

## Goldnanopartikel-Fluorophor-Komplexe: empfindliche, selektive „Nasen“ für die Biosensorik

Uwe H. F. Bunz\* und Vincent M. Rotello\*

Biosensoren · Fluoreszenzsonden · Nanopartikel · Verdrängungssassays

**G**oldnanopartikel (Gold-NPs) löschen die Fluoreszenz adsorbiertes Fluorophore. Sobald solche Komplexe durch einen Analyten gespalten werden, beobachtet man ein „Anschalten“ der Fluoreszenz. Durch eine sorgfältige Auswahl von funktionalisiertem NP und Fluorophor lassen sich Komplexe mit differentiellem Ansprechverhalten auf Analyte erhalten, was zu vielseitigen und dennoch einfachen Array-basierten Sensorplattformen führt. Mithilfe dieser Methode können wir Proteine in Pufferlösungen und im Blutserum identifizieren, zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies und -stämmen differenzieren und gesunde, karzinöse und metastatische Human- und Mauszellen voneinander unterscheiden.

### 1. Einleitung

Die qualitative und quantitative Analyse von Zellen, Proteinen und anderen biologischen Systemen in komplexen Matrices ist für die Diagnose von Krankheiten wichtig. Hierfür gibt es eine Vielzahl von Methoden, darunter das ELISA-Verfahren (enzymgekoppelter Immunadsorptions-test), „Omics“ und verwandte Verfahren in Kopplung mit der Massenspektrometrie sowie weitverbreitete Techniken wie die Gelelektrophorese zum Nachweis von Störungen des Blutserums bei Patienten mit Leberversagen oder anderen Stoffwechselproblemen.<sup>[1]</sup> Zur Detektion von Mikroorganismen sind das Plattieren und Kultivieren von Zellen ebenso wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) Standard. Virale Infektionen werden im Allgemeinen durch ELISA nachgewiesen, oder, beim frühzeitigen HIV-Nachweis, durch PCR.<sup>[2]</sup> Weitere Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen, einschließlich elektrochemischer Tests, wurden vorgeschlagen.<sup>[3]</sup> Einfache und schnelle Tests, die die Anwesenheit eines solchen Analyten durch Farbumschlag oder eine Änderung

im Fluoreszenzverhalten anzeigen, sind hingegen kaum bekannt. Ein solcher „Teststreifen“ könnte sogar eine kleine Indikatorenbibliothek enthalten, die auf kombinierte Weise die Ab- oder Anwesenheit bestimmter Analy-

te anzeigen könnte.

Durch die Kombination von selektiven anstelle von spezifischen Sensoren/Indikatoren in einem Sensorarray entsteht eine chemische Nase oder Zunge, die durch ihr kombiniertes Ansprechverhalten Analyten oder Krankheitszustände identifiziert. Die Bezeichnungen chemische Zunge und chemische Nase liest man oft im Zusammenhang mit selektiven Elektroden und der elektrochemischen Detektion von Analyten.<sup>[4]</sup> Diese Methoden sind sehr nützlich, jedoch wollen wir uns in diesem Kurzaufsatzz auf optische Detektionsmethoden konzentrieren, genauer gesagt auf Materialien, die ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Thematisch nah an diesem Thema sind kleine Bibliotheken von Farbstoffen, die bei Kontakt mit Analyten einen Farbwechsel erfahren. Interessante Beispiele für die Erfassung von mannigfaltigen Analytsätzen sind die von Suslick et al. eingesetzten Sensoren auf der Basis von Indikator-Arrays<sup>[5]</sup> oder die von Anslyn und Hewage beschriebene Minibibliothek von Thiol-funktionalisierten Squarain-Farbstoffen zum Nachweis von Metallkationen.<sup>[6]</sup> Die Signaltransduktion kann bei solchen Bibliotheken über verschiedene Mechanismen erfolgen; im Falle von Suslicks Sensoren ändert eine Serie solvatochromer Farbstoffe ihre Farbe nach Kontakt mit den Analyten. Man könnte sich auch eine Reihe von kreuzreaktiven,<sup>[7]</sup> aber nicht sehr selektiven Sensormolekülen vorstellen, die als Verdrängungssassay fungieren, indem der Komplex durch einen Analyten gespalten wird.<sup>[8,9]</sup> Beim Indikator-Verdrängungssassay (indicator displacement assay, IDA) wird eine molekulare Einheit, die ein oder mehrere Erkennungselemente enthält, mit einer signalfabgebenden Einheit, typischerweise einer kolorimetrischen

[\*] Prof. U. H. F. Bunz  
School of Chemistry and Biochemistry  
Georgia Institute of Technology  
901 Atlantic Drive, Atlanta GA 30332 (USA)  
Fax: (+1) 404-385-1795  
E-Mail: uwe.bunz@chemistry.gatech.edu

Prof. V. M. Rotello  
Department of Chemistry, University of Massachusetts  
710 N Pleasant Street, Amherst, MA (USA)  
E-Mail: rotello@chem.umass.edu

Spezies oder einem fluoreszierenden Molekül, kombiniert. Farbstoff und Erkennungseinheit bilden einen selbstorganisierten, „supramolekularen“ Komplex. Setzt man diesen dem gelösten Analyten zu, so ersetzt der Analyt einige oder alle Farbstoffeinheiten, und ein Signal wird generiert.

Bei einem klassischen Sensor oder Indikator ist das detektierende Element kovalent mit der signalgebenden Einheit verknüpft. Die Anbindung eines Analyten induziert eine elektronische Veränderung im Farbstoff, was zu einer Rot- oder Blauverschiebung des Absorptions- und/oder Emissionsspektrums führt.<sup>[10]</sup> Der Vorteil des IDA-Verfahrens gegenüber klassischen Nachweisverfahren ist sein „Mix-and-match“-Charakter, was heißt, dass eine Serie von  $n$  Rezeptoreinheiten mit einer zweiten Serie von  $m$  Indikatormolekülen kombiniert werden kann, woraus eine Matrix von  $n \times m$  selbstorganisierten IDA-Elementen resultiert. Der präparative Aufwand für den Aufbau einer solchen Sensorbibliothek ist damit weit geringer, als jeden neuen Sensor einzeln zu synthetisieren. Darüber hinaus können die beiden IDA-Komponenten unabhängig voneinander modifiziert werden, um Bindungsaffinitäten und Selektivitäten der erhaltenen IDA zu manipulieren.

Suspensionen von Goldnanopartikeln (Au-NPs)<sup>[11]</sup> haben eine intensive Farbe, und oberflächengeschützte Au-NPs haben breite Anwendung in biologischen Nachweisverfahren gefunden.<sup>[12]</sup> Es sind starke Fluoreszenzloscher, die entweder durch resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) oder einen Elektronentransfer-Mechanismus agieren. NPs können in Größen zwischen 2 und 50 nm hergestellt werden. Monoschichten<sup>[13]</sup> von Liganden ermöglichen eine fein abgestimmte Löslichkeit in jedem gewünschten Lösungsmittel und können zusätzlich sensorische Einheiten oder molekulare Erkennungselemente enthalten. Die Moleküle der Monoschicht, die normalerweise Thiol-Endgruppen tragen, werden durch Ligandenaustausch unter Bildung einer Gold-Schwefel-Bindung an das NP verankert. Die Kombination von NPs mit unterschiedlichen Thiol-Liganden bietet Zugang zu einer Vielfalt funktionalisierter Fluoreszenzloscher auf NP-Basis von unterschiedlichster Größe und mit unterschiedlichen Erkennungselementen und Valenzeigenschaften.<sup>[14,15]</sup> Die Ladung und Hydrophobie der Monoschichten, und damit auch der geschützten NPs, lassen sich also gezielt einstellen.

Die durch Monoschichten geschützten NPs sind polyvalent und lassen sich mit jeder Art von Fluorophor kombinieren. Wir beschränken uns in diesem Kurzaufsatz auf IDAs, die durch Kombination von positiv geladenen Au-NPs mit

negativ geladenen konjugierten Polymeren vom PPE-Typ (Poly(*para*-phenylenethinylen)) und dem anionischen, grün fluoreszierenden Protein (GFP) entstehen (Abbildung 1). In beiden Fällen erhält man attraktive selbstorganisierte IDA-

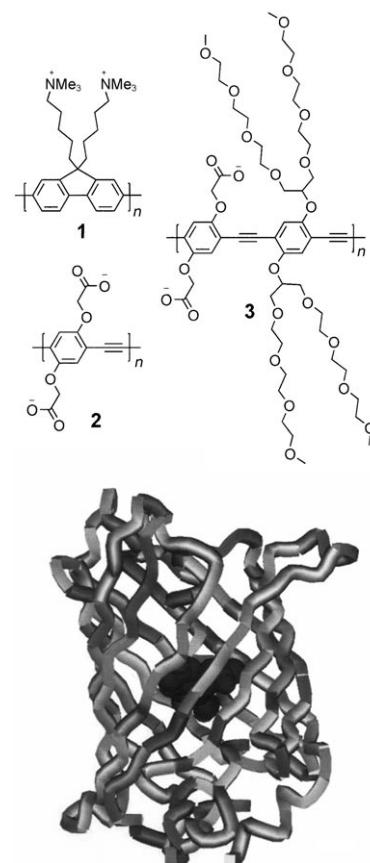


Abbildung 1. Fluorophore 1–4.

Sensoren, die Proteine, Bakterien und Zellen durch ein Analyt-induziertes „Anschalten“ der Fluoreszenz erkennen können. Gold ist nicht das einzige Material, das für diesen Ansatz geeignet ist, und im Abschnitt 5 zeigen wir, dass auch Cobalferrit-NP/PPE-Konstrukte für den IDA-Nachweis von Pyrophosphat (PPi) in Gegenwart von Phosphat (Pi) genutzt werden können.



Uwe Bunz (geb. 1963) promovierte 1990 an der LMU München. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei K. P. C. Vollhardt an der UC Berkeley habilitierte er bei K. Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz. Von 1997 bis 2003 war er zuerst Associate, dann Full Professor an der University of South Carolina. Seit 2003 ist er Professor für Chemie am Georgia Institute of Technology. Seine Forschungsinteressen gelten konjugierten Polymeren.



