

Selbstorganisation lebender Systeme mit funktionalen Nanomaterialien**

Zoran Popović, Matthias Otter, Gion Calzaferri und Luisa De Cola*

Professor Vincenzo Balzani gewidmet

Der Aufbau von großen Strukturen^[1] oder funktionalen supramolekularen Systemen^[2–12] aus Molekülen sowie das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den Molekülen oder zwischen den Molekülen und einem Substrat sind entscheidend für die Verwirklichung molekularer Funktioneinheiten.^[13,14] Nach dem Vorbild der Natur wurden einfache Systeme entworfen, die natürliche Vorgänge durch die Verknüpfung von biologischen Komponenten und abiotischen Materialien imitieren könnten,^[15–17] um Prozesse in biologischen Systemen aufzuklären^[18–20] oder einen Vorteil aus den Eigenschaften einer „nichtbiologischen“ Komponente in einer natürlichen Umgebung zu ziehen (in vivo und in vitro). Mit dem Ziel, die Lücke zwischen der nanoskopischen und der makroskopischen Welt zu schließen, oder um Strukturen nachzuempfinden, deren Ausmaße vergleichbar sind mit denen von biomakromolekularen Systemen, wurden in letzter Zeit Nanopartikel,^[21] Mikroplättchen^[22] und Nanoröhren^[23] hergestellt. Allerdings wurden bisher noch keine Versuche zur Selbstorganisation von Bakterien mithilfe von künstlichen funktionalen Nano- und Mikromaterialien beschrieben, die eine Kommunikation zwischen den Zellen ermöglichen.

Als ersten Schritt in Richtung eines Austausch von spezifischen Informationen zwischen synthetischen Systemen und/oder Bakterien haben wir einen biokompatiblen synthetischen Nanobehälter, den Zeolith L, funktionalisiert und

mit nichtpathogenen *Escherichia coli*-Bakterien verknüpft. Wir zeigen hier, dass das lebende System, das mit dem Zeolithen verbunden ist, leicht durch Fluoreszenzspektroskopie visualisiert werden kann. Überdies gelang es uns wegen der genau definierten Ausrichtung von Zeolith und Bakterium, zwei Bakterien so anzuordnen, dass sie über einen Nanobehälter verknüpft sind.

Zeolithe sind Netzwerke aus SiO_4^- - und AlO_4^- -Tetraedern. Jedes Al-Atom trägt in seiner Umgebung zu einer negativen Ladung bei, die durch die Einlagerung von Natrium-, Calcium- oder anderen Kationen in den großen Hohlräumen der Struktur kompensiert wird.^[24,25] Der Zeolith L enthält eindimensionale Kanäle, die den ganzen Kristall durchlaufen. Sie haben an der Öffnung einen Durchmesser von 0.71 nm und einen größten freien Durchmesser von 1.26 nm. Die Elementarzelle ist 0.75 nm lang, und die Mittenentfernung beträgt für zwei benachbarte Kanäle 1.84 nm (Abbildung 1).^[24,25]

Somit besteht ein Kristall mit einem Durchmesser von 550 nm aus etwa 80000 parallelen Kanälen. Eine wichtige Eigenschaft dieser Kristalle ist ihre Fähigkeit, verschiedenartige Moleküle einzulagern, z.B. Farbstoffmoleküle mit gewünschten Emissionseigenschaften. Außerdem können Kristalle mit verschiedenen Seitenverhältnissen und in verschiedenen Größen hergestellt werden, die von 30 nm bis zu mehreren tausend Nanometern reichen,^[27] und die Kanaleingänge können mit Molekülen chemisch modifiziert

[*] Z. Popović, M. Otter, Prof. Dr. L. De Cola

Physikalisches Institut und
Center for Nanotechnology, CenTech
Universität Münster
Heisenbergstraße 11, 48149 Münster (Deutschland)
Fax: (+49) 251-980-2834
E-Mail: decola@uni-muenster.de
Homepage: <http://www.uni-muenster.de/physik.pi/decola/>
Prof. Dr. G. Calzaferri
Departement für Chemie und Biochemie
Universität Bern
Freiestrasse 3, 3012 Bern (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Westfälische Wilhelms-Universität Münster, das Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen, den SFB 656, MoBiL Münster (Projekt PM1) und den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Projekt NF 200020-105140. Wir bedanken uns bei Dr. Kathrin Bissantz und Ramona Wesselmann für die *E. coli*-Proben, bei Dr. Dingyong Zhong für die Messungen am Rasterelektronenmikroskop und bei Dr. Arantzazu Zabala Ruiz für die Zeolith-Herstellung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

