Hybridisierung aufgelöst, und das freigesetzte Eisen wurde durch kathodische Stripping-Voltammetrie in Gegenwart des Liganden 1-Nitroso-2-naphthol und katalytischer Mengen Bromat quantifiziert.

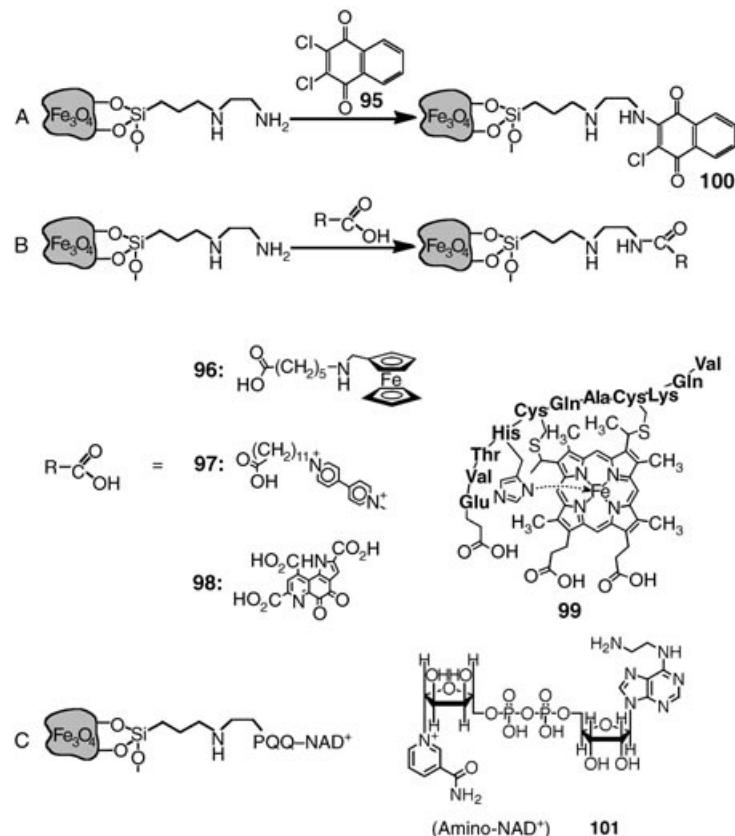
Durch Anwendung funktionalisierter Magnetpartikel als Carrier für DNA-Proben stehen elegante Analyseschemata zur Lösung komplexer analytischer Aufgaben zur Verfügung. Ein Beispiel ist die Untersuchung des Aldehyddehydrogenase-Gens 2 durch Single-Nucleotide-Polymorphism(SNP)-Genotypisierung mit einem einzelnen bakteriellen Magnetpartikel.<sup>[328]</sup>

#### 7.4. Redoxaktivierte Magnetpartikel zur Ansteuerung und Verstärkung elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Prozesse

Magnetische Mikro- und Nanopartikel mit redoxaktiven Gruppen werden zur Steuerung von biokatalytischen Reaktionen eingesetzt. Eine Serie elektroaktiver Gruppen – 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**95**), *N*-(Ferrocenylmethyl)aminohexansäure (**96**), *N*-Methyl-*N'*-dodecansäure-4,4'-bipyridinium (**97**), Pyrrolochinolinchinon (**PQQ**, **98**) und Mikroperoxidase-11 (MP-11, **99**) – wurde mit Magnetit-Partikeln kovalent verknüpft (Abbildung 40).<sup>[329,330]</sup>

In Abbildung 41 A ist schematisch dargestellt, wie die elektrochemische Aktivität der funktionalen Magnetpartikel durch einen externen Magneten geschaltet werden kann. Eine Anziehung des Magnetpartikels zur Elektrodenoberfläche durch einen externen Magneten schaltet den elektrischen Kontakt zwischen den Redoxeinheiten R und der Elektrode ein und aktiviert damit die Redoxeigenschaften der Komponenten. Positioniert man den Magneten oberhalb der elektrochemischen Zelle, werden die Magnetpartikel von der Elektrode weggezogen, und die elektrochemische Aktivität der funktionalisierten Magnetpartikel wird ausgeschaltet. Abbildung 41 B zeigt ein Beispiel für die reversible Aktivierung und Desaktivierung der Redoxeigenschaften des an einem Magnetpartikel gebundenen Ferrocen-Derivats **96** mit  $E^\circ = 0.32$  V (gegen SCE). Auf ähnliche Weise konnte die elektrochemische Antwort von Magnetpartikeln mit koordiniertem Aminonaphthochinon (**100**;  $E^\circ = -0.39$  V gegen SCE, pH 7.0) geschaltet werden.

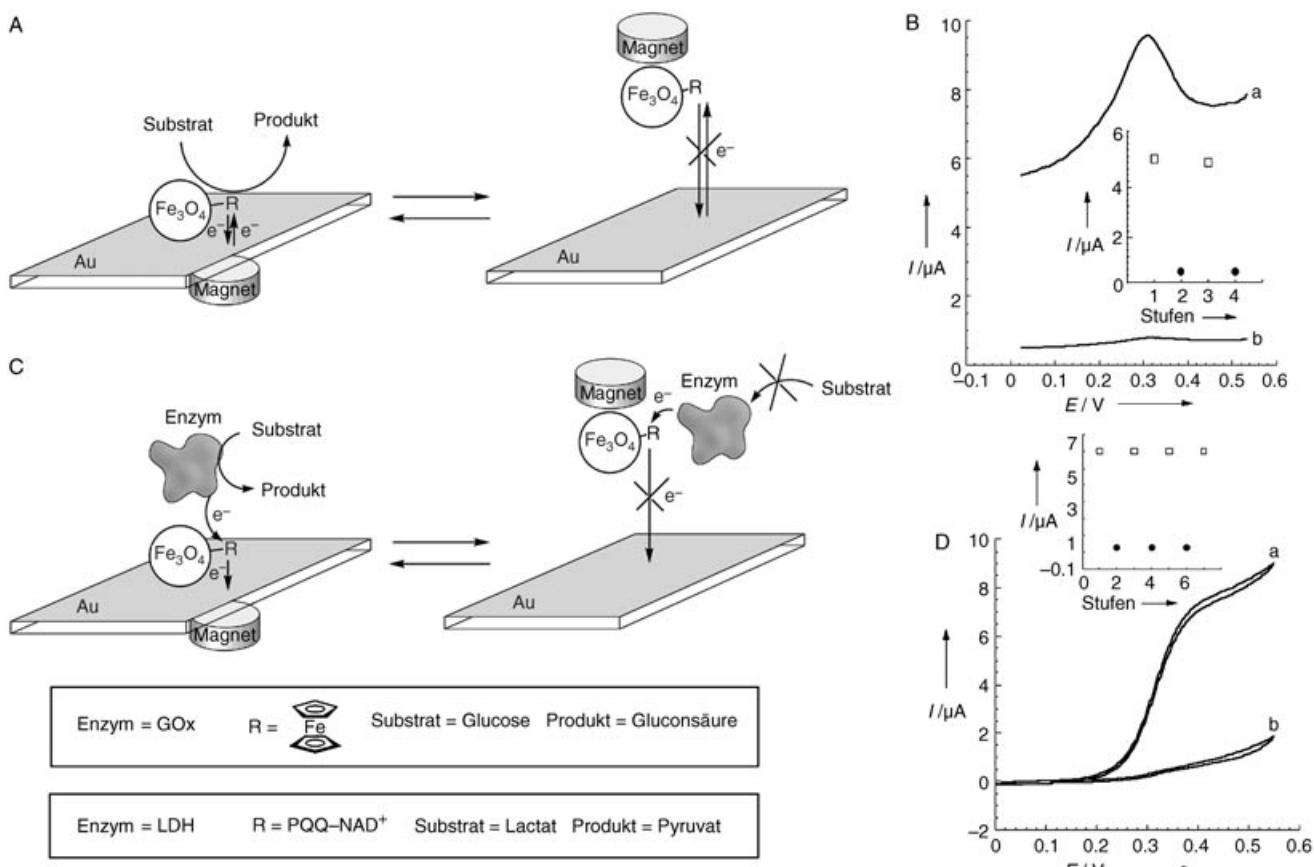
Die elektrochemische Ansteuerung der mit den Magnetpartikeln verknüpften Redoxeinheiten ermöglicht eine sekundäre, magnetisch schaltbare Aktivierung und Desaktivierung bioelektrokatalytischer Prozesse. Beispielsweise wirkt Pyrrolochinolinchinon (PQQ, **98**,  $E^\circ = -0.16$  V gegen SCE,



**Abbildung 40.** Synthese eines funktionalisierten Magnetpartikels (zur Übertragung von Redoxprozessen) durch kovalente Anbindung redoxaktiver Gruppen. Die Ausgangspartikel sind mit einem Film aus [3-(2-Aminoethyl)aminopropyl]siloxan überzogen. A) Bindung von 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**95**) an die beschichteten Ausgangspartikel. B) Carbodiimid-Kupplung von elektronenübertragenden Carboxylderivaten (**96–99**) an die Aminogruppen der Siloxan-Schicht. C) Mit dem PQQ-NAD<sup>+</sup>-Komplex (**101**) funktionalisierte Magnetpartikel zur elektrochemischen Aktivierung von NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzymen. (Mit Genehmigung aus Lit. [329].)

pH 8.0) als Elektrokatalysator für die Oxidation von NADH.<sup>[331]</sup> Entsprechend wurden die mit **98** funktionalisierten Magnetpartikel (mit einer durchschnittlichen Oberflächenbedeckung von  $7.5 \times 10^3$  PQQ-Einheiten je Partikel) zur Steuerung der elektrokatalytischen Oxidation von NADH durch einen externen Magneten genutzt.<sup>[329b]</sup> Ähnlich wurden Magnetpartikel, die mit Mikroperoxidase-11 (**99**) beladen waren, für die magnetisch schaltbare elektrokatalytische Reduktion von Wasserstoffperoxid eingesetzt.<sup>[329b]</sup>

Elektronenübertragende Einheiten vermitteln den Elektronenfluss zwischen den aktiven Zentren der Redoxenzyme und den Elektroden. Zum Beispiel stellen Ferrocen oder Bipyridinium als Mediatoren den elektrischen Kontakt zu oxidativen Redoxenzymen wie Glucoseoxidase oder reduktiven Biokatalysatoren wie Nitratreduktase her.<sup>[195]</sup> Die Aktivierung der Redoxfunktionen der mediatormodifizierten Magnetpartikel ermöglicht die nachfolgende schaltbare Aktivierung und Desaktivierung enzymatischer bioelektrokatalytischer Umwandlungen mithilfe eines externen Magneten.<sup>[329]</sup> Abbildung 41 C zeigt schematisch die magnetisch schaltbare Aktivierung von Redoxenzymen mit Magnetpar-



**Abbildung 41.** Elektrochemische, elektrokatalytische und bioelektrokatalytische Reaktionen funktionaler Magnetpartikel, gesteuert durch einen externen Magneten: A) An- und Ausschalten der elektrochemischen Reaktion der redoxübertragenden Gruppen (R), die kovalent an die Magnetpartikel gebunden sind. B) Differentielle Pulsvoltammogramme einer Goldelektrode in Gegenwart von mit dem Ferrocen-Derivat **96** funktionalisierten Magnetpartikeln. Die Partikel werden magnetisch zur Elektrodenoberfläche hin (□) oder von dort weg gezogen (●). Einschub: Reversible Änderungen des Peak-Stroms durch magnetische Aktivierung (a) und Desaktivierung (b) des elektrochemischen Vorgangs. C) An- und Ausschalten der bioelektrokatalytischen Oxidation von Glucose in Gegenwart von Glucoseoxidase (GOx) und mit **96** funktionalisierten Magnetpartikeln sowie Oxidation von Lactat in Gegenwart von Lactatdehydrogenase (LDH) und PQQ-NAD<sup>+</sup>-funktionalisierten Magnetpartikeln. D) Cyclovoltammogramme an einer Goldelektrode in Gegenwart von mit **96** funktionalisierten Magnetpartikeln (10 mg), Glucose (10 mM) und GOx (1 mg mL<sup>-1</sup>): a) Anschalten der Redoxfunktionen der Partikel durch Anziehung zur Elektrode. b) Ausschalten der Redoxfunktionen der Partikel durch Abzug von der Elektrode. Einschub: Reversible Änderung des elektrokatalytischen Stroms (gemessen bei  $E = 0.45 \text{ V}$  gegen SCE) bei Anziehung der Magnetpartikel zur Elektrode (□) und Abzug der Magnetpartikel von der Elektrode (●). (Mit Genehmigung aus Lit. [329].)

tikeln, die mit Elektronenmediatoren funktionalisiert sind. Ein Beispiel ist die Oxidation von Glucose durch Glucose-oxidase in Gegenwart der mit dem Ferrocen-Derivat **96** funktionalisierten Magnetpartikeln. Nach der magnetischen Anlagerung der Magnetpartikel an die Elektrode wird die Ferroceneinheit zum Ferrocenyl-Kation oxidiert. Die kationischen Ferrocenyl-Mediatoren oxidieren das Redoxzentrum von Glucoseoxidase und aktivieren die Oxidation von Glucose. Durch Wegziehen der Magnetpartikel von der Elektrodenoberfläche durch den externen Magneten wird der elektrische Kontakt zwischen der Elektrode und der Ferroceneinheit unterbrochen und die nachgeschaltete Oxidation von Glucose inhibiert. Abbildung 41D zeigt die magnetische Aktivierung der bioelektrokatalytischen Oxidation von Glucose, die sich am Anodenstroms ablesen lässt. Die Reaktion läuft an, wenn die funktionalen Magnetpartikel zur Elektrode gezogen werden. Analog wird die Oxidation der Glucose blockiert, wenn die Magnetpartikel von der Elektrode abge-

löst werden. Durch die reversible Anlagerung und Ablösung der Magnetpartikel an die bzw. von der Elektrodenoberfläche kann der Prozess also cyclisch an- und ausgeschaltet werden.

Ähnlich war der Ansatz zur magnetischen Schaltung der bioelektrokatalytischen Reduktion von Nitrat zu Nitrit mit Nitratreduktase als Biokatalysator und Bipyridinium(**97**)-derivatisierten Magnetpartikeln ( $E = -0.57 \text{ V}$  gegen SCE) als Übertragungskomponenten.<sup>[329b]</sup> Nach Anlagerung der mit **97** derivatisierten Magnetpartikel an die Elektrode und Anlegen eines Potentials von  $E = -0.7 \text{ V}$  katalysierte das Bipyridinium-Radikalkation die Reduktion von Nitrat zu Nitrit mit einer Geschwindigkeit von  $6.5 \times 10^{-3} \text{ mM min}^{-1}$ . Durch Ablösung der Partikel von der Elektrode durch Positionierung des Magneten oberhalb der elektrochemischen Zelle wurde die Enzymreaktion blockiert. Durch Änderung der Position des externen Magneten relativ zur Zelle konnte somit die Reduktion von  $\text{NO}_3^-$  reversibel an- und ausgeschaltet werden.

Derivatisierte Magnetpartikel wurden auch für die cyclische Aktivierung und Desaktivierung von NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzymen durch einen externen Magneten genutzt. Es wurde berichtet, dass eine kovalent verknüpfte Monoschicht von PQQ-NAD<sup>+</sup> auf einer Elektrode als aktive Grenzschicht für die Aktivierung NAD<sup>+</sup>-abhängiger Enzyme wie der Lactatdehydrogenase wirkt.<sup>[332]</sup> Die biokatalytische Oxidation des Substrats liefert NADH, das von PQQ zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird. Das dabei anfallende PQQH<sub>2</sub> wird an der Elektrode zu PQQ oxidiert, wodurch die elektrochemisch getriebene biokatalytische Oxidation des Substrats, in diesem Falle Lactat, stimuliert wird. Entsprechend wurden die mit PQQ (**98**) derivatisierten Magnetpartikel mit *N*<sup>6</sup>-(2-Aminooethyl)-β-nicotinamiddinucleotid (**101**)<sup>[333]</sup> zu PQQ-NAD<sup>+</sup>-modifizierten Partikeln umgesetzt (Abbildung 40C).<sup>[329b]</sup> Diese eignen sich zur magnetischen Schaltung der bioelektrokatalytischen Funktion des NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) mithilfe eines externen Magneten (Abbildung 41 C). Die Anlagerung der PQQ-NAD<sup>+</sup>-derivatisierten Magnetpartikel an die Elektrode in Gegenwart von LDH aktiviert die bioelektrokatalysierte Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Auf die enzymatische Reduktion des NAD<sup>+</sup>-Cofaktors durch Lactat folgte die Oxidation des entstandenen NADH durch den Elektrokatalysator PQQ. Durch Anlegen des für die Oxidation des gebildeten PQQH<sub>2</sub> geeigneten Potentials ( $E = 0.05$  V gegen SCE) wird der Elektrokatalysator regeneriert. Auf diese Weise gelingt die kontinuierliche Oxidation von Lactat zu Pyruvat in Gegenwart von LDH. Der elektrokatalytisch erzeugte Anodenstrom dieses Systems nimmt mit steigender Lactatkonzentration zu und erreicht einen Sättigungswert für die Stromdichte bei  $I_{max} = 1.8 \mu\text{A cm}^{-2}$  bei einer Lactatkonzentration von 50 mM. Eine kinetische Analyse der Oxidation von Lactat zu Pyruvat durch LDH bei Elektrolyse im Fließgleichgewicht ergab eine Bildungsgeschwindigkeit von Pyruvat von  $0.13 \text{ mM min}^{-1}$ . Die Ablösung der funktionalisierten Magnetpartikel von der Elektrode durch den externen Magneten unterbricht die Reaktion, sodass der Prozess durch die Positionierung des Magneten unterhalb oder oberhalb der Zelle reversibel an- und ausgeschaltet werden kann.

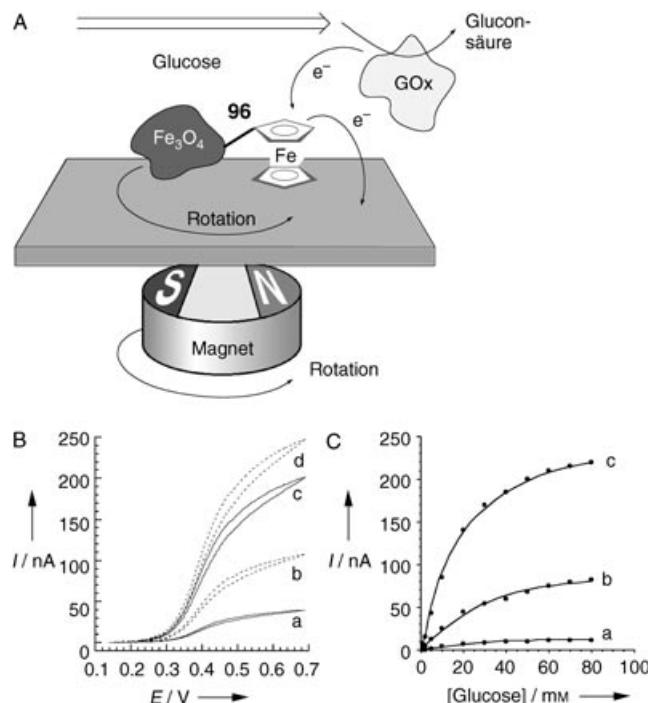
Die Möglichkeit, bioelektrokatalytische Transformationen mit einem Magneten zu steuern, wurde zur Entwicklung selektiver dualer Biosensorsysteme genutzt.<sup>[334]</sup> Der spezifische simultane elektrochemische Nachweis von zwei Substraten in einer Region überlappender Redoxpotentiale ist eine Herausforderung für die Bioelektronik.

Die simultane Analyse von Lactat und Glucose in Gegenwart der beiden oxidierenden Enzyme LDH und GOx gelang durch Anwendung einer mit einer Ferrocen-Monolage beschichteten Elektrode, NAD<sup>+</sup>-PQQ-derivatisierter Magnetpartikel und eines externen Magneten. Bei einem Elektrodenpotential von  $E > 0.32$  V (gegen SCE) und Abziehen der Magnetpartikel von der Elektrode wird Glucose ferrocenvermittelt oxidiert, während die Oxidation von Lactat blockiert wird. Nach magnetischer Anlagerung der NAD<sup>+</sup>-PQQ-Magnetpartikel an die Elektrode und gleichzeitiger Senkung des Elektrodenpotentials in den Bereich  $-0.13 < E < 0.32$  V (gegen SCE) setzte die PQQ-NAD<sup>+</sup>-vermittelte Oxidation von Lactat durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige Lactatde-

hydrogenase ein. Da die Ferrocen-Gruppen bei diesem Potential nicht oxidiert werden, wird auch die Glucose nicht oxidiert.

Ein wichtiger Fortschritt bei der magnetischen Steuerung elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Transformationen bestand darin, die Magnetpartikel nach Ablagerung auf der Elektrode durch einen externen Magneten in Rotation zu versetzen.<sup>[335]</sup> In diesem Experiment verhalten sich die redoxfunktionalisierten Magnetpartikel wie kreisförmig rotierende Mikroelektroden. Die durch die Partikel vermittelten Prozesse werden somit nicht durch Diffusion, sondern durch Konvektion der Substrate zu den Mikroelektroden gesteuert. Auf diese Weise erhält man stärkere amperometrische Signale der partikelvermittelten elektrokatalytischen Prozesse, und die entstehenden Ströme können durch die Rotationsgeschwindigkeit der Partikel reguliert werden.

In Abbildung 42 A ist die verbesserte amperometrische Analyse von Glucose durch Rotation von Magnetpartikeln (funktionalisiert mit dem Ferrocen-Derivat **96**) auf der Elek-

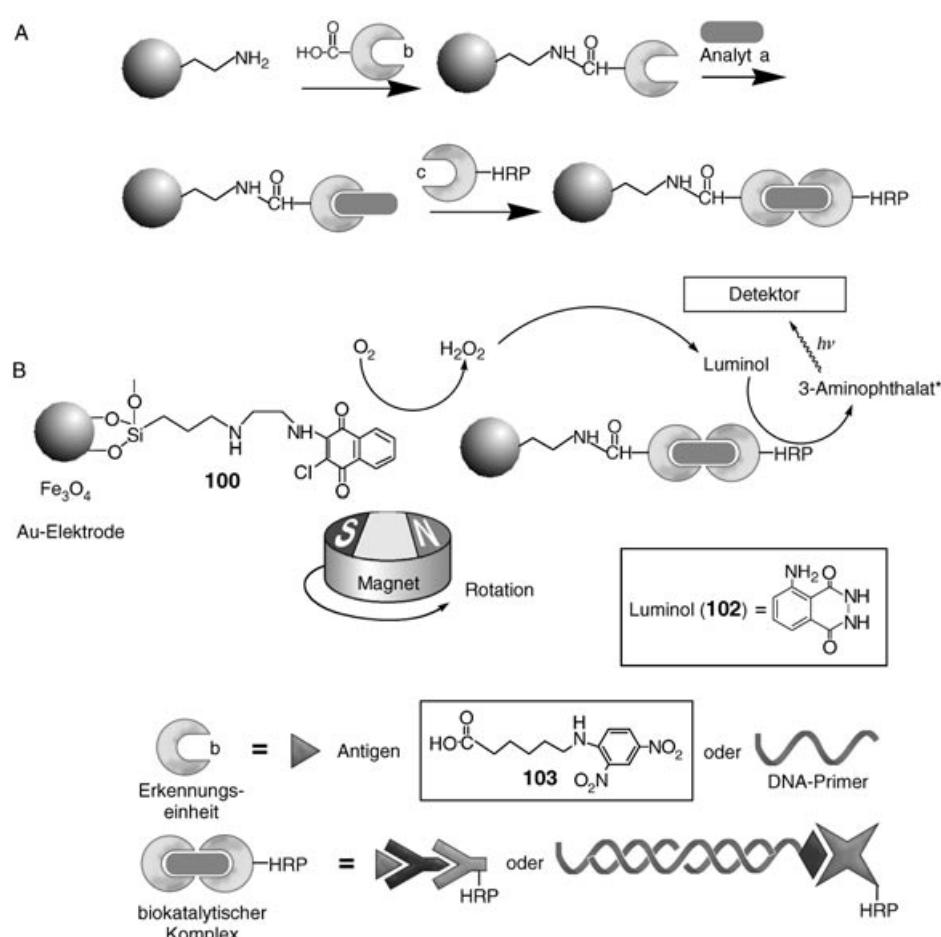


**Abbildung 42.** A) Bioelektrokatalytische Oxidation von Glucose in Gegenwart von GOx und Ferrocen-funktionalisierten Magnetpartikeln, verstärkt durch kreisförmige Rotation der Partikel durch einen externen rotierenden Magneten. B) Cyclovoltammogramme einer Goldelektrode mit magnetisch adsorbierten **96**-Magnetpartikel-Konjugaten (6 mg) in Gegenwart von GOx ( $1 \times 10^{-5}$  M) und Glucose (50 mM) ohne und mit Rotation des Magneten (UpM): a) 0, b) 10, c) 100, d) 400. Scan-Geschwindigkeit:  $5 \text{ mVs}^{-1}$ . C) Kalibrierkurven für den amperometrischen Nachweis von Glucose ( $E = 0.5$  V gegen SCE) ohne und mit Rotation des Magneten (UpM): a) 0, b) 100, c) 400. (Mit Genehmigung aus Lit.[335], Copyright American Chemical Society, 2002.)

trodenunterlage schematisch dargestellt. Da die Wechselwirkung der Glucoseoxidase (GOx) mit dem an das Magnetpartikel gekoppelten Elektronenüberträger konvektionskontrolliert ist, hängen die erzeugten elektrokatalytischen Ströme

von der Quadratwurzel der Rotationsgeschwindigkeit ab ( $I_{\text{cat}} \propto \omega^{1/2}$ ). In Abbildung 42B sind die gemessenen Ströme als Funktion der Rotationsgeschwindigkeit des externen Magneten dargestellt. Die Stromstärke steigt deutlich sichtbar an, wenn die Rotationsgeschwindigkeit erhöht wird. Abbildung 42C zeigt die Stromstärke in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration (Kalibrierkurven) in der Anordnung mit rotierenden Partikeln (Rotationsgeschwindigkeiten 400 UpM (Kurve c) und 100 UpM (Kurve b)) und in stationärer Anordnung (Kurve a). Durch die Rotation der Partikel nimmt das amperometrische Signal des Vorgangs auf etwa das 15fache zu (bei 400 UpM), weshalb sich die Glucosekonzentration mit deutlich höherer Empfindlichkeit bestimmen lässt. Die Messsignale wurden nach der konventionellen Theorie der rotierenden Scheiben-elektrode (RDE, rotating disc electrode) ausgewertet.<sup>[336]</sup> Eine Analyse der experimentellen Ströme in Abhängigkeit von den Rotationsgeschwindigkeiten der Magnetpartikel nach der Theorie von Levich<sup>[336]</sup> ermöglichte es, die Konstanten für die Elektronenübertragungsgeschwindigkeit an der Grenzfläche anzugeben.

