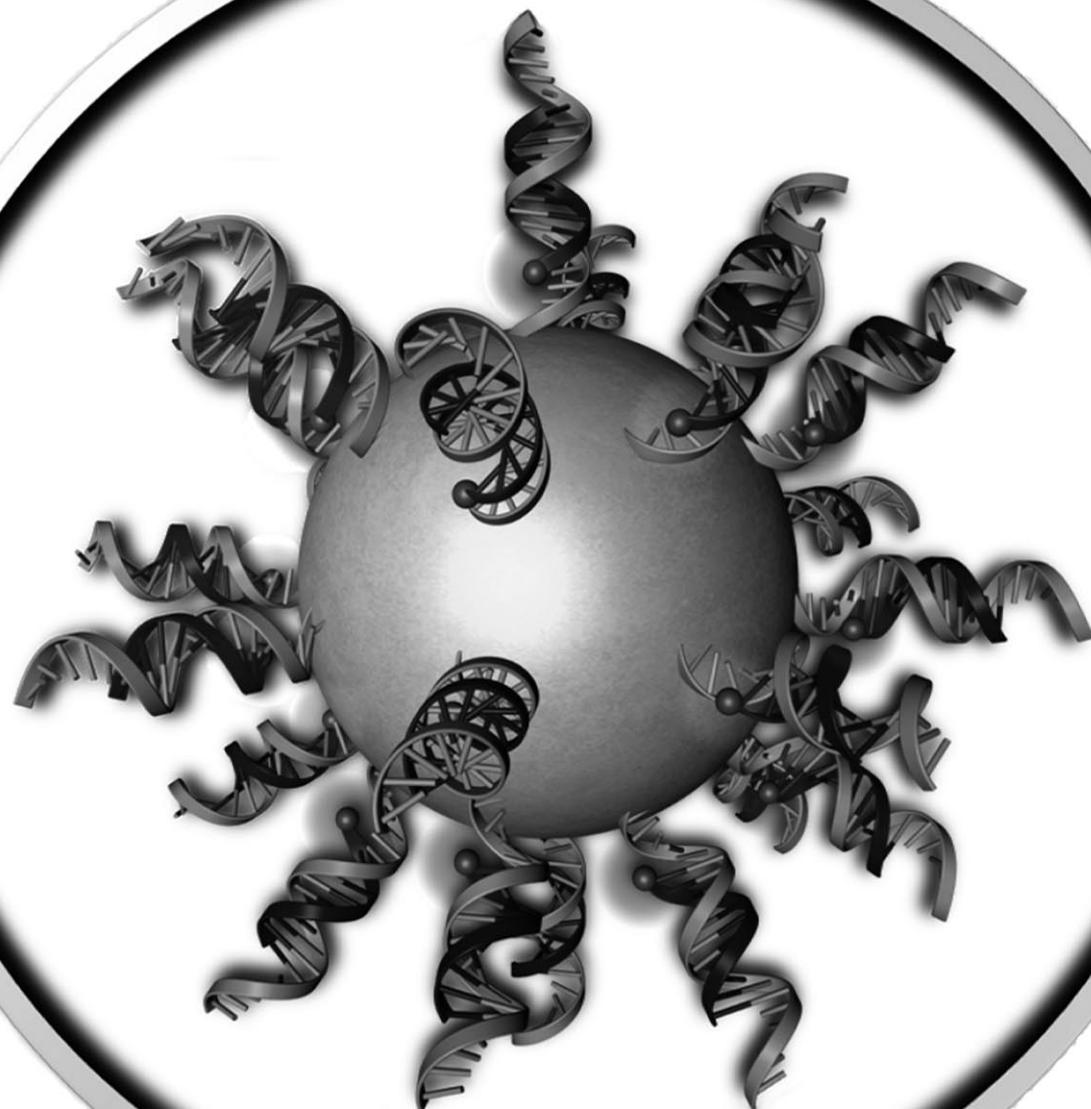


Goldnanopartikel in Biologie und Medizin

David A. Giljohann, Dwight S. Seferos, Weston L. Daniel, Matthew D. Massich,
Pinal C. Patel und Chad A. Mirkin*

Stichwörter:

Cytotoxizität · DNA · Gold ·
Nanopartikel · Wirkstofftransport



Goldkolloide werden in Chemie, Biologie, Technik und Medizin häufig eingesetzt. Heute kann man diese Materialien reproduzierbar herstellen, mit einer scheinbar unbegrenzten Zahl an funktionellen Gruppen chemisch modifizieren und – in bestimmten Fällen – bis hinab zur Ebene einzelner Atome charakterisieren. Dieser Aufsatz behandelt neuere Entwicklungen hinsichtlich Synthese und Biokonjugation von Goldnanokonjugaten sowie deren Verwendung in Zellen. Es gibt heute viele Beispiele für hochempfindliche und selektive Assays auf der Basis von Goldkonjugaten. In den letzten Jahren war der Fokus auf den Einsatz solcher Materialien in der Therapie gerichtet. Strukturen, die als genregulierende Agentien, Wirkstofftransporter, Bildgebungsagentien und lichtempfindliche Therapeutika fungieren, wurden entwickelt und in Verbindung mit Zellen und vielen schwächenden Krankheiten erforscht. Diese Strukturen wurden nicht einfach als Alternativen zu molekularen Systemen gewählt, sondern weil ihre neuen physikalischen und chemischen Eigenschaften ihnen in zellulären und medizinischen Anwendungen erhebliche Vorteile verschaffen.

1. Einführung

Goldnanopartikel (AuNPs) haben eine lange Geschichte in der Chemie, die bis ins antike Rom zurückreicht, wo sie zum Färben von Gläsern für dekorative Zwecke verwendet wurden. Das moderne Zeitalter der AuNP-Synthese begann vor über 150 Jahren mit der Arbeit von Michael Faraday, der wahrscheinlich als erster beobachtete, dass sich kolloidale Goldlösungen in einigen Eigenschaften von Gold als Festkörper unterscheiden.^[1,2] In der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts wurden zuverlässige Synthesemethoden für AuNPs mit Kugelform oder anderen Formen entwickelt.^[3] Diese Strukturen weisen besondere Merkmale auf: größen- und formabhängige optische und elektronische Eigenschaften sowie ein hohes Oberfläche/Volumen-Verhältnis. Außerdem können die Oberflächen leicht mit Liganden modifiziert werden, die Thiol-, Phosphan- und Aminfunktionen mit Affinität zu Goldoberflächen enthalten.^[3] Über solche funktionalen Gruppen können auch Oligonucleotide, Proteine und Antikörper an die AuNPs geknüpft werden. Die Realisierung solcher Goldnanokonjugate hat zahlreiche Untersuchungen ermöglicht; dazu gehören die programmierte Materialanordnung und Kristallisation,^[4,5] die Bildung von Nanopartikel-Dimeren und -Trimeren auf DNA-Templaten,^[6] Bioelektronik^[7-9] und Nachweismethoden.^[10,11] Die Anwendungen von Goldnanokonjugaten in Biodetektion und Biodiagnostik sind an anderer Stelle besprochen worden.^[12-14]

Basierend auf Goldnanokonjugaten und deren Eigenschaften haben sich in den letzten Jahren aufregende Entwicklungen mit enormem Potenzial für die Biologie und Medizin ergeben. Diese Untersuchungen repräsentieren eine neue Ausrichtung, fernab der gängigen Verwendung der Goldnanokonjugate als Marker für die Elektronenmikroskopie.^[15] Aktuelle Untersuchungen von uns und anderen Arbeitsgruppen haben bewiesen, dass Goldnanokonjugate, deren Oberflächen mit geeigneten Resten funktionalisiert

Aus dem Inhalt

1. Einführung	3353
2. Citrat und Transferrin	3353
3. Amine	3355
4. Oligonucleotide	3357
5. Peptide	3360
6. Antikörper	3361
7. Lipide	3362
8. Zusammenfassung und Ausblick	3363

sind, leicht in lebende Zellen eindringen können. Diese Entwicklungen haben ein neues Gebiet in der Nanopartikelforschung begründet, das eine breitere Verwendung von Goldnanokonjugaten in der Zellbiologie vorsieht und die Aussicht auf Verwendung als Therapeutika einschließt.

In diesem Beitrag beschreiben wir den neuesten Stand der Forschung zu Goldnanokonjugaten für zelluläre und therapeutische Anwendungen. Weil die chemische Beschaffenheit der Oberfläche die Eigenschaften und Funktionen entscheidend beeinflusst, haben wir diese Übersicht hinsichtlich der Art der Oberflächenfunktionalisierung in Abschnitte über Citrat-, Amin-, Nucleinsäure-, Peptid-, Antikörper- und Lipid-Liganden untergliedert (Tabelle 1). In jedem Abschnitt besprechen wir die Synthese, physikalische und chemische Eigenschaften sowie Untersuchungen und Anwendungen im Zusammenhang mit Zellen. Abschnitt 8 behandelt zusätzlich Chancen und verweist auf offene Fragen. Damit wollen wir zukünftige Untersuchungen anregen, die zu Fortschritten in der Chemie der Goldnanopartikel führen können.

2. Citrat und Transferrin

Mit Citrat funktionalisierte Goldnanopartikel können hoch monodispers und in großem Umfang nach den Metho-

[*] D. A. Giljohann,^[+] D. S. Seferos,^[++] W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin
Department of Chemistry and International Institute for Nanotechnology, Northwestern University
2145 Sheridan Road, Evanston, IL 60208-3113 (USA)
Fax: (+1) 847-467-5123
E-Mail: chadnano@northwestern.edu

[+] Aktuelle Anschrift:
Department of Chemistry, University of Toronto
80 St. George Street, Toronto, Ontario M5S 3H6 (Kanada)

[+] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Tabelle 1: Funktionalitäten auf AuNP-Oberflächen.

Oberflächenfunktionalität	Anwendung	Literatur
Citrat	Aufnahme in Zelle	[18, 19]
Transferrin	Aufnahme in Zelle	[20, 21]
CTAB	Aufnahme in Zelle	[14, 94]
Amin	Gen-Transfektion Antivirale Aktivität Wirkstofftransport	[26, 30, 31] [34] [34]
Oligonucleotid	Oligonucleotid-Transfektion Antisense-Genregulation mRNA-Nachweis Detektion niedermolekularer Verbindungen RNA-Interferenz	[36] [25, 77, 88, 102] [87, 88] [89] [90]
Peptid	Krebszellenerkennung Kerntranslokation	[93] [23, 100]
Antikörper	Antisense-Genregulation Bildgebung Photothermische Therapie	[102] [15, 106, 107, 110] [108, 109, 110]
Lipid	Bildgebung Cholesterinbindung	[112] [111]

den von Frens^[16] und Turkevich^[17] hergestellt werden. Diese Methoden ermöglichen die Synthese citratbedeckter Nanokügelchen mit 5 bis 250 nm Durchmesser.^[16, 17] Unter anderem wegen dieser etablierten Synthese von Goldnanopartikeln mit genau einstellbarer Größe beruhen die neueren Untersuchungen zur Aufnahme in Zellen auf Citrat-funktionalisierten Nanokonjugaten.^[18] In einer solchen Studie ermittelten Chan et al., wie die Größe und Form von Partikeln deren Zellgängigkeit beeinflussen.^[19] Diese Arbeit zeigt, dass die

Zeitdauer, während der die Partikel in einem HeLa-Zellmodell internalisiert bleiben, für Teilchen mit 14 bis 74 nm Durchmesser unabhängig von der Partikelgröße ist. Die Größe beeinflusst jedoch die Gesamtzahl der während des Experiments aufgenommenen Nanopartikelkonjugate. Unter Verwendung der induktiv gekoppelten Plasma-Atomemissionsspektroskopie (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES) bestimmten die Forscher den intrazellulären Goldgehalt, und sie stellten fest, dass citratbedeckte Goldnanokonjugate mit 50 nm Durchmesser am leichtesten von HeLa-Zellen aufgenommen werden (Abbildung 1). Sie ermittelten, dass HeLa-Zellen maximal 3000, 6160 und 2988 citratstabilisierte Goldnanokonjugate mit Durchmessern von 14, 50 bzw. 74 nm aufnehmen.

Der Mechanismus, nach dem die citratbedeckten Goldnanokonjugate in die Zellen eintreten, wurde untersucht. Chan et al. konnten Transmissionselektronenmikroskopie-Bilder aufnehmen, die zeigen, dass internalisierte 'bloße' Citrat-Nanokonjugate in den Zellen hauptsächlich innerhalb von Vesikeln lokalisiert sind.^[19] Sie korrelierten die Aufnahme in Zellen mit der nichtspezifischen Adsorption von Proteinen an die citratbedeckte Nanopartikeloberfläche.

Eine Oberfläche mit negativ geladenen Citratgruppen liefert ein geeignetes Gerüst, um positiv geladene Proteine wie Transferrin anzulagern, die den Eintritt in Zellen erleichtern sollten. Mithilfe von Rasterkraftmikroskopie konnten Transferrin-beschichtete citratfunktionalisierte Goldnanokonjugate auf der Zelloberfläche abgebildet werden.^[20] Diese Bilder lassen auf eine Vesikelbildung an der Zelloberfläche und eine Aufnahme der Nanokonjugate durch Endozytose schließen. Einige Experimente von Chan et al. belegten zudem, dass mit Transferrin überzogene und mit



Chad A. Mirkin ist Director of the Northwestern University International Institute for Nanotechnology, George B. Rathmann Prof. of Chemistry, Prof. of Chemical and Biological Engineering, Prof. of Biomedical Engineering, Prof. of Materials Science and Engineering and Prof. of Medicine. Er hat über 400 Manuskripte sowie über 350 Patente und Patentanmeldungen verfasst. Er gründete die Firmen Nanosphere, NanoLink und AuraSense, und er war Mitbegründer der Zeitschrift *Small*. Für seine Beiträge zu Chemie, Material- und Nanowissenschaften hat er über 60 nationale und internationale Auszeichnungen erhalten.



Weston Daniel studierte Chemie an der University of Minnesota, