

Hochstabile Nanopartikel für Biologie und Biomedizin

Rongchao Jin*

Biomedizin · Nanokristalle · Nanotechnologie ·
Nichtkovalente Wechselwirkungen ·
Oberflächenchemie

Die Nanowissenschaften haben beinahe jedes Teilgebiet der Naturwissenschaft beeinflusst – die Materialwissenschaften, die Chemie, die Physik, die Biologie wie auch die Medizin. Einige der vielversprechendsten Anwendungen anorganischer Nanopartikel finden sich in der Biologie und Biomedizin,^[1–3] z. B. die Verwendung von Nanopartikeln als Marker für DNA- und Proteindetektion, als Sonden für die Magnetresonanztomographie und Dynamikstudien in biologischen Systemen sowie als Tracer zur Lokalisierung von Markerproteinen. Ein entscheidender Aspekt bei der Entwicklung anorganischer Nanopartikel für biologische Anwendungen ist die Stabilität bio-funktionalisierter Nanopartikel in biologischen Medien.^[1,2] Diese hat direkten Einfluss auf die Empfindlichkeit, Selektivität und nichtspezifischen Eigenschaften von Nanopartikel-Biosensoren. Ein Meilenstein der Entwicklung stabiler Nanopartikel für biologische Anwendungen waren Arbeiten über Goldnanopartikel, die mit thiolterminierter DNA funktionalisiert sind.^[1] Kürzlich konnten nun Cao et al. vielversprechende Fortschritte in Bezug auf die Nanopartikel-Stabilität erzielen.^[4]

Bereits vor 2000 Jahren fanden Nanopartikel (z. B. kolloidales Gold) im antiken China und Ägypten für künstlerische und medizinische Zwecke Verwendung.^[5] „Lösliches“, kolloidales Gold war bereits um das 5. Jahrhundert v. Chr. herum bekannt.^[5] Zu Beginn der 1950er Jahre revolutionierte die Strukturbestimmung der DNA-Doppelhelix die Biologie – die Geburtsstunde der modernen Molekularbiologie. Eine Motivation für die Anwendung von Nanopartikeln in der Biologie war die Tatsache, dass die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nach dem 2. Weltkrieg eine populäre Technik wurde: Molekularbiologen konnten mit ihrer Hilfe Zellstrukturen und Zellbestandteile mit hoher Auflösung (wenige nm) beobachten. Ein großes Problem allerdings war der geringe Kontrast unmarkierter biologischer Gewebe, der auf die schwache Elektronenstreuung durch die leichten Elemente C, H, N und O zurückzuführen ist. (Die Fähigkeit von Atomen zur Streuung von Elektronen hängt von der Elektron-Kern-Wechselwirkung ab und ist durch die Gleichung $\sigma \propto Z^2$ gegeben; der Streuquerschnitt σ als Maß für die Streueigenschaft eines Atoms ist also proportional zum Quadrat der Ordnungszahl Z eines Atoms.)

Um den geringen Kontrast bei der TEM zu kompensieren, wurden Färbemethoden auf Basis von Schwermetallen wie Wolfram, Quecksilber, Uran, Blei und Osmium entwickelt. Porter et al. untersuchten 1945 Zellen mit TEM nach Anfärbung des Gewebes mit Osmiumtetroxid.^[6] Die genannten Färbetechniken werden auch heute noch eingesetzt; ein großer Nachteil der Verwendung schwermetallderivatisierter Biomoleküle in der konventionellen TEM ist allerdings, dass die Signale der Elektronenstreuung noch nicht stark genug sind, um Einzelmoleküle zu unterscheiden. Auch mit der moderneren Methode der Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM-Z-Kontrast-Bildgebung, ca. 0.1 nm Auflösung nach Korrektur der sphärischen Aberration) ist dies bisher nicht möglich. Dementsprechend ist die Abbildung von Ultrastrukturen bis hinab zu Einzelmolekülen in biologischen Systemen bis heute problematisch.