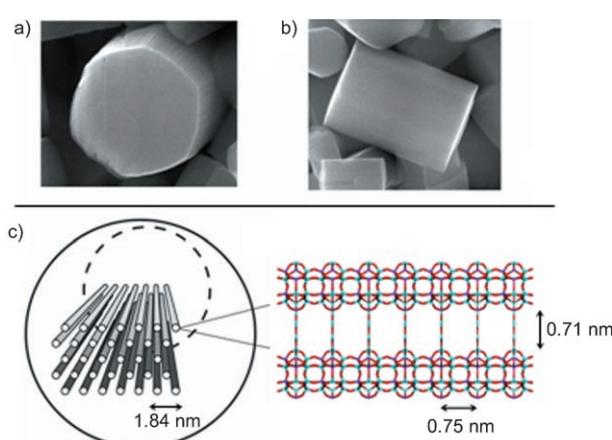


Abbildung 1. Netzwerk und Morphologie von Zeolith L: Die REM-Bilder zeigen die Basis (a) und den Mantel (b) des Kristalls. Das Bild im Kreis (c) verdeutlicht, dass der gesamte Kristall durch viele, streng parallele Kanäle durchzogen wird. Unten rechts ist ein Längsschnitt durch einen Kanal abgebildet.

werden, die die Funktion eines Stopfens erfüllen.^[26,28–30] Außerdem ist es möglich, die in den Kanälen befindlichen Kationen auszutauschen.^[31]

Wegen der Biokompatibilität von Zeolith-L-Kristallen und ihrer Struktur mit eindimensionalen Kanälen können mit ihnen künstliche Systeme realisiert werden, die sich durch neue Eigenschaften und Funktionen von üblichen Nanopartikeln abheben. Um zu beweisen, dass eine Aggregation nicht nur für Moleküle und Nanoobjekte möglich ist, sondern auch auf lebende Systeme ausgeweitet werden kann, haben wir eine Hybridstruktur aus Zellen und Zeolith L konstruiert. Bei dem von uns gewählten Organismus handelt es sich um das nichtpathogene Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (Zelllinie JM109).

Die äußere Zellmembran von *E. coli* ist mit Lipopolysacchariden überzogen, die an vielen Stellen phosphoryliert sind. Diese Eigenschaft haben wir für die Bildung von Hybrid-Gebilden genutzt, da eine elektrostatische Bindung zwischen den negativ geladenen äußeren Zellmembranen und dem positiv geladenen Zeolith-L-Kristall auftritt.

Interessanterweise waren wir in der Lage, die Ladung selektiv an den Kanaleingängen zu positionieren, sodass die übrige Kristalloberfläche ihre Eigenschaften behält. Im ersten Aufbauschritt befüllten wir einen 1 µm langen Zeolith L durch Ionenaustausch^[26] mit dem grün lumineszierenden organischen Farbstoff Pyronin (Abbildung 2).

Danach funktionalisierten wir die Kanaleingänge^[28] mit Aminoderivaten, die unter diesen Bedingungen protoniert vorliegen, sodass ein positiv geladenes System entsteht. Eine Mischung von aminofunktionalisierten Zeolithkristallen und Bakterien im Verhältnis von ungefähr 1:1 wurde eine Stunde bei 37°C in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) inkubiert. Wir beobachteten ein stabiles Hybrid-Gebilde, dessen Entstehung höchstwahrscheinlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, obwohl wir Wasserstoffbrücken nicht