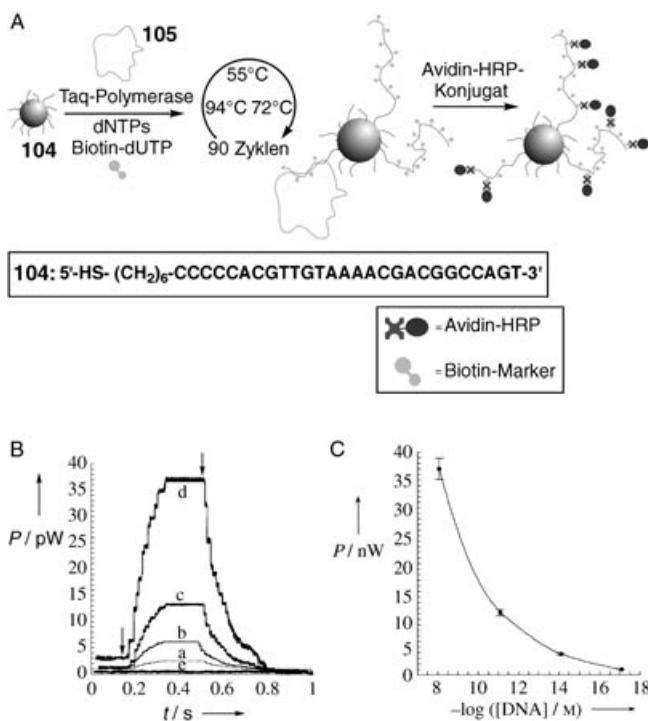
Die Verstärkung (bio-)elektrokatalytischer Signale durch rotierende Magnetpartikel kann auch zur Verstärkung von Biosensorsignalen genutzt werden. Das Prinzip ist in Abbildung 43A schematisch dargestellt: Ein Analyt a wird von Magnetpartikeln, konjugiert mit der komplementären Einheit b, erkannt. Durch Bindung eines zweiten Reagens für die Erkennung von a (mit Meerrettichperoxidase konjugiertes c) entsteht eine biokatalytische Sandwich-Struktur. Die magnetische Ablagerung einer Mischung aus der Sandwich-Struktur b/a/c-HRP und Aminonaphthochinon(**100**)-derivatisierten Magnetpartikeln ermöglicht einen verbesserten Nachweis des Analyten durch elektrisch erzeugte Chemilumineszenz. Die Elektroreduktion von **100** löst die elektrokatalytische Reduktion von O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus. Das Wasserstoffperoxid wiederum induziert in Gegenwart von Luminol (**102**) eine durch HRP katalysierte Lichtemission. Durch die Rotation der Magnetpartikel reagieren O<sub>2</sub> und Luminol mit den funktionalisierten Magnetpartikeln konvektionskontrolliert, wodurch die Chemilumineszenz verstärkt wird (Abbildung 43B). Als biosensorisch aktive Affinitätswechselwirkungen auf den Magnetpartikeln können Antigen-Antikör-



**Abbildung 43.** Signalverstärkung beim Nachweis von Bioaffinitäts-Erkennungsvorgängen durch mehrfach markierte rotierende Magnetpartikel: A) Synthese der funktionalisierten Magnetpartikel für den Bioerkennungssassay. B) Signalverstärkung im Bioerkennungssassay durch Rotation der funktionalisierten Magnetpartikel.

per-Reaktionen, Nucleinsäure-DNA-Hybridisierungen und andere intermolekulare Wirt-Gast-Wechselwirkungen genutzt werden. Mithilfe rotierender funktionalisierter Magnetpartikel gelingt auch ein besserer Nachweis von immunologischen Wechselwirkungen (z. B. von DNP-Antikörpern mit DNP-Antigen(**103**)-funktionalisierten Magnetpartikeln) sowie der ultrasensitive Nachweis von DNA.<sup>[337]</sup>

Ein modifiziertes Schema für die Verstärkung des Nachweissignals viraler DNA durch funktionalisierte Magnetpartikel ist in Abbildung 44A am Beispiel der Analyse der 7249 Basen langen M13mp18-DNA gezeigt.<sup>[338]</sup> Der 27 Basen lange DNA-Primer **104** ist komplementär zu einem Segment der Analyt-DNA und mit dem Magnetpartikel gekuppelt. Der Hybridisierung von **104** mit der M13mp18-DNA **105** schließt sich ein Polymerisationsschritt mit einer dNTP-Mischung an, in der sich auch biotinmarkiertes dUTP befindet. Auf diese Weise werden Biotinmarkierungen in die replizierte DNA auf den Magnetpartikeln eingefügt. Diesem Prozess folgt eine Sequenz von thermischen Zyklen, in denen M13mp18-DNA dissoziiert, mit einem anderen Primer rehybridisiert und erneut repliziert wird (wieder unter Einführung der Biotinmarkierungen). Anschließend werden die Partikel mit einem



**Abbildung 44.** A) Markierung von Nucleinsäure-Replikaten an Magnetpartikeln mit Biotingruppen durch thermische Zyklen zum verbesserten Nachweis viraler DNA durch mehrfach markierte rotierende Magnetpartikel. B) Chemolumineszenz bei der Analyse von M13mp18-DNA ( $8 \times 10^{-9}$  M) bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten (UpM): a) 0, b) 60, c) 400, d) 2000; e) Chemilumineszenz in Abwesenheit der M13mp18-DNA bei 2000 UpM. C) Kalibrierkurve für die Chemilumineszenz bei unterschiedlichen Konzentrationen von M13mp18-DNA bei 2000 UpM. In allen Experimenten wurde die Chemilumineszenz durch Anlegen eines Potentialsprungs von  $E=0.0$  nach  $-0.5$  V und zurück unter Luft erzeugt. Die Pfeile in der Abbildung markieren den Zeitpunkt, zu dem das Potential auf  $-0.5$  V bzw. auf  $0.0$  V eingestellt wird. (Teile B und C mit Genehmigung aus Lit. [338].)

Avidin-HRP-Konjugat assoziiert, die funktionalisierten Magnetpartikel mit einem externen Magneten auf der Elektrodenoberfläche gesammelt und mit den Aminonaphthochinon(100)-markierten Partikeln gemischt. Die elektrokatalytische Reduktion von  $O_2$  durch die Chinongruppen liefert  $H_2O_2$ , das in Gegenwart von Luminol und HRP Chemilumineszenz erzeugt; durch die Rotation der Magnetpartikel wird die Lichtemission verstärkt. Abbildung 44B zeigt die Intensität des emittierten Lichts bei der Analyse der M13mp18-DNA ( $8 \times 10^{-9}$  M) bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten der Partikel. Mit dieser Methode wurde die Ziel-DNA mit einer Nachweissgrenze von  $8 \times 10^{-18}$  M detektiert (Abbildung 44C). Die Intensität der Chemilumineszenz korreliert linear mit der Quadratwurzel der Rotationsgeschwindigkeit ( $\omega^{1/2}$ ), was in Einklang damit ist, dass die Lumineszenz durch die Konvektion des Substrats zu den rotierenden Partikeln bestimmt wird. Mit einem ähnlichen Ansatz wurden Fehlpaarungen einzelner Basen in DNA nachgewiesen<sup>[338]</sup> und die Telomeraseaktivität in Tumorzellen bestimmt.<sup>[339]</sup>

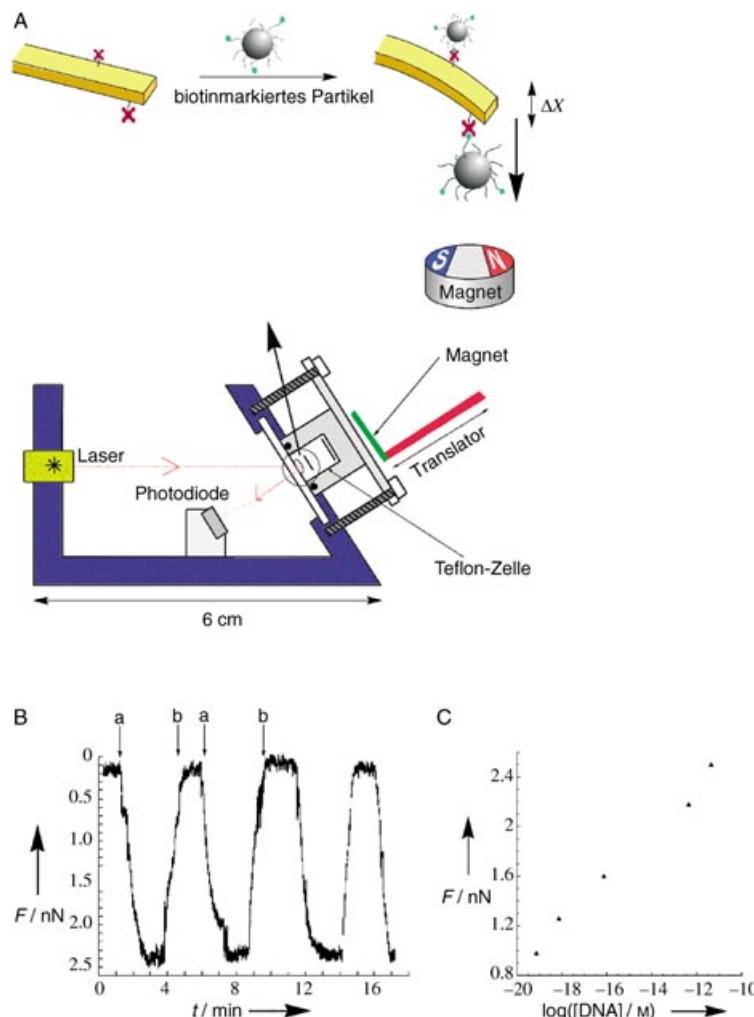
## 7.5. Magnetomechanischer Nachweis biologischer Erkennungsprozesse

Federhebel (cantilever) sind chemisch modifizierbar, und ihre nanometrische Auslenkung kann optisch verfolgt werden, was diese Mikroelemente zu idealen mechanischen Sensoren macht.<sup>[340]</sup> Es wurde darüber berichtet, dass durch mechanische Spannungen bedingte Wechselwirkungen an der Oberfläche von Federhebeln deren Auslenkung induzieren. Zum Beispiel wurde ein Federhebel mit einer dünnen Poly-anilinfolie als reversible, elektrochemisch ansteuerbare mechanische Funktionseinheit beschrieben.<sup>[341]</sup> Oxidiert man den Polymerfilm, stoßen sich die Polymerketten elektrostatisch ab und erzeugen eine mechanische Spannung, wodurch der Federhebel ausgelenkt wird. Bei Reduktion des oxidierten Polymers verschwindet die Oberflächenspannung, und der Federhebel kehrt in seine Ausgangsposition zurück. Biologische Erkennungsprozesse wie Antikörper-Antigen-<sup>[342]</sup> und Nucleinsäure-DNA-Wechselwirkungen<sup>[343]</sup> sind gleichermaßen geeignet, einen Federhebel mechanisch auszulenken. Zum Beispiel induziert die elektrostatische Abstoßung zwischen oberflächenhybridisierten DNA-Molekülen eine Oberflächenspannung und damit eine mechanische Auslenkung des Federhebels.<sup>[343]</sup>

Vorgeschlagen wurde die Verwendung eines Federhebel-Arrays zur parallelen mikromechanischen Detektion von unterschiedlichen Ziel-DNAs oder unterschiedlichen Mutanten. Die Idee war, den Federhebel mit Magnetpartikeln zu modifizieren mit einem externen Magnetfeld auszulenken. Basierend auf diesem Ansatz wurde ein hochempfindlicher Magnetfeldsensor entwickelt,<sup>[342]</sup> der Änderungen des Magnetfeldes bis hinab zu 10 nT anzeigt. Die vielfältige Verwendung von Magnetpartikeln in biosensorischen Messungen<sup>[344]</sup> lässt erwarten, dass auch der verstärkte magnetomechanische Nachweis von biologischen Erkennungsprozessen seine Anwendung finden wird.

Ein Nachweissystem auf der Basis der magnetisch induzierten Auslenkung eines Federhebels wurde entwickelt, das den hochempfindlichen magnetomechanischen Nachweis von DNA und Fehlpaarungen einzelner Basen in Nucleinsäuren sowie Assays der Telomerase-Aktivität ermöglicht.<sup>[345]</sup> Der Federhebel wurde mit Magnetpartikeln beladen, die wiederum mit der biosensorischen Oberfläche konjugiert waren. In einem Experiment wurde die zu analysierende M13mp18-DNA mit Nucleinsäure-modifizierten Magnetkügelchen hybridisiert und dann mit dNTPs (einschließlich biotinmarkiertem dUTP) repliziert (vergleiche auch Abbildung 44A). Zunächst wurden die primermodifizierten Magnetkügelchen mit der M13mp18-DNA umgesetzt und 90 Replikationszyklen unter Einbau von Biotinmarkierungen unterzogen. Dabei wurden die Partikel wiederholt mit M13mp18-DNA hybridisiert und mit der dNTP-Nucleotidmischung, die Biotin-dUTP enthielt, in Gegenwart von Taq-Polymerase repliziert. Die Doppelstränge wurden durch Schmelzen aufgelöst, die funktionalisierten Magnetpartikel wieder hybridisiert, polymerisiert (und dabei markiert) usw. Auf diese Weise wurden die biotinmarkierten Ketten, die mit den Magnetpartikeln assoziiert waren, linear amplifiziert. Die entstandenen Kügelchen wurden auf einen Avidin-beschichteten Federhe-

bel aufgetragen, der zur Messung durch ein externes magnetisches Feld ausgelenkt wurde (Abbildung 45 A). Abbildung 45 B zeigt die reversible magnetomechanische Auslenkung des Federhebels und die Rückkehr in die Ausgangsposition. Durch Positionierung des externen Magneten unter



**Abbildung 45.** A) Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus und des Konzepts der magnetomechanischen Analyse von biologischen Erkennungsprozessen mit einem funktionalisierten Federhebel (X = Auslenkung). B) Magnetomechanische Auslenkung oder Rückstellung des Federhebels bei der Analyse von M13mp18-DNA mit Taq-Polymerase und thermischen Zyklen für Replikation und Markierung; M13mp18-DNA:  $7.1 \times 10^{-12} \text{ M}$ . Am Punkt a wird der Federhebel einem externen Magnetfeld ausgesetzt, bei Punkt b wird der Magnet entfernt. C) Abhängigkeit der Auslenkung von der M13mp18-DNA-Konzentration. (Mit Genehmigung aus Lit. [345], Copyright American Chemical Society, 2004.)

dem Federhebel wird dieser angezogen und ausgelenkt. Nach Entfernen des Magneten kehrt der Federhebel in seine Ausgangsposition zurück. Der Grad der magnetisch induzierten Auslenkung ist eine Funktion der Menge der funktionalisierten Magnetpartikel an der Oberfläche. Diese wiederum hängt von der Konzentration der analysierten M13mp18-DNA ab. Die Nachweisgrenze für die magnetomechanische Detektion der DNA lag bei  $7.1 \times 10^{-20} \text{ M}$  (Abbildung 45 C).

Einem ähnlichen Konzept folgend wurde ein magnetomechanisches Verfahren zum Nachweis von Fehlpaarungen

einzelner Basen in Nucleinsäuren entwickelt.<sup>[345]</sup> Der Ansatz wurde auch auf magnetomechanische Tests der Telomerase-Aktivität in Tumorzellen übertragen.<sup>[345]</sup> Ein Nucleinsäure-Primer, der von der Telomerase erkannt wird, wurde an Magnetpartikel gekuppelt und die Telomerisierung des Primers in Gegenwart von HeLa-Zellextrakt mit der dNTP-Mischung (einschließlich biotinmarkierter dUTP) durchgeführt. Bei der Telomerisierung wurde der Biotinmarker in die Telomere eingebaut, sodass die markierten Magnetpartikel an die Avidin-modifizierten Federhebel binden konnten. Zum magnetomechanischen Nachweis der Telomerase-Aktivität mit dieser Messanordnung sind lediglich 100 Tumorzellen erforderlich.

## 8. Biomolekulare Nanoschaltkreise

Bei der Miniaturisierung von Objekten durch lithographische Techniken stößt man inzwischen an eine theoretische Untergrenze, und man ist sich einig, dass andere Methoden entwickelt werden müssen, um in den Größenbereich unterhalb dieser Barriere zu gelangen. Als Alternative zu den lithographischen Verfahren, die auf dem Top-down-Prinzip beruhen, ist vorgeschlagen worden, die umgekehrte Richtung zu beschreiten, d.h. Mikro- und Nanoobjekte „von unten“ nach dem Bottom-up-Prinzip aufzubauen. Hierbei könnten molekulare oder supramolekulare Objekte als Template oder Keime zur Erzeugung nanometergroßer Strukturen verwendet werden.

Nanodrähte werden als Funktionseinheiten für selbstorganisierende logische und Speicherschaltkreise in künftigen nanotechnologischen Bauelementen betrachtet.<sup>[346]</sup> Die Entwicklung von Methoden zur Fertigung von Metall- oder Halbleiter-Nanodrähten ist daher eine Grundvoraussetzung, um Nanoschaltkreise und Nanobauelemente zu konstruieren. Außerdem sollten die Nanodrähte funktionelle Stellen enthalten, die den Einbau in Strukturen höherer Komplexität und hierarchischer Funktionalität ermöglichen, weshalb Biomaterialien als Template für die Erzeugung von Nanodrähten und Nanoleiterbahnen besonders attraktiv sind. Die hochentwickelten Strukturen, die uns die Natur zur Verfügung stellt, können als einfache Template genutzt werden, weit darüber hinaus aber lassen sich die spezifischen Fähigkeiten von Biomaterialien zur Erkennung von Strukturen auch für die selbstorganisierte Bildung komplexer funktioneller Strukturen heranziehen.

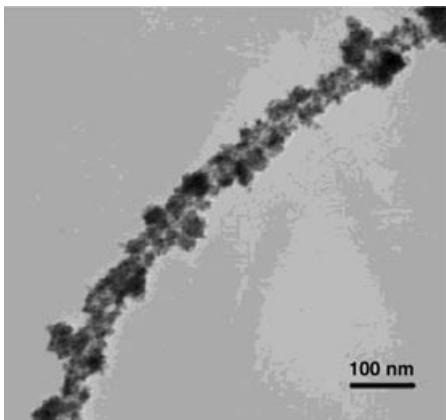
Biologische Template wie DNA,<sup>[182, 225, 347]</sup> Viren,<sup>[299d,e, 348]</sup> Antikörper,<sup>[38]</sup> S-Layer (bakterielle Oberflächenschichten),<sup>[112, 349]</sup> Proteinkäfige,<sup>[130]</sup> bakterielle Rhabdosomen<sup>[350]</sup> und Mikrotubuli<sup>[351]</sup> wurden zur Keimbildung, Abscheidung und Aggregation von anorganischen Mikro- und Nanostrukturen eingesetzt. Neben den Mikrotubuli kennt man noch eine Reihe weiterer polymorpher Tubulinaggregate wie Schichten, Makrotubuli und S-Bänder.<sup>[352]</sup>

Biomoleküle haben ähnliche Abmessungen wie die interessierenden Nanoobjekte, sodass Template biologischen Ursprungs als „Fabriken“ für die Produktion von nanoskopischen „Gussformen“ fungieren können. Die Vermehrung von Zellen, die Replikation der DNA, die Synthese von Proteinen

und die Assoziation von Protein-Monomeren zu Schichten, Röhren oder Bändern sind geeignete biologische Prozesse für die Hochdurchsatz-Synthese von Templaten aus Biomaterialien. Die Methoden der Gentechnik zur Manipulation von Proteinen und die chemischen Methoden zur De-novo-Synthese von Proteinen mit synthetischen Aminosäuren oder von DNA mit synthetischen Nucleotiden liefern uns eine breitgefächerte Auswahl von Verfahren zur maßgeschneiderten Erzeugung von Templaten für die gewünschten Nanostrukturen. Obwohl sich diese Forschungen noch in den Anfängen befinden, liegen schon substantielle Ergebnisse vor, die aufregende Entwicklungen erwarten lassen.

## 8.1 Proteinbasierte Nanoschaltkreise

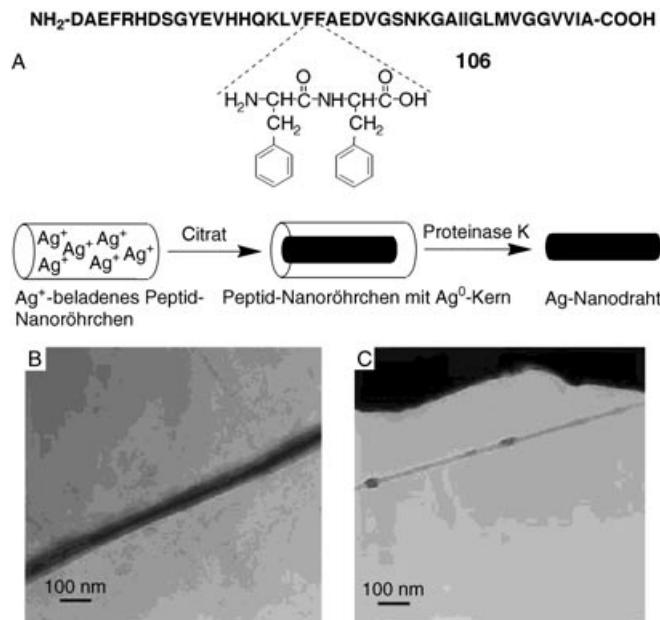
Natürliche Proteinstrukturen wie Mikrotubuli<sup>[351]</sup> wurden als Template für die gezielte Abscheidung von Metall-Nanopartikeln verwendet. Mikrotubuli sind zylindrische Proteine, die aus definiert angeordneten  $\alpha$ , $\beta$ -heterodimeren Tubulin-Untereinheiten bestehen. Die Länge der Tubulin-Dimere beträgt etwa 8 nm bei einem Durchmesser von 4 bis 5 nm. Je nach Bedingungen lagern sich *in vitro* dreizehn oder vierzehn Protofilamente fast parallel aneinander und bilden Hohlzylinder mit einem äußeren Durchmesser von 25 nm und einer Länge von mehreren Mikrometern. Diese Aggregate dienen als biologische Template zur Erzeugung von Metall-Nanodrähten durch Ablagerung und katalytische Verlängerung von Nanopartikeln (Abbildung 46).<sup>[353]</sup>



**Abbildung 46.** TEM-Aufnahme der Oberfläche eines Mikrotubulus mit Platin-Nanopartikel-Aggregaten; zu erkennen ist eine quasi-kontinuierliche Bedeckung. (Mit Genehmigung aus Lit. [353].)

