

## Photoaktive hybride Nanomaterialien für gezieltes Anbinden, Markieren und Töten von Antibiotika-resistenten Bakterien\*\*

Cristian A. Strassert,\* Matthias Otter, Rodrigo Q. Albuquerque, Andrea Höne, Yolanda Vida, Berenike Maier und Luisa De Cola\*

Phototherapeutika bieten sich für die wirksame Behandlung von Krebs und Infektionskrankheiten an,<sup>[1–3]</sup> während die Nanotechnologie multifunktionelle Strukturen mit gezielter Zytotoxizität und Markierungsfähigkeit („Targeting“) bereitstellt.<sup>[4–6]</sup> Diese Strukturen müssen sowohl robust und gut charakterisiert als auch industriell produzierbar sein.<sup>[7]</sup> Im Folgenden beschreiben wir ein multifunktionelles, auf Zeolith L basierendes, hybrides Nanomaterial, das über Aminogruppen an pathogene und Antibiotika-resistente Bakterien gezielt bindet, sie mithilfe eines in die Zeolithkanäle eingesetzten hochfluoreszenten grünen Farbstoffs sichtbar macht und mithilfe eines auf die Nanopartikeloberfläche aufgebrachten Photosensibilisator bei Bestrahlung inaktiviert. Die Wirksamkeit wurde an Antibiotika-resistenten *Escherichia coli*- und *Neisseria-gonorrhoeae*-Zellen belegt. Hieraus ergeben sich faszinierende Möglichkeiten für die Entwicklung einer neuen Generation von Photosensibilisatoren für die Phototherapie.

Zu den Herausforderungen der modernen Pharmakologie gehören die Resistenz von Bakterien gegen mehrere Antibiotika und die Resistenz von neoplastischen Zellen gegen Chemotherapeutika, die zudem unerwünschte Nebeneffekte haben. Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine etablierte Methode, um Krebs und die Makuladegeneration zu behandeln,<sup>[1,2]</sup> und bietet eine Alternative bei der Behandlung Antibiotika-resistenter Bakterien.<sup>[3]</sup> Bei der PDT erzeugt ein Photosensibilisator bei Bestrahlung mit Licht zytotoxisches  $^1\text{O}_2$ . Optimal wäre es, wenn eine einzige Struktur entwickelt werden könnte, die gezielte therapeuti-

sche Wirkung, ausreichende  $^1\text{O}_2$ -Photoproduktion und bildgebende Fähigkeiten vereinte.<sup>[1–3]</sup>

Die Oberflächen von Nanopartikeln wurden mit biokompatiblen Einheiten so modifiziert, dass das Ergebnis therapeutische, analytische oder bildgebende Materialien sein sollten.<sup>[8–13]</sup> Es ist außerdem bekannt, dass aminomodifizierte Zeolith-L-Mikrokristalle an die Oberfläche von *E. coli*-Zellen binden.<sup>[14]</sup> Zeolith L ist ein Aluminosilikat, in dessen Kanäle eine Vielzahl an Farbstoffen eingelagert werden kann.<sup>[15]</sup> Es ist ein ungiftiger Träger, der an seiner Oberfläche und, orthogonal dazu, an den Kanaleingängen modifiziert werden kann.<sup>[16]</sup> Allerdings wurden bislang keine Versuche unternommen, diese Möglichkeiten für therapeutische Zwecke zu nutzen. Phthalocyanine eignen sich ausgezeichnet für die Entwicklung von Phototherapeutika, da sie wenig giftig und sehr stabil sind, eine hohe  $^1\text{O}_2$ -Produktion gewährleisten und Licht im „therapeutischen Fenster“ absorbieren.<sup>[1–3,17]</sup> Insbesondere wurden  $\text{Zn}^{II}$ - und  $\text{Si}^{IV}$ -Phthalocyanine als vielversprechende Photosensibilisatoren untersucht.<sup>[1–3]</sup> Auch hier sind Aminogruppen wichtig, um die biologische Aktivität der Farbstoffe zu modulieren,<sup>[18,19]</sup> die mit einer Vielzahl an Strukturen mit interessanten photo-physikalischen und photobiologischen Eigenschaften verknüpft werden können.<sup>[20–24]</sup> Das Aggregieren dieser Verbindungen ist jedoch ein Nachteil, den es zu vermeiden gilt, um die photosensibilisierenden Eigenschaften der Makrocyclen zu nutzen.<sup>[17]</sup>