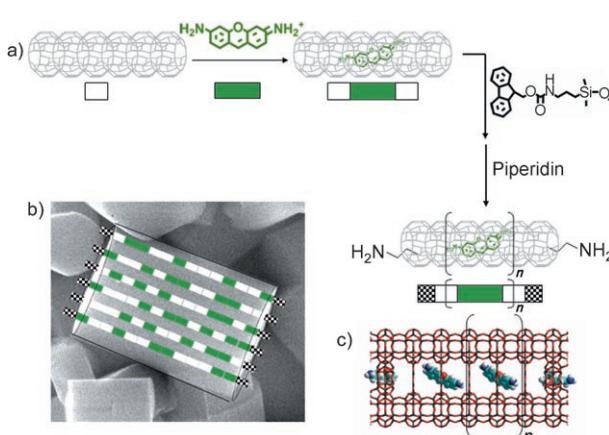


Abbildung 2. a) Vorgehensweise bei der Aminofunktionalisierung von Zeolith L, vereinfacht für einen einzigen Kanal gezeigt (die weißen Kästchen repräsentieren eine Elementarzelle): Nach dem Einführen des Fluoreszenzfarbstoffs Pyronin (grünes Rechteck) werden die Eingänge eines Kanals mit einem Silanderivat funktionalisiert. Die anschließende Hydrolyse der Amidfunktion führt zu einer primären Aminogruppe (schwarz-weißes Schachbrettmuster). b) Überlagerung einer schematischen Darstellung mit einem realen REM-Bild. c) Vereinfachte Ansicht eines funktionalisierten Kristalls mit eingelagerten Molekülen.

ausschließen können. Nichtfunktionalisierte Zeolith-L-Kristalle bilden erwartungsgemäß keine beständigen Hybrid-Gebilde mit den Bakterien.

Um dieses Gebilde näher zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie in Lösung genutzt. In den Aggregaten können die Zeolithe leicht durch Licht des Wellenlängenbereichs 420–490 nm erkannt werden, das den eingelagerten Farbstoff Pyronin anregt, der daraufhin grün emittiert (Abbildung 3a)

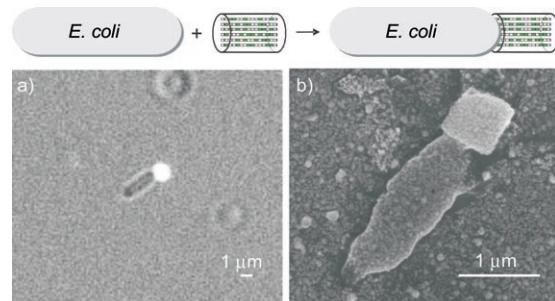


Abbildung 3. 1:1-Gebilde aus einem Zeolith-L-Kristall und einem Bakterium in PBS-Lösung: a) mit weißer und blauer Belichtung unter einem optischen Mikroskop; b) REM-Bild des Gebildes nach Verdampfen des Lösungsmittels und anschließender Beschichtung mit Silber.

Rasterelektronenmikroskopische Analysen an trockenen Proben bestätigen die Ergebnisse für die Gebilde in Lösung (Abbildung 3b). Es ist bemerkenswert, dass das Zeolith-Bakterium-Gebilde unter physiologischen Bedingungen lebensfähig ist und sich uneingeschränkt bewegen kann. Der Organismus ist in der Lage, mit einer so schweren Last wie einem 1 µm großen Zeolithkristall in der Lösung zu „schwimmen“ (siehe die Filme in den Hintergrundinformationen). Die Bewegungen des Bakteriums sind leicht unter einem Fluoreszenzmikroskop zu verfolgen, indem man das Licht erfasst, das bei Anregung vom eingelagerten Farbstoff (Pyronin) emittiert wird. Nach Beobachtung einiger Proben (siehe Abbildung 3 und die Filme in den Hintergrundinformationen) kann festgestellt werden, dass der Zeolith hauptsächlich an den Polen des Bakteriums haftet. Dieses Ergebnis stimmt mit Literaturdaten überein, die ebenfalls zeigen, dass sich Mikropartikel an den Enden der *E.-coli*-Bakterien anlagern,^[32] und obwohl die Gründe nicht vollständig aufgeklärt wurden, könnte dieses Verhalten mit unterschiedlichen Domänen auf der Zelloberfläche erklärt werden.^[33] Wir können nicht ausschließen, dass die beiden Komponenten – Zeolith und Bakterium – in den ersten Millisekunden nach dem Mischen zufällig zusammentreffen, woraufhin der Zeolith entlang der Zelle wandert, um eine bestimmte Art von Wechselwirkung zu maximieren. Wir möchten betonen, dass die Entstehung eines Gebildes kein vereinzelter Vorgang ist; vielmehr zeigen über 70 % der Bakterien in der Lösung dieses Verhalten. (Die Filme in den Hintergrundinformationen zeigen mehrere Bakterien (auch außerhalb des Fokus) an denen ein Zeolith hängt.)