Viele Proteine, z. B. Ferritin,<sup>[128]</sup> umschließen definierte Kanäle oder Hohlräume oder bilden porenhaltige Auflagen auf Oberflächen wie S-Layern.<sup>[354]</sup> Diese kanal- oder porenhaltigen Materialien können als Template für die Erzeugung von Nanostrukturen, Nanostäbchen oder sogar Schaltkreisen dienen. Ferritin z. B. besteht aus einer hohlen Polypeptid-Hülle mit 8 nm Innen- und 12 nm Außendurchmesser und einem 5 nm großen Eisenoxidkern ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>[128]</sup> Durch Reduktion kann das Eisenoxid aus dem Kern ausgewaschen werden. Den Apoferritin-Kanal kann man anschließend mit

anorganischen Oxiden, Sulfiden und Seleniden (z.B. MnO, FeS, CdS, CdSe) unter Bildung von Nanostäbchen remineralisieren.<sup>[129,130]</sup> Aromatische kurzkettige Peptide (wie das Diphenylalanin- $\beta$ -amyloid **106**, das bei der Alzheimer-Krankheit auftritt) bilden gut geordnete Nanoröhrchen, die als Template für Silber-Nanodrähte geeignet sind (Abbildung 47 A).<sup>[355]</sup> Die Peptid-Nanoröhrchen werden mit Ag<sup>+</sup>-



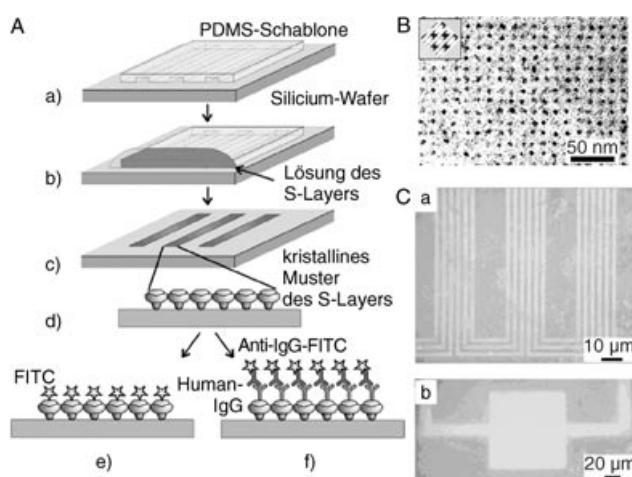
**Abbildung 47.** A) Herstellung eines Silber-Nanodrahtes im Inneren einer Röhre aus kurzkettigen Diphenylalanin-Peptiden. B) TEM-Abbildung des Peptid-Templats, das mit einem metallischen Silber-Nanodraht gefüllt ist. C) TEM-Abbildung des Silber-Nanodrahtes nach Entfernen des Peptid-Templats mit Proteinase K. (Mit Genehmigung aus Lit. [355].)

Ionen beladen, die anschließend mit Citrat zu metallischen Silber-Nanodrähten reduziert werden (Abbildung 47B). Zum Schluss wird die Peptidhülle mit Proteinase K enzymatisch entfernt, sodass mikrometerlange Silber-Nanodrähte von etwa 20 nm Durchmesser zurückbleiben (Abbildung 47C). Bei Verwendung von D-Phenylalanin-Peptidfibrillen, die gegen Proteinase K resistent sind, bleibt die Peptidhülle um die Silber-Nanodrähte erhalten. Verschiedene Arten von Nanoröhrchen aus Biomaterialien wurden genutzt, um Metall-Nanodrähte zu erzeugen, die durch eine „Haut“ von Biomolekülen isoliert sind. So wurden Metall-Lipid-Nanodrähte erhalten (Gold-Nanopartikel von 3 bis 10 nm in einem Glycolipid-Hohlzylinder), wenn der innere Kanal des Lipid-Nanoröhrchens mit einer wässrigen  $\text{HAuCl}_4$ -Lösung durch Kapillarkräfte gefüllt und der Goldkomplex anschließend photochemisch reduziert wurde.<sup>[356]</sup>

Kristalline Proteinschichten auf bakteriellen Zellwänden (S-Layer)<sup>[354]</sup> haben ein breites Anwendungspotential. Folgende Eigenschaften ragen heraus: 1) Die Poren, die die S-Layer durchziehen, haben identische Größe und Morphologie und liegen im Größenbereich von Ultrafiltrationsmembranen. 2) Funktionelle Gruppen an der Oberfläche und in

den Poren sind in genau definierten Positionen und Orientierungen aufgereiht und auf sehr präzise Weise für chemische Modifikationen und die Bindung funktioneller Moleküle zugänglich. 3) Isolierte S-Layer-Untereinheiten können als geschlossene Monoschichten auf festen Trägern rekristallisiert (z.B. auf Metallen, Polymeren, Silicium-Wafers). 4) Durch gentechnische Methoden können funktionelle Domänen in die S-Layer-Proteine eingeführt werden.

S-Layer-Techniken bieten daher vielfältige Ansätze für die Biotechnologie, Biomimetika, molekulare Nanotechnologie, Nanostrukturierung von Oberflächen und Bildung geordneter Arrays von Metalclustern oder Nanopartikeln, wie sie in der Nanoelektronik benötigt werden. S-Layer wurden durch Bestrahlung mit Tief-UV-Licht, durch Anwendung weicher Lithographie-Techniken<sup>[357]</sup> oder durch Mikromolding in Kapillaren (MIMIC, micromolding in capillaries) strukturiert (Abbildung 48 A).<sup>[354c]</sup> So präparierte S-Layer

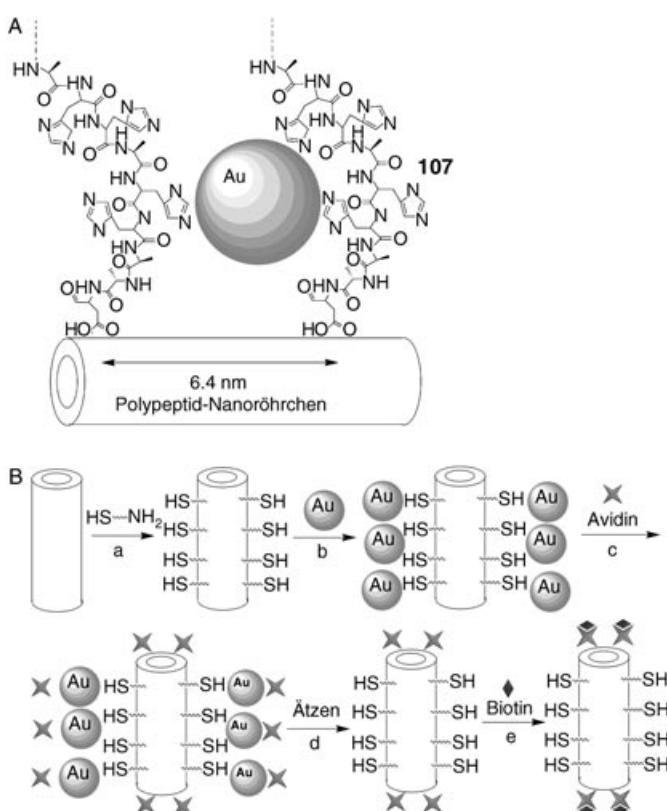


**Abbildung 48.** Fertigung eines Nanoschaltkreises unter Verwendung spezifischer biologischer Wechselwirkungen auf Oberflächen: A) Schematische Erzeugung von S-Layer-Proteinmustern durch MIMIC: a) Mit einer „Gussform“ aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) werden Kanäle auf einem Silicium-Wafer erzeugt. b) Die Kanäle werden durch Kapillarkräfte mit einer Proteinlösung gefüllt. c-d) Nach Entfernen der Schablone bleiben kristalline Proteimuster auf der Trägeroberfläche zurück. e) Die S-Layer-Muster werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert oder f) als Substrate für eine Antikörper-Antigen-Immunreaktion verwendet. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines nanoskaligen Gold-Übergitters auf einem S-Layer mit quadratischer Gittersymmetrie. Der Einschub zeigt eine AFM-Aufnahme des nativen S-Layers im gleichen Maßstab. C) Fluoreszenzaufnahmen eines S-Layers, dessen Muster mit einer „schaltkreisähnlichen“ PDMS-Form erzeugt wurde. a) und b) zeigen das gleiche Muster in unterschiedlichen Größen. (Teile A und C aus Lit. [354c], Teil B aus Lit. [354e] mit Genehmigung.)

funktionierten als immobilisierende Template für funktionale Biomaterialien oder für die Bildung geordneter Arrays aus Nanopartikeln, die für die Nanoelektronik und nichtlineare Optik von Bedeutung sind. 4–5 nm große monodisperse Gold-Partikel wurden in der Porenregion der S-Layer erzeugt, sodass die Abstände zwischen den Partikeln des Gold-Übergitters am S-Layer-Gerüst ausgerichtet waren (Abbildung 48B). Durch Strukturierung der S-Layer mit der

MIMIC-Technik wurden Nanoschaltkreise hoher Komplexität hergestellt. Nach der Rekristallisation des S-Layers und der Entfernung der „Gussform“ wurde humanes IgG kovalent an aktive Carboxylatgruppen auf der Oberfläche des S-Layers gebunden. Nach Behandlung mit Fluoresceinisothiocyanat und Anti-hIgG wurde das Muster des modifizierten S-Layers mit Fluoreszenz-Imaging visualisiert (Abbildung 48C).

Alternativ kann die Metallisierung auch an der Außenseite peptidisches Template durchgeführt werden.<sup>[358]</sup> Bis( $N$ - $\alpha$ -amidoglycylglycin)-1,7-heptandicarboxylat-Moleküle wurden zunächst durch Selbstorganisation (über intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Amid- und Carboxylatgruppen) zu Nanoröhren zusammengefügt.<sup>[359]</sup> Das sequenzierte histidinreiche Peptid **107** wurde an die Peptid-Nanoröhren konjugiert und koordinierte selektiv Gold-Ionen (aus  $[\text{ClAuPMMe}_3]$ ), die als Keime für Gold-Nanokristalle dienten (Abbildung 49 A). Nach Reduktion der Gold-



**Abbildung 49.** A) Struktur des Gold-Nanopartikel-Peptid-Komplexes auf dem histidinreichen Polypeptid-Nanoröhrchen als Träger. B) An den Enden verknüpfte Peptid-Nanoröhren durch Immobilisierung von Streptavidin an den Enden der Au-maskierten Röhren.

Ionen wachsen monodisperse Gold-Nanokristalle auf den Nanoröhren. Konformation und Ladungsverteilung des histidinreichen Peptids hängen vom pH-Wert ab, und die Goldionen-Konzentration in der Mutterlauge bestimmt Größe und Packungsdichte der Gold-Nanokristalle. Der Durchmesser der Gold-Nanokristalle war durch den Platz zwischen benachbarten histidinreichen Peptiden auf den Nanoröhren begrenzt.

Diese einfache Biomineralisationsmethode zur Herstellung von metallisierten Nanoröhrchen lässt sich auf viele Metalle und Halbleiter übertragen, wenn man Peptide mit sequenzspezifischen Gruppen für die Koordination der Metallionen verwendet. So wurde ein histidinreiches Epitop AHHAHAAAD (HRE) aus HRP II als Peptid für die wässrige Synthese einer Reihe von Metallsulfid-, Metalloxid- und reinen Metalclustern eingesetzt.<sup>[360]</sup> Ein Screening der Cluster gegen einen monoklonalen Antikörper gegen HRP II zeigte, dass eine molekulare Erkennung zwischen dem Liganden-Epitop entlang der Oberfläche des Nanoclusters und einigen peptidverkapselten Nanoclustern vorliegt. Silber-Nanokristalle mit kontrollierter Form wurden auf einem Peptidröhrchen gezüchtet, das mit dem sequenzierten Peptid Asn-Pro-Ser-Ser-Leu-Phe-Arg-Tyr-Leu-Pro-Ser-Asp bedeckt war. Das Peptid dirigiert das Wachstum des Silber-Nanokristalls an die (111)-Fläche.<sup>[358c]</sup> Die Biomineralisation von Ag<sup>+</sup>-Ionen auf Polypeptid-Nanoröhrchen ergab isotrope hexagonale beschichtete Ag-Nanokristalle.

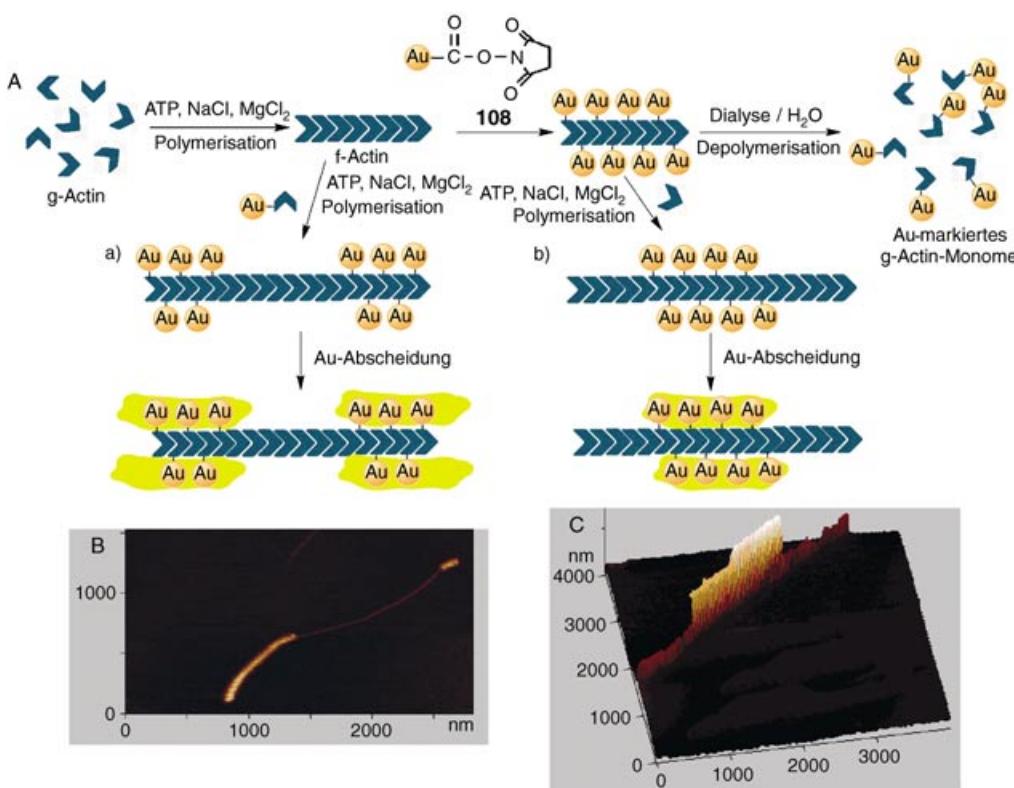
Peptid-Nanoröhrchen<sup>[359]</sup> enthalten an ihrer Oberfläche freie Amid- und Carboxylgruppen als Bindestellen für biologische Moleküle und Metallionen, woraus sich ein Ansatzpunkt für die Synthese funktionaler Nanoröhrchen ergibt. Auch Thiolfunktionen als Ankergruppen für Gold-Nanopartikel können in das Protein-Rückgrat eingeführt werden. Diese Bindestellen sind über die gesamte Oberfläche des Nanoröhrchens verstreut, sodass es zu einer gleichmäßigen Verteilung modifizierender Einheiten über die gesamte Länge kommt. In einem Experiment wurden Amyloid-Proteinfasern (10 nm) durch Selbstorganisation der Priondeterminante aus *Saccharomyces cerevisiae* (N-Terminus und Mittelregion (NM) von Sup35p) erzeugt. Diese war gentechnisch so modifiziert, dass Thiolgruppen an der Proteinoberfläche eingeführt wurden. Durch Koordination von Gold-Nanopartikeln an der aktivierte Oberfläche der Proteinfasern und nachfolgende katalytische Abscheidung von Silber auf den Gold-Nanopartikeln wurden mikrometerlange Drähte mit einem Durchmesser von ca. 100 nm und guter elektrischer Leitfähigkeit erhalten.<sup>[361]</sup>

Eine neue Methode wurde entwickelt, mit der Peptid-Nanoröhrchen spezifisch an den Enden funktionalisiert werden, ohne die Seitenwände zu modifizieren.<sup>[362]</sup> Zunächst werden die Seitenwände der Nanoröhrchen mit Thiolgruppen versehen, indem man die Carboxylgruppen über Carbodiimid an 2-Mercaptoethylamin kuppelt (Abbildung 49B, Schritt a). Anschließend wird mit Gold-Nanopartikeln komplexiert, sodass die Seitenwände maskiert sind (Abbildung 49B, Schritt b). Die Lösung der Nanoröhrchen wird mit Sulforhodamin-markiertem Avidin inkubiert (Abbildung 49B, Schritt c), wobei Avidin an den Enden (ohne Gold-Nanopartikel) und den Seitenwänden (mit Gold-Nanopartikeln) der Nanoröhrchen immobilisiert wird. Die Gold-Nanopartikel werden chemisch geätzt (Abbildung 49B, Schritt d) und das Avidin dadurch von den Seitenwänden der Nanoröhrchen entfernt, während es an den Enden der Nanoröhrchen gebunden bleibt (Avidin wird durch den Ätzvorgang nicht denaturiert). Die Enden der Nanoröhrchen können nun die komplementäre Biotin-Einheit erkennen und immobilisieren (Abbildung 49B, Schritt e). Mit diesem Verfahren gelingt es,

einzelne Nanoröhrchen an gewünschte Stellen auf komplementären und strukturierten Proteinoberflächen zu dirigieren. Die spezifische Schwanz-Schwanz-Kupplung von Peptid-Nanoröhrchen (z.B. über Biotin-Avidin-Wechselwirkungen) kann zur Herstellung eines Templaats und bei weiterer Metalloisierung zur Erzeugung eines leitfähigen Nanoschaltkreises genutzt werden.

Durch spezifische Anordnung von Proteinuntereinheiten zu Templaatsen kann ein bestimmtes Muster für den nachher produzierten Metall-Nanodraht festgelegt werden. Ein f-Actin-Filament bindet spezifisch das biomolekulare Motorprotein Myosin, das einen mobilen Komplex mit dem Filament bildet und entlang des Filaments eine Translationsbewegung ausführt (angetrieben durch ATP-Hydrolyse).<sup>[363]</sup> Das f-Actin-Filament entsteht durch reversible Assoziation von g-Actin-Untereinheiten in Gegenwart von ATP, Mg<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup>-Ionen. Kürzlich wurde über die Bildung von Gold-Nanodrähten mit dem f-Actin-Filament als Templat berichtet.<sup>[364]</sup> Das f-Actin-Filament wurde mit Gold-Nanopartikeln (1.4 nm Durchmesser, funktionalisiert mit einzelnen N-Hydroxysuccinimidylester-Gruppen (**108**)) kovalent modifiziert. Nach Entfernung von ATP, Mg<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ionen durch Dialyse zerfiel das Filament wieder, und mit Gold-Nanopartikeln beladene g-Actin-Untereinheiten wurden zurückgebildet. Die Kupplung der Gold-Nanopartikel an die polymere Form des Actins und die anschließende Dissoziation waren notwendig, um Bindestellen des Actinmonomers zu schützen. Die mit Gold-Nanopartikeln beladenen g-Actin-Untereinheiten wurden dann als vielseitige Bausteine für die Mg<sup>2+</sup>-Na<sup>+</sup>-ATP-induzierte Polymerisation der funktionalisierten Monomere zu Gold-Nanopartikel-beladenen Filamenten nach einem vorgegebenen Muster genutzt (Abbildung 50A). Die stromlose, katalytische Goldabscheidung auf dem Gold-Nanopartikel-beladenen f-Actin-Filament ergab abhängig von der Zeitdauer der Goldabscheidung 1–3 µm lange Golddrähte von 80–150 nm Dicke. Durch sequenzielle Polymerisation des nackten Actin-Filaments auf dem vorgeformten Gold-Nanopartikel-Actin-Draht und anschließende stromlose katalytische Abscheidung von Gold auf den Gold-Nanopartikeln wurden strukturierte Actin/Gold-Nanodraht/Actin-Filamente erzeugt (Abbildung 50C). In einem vergleichbaren Ansatz wurden Filamente der Zusammensetzung Gold-Nanodraht/Actin/Gold-Nanodraht erhalten (Abbildung 50B). Hier zeigt sich eine Möglichkeit auf, die beiden Gold-Drähte als Kontakte für die Abscheidung eines Halbleiter-Nanoröhrchens zu verwenden und so ein Transistor-Element herzustellen. Das auf dem Actin-Filament abgeschiedene Gold ist metallisch leitfähig und weist einen ähnlichen Widerstand wie metallisches Gold auf.

Die spezifischen bindenden Wechselwirkungen von Proteinen wie Streptavidin können zur spezifischen Vernetzung oder Verbrückung bei der Fertigung von Nanopartikel-Schaltkreisen verwendet werden. SAv ist ein homotetrameres Protein mit vier hochaffinen Bindungsstellen für Biotin ( $K_a > 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ). Durch Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln<sup>[126]</sup> (oder von Ferritin-Partikeln<sup>[132]</sup>) mit Biotin und Umsetzung mit SAv sind dreidimensionale Nanopartikel-Aggregate zugänglich. Ähnliche Aggregate wurden auch mithilfe komplementärer Antigen-Antikörper-Bindungen er-



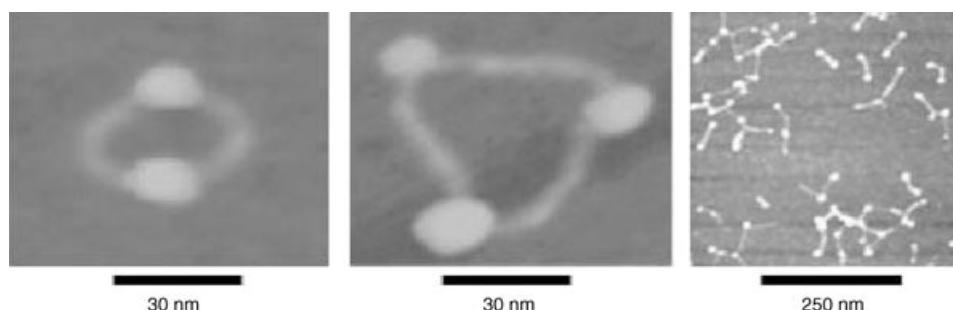
**Abbildung 50.** A) Herstellung von strukturierten Gold-Nanodrähten mit dem Actin-Verfahren. Links: Golddraht/Actin/Golddraht-Filament; rechts: Actin/Golddraht/Actin-Filament. B) AFM-Aufnahme des Actin/Golddraht/Actin-Filaments. C) AFM-Aufnahme des Golddraht/Actin/Golddraht-Filaments.

zeugt.<sup>[38,118]</sup> Ein einfaches geordnetes Antigen-Antikörper-Metall-Nanopartikel-Aggregat wurde durch Vernetzung von Gold-Nanopartikeln (12 nm) erhalten, die mit dem Anti-Dinitrophenyl-Antikörper

(DNP-Ab) funktionalisiert waren. Hierzu wurde ein bifunktionelles Bis(dinitrophenyl)-Antigen (Bis(*N*-2,4-dinitrophenyloctamethylendiamin)) eingesetzt, das die antikörperbeladenen Gold-Partikel vernetzt. Schaltkreise höherer Komplexität wurden durch die Anwendung unterschiedlicher Protein-Rezeptoren und Metalle hergestellt.<sup>[38,118]</sup> Die Bildung eines Nanopartikel-Aggregats aus zwei unterschiedlichen Nanopartikeln gelang durch Funktionalisierung der Nanopartikel mit entweder Streptavidin oder

DNA-Ab. Die oligomeren Aggregate aus bioorganischen Streptavidin-Partikeln und bisbiotinylierten ds-DNA-Spacern fungierten als Modellsystem zur Untersuchung der Eigenschaften komplexer Partikel-Netzwerke. SAV fungiert als 5-nm-Modellpartikel, das eine begrenzte Zahl von Verknüpfungen mit anderen Partikeln innerhalb des Netzwerkes eingehen kann. Ein, zwei, drei oder vier biotinylierte DNA-Fragmente wurden mit SAV durch die hochaffine SAV-Biotin-

Wechselwirkung konjugiert. Die Bildung von Dimeren, Tri- und Oligomeren wurde mit Rasterkraftmikroskopie (SFM) sichtbar gemacht (Abbildung 51).<sup>[21a]</sup>



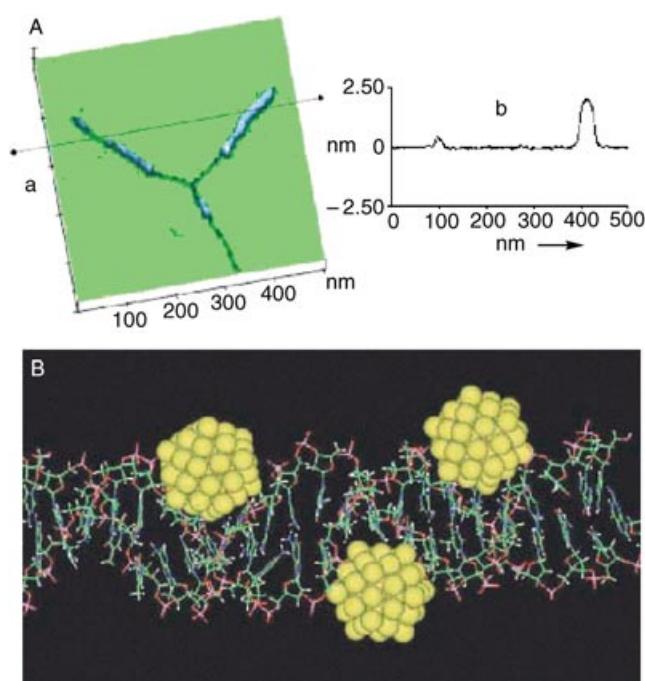
**Abbildung 51.** SFM-Aufnahmen von Nanopartikel-Netzwerken, die mit ds-DNA als Spacern hergestellt wurden. Die ds-DNA-Fragmente enthalten zwei Biotin-Bindestellen an den beiden 5'-Enden der ds-DNA, die eine Vernetzung des biotinbindenden Proteins Streptavidin bewirken. (Mit Genehmigung aus Lit. [21a].)