Vincent Rotello (geb. 1964) promovierte 1990 an der Yale University und war anschließend Postdoc bei J. Rebek, Jr. am MIT. 1992 schloss er sich dem Department of Chemistry an der University of Massachusetts in Amherst an, wo er seine weitere akademische Karriere bestreiten hat. Seit 2003 ist er Goessmann-Professor für Chemie. Seine Forschungsinteressen gelten Nanopartikeln und Grenzflächen.

## 2. Wechselwirkungen von Gold-Nanopartikeln mit konjugierten Polymeren

## 2.1. Gold-NPs sind leistungsstarke Fluoreszenzlöscher

Heeger, Bazan et al.<sup>[16]</sup> entdeckten, dass die Fluoreszenz des kationischen wasserlöslichen Polyfluorens **1** (Abbildung 1) durch die Zugabe winziger Mengen von Au-NPs unterschiedlicher Größe gelöscht wird. Die NPs weisen effektive Stern-Volmer-Konstanten ( $K_{SV}$ ) in der Größenordnung  $K_{SV} = 10^7\text{--}10^{11}$  auf. Der Mechanismus der Fluoreszenzlösung (Elektronen- oder Energietransfer) konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden, allerdings lässt die deutliche Überlappung des Emissionsspektrums von **1** mit dem Absorptionsspektrum der NPs auf einen FRET-Mechanismus schließen. Die Autoren nahmen an, dass die Fluoreszenzlösung durch einen statischen Mechanismus erfolgt, was bei Emissionslebensdauern der konjugierten Polymere **1**–**3** von 0.3–0.7 ns allgemein der Fall ist. Unter diesen Bedingungen sind die beobachteten Stern-Volmer-Konstanten gleich einer Bindungskonstanten  $K_a$ . Diffusionskontrollierte oder dynamische Fluoreszenzlösung spielen bei den mikromolaren Polymerkonzentrationen, wie sie in diesen Studien verwendet wurden, nur eine kleine Rolle. Die Stern-Volmer-Gleichung [Gl. (1);  $I_0$  ist die anfängliche Fluoreszenzintensität,  $I_{(Q)}$  ist die Intensität nach Zugabe des Fluoreszenzlöschers] bietet damit einen bequemen Ansatz für die Bestimmung von Bindungskonstanten.

$$I_0/I_{[Q]} = 1 + K_{\text{sv}}[Q] \quad (1)$$

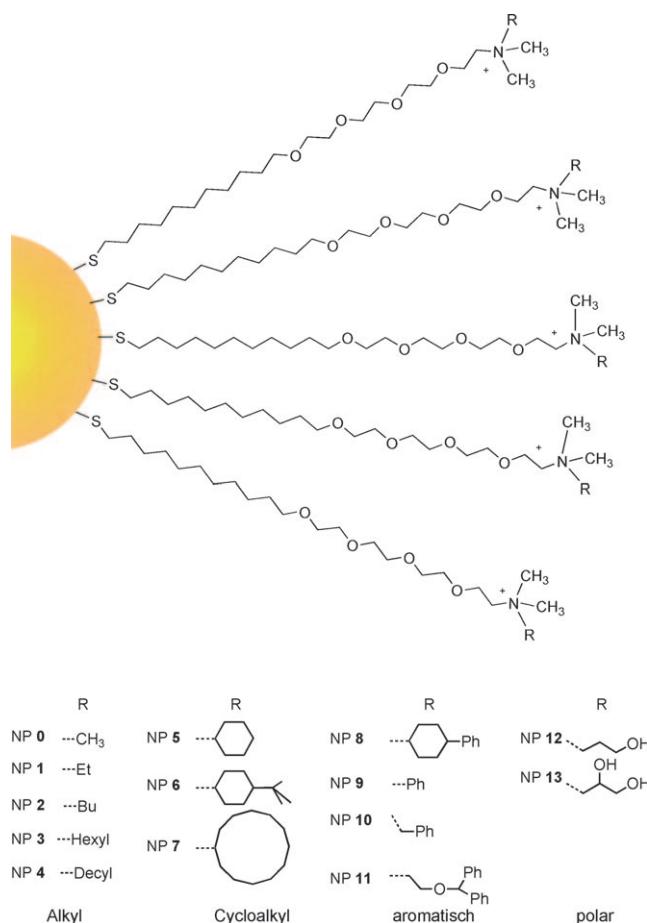
Aus den Daten ermittelten Heeger, Bazan et al. hohe effektive Stern-Volmer-Konstanten ( $K_{sv}$ ), wobei aber die Kurve  $I_0/I_{[Q]}$  als Funktion der Konzentration des Fluoreszenzlöschers nicht linear, sondern nach oben gekrümmt verlief. Woran liegt das? In der Stern-Volmer-Gleichung steht  $[Q]$  für die Konzentration des *freien* Fluoreszenzlöschers  $Q$ , und nicht etwa für dessen Gesamtkonzentration (dies ist  $[Q]_{tot}$ ).  $[Q]$  ist allerdings schwierig zu messen, während  $[Q]_{tot}$  einfach die Konzentration des zugefügten Fluoreszenzlöschers ist. Für den Fall, dass das Produkt aus  $K_{sv}$  und  $[\text{Fluorophor}]$  kleiner 1 ist, kann  $[Q]$  mit  $[Q]_{tot}$  angenähert werden, und es resultiert eine lineare Kurve.<sup>[17]</sup> Für den Fall  $K_{sv}[\text{Fluorophor}] \gg 1$  gilt diese Näherung dagegen nicht mehr, und es gilt  $[Q] \ll [Q]_{tot}$ . In diesen Fällen muss Gleichung (2) verwendet werden, um zuverlässige  $K_{sv}$ - oder  $K_a$ -Werte zu erhalten.

$$I_{[Q]} = I_0 + \frac{\alpha}{2} \left[ \left( [F]_0 + n[Q]_{\text{tot}} + \frac{1}{K_{\text{SV}}} \right) - \left\{ \left( [F]_0 + n[Q]_{\text{tot}} + \frac{1}{K_{\text{SV}}} \right)^2 - 4n[F]_0[Q]_{\text{tot}} \right\}^{1/2} \right] \quad (2)$$

## 2.2. Einfluss von Hydrophobie und Ladung auf die Bindung von konjugierten PPE-Polymeren an Monoschicht-geschützte NPs<sup>[18]</sup>

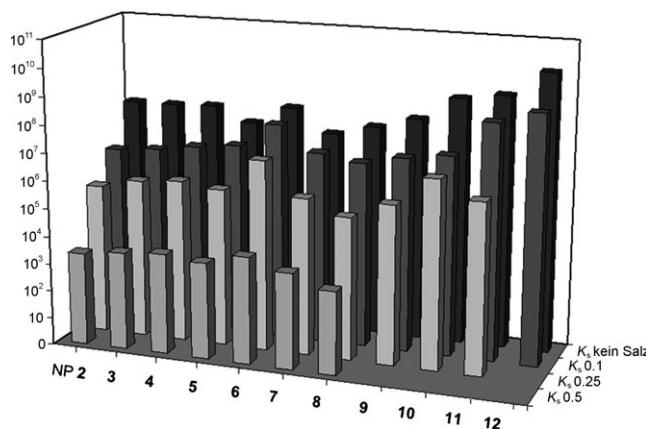
Wie wird die Bindung zwischen konjugierten Polymeren und Au-NPs von der Polymerstruktur und der schützenden Monoschicht auf den Au-NPs beeinflusst? Um hierfür ein

systematisches Verständnis zu erhalten, haben wir die beiden anionischen PPEs **2** und **3** untersucht. Durch die zusätzlichen verzweigten Oligoethylenglycol-Seitenketten am PPE-Rückgrat erhöht sich die Fluoreszenz von **3** gegenüber der von **2** um den Faktor vier. Gleichzeitig werden die nichtspezifischen Wechselwirkungen mit biologischem Material minimiert, was ein wichtiger Aspekt für unseren Sensorentwurf war. Die Verwendung von GFP (**4**), einem negativ geladenen, fluoreszierenden Protein, erlaubt zusätzliche Flexibilität hinsichtlich der Bindungs- und Fluoreszenzeigenschaften. Die von uns eingesetzten Fluorophore und Thiol-Komponenten sowie die Struktur einer geschützten Au-Oberfläche sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.



**Abbildung 2.** Oben: Struktur eines durch eine Thiol-Monoschicht geschützten Au-NP. Unten: verwendete Thiole.

Um die grundlegenden Wechselwirkungen zwischen Gold-NPs und konjugierten Polymeren zu verstehen, verwendeten wir das einfach aufgebaute PPE **3**<sup>[19,20]</sup> und ermittelten die Bindungskonstanten für die Bindung zwischen **3** und **NP1-NP11** in wässriger Lösung bei unterschiedlichen Ionenstärken. Die Bindungskonstanten wurden anhand der Fluoreszenzlösung von **3** durch **NP1-NP11** und Auswertung der Daten mit Gleichung (2) erhalten. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse der Bindungsexperimente bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen.

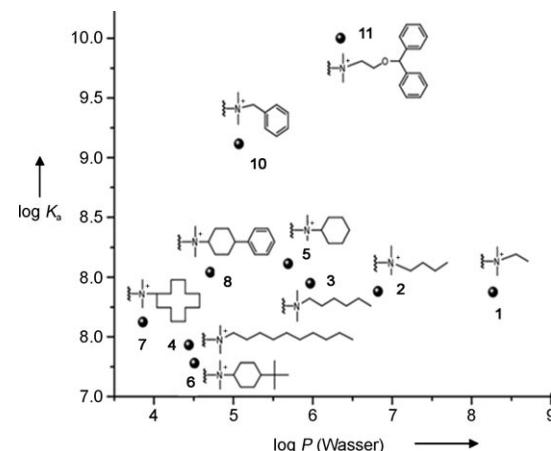


**Abbildung 3.** Logarithmische Auftragung der Bindungskonstanten für Konjugate zwischen **NP2–NP12** und **PPE 3** in Wasser und in 0.1, 0.25 und 0.5 M NaCl-Lösung ( $K_s = K_{SV} = K_a$ ). Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [18].