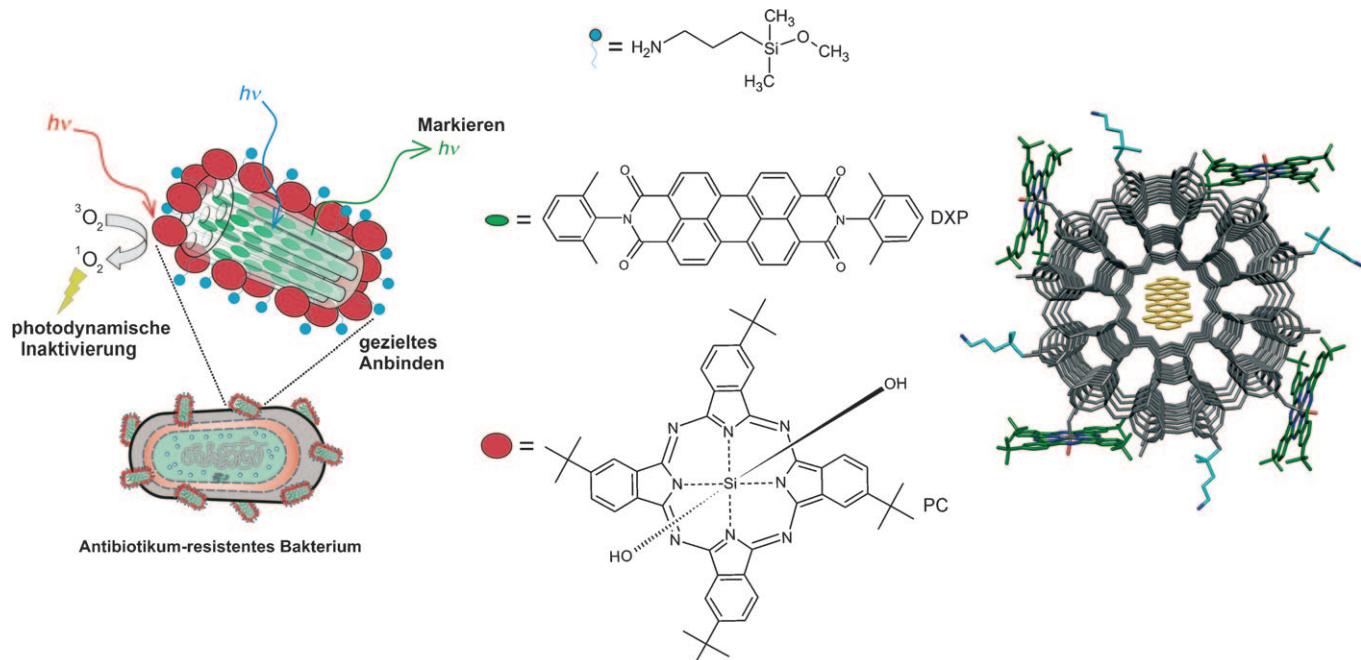
Wir haben eine Nanoarchitektur konzipiert, die Fluoreszenzbildgebung, photosensibilisierende Eigenschaften und Anhaftung an Zellen vereint (Abbildung 1). Hierzu wurden Zeolith L-Nanokristalle mit 50 nm in Länge und Durchmesser mit grün emittierendem DXP (*N,N*'-Bis(2,6-dimethylphenyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxyimid) durch Gasphasenaustausch beladen.<sup>[15]</sup> Anschließend wurden sie mit Tetra-*tert*-butyl-substituiertem  $\text{Si}^{IV}$ -Phthalocyanindihydroxid (PC) durch axiale Verknüpfung des zentralen  $\text{Si}^{IV}$ -Atoms mit OH-Gruppen der Kristalloberfläche funktionalisiert. Diese Anbindung und die sterische Abstoßung der *tert*-Butylgruppen verhindern die Aggregation der Makrocyclen. Schließlich wurde die Oberfläche des Zeolithen mit Aminogruppen eingehüllt, um eine Anbindung an Bakterien zu ermöglichen.<sup>[14]</sup>