Die lineare Form der Gebilde in Abbildung 3 führte uns zu der Frage, ob lebende Systeme in der Art organisiert werden können, dass sie einen Nanobehälter als Verknüpfung

nutzen. Um dieses Ziel zu erreichen, haben wir einen großen Überschuss an Bakterien mit den Zeolith-L-Kristallen inkubiert. Nach dem Mischen fanden wir unter dem Mikroskop lineare Strukturen, die nicht von einzelnen Zellen stammen konnten. Eine genaue Analyse ergab vielmehr, dass das Verhältnis von Zeolith und Bakterium jetzt 1:2 betrug. Abbildung 4 zeigt ein Hybrid-Gebilde, das durch optische Mi-

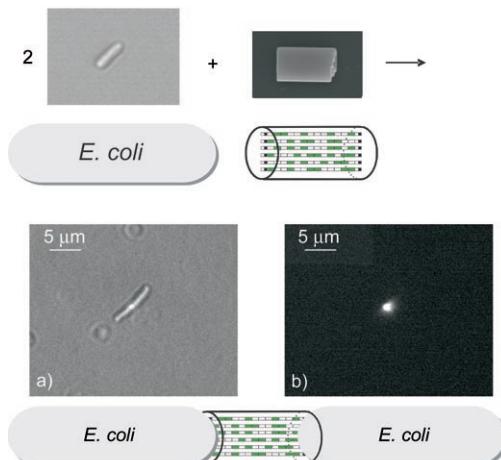


Abbildung 4. Selbstorganisation von zwei Bakterien mit einem funktionalisierten, 1 μm langen Zeolith-L-Kristall als Verknüpfung: a) Mit weißer und blauer Belichtung ist unter dem optischen Mikroskop das gesamte Aggregat erkennbar. b) In der gleichen Probe wird die Fluoreszenz des mit Pyronin gefüllten, verknüpfenden Zeoliths bei Anregung mit blauem Licht beobachtet.

kroskopie mit weißem und blauem Licht charakterisiert wurde. Wir wissen noch nicht, ob der Zeolith eine aktive Rolle bei der Kommunikation zwischen zwei verknüpften Systemen spielen kann, allerdings möchten wir betonen, dass unser Zeolith in seiner Rolle als Verknüpfung nicht nur biokompatibel und stabil, sondern auch funktional und modular ist. Die Kanäle, die von einem Ende des Zeoliths zum anderen verlaufen, können leer oder mit vielen verschiedenenartigen Chemikalien gefüllt sein.

Länge und Breite des Zeoliths lassen sich um bis zu drei Größenordnungen variieren, sodass topologische Effekte in lebenden Systemen erforscht werden können. Des Weiteren eröffnet die gezielte Funktionalisierung eines Zeolithen an verschiedenen Stellen und mit verschiedenen chemischen Gruppen zahllose Möglichkeiten, lebende Systeme und Materialien zu kombinieren.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die chemisch programmierte Selbstorganisation eines funktionalen Nanomaterials mit einem lebenden System möglich ist. Auf diese Weise können Anordnungen von Bakterien aufgebaut werden, und wir gehen davon aus, dass ein Austausch von spezifischen Informationen zwischen Zeolithen und Bakterien gelingen kann.

Experimentelles

Zeolithmodifikation: Der zylinderförmige Zeolith L wurde entsprechend Lit. [27] synthetisiert. Die Kristalle waren durchschnittlich

1.0 μm lang und hatten einen Durchmesser von 1.0 μm . Mit Pyronin gefüllte Kristalle wurden nach einer bekannten Ionenaustauschprozedur in Wasser erhalten.^[26] Die Einführung der Aminogruppen erfolgte wie in Lit. [28] beschrieben.

Experimente mit dem Bakterium *E. coli*: Eine Probe der *E. coli*-Zelllinie JM109 wurde frisch aus einer inkubierten Vorratslösung in LB-Medium gewonnen und in PBS-Lösung suspendiert. (Das LB-Medium wurde aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 1 Liter Wasser erhalten und mit NaOH auf pH 7 eingestellt.) Die Konzentration wurde anhand der optischen Dichte auf 10⁹ Zellen pro Milliliter geschätzt. Ungefähr 1 mg Zeolith wurde in 1 mL doppelt destilliertem Wasser suspendiert und 15 min in einem Ultraschallbad behandelt. Bakterien und Zeolith wurden im Verhältnis 1:1 oder mit einem Überschuss an Bakterien gemischt (hinsichtlich der Zahl von Bakterien und Zeolith-L-Kristallen; 100- μL -Aliquote) und 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurde ein Aliquot (10 μL) entnommen, 10fach verdünnt und auf einen Glasträger aufgebracht (10 μL). Der Tropfen wurde mit einem Deckglas bedeckt, versiegelt und sofort unter dem optischen Mikroskop untersucht.