In den 1970er Jahren rückte die Kolloidwissenschaft in das Blickfeld der Forscher. Es waren vermutlich erstmals Faulk und Taylor, die 1971 kolloidales Gold als Immunsonde mit hoher Elektronendichte einsetzten.^[7] Romano et al. entwickelten 1974 Antikörper-Gold-Konjugate.^[8] Erwähnenswert ist, dass Singer bereits um 1959 Ferritin (ein Protein mit einer zentralen Eisen(III)hydroxid-Phosphat-Micelle mit einem Durchmesser von ca. 10 nm) verwendet hatte, um Antikörper zu markieren.^[9] Dennoch begannen erst in den 1970er Jahren umfangreiche Forschungen zur Entwicklung praktikabler chemischer Verfahren für die Synthese wasserlöslicher Nanopartikelmarker mit hoher Elektronendichte.^[10–12] Diese Nanopartikel ergeben eine höhere TEM-Auflösung von zellulären Ultrastrukturen, z. B. bei der Detektion einzelner Proteinuntereinheiten eines Viruskapsids. In den 1980er Jahren gewannen Antikörper-Gold-Konjugate dank ihrer Anwendung in der Histochemie, Immunocytochemie und Immunpathologie an Bedeutung.^[12,13] Auch wurden neue Techniken für die Immunocytochemie entwickelt, bei der Goldnanopartikel verschiedener Größe eingesetzt werden, um Proben mehrfach zu markieren.^[14] Durch die Entwicklung kleiner Goldnanopartikel (z. B. Nanogold mit einem Durchmesser von 1.4 nm und damit wesentlich kleiner als ein IgG-Molekül mit einer Größe von 5–10 nm) wurde die Zugänglichkeit von Antigenbindungsstellen für Antikörper-Gold-Konjugate wesentlich verbessert.^[15]

[*] Prof. Dr. R. Jin
Carnegie Mellon University
Department of Chemistry
Pittsburgh, PA 15213 (USA)
Fax: (+1) 412-268-1061
E-Mail: rongchao@andrew.cmu.edu
Homepage: <http://www.chem.cmu.edu/groups/jin/>

Die Konjugation von Antikörpern, Lektinen oder anderen Proteinen mit Goldnanopartikeln beruhte bisher meistens auf nicht-spezifischen (z. B. Adsorption) oder nicht-kovalenten (z. B. elektrostatischen) Wechselwirkungen zwischen der Partikeloberfläche und dem Biomolekül,^[7,8] weshalb die Stabilität dieser Nanopartikelsonden gering war. Die Stabilität ist bei biologischen Untersuchungen unter rauen Bedingungen entscheidend, z. B. bei der Verfolgung von Biomolekülen und bei Dynamikstudien über längere Zeiträume, bei hohen Salzkonzentrationen sowie in Gegenwart von reaktiven Molekülen wie Dithiothreitol, einem kleinen, ungeladenen Molekül, das zwei Thiolgruppen trägt und zum Schutz von Proteinen vor Oxidation verwendet wird.

Mirkin, Alivisatos et al. synthetisierten 1996 Nanopartikel, die mit thiolterminierten DNA-Oligonucleotiden funktionalisiert sind (Abbildung 1 A).^[16,17] Diese Konjugate er-

threitol oder Molekülen mit SH-, Phosphin- und NH₂-Gruppen widerstehen.^[18a]

Die Herstellung DNA-funktionalisierter Goldnanopartikel ist ein Meilenstein in der Entwicklung stabiler Nanopartikel für biologische Anwendungen. Bei der Stabilisierung der Goldnanopartikel sind hauptsächlich zwei Mechanismen von Bedeutung: a) Thiole haben eine hohe Affinität für Gold, wodurch sich die Partikeloberfläche mit einer dichten Hülle aus thiolterminierter DNA modifizieren lässt. b) Das DNA-Rückgrat trägt wegen seiner Phosphatgruppen negative Ladungen, wodurch sich um das Nanopartikel eine Schicht negativer Ladung bildet, die eine Annäherung geladener Moleküle sowie anderer Nanopartikel verhindert. Dadurch lässt sich die Aggregation der Nanopartikel verhindern, sogar bei hohen Salzkonzentrationen und hohen Temperaturen.^[16,18] Trotz der enormen Stabilität DNA-funktionalisierter Goldnanopartikel sind sie nur eingeschränkt verwendbar. Zum Beispiel sind sie noch immer etwas anfällig für Dithiothreitol,^[18a] hinzu kommt, dass die Thiolmethode nur für metallische Nanopartikel genutzt werden kann, nicht aber für Quantenpunkte und Nanopartikel, die auf Metalloxiden wie Fe₃O₄ basieren.^[3,4]