## 8.2. DNA als funktionales Templat für Nanoschaltkreise

Unter den vielfältigen Biomaterialien ist insbesondere die DNA als Templatmaterial für die Konstruktion von Nanoschaltkreisen interessant. Hierfür gibt es Gründe: 1) Es existieren ausgereifte Methoden für die Synthese von Nucleinsäuren mit definierter Länge, Basensequenz und Form sowie für die Selbstorganisation komplexer Strukturen.<sup>[365]</sup>

Variable DNA-Formen können als vielseitige vorgefertigte Template für Nanoschaltkreise fungieren, und festgelegte Basensequenzen lassen sich als spezifisch adressierbare Domänen für die Bindung der Nanodraht-Komponenten nutzen. Damit könnten strukturierte Nanoschaltkreise zugänglich sein. 2) Die Natur stellt uns eine große Auswahl an Biokatalysatoren, d.h. Enzymen, für die Manipulation der DNA zur Verfügung. Diese können als Werkzeuge zur gezielten Formgebung der DNA und letztlich zur Erzeugung von Nanoschaltkreisen eingesetzt werden. Ligasen verknüpfen Nucleinsäurestücke, Endonukleasen schneiden Nucleinsäuren an spezifischen Positionen, die Telomerase verlängert einsträngige Nucleinsäuren um Telomereinheiten und die Polymerase repliziert DNA, um nur einige Beispiele zu nennen. Solche Biokatalysatoren können als „Cut-and-Paste“-Werkzeuge zur Modifizierung von DNA-Matrizen angesehen werden. Speziell der Replikations-Katalysator birgt eine Perspektive für das Design künftiger „Nanodraht-Fabriken“. 3) Durch Interkalation molekularer Komponenten in die DNA und durch Bindung kationischer Spezies, z.B. Metallionen, an die Phosphatgruppen der Nucleinsäuren werden chemisch aktive funktionale Komplexe erhalten. Solche verknüpften molekularen Komponenten könnten als Vorstufen für die Bildung von Nanodrähten fungieren. Interkalatoren, die selektiv an bestimmte Basenpaare binden, können als dirigierende Einheiten für die selektive Anlagerung von Substraten auf Nucleinsäuren dienen. Eine solche gesteuerte Aggregation von reaktiven Stellen kann zu strukturierten Nanoschaltkreisen führen. 4) Unterschiedliche Proteine binden spezifisch an bestimmte Nucleinsäure-Sequenzen, was den adressierbaren Aufbau von komplexen DNA-Protein-Strukturen ermöglicht. Diese können entweder zusätzlich zur DNA als adressierbare Domänen für die selektive Anlagerung von Metallen oder Halbleitern eingesetzt werden oder aber, um die DNA temporär gegen Metallanlagerung zu schützen. Solche isolierten Domänen können dann für die Anlagerung anderer Metalle oder Halbleiter genutzt werden, um so komplexe Strukturen mit definierten Mustern herzustellen.

Die Wechselwirkung von Metall-Nanopartikeln mit DNA ist ein gut untersuchtes Phänomen,<sup>[179,181,347,366]</sup> und der mikroskopische Mechanismus der Komplexierung von Metall-Nanopartikeln durch DNA-Matrizen ist bekannt.<sup>[227]</sup> Gewöhnlich wird einzel- oder doppelsträngige DNA mit solchen Metallpartikeln beladen, die sich mit TEM oder AFM leicht abbilden lassen.<sup>[367]</sup> Bei der Wechselwirkung von phosphanstabilisierten Gold-Nanopartikeln ( $\text{Au}_{55}(\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{H})_{12}\text{Cl}_6$ ) mit DNA konnte die Bildung goldbeladener, drahtähnlicher DNA-Strukturen mit AFM visualisiert werden (Abbildung 52 A).<sup>[367a]</sup> Laut Molecular-Modeling-Studien der Wechselwirkungen zwischen DNA und  $\text{Au}_{55}$ - sowie  $\text{Au}_{13}$ -Nanopartikeln passen sich die Nanopartikel in die Furchen der DNA ein (Abbildung 52B). Einige der Phosphanliganden werden durch Phosphatgruppen der DNA substituiert, sodass eine starke Bindung zwischen den Gold-Nanopartikeln und der DNA resultiert. Gold-Nanopartikel, die mit anderen Phosphanliganden beschichtet waren (z.B. Tris(hydroxymethyl)phosphan),<sup>[368]</sup> wurden ebenfalls zur Beladung von DNA-Matrizen verwendet, wobei sich Nanodrähte bildeten.



**Abbildung 52.** A) AFM-Bild von  $\lambda$ -DNA (a), die teilweise mit  $\text{Au}_{55}$ -Clustern beladen ist, mit zugehörigem Höhenprofil (b). B) Energieminimierte Struktur der DNA mit  $\text{Au}_{55}$ -Clustern, die entlang dem Phosphat-Rückgrat in der großen Furche der DNA angeordnet sind. (Mit Genehmigung aus Lit. [367a].)

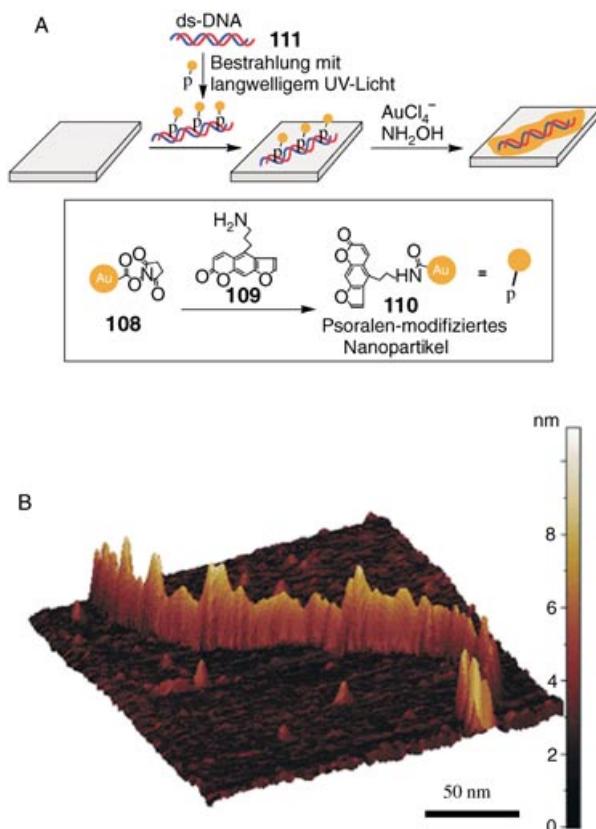
te bildeten. Eindimensionale Ketten von Gold-Nanopartikeln (4.4 nm), die mit kationischen Trimethyl(mercaptoundecyl)ammonium-Monoschichten überzogen waren, wurden elektrostatisch entlang den DNA-Molekülen unter sorgfältiger Kontrolle der relativen molaren Mengen an Nanopartikeln und DNA-Basenpaaren in Lösung angeordnet.<sup>[367b]</sup> TEM-Bilder von eingetrockneten Lösungsmitteltropfen mit einem molaren Verhältnis DNA-Basenpaare/beschichtete Nanopartikel von etwa 20:1 zeigen mehrere Mikrometer lange Ketten von Au-Nanopartikeln, die fast die Kanten der kationischen Monoschichten entlang der anionischen DNA-Matrizen berühren.

Ausgehend von der Idee, die DNA als Matrize für die Erzeugung von Nanoschaltkreisen einzusetzen, wurden Experimente zur gezielten Anordnung DNA-vernetzter Halbleiter-Nanopartikel und DNA-basierter Metall-Nanopartikel-Nanodrähte auf Oberflächen durchgeführt. Da die Nanopartikel „auf Lücke“ an den DNA-Matrizen koordiniert sind, stellt sich die Frage nach der elektrischen Leitfähigkeit der DNA-Matrize selbst. Der Elektronentransport durch die DNA ist eines der am intensivsten diskutierten Phänomene der letzten Jahre<sup>[224,369]</sup> und nach wie vor Gegenstand theoretischer<sup>[370]</sup> und experimenteller Studien.<sup>[371]</sup> Trotz einiger optimistischer Befunde, die auf gute Leitungseigenschaften des gesamten DNA-Rückgrats hinweisen,<sup>[372]</sup> wird in den meisten Arbeiten über schlecht leitende<sup>[373]</sup> oder isolierende<sup>[374]</sup> Eigenschaften der DNA berichtet. Um die Leitfähigkeit der DNA zu untersuchen, wurde eine doppelsträngige DNA zwischen zwei Gold-Nanopartikeln analysiert. Hierzu wurden thiolderivatisierte Oligonukleotide an Gold-Nano-

partikel gekuppelt und diese mit DNA-Ketten aus doppelsträngigen Helices unterschiedlicher Länge (24, 48 oder 72 Basenpaare) verbrückt. Die Helices waren an beiden Enden mit einzelsträngigen Domänen terminiert, die komplementär zu den an den Gold-Nanopartikeln gebundenen Oligonukleotiden waren.<sup>[69b]</sup> Die mit ds-DNA-Spacern verbrückten Gold-Nanopartikel-Aggregate wurden auf einem elektrisch nichtleitenden festen Träger abgeschieden und ihre Leitfähigkeit nach der Vier-Punkt-Methode bestimmt. Überraschenderweise lagen die Leitfähigkeiten der Aggregate mit allen drei DNA-Linkern im Bereich zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$  bei Raumtemperatur, und alle zeigten ein ähnliches temperaturabhängiges Verhalten. Die Ähnlichkeit der elektrischen Eigenschaften der Aggregate wird darauf zurückgeführt, dass die DNA-Spacer komprimiert werden und daher kleine und vergleichbare Abstände zwischen den Gold-Nanopartikeln resultieren. Dementsprechend spiegeln die gemessenen Leitfähigkeitsparameter die elektrischen Eigenschaften von metallischen Nanopartikeln wider, die „auf Lücke“ angeordnet sind.

Die Leitfähigkeit metallischer Nanopartikel-Aggregate auf einer DNA-Matrize kann durch chemische Abscheidung eines anderen Metalls verstärkt werden (z.B. Ag-Abscheidung auf einem Gold-Aggregat). Das abgeschiedene Metall füllt die Lücken auf und bildet einen kontinuierlichen leitfähigen Nanodraht. Das allgemeine Konzept der DNA-Metallisierung basiert auf der Konjugatbildung von Metall-Komplexen oder metallischen Nanopartikeln mit der DNA-Matrize und dem nachfolgenden Wachstum der Metallkeime mit dem gleichen oder einem anderen Metall durch chemische Reduktion des entsprechenden Metallions durch starke Reduktionsmittel wie Dimethylaminoboran, Hydrochinon oder Natriumborhydrid.<sup>[224]</sup> Wenn Metallionen oder Metallkomplexe (z.B. Silber- oder Kupferionen,<sup>[375]</sup> Platin- oder Palladiumkomplexe<sup>[227]</sup>) elektrostatisch mit einer DNA-Matrize konjugiert und dann als aktive Zentren für die Metallisierung der DNA verwendet werden, läuft der Prozess der kontinuierlichen Nanodraht-Bildung über mehrere Stunden bis zu einem Tag ab.<sup>[181,347]</sup> Der Vorgang wird erheblich verkürzt, wenn man vorgefertigte Metall-Nanopartikel einsetzt.<sup>[368]</sup> Für die Bindung der primären Metallcluster an die DNA-Matrize stehen mehrere Methoden zur Verfügung: 1) Reduktion von Metallionen an den Phosphatgruppen zu metallischen Keimen, die mit der DNA verbunden sind. 2) Verwendung von Metall- oder Halbleiter-Nanopartikeln, die mit interkalierbaren Gruppen verbunden sind. Die Interkalation der molekularen Komponenten in die doppelsträngige DNA führt zur Assoziation des Nanopartikels an die DNA-Matrize. 3) Synthese von DNA mit funktionalen Seitengruppen, die die kovalente Anbindung von Metall- oder Halbleiter-Nanopartikeln an die DNA ermöglichen. 4) Synthese von einzelsträngiger DNA, die konstante repetitive Einheiten enthält (z.B. Telomere), und Hybridisierung mit Metall- oder Halbleiter-Nanopartikeln, die mit kurzen, zu den einzelsträngigen repetitiven DNA-Einheiten komplementären Nucleinsäuren functionalisiert sind.

Abbildung 53 A zeigt das Prinzip der Aggregation von Gold-Nanopartikeln auf der DNA-Matrize unter Anwendung von Gold-Nanopartikeln mit einer interkalierbaren Funkti-



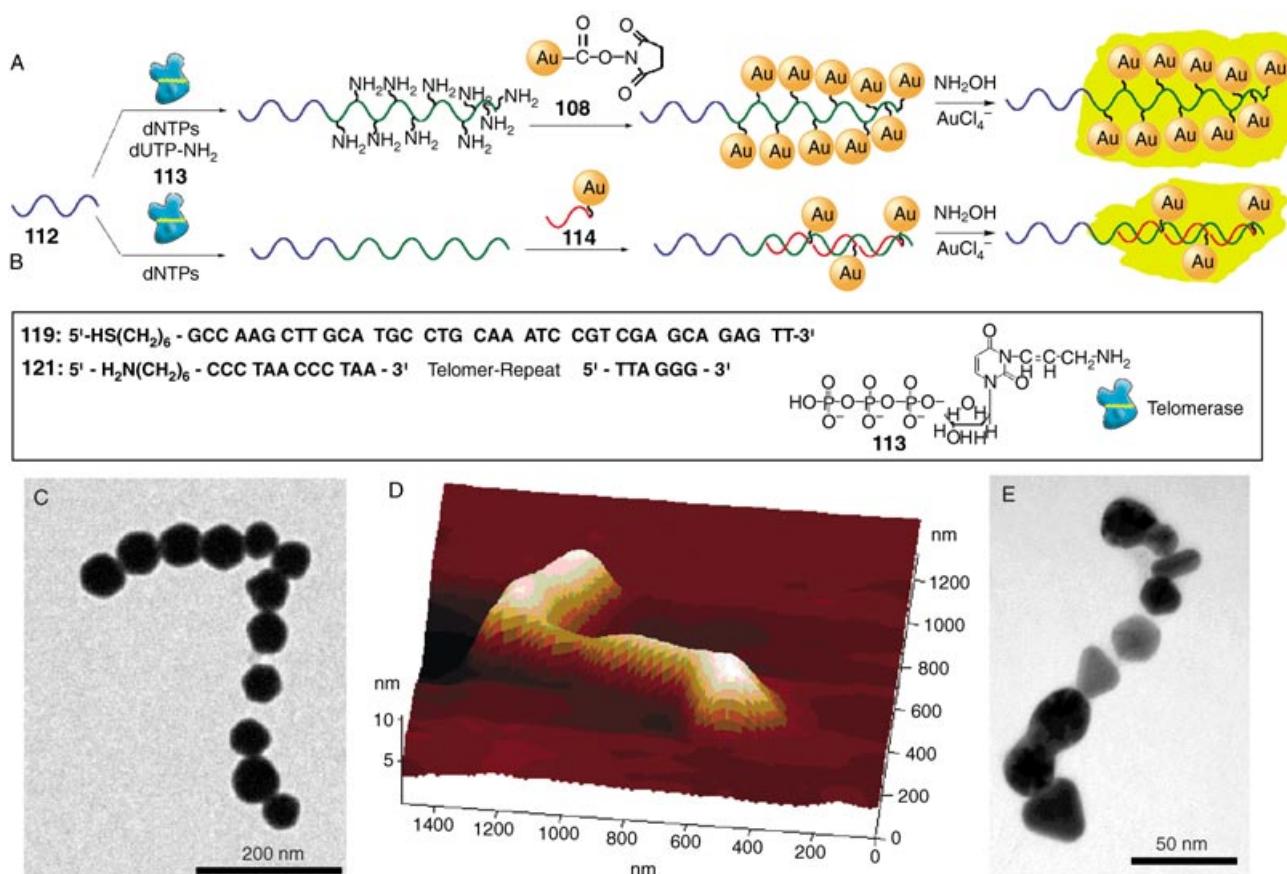
**Abbildung 53.** A) Herstellung eines Gold-Nanopartikel-Drahtes mit einer polyA/polyT-Matrize und Gold-Nanopartikeln, die mit einem interkalierbaren Molekül (Psoralen) modifiziert sind. B) AFM-Aufnahme des Gold-Nanopartikel-Drahtes an der polyA/polyT-Matrize.

on.<sup>[376]</sup> Aminofunktionalisiertes Psoralen (**109**) wurde mit dem  $\text{Au}_{55}$ -Nanocluster **108** (Durchmesser 1.4 nm), der eine einzelne *N*-Hydroxysuccinimid-Estergruppe trägt, zum psoralenfunktionalisierten  $\text{Au}_{55}$ -Nanopartikel **110** umgesetzt. Da Psoralen als spezifischer Interkalator für A-T-Paare wirkt, wurden die funktionalisierten  $\text{Au}_{55}$ -Nanopartikel mit einer pA/pT-ds-DNA **111** umgesetzt. Anschließend wurde das Aggregat mit UV-Licht bestrahlt, um die  $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition zwischen den Psoralengruppen und den Thyminbasen der DNA zu induzieren. Dieser Prozess fixiert die  $\text{Au}_{55}$ -Nanopartikel kovalent an der DNA-Matrize. Abbildung 53 B zeigt das AFM-Bild des erhaltenen, 600–700 nm langen Nanopartikel-Drahtes. Der Durchmesser beträgt 3.5–8 nm und wird durch den Durchmesser der Matrizen-DNA bestimmt. Die Höhe des Drahtes (3–4 nm) lässt darauf schließen, dass die Gold-Nanopartikel an gegenüberliegenden Seiten der doppelsträngigen DNA interkalieren. Das kontinuierliche Erscheinungsbild des Gold-Nanopartikel-Drahtes ist durch die Größe der Raster-AFM-Spitze bedingt; in Wirklichkeit befinden sich die meisten Partikel nicht in engem Kontakt zueinander. Die auf einer DNA-Matrize angeordneten Gold-Nanopartikeln könnten durch stromlose Abscheidungsprozesse vergrößert werden (z.B. durch Reaktion von  $[\text{AuCl}_4]^{2-}$  mit  $\text{NH}_2\text{OH}$ ), bis ein kontinuierlicher, leitfähiger Nanodraht entsteht.

Ein anderer Ansatz zur Erzeugung eines leitfähigen Drahtes entlang einer DNA-Matrize beruht auf der elektrostatischen Assoziation metastabiler Gold-Nanopartikel mit einer DNA-Matrize.<sup>[377]</sup> Die Gold-Nanopartikel waren mit dem kationischen Stabilisator Thiocholin ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ , **54**) modifiziert, der die elektrostatische Assoziation der Nanopartikel mit der negativ geladenen DNA-Matrize bewirkt. So präpariert aggregierte die instabilen Gold-Nanopartikel zu den leitenden Drahtstrukturen. Gold-Kern-Anilin-Hülle-Nanopartikel wurden durch Selbstorganisation auf eine DNA-Matrize aufgebracht, die auf einer Oberfläche ausgestreckt war. Es wurden gut ausgerichtete Aggregate mit weitreichender Ordnung erhalten.<sup>[378]</sup> Die Anilin-Hülle induzierte die notwendige positive Ladung auf die Nanopartikel, sodass diese elektrostatisch an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA-Matrize binden konnten. Lineare Arrays der anilinbeschichteten Gold-Nanopartikel mit Abständen zwischen den Partikeln wurden auf der DNA zu halsbandartigen Nanostrukturen angeordnet. Durch Abscheidung unterschiedlicher Metalle oder Nanopartikel in den Zwischenräumen zwischen den Partikeln lassen sich die elektrischen oder optischen Eigenschaften der linearen Arrays einstellen.

Eine Hochdurchsatz-Synthese von DNA-Matrizen zur Erzeugung metallischer Nanodrähte wurde mit der Telomerase aus HeLa-Tumorzellen entwickelt. Telomere sind Nukleinsäuren aus konstanten repetitiven Einheiten ( $5'$ -TTAGGG- $3'$ ), die die Chromosomen-Enden vor Abbau schützen.<sup>[379]</sup> Ihr schrittweiser Abbau während des normalen Lebenszyklus einer Zelle verursacht bei einer bestimmten Länge ein zelluläres Signal für die Beendigung des Lebenszyklus und der Proliferation.<sup>[380]</sup> In manchen Zellen kann die Ribonucleoprotein-Telomerase akkumuliert werden; dieses Enzym verlängert die Telomeren-Enden um die konstanten repetitiven Einheiten. Dadurch entstehen unsterbliche maligne oder Krebszellen, sodass die Telomerase ein charakteristischer Biomarker für Krebszellen ist.<sup>[381]</sup>

Die konstanten repetitiven Einheiten der Telomere stellen adressierbare Domänen zur Verfügung, die als Matrizen zur Bildung metallischer Nanodrähte genutzt werden können.<sup>[382]</sup> In einem Ansatz wurde der Primer **112** in Gegenwart einer dNTP-Mischung telomerisiert, die auch Aminoallyl-dUTP (**113**) enthielt (Abbildung 54 A). Die entstehenden aminomarkierten Telomere wurden mit Gold-Nanopartikeln (1.4 nm) umgesetzt, die ihrerseits mit je einer einzelnen *N*-Hydroxysuccinimid-Estergruppe (**108**) konju-



**Abbildung 54.** Aufbau von Gold-Nanodrähten an einer Telomer-Matrize: A) kovalente Bindung von Gold-Nanopartikeln an Aminogruppen eines Telomers und anschließende katalytische Vergrößerung der Nanopartikel; die Aminogruppen werden im Telomerisationsschritt in die Telomerstruktur eingebaut. B) Bindung von Oligonukleotid-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln an die komplementären Domänen des Telomers und anschließende katalytische Vergrößerung der Nanopartikel. C, D) TEM- bzw. AFM-Aufnahmen des Gold-Nanodrahtes, der nach dem Verfahren (A) hergestellt wurde. E) TEM-Aufnahme des Gold-Nanodrahtes, der nach dem Verfahren (B) hergestellt wurde. (Mit Genehmigung aus Lit. [382], Copyright American Chemical Society, 2004.)

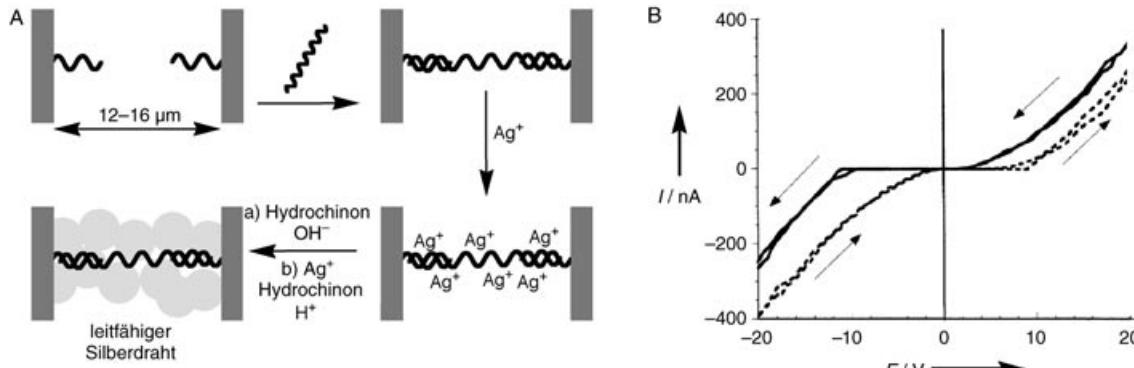
giert waren. Auf diese Weise wurden Telomere erhalten, die mit Gold-Nanopartikeln modifiziert waren. Die mit den Gold-Nanopartikeln beladenen DNA-Drähte wurden dann durch stromlose Goldabscheidung zu einem metallischen Nanodraht vergrößert (Abbildung 54 C,D). In einem anderen Ansatz wurde das Telomer mit komplementären Nucleinsäuresegmenten **114** hybridisiert, die an Gold-Nanopartikel konjugiert waren (Abbildung 54 B). Durch anschließende Vergrößerung des modifizierten DNA-Duplex durch stromlose Goldabscheidung auf den Nanopartikeln entstand ein metallischer Nanodraht (Abbildung 54 E).