Die Beladung mit DXP wurde unter einem Prozent gehalten, um die Bildung von J-Aggregaten in den Zeolithkanälen zu vermeiden, da diese die Quantenausbeute der Photolumineszenz vermindern und eine bathochrome Verschiebung der emittierten Wellenlänge verursachen.<sup>[25]</sup> Bei einer solchen Beladung erhält man eine einheitliche grüne Fluoreszenz. Wir haben den Bedeckungsgrad der Oberfläche

[\*] Dr. C. A. Strassert, Dipl.-Chem. M. Otter, Dr. R. Q. Albuquerque, Dr. Y. Vida, Prof. L. De Cola  
Physikalisches Institut und Center for Nanotechnology (CeNTech)  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Heisenbergstraße 11, 48149 Münster (Deutschland)  
Fax: (+49) 251-980-2834  
E-Mail: ca.s@uni-muenster.de  
decola@uni-muenster.de  
Homepage: <http://www.uni-muenster.de/Physik.PI/DeCola/>  
Dipl.-Biol. A. Höne, Prof. B. Maier  
Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster

[\*\*] Wir danken Prof. Peters für die *E. coli*-Proben und S. Fibikar für die Hilfe bei der Aufnahme der REM-Bilder sowie der DFG (Fördernummer: INST 211/418-1 FUGG) für die Mittel zum Kauf des zeitaufwändigen Konfokalmikroskops. Diese Arbeit wurde außerdem von der DFG (A.H. und B.M.: SFB629), der Alexander-von-Humboldt-Stiftung (R.Q.A.) und der Fundación Ramón Areces (Y.V.) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902837> zu finden.



**Abbildung 1.** Aufbau des multifunktionellen Nanomaterials, das genutzt wurde, um Antibiotika-resistente Bakterien gezielt zu markieren und zu photoaktivieren. Der Zeolith-L-Nanokristall ist mit dem Emitter DXP (grüne Ellipsoide) beladen und seine Oberfläche ist mit dem Phthalocyaninderivat PC (rote Ellipsoide) und Aminogruppen (blaue Ellipsoide) funktionalisiert, wobei letztere die Anbindung an Bakterien ermöglichen. Rechts ist die Anbindung der funktionellen Gruppen an das Zeolith-L-Netzwerk verdeutlicht.

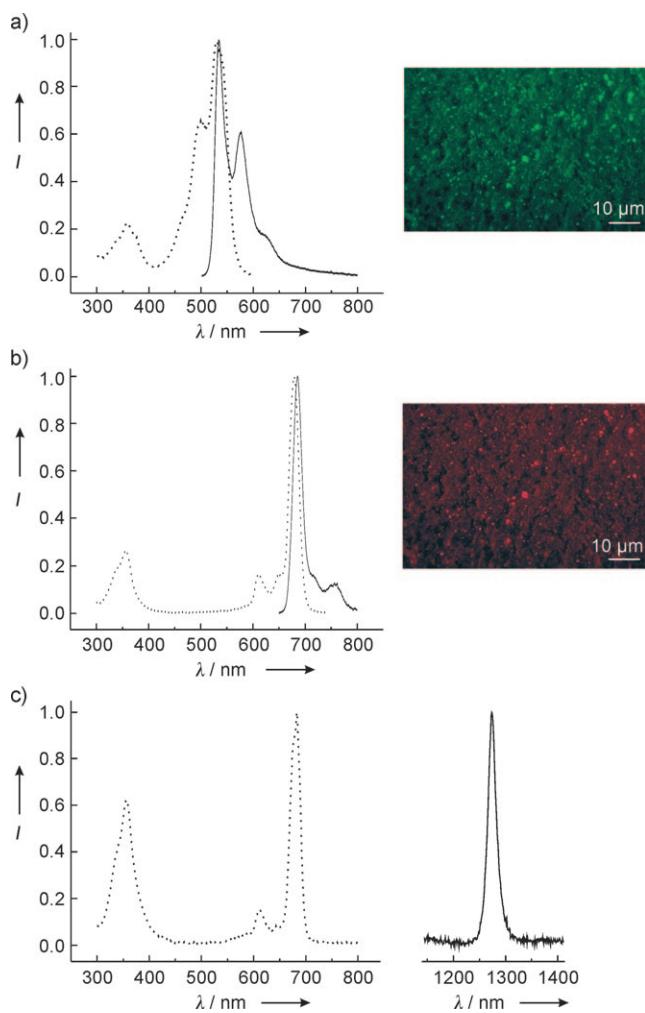
unter der Annahme, dass die Zeolithe eine zylindrische Form mit 50 nm Höhe und 50 nm Durchmesser haben, durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen auf  $17 \times 10^3$  PC-Moleküle pro Kristall geschätzt. Allerdings wird hierbei die effektive Kristalloberfläche unterschätzt, da diese Unebenheiten und Terrassen aufweist. Die Fläche eines einzelnen PC-Moleküls beträgt  $2 \text{ nm}^2$ , sodass auf einem idealisierten, zylindrischen Zeolith-L-Nanokristall (dessen Oberfläche ca.  $12000 \text{ nm}^2$  beträgt)  $6 \times 10^3$  Moleküle gebunden werden können. Dieser Wert ist kleiner als der experimentell erhaltene Wert, liegt aber in der gleichen Größenordnung und deutet darauf hin, dass die tatsächliche Oberfläche des Nanokristalls größer ist. In jedem Fall ist der größte Teil der Oberfläche mit PC bedeckt, was zur photobiologischen Effizienz beiträgt (siehe unten).