Mit aromatischen Monoschichten funktionalisierte NPs sind wirksamere Fluoreszenzlöscher und binden demzufolge fester an das konjugierte Polymer **3** als aliphatischen Monoschichten. Unter den aliphatischen NPs geht **NP6** die stärkste Bindung mit **3** ein. Ein zweiter Trend ist die Abhängigkeit der Bindungskonstanten von der NaCl-Konzentration. Da viele biologische Prozesse in einer Umgebung mit hoher Ionenstärke stattfinden, musste der Einfluss auf die Bindung von **3** an NPs bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen ermittelt werden.

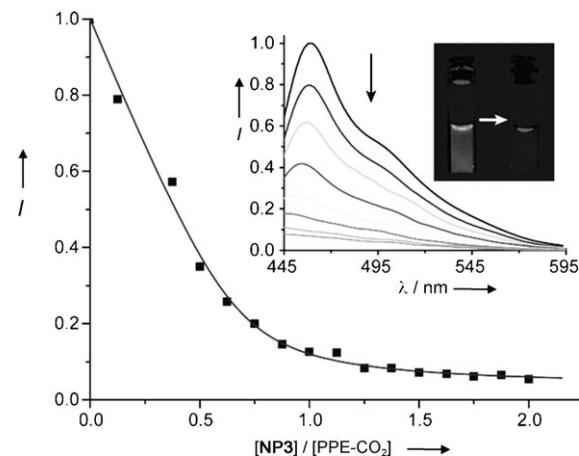
Die Bindung zwischen NPs und **3** hat hydrophobe und elektrostatische Anteile. Eine zunehmende Salzkonzentration sollte sich, zumindest auf den ersten Blick, störend auf den elektrostatischen Anteil auswirken, den hydrophoben Anteil aber ungestört lassen. Jedoch scheinen die Verhältnisse komplizierter zu sein: Die am stärksten hydrophoben NPs (die „aromatisch“ funktionalisierten) weisen die höchsten Bindungskonstanten in reinem Wasser auf, zeigen sich aber am stärksten von der Salzkonzentration abhängig. Dieser Effekt könnte seine Ursache darin haben, dass die schwache Bindung zwischen der  $\pi$ -Fläche des Polymers und den kationischen Kopfgruppen (Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen) gestört wird.<sup>[21]</sup>

Zur weiteren Analyse haben wir die Hydrophobie der Liganden (bestimmt durch den Verteilungskoeffizienten) mit den Bindungskonstanten ( $K_a$ ) korreliert, wie sie aus der Titration der Gold-NPs mit **3** erhalten wurden (Abbildung 4). Interessanterweise haben im Fall der Alkyl-substituierten Thiole die hydrophoben Eigenschaften keinen großen Einfluss auf die Bindung. Ihre höhere Hydrophobie führt nicht zu einer größeren Bindungskonstante. Der Grund hierfür könnte sein, dass gleichzeitig die elektrostatische Wechselwirkung des Gold-NP mit **3** abnimmt. Im Falle der aromatisch substituierten Thiole korreliert hingegen  $K_a$  mit der Hydrophobie des Au-NP. Je hydrophober die Ligandensphäre um das Gold-NP ist, umso größer ist die Bindungskonstante für die Anbindung an **3**. Dieses Ergebnis ist leicht nachvollziehbar, da die starken Aren-Aren-Wechselwirkungen zwischen den Gold-NPs und **PPE 2** die Bindung verstärken werden. Je-



**Abbildung 4.** Logarithmische Auftragung der Bindungskonstanten gegen die Verteilungskoeffizienten von **NP1–NP11**. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [18].

doch muss eine starke elektrostatische Komponente vorhanden sein, da die Konstrukte aus **3** und „aromatischen“ NPs beim steigender Salzkonzentration rasch gespalten werden. Bei physiologischen Salzkonzentrationen ist die Bindung der NPs mit aromatischer Kopfgruppe zwar geschwächt, mit  $K_a = 10^6$ – $10^7$  aber immer noch groß genug, um diese Systeme in Verdrängungsassays einsetzen zu können. Falls höhere Bindungskonstanten erwünscht sind, kann **PPE 2** eingesetzt werden, das eine höhere Ladungsdichte aufweist und höhere Bindungskonstanten ergibt. Die Titration von **NP3** mit **2** er gab  $K_a = 1.7 \times 10^8$ , die Titration von **NP3** mit **3** ergab  $K_a = 8.8 \times 10^7$ . Charakteristische Titrationskurven für die Wechselwirkung von **NP3** mit **2** sind in Abbildung 5 gezeigt.

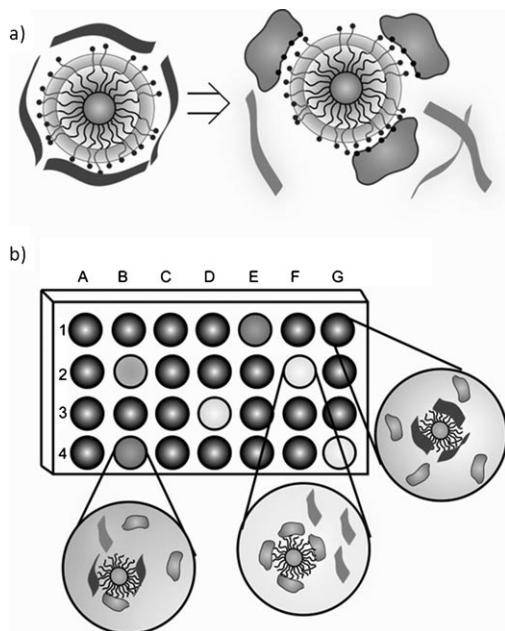


**Abbildung 5.** Änderung der Fluoreszenzintensität von **2** (100 nM) bei 465 nm nach Zugabe des kationischen **NP3**. Der Einschub zeigt das Fluoreszenzspektrum von **2** vor und nach der Zugabe von **NP3** sowie eine Photographie der Lösung. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [22].

### 3. Erkennung von Proteinen mit Goldnanopartikel-Fluorophor-Konstrukten

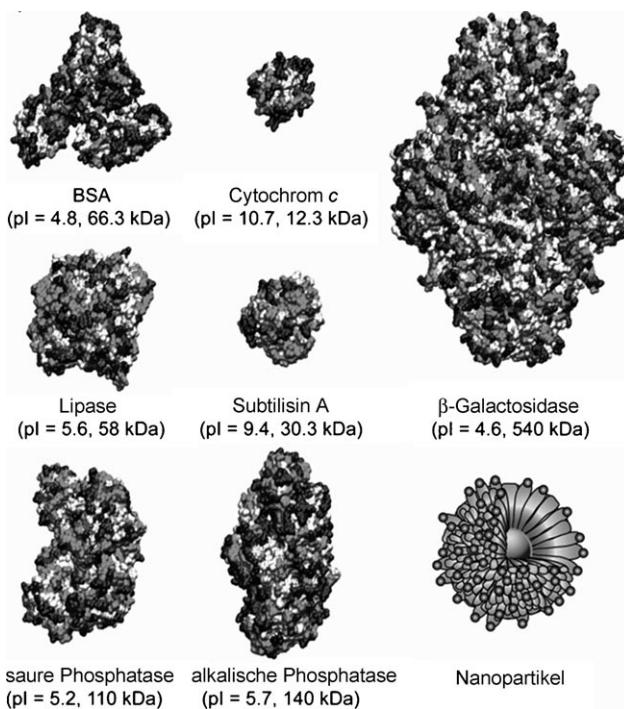
#### 3.1. Erkennung von Proteinen mit Konstrukten aus PPE und einer Bibliothek aus sechs NPs<sup>[22]</sup>

Um die Eignung von NP-PPE-Konstrukten zum Nachweis von Proteinen zu untersuchen, wurde eine kleine Bibliothek aus den NPs **NP0,1,3,5,10,12** und dem Carboxylat-PPE **2** erzeugt. Lösungen der NPs wurden mit einer verdünnten Lösung von **2** gemischt, bis die Fluoreszenz des PPE auf 10 % des Ursprungswerts gesunken war (Abbildungen 5 und 6). Die Bibliothek wurde mit verdünnten Lösungen der



**Abbildung 6.** Fluorophorverdrängungsassay zum Proteinnachweis. a) Verdrängung des fluoreszenzgelöschten Polymers durch den Proteinanalyt, einhergehend mit der Wiederherstellung der Fluoreszenz. b) Generierung eines Analysemusters durch differentielle Abspaltung fluoreszierender Polymere von den Gold-NPs. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [22].

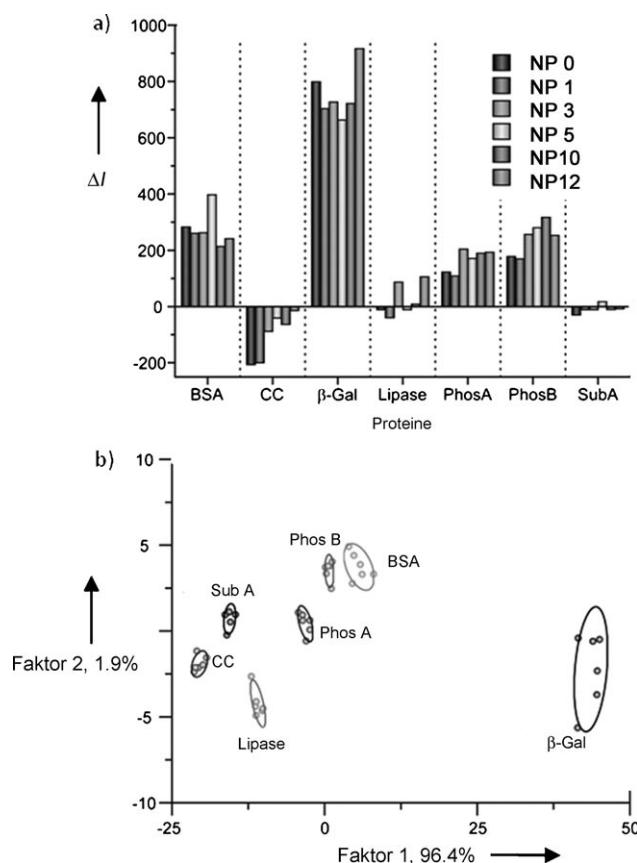
sieben in Abbildung 7 gezeigten Proteine versetzt, und die Fluoreszenzänderung der Konstrukte wurde quantifiziert (Abbildung 8). Schon an den Rohdaten ist zu erkennen, dass die sieben Protein-Analyte ein unterschiedliches Ein- und Ausschalten der Fluoreszenz der sechs NP-PPE-Konstrukte bewirken. Nicht ganz unerwartet zeigt  $\beta$ -Gal den stärksten Einfluss, was sein hohes Molekulargewicht und die stark negative Ladung bekundet. Cytochrom c (CC) zeigt eine wirksame Fluoreszenzlösung als Folge des effektiven FRET vom PPE zum stark farbigen Protein. In der linearen Diskriminanzanalyse (Abbildung 8b) sind alle sieben Proteine deutlich unterscheidbar, und die mathematischen Unbekannten aus dem Trainingsdatensatz wurden mit 95 % Genauigkeit identifiziert.