Quantenpunkte sind eine neue, vielversprechende Art von Fluoreszenzmarkern für Biomoleküle.^[2] Seitdem die Herstellung qualitativ hochwertiger Quantenpunkte möglich ist,^[19] haben diese Nanomaterialien viel Aufmerksamkeit gefunden. Quantenpunkte haben mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen Farbstoffen: Die Stärke ihrer Photolumineszenz ist einstellbar, sie haben einen breiten Anregungswellenlängenbereich, hohe Quantenausbeuten (mehr als 50 %) und sind chemisch stabil. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Quantenpunkte gegenüber anderen Markern, wie organischen Fluorophoren (z. B. Cy-Fluorophore) oder fluoreszenten Proteinen (z. B. dem grün fluoreszierenden Protein, GFP), überlegen.^[2,3] Allerdings werden diese qualitativ hochwertigen Quantenpunkte normalerweise in organischen Lösungsmitteln hergestellt, und ihre Überführung in wässrige Systeme, die entscheidend für ihre Anwendung in biologischen Systemen ist, gestaltet sich schwierig. Ein weiteres Problem besteht darin, dass ihre in organischen Lösungsmitteln hohe Quantenausbeute in Wasser durch den Verlust an Exzitonen signifikant sinkt.^[19b] Durch Funktionalisierung von Quantenpunkten mit amphiphilen Liganden konnte man Nanokristallmicellen herstellen, in denen die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Liganden Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Primärliganden der Nanokristalloberfläche eingingen (Abbildung 1 B).^[20] Das Problem der sinkenden Photolumineszenz konnte auf diese Weise aber nicht vollständig gelöst werden.

Angesichts der Einschränkungen von metallischen Nanopartikeln (z. B. Au) und Quantenpunkten (z. B. Cd/ZnS) ist es von entscheidender Bedeutung, neue Verfahren zur Herstellung möglichst stabiler Nanopartikel zu entwickeln. Cao et al. haben nun mithilfe einer vielseitigen Strategie Nanopartikelhüllen (d. h. passivierende Liganden) konstruiert, die die Stabilität von Nanopartikeln unter rauen Bedingungen verbessern.^[4] Die Strategie setzt auf die Kombination zweier Wechselwirkungen (Abbildung 1 C): a) Koordination der Liganden an die Partikeloberfläche und b) Van-der-Waals-

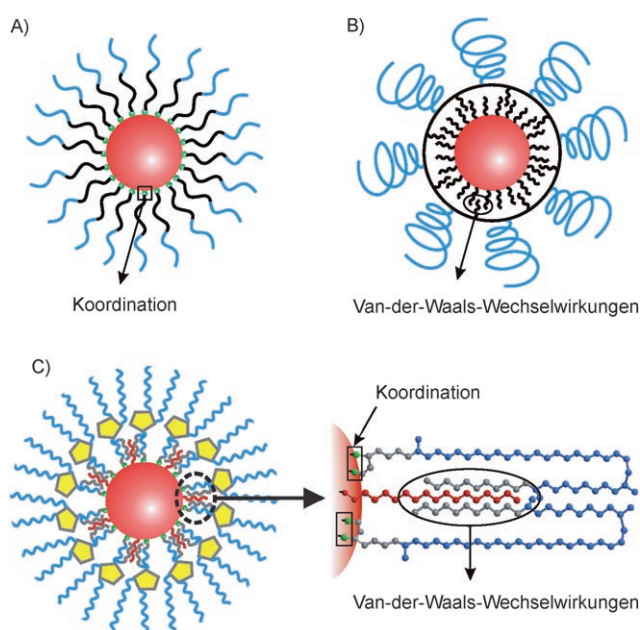
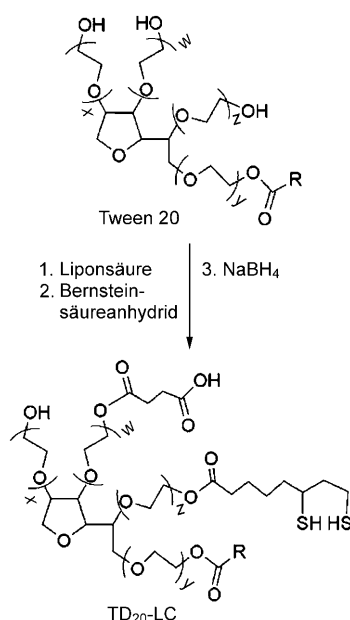


Abbildung 1. Strategien zur Stabilisierung von Nanopartikeln für biologische Anwendungen. A) Thiolterminierte Liganden (z. B. DNA). B) Hydrophobe Wechselwirkungen. C) Eine vielseitige Strategie zur Herstellung hochstabiler, wasserlöslicher anorganischer Nanopartikel.