Die photophysikalischen Eigenschaften sind in Abbildung 2 dargestellt, welche die Anregungs- und Emissionspektren der hybriden Systeme sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigt. In Abbildung 2a ist neben den charakteristischen Emissions- und Anregungsspektren von DXP<sup>[26]</sup> auch die grüne Fluoreszenz der Probe, die nach der DXP-Anregung erhalten wird, zu sehen. Abbildung 2b zeigt die markanten Anregungs- und Emissionsspektren von PC<sup>[20,21]</sup> zusammen mit einem Mikroskopiebild seiner roten Fluoreszenz, was beweist, dass die Zeolith-L-Oberfläche die Bildung von PC-Aggregaten verhindert. Ein zusätzliches Experiment mit 4 µm langen Zeolithkristallen ergab, dass nach der PC-Anregung nur an den mit PC funktionalisierten Kristallen eine helle rote Lumineszenz beobachtet werden konnte. Ungebundenes PC verblieb in seiner Form als nichtfluoreszierende grüne Kristalle (Abbildung S1).

Beim Aufzeichnen der PC-Emission (Abbildung 2b) sind im Anregungsspektrum lediglich die Soret- und die Q-Bande des Makrocycles zu sehen (es wird keine DXP-Absorption detektiert). Es findet also kein Elektronenenergietausch von DXP zu PC statt, eine Konsequenz der elektronischen Entkopplung zwischen dem Chormophor im Zeolith-L-Kanal und dem Chromophor, das auf der Oberfläche gebunden ist.<sup>[15,16]</sup> Beide Farbstoffe stellen unabhängige photophysikalische Markierungen dar, die einzeln detektiert und adressiert werden können, was die Verwendung von DXP als internen Standard zur Beobachtung der Bakterien möglich macht.

Abbildung 2c demonstriert, dass nach der PC-Anregung bei 670 nm eine intensive Emission mit einem Maximum bei 1275 nm erhalten wird, die mit der charakteristischen Phosphoreszenz von  ${}^1\text{O}_2$  übereinstimmt.<sup>[20,21]</sup> Das zugehörige Anregungsspektrum wurde durch Analyse der Emission bei 1275 nm erhalten, und es reproduziert die Soret- und die Q-Bande des Makrocyclus (vgl. Abbildung 2b), womit bewiesen ist, dass nur PC für die Erzeugung von  ${}^1\text{O}_2$  verantwortlich ist. Durch Zugabe des  ${}^1\text{O}_2$ -Fängers DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan) wurde die Emission bei 1275 nm komplett unterdrückt. Außerdem konnte keine  ${}^1\text{O}_2$ -Photoproduktion beobachtet werden, wenn die Nanokristalle nicht mit PC funktionalisiert waren.