**Abbildung 7.** Relative Größen, Molekulargewichte und isoelektronische Punkte (pI) der sieben Proteine und des Au-NP, die im Verdrängungsassay in Lit. [22] verwendet wurden. BSA = Rinderserumalbumin. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [22].

#### 3.2. Grün fluoreszierendes Protein zur Erkennung von Proteinen im Blutserum<sup>[23]</sup>

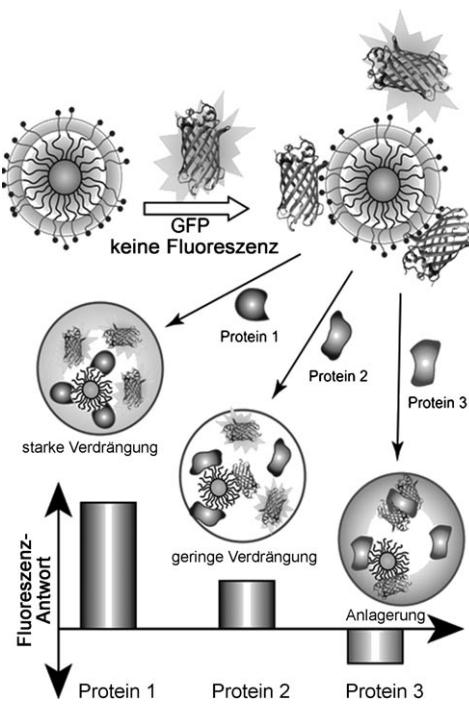
Die Unterscheidung von Proteinen mithilfe dieser einfachen, nichtbiologischen NP-PPE-Konstrukte gelingt erstaunlich genau. Der Grund dürfte darin liegen, dass jedes NP-PPE-Konstrukt ein analoges Ansprechverhalten auf jedes der Proteine zeigt: Wenn angenommen wird, dass jede Fluoreszenz-Antwort z. B. 1000 unterscheidbare Werte ergeben kann, so hätte man eine theoretische Antwortbreite im Bereich von  $1000^6 = 10^{18}$  unterschiedlich ansprechenden Elementen (die tatsächliche Zahl ist geringer, da nicht alle Antworten unabhängig voneinander sind). Der mögliche Nachweis einzelner Proteine in Wasser – wiewohl von fundamentalem Interesse – ist nicht hinreichend, um diese Konstrukte zur Erkennung von Analyten in komplexen Matrices wie Blutserum, Sperma, Urin oder Schweiß einzusetzen. Die diagnostisch wichtigste biologische Matrix ist menschliches Blutserum (die proteinreiche Lösung, die übrigbleibt, wenn weiße und rote Blutkörperchen aus dem Blut entfernt werden).<sup>[24]</sup> Das Blutplasma/Serum-Proteom enthält mehr als 20000 unterschiedliche Proteine und ist damit das perfekte Testsystem für jedwede bioanalytische Methode. Um nichtspezifische Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und den Serumproteinen zu minimieren, wurde grün fluoreszierendes Protein (GFP) als Fluorophor zur Erkennung von Serumproteinen eingesetzt; PPE kann nichtspezifische Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen zeigen (Abbildung 9).<sup>[25a]</sup> Darüber hinaus weist GFP eine definierte Größe und definiertes Molekulargewicht auf, und weil der



**Abbildung 8.** Array-basierter Nachweis von Proteinanalyten in Konzentrationen von 5  $\mu$ M. a) Fluoreszenzantworten ( $\Delta I$ ) des NP-PPE-Sensors (**NP0,1,3,5,10,12**) für verschiedene Proteine (BSA: Rinderserumalbumin, CC: Cytochrom c,  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galactosidase, PhosA: saure Phosphatase, PhosB: alkalische Phosphatase, SubA: Subtilisin A). Jeder Wert ist der Mittelwert aus sechs Parallelmessungen. b) Kanonisches Score-Diagramm der ersten zwei Faktoren aus vereinfachten Fluoreszenzantwortmustern, wie sie in den NP-PPE-Arrays der sieben Proteine (5  $\mu$ M) erhalten wurden. Die kanonischen Scores wurden durch lineare Diskriminanzanalyse (LDA) für die Identifizierung der sieben Proteine berechnet. Ellipsen markieren einen Vertrauensbereich von 95%. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [22].

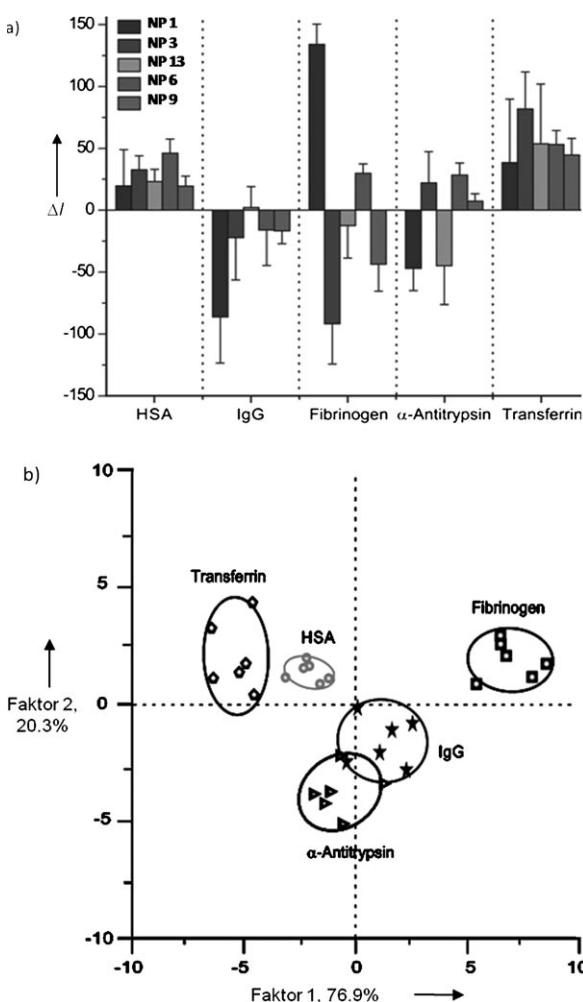
Fluorophor in einer fassförmigen Proteinstruktur eingebettet ist, sind aggregationsinduzierte Fluoreszenzlösung und die Bildung von Excimeren, wie sie bei konjugierten Polymeren auftreten können, deutlich reduziert.<sup>[25b]</sup> Die Bindungskonstanten der GFP-NP-Komplexe sind ähnlich hoch wie im Fall von PPE; zum Beispiel zeigt der **NP13**-GFP-Komplex einen  $K_a$  von  $5 \times 10^9$ , ähnlich dem Komplex zwischen PPE **3** und **NP10-13**.

Die 20 am häufigsten vorkommenden Serumproteine machen gewichtsmäßig 99 % aller Serumproteine aus. Von diesen 20 stellen wiederum die fünf häufigsten, nämlich Albumin (70 %), IgG (14 %), Transferrin (5.7 %), Fibrinogen (2.8 %) und  $\alpha$ -Antitrypsin (0.7 %), 93 % der Proteinmasse im menschlichen Blutserum. Serumproben werden bei medizinischen Diagnosen üblicherweise durch einfache Elektrophorese untersucht,<sup>[1]</sup> wodurch sich Störungen im Proteinhaushalt, die einen Hinweis auf Leberstörungen und andere Krankheiten geben, bestimmen lassen. Für den Nachweis von



**Abbildung 9.** Kompetitive Bindung zwischen Proteinen und einem fluoreszenzgelöschten GFP-NP-Komplex: Je nachdem, ob das Protein GFP vom NP verdrängt oder bevorzugt an GFP anlagert, kommt es zu einer Aktivierung der Fluoreszenz oder einer weiteren Lösung. Untersucht wurden **NP1,3,6,9** und **13**. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [23].