Damit eine praktische Anwendung möglich ist, müssen Nanodrähte mit Makro- oder Mikroelektroden elektrisch kontaktiert werden. Mit diesem Ziel wurde ein einzelner Nanodraht auf einer DNA-Matrize hergestellt, der zwei Mikroelektroden verbrückte.<sup>[225,226]</sup> Die beiden Mikroelektroden, die sich in einem Abstand von 12 bis 16 µm gegenüberlagen, wurden mit Oligonucleotiden von zwölf Basen Länge derivatisiert und mit einer 16 µm langen λ-DNA verbrückt (Abbildung 55 A). Die Phosphatgruppen der DNA-Brücke wurden durch Ionenaustausch mit Ag<sup>+</sup>-Ionen beladen, die mit Hydrochinon zu metallischem Silber reduziert wurden. Die kleinen Silberaggregate entlang des DNA-Rückgrates wurden als Katalysatoren für die weitere reduktive Abscheidung von Silber genutzt, wobei ein Silber-Nanodraht gebildet wurde. Diese mikrometergroße Funktionseinheit hatte eine typische Breite von 100 nm und eine granuläre Morphologie (bestimmt durch AFM). Elektrische Messungen ergaben nichtlineare *I-V*-Kurven (Abbildung 55 B). Der Grund für die Nichtlinearität ist gegenwärtig ebensowenig verstanden wie die beobachtete Hysterese. Mögliche Ursachen sind Quanteneffekte des Nanodrahtes oder lokale Defekte, die als Tunnelbarrieren für den Elektronentransport wirken. Ein ähnlicher Ansatz wurde gewählt, um gut leitende Nanodrähte entlang einer DNA-Matrize zu erzeugen, die makroskopisch verzahnte Goldelektroden überbrücken.<sup>[383]</sup> Die DNA-Moleküle wurden zwischen die makroskopischen Goldelektroden gebracht und mit Pd<sup>2+</sup>-Ionen beladen.<sup>[383a]</sup> Die Ionen wurden chemisch zu kontinuierlichen Metalldrähten reduziert, deren Leitfähigkeit nur etwa eine Größenordnung unter der von metallischem Palladium liegt.

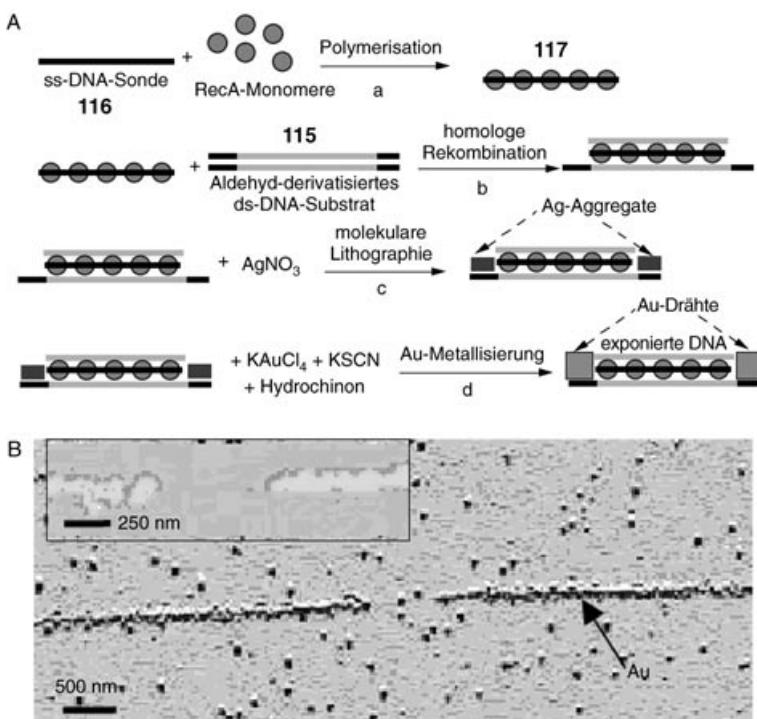
In einem weiteren Experiment wurde die lineare doppelsträngige M13mp18-DNA (ca. 2.5 µm lang) zwischen ver-

zahnten Elektroden (2.0 µm Abstand) vektoriell immobilisiert. Erreicht wurde dies durch unsymmetrisches Modifizieren der Elektrodenoberflächen.<sup>[383b]</sup> Eine Seite der Elektroden wurde selektiv mit Streptavidin überzogen, die andere mit Gold-Nanopartikeln beschichtet. Eine asymmetrische doppelsträngige M13mp18-DNA mit einer 5'-Thiolgruppe am einen Ende und einem 5'-Biotinrest am anderen Ende wurde durch Polymerasekettenreaktion mit zwei unterschiedlichen Primern markiert. Die DNA-Wechselwirkung mit dem Elektrodensystem führt zu einer selektiven Überbrückung der Elektrodenoberflächen durch die Biotin-Streptavidin-Kupplung auf der einen Seite und der Thiol-Adsorption an die Gold-Nanopartikel auf der anderen Seite. Durch weitere Metallisierung der DNA-Brücken könnte ein elektrischer Kontakt zwischen den verzahnten Elektroden hergestellt werden.

Eine funktionierende molekulare Elektronik erfordert weit ausgereiferte Operationen als die bislang beschriebenen, z.B. Methoden zur Bildung komplexerer Geometrien, zur nanoskopischen Strukturbildung von Leiterbahnen und zur molekularen exakten Lokalisierung von Bauelementen. Die Bindung von Proteinen (z.B. RecA) an DNA wurde genutzt, um nanoskalige DNA-basierte Metalldrähte mit nichtleitenden oder halbleitenden Lücken zu strukturieren.<sup>[384]</sup> Der biomolekulare lithographische Prozess, der hierfür angewendet wurde, basiert auf dem Prozess der homologen Rekombination, ausgelöst durch Einwirkung von RecA-Protein auf doppelsträngige DNA-Moleküle. Die Information zur Steuerung des lithographischen Prozesses ist in dem 48502 Basenpaaren langen doppelsträngigen DNA-Substrat **115** und in der einzelsträngigen DNA-Hilfskette **116** aus 2027 Basen hinterlegt. Die RecA-Proteine werden auf der Einzelstrang-Sonde zu einem Nucleoprotein-Filament **117** polymerisiert. Das Filament wird anschließend mit dem ds-DNA-Substrat **115** gemischt (Abbildung 56, Schritte a und b). Die RecA-Polymerisation auf der ss-DNA **116** ist nicht sequenzspezifisch, allerdings ist die Bindungsspezifität des Nucleoproteinfilaments **117** zum ds-DNA-Substrat **115** durch die Sequenz der Sonde und ihre Homologie zum Substratmolekül festgelegt. Anschließend werden Ag<sup>+</sup>-Ionen an den proteinfreien DNA-Domänen des Nucleoproteinfilaments abgelagert und dort zu Silberclustern reduziert, die mit den freien Domänen des DNA-Aggregats konjugiert sind (Abbildung 56 A,



**Abbildung 55.** A) Konstruktion eines Nanodrahtes zwischen zwei Mikroelektroden: Ag<sup>+</sup>-Ionen werden auf einer DNA-Brücke abgeschieden und anschließend chemisch zu einem metallischen Aggregat reduziert. B) *I-V*-Kurven der nach (A) erzeugten Funktionseinheit. (Teil B mit Genehmigung aus Lit. [255].)



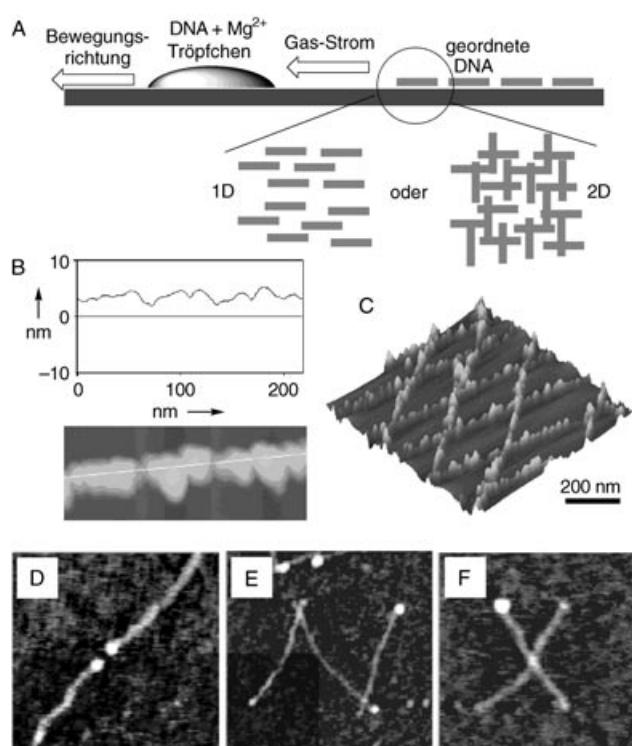
**Abbildung 56.** A) Molekulare Lithographie durch Einwirkung von RecA-Proteinen auf ds-DNA. B) AFM-Aufnahme der strukturierten DNA-Matrize nach Metallisierung mit Gold. Einschub: vergrößerte Aufnahme einer Lücke. Die Höhe der metallisierten Abschnitte beträgt etwa 50 nm. (Mit Genehmigung aus Lit. [384].)

Schritt c). Die ds-DNA **115** ist zuvor mit Aldehydgruppen modifiziert worden, die die chemische Reduktion der elektrostatisch gebundenen  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu Silberclustern vermitteln. Die lokalisierten, maskierenden RecA-Proteine verhindern die Silberabscheidung auf dem Nucleoproteinfilament **117** und halten eine Lücke definierter Sequenzlänge zwischen den silberbeladenen Segmenten des Substratmoleküls frei. Die Silbercluster dienen als Katalysatoren für die folgende stromlose Abscheidung von Gold (Abbildung 56 A, Schritt d); in diesem Abscheidungsschritt wurden zwei kontinuierliche Golddrähte erzeugt, die durch eine definierte Lücke getrennt sind (Abbildung 56 B). Das Nucleoproteinfilament **117** konnte durch Erkennungsreaktionen (Biotin-Streptavidin, Antigen-Antikörper) weiter funktionalisiert werden, wobei komplexe Hybridstrukturen aus Biomaterial und Metall-Nanodrähten oder Halbleiter-Nanodrähten erhalten wurden.

In einem vergleichbaren Ansatz wurde das Nucleoproteinfilament **117** verwendet, um die DNA in erster Linie vor der Aldehyd-Derivatisierung (nicht vor der Metallisierung) zu schützen.<sup>[385]</sup> Die Bindung von RecA an die DNA blockiert deren Reaktion mit Glutaraldehyd, sodass ein Abschnitt auf der DNA underivatisiert bleibt. Nach Entfernen des überschüssigen Glutaraldehyds wurde das RecA-Protein wieder abgelöst und die DNA gereinigt. Die erhaltenen DNA-Moleküle mit definiertem Aldehyd-Muster wurden durch „molekulares Kämmen“ auf einem passivierten Silicium-Wafer ausgerichtet und in einer Silberlösung inkubiert. Das

Aldehyd-Muster diente als „Blaupause“ für die Erzeugung einer isolierenden Lücke in der DNA-Metallisierung.

Über die kombinierte Anwendung von „molekularem Kämmen“ und DNA-Metallisierung zur Herstellung ein- und zweidimensionaler metallischer Nanodraht-Arrays wurde kürzlich berichtet.<sup>[386]</sup> Die Methode umfasst drei Schritte: 1) Mithilfe eines Tropfenfließprozesses wurden parallele DNA-Arrays mit festgelegter Orientierung und Dichte präpariert (Abbildung 57 A). Zur Erzeugung zweidimensionaler Arrays wurde ein zweiter Ausrichtungsprozess in eine andere Richtung vorgenommen. 2)  $\text{Pd}^{2+}$ -Ionen wurden an das negativ geladene Rückgrat der DNA adsorbiert. 3) Die adsorbierten  $\text{Pd}^{2+}$ -Ionen wurden unter Bildung von Palladium-Nanodrähten chemisch reduziert. Entsprechend dem DNA-Muster resultierten parallele oder gekreuzte Netze aus Pd-Nanodrähten auf Glimmer. Die Drähte bestanden aus Nanopartikeln mit beobachteten Durchmessern von etwa 30 nm, der tatsächliche Durchmesser dürfte wegen der begrenzten lateralen Auflösung der AFM-Spitze allerdings kleiner sein. Eine



**Abbildung 57.** A) Strömungsvermitteltes „molekulares Kämmen“ von DNA-Molekülen auf einem Träger. B) AFM-Aufnahme eines Pd-Nanodrähten im Querschnitt; die Höhe der Partikel beträgt etwa 5 nm. C) AFM-Aufnahme eines netzförmigen zweidimensionalen Arrays aus Pd-Nanodrähten, erzeugt durch Metallisierung einer zweidimensional ausgerichteten DNA-Probe. D) Mit einer AFM-Spitze zerschnittener DNA-Strang. E, F) Durch Manipulation mit einer AFM-Spitze erzeugte DNA-Muster. (Teile A–C aus Lit. [386], Teile D–F aus Lit. [387e] mit Genehmigung der American Chemical Society, 2002.)

Querschnittsanalyse der Leiterbahnen (Abbildung 57B) ergab eine Höhe von etwa 5 nm. Eine hoch aufgelöste AFM-Aufnahme (Abbildung 57C) zeigt die wohldefinierte netzförmige Anordnung der Palladium-Nanodrähte.

Diese Fertigungsmethode könnte insbesondere für die parallele Anordnung von nanoskaligen Bauelementen zu funktionalen Netzwerken eingesetzt werden. Die Komplexität der zweidimensionalen DNA-Arrays wurde durch ein molekulares „Cut-and-Move“-Verfahren mit einer AFM-Spitze erhöht.<sup>[387]</sup> Mit der AFM-Spitze wurde ein DNA-Strang an einer bestimmten Stelle aufgeschnitten (Abbildung 57D) und ein Teil der DNA weggeschwitscht. Die verbliebene DNA-Struktur wurde mit der AFM-Spitze zu verschiedenen Mustern angeordnet (Abbildung 57E,F). Durch Metallisierung der erzeugten DNA-Muster könnten verschiedene strukturierte Nanoleiterbahnen mit hoher Komplexität hergestellt werden.

Die variablen und komplexen Möglichkeiten zum Design der DNA bieten Perspektiven für die programmierte Form- und Strukturgebung von DNA-Matrizen.<sup>[385]</sup> Zum Beispiel wurde eine kreuzförmige Struktur mit Bindungsstellen an den Enden aus acht doppelsträngigen DNA-Einheiten synthetisiert. Durch Selbstorganisation dieser Bausteine wurden zweidimensionale Gitter oder Bänder mit einem periodischen quadratischen Muster erhalten.<sup>[388]</sup> Durch Metallisierung der Nanobänder wurden hochleitfähige Silberdrähte erzeugt. Ebenfalls beschrieben wurden DNA-Gitter aus dreifach überkreuzten DNA-Molekülen, die als Matrizen für die Bildung von Gold-Nanopartikel-Arrays verwendet wurden.<sup>[389]</sup>

### 8.3. Virale Matrizen als funktionale Template für Nanoschaltkreise

Es ist bekannt, dass einige Arten stäbchenförmiger Viren wohldefinierte flüssig-kristalline Phasen bilden.<sup>[390]</sup> Dazu passend wurde vor kurzem eine Methode zur Selbstorganisation nanokristalliner Filme beschrieben, die auf der Anwendung von Nanokristall-funktionalisierten M13-Viren beruht.<sup>[391]</sup> Ein Ende des M13-Virus wurde gentechnisch so modifiziert, dass es an ein gewünschtes Halbleitermaterial bindet (speziell II-VI-Halbleiter-Nanopartikel) oder als Keimzentrum wirkt.<sup>[392]</sup> Die mit Halbleiter-Nanokristallen funktionalisierten viralen flüssig-kristallinen Bausteine wurden zu geordneten freitragenden Hybridfilmen vergrößert. Die resultierenden Nanokristalle waren nanoskopisch wie auch mikroskopisch geordnet und zeigten ein periodisches Streifenmuster mit 72 µm großen Domänen.

Zur Ausrichtung von Nanopartikeln (einschließlich metallischer und magnetischer) wurde ein allgemeiner Ansatz entwickelt, der auf der Anwendung gentechnisch veränderter Viren mit spezifischer Affinität für Streptavidin basiert. Die gentechnisch modifizierten Anti-Streptavidin-M13-Viren mit spezifischen Bindungsstellen für Streptavidin wurden mit Gold-Nanopartikel/Streptavidin-Hybriden umgesetzt. Erhalten wurden smektisch geordnete freitragende Gold-Nanopartikel/Virus-Filme. Die Länge der Viruspartikel kann über das

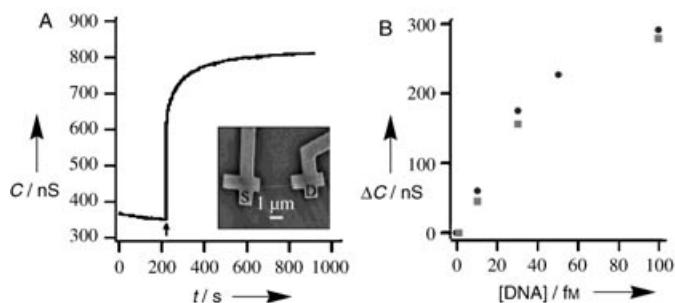
DNA-Insert eingestellt werden, sodass das Raster der smektischen Schicht gentechnisch steuerbar ist.

Viren wurden als Template genutzt, um Nanopartikel mit präziser Positionierung der Cluster zu aggregieren.<sup>[393]</sup> Zum Beispiel wurden mithilfe des Tabakmosaikvirus (TMV) als Templat metallische Nanopartikel (Pt, Au, Ag) zu Nanodrähten organisiert.<sup>[393a,b]</sup> Die ionischen Vorstufen,  $[PtCl_6]^{2-}$ ,  $[AuCl_4]^-$  und  $Ag^+$ , wurden an die Virusoberfläche gebunden und chemisch reduziert, sodass die Oberfläche der Wildtyp-TMV-Stäbchen spezifisch mit metallischen Nanopartikeln von unter 10 nm Größe bedeckt wurde. Ähnlich wurden nur wenige Atome dicke Nickel- und Cobalt-Nanodrähte mit Längen bis in den Mikrometerbereich im zentralen Kanal von TMV als Templat gebildet.<sup>[394]</sup> Verschiedene Mutanten des Kuherbsen-Mosaikvirus (CPMV) wurden als Template zur Anbindung von 2 und 5 nm großen Gold-Nanopartikeln über Gold-Schwefel-Bindungen an spezifische Stellen des Virus verwendet. Mit diesem Ansatz wurden dreidimensionale Muster mit definierten Abständen erhalten.<sup>[393c]</sup>

### 8.4. Integration von Nanodrähten in Nanobauelemente

Das ultimative Ziel der Nanobioelektronik ist die Integration der Nanodrähte in funktionsfähige elektronische Systeme oder funktionelle Bauelemente. Das Hauptaugenmerk galt bislang den strukturellen Merkmalen von Nanoschaltkreisen und den Leitungseigenschaften der Nanostrukturen, derweil sich Forschungen zur Fertigung funktionierender Komponenten noch in den Anfängen befinden. Jüngste Arbeiten weisen aber auf vielversprechende Entwicklungen in diesem Bereich hin.

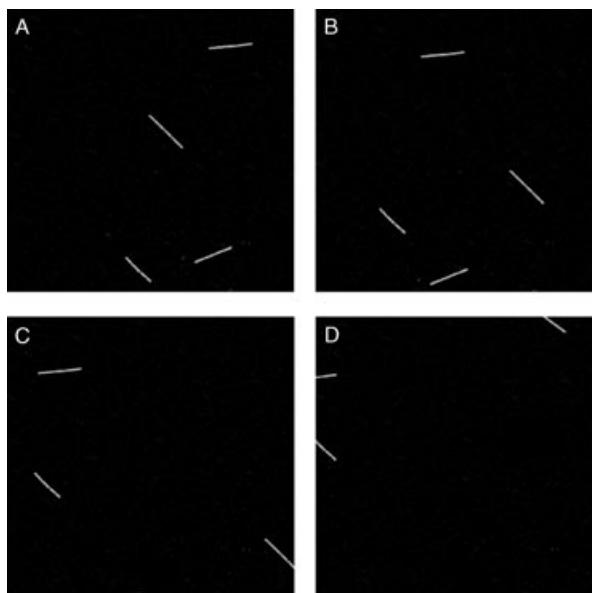
Nanobiosensoren auf der Basis funktionalisierter Nanodrähte<sup>[395]</sup> und Nanoröhren<sup>[396]</sup> sind in jüngster Zeit intensiv untersucht worden. Funktionalisierte Silicium-Nanodrähte wurden in der DNA-Analyse mittels Leitfähigkeitsmessungen eingesetzt.<sup>[397]</sup> Die Si-Nanodrähte vom p-Typ wurden durch chemische Dampfabscheidung in Gegenwart von katalytischen Gold-Nanoclustern synthetisiert und in Sensor-elemente mit elektrisch adressierbaren Nanodrähten integriert (Abbildung 58 A, kleines Bild).<sup>[397a]</sup> Eine PNA-Sonde



**Abbildung 58.** A) Leitfähigkeit eines mit dem PNA-Rezeptor funktionalisierten Si-Nanodrahtes; an der mit dem Pfeil markierten Stelle wurden 60 fm Analyt-DNA (Wildtyp-CFTR) zugegeben. Der Einschub zeigt das SEM-Bild eines Transistorelements mit Source- (S) und Drain-Elektrode (D); Skalierung: 1 µm. B) Leitfähigkeit zweier Si-Nanodrahtelemente (Quadrate und Kreise) als Funktion der Konzentration der Analyt-DNA. (Mit Genehmigung aus Lit. [397a], Copyright American Chemical Society, 2004.)

mit der Sequenz 5'-ATCATCTTG-3', die vollständig komplementär zur Sequenz des Transmembranrezeptors der Wildtyp-Mukoviszidose (CFTR) ist, wurde an den Nanodraht gebunden und als Rezeptor für die Analyse von Wildtyp- und mutierten Oligonucleotidsequenzen der ΔF508-Region von CFTR verwendet (5'-CATAGGAAACACCAAAGATGATTTCTT-3' bzw. 5'-CATAGGAAACACCAATGATTTCTT-3'). Die Bildung des negativ geladenen Doppelstrangkomplexes zwischen den oberflächenfixierten PNA-Rezeptoreinheiten und der komplementären Analyt-DNA verursachte eine Leitfähigkeitsänderung des Nanodrahtes (Abbildung 58 A), die nichtkomplementäre, mutierte DNA hingegen nicht. Daraus folgt, dass das elektronische Signal von der spezifischen Bindung der Analyt-DNA herröhrt und nicht von einer unspezifischen DNA-Adsorption. In konzentrationsabhängigen Messungen wurde eine Nachweisgrenze von etwa 10 fm ermittelt (Abbildung 58 B). Dieser Ansatz ist ein Schritt hin zu einem direkten, markerfreien DNA-Nachweis mit hoher Empfindlichkeit und guter Selektivität und birgt eine Perspektive für die integrierte Hochdurchsatz-Detektion von DNA mit Anwendungen im genetischen Screening und in der Aufspürung von Biokampfstoffen.

Das in Abschnitt 8.1 beschriebene Actin/Gold-Nanodraht/Actin-Filament wurde als Nanotransportsystem genutzt.<sup>[364]</sup> In diesem Experiment wurde das Filament mit Phalloidin verfestigt und auf eine Myosin-Schnittstelle auf einem Glasträger aufgetragen. Bei Zugabe von ATP (als „Treibstoff“) bewegten sich die actinmodifizierten Gold-Nanostäbchen auf der Oberfläche. Die Bewegung der Nanoobjekte wurde unter dem Reflexionsmikroskop verfolgt (Abbildung 59), und eine Geschwindigkeit von  $250 \text{ nm s}^{-1}$  wurde ermittelt. In einem ähnlichen Ansatz wurden CdSe-Nanopartikel auf Mikrotubuli aggregiert und die erzeugten Filamente in Gegenwart von Kinesin in Bewegung versetzt.<sup>[398]</sup>



**Abbildung 59.** Momentaufnahmen (Reflexionsmikroskopie) der sich bewegenden Actin/Gold-Nanodraht/Actin-Filamente auf einer myosinbeschichteten Glasoberfläche bei Zugabe von ATP. Die Bilder A–D zeigen den gleichen Ausschnitt in Zeitabständen von 5 Sekunden.