möglichen die hochempfindliche Detektion komplementärer DNA-Moleküle, bei der die Goldnanopartikel als Reporter fungieren.^[16] Seither wurde eine Reihe von Detektionsmethoden auf Basis kovalent biofunktionalisierter Goldnanopartikel für den Proteinnachweis, die medizinische Diagnostik, die Genexpression etc. entwickelt.^[1] Auf diese Weise funktionalisierte Nanopartikel sind hochstabil.^[18] Sie können sehr hohen Salzkonzentrationen standhalten (z. B. 2 M NaCl) – anders als kolloidales Gold (z. B. mit Citrat stabilisierte Goldkolloide), das schon in Gegenwart geringer Salzkonzentrationen (ca. 10 mM NaCl) instabil ist –, sie sind äußerst hitzebeständig (z. B. beim Sieden), und sie können bis zu einem gewissen Grad dem Angriff von Molekülen wie Dithio-

Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Enden (Rest R, grau) der verwendeten Tween-Derivate und den Primärliganden (rot) auf der Nanokristalloberfläche (eingekreister Bereich in Abbildung 1 C). Diese Difunktionalität erhöht die Stabilität der Nanopartikel deutlich und macht diese so für biologische Anwendungen unter rauen Bedingungen geeignet. Auf den ersten Blick mag diese Idee dem früheren Ansatz ähneln, bei dem zwischen Primärliganden der Nanopartikeloberfläche und amphiphilen Liganden hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen eingegangen werden.^[20] Bei dem neuen Ansatz aber sind die Tween-Derivate zusätzlich an die Nanopartikeloberfläche koordiniert, was zu kompakteren Nanopartikeln im Vergleich mit den Nanopartikelmicellen führt. Daher lassen sich die neuartigen Nanopartikel besser verarbeiten und funktionalisieren, was von Vorteil für ihre Zellgängigkeit und daher von größter Bedeutung für ihre In-vivo-Anwendung als Nanosonden ist.

Cao et al. verwendeten als Gerüst maßgeschneiderte Polyethylenglycol(PEG)sorbitanfettsäureester (kommerzieller Name: Tween, Beispiel siehe Schema 1). Diese Moleküle



Schema 1. Herstellung eines carboxyfunctionalisierten Tween-Liganden (TD₂₀-LC) aus Tween 20 ($w + x + y + z = 20$, R = C₁₁H₂₃).

haben vier Arme, von denen einer ein langkettiger hydrophober Rest (R) ist. Tween kann eine unterschiedliche Zahl von Ethylenglycoleinheiten enthalten (z. B. $n = 20$ Einheiten für Tween 20). Auf Basis dieser Tween-Gerüstmoleküle haben Cao et al. neue difunktionale Liganden entwickelt. Diese Tween-Derivate (TD_{*n*}) zeigen eine starke Affinität zu hydrophoben Nanopartikeln durch Koordinationsbindungen und hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Mit diesen neuen TD_{*n*}-Liganden lässt sich das Problem überwinden, dass der Tween-Arm alleine nur schwache Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den hydrophoben Liganden der Partikeloberfläche eingehen kann. Solche Liganden (TD_{*n*}, $n = 20, 40, 60, 80$) wurden zur Herstellung wasserlöslicher,

hochstabiler Nanopartikel basierend auf Au, CdSe/ZnS und Fe₃O₄ verwendet. Entsprechend funktionalisierte Goldnanopartikel sind hochstabil innerhalb eines breiten pH-Bereichs (pH 1–14) und bei hohen Ionenkonzentrationen (bis zu 5 M NaCl).^[4] Ihre Stabilität ist sogar höher als die von DNA-Goldnanopartikel-Konjugaten, was äußerst vielversprechend für ihre Anwendung in Biologie und Biomedizin ist.