Proteinen wie Troponin hingegen, die nur in Spuren vorkommen, werden Antikörpertests eingesetzt. Ein Brückenschlag zwischen diesen beiden Methoden sind die 2D-SDS-PAGE<sup>[1]</sup>-Elektrophorese und die SELDI-Massenspektrometrie (SELDI = oberflächenverstärkte Laser-Desorption/Ionisierung).<sup>[26]</sup> Monoklonale Antikörper sind sehr empfindlich, erfordern aber für jedes Protein einen spezifischen Antikörper; die Elektrophorese ist einfach, aber in ihren Möglichkeiten begrenzt, während die Massenspektrometrie teure Gerätetechnik erfordert und keinen hohen Durchsatz ermöglicht. Daher besteht Interesse an grundlegenden diagnostischen Methoden, mit denen der Gehalt eines bestimmten Proteins im Serum bestimmt werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine Bibliothek der positiv geladenen **NP1,3,6,9** und **NP13** erstellt, die mit dem negativ geladenem GFP in kommerziell erhältlichem Human-Blutserum kombiniert wurden. Ein typisches Verhältnis von NP zu GFP, bei dem Komplexe mit einem Optimum an Reaktionsfähigkeit gegenüber hinzugefügten Proteinen erhalten wurden, war 2:1 bei einer NP-Konzentration von 500 nm. Abbildung 10 zeigt die Fluoreszenzänderung der NP-GFP-Konstrukte im Serum bei Konzentrationen von je 500 nm HSA, IgG, Fibrinogen, Antitrypsin und Transferrin. Man beobachtet sowohl Ab- als auch Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die lineare Diskriminanzanalyse zeigt, dass die Proteine, mit Ausnahme von IgG und Antitrypsin, zweidimensional gut aufgelöst werden und nichtüberlappende Muster bilden. Allerdings können IgG und Antitrypsin in der dritten Dimension differenziert werden (nicht gezeigt). In weiteren Versuchen ließ sich zei-



**Abbildung 10.** a) Fluoreszenz-Antworten ( $\Delta I$ ) von fünf GFP-NP-Addukten auf Serumproteine (500 nM) in Human-Blutserum. Die aufgetragenen Antworten sind der Mittelwert aus sechs Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen. b) Kanonisches Score-Diagramm der Fluoreszenzmuster, wie sie aus der LDA gegen fünf Proteinanalyten bei einer definierten Konzentration (500 nM) erhalten wurden. Ellipsen markieren einen Vertrauensbereich von 95%. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [23].

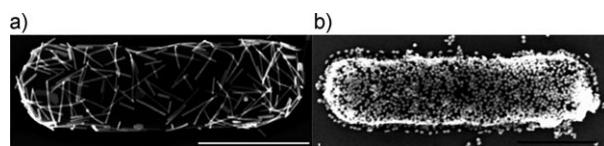
gen, dass auch Mischungen verschiedener Proteine oder die Zugabe eines Proteins in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer spezifischen und reproduzierbaren Änderung in den LDA-Mustern führte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass einfache Bibliotheken aus unterschiedlich funktionalisierten Gold-NPs und entweder Biofluorophoren wie GFP oder aber konjugierten Polymeren befähigt sind, Proteine ebenso wie Störungen im Proteinhauptsatz in einer komplexen Matrix wie dem Blutserum erkennen und aufspüren zu können. Dies ist ein beeindruckendes Ergebnis für diese doch eher einfachen Konstrukte, bei denen hierzu elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen reichen.

## 4. Erkennung von Bakterien- und Säugerzellen mit PPE-NP-Konstrukten

### 4.1. Wechselwirkungen von Bakterien mit anorganischen NPs

Bakterien sind zwischen 0.5 und 10  $\mu\text{m}$  groß und haben eine negativ geladene Oberfläche, wodurch sie mit NPs verschiedener Gestalt Wechselwirkungen eingehen können. Murphy et al.<sup>[27a]</sup> zeigten, dass CTAB-funktionalisierte Goldnanostäbchen und -nanosphären (Abbildung 11; CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid) homogen auf der Hülle von *B. cereus* anlagern. Die Teichonsäuregruppen verleihen diesem Gram-positiven Mikroorganismus eine stark negative Ladung, wodurch elektrostatische Bindungen zu kationischen Materialien erleichtert werden.



**Abbildung 11.** a) Monoschicht aus Au-Nanostäbchen (25 nm  $\times$  400 nm) nach 15 min. b) Au-Nanosphären (Durchmesser: 45 nm) auf *Bacillus cereus*, 15 min nach Zugabe. Maßstabsbalken 1  $\mu\text{m}$ . Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [27a].

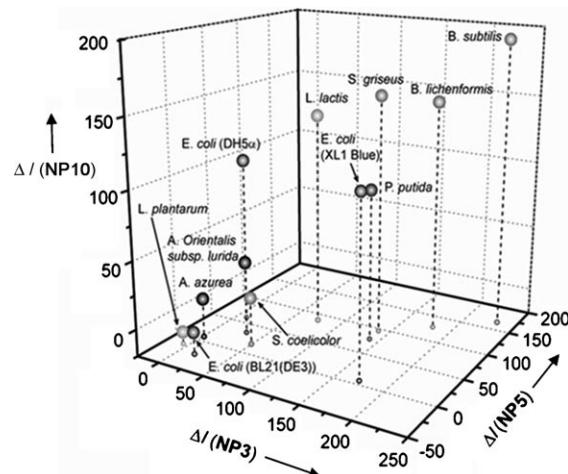
Bei anderen Untersuchungen wurden Mannose-substituierte Gold-NPs spezifisch durch die Pili von *E.-coli*-Bakterien komplexiert (Pili sind feine „Härchen“ auf der Oberfläche des Bakteriums). Pili sind reich an Lectinen, d.h. zuckerbindenden Proteinen, und wechselwirken daher bevorzugt mit jenen Bestandteilen des Bakteriums.<sup>[28]</sup> In einer Studie von Bertozzi und Bednarski wurde mittels Avidin ein Mannose-Biotin-Konstrukt erzeugt und mit *E.-coli*-Bakterien zusammengebracht.<sup>[27b]</sup> Ein Avidin-Antikörper wurde hinzugegeben und das gebildete Konstrukt mit Protein-A-funktionalisierten Gold-NPs inkubiert. Dieses Vorgehen ermöglichte die Visualisierung von funktionellen Mannose-bindenden Gruppen auf den Pili mittels TEM. Auf eine ähnliche Weise wurden Goldnanostäbchen durch elektrostatische Wechselwirkungen oder kovalente Beladung mit einem Antikörper gegen *P. aeruginosa* funktionalisiert. Durch Inkubieren mit *P. aeruginosa* wurden Hybride erhalten, bei denen die Nanostäbchen die Bakterienoberfläche bedeckten.<sup>[29]</sup> Wechselwirkungen zwischen Fluorophor-NP-Konstrukten und Bakterien wurden bislang noch nicht genutzt, obwohl die Gruppen um Swager und Bunz die Wechselwirkungen von konjugierten Polymeren mit Bakterien untersucht haben.<sup>[30,31]</sup>

Die erfolgreiche Erkennung von Proteinen lässt vermuten, dass auch Proteine auf Bakterienoberflächen auf Nanostrukturen aus Gold-NPs und PPEs wie **2** und **3** ansprechen sollten. Die Zellwände von Bakterien sind negativ geladen und bieten eine polyvalente Umgebung, die mit NP-PPE-Konstrukten unter Anschalten der Fluoreszenz stark wechselwirken kann – ähnlich dem Effekt, wie er bei Proteinen beobachtet wurde. Die bisherigen Veröffentlichungen sprechen stark dafür, dass dieser Ansatz Erfolg haben könnte.<sup>[30–31]</sup>

4.2. Erkennung von Bakterien<sup>[32]</sup>

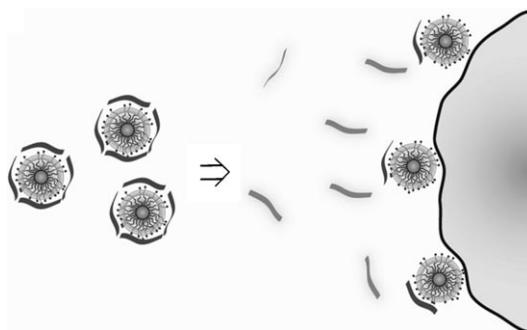
Der Nachweis und die Quantifizierung von Bakterien ist von immenser Bedeutung für die Bereiche Medizin, Umweltschutz und Gesundheitswesen. Bakterielle Infektionen treten im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen, nosokomialen Infektionen usw. auf und sind von großem Belang für die öffentliche Gesundheit. In der klinischen Diagnostik werden diese Infektionen in Plattenkulturen nachgewiesen, was eine effiziente, aber auch recht zeitintensive Methode ist. Mehrere hochentwickelte Methoden wie die PCR sind zum Nachweis spezifischer Mikroorganismen eingesetzt worden,<sup>[33]</sup> allerdings wäre eine einfache nasschemische Methode zur schnellen Identifizierung von Mikroorganismen von hohem Interesse im klinischen Bereich, in der Lebensmittelüberwachung usw.<sup>[34]</sup> Laut Reisner und Woods<sup>[35]</sup> werden mehr als 80% aller klinisch gemeldeten Infektionen von nur sieben Mikroorganismen verursacht, wobei allein *E. coli* und *S. aureus* für rund 50% verantwortlich sind.

Die drei hydrophoben Partikel **NP3,5,10** wurden mit PPE **3** zu Konstrukten kombiniert, deren PPE-Fluoreszenz auf 10% der ursprünglichen Intensität verringert war (Abbildung 12). Die so erhaltenen Lösungen wurden mit Bakterienpräparaten versetzt, die eine optische Dichte von 0.05 bei 600 nm aufwiesen. Nach einigen Minuten hatten die Bakterienzellen einen Teil des PPE **3** an den NPs ersetzt, und ein beträchtlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität konnte in den meisten Fällen beobachtet werden. Zwölf unterschiedliche Bakterienstämme wurden untersucht; Abbildung 13 zeigt die Fluoreszenzantworten der Konstrukte in Gegenwart der Bakterien. Wichtig ist dabei zu erwähnen, dass alle drei NPs hydrophobe Kopfgruppen aufweisen. Konjugate mit Beteiligung hydrophiler oder kurzkettiger Ammoniumsalze wie **NP0,1,12,13** konnten nicht gespalten werden und zeigten praktisch keinen Fluoreszenzanstieg. Wie Abbildung 13 belegt, konnten die zwölf Bakterienarten problemlos durch die

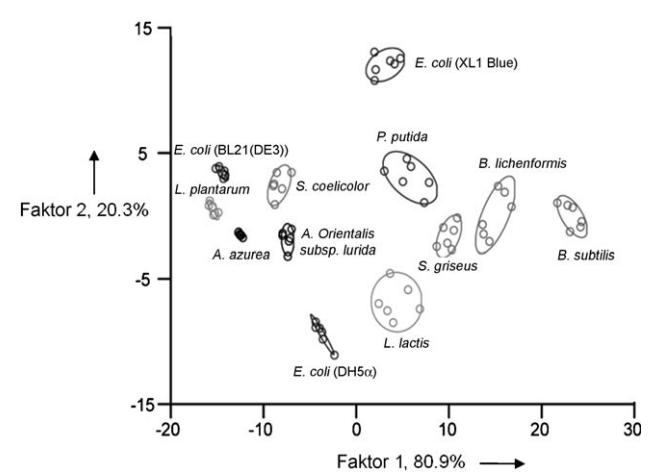


**Abbildung 13.** Fluoreszenzantworten von NP-Polymer-Konstrukten in Gegenwart verschiedener Bakterien ( $OD_{600} = 0.05$ ). 3D-Darstellung der Änderung in der Fluoreszenzintensität, aufgetragen gegen die drei NP-Polymer-Konstrukte. Jeder Wert ist der Mittelwert aus sechs Parallelmessungen. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [32].