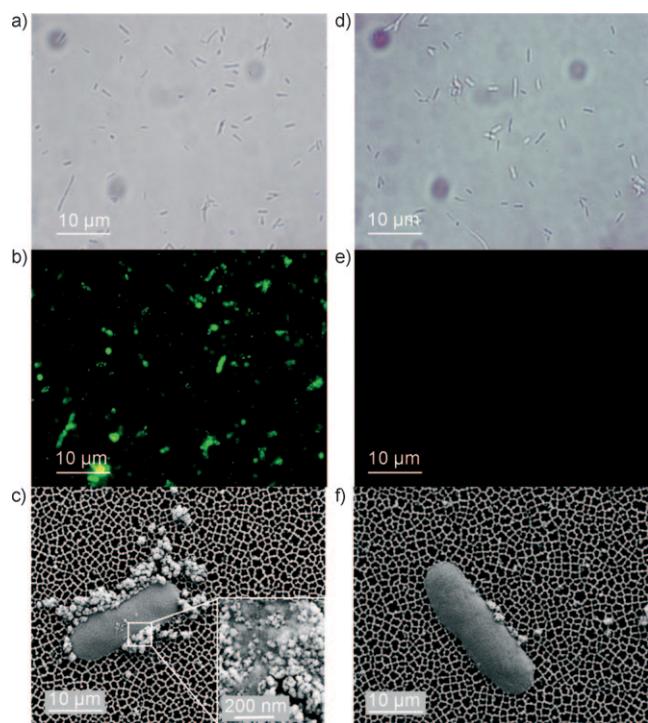
Ein Stamm *E. coli*, der Resistenz gegen Chloramphenicol zeigt, wurde als biologisches Modell genutzt. Die Photoaktivierung Gram-negativer Bakterien ist schwieriger, da eine zusätzliche äußere Membran vorhanden ist, die Lipopolysaccharide enthält und die Bakterien resistenter gegen herkömmliche photosensibilisierende Medikamente macht.<sup>[3]</sup>



**Abbildung 2.** Anregungs- (gepunktete Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) von DXP (a;  $\lambda_{\text{em}} = 620$ ,  $\lambda_{\text{anr}} = 480$  nm), von PC (b;  $\lambda_{\text{em}} = 750$ ,  $\lambda_{\text{anr}} = 630$  nm) sowie von PC und  $^1\text{O}_2$  (c;  $\lambda_{\text{em}} = 1275$ ,  $\lambda_{\text{anr}} = 670$  nm), jeweils in einer Suspension des Nanomaterials in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden mit einer Anregungswellenlänge von 420–490 nm (a) oder 575–630 nm (b) aufgenommen.

Mit aminofunktionalisiertem Nanomaterial konnten die *E. coli*-Zellen markiert werden, wie auf den Mikroskopiebildern zu erkennen ist (Abbildung 3a,b und Abbildung S2). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von markierten *E. coli*-Bakterien beweisen das Anbinden des hybriden Nanomaterials. Hierbei stellen die Aminogruppen eine effektive Verankerung mit der Bakterienoberfläche durch ihre Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen sowie elektrostatische Bindungen aufzubauen, sicher. Die Messung des Zeta-Potentials (Tabelle S1) beweist, dass die aminofunktionalisierten Zeolithkristalle positiv geladen sind, was die Anbindung an die negativ geladenen Membranen der Bakterien begünstigt. Zeolithkristalle ohne Aminogruppen dagegen haben ein negatives Zeta-Potential, weshalb bei ihnen keine Anheftung an die negativ geladenen Oberflächen der Bakterien auftritt. Dies wurde durch Fluoreszenzmikroskopie und REM-Analyse bestätigt (Abbildung 3e,f).

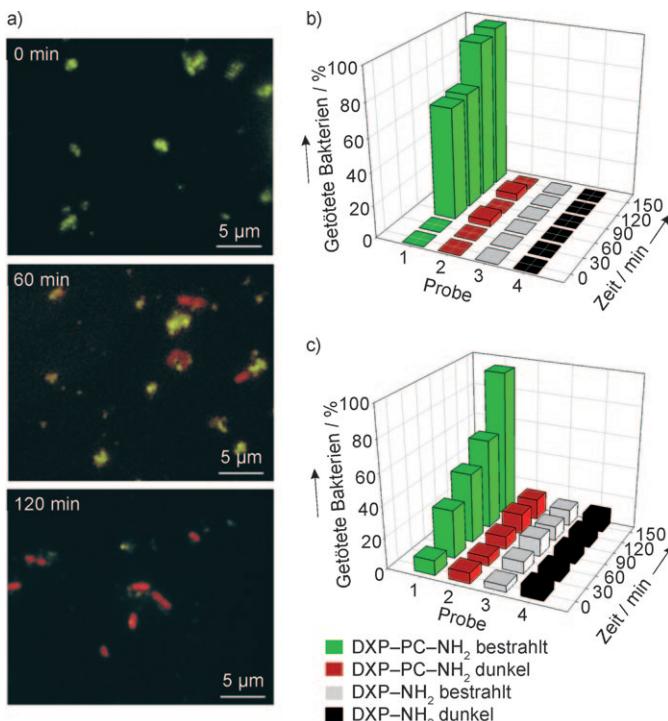
Um die photobiologische Aktivität zu untersuchen, wurde eine photodynamische Behandlung durchgeführt. Dazu