## 9. Schlussfolgerungen

Gegenstand dieses Aufsatzes sind aktuelle Fortschritte in dem sich schnell entwickelnden Bereich funktionaler Hybridsysteme aus Biomolekülen und Nanopartikeln oder Nanostäbchen. Die Forschungen auf diesem Gebiet sind naturgemäß interdisziplinär und zielen darauf ab, die ungewöhnlichen optischen, elektronischen und katalytischen Eigenschaften von Nanoobjekten mit den optimierten Erkennungs- und Reaktivitätseigenschaften von Biomaterialien zu kombinieren. Der Umstand, dass Nanopartikel und Biomaterialien (Enzyme, Antikörper, Nucleinsäuren) oft ähnliche Abmessungen haben, macht solche Hybridsysteme zu erfolgversprechenden Komponenten für Nanostrukturen und Nanofunktionseinheiten.

Eine Reihe von Funktionen und Anwendungen von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden wurde diskutiert, darunter analytische Anwendungen, signalinduzierte elektronische Funktionen und Anwendungen in Nanoschaltkreisen und Nanobaulementen. Einige dieser Funktionen können bereits zu tragfähigen Technologien umgesetzt werden, andere bedürfen noch aufwändiger Grundlagenforschung. Bei den analytischen Anwendungen von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt. Die besonderen optischen Eigenschaften von Nanopartikeln und die Photophysik gekoppelter Wechselwirkungen zwischen Partikeln sind mittlerweile gut verstanden, sodass es gelungen ist, solche Partikel als optische Marker für Erkennungereignisse nutzbar zu machen. Ähnlich wurden Verfahren entwickelt, die die katalytischen Eigenschaften der Nanomaterialien zur Verstärkung biologischer Erkennungsprozesse einsetzen. Die Organisation von Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden auf Oberflächen kann zum elektronischen Nachweis von Erkennungsvorgängen (durch elektrische Leitfähigkeit, piezoelektrische oder photoelektrochemische Übertragungsverfahren) verwendet werden. Die Größenabhängigkeit der optischen Eigenschaften von Halbleiter-Nanopartikeln zeigt eine Perspektive für die parallele Hochdurchsatz-Analyse von Analyt-Ensembles auf. Denkbar ist hier die Organisation von kombinatorischen Bibliotheken aus Biomolekül-Halbleiter-Nanopartikel-Hybriden oder die Anordnung von unterschiedlichen Biomolekül-Nanopartikel-Hybriden in Array-Konfigurationen.

Neue Anwendungen von Biomaterial-Magnetpartikel-Konjugaten in der Analytik wurden diskutiert. Während die Konzentrierung und Trennung von Substanzen mithilfe von Magnetpartikeln heute zum Stand der Technik gehört, sind Konzepte wie die Verstärkung elektronischer Sensorsignale durch extern gesteuerte Rotation der Magnetpartikel neu. Viele künftige Anwendungen rotierender Magnetpartikel werden bei der Detektion von Antigen-Antikörper-, Nucleinsäure-DNA-, Protein-DNA- oder Rezeptor-Zell-Wechselwirkungen erwartet. Auch die verstärkte Reaktivität an rotierenden Magnetpartikeln (z.B. die beschleunigte Hybridisierung oder Polymerisation) kann zur Verbesserung von Analyseverfahren genutzt werden. Eine weitere Perspektive ist die Anwendung von Nanopartikel-Hybriden als mechanischer Antrieb für Mikroelemente. Der Nachweis von Biomaterialien (z.B. Antikörpern<sup>[399]</sup> oder DNA<sup>[400]</sup>) durch mecha-

nische Bewegung mikroskopischer Federhebel aufgrund von Oberflächenspannungen ist bereits etabliert. Möglich wäre es, geladene Nanopartikel oder Magnetpartikel als Marker für biologische Erkennungsvorgänge einzusetzen, die in der Lage sind, Oberflächenspannungen zu verstärken und dadurch Mikroobjekte mechanisch zu aktivieren.

Elektronisch ansteuerbare Redoxprotein-Nanopartikel-Hybride bieten eine neue Strategie zur elektrischen Kontaktierung von Redoxenzymen mit ihrer makroskopischen Umgebung. Vorhersehbar ist auch der Einsatz anderer Nanoobjekte wie Metall- oder Halbleiter-Nanostäbchen oder Kohlenstoff-Nanoröhrchen. Auch magnetisch ansteuerbare Redoxproteine finden sicher Anwendungen beim Design komplexer Sensorsysteme und bei der Entwicklung neuer Methoden für die Oberflächenstrukturierung.

Die Anwendung von Biomaterialien als Template zur Herstellung von Nanostrukturen und Nanoschaltkreisen in Gegenwart von Nanopartikeln befindet sich noch in einer frühen Entwicklungsphase, die Tragfähigkeit des Konzepts ist aber belegt. So ist es z. B. gelungen, Nanodrähte mit kontrollierter Form und elektronischer Funktion durch den Einbau von Nanopartikeln in biologische Template zu erzeugen. Die größten Herausforderungen liegen jedoch noch vor uns, und aufregende Systeme sind für die Zukunft zu erwarten. Den Nanopartikelarchitekturen auf biologischen Templates liegen relativ einfache Strukturmotive zugrunde, die die katalytischen Funktionen des Biomaterials nicht voll ausschöpfen. Die Replikation von Nanopartikel-markierter DNA – und speziell die Entwicklung einer gezielten Polymerasekettenreaktion zur Bildung von Nanopartikel-Drähten – birgt einen neuen Ansatz für das Design biologischer Funktionseinheiten. Der Einsatz von Biomolekül-Nanopartikel-Kompositssystemen zur Fertigung von Nanobauelementen befindet sich noch in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung, trotzdem ist bereits jetzt mit der Entdeckung neuer faszinierender Phänomene zu rechnen.

Entscheidende Voraussetzung für die künftige Entwicklung von Biomolekül-Nanopartikel-Systemen ist die Erarbeitung neuer Synthesemethoden. Mit den gegenwärtigen Methoden werden meist Nanopartikel erzeugt, die von einer stabilisierenden Schicht umgeben sind. Die Herstellung von Nanopartikeln mit einer einzigen Funktionalität ist eine weitaus schwierigere Aufgabe, die erfolgreiche Synthese von monofunktionalisierten  $\text{Au}_{55}$ -Clustern zeigt aber, dass solche Verfahren prinzipiell möglich sind. Eine kontrollierte Funktionalisierung wäre die Grundlage für ein programmierbares vektorielles Wachstum von Biomolekül-Nanopartikel-Strukturen. Ein möglicher Ansatz ist die spezifische chemische Funktionalisierung der Kanten von Nanostäbchen mit Biomaterialien.

Für biomolekular funktionalisierte Nanopartikel und Nanostäbchen ergeben sich vielfache Anwendungsmöglichkeiten, etwa in der biomolekularen Elektronik,<sup>[401]</sup> für Biosensoren,<sup>[402, 403]</sup> und Bioaktuatoren<sup>[345, 364]</sup> oder in der Medizin bei der photodynamischen Tumortherapie,<sup>[404]</sup> der gezielten Freisetzung von Radioisotopen,<sup>[405]</sup> der Wirkstoff-Freisetzung,<sup>[406]</sup> der elektronischen DNA-Sequenzierung, in Genübertragungssystemen<sup>[407]</sup> und der Gentherapie.<sup>[408]</sup> Neue faszinierende Technologien können mit Bionanomaterialien

erschlossen werden. Ein Beispiel ist das sich neu abzeichnende Gebiet der Nanorobotics, das die Entwicklung, Herstellung und Programmierung von mikroskopischen Robotern und den programmierbaren Aufbau von Nanoobjekten beinhaltet.<sup>[409]</sup> Nanoroboter sind im Kern nanoelektrromechanische Systeme, die alle wichtigen Themen der aktuellen Forschung und Technik betreffen: Sensorik, Aktuatorik, Regelung, Kommunikation, Energieversorgung, Schnittstellen zwischen räumlichen Skalen und zwischen organischen/anorganischen und biologischen/mechanischen Systemen. Nanoroboter könnten revolutionäre Anwendungen in Bereichen wie der Umweltüberwachung und der Gesundheitsfürsorge finden. Weitere neu aufkommende Themen sind nanoelektrromechanische Quantenschaltkreise und Quantensysteme.<sup>[410]</sup> Grundlage dieser Entwicklungen sind Fortschritte in der Fertigungstechnik für freistehende Nanokomponenten, die mechanisch beweglich sind und eine Vielfalt von Funktionen ausführen können (optische, elektrische und insbesondere mechanische). Mit dem Einsatz bionanohybrider Systeme könnte das Potenzial dieser Technologien für die Sensorik, Informations- und Signalverarbeitung voll ausgeschöpft werden.

Die Kombination der ungewöhnlichen Eigenschaften von Nanoobjekten und Biomaterialien gibt uns alle Möglichkeiten an die Hand, das neue Gebiet der Nanobiotechnologie interdisziplinär zu gestalten.<sup>[411]</sup> Betrachtet man die jüngsten Fortschritte auf diesem Gebiet, kann man eine aufregende neue Wissenschaft mit faszinierenden Systemen erwarten.

*Wir danken der Deutsch-Israelischen Stiftung für wissenschaftliche Forschung und Entwicklung (GIF) für die Unterstützung unserer Arbeiten. Der Vortitel dieses Aufsatzes wurde von Dr. Andrew N. Shipway entworfen.*

Eingegangen am 20. Januar 2004  
Online veröffentlicht am 10. November 2004  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- 
- [1] R. Feynman in *The Pleasure of Finding Things Out: There is Plenty of Room at the Bottom* (Hrsg.: J. Robbins), Perseus, 1999.
  - [2] D. Qin, Y. N. Xia, J. A. Rogers, R. J. Jackman, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *194*, 1–20.
  - [3] D. M. Tenant, K. Feder, K. F. Dreyer, R. P. Gnall, T. L. Koch, U. Koren, B. I. Miller, M. G. Young, *Microelectron. Eng.* **1995**, *27*, 427–434.
  - [4] *Metal Nanoparticles. Synthesis, Characterization and Application* (Hrsg.: D. L. Feldheim, C. A. Foss, Jr.), Marcel Dekker, New York, 2002.
  - [5] a) F. C. Meldrum, J. Flath, W. Knoll, *Langmuir* **1997**, *13*, 2033–2049; b) L. Spanhel, H. Weller, A. Fojtik, A. Henglein, *Ber. Bunsen-Ges.* **1987**, *91*, 88–94; c) E. Stathatos, P. Lianos, F. Del Monte, D. Levy, D. Tsiorvas, *Langmuir* **1997**, *13*, 4295–4300; d) R. Rizza, D. Fitzmaurice, S. Hearne, G. Hughes, G. Spoto, E. Ciliberto, H. Kerp, R. Schropp, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2969–2982; e) D. L. Klein, R. Roth, A. K. L. Lim, A. P. Alivisatos, P. L. McEuen, *Nature* **1997**, *389*, 699–701.
  - [6] a) J. F. Hicks, D. T. Miles, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13322–13328; b) J. F. Hicks, F. P. Zamborini, A. J. Osisek, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7048–7053;

- c) S. Chen, R. W. Murray, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9996–10000; d) J. F. Hicks, F. P. Zamborini, R. W. Murray, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7751–7757; e) S. Chen, R. W. Murray, S. W. Feldberg, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9898–9907.
- [7] a) A. N. Shipway, E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 18–52; b) M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- [8] a) A. Badia, S. Singh, L. Demers, L. Cuccia, G. R. Brown, R. B. Lennox, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 359–363; b) M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1655–1666.
- [9] a) H. Yao, O. Momozawa, T. Hamatani, K. Kimura, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4692–4697; b) N. Hussain, B. Singh, T. Sakthivel, A. T. Florence, *Int. J. Pharm.* **2003**, *254*, 27–31; c) A. C. Templeton, S. Chen, S. M. Gross, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, *15*, 66–76.
- [10] a) A. Miyazaki, Y. Nakano, *Langmuir* **2000**, *16*, 7109–7111; b) W. P. Wuelfing, S. M. Gross, D. T. Miles, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12696–12697; c) T. Teranishi, I. Kiyokawa, M. Miyake, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 596–599.
- [11] M. Valina-Saba, G. Bauer, N. Stich, F. Pittner, T. Schalkhammer, *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *8*–*9*, 205–209.
- [12] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [13] a) M. Lahav, A. N. Shipway, I. Willner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 1925–1931; b) W. Chen, D. Grouquist, J. Roark, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2002**, *2*, 47–53.
- [14] A. N. Shipway, I. Willner, *Chem. Commun.* **2001**, 2035–2045.
- [15] a) D. L. Feldheim, C. D. Keating, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 1–12; b) T. W. Kim, D. C. Choo, J. H. Shim, S. O. Kang, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 2168–2170.
- [16] J. Liu, M. Gomez-Kaifer, A. E. Kaifer in *Structure and Bonding*, Bd. 99 (Hrsg.: J.-P. Sauvage), Springer, New York, **2001**, S. 141–162.
- [17] D. L. Feldheim, K. C. Grabar, M. J. Natan, T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7640–7641.
- [18] a) T. Trindade, P. O'Brien, N. L. Pickett, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3843–3858; b) J.-T. Lue, *J. Phys. Chem. Solids* **2001**, *62*, 1599–1612; c) K. Grieve, P. Mulvaney, F. Grieser, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 168–172; d) P. Schwerdtfeger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1936–1939; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1892–1895.
- [19] a) M. Brust, C. J. Kiely, *Colloids Surf. A* **2002**, *202*, 175–186; b) W. P. McConnell, J. P. Novak, L. C. Brousseau III, R. R. Fuierer, R. C. Tenant, D. L. Feldheim, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8925–8930; c) R. Gangopadhyay, A. De, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 608–622.
- [20] E. Katz, A. N. Shipway, I. Willner in *Nanoparticles. From Theory to Application* (Hrsg.: G. Schmid), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 368–421.
- [21] a) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158; b) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5974–5978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5796–5800; c) W. J. Parak, D. Gerion, T. Pellegrino, D. Zanchet, C. Michelet, S. C. Williams, R. Boudreau, M. A. Le Gros, C. A. Larabell, A. P. Alivisatos, *Nanotechnology* **2003**, *14*, R15–R27; d) A. Csaki, G. Maubach, D. Born, J. Reichert, W. Fritzsche, *Single Mol.* **2002**, *3*, 275–280.
- [22] a) S. G. Penn, L. Hey, M. J. Natan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 609–615; b) J. L. West, N. J. Halas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, *5*, 285–292; c) P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47–52.
- [23] a) V. Escriou, M. Carrière, D. Scherman, P. Wils, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 295–306; b) A. G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. Glomm, J. Ryan, M. F. Anderson, S. Franzen, D. L. Feldheim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4700–4701.
- [24] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 631–651.
- [25] C. Aymonier, U. Schlotterbeck, L. Antonietti, P. Zacharias, R. Thomann, J. C. Tiller, S. Mecking, *Chem. Commun.* **2002**, 3018–3019.
- [26] Y. Xia, P. Yang, Y. Sun, Y. Wu, B. Mayers, B. Gates, Y. Yin, F. Kim, H. Yan, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 353–389.
- [27] I. W. Hamley, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1730–1752; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1692–1712.
- [28] H. Cölfen, S. Mann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2452–2468; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2350–2365.
- [29] K. J. C. van Bommel, A. Friggeri, S. Shinkai, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1010–1030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 980–999.
- [30] *Bioelectronics: From Theory to Applications* (Hrsg.: I. Willner, E. Katz), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, im Druck.
- [31] a) G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, London, **1992**; b) R. F. Taylor, *Protein Immobilization*, Dekker, New York, **1990**; c) A. F. Collings, F. Caruso, *Rep. Prog. Phys.* **1997**, *60*, 1397–1445.
- [32] a) S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, *Microchim. Acta* **1998**, *128*, 127–143; b) W. H. Scouten, J. H. T. Luong, R. S. Brown, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 178–185.
- [33] T. Rajh, J. M. Nedeljkovic, L. X. Chen, O. Poluektov, M. C. Thurnauer, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3515–3519.
- [34] J. B. Broderick, M. J. Natan, T. V. O'Halloran, R. P. Van Duyne, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13771–13776.
- [35] C. Yongli, Z. Xiufang, G. Yandao, Z. Nanming, Z. Tingying, S. Xinqi, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *214*, 38–45.
- [36] J. De Groot, R. E. Hester, S. Kaminaka, T. Kitagawa, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2044–2048.
- [37] N. G. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev, B. N. Khlebtsov, L. A. Dykman, P. Englebienne, *Colloid J.* **2003**, *65*, 622–635.
- [38] W. Shenton, S. A. Davis, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 449–452.
- [39] a) I. D. G. MacDonald, W. E. Smith, *Langmuir* **1996**, *12*, 706–713; b) B. N. Rospendowski, K. Kelly, C. R. Wolf, W. E. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1217–1225.
- [40] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150.
- [41] D. Ibano, Y. Yokota, T. Tominaga, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 574–575.
- [42] H. Larssericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *237*, 98–103.
- [43] a) M. J. Meziani, H. W. Rollins, L. F. Allard, Y.-P. Sun, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11178–11182; b) M. J. Meziani, Y.-P. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8015–8018.
- [44] M. Zheng, F. Davidson, X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7790–7791.
- [45] P. Pengo, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, L. Pasquato, P. Scrimin, *Langmuir* **2003**, *19*, 2521–2524.
- [46] F. Caruso, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 11–22.
- [47] F. Caruso, H. Möhwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6039–6046.
- [48] F. Caruso, H. Fiedler, K. Haage, *Colloids Surf. A* **2000**, *169*, 287–293.
- [49] C. Schüller, F. Caruso, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 750–753.
- [50] F. Caruso, C. Schüller, *Langmuir* **2000**, *16*, 9595–9603.
- [51] Y. Lvov, F. Caruso, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4212–4217.
- [52] W. Yang, D. Trau, R. Renneberg, N. T. Yu, F. Caruso, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *234*, 356–362.
- [53] R. Mahtab, J. P. Rogers, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9099–9100.

- [54] R. Mahtab, J. P. Rogers, C. P. Singleton, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7028–7032.
- [55] R. Mahtab, H. H. Harden, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 14–17.
- [56] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, K. Nowaczyk, C. J. Murphy, *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 128–136.
- [57] S. R. Bigham, J. L. Coffey, *J. Cluster Sci.* **2000**, *11*, 359–372.
- [58] C. J. Murphy, E. B. Brauns, L. Gearheart, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1997**, *452*, 597–601.
- [59] a) E. B. Brauns, C. J. Murphy, M. A. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2449–2456; b) E. B. Brauns, M. L. Madaras, R. S. Coleman, C. J. Murphy, M. A. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11644–11649; c) J. Wildeson, C. J. Murphy, *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 99–106.
- [60] L. A. Gearheart, H. J. Ploehn, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 12609–12615.
- [61] K. Naka, H. Itoh, Y. Tampo, Y. Chujo, *Langmuir* **2003**, *19*, 5546–5549.
- [62] V. I. Korsounski, R. B. Neder, K. Hradil, C. Barglik-Chory, G. Müller, J. Neufeld, *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 1389–1396.
- [63] M. A. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, Academic Press, New York, **1989**.
- [64] a) S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue, H. L. Chappelle, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 71–76; b) E. Droz, M. Taborelli, P. Descouts, T. N. C. Wells, R. C. Werlen, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1996**, *14*, 1422–1426.
- [65] a) H.-G. Hong, P. W. Bohn, S. G. Sligar, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1635–1638; b) H.-G. Hong, M. Jiang, S. G. Sligar, P. W. Bohn, *Langmuir* **1994**, *10*, 153–158; c) M. A. Firestone, M. L. Shank, S. G. Sligar, P. W. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9033–9041; d) S. Kanno, Y. Yanagida, T. Haruyama, E. Kobatake, M. Aizawa, *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 207–214.
- [66] J. Li, J. Wang, V. G. Gavalas, D. A. Atwood, L. G. Bachas, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 55–58.
- [67] A. Schroedter, H. Weller, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3346–3350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3218–3221.
- [68] a) H. Jeon, G. G. Shipley, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30465–30470; b) M. Malecki, A. Hsu, L. Truong, S. Sanchez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 213–218; c) O. Medalia, M. Heim, R. Guckenberger, R. Sperling, J. Sperling, *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 113–119; d) K.-M. Sung, D. W. Mosley, B. R. Peele, S. Zhang, J. M. Jacobson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5064–5065.
- [69] a) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609; b) S.-J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, P. W. Brazis, C. R. Kannewurf, R. L. Letsinger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4003–4006; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3845–3848; c) L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds III, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5535–5541.
- [70] G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8122–8123.
- [71] R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, C. A. Mirkin, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 289–291.
- [72] L. Jiang, B. Q. Yang, Y. D. Ma, Y. C. Liu, W. S. Yang, T. J. Li, C. C. Sun, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *380*, 29–33.
- [73] W. J. Parak, T. Pellegrino, C. M. Michelet, D. Gerion, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 33–36.
- [74] J. E. Gestwicki, L. E. Strong, L. L. Kisseling, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4741–4744; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4567–4570.
- [75] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2015.
- [76] B. M. Sergeev, M. V. Kiryukhin, M. Y. Rubtsova, A. N. Prusov, *Colloid J.* **2003**, *65*, 636–638.
- [77] a) K. Okano, S. Takahashi, K. Yasuda, D. Tokinaga, K. Imai, M. Koga, *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 120–125; b) T. Soukka, H. Härmä, J. Paukkunen, T. Lövgren, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2254–2260; c) I. Sondi, O. Siiman, S. Koester, E. Matijevic, *Langmuir* **2000**, *16*, 3107–3118.
- [78] a) A. Yoshizumi, N. Kanayama, Y. Maehara, M. Ide, H. Kitano, *Langmuir* **1999**, *15*, 482–488; b) M. J. Hernández, J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, S. Penadés, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1624–1627; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1554–1557.
- [79] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Cañada, A. Fernández, S. Penadés, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2317–2321; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2258–2261.
- [80] a) C.-C. Lin, Y.-C. Yeh, C.-Y. Yang, C.-L. Chen, G.-F. Chen, C.-C. Chen, Y.-C. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3508–3509; b) C.-C. Lin, Y.-C. Yeh, C.-Y. Yang, G.-F. Chen, Y.-C. Chen, Y.-C. Wu, C.-C. Chen, *Chem. Commun.* **2003**, 2920–2921.
- [81] H. Otsuka, Y. Akiyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8226–8230.
- [82] D. C. Hone, A. H. Haines, D. A. Russell, *Langmuir* **2003**, *19*, 7141–7144.
- [83] B. Nolting, J.-J. Yu, G.-Y. Liu, S.-J. Cho, S. Kauzlarich, J. Gervay-Hague, *Langmuir* **2003**, *19*, 6465–6473.
- [84] H. Gu, P. L. Ho, E. Tong, L. Wang, B. Xu, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1261–1263.
- [85] D. Ishii, K. Kinbara, Y. Ishida, N. Ishii, M. Okochi, M. Yohda, T. Aida, *Nature* **2003**, *423*, 628–632.
- [86] a) M. Kowshik, N. Deshmukh, W. Vogel, J. Urban, S. K. Kulkarni, K. M. Paknikar, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 583–588; b) Y. Roh, R. J. Lauf, A. D. McMillan, C. Zhang, C. J. Rawn, J. Bai, T. J. Phelps, *Solid State Commun.* **2001**, *118*, 529–534; c) J. M. Slocik, D. W. Wright, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1135–1141; d) M. Kowshik, S. Ashtaputre, S. Kharrazi, W. Vogel, J. Urban, S. K. Kulkarni, K. M. Paknikar, *Nanotechnology* **2003**, *14*, 95–100; e) T. Matsunaga, H. Takeyama, *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 391–394; f) P. Raveendran, J. Fu, S. L. Wallen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13940–13941; g) S. S. Shankar, A. Ahmad, M. Sastry, *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1627–1631; h) A. Ahmad, S. Senapati, M. Khan, R. Kumar, R. Ramani, V. Srinivas, M. Sastry, *Nanotechnology* **2003**, *14*, 824–828.
- [87] a) A. Ahmad, P. Mukherjee, D. Mandal, S. Senapati, M. I. Khan, R. Kumar, M. Sastry, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12108–12109; b) J. L. Gardea-Torresdey, J. G. Parsons, E. Gomez, J. Peralta-Videa, H. E. Troiani, P. Santiago, M. J. Yacaman, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 397–401.
- [88] S.-Y. Ding, M. Jones, M. P. Tucker, J. M. Nedeljkovic, J. Wall, M. N. Simon, G. Rumbles, M. E. Himmel, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1581–1585.
- [89] a) A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1531–1537; b) H. Xu, E. J. Bjerneld, M. Käll, L. Börjesson, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 4357–4360.
- [90] A. K. Boal, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4914–4915.
- [91] J. Pan, G. Benkö, Y. Xu, T. Pascher, L. Sun, V. Sundström, T. Polivka, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13949–13957.
- [92] S. O. Obare, T. Ito, M. H. Balfour, G. J. Meyer, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1151–1153.
- [93] N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach, J. Studer, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 281–286.
- [94] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783.
- [95] S. R. N. Peña, S. Raina, G. P. Goodrich, N. V. Fedoroff, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7314–7323.
- [96] M. J. Hannon, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, I. Meistermann, C. J. Isaac, K. J. Sanders, A. Rodger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 903–908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 880–884.
- [97] A. U. Bielinska, C. Chen, J. Johnson, J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 843–850.