drei NPs unterschieden werden, und auch das LDA-Diagramm (Abbildung 14) zeigt ihre deutlich separierte Gruppierung. Ein wichtiges Ergebnis ist, dass drei unterschiedliche *E. coli*-Stämme (XL1-Blue, BL21(DE3), DH5 $\alpha$ ) mühelos differenziert werden konnten. Dass ihre Fluoreszenzantworten nicht eng gruppiert sind, weist auf merkliche Unterschiede in ihrer Oberflächenchemie hin. Gram-negative (*E. coli*, *P. putida*) und Gram-positive Bakterien (*A. azurea*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*) sind leicht unterscheidbar und sind ebenfalls nicht auffällig gruppiert (Abbildung 14). Zufällig ausgewählte Bakterienlösungen aus dem Trainingssatz wurden in 95% der Fälle identifiziert, was die Robustheit dieser kleinen NP-PPE-Bibliothek unter Beweis stellt. Es wird spekuliert, dass hydrophobe reaktive Zentren (Hotspots) an der Oberfläche der Bakterien für die Bindung an hydrophobe



**Abbildung 12.** Verdrängung von anionischen konjugierten Polymeren von kationischen NPs durch negativ geladene Bakterienoberflächen. Bei der Freisetzung vom NP wird die zuvor gelöste Fluoreszenz des  $\pi$ -konjugierten Polymers wiederhergestellt. Die Fluoreszenzantwort hängt vom Ausmaß der Verdrängung ab, das wiederum von den relativen Bindungskräften der Polymer-NP- und Bakterien-NP-Wechselwirkungen bestimmt wird. Durch Modulieren dieser Wechselwirkungen könnte die Sensoranordnung unterscheidbare Antwortmuster für unterschiedliche Bakterien generieren. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [32].



**Abbildung 14.** Kanonisches Score-Diagramm der Fluoreszenzantwortmuster, ermittelt durch LDA. Die ersten zwei Faktoren weisen eine Varianz von 96.2% auf. Ellipsen markieren einen Vertrauensbereich von 95%. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [32].

NPs zuständig sind. Während die Wirkungsweise von Proteinen auf Bakteriooberflächen ebenso wie die Oberflächenstruktur von Bakterien in der Literatur ausführlich dokumentiert sind, ist über die mesoskopische „Landschaft“ der Bakteriooberfläche – also wie sich die Proteinkomplexe, Lipid-Rafts und Glycane zu Strukturen von Größen zwischen 10 und 100 nm anordnen – bislang wenig bekannt. Es ist aber davon auszugehen, dass diese selbstorganisierten Überstrukturen eine große Rolle für den überraschenden Erfolg dieses einfachen NP-PPE-basierten Nachweisverfahren spielt.

### 4.3. Erkennung von Sägerzellen<sup>[36]</sup>

Die erfolgreiche Erkennung von Bakterien durch NP-Komplexe fluoreszierender Polymere bietet eine Perspektive auch für den Nachweis von Sägerzellen. Eine offenkundig wichtige Frage ist, ob Krebszellen in unterschiedlicher Weise auf die NP-Fluorophor-Konstrukte ansprechen im Vergleich zu gesunden Zellen. Oder, in einem nächsten Schritt, ob die Methode zwischen karzinösen und metastatischen Zellen unterscheiden kann. Sägerzellen und ihre Wechselwirkungen mit (Gold-NP)-Fluorophor-Konstrukten wurden auf eine mögliche Differenzierung zwischen normalen und karzinösen/metastatischen sowie zwischen karzinösen und metastatischen Zellen untersucht. Eine erfolgreiche Differenzierung ergäbe Ansätze für die Entwicklung einfacher Nachweisverfahren für die frühe Erkennung neoplastischen Wachstums und dessen Klassifizierung als metastatisch oder nichtmetastatisch.

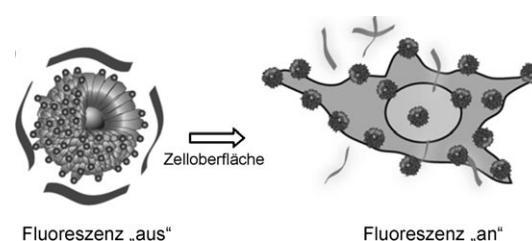
Um die Fähigkeit unserer Sensoren zur Differenzierung von Sägerzellen zu testen, haben wir eine Reihe von Zelllinien (Tabelle 1) mit den Konstrukten aus **NP5,10,12** und **PPE 2** versetzt. Diese drei Konstrukte zeigten das stärkste

**Tabelle 1:** Übersicht über die in unserer Studie eingesetzten Sägerzellen.

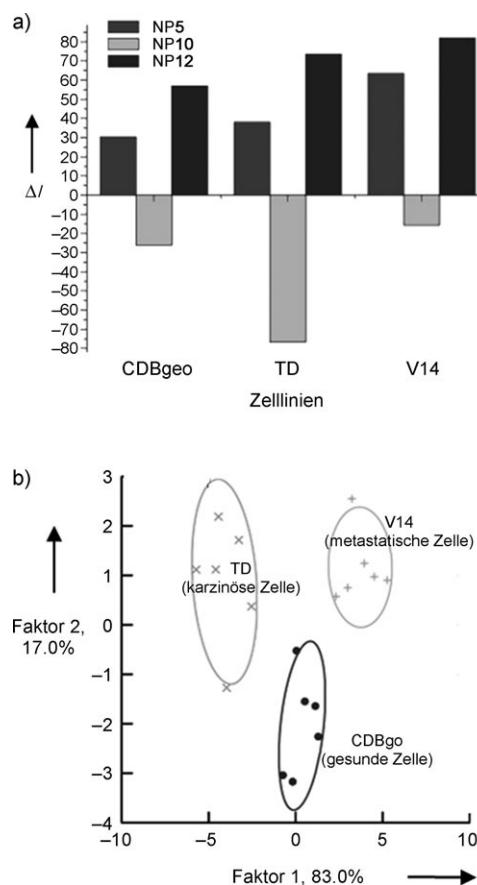
Spezies	Organ	Zelllinie	Zustand
Mensch	Leber	HepG2	karzinös
	Gebärmutterhals	HeLa	karzinös
	Hoden	NT2	karzinös
	Brust	MCF10A	gesund
Maus	BALB/c Brust	MCF-7	karzinös
		MDA-MB-231	metastatisch
		CDBgeo	gesund
		TD	karzinös
		V14	metastatisch

Ansprechverhalten auf Sägerzellen (Abbildungen 15 und 16) und wurden aus der in Abbildung 2 dargestellten Bibliothek erhalten. Andere NPs wurden ebenfalls getestet, sprachen aber nicht nennenswert auf Sägerzellen an.

Die drei NP-PPE-Konstrukte sind in der Lage, vier menschliche Krebszelllinien sowie auch gesundes, karzinöses und metastatisches Brustgewebe zu differenzieren. Diese Ergebnisse sind vielversprechend, allerdings wurden die Zelllinien aus unterschiedlichen Individuen entnommen. Das bedeutet, dass die Beobachtungen nicht zwangsläufig auf die



**Abbildung 15.** Mechanismus der Zellerkennung durch Fluorophorverdrängung. Die Zelle verdrängt das fluoreszenzgelöste Polymer, wodurch dessen Fluoreszenz wieder hergestellt wird (dunkle Bänder: Fluoreszenz ausgeschaltet; helle Bänder: Fluoreszenz angeschaltet).

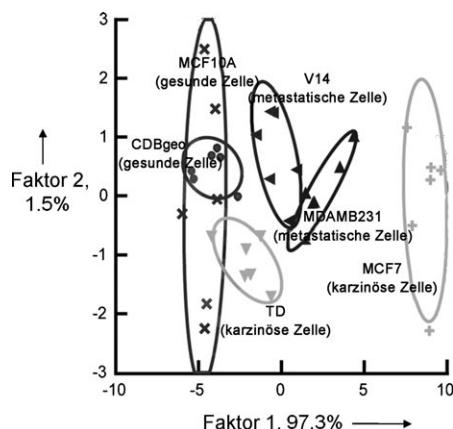


**Abbildung 16.** a) Erkennung von isogenen Zellarten: Drei Zelllinien des gleichen Genotyps (CDBgeo, TD und V14) ändern ihre Fluoreszenzintensität bei Einwirkung supramolekularer NP-Polymer-Komplexe. Jeder Wert ist über Parallelmessungen gemittelt. b) Kanonisches Score-Diagramm für die ersten zwei Faktoren vereinfachter Fluoreszenzantwortmuster, die mittels NP-PPE-Array gegen unterschiedliche Sägerzellarten erhalten wurden. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [36].

unterschiedlichen Zustände eines bestimmten Zelltyps zurückzuführen sein müssen, sondern ihre Ursache auch in genetischen Unterschieden der Individuen haben könnten. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde eine Gruppe isogener Zelllinien untersucht. Diese wurden aus Brustgewebe von BALB/c-Mäusen gewonnen und enthielten sowohl gesunde als auch transformierte Zelllinien, die nach Implantation in

Mäusen in nichtinvasiven und invasiven Tumoren resultieren. Da die Zellen alle den gleichen Genotypen haben und daher die beobachteten Änderungen nur vom Zustand der Zelle (gesund, karzinös oder metastatisch) herrühren können, ist der Einsatz von isogenen Zelllinien ein besonders stringenter Test zur Entwicklung von Diagnoseverfahren. Wie Abbildung 16 belegt, konnten mit den drei NP-PPE-Konstrukten die isogenen Zelllinien anhand der Fluoreszenzänderung und – noch deutlicher – im LDA-Diagramm differenziert werden.