**Abbildung 3.** Wechselwirkung zwischen dem hybriden Nanomaterial und *E. coli*-Zellen in PBS (=isotone, mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung). Weißlichtmikroskopie-, Fluoreszenzmikroskopie- ( $\lambda_{\text{anr}} = 470$ –490 nm) und Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Bilder der Bakterien, die mit aminofunktionalisiertem Nanomaterial (a,b,c) bzw. nichtaminofunktionalisiertem Nanomaterial (d,e,f) behandelt wurden. Der vergrößerte Einschub in (c) zeigt an einem Ausschnitt des Bakteriums, wie das Nanomaterial anhaftet. Ein Vergleich der linken und rechten Bilder belegt den Targeting-Effekt der Aminogruppen (für Details siehe Text).

wurde eine Suspension von *E. coli*-Zellen mit dem hybriden Nanomaterial 2.5 h lang mit Licht zwischen 570 und 900 nm bestrahlt (Bestrahlungsdichte  $3 \text{ mW cm}^{-2}$ ). In diesem Spektralbereich wird nur PC angeregt, um  $^1\text{O}_2$  zu produzieren, wodurch verhindert wird, dass DXP in den Kanälen durch Photobleichen zerstört wird. In Abständen von 30 min wurde eine Probe mit Propidiumiodid (PI) versetzt. Dieser Farbstoff durchdringt selektiv die Membranen von toten Zellen, die wegen ihres geänderten Membranpotentials für ihn permeabel werden, und emittiert wegen seiner Interkalation mit DNA stark rot.<sup>[27]</sup> Abbildung 4a zeigt Fluoreszenzmikroskopiebilder der *E. coli*-Zellen, die mit dem hybriden Nanomaterial markiert wurden, während der photodynamischen Behandlung. Der fortschreitende Zelltod wird am Farbwechsel deutlich: Die lebenden Zellen zeigen die grüne Fluoreszenz der DXP-Markierung, die inaktivierten Zellen die rote Fluoreszenz von PI.

Eine Quantifizierung der toten Bakterien als Funktion der Bestrahlungszeit bietet Abbildung 4b; sie wurde durch Analyse der Weißlicht- und Fluoreszenzmikroskopiebilder während der photodynamischen Behandlung erhalten. Nur das Zusammenspiel von Bestrahlung und PC-Funktionalisierung führte zu einer erfolgreichen Photoaktivierung der Zellen, was den photodynamischen Effekt beweist. Ohne PC oder ohne Bestrahlung trat kein signifikanter Zelltod ein. Die



**Abbildung 4.** a) Zeitraffer-Fluoreszenzmikroskopiebilder der Chloramphenicol-resistenten *E. coli*-Zellen während einer photodynamischen Behandlung in PBS, aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von 470–490 nm. Die grüne Emission stammt vom DXP-gefüllten Nanomaterial, die rote vom PI-DNA-Komplex, der nur in den toten Bakterien entsteht. Anteil an b) inaktivierten *E. coli*- und c) inaktivierten *N. gonorrhoeae*-Zellen als Funktion der Zeit und der Versuchsbedingungen.

photodynamische Inaktivierung war nach 2 h vollständig (95 %), was einer Lichtdosis von  $27 \text{ J cm}^{-2}$  entspricht. Dies ist weniger als in der Literatur beschrieben.<sup>[28]</sup> Vergleichbare Ergebnisse wurden an einem Stamm pathogener und Tetracyclin-resistenter *N. gonorrhoeae*-Zellen erhalten, bei dem die Inaktivierungseffizienz ebenfalls bei 95 % lag (Abbildung 4c).