Auch der Verlust an Quantenausbeute von Quantenpunkten nach Transfer in wässrige Systeme kann mithilfe dieser difunktionalen Liganden verhindert werden. Wu et al. haben demonstriert, dass entsprechende CdSe/ZnS-Nanopartikel nach dem Transfer in ein wässriges System ihre hohe Quantenausbeute (ca. 50 %) mehr als drei Monate lang sogar unter drastischen Bedingungen (pH 2–12.5) behalten.^[4] Die Stabilität TD_{*n*}-funktionalisierter Quantenpunkte ist maßgeblich höher als jene von Quantenpunkten, die mit PEG-funktionalisierten Liponsäureliganden modifiziert wurden. Diesen fehlen die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Nanopartikeloberfläche. Nanopartikel mit PEG-funktionalisierter Polymerhülle haben einen großen hydrodynamischen Durchmesser von 30–40 nm, der ihre Verwendung in vivo wegen der geringen Mobilität solch großer Nanopartikel in Zellen und Geweben einschränkt; TD_{*n*}-funktionalisierte Quantenpunkte haben hingegen einen viel kleineren hydrodynamischen Durchmesser von weniger als 20 nm.

Ein weiterer Vorteil der Tween-Liganden ist, dass eine Carboxygruppe in einen der TD_{*n*}-Arme eingeführt werden kann (siehe Schema 1). Dies wiederum ermöglicht die einfache Anlagerung von Biomolekülen wie Antikörpern durch eine milde *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid- (EDC)-basierte Kupplung.^[4] Diese Vielseitigkeit lässt sich nicht mit anderen einfachen Liganden, z. B. langkettigen Alkanthiolen, erreichen.^[20d] Die Modifizierbarkeit der Arme kann den Tween-Molekülen kooperative Eigenschaften verleihen, die eine bessere Bindung von Zielmolekülen sowie die Einführung vielzähliger funktioneller Gruppen ermöglichen, die Informationen über die Wirkungsweise der Nanopartikel in der Zelle liefern.

Die stabilen Nanopartikel von Cao et al. sind weniger anfällig gegen den Abbau durch Nukleasen, weniger oder nicht toxisch für Zellen und werden von diesen dank ihrer geringen Größe leichter aufgenommen. Denkbare Anwendungen liegen unter anderem in der intrazellulären Genregulation zur Kontrolle von Proteinexpression und im Wirkstofftransport zu bestimmten Zelltypen oder Zellkompartimenten. Die Herstellung hochstabiler und möglichst kleiner Nanopartikel, die eine große Zahl an Reportergruppen enthalten, sowie die Durchführung vielfältiger chemischer Reaktionen an ihren Oberflächen werden auch in Zukunft zentrale Themen in der Nanobiotechnologie sein. Stabile Nanopartikel werden neue Möglichkeiten in der Nanotherapie und bei der Erforschung von Genfunktionen eröffnen.

Online veröffentlicht am 4. August 2008

- [1] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547.
- [2] A. P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47.

- [3] a) K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4676; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562; b) E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.
- [4] H. Wu, H. Zhu, J. Zhang, S. Yang, C. Liu, Y. C. Cao, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3790; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3730.
- [5] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
- [6] K. R. Porter, A. Claude, E. F. Fullam, *J. Exp. Med.* **1945**, *81*, 233.
- [7] W. P. Faulk, G. M. Taylor, *Immunochemistry* **1971**, *8*, 1081.
- [8] E. L. Romano, C. Stolinski, N. C. Hughes-Jones, *Immunochemistry* **1974**, *11*, 521.
- [9] S. J. Singer, *Nature* **1959**, *183*, 1523.
- [10] G. Frens, *Nature* **1973**, *241*, 20.
- [11] P. A. Bartlett, B. Bauer, S. J. Singer, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5085.
- [12] Eine Übersicht: J. Roth, *Histochem. Cell Biol.* **1996**, *106*, 1.
- [13] W. Baschong, J. J. Lucocq, J. Roth, *Histochemistry* **1985**, *83*, 409.
- [14] J. W. Slot, H. J. Geuze, *Eur. J. Cell Biol.* **1985**, *38*, 87.
- [15] a) J. F. Hainfeld, *Science* **1987**, *236*, 450; b) J. F. Hainfeld, F. R. Furuya, *J. Histochem. Cytochem.* **1992**, *40*, 177.
- [16] a) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607; b) R. Elghanian, J. J. Stohoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078.
- [17] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. G. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609.
- [18] a) Z. Li, R. Jin, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1558; b) R. Jin, G. Wu, Z. Li, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1643.
- [19] a) C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706; b) M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468.
- [20] a) X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41; b) A. M. Smith, H. Duan, M. N. Rhyner, G. Ruan, S. Nie, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3895; c) B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science* **2002**, *298*, 1759; d) R. C. Doty, T. R. Tshikhudo, M. Brust, D. G. Fernig, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4630.