Abbildung 17 zeigt ein kanonisches Score-Diagramm der Fluoreszenzmuster aller beobachteten Fluoreszenzantworten der von uns untersuchten Human- und Mäusezellen aus Brustgewebe. Das LDA-Diagramm differenziert metastati-



**Abbildung 17.** Kanonisches Score-Diagramm für die ersten zwei Faktoren vereinfachter Fluoreszenzantwortmuster, die mittels NP-PPE-Array gegen gesunde und karzinöse Brustgewebszellen erhalten wurden. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [36].

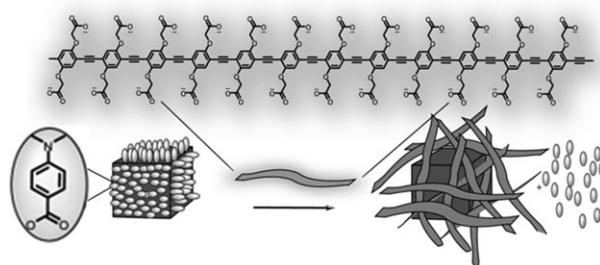
sche von karzinösen und gesunden Zellen. Interessanterweise können die gesunden Zellen CDBgeo und MCF10A nicht unterschieden werden, alle anderen Zelltypen sind aber erstaunlich gut separiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die drei hydrophoben Konstrukte offenbar empfindlicher auf Unterschiede in der Chemie der Zelloberfläche ansprechen, als auf Änderungen, die aus dem Genotyp der Zelle resultieren. Dies ist überraschend, könnte aber daraus folgen, dass bei karzinösen Zellen der Aufbau der Zelloberfläche beträchtlich verändert ist.

Die vorgestellte Methode beruht nicht auf der Detektion von Krebsmarkern, sondern spricht auf geringe Änderungen in der physikalischen Chemie der Zelloberflächen an. Für die nahe Zukunft planen wir die Entwicklung einer Referenzdatenbank, in der wir die Wechselwirkungen verschiedener Krebszellarten mit einem Pool von NP-Fluorophor-Konstrukten zusammenstellen.

### 5. Ein einfacher Pyrophosphat-Sensor unter Einbeziehung von PPE-Spinell-NP-Konstrukten<sup>[37]</sup>

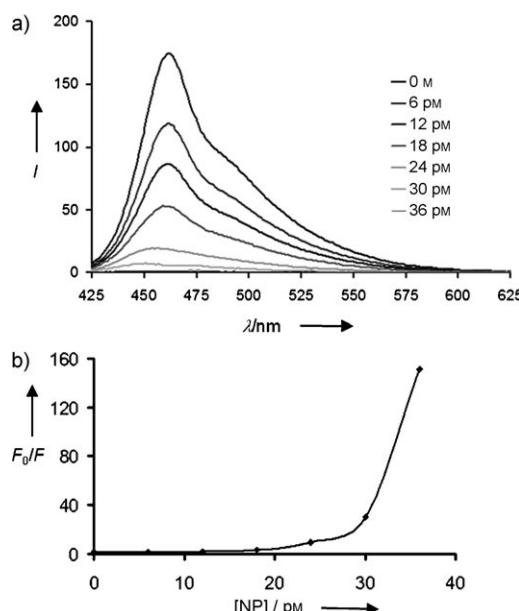
Gold-NPs sind leicht zu funktionalisieren und in einer Vielfalt unterschiedlicher Formen erhältlich, aber auch andere NPs können attraktive IDA-Materialien sein. Im vor-

liegenden Fall werden Cobalferrit-Nanowürfel (10 nm) mit Spinellstruktur,  $(\text{CoFe}_2\text{O}_4)_n$ , mithilfe von Dimethylamino-benzoësäure (DMAB) als stabilisierendem Liganden einfach und schnell synthetisiert. Hinzugesetztes PPE **2** verdrängt DMAB, und man erhält ein Konstrukt aus **2** und  $(\text{CoFe}_2\text{O}_4)_n$ -Nanowürfel (bestätigt durch photoakustische IR-Spektroskopie). Eine Lösung mit 5  $\mu\text{m}$  **2** zeigte eine Fluoreszenzabnahme von 90 % in Gegenwart von 20 pm Nanowürfel, was auf eine extrem effiziente Bindung schließen lässt. Da das Absorptionsspektrum der Nanowürfel mit dem Emissionspektrum von **2** überlappt, handelt es sich vermutlich um einen FRET-Prozess, obwohl eine Fluoreszenzlösung durch einen Elektronentransfermechanismus nicht ausgeschlossen werden kann. Das Prinzip der Komplexbildung ist in Abbildung 18 skizziert. Abbildung 19 zeigt das Emissionsspektrum von **2** nach Zugabe der Nanowürfel sowie die resultierende Stern-Volmer-Kurve.



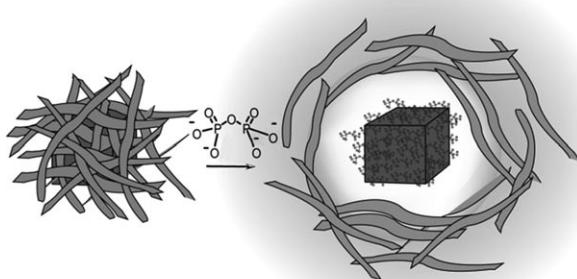
**Abbildung 18.** Aufbau des PPE-NP-Konstrukts und Prinzip der Fluoreszenzlösung bei konjugierten Polymeren. Dargestellt ist der Austausch von DMAB durch **2**. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [37].

Metalloxidoberflächen mit exponierten Hydroxygruppen und Übergangsmetallkationen können starke Wechselwirkungen mit kleinen, harten anorganischen Oxoanionen eingehen. Im Fall der Wechselwirkung von **2** mit Spinell-Nanowürfeln zeigten Phosphat-Ionen den größten Effekt auf die Wiederherstellung der Fluoreszenz, während die meisten anderen Anionen die Konstrukte nicht spalten konnten. Besonders interessant war die Unterscheidung der Konstrukte zwischen Phosphat (Pi) und Pyrophosphat (PPi). Pi erzielte in einer Konzentration von 0.2  $\mu\text{M}$  einen sichtbaren Fluoreszenzanstieg, mit PPi genügten aber bereits 2  $\mu\text{M}$ . Allerdings können durch Fluoreszenzspektroskopie 40 nm PPi in einer 0.1  $\mu\text{M}$  Pi-Lösung nachgewiesen werden. Für diagnostische und biologische Anwendungen ist dies von großer Bedeutung, da Pi im Blutserum in millimolaren Mengen enthalten ist, PPi dagegen im mikromolaren Bereich auftritt. Das Verhältnis Pi/PPi im Blutserum ist  $> 250:1$ , und zahlreiche kardiovaskuläre und osteoporotische Krankheiten werden mit einer Störung des Pi/PPi-Verhältnisses in Verbindung gebracht.<sup>[38]</sup> Durch Verwendung der Nanowürfel/PPE-**2**-Konstrukte kann gezeigt werden, dass die Differenzierung von Pi und PPi mithilfe von Sensoren prinzipiell machbar ist. Zum Nachweis von Pi/PPi in Blutserum oder Urin sind sicher noch weitergehende Entwicklungen bezüglich Selektivität und Empfindlichkeit nötig, aber in Pufferlösung sind diese einfache



**Abbildung 19.** a) Fluoreszenzlösung von PPE 2 ( $5 \times 10^{-6}$  M) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von DMAB-stabilisierten  $(\text{CoFe}_2\text{O}_4)_x$ -NPs (10 nm). b) Stern-Volmer-Kurve für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $F_0/F$ . Die unterschiedlichen Anfangsintensitäten, wie sie in (a) zu sehen sind, wirken sich nicht auf die Stern-Volmer-Kurve aus, die per Definition intern kalibriert ist. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [37].

chen Konstrukte bereits jetzt erstaunlich leistungsfähig (Abbildung 20).



**Abbildung 20.** Funktionsprinzip des NP-basierten Verdrängungstests. Links: fluoreszenzgelöschtes PPE-NP-Konstrukt; rechts: PPI-gebundenes NP und verdrängtes, jetzt fluoreszierendes PPE. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [37].

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Kombination von Ammonium-funktionalisierten Gold-NPs mit konjugierten Polymeren oder grün fluoreszierenden Proteinen in Wasser ergibt einen diversifizierten Satz<sup>[39]</sup> von selbstorganisierten hydrophoben/elektrostatischen Komplexen oder Hybriden. Die Fluoreszenzintensität dieser Konstrukte kann durch das Verhältnis von konjugiertem Polymer oder GFP zu Gold-NP beliebig eingestellt wer-

den: Je höher die NP-Konzentration, desto niedriger die Emissionsintensität. Der Mechanismus der Fluoreszenzlösung ist nicht vollständig verstanden, allerdings lässt die Überlappung des Absorptionsspektrums der Gold-NPs mit dem Emissionsspektrum der Fluorophore einen effizienten Energietransfer vermuten.

Die Bildung dieser „nichtfluoreszierenden“ Konstrukte wird durch elektrostatische Wechselwirkungen getrieben. Dabei beeinflusst die chemische Natur der eingesetzten Ammoniumgruppen über die Bindungs- oder Assoziationskonstanten ( $K_a$ ) zwischen Partikel und Fluorophor die Fluoreszenzlösung. Unabhängig von den eingesetzten NPs weist  $K_a$  aber stets hohe Wert von  $10^7$  bis  $10^{11}$  in Wasser auf, wobei Ammoniumsalze mit aromatischen Kopfgruppen die stärkste Bindung zeigen. Diese hohen  $K_a$ -Werte führen zu einer effizienten Bildung der Komplexe schon bei relativ geringen, analytisch und diagnostisch relevanten Konzentrationen (Fluorophore im hohen nanomolaren Bereich von 100 bis 500 nm).