Zusammenfassend betrachtet haben wir ein innovatives Werkzeug zur Anwendung in der Phototherapie entwickelt. Es nutzt eine multifunktionelle Nanoarchitektur, die auf der Zeolith-L-Plattform basiert. Ihr robuster Aufbau ist durch die Verwendung von industriellen Standardchromophoren und einem gut definierten festen Substrat leicht herzustellen. Wir konnten beweisen, dass das hybride Nanomaterial effizient  $^1\text{O}_2$  produziert und an bakteriellen Oberflächen anhaftet, was zu gezielter Markierung und Photoinaktivierung von Antibiotika-resistenten Bakterien führt. Diese Ergebnisse eröffnen faszinierende Möglichkeiten für die photodynamische Behandlung infektiöser und neoplastischer Erkrankungen und lässt auf die Entwicklung einer dritten Generation von Photosensibilisatoren für die PDT hoffen.

Eingegangen am 27. Mai 2009  
 Online veröffentlicht am 3. September 2009

**Stichwörter:** Antibiotika-resistente Bakterien · Fluoreszenz · Phthalocyanine · Singuletsauerstoff · Wirkstoff-Forschung

- [1] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbeklik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889–905.
- [2] A. Juzeniene, Q. Peng, J. Mohan, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 1234–1245.
- [3] M. R. Hamblin, T. Hasan, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 436–450.
- [4] M.-R. Choi, K. J. Stanton-Maxey, J. K. Stanley, J. C. S. Levin, R. Bardhan, D. Akin, S. Badve, J. Sturgis, J. P. Robinson, R. Bashir, N. J. Halas, S. E. Clare, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3759–3765.
- [5] M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161–171.
- [6] G. M. Whitesides, *Small* **2005**, *1*, 172–179.
- [7] M. Eaton, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 251–253.
- [8] A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1028–1042.
- [9] R. C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 579–591.
- [10] L. Tetard, A. Passian, K. T. Venmar, R. M. Lynch, B. H. Voy, G. Shekhawat, V. P. David, T. Thundat, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 501–505.
- [11] T. Rajh, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 347–348.
- [12] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 145–150.
- [13] E. Tasciotti, X. W. Liu, R. Bhavane, K. Plant, A. D. Leonard, B. K. Price, M. M. C. Cheng, P. Decuzzi, J. M. Tour, F. Robertson, M. E. Ferrari, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 151–157.
- [14] Z. Popovic, M. Otter, G. Calzaferri, L. De Cola, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6301–6304; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6188–6191.
- [15] G. Calzaferri, S. Huber, H. Maas, C. Minkowski, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3860–3888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3732–3758.
- [16] M. Busby, H. Kerschbaumer, G. Calzaferri, L. De Cola, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1614–1618.
- [17] C. A. Strassert, G. M. Bilmes, J. Awruch, L. E. Dicelio, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 738–747.
- [18] N. B. Rumie Vittar, C. G. Prucca, C. A. Strassert, J. Awruch, V. A. Rivarola, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 2195–2205.
- [19] N. L. Oleinick, A. R. Antunez, M. E. Clay, B. D. Rihter, M. E. Kenney, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 242–247.
- [20] K. Ishii, M. Shiine, Y. Kikukawa, N. Kobayashi, T. Shiragami, J. Matsumoto, M. Yasuda, H. Suzuki, H. Yokoi, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *448*, 264–267.
- [21] K. Ishii, Y. Kikukawa, M. Shiine, N. Kobayashi, T. Tsuru, Y. Sakai, A. Sakoda, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 2975–2981.
- [22] S. Dayal, C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2890–2891.
- [23] N. Nishiyama, A. Iriyama, W.-D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama, K. Kataoka, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 934–941.
- [24] M. E. Wieder, D. C. Hone, M. J. Cook, M. M. Handsley, J. Gavrilovic, D. A. Russell, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 727–734.
- [25] M. Busby, C. Blum, M. Tibben, S. Fibikar, G. Calzaferri, V. Subramaniam, L. De Cola, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10970–10976.
- [26] G. Calzaferri, K. Lutkouskaya, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 887–918.
- [27] G. Nebe-von-Caron, P. J. Stephens, C. J. Hewitt, J. R. Powell, R. A. Badley, *J. Microbiol. Methods* **2000**, *42*, 97–114.
- [28] V. Mantareva, V. Kussovski, I. Angelov, E. Borisova, L. Avramov, G. Schnurpfeil, D. Wöhrle, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4829–4835.