Bei den Messungen wurde eine Schwarz-Weiß-Digitalkamera (Leica DFC350FXR2) verwendet, die auf das invertierte Leica-Mikroskop montiert war. Die Probe wurde durch ein Ölimmersionsobjektiv (63 \times /1.4) mit weißem Licht und/oder Fluoreszenzbelichtung (mit Filterwürfel H3, Leica) beobachtet. Die REM-Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop von LEO (Typ 1530VP, Beschleunigungsspannung 15 kV) erhalten. Proben hierfür wurden durch Aufbringen der Zeolith-*E. coli*-Mischung auf eine Glimmerplatte, Verdampfen des Lösungsmittels und Überziehen mit einer 4 nm dicken Silberschicht vorbereitet.

Eingegangen am 7. März 2007
Online veröffentlicht am 3. Juli 2007

Stichwörter: Bakterien · Fluoreszenz · Nanokanäle · Selbstorganisation · Zeolithe

- [1] A. D. Schlüter, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 245, 327.
- [2] F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry: An Introduction*, Wiley, New York, **1995**, S. 360.
- [3] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, New York, **1995**, S. 262.
- [4] J. W. Steed, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York, **2000**, S. 772.
- [5] J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, S. Silvi, F. Stoddart, *Science* **2004**, 303, 1845–1849.
- [6] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 723–732.
- [7] D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *Science* **2002**, 295, 2403–2407.
- [8] B. Grzybowski, G. M. Whitesides, *Science* **2002**, 295, 2418–2421.
- [9] W. T. S. Huck in *Nanoscale Assembly-Chemical Techniques*, Springer, Cambridge, **2005**, S. 260.
- [10] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 91–116; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89–112.
- [11] S. I. Stupp, V. LeBonheur, K. Walker, L. S. Li, K. E. Huggins, M. Keser, A. Amstutz, *Science* **1997**, 276, 384–389.
- [12] K. B. Yoon, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 29–40.
- [13] V. Balzani, A. Credi, B. Ferrer, S. Silvi, M. Venturi in *Molecular Machines* (Hrsg.: T. R. Kelly), Springer, Heidelberg, **2005**, S. 1–27.
- [14] Y. Hiratsuka, M. Miyata, T. Tada, T. P. Q. Uyeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13618–13623.
- [15] H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J. P. Briand, M. Prato, S. Muller, A. Bianco, *Nano Lett.* **2006**, 6, 1522–1528.

- [16] D. B. Weibel, P. Garstecki, D. Ryan, W. R. Diluzio, M. Mayer, J. E. Seto, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11963–11967.
- [17] Y. Hiratsuka, M. Miyata, T. P. Q. Uyeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 318–324.
- [18] J. Z. Xi, D. Ho, B. Chu, C. D. Montemagno, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1233–1240.
- [19] C. V. Gabel, H. C. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8748–8751.
- [20] N. Darnton, L. Turner, K. Breuer, H. C. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1863–1870.
- [21] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- [22] T. D. Clark, J. Tien, D. C. Duffy, K. E. Paul, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7677–7682.
- [23] S. J. Hurst, E. K. Payne, L. D. Qin, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2738–2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2672–2692.
- [24] D. W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves*, Wiley, New York, **1974**, S. 771.
- [25] C. Baerlocher, W. M. Meier, D. H. Olson, *Atlas of Zeolite Framework Types*, Elsevier, Amsterdam, **2001**, S. 308.
- [26] G. Calzaferri, S. Huber, H. Maas, C. Minkowski, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3860–3888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3732–3758.
- [27] A. Z. Ruiz, D. Brühwiler, T. Ban, G. Calzaferri, *Monatsh. Chem.* **2005**, *136*, 77–89.
- [28] S. Huber, G. Calzaferri, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6906–6910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6738–6742.
- [29] R. Q. Albuquerque, Z. Popović, L. De Cola, G. Calzaferri, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1050–1053.
- [30] H. Li, A. Devaux, Z. Popović, L. De Cola, G. Calzaferri, *Microporous Mesoporous Mater.* **2006**, *95*, 112–117.
- [31] K. A. Fisher, K. D. Huddersman, M. J. Taylor, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5873–5878.
- [32] J. F. Jones, J. D. Feick, D. Imoudou, N. Chukwumah, M. Vigeant, D. Velegol, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6515–6519.
- [33] E. Milejkovskaya, W. Dowhan, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 1172–1175.