Die Wechselwirkungen der selbstorganisierten Hybride mit (negativ geladenen) biologischen Analyten, z. B. Proteinen in Wasser und Blutserum, anorganischen Ionen wie PPi und bakteriellen oder Säugerzellen, führen zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität des Konstrukts – in den meisten Fällen wird die Fluoreszenz „angeschaltet“. In manchen Fällen kann eine zusätzliche Fluoreszenzlösung beobachtet werden, etwa durch induzierte Aggregation der Komplexe oder durch Analyt-induzierte Aggregation der beteiligten Fluorophore.

Die hervorstechenden und emergenten, d.h. nicht vorhersagbaren Eigenschaften dieser Hybride sind:

- Hohe Selektivität gegenüber Analytgruppen, wenn ein kleiner Satz von drei bis sechs NPs in Verbindung mit einem geeigneten Fluorophor zur Identifizierung biologischer Analyte eingesetzt wird.
- Nachweis von sehr geringen Mengen zugesetzter Proteine in natürlichem Human-Blutserum, d.h. eine hervorragende Leistungsfähigkeit der Konstrukte in komplexen biologischen Matrices.
- Erkennung und Differenzierung von Proteinen, Bakterien und Zellen mittels einer geringen Zahl von Konstrukten.
- Die oben angegebenen Eigenschaften werden durch einfache Monoschicht-geschützte, positiv geladene Gold-NPs erreicht, die sich nur in ihren Kopfgruppen unterscheiden (siehe Abbildung 2).
- Durch die Verwendung von differenzierteren Kopfgruppen sollten sich die Selektivität und Empfindlichkeit der NP-PPE-Konstrukte gegenüber den bisher beschriebenen Systemen deutlich verbessern lassen. Solche Kopfgruppen könnten Oligopeptide, Zucker, kleine Wirkstoffmoleküle oder niedermolekulare Proteine sein, die über Thiol-Oligoethylenglycole an das Gold-NP geknüpft werden.

Mit nur geringem Syntheseaufwand sollte es möglich sein, die Eigenschaften der gebildeten Konstrukte an die spezifischen Bedürfnisse anzupassen, etwa den  $K_a$  der NP-Fluorophor-Bindung zu erhöhen oder zu senken oder die Selektivität und Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Analyten zu ändern. Irgendwann – mit ausgeklügelteren Konstrukten –

wird die Empfindlichkeit nur noch von der Menge des freigesetzten Fluorophors abhängen; man wird dann Katalysekreisläufe in Betracht ziehen müssen, wobei ein NP-Katalysator-Komplex zum Einsatz kommen könnte.

Kombinationen von einfachen Ammonium-funktionalisierten NPs mit Polymer- und Peptid-Fluorophoren detektieren und quantifizieren Proteine in Wasser, Pufferlösungen und Blutserum, können aber auch zwischen unterschiedlichen Bakterienstämmen und Krankheitszuständen in isogenen Zelllinien unterscheiden. Insgesamt könnte sich diese Methodik zu einer leistungsfähigen, technisch einfachen Ergänzung zu ELISA-Verfahren und Antikörpertests entwickeln, genauso gut wie zu einer aufgerüsteten, „molekularen“ Version einer Gelelektrophorese. Die Nachweigrenze für Analyte kann direkt durch die Struktur der Konstrukte beeinflusst werden. Beim Nachweis von Proteinabnormalitäten im Blutserum kann unsere Methode bereits mit den breit eingesetzten, einfachen Elektrophoresemethoden mithalten.<sup>[1]</sup> Der Einsatz der NP-Fluorophor-Konstrukte im klinischen Bereich wird eine Implementierung in einfache und robuste Vorrichungen erfordern, die keine umfangreiche Datenaufbereitung benötigen, sondern wo der Analyt lediglich auf einen Streifen aufgebracht oder einem einfachen Mikrofluidiksystem zugeführt werden muss. Mit den Studien, die wir in diesem Kurzaufsatz beschrieben haben, wurde nur die Oberfläche dieser Methode gekratzt.

Die hier beschriebenen Forschungen wurden vom U.S. Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences, Division of Materials Sciences and Engineering (DE-FG02-04ER46141) (UB-Sommergehalt; Lit. [14b, 18, 19, 25a, 30b, 31, 32, 37] wurden vollständig oder teilweise vom BES gefördert), dem National Science Foundation (NSF) Center for Hierarchical Manufacturing an der University of Massachusetts (NSEC, DMI-0531171) und den NIH (GM077173 und AI073425) gefördert.

Eingegangen am 9. Dezember 2009  
Online veröffentlicht am 1. April 2010

Übersetzt von Dr. Frauke Pfeiffer, Weinheim

- [1] R. A. McPherson, M. R. Pincus, *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21. Aufl., Elsevier, Philadelphia, **2007**.
- [2] F. Laure, C. Rouzioux, F. Veber, C. Jacomet, V. Courgnaud, S. Blanche, M. Burgard, C. Griselli, C. Brechot, *Lancet* **1988**, 332, 538–541.
- [3] A. K. Deisingh, M. Thompson, *Analyst* **2002**, 127, 567–581.
- [4] a) K. Toko, *Sens. Actuators B* **2000**, 64, 205–215; b) Y. Vlasov, A. Legin, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 361, 255–260; c) J. Janata, M. Josowicz, *Nat. Mater.* **2003**, 2, 19–24.
- [5] a) N. A. Rakow, K. S. Suslick, *Nature* **2000**, 406, 710–713; b) C. Zhang, K. S. Suslick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11548–11549; c) C. Zhang, K. S. Suslick, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 237–242.
- [6] H. S. Hewage, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13099–13106.
- [7] K. J. Albert, N. S. Lewis, C. L. Schauer, G. A. Sotzing, S. E. Stitzel, T. P. Vaid, D. R. Walt, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2595–2626.
- [8] a) N. T. Greene, K. D. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5695–5700; b) C. J. Stephenson, K. D. Shimizu, *Polym. Int.* **2007**, 56, 482–488.
- [9] a) M. Kitamura, S. H. Shabbir, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 4479–4489; b) E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 687–699; c) B. T. Nguyen, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3118–3127; d) A. T. Wright, E. V. Anslyn, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 14–28; e) S. L. Wiskur, P. N. Floriano, E. V. Anslyn, J. T. McDevitt, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2116–2118; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2070–2072; f) S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 963–972; g) T. S. Snowden, E. V. Anslyn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 740–746.
- [10] a) P. L. McGrier, K. M. Solntsev, S. Miao, L. M. Tolbert, O. R. Miranda, V. M. Rotello, U. H. F. Bunz, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 4503–4510; b) A. J. Zuccheri, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11872–11881.
- [11] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 293–346.
- [12] a) N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547–1562; b) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849–1862.
- [13] a) R. Shenthal, V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 549–561; b) U. Drechsler, B. Erdogan, V. M. Rotello, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5570–5579.
- [14] a) M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754–2794; b) I. B. Kim, B. Erdogan, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 6247–6254.
- [15] a) A. Verma, V. M. Rotello, *Chem. Commun.* **2005**, 303–312; b) L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 71–77; c) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922–14933.
- [16] C. Fan, S. Wang, J. W. Hong, G. C. Bazan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6297–6301.
- [17] Q. Zhou, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12593–12602.
- [18] R. L. Phillips, O. R. Miranda, D. E. Mortenson, C. Subramani, V. M. Rotello, U. H. F. Bunz, *Soft Matter* **2009**, 5, 607–612.
- [19] I. B. Kim, A. Dunkhorst, J. Gilbert, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2005**, 38, 4560–4562.
- [20] H. Jiang, P. Taranekar, J. R. Reynolds, K. S. Schanze, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4364–4381; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4300–4316.
- [21] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1303–1324.
- [22] C. C. You, O. R. Miranda, B. Gider, P. S. Ghosh, I. B. Kim, B. Erdogan, S. A. Krovi, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 318–323.
- [23] M. De, S. Rana, H. Akpinar, O. R. Miranda, R. R. Arvizu, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Chem.* **2009**, 1, 461–465.
- [24] H. J. Issaq, Z. Xiao, T. D. Veenstra, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3601–3620.
- [25] a) I. B. Kim, A. Dunkhorst, U. H. F. Bunz, *Langmuir* **2005**, 21, 7985–7989; b) C. E. Halkyard, M. E. Rampey, L. Kloppenburg, S. L. Studer-Martinez, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **1998**, 31, 8655–8659.
- [26] H. J. Issaq, T. D. Veenstra, T. P. Conrads, D. Felschow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 292, 587–592.
- [27] a) V. Berry, A. Gole, S. Kundu, C. J. Murphy, R. F. Saraf, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17600–17601; b) C. R. Bertozzi, M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2242–2245.
- [28] 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.
- [29] R. S. Norman, J. W. Stone, A. Gole, C. J. Murphy, T. L. Sabo-Atwood, *Nano Lett.* **2008**, 8, 302–306.
- [30] a) M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13343–13346; b) I. B. Kim, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *Chem. Commun.* **2005**, 1273–1275.

- [31] R. L. Phillips, I. B. Kim, B. E. Carson, B. Tidbeck, Y. Bai, T. L. Lowary, L. M. Tolbert, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2008**, *41*, 7316–7320.
- [32] R. L. Phillips, O. R. Miranda, C. C. You, V. M. Rotello, U. H. F. Bunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2628–2632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2590–2594.
- [33] D. C. Oliveira, H. de Lencastre, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2155–2161.
- [34] M. S. Maynor, T. L. Nelson, C. O'Sullivan, J. J. Lavigne, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3217–3220.
- [35] B. S. Reisner, G. L. Woods, *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2024–2026.
- [36] A. Bajaj, O. R. Miranda, I. B. Kim, R. L. Phillips, D. J. Jerry, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10912–10916.
- [37] I. B. Kim, M. H. Han, R. L. Phillips, B. Samanta, V. M. Rotello, Z. J. Zhang, U. H. F. Bunz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 449–456.
- [38] a) E. Chantelau, *VASA-J. Vascular Diseases* **2001**, *30*, 15–20; b) H. Fleisch, R. G. Russell, F. Straumann, *Nature* **1966**, *212*, 901–903.
- [39] R. Hoffmann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3439–3443; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3337–3340.