- [98] K. Iijima, M. Yoshizumi, M. Hashimoto, S. Kim, M. Eto, J. Ako, Y. Q. Kiang, N. Sudoh, K. Hosoda, K. Nakahara, K. Toda, Y. Ouchi, *Circulation* **2000**, *101*, 805–811.
- [99] M. J. Hostetler, A. C. Templeton, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, *15*, 3782–3789.
- [100] A. K. Boal, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 734–735.
- [101] C. M. McIntosh, E. A. Esposito III, A. K. Boal, J. M. Simard, C. T. Martin, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7626–7629.
- [102] X. He, K. Wang, W. Tan, B. Liu, X. Lin, C. He, D. Li, S. Huang, J. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7168–7169.
- [103] K. Hamad-Schifferli, J. J. Schwartz, A. T. Santos, S. Zhang, J. M. Jacobson, *Nature* **2002**, *415*, 152–155.
- [104] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fähling, R. Felix, *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 413–419.
- [105] B. Dubertret, M. Calame, A. J. Libchaber, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365–370.
- [106] D. J. Maxwell, J. R. Taylor, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9606–9612.
- [107] a) N. O. Fischer, C. M. McIntosh, J. M. Simard, V. M. Rotello, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5018–5023; b) N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, J. M. Simard, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13387–13391; c) R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 739–743.
- [108] C.-Y. Lai, B. G. Trewyn, D. M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4451–4459.
- [109] a) C. Petit, A. Taleb, M.-P. Pilani, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 259–261; b) C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, *Science* **1995**, *270*, 1335–1338; c) T. Vossmeyer, G. Reck, L. Katsikas, E. T. K. Haupt, B. Schulz, H. Weller, *Science* **1995**, *267*, 1476–1479; d) B. A. Korgel, D. Fitzmaurice, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 661–665.
- [110] A. Sashchiuk, E. Lifshitz, R. Reisfeld, T. Saraidarov, M. Zelner, A. Willenz, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2002**, *24*, 31–38.
- [111] S. A. Davis, M. Breulmann, K. H. Rhodes, B. Zhang, S. Mann, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3218–3226.
- [112] W. Shenton, D. Pum, U. B. Sleytr, S. Mann, *Nature* **1997**, *389*, 585–587.
- [113] S. Dieluweit, D. Pum, U. B. Sleytr, *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 15–19.
- [114] S. A. Davis, H. M. Patel, E. L. Mayers, N. H. Mendelson, G. Franco, S. Mann, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2516–2524.
- [115] R. P. Andres, J. D. Bielefeld, J. I. Henderson, D. B. Janes, V. R. Kolagunta, C. P. Kubiak, W. J. Mahoney, R. G. Osifchin, *Science* **1996**, *273*, 1690–1693.
- [116] M. Brust, D. Bethell, D. J. Schiffrian, C. J. Kiely, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 795–797.
- [117] S. Cobbe, S. Connolly, D. Ryan, L. Nagle, R. Eritja, D. Fitzmaurice, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 470–477.
- [118] S. Mann, W. Shenton, M. Li, S. Connolly, D. Fitzmaurice, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 147–150.
- [119] R. Bashir, *Superlattices Microstruct.* **2001**, *29*, 1–16.
- [120] C. M. Niemeyer, *Appl. Phys. A* **1999**, *68*, 119–124.
- [121] V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, Y. M. Krasnov, V. K. Plotnikov, N. G. Khlebtsov, *Colloid J.* **2002**, *64*, 671–680.
- [122] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11758–11763.
- [123] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85–88.
- [124] a) B. K. Sinha, C. F. Chingell, *Methods Enzymol.* **1979**, *62*, 295–308; b) U. Piran, W. J. Riordan, *J. Immunol. Methods* **1990**, *133*, 141–143.
- [125] a) T. Sano, M. W. Pandori, X. M. Chen, C. L. Smith, C. R. Cantor, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28204–28209; b) T. Sano, C. R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3180–3184.
- [126] a) S. Connolly, D. Fitzmaurice, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1202–1205; b) S. Connolly, S. Cobbe, D. Fitzmaurice, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2222–2226.
- [127] K. K. Caswell, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13914–13915.
- [128] P. M. Harrison, P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 161–203.
- [129] a) T. Douglas, D. P. E. Dickson, S. Betteridge, J. Charnock, C. D. Garner, S. Mann, *Science* **1995**, *269*, 54–57; b) F. C. Meldrum, T. Douglas, S. Levi, P. Arosio, S. Mann, *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *58*, 59–68; c) F. C. Meldrum, B. R. Heywood, S. Mann, *Science* **1992**, *257*, 522–523.
- [130] K. K. W. Wong, S. Mann, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 928–931.
- [131] J. M. Dominguez-Vera, E. Colacio, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6983–6985.
- [132] M. Li, K. K. W. Wong, S. Mann, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23–26.
- [133] N. T. K. Thanh, J. H. Rees, Z. Rosenzweig, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1174–1178.
- [134] N. T. K. Thanh, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1624–1628.
- [135] L. R. Hirsch, J. B. Jackson, A. Lee, N. J. Halas, J. L. West, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2377–2381.
- [136] S. Wang, N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen, J. Studer, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 817–822.
- [137] S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, A. M. Belcher, *Nature* **2000**, *405*, 665–668.
- [138] a) C. A. Mirkin, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2258–2272; b) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1849–1862.
- [139] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078–1081.
- [140] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959–1964.
- [141] a) R. A. Reynolds III, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3795–3796; b) G. R. Souza, J. H. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6734–6735.
- [142] R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12674–12675.
- [143] J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4640–4650.
- [144] E. Dujardin, L.-B. Hsin, C. R. C. Wang, S. Mann, *Chem. Commun.* **2001**, 1264–1265.
- [145] Y. J. Kim, R. C. Johnson, J. T. Hupp, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 165–167.
- [146] S. Y. Lin, S. W. Liu, C. M. Lin, C. H. Chen, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 330–335.
- [147] a) J. Liu, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6642–6643; b) J. Liu, Y. Lu, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1627–1632.
- [148] a) R. R. Breaker, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 31–39; b) R. R. Breaker, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371–390; c) G. F. Joyce in *The RNA World*, Vol. 37 (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**, S. 687–689.
- [149] a) J. Li, W. Zheng, A. H. Kwon, Y. Lu, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 481–488; b) S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262–4266; c) D. Faulhammer, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2984–2988; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2837–2841.
- [150] A. G. Kanaras, Z. Wang, A. D. Bates, R. Cosstick, M. Brust, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 201–204; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 191–194.
- [151] C. S. Yun, G. A. Khitrov, D. E. Vergona, N. O. Reich, G. F. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7644–7645.

- [152] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- [153] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1925–1929; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1808–1812.
- [154] K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8102–8103.
- [155] R. Chakrabarti, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12531–12540.
- [156] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685–3688.
- [157] a) S.-J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2993–2996; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2909–2912; b) C. M. Niemeyer, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 51–53.
- [158] C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391–2395; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2265–2268.
- [159] Q. Wang, T. Lin, L. Tang, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 477–480; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 459–462.
- [160] H. Liang, T. E. Angelini, J. Ho, P. V. Braun, G. C. L. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11786–11787.
- [161] I. Willner, *Science* **2002**, *298*, 2407–2408.
- [162] F. A. Armstrong, G. S. Wilson, *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2623–2645.
- [163] A. Heller, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 128–134.
- [164] A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3579–3587.
- [165] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1230–1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1180–1218.
- [166] a) J. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *18*, 47–53; b) H.-L. Schmidt, W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 127–135; c) I. Willner, E. Katz, B. Willner, *Electroanal. Chem.* **1997**, *9*, 965–977.
- [167] a) I. Willner, G. Arad, E. Katz, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *44*, 209–214; b) I. Willner, E. Katz, F. Patolsky, A. F. Bückmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 1817–1822; c) E. Katz, B. Filanovsky, I. Willner, *New J. Chem.* **1999**, *23*, 481–487; d) E. Katz, I. Willner, A. B. Kotlyar, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *479*, 64–68; e) S. C. Barton, H.-H. Kim, G. Binyamin, Y. Zhang, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5802–5803; f) T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H.-H. Kim, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8630–8631; g) E. Katz, A. N. Shipway, I. Willner in *Handbook of Fuel Cells. Fundamentals, Technology, Applications*, Bd. 1 (Hrsg.: W. Vielstich, H. Gasteiger, A. Lamm), Wiley, **2003**, S. 355–381.
- [168] a) I. Willner, A. Doron, E. Katz, *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 546–560; b) R. Blonder, E. Katz, I. Willner, V. Wray, A. F. Bückmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11747–11757.
- [169] a) G. Sundarababu, H. Gao, H. Sigrist, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 540–544; b) S. K. Bhatia, J. L. Teixeira, M. Anderson, L. Shriver-Lake, J. M. Calvert, J. H. Georger, J. J. Hickman, C. S. Dulcey, P. E. Schoen, F. S. Ligler, *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 197–205.
- [170] M. Sastry, M. Rao, K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 847–855.
- [171] a) N. Kimizuka, M. Tanaka, T. Kunitake, *Chem. Lett.* **1999**, 1333–1334; b) P. He, N. Hu, J. F. Rusling, *Langmuir* **2004**, *20*, 722–729.
- [172] S. Deki, Y. Aoi, O. Hiroi, A. Kajinami, *Chem. Lett.* **1996**, 433–434.
- [173] S. Phadtare, A. Kumar, V. P. Vinod, C. Dash, D. V. Palaskar, M. Rao, P. G. Shukla, S. Sivaram, M. Sastry, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1944–1949.
- [174] N. Levit-Binnun, A. B. Lindner, O. Zik, Z. Eshhar, E. Moses, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1436–1441.
- [175] Y. Maeda, T. Nakamura, K. Uchimura, T. Matsumoto, H. Tabata, T. Kawai, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1999**, *17*, 494–496.
- [176] T. Torimoto, M. Yamashita, S. Kuwabata, T. Sakata, H. Mori, H. Yoneyama, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8799–8803.
- [177] J. L. Coffer, S. R. Bigham, X. Li, R. F. Pinizzotto, Y. G. Rho, R. M. Pirtle, I. L. Pirtle, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *69*, 3851–3853.
- [178] M. Sastry, A. Kumar, S. Datar, C. V. Dharmadhikari, K. N. Ganesh, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *78*, 2943–2945.
- [179] A. Kumar, M. Pattarkine, M. Bhadade, A. B. Mandale, K. N. Ganesh, S. S. Datar, C. V. Dharmadhikari, M. Sastry, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 341–344.
- [180] a) S. Han, J. Lin, F. Zhou, R. L. Vellanoweth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *279*, 265–269; b) E. Huang, M. Satjapipat, S. Han, F. Zhou, *Langmuir* **2001**, *17*, 1215–1224.
- [181] J. Richter, R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plaschke, H. K. Schackert, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 507–510.
- [182] Y. Maeda, H. Tabata, T. Kawai, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 1181–1183.
- [183] J. K. N. Mbindyo, B. D. Reiss, B. R. Martin, C. D. Keating, M. J. Natan, T. E. Mallouk, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 249–254.
- [184] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, S. Gao, L. Chi, S. Peschel, U. Simon, *Colloid Polym. Sci.* **2001**, *279*, 68–72.
- [185] L. M. Demers, S.-J. Park, T. A. Taton, Z. Li, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3161–3163; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3071–3073.
- [186] a) K.-B. Lee, J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5588–5589; b) H. Zhang, K. B. Lee, Z. Li, C. A. Mirkin, *Nanotechnology* **2003**, *14*, 1113–1117.
- [187] T. A. Taton, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6305–6306.
- [188] I. Willner, F. Patolsky, J. Wasserman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1913–1916; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1861–1864.
- [189] a) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, P. Hazarika, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5944–5948; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5766–5770; b) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, U. Simon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *301*, 995–999.
- [190] a) L. Cognet, C. Tardin, D. Boyer, D. Choquet, P. Tamarat, B. Lounis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11350–11355; b) Y. F. Wang, D. W. Pang, Z. L. Zhang, H. Z. Zheng, J. P. Cao, J. T. Shen, *J. Med. Virol.* **2003**, *70*, 205–211; c) K. Sokolov, M. Follen, J. Aaron, I. Pavlova, A. Malpica, R. Lotan, R. Richards-Kortum, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1999–2004.
- [191] a) D. M. Willard, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 284–286; b) J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 247–257.
- [192] D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. C. García, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1225–1235.
- [193] a) W. R. Holland, D. G. Hall, *Phys. Rev. B* **1983**, *27*, 7765–7768; b) T. Kume, N. Nakagawa, S. Hayashi, K. Yamamoto, *Solid State Commun.* **1995**, *93*, 171–175; c) G. S. Agarwal, S. D. Gupta, *Phys. Rev. B* **1985**, *32*, 3607–3611.
- [194] a) I. Willner, E. Katz, B. Willner in *Biosensors and Their Applications* (Hrsg.: V. C. Yang, T. T. Ngo), Kluwer, New York, **2000**, S. 47–98; b) I. Willner, B. Willner, E. Katz, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *82*, 325–355; c) L. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 560–568; d) I. Willner, B. Willner, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 222–230; e) F. A. Armstrong, H. A. Heering, J. Hirst, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 169–179.
- [195] P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. G. Whitaker, *Prog. React. Kinet.* **1991**, *16*, 55–155.
- [196] a) Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1285–1289; b) W. Schuhmann, T. J. Ohara, H.-L. Schmidt, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1394–1397; c) Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2615–2620; d) I. Willner, A. Riklin, B. Shoham, D. Rivenzon, E. Katz, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 912–915; e) I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10965–10966; f) A. Badia, R. Carlini, A.

- Fernandez, F. Battaglini, S. R. Mikkelsen, A. M. English, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7053–7060.
- [197] S. A. Emr, A. M. Yacynych, *Electroanalysis* **1995**, *6*, 913–923.
- [198] a) I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A. F. Bückmann, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10321–10322; b) E. Katz, A. Riklin, V. Heleg-Shabtai, I. Willner, A. F. Bückmann, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 45–58.
- [199] a) O. A. Raitman, E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6487–6496; b) O. A. Raitman, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Chem. Commun.* **2002**, *1936*–1937.
- [200] a) L.-H. Guo, G. McLendon, H. Razafitrimo, Y. Gao, *J. Mater. Chem.* **1996**, *6*, 369–374; b) H. Zimmermann, A. Lindgren, W. Schuhmann, L. Gorton, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 592–599.
- [201] a) J. Zhao, R. W. Henkens, J. Stonehurner, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *327*, 109–119; b) A. L. Crumbliss, S. C. Perine, J. Stonehurner, K. R. Tubergen, J. Zhao, R. W. Henkens, J. P. O'Daly, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 483–490; c) J. Zhao, J. P. O'Daly, R. W. Henkens, J. Stonehurner, A. L. Crumbliss, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 493–502; d) S. Bharathi, M. Nogami, *Analyst* **2001**, *126*, 1919–1922; e) S. Liu, H. Ju, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1488–1493; f) X.-Y. Wang, H. Zhong, Y. Lv, H.-Y. Chen, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 1054–1055; g) S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 177–183; h) S. Liu, H. Ju, *Analyst* **2003**, *128*, 1420–1424; i) H.-Y. Gu, R.-X. Sa, S.-S. Yuan, H.-Y. Chen, A.-M. Yu, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 934–935; j) T. Liu, J. Zhong, X. Gan, C. Fan, G. Li, N. Matsuda, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 1364–1366; k) L. Wang, E. Wang, *Electrochim. Commun.* **2004**, *6*, 225–229; l) S. Liu, Z. Dai, H. Chen, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 963–969; m) Y. Zhang, P. He, N. Hu, *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 1981–1988; n) S. Xu, X. Han, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1117–1120.
- [202] X. Han, W. Cheng, Z. Zhang, S. Dong, E. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1556*, 273–277.
- [203] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science* **2003**, *299*, 1877–1881.
- [204] V. Pardo-Yissar, E. Katz, J. Wasserman, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 622–623.
- [205] M. L. Curri, A. Agostiano, G. Leo, A. Mallardi, P. Cosma, M. D. Monica, *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *22*, 449–452.
- [206] a) P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 788–800; b) M. M. Alvarez, J. T. Khouri, T. G. Schaaff, M. N. Shafiqullin, I. Vezmar, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3706–3712; c) A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13226–13329; d) L. Brus, *Appl. Phys. A* **1991**, *53*, 465–474.
- [207] a) R. F. Khairutdinov, *Colloid J.* **1997**, *59*, 535–548; b) *Single Charge Tunneling: Coulomb Blockade Phenomena in Nanostructures* (Hrsg.: H. Grabert, M. Devoret), Plenum, New York, **1992** (NATO ASI Ser. Ser. B).
- [208] a) L. N. Lewis, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2693–2730; b) V. Kesavan, P. S. Sivanand, S. Chandrasekaran, Y. Koltypin, A. Gedanken, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3729–3730; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3521–3523; c) R. Schlögl, S. B. A. Hamid, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1656–1667; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1628–1637.
- [209] L. He, M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, M. J. Natan, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9071–9077.
- [210] a) S. Kubitschko, J. Spinke, T. Brückner, S. Pohl, N. Oranthe, *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 112–122; b) L. A. Lyon, M. D. Musick, M. J. Natan, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5177–5183; c) P. Englebienne, A. V. Hoonacker, M. Verhas, *Analyst* **2001**, *126*, 1645–1651.
- [211] M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Eken, M. Taylan, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2181–2187.
- [212] J. Wang, *Stripping Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, **1985**.
- [213] N. Zhu, H. Cai, P. He, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 181–189.
- [214] J. Wang, J. Li, A. J. Baca, J. Hu, F. Zhou, W. Yan, D.-W. Pang, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3941–3945.
- [215] J. Wang, D. Xu, A.-N. Kawde, R. Polksky, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5576–5581.
- [216] L. Authier, C. Grossiord, P. Brossier, B. Limoges, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4450–4456.
- [217] H. Cai, Y. Xu, N. Zhu, P. He, Y. Fang, *Analyst* **2002**, *127*, 803–808.
- [218] H. Cai, N. Zhu, Y. Jiang, P. He, Y. Fang, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1311–1319.
- [219] J. Wang, G. Liu, Q. Zhu, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6218–6222.
- [220] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192–1199.
- [221] T. M.-H. Lee, L.-L. Li, I.-M. Hsing, *Langmuir* **2003**, *19*, 4338–4343.
- [222] J. Wang, R. Polksky, D. Xu, *Langmuir* **2001**, *17*, 5739–5741.
- [223] J. Wang, O. Rincón, R. Polksky, E. Dominguez, *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 83–86.
- [224] J. Richter, *Physica E* **2003**, *16*, 157–173.
- [225] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778.
- [226] Y. Eichen, E. Braun, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Acta Polym.* **1998**, *49*, 663–670.
- [227] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, A. De Vita, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 841–844.
- [228] O. D. Velev, E. W. Kaler, *Langmuir* **1999**, *15*, 3693–3698.
- [229] a) S.-J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *295*, 1503–1506; b) L. Moreno-Hagelsieb, P. E. Lobert, R. Pampin, D. Bourgeois, J. Remacle, *Sens. Actuators B* **2004**, *98*, 269–274.
- [230] M. Urban, R. Möller, W. Fritzsch, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 1077–1081.
- [231] A. Doron, E. Katz, I. Willner, *Langmuir* **1995**, *11*, 1313–1317.
- [232] H. Cai, C. Xu, P. He, Y. Fang, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *510*, 78–85.
- [233] H. Lin, H. Zhao, J. Li, J. Tang, M. Duan, L. Jiang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 817–820.
- [234] a) M. Wang, L. Wang, G. Wang, X. Ji, Y. Bai, T. Li, S. Gong, J. Li, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 575–582; b) C.-X. Lei, F.-C. Gong, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Sens. Actuators B* **2003**, *96*, 582–588; c) S.-Q. Hua, J.-W. Xie, Q.-H. Xu, K.-T. Rong, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Talanta* **2003**, *61*, 769–777; d) H. Wang, J. Li, Y. Ding, C. Lei, G. Shen, R. Yu, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *501*, 37–43; e) C.-X. Lei, F.-C. Gong, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Sens. Actuators B* **2003**, *96*, 582–588; f) M. Wang, C. Sun, L. Wang, X. Ji, Y. Bai, T. Li, J. Li, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 1117–1125.
- [235] E. Katz, A. N. Shipway, I. Willner in *Nanoscale Materials* (Hrsg.: L. M. Liz-Marzan, P. Kamat), Kluwer, Dordrecht, **2003**, S. 5–78.
- [236] J. Wang, G. Liu, R. Polksky, A. Merkoçi, *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 722–726.
- [237] J. Wang, G. Liu, A. Merkoçi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3214–3215.
- [238] a) A. Kawde, J. Wang, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 101–107; b) J. Wang, G. Liu, M. R. Jan, Q. Zhu, *Electrochim. Commun.* **2003**, *5*, 1000–1004.
- [239] a) J. Wang, R. Polksky, A. Merkoçi, K. Turner, *Langmuir* **2003**, *19*, 989–991; b) J. Wang, G. Liu, G. Rivas, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4667–4671.
- [240] D. Trau, W. J. Yang, M. Seydack, F. Carusu, N.-T. Yu, R. Renneberg, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5480–5486.
- [241] L. Alfanta, A. Singh, I. Willner, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 91–102.
- [242] D. A. Buttry, M. D. Ward, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1355–1379.
- [243] a) X. C. Zhou, S. J. O'Shea, S. F. Y. Li, *Chem. Commun.* **2000**, 953–954; b) F. Patolsky, K. T. Ranjit, A. Lichtenstein, I.

- Willner, *Chem. Commun.* **2000**, 1025–1026; c) T. Liu, J. Tang, L. Jiang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 313, 3–7.
- [244] S. Han, J. Lin, M. Satjapipat, A. J. Baca, F. Zhou, *Chem. Commun.* **2001**, 609–610.
- [245] T. Liu, J. Tang, H. Zhao, Y. Deng, L. Jiang, *Langmuir* **2002**, 18, 5624–5626.
- [246] I. Willner, F. Patolsky, Y. Weizmann, B. Willner, *Talanta* **2002**, 56, 847–856.
- [247] Y. Weizmann, F. Patolsky, I. Willner, *Analyst* **2001**, 126, 1502–1504.
- [248] a) T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, 289, 1757–1760; b) J. Reichert, A. Csáki, J. M. Köhler, W. Fritzsche, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 6025–6029; c) T. A. Taton, G. L. Lu, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5164–5165; d) J. J. Storhoff, S. S. Marla, P. Bao, S. Hagenow, H. Mehta, A. Lucas, V. Garimella, T. Patno, W. Buckingham, W. Cork, U. R. Müller, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 875–883.
- [249] a) S. Y. Park, D. Stroud, *Physica B* **2003**, 338, 353–356; b) R. Jin, G. Wu, Z. Li, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1643–1654.
- [250] S. Schultz, D. R. Smith, J. J. Mock, D. A. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 996–1001.
- [251] A. P. Han, M. Dufva, E. Belleville, C. B. V. Christensen, *Lab Chip* **2003**, 3, 329–332.
- [252] R. C. Bailey, J.-M. Nam, C. A. Mirkin, J. T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13541–13547.
- [253] a) G. Bauer, F. Pittner, T. Schalkhammer, *Microchim. Acta* **1999**, 131, 107–114; b) F. Frederix, J.-M. Friedt, K.-H. Choi, W. Laureyn, A. Campitelli, D. Mondelaers, G. Maes, G. Borghs, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6894–6900; c) L. Olofsson, T. Rindzевичius, I. Pfeiffer, M. Käll, F. Höök, *Langmuir* **2003**, 19, 10414–10419.
- [254] K. Glynnou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, V. Syriopoulou, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4155–4160.
- [255] Z. Ma, S.-F. Sui, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2280–2283; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2176–2179.
- [256] B. Dragnea, C. Chen, E.-S. Kwak, B. Stein, C. C. Kao, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6374–6375.
- [257] C. Bohren, D. Huffmann, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, New York, 1983.
- [258] G. Raschke, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, *Nano Lett.* **2003**, 3, 935–938.
- [259] a) S. R. Nicewarner-Peña, A. J. Carado, K. E. Shale, C. D. Keating, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7360–7367; b) S. R. Nicewarner-Peña, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science* **2001**, 294, 137–141; c) N. S. Birenbaum, B. T. Lai, C. S. Chen, D. H. Reich, G. J. Meyer, *Langmuir* **2003**, 19, 9580–9582.
- [260] J.-M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **2003**, 301, 1884–1886.
- [261] D. A. Schultz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 13–22.
- [262] M. G. Ryadnov, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9388–9394.
- [263] S.-F. Cheng, L.-K. Chau, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 16–21.
- [264] E. Hutter, M.-P. Pilani, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 6497–6499.
- [265] a) A. J. Haes, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10596–10604; b) J. C. Riboh, A. J. Haes, A. D. McFarland, C. R. Yonzon, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 1772–1780; c) A. J. Haes, S. Zou, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 109–116.
- [266] M. Zayats, S. P. Pogorelova, A. B. Kharitonov, O. Lioubashevski, E. Katz, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 6108–6114.
- [267] a) O. Lioubashevski, V. Chegel, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7133–7143; b) M. Zayats, A. B. Kharitonov, S. P. Pogorelova, O. Lioubashevski, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16006–16014.
- [268] a) H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2957–2975; b) A. Campion, P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 241–250.
- [269] a) C. D. Keating, K. M. Kovaleski, M. J. Natan, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 9404–9413; b) C. D. Keating, K. M. Kovaleski, M. J. Natan, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 9414–9425.
- [270] a) F. T. Docherty, M. Clark, G. McNay, D. Graham, W. E. Smith, *Faraday Discuss.* **2004**, 126, 281–288; b) Y. C. Cao, R. Jin, J.-M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14676–14677; c) K. Faulds, W. E. Smith, D. Graham, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 412–417.
- [271] a) D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell, M. D. Porter, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5936–5943; b) S. Xu, X. Ji, W. Xu, X. Li, L. Wang, Y. Bai, B. Zhao, Y. Ozaki, *Analyst* **2004**, 129, 63–68.
- [272] a) B. M. Lingerfelt, H. MattoSSI, E. R. Goldman, M. Mauro, G. P. Anderson, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4043–4049; b) L.-Y. Wang, L. Wang, F. Gao, Z.-Y. Yu, Z.-M. Wu, *Analyst* **2002**, 127, 977–980; c) L.-Y. Wang, X.-W. Kan, M.-C. Zhang, C.-Q. Zhu, L. Wang, *Analyst* **2002**, 127, 1531–1534; d) L. Wang, L. Wang, C. Zhu, X. W. Wei, X. Kan, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 468, 35–41; e) L.-Y. Wang, Y.-Y. Zhou, L. Wang, C.-Q. Zhu, Y.-X. Li, F. Gao, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 466, 87–92; f) E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. MattoSSI, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran, G. P. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6378–6382; g) D. Gerion, W. J. Parak, S. C. Williams, D. Zanchet, C. M. Michelet, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7070–7074; h) S. Kim, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14652–14653; i) W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, 281, 2016–2018.
- [273] J. Malicka, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 306, 213–218.
- [274] N. Lochner, C. Lobmaier, M. Wirth, A. Leitner, F. Pittner, F. Gabor, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, 56, 469–477.
- [275] F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13918–13919.
- [276] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. MattoSSI, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 301–310.
- [277] I. L. Medintz, S. A. Trammell, H. MattoSSI, J. M. Mauro, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 30–31.
- [278] a) X. Zhao, R. Tapec-Dytioco, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11474–11475; b) W. Yang, C. G. Zhang, H. Y. Qu, H. H. Yang, J. G. Xua, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 503, 163–169.
- [279] a) *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* (Hrsg.: U. Häfeli, W. Schütt, J. Teller, M. Zborowski), Plenum, New York, 1997; b) K. Nishimura, M. Hasegawa, Y. Ogura, T. Nishi, K. Kataoka, H. Handa, M. Abe, *J. Appl. Phys.* **2002**, 91, 8555–8556; c) C. Grüttner, J. Teller, *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 194, 8–15; d) R. V. Mehta, R. V. Upadhyay, S. W. Charles, C. N. Ramchand, *Biotechnol. Tech.* **1997**, 11, 493–496; e) D. C. F. Chan, D. B. Kirpotin, P. A. Bunn, Jr., *J. Magn. Magn. Mater.* **1993**, 122, 374–378; f) R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2897–2898; g) P. M. Dey, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 140, 385–390; h) B. A. Schwartz, G. R. Gray, *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, 181, 542–548; i) Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D* **2003**, 36, R167–R181; j) C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D* **2003**, 36, R198–R206; k) J. Ugelstad, P. Stenstad, L. Kilaas, W. S. Prestvik, R. Herje, A. Berge, E. Hornes, *Blood Purif.* **1993**, 11, 349–369; l) M. Uhlén, *Nature* **1989**, 340, 733–744; m) *Advances in Biomagnetic Separation* (Hrsg.: M. Uhlén, E. Hornes, O. Olsviki), Eaton, Natick, 1994; n) M. Shinkai, *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, 94, 606–613; o) A. S. Arbab, L. A. Bashaw, B. R. Miller, E. K. Jordan, B. K. Lewis, H. Kalish, J. A. Frank, *Radiology* **2003**, 229, 838–846; p) Y. H. Zhu, X. L. Yang, P. L. Li, H. Ying, *Progr. Chem.* **2003**, 15, 512–517; q) A. M. Koch, F. Reynolds, M. F. Kircher, H. P. Merkle, R.

- Weissleder, L. Josephson, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1115–1121; r) A. K. Gupta, A. S. G. Curtis, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3029–3040; s) D. Wang, J. He, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 409–413; t) A. K. Gupta, C. Berry, M. Gupta, A. Curtis, *IEEE Trans. Nanobioscience* **2003**, *2*, 255–261.
- [280] a) F.-H. Wang, T. Yoshitake, D.-K. Kim, M. Muhammed, B. Bjelke, Jan Kehr, *J. Nanopart. Res.* **2003**, *5*, 137–146; b) S. Bucak, D. A. Jones, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 477–484.
- [281] a) S. V. Sonti, A. Bose, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *170*, 575–585; b) J. Roger, J. N. Pons, R. Massart, A. Halbreich, J. C. Bacri, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **1999**, *5*, 321–325.
- [282] a) H. Gu, P.-L. Ho, K. W. T. Tsang, C.-W. Yu, B. Xu, *Chem. Commun.* **2003**, 1966–1967; b) H. Gu, P.-L. Ho, K. W. T. Tsang, L. Wang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15702–15703.
- [283] X. Zhao, R. Tapec-Dytico, K. Wang, W. Tan, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3476–3483.
- [284] D. L. Graham, H. A. Ferreira, P. P. Freitas, J. M. S. Cabral, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 483–488.
- [285] M. Fang, P. S. Grant, M. J. McShane, G. B. Sukhorukov, V. O. Golub, Y. M. Lvov, *Langmuir* **2002**, *18*, 6338–6344.
- [286] J. Hoinville, A. Bewick, D. Gleeson, R. Jones, O. Kasutich, E. Mayes, A. Nartowski, B. Warne, J. Wiggins, K. Wong, *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 7187–7189.
- [287] L. Shen, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, *Langmuir* **1999**, *15*, 447–453.
- [288] T. Hyeon, *Chem. Commun.* **2003**, 927–934.
- [289] S. Sun, H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204–8205.
- [290] M. Chen, S. Yamamuro, D. Farrell, S. A. Majetich, *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 7551–7553.
- [291] a) X. Gao, K. M. K. Yu, K. Y. Tam, S. C. Tsang, *Chem. Commun.* **2003**, 2998–2999; b) H.-H. Yang, S.-Q. Zhang, X.-L. Chen, Z.-X. Zhuang, J.-G. Xu, X.-R. Wang, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1316–1321.
- [292] a) T. Tanaka, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3518–3522; b) C. R. Martin, D. T. Mitchell, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 322A–327A.
- [293] a) A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S. W. Chang, C. Spagnoli, K. V. P. M. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R. A. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1684–1685; b) M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Shen, H. Zhang, N. Gu, *Colloids Surf. A* **2003**, *212*, 219–226; c) S.-H. Huang, M.-H. Liao, D.-H. Chen, *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1095–1100; d) D. Cao, P. He, N. Hu, *Analyst* **2003**, *128*, 1268–1274.
- [294] a) M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayashi, *Biocatalysis* **1991**, *5*, 61–69; b) M.-H. Liao, D.-H. Chen, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1723–1727.
- [295] M.-H. Liao, D.-H. Chen, *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1913–1917.
- [296] S. Mornet, A. Vekris, J. Bonnet, E. Duguet, F. Grasset, J.-H. Choy, J. Portier, *Mater. Lett.* **2000**, *42*, 183–188.
- [297] L. E. Euliss, S. G. Grancharov, S. O'Brien, T. J. Deming, G. D. Stucky, C. B. Murray, G. A. Held, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1489–1493.
- [298] a) *Biomimetic Materials Chemistry* (Hrsg.: S. Mann), VCH, New York, **1996**; b) *Chem. Commun.* **2004**, 1–4 (Focus Article).
- [299] a) F. C. Meldrum, V. J. Wade, D. L. Nimmo, B. R. Heywood, S. Mann, *Nature* **1991**, *349*, 684–687; b) F. C. Meldrum, B. R. Heywood, S. Mann, *Science* **1992**, *257*, 522–523; c) T. Douglas, V. T. Stark, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1828–1830; d) T. Douglas, M. Young, *Nature* **1998**, *393*, 152–155; e) T. Douglas, M. Young, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 679–681; f) C. E. Flynn, S.-W. Lee, B. R. Peelle, A. M. Belcher, *Acta Mater.* **2003**, *51*, 5867–5880; g) M. L. Flenniken, D. A. Willits, S. Brumfield, M. J. Young, T. Douglas, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1573–1576.
- [300] S. Mann, F. C. Meldrum, *Adv. Mater.* **1991**, *3*, 316–318.
- [301] D. P. E. Dickson, S. A. Walton, S. Mann, K. Wong, *Nanostruct. Mater.* **1997**, *9*, 595–598.
- [302] K. K. W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D. D. Awschalom, S. Mann, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 279–285.
- [303] a) K. C. Martin, S. M. Villano, P. R. McCurdy, D. C. Zapien, *Langmuir* **2003**, *19*, 5808–5812; b) M. Tominaga, I. Taniguchi, *Chem. Lett.* **2003**, 954–955; c) F. Marken, D. Patel, C. E. Madden, R. C. Millward, S. Fletcher, *New J. Chem.* **2002**, *26*, 259–263.
- [304] M. Allen, D. Willits, J. Mosolf, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1562–1565.
- [305] a) M. Bozzi, G. Mignogna, S. Stefanini, D. Barra, C. Longhi, P. Valenti, E. Chiancone, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3259–3265; b) A. Ilari, S. Stefanini, E. Chiancone, D. Tsernoglou, *Nat. Struct. Biochem. J.* **2000**, *7*, 38–43.
- [306] a) S. Stefanini, S. Cavallo, B. Montagnini, E. Chiancone, *Biochem. J.* **1999**, *338*, 71–75; b) X. Yang, E. Chiancone, S. Stefanini, A. Ilari, N. D. Chasteen, *Biochem. J.* **2000**, *349*, 783–786.
- [307] T. Douglas, E. Strable, D. Willits, A. Aitouchen, M. Libera, M. Young, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 415–418.
- [308] E. Bäuerlein, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 636–664; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 614–641.
- [309] R. P. Blakemore, D. Maratea, R. S. Wolfe, *J. Bacteriol.* **1979**, *140*, 720–729.
- [310] T. Matsunaga, F. Tadokoro, N. Nakamura, *IEEE Trans. Magn.* **1990**, *26*, 1557–1559.
- [311] T. Matsunaga, T. Sakaguchi, F. Tadokoro, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *35*, 651–655.
- [312] K. H. Scheifer, D. Schuler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig, M. Kohler, *Syst. Appl. Microbiol.* **1991**, *14*, 379–385.
- [313] a) Y. A. Gorby, T. J. Beveridge, R. P. Blakemore, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 834–841; b) T. Matsunaga, *Trends Biotechnol.* **1991**, *9*, 91–95.
- [314] T. Matsunaga, H. Takeyama, *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 391–394.
- [315] a) N. Nakamura, K. Hashimoto, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 268–272; b) N. Nakamura, J. G. Burgess, K. Yagiuda, S. Kudo, T. Sakaguchi, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2036–2039; c) N. Nakamura, T. Matsunaga, *Anal. Chim. Acta* **1993**, *281*, 585–589.
- [316] T. Matsunaga, M. Kawasaki, X. Yu, N. Tsujimura, N. Nakamura, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3551–3554.
- [317] K. Sode, S. Kudo, T. Sakaguchi, N. Nakamura, T. Matsunaga, *Biotechnol. Tech.* **1993**, *7*, 688–694.
- [318] H. Takeyama, A. Yamazawa, N. Nakamura, T. Matsunaga, *Biotechnol. Tech.* **1995**, *9*, 355–360.
- [319] a) J. Li, X. He, Z. Wu, K. Wang, G. Shen, R. Yu, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 191–198; b) V. Kourilov, M. Steinitz, *Anal. Biochem.* **2002**, *311*, 166–170; c) Tadashi Matsunaga, F. Ueki, K. Obata, H. Tajima, T. Tanaka, H. Takeyama, Y. Goda, S. Fujimoto, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *475*, 75–83; d) H. Furukawa, R. Shimojyo, N. Ohnishi, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 478–483.
- [320] R. Wilson, *Chem. Commun.* **2003**, 108–109.
- [321] Z.-L. Zhi, Y. Murakami, Y. Morita, Q. Hasan, E. Tamiya, *Anal. Biochem.* **2003**, *318*, 236–243.
- [322] J. M. Perez, F. J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10192–10193.
- [323] J. Wang, A.-N. Kawde, A. Erdem, M. Salazar, *Analyst* **2001**, *126*, 2020–2024.
- [324] J. Wang, A.-N. Kawde, *Electrochim. Commun.* **2002**, *4*, 349–352.
- [325] J. Wang, D. Xu, R. Polksky, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4208–4209.
- [326] H. Cai, Y. Wang, P. He, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 165–172.

- [327] J. Wang, G. Liu, A. Merkoçi, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *482*, 149–155.
- [328] T. Yoshino, T. Tanaka, H. Takeyama, T. Matsunaga, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 661–666.
- [329] a) R. Hirsch, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12053–12054; b) E. Katz, L. Sheeney-Haj-Ichia, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4138–4148.
- [330] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4724–4737; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4576–4588.
- [331] a) E. Katz, T. Lötzbeyer, D. D. Schlereth, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *373*, 189–200; b) I. Willner, A. Riklin, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1535–1539.
- [332] a) A. Bardea, E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9114–9119; b) M. Zayats, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14724–14735.
- [333] A. F. Bückmann, V. Wray, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1992**, *15*, 303–310.
- [334] E. Katz, L. Sheeney-Haj-Ichia, A. F. Bückmann, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1399–1402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1343–1346.
- [335] E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10290–10291.
- [336] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [337] Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3452–3454.
- [338] F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2474–2478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2372–2376.
- [339] F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, I. Willner, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 943–948.
- [340] a) R. Raiteri, M. Grattarola, H. J. Butt, P. Skládal, *Sens. Actuators B* **2001**, *79*, 115–126; b) M. Sepaniak, P. Datskos, N. Lavrik, C. Tipple, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 568A–575A.
- [341] M. Lahav, C. Durkan, R. Gabai, E. Katz, I. Willner, M. E. Welland, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4219–4221; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4095–4098.
- [342] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettinger, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, C. Gerber, J. K. Gimzewski, *Science* **2000**, *288*, 316–318.
- [343] R. P. Cowburn, A. M. Moulin, M. E. Welland, *Appl. Phys. Lett.* **1997**, *71*, 2202–2204.
- [344] E. Paleček, S. Billová, L. Havran, R. Kizwek, A. Mičulková, F. Jelen, *Talanta* **2002**, *56*, 919–930.
- [345] Y. Weizmann, F. Patolsky, O. Lioubashevski, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1073–1080.
- [346] N. I. Kovtyukhova, T. E. Mallouk, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4354–4363.
- [347] W. E. Ford, O. Harnack, A. Yasuda, J. M. Wessels, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1793–1797.
- [348] W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 253–256.
- [349] S. R. Hall, W. Shenton, H. Engelhardt, S. Mann, *ChemPhysChem* **2001**, *2*, 184–186.
- [350] M. Pazirandeh, S. Baral, J. Cambell, *Biomimetics* **1992**, *1*, 41–47.
- [351] a) R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, R. Wahl, G. Sadowski, K. J. Böhm, E. Unger, *Thin Solid Films* **1997**, *305*, 248–253; b) M. Mertig, R. Kirsch, W. Pompe, *Appl. Phys. A* **1998**, *66*, S723–S727; c) W. Fritzsche, K. J. Böhm, E. Unger, J. M. Köhler, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *75*, 2854–2856.
- [352] E. Unger, K.-J. Böhm, W. Vater, *Electron Microsc. Rev.* **1990**, *3*, 355–395.
- [353] S. Behrens, K. Rahn, W. Habicht, K.-J. Böhm, H. Rösner, E. Dinjus, E. Unger, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1621–1625.
- [354] a) M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 859–868; b) U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1098–1120; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1034–1054; c) E. S. Györvary, A. O’Riordan, A. J. Quinn, G. Redmond, D. Pum, U. B. Sleytr, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 315–319; d) U. B. Sleytr, M. Sára, D. Pum, B. Schuster, *Prog. Surf. Sci.* **2001**, *68*, 231–278; e) D. Pum, U. B. Sleytr, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 8–12.
- [355] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625–627.
- [356] B. Yang, S. Kamiya, K. Yoshida, T. Shimizu, *Chem. Commun.* **2004**, 500–501.
- [357] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568–594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550–575.
- [358] a) R. Djalali, Y. Chen, H. Matsui, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13660–13661; b) R. Djalali, Y. Chen, H. Matsui, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5873–5879; c) L. Yu, I. A. Banerjee, H. Matsui, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14837–14840.
- [359] a) H. Matsui, B. Gologan, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3383–3386; b) T. Shimizu, M. Kogiso, M. Masuda, *Nature* **1996**, *383*, 487–488; c) M. Kogiso, S. Ohnishi, K. Yase, M. Masuda, T. Shimizu, *Langmuir* **1998**, *14*, 4978–4986; d) T. Shimizu, M. Kogiso, M. Masuda, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6209–6210.
- [360] J. M. Slocik, J. T. Moore, D. W. Wright, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 169–173.
- [361] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.-M. Lin, H. Jaeger, S. L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4527–4532.
- [362] I. A. Banerjee, L. Yu, H. Matsui, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 283–287.
- [363] a) R. D. Vale, *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 445–450; b) C. G. dos Remedios, P. D. J. Moens, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1228*, 99–124.
- [364] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 692–695.
- [365] a) N. C. Seeman, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 357–363; b) N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220–3238; c) X. Yang, L. A. Wenzler, J. Qi, X. Li, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9779–9786; d) J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277–280; e) D. Liu, M. Wang, Z. Deng, R. Walulu, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2324–2325.
- [366] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 32–35.
- [367] a) Y. Liu, W. Meyer-Zaika, S. Franzka, G. Schmid, M. Tsoli, H. Kuhn, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2959–2963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2853–2857; b) G. Wang, R. W. Murray, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 95–101.
- [368] O. Harnack, W. E. Ford, A. Yasuda, J. M. Wessels, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 919–923.
- [369] a) S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375–381; b) M. Ratner, *Nature* **1999**, *397*, 480–481.
- [370] Y. Asai, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 4647–4652.
- [371] a) T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2221–2228; b) D. Hennig, J. F. R. Archilla, J. Agarwal, *Physica D* **2003**, *180*, 256–272; c) M. A. O’Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6076–6080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5896–5900.
- [372] a) D. D. Eley, R. B. Leslie, *Nature* **1963**, *197*, 898–899; b) H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407–410.
- [373] a) P. Tran, B. Alavi, G. Gruner, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 1564–1567; b) L. T. Cai, H. Tabata, T. Kawai, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 3105–3106; c) Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka, M. Shimomura, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6165–6166.
- [374] a) P. J. de Pablo, F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, P. Herrero, A. M. Baró, P. Ordejón, J. M. Soler, E. Artacho, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4992–4995; b) M. Bockrath, N. Markovic, A. Shepard, M. Tinkham, L. Gurevich, L. P. Kouwenhoven, M. W. Wu, L. L. Sohn, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 187–190; c) A. J. Storm, J. van Noort, S. de Vries, C. Dekker, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 3881–3883.
- [375] C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 359–363.

- [376] F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2429–2433; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2323–2327.
- [377] T. Yonezawa, S. Onoue, N. Kimizuka, *Chem. Lett.* **2002**, 1172–1173.
- [378] H. Nakao, H. Shiigi, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Nagaoka, S. Sugiyama, T. Ohtani, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1391–1394.
- [379] R. J. Preston, *Radiat. Res.* **1997**, *147*, 529–534.
- [380] a) M. A. Blasco, *Eur. J. Cell Biol.* **2003**, *82*, 441–446; b) P. J. Perry, J. R. P. Arnold, T. C. Jenkins, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2001**, *10*, 2141–2156.
- [381] C. Testorelli, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2003**, *22*, 165–169.
- [382] Y. Weizmann, F. Patolsky, I. Popov, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 787–792.
- [383] a) J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, I. Mönch, H. K. Schackert, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *78*, 536–538; b) R. Hözel, N. Gajovic-Eichelmann, F. F. Bier, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 555–564.
- [384] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, *297*, 72–75.
- [385] K. Keren, R. S. Berman, E. Braun, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 323–326.
- [386] Z. Deng, C. Mao, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1545–1548.
- [387] J. Hu, Y. Zhang, H. Gao, M. Li, U. Hartmann, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 55–57.
- [388] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, *301*, 1882–1884.
- [389] H. Li, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 418–419.
- [390] a) Z. Dogic, S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 2417–2420; b) Z. Dogic, S. Fraden, *Langmuir* **2000**, *16*, 7820–7824.
- [391] S.-W. Lee, C. Mao, C. E. Flynn, A. M. Belcher, *Science* **2002**, *296*, 892–895.
- [392] a) S.-W. Lee, S. Kwan, A. M. Belcher, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 689–692; b) C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Science* **2004**, *303*, 213–217.
- [393] a) E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, S. Mann, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 413–417; b) M. Knez, M. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, T. P. Martin, K. Kern, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 116–124; c) A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, J. D. Cole, M. Kim, B. Gnade, A. Chatterji, W. F. Ochoa, T. Lin, J. E. Johnson, B. R. Ratna, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 867–870.
- [394] M. Knez, A. M. Bittner, F. Boes, C. Wege, H. Jeske, E. Mai, K. Kern, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1079–1082.
- [395] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C. M. Lieber, *Science* **2001**, *293*, 1289–1292.
- [396] a) R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. W. S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4984–4989; b) A. Star, J.-C. P. Gabriel, K. Bradley, G. Gruner, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 459–463.
- [397] a) J. Hahm, C. M. Lieber, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 51–54; b) Z. Li, Y. Chen, X. Li, T. I. Kamins, K. Nauka, R. S. Williams, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 245–247.
- [398] G. D. Bachand, S. B. Rivera, A. K. Boal, J. Gaudioso, J. Liu, B. C. Bunker, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 817–821.
- [399] a) C. Grogan, R. Raiteri, G. M. O'Connor, T. J. Glynn, V. Cunningham, M. Kane, M. Charlton, D. Leech, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 201–207; b) D. P. Allison, P. Hinterdorfer, W. H. Han, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 47–51; c) G. H. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, A. Majumdar, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 856–860.
- [400] a) H. Clausen-Schaumann, M. Rief, M. Seitz, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 89–92; b) K. M. Hansen, H.-F. Ji, G. H. Wu, R. Datar, R. Cote, A. Majumdar, T. Thundat, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1567–1571.
- [401] A. M. Rawlett, T. J. Hopson, I. Amlani, R. Zhang, J. Tresek, L. A. Nagahara, R. K. Tsui, H. Goronkin, *Nanotechnology* **2003**, *14*, 377–384.
- [402] W. Fritzsche, T. A. Taton, *Nanotechnology* **2003**, *14*, R63–R73.
- [403] R. Möller, A. Csaki, W. Fritzsche, *Tech. Mess.* **2003**, *70*, 582–584.
- [404] A. C. S. Samia, X. Chen, C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15736–15737.
- [405] P. R. Lockman, M. O. Oyewumi, J. M. Koziara, K. E. Roder, R. J. Mumper, D. D. Allen, *J. Controlled Release* **2003**, *93*, 271–282.
- [406] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Science* **2004**, *303*, 1818–1822.
- [407] a) A. K. Salem, P. C. Searson, K. W. Leong, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 668–671; b) Z. R. Cui, R. J. Mumper, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2003**, *20*, 103–137; c) D. Luo, E. Han, N. Belcheva, W. M. Saltzman, *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 333–341.
- [408] A. D. Miller, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 53–54.
- [409] A. A. G. Requicha, *Proc. IEEE* **2003**, *91*, 1922–1933.
- [410] a) H. J. De los Santos, *Proc. IEEE* **2003**, *91*, 1907–1921; b) M. Forshaw, R. Stadler, D. Crawley, K. Nikolic, *Nanotechnology* **2004**, *15*, S220–S223.
- [411] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 577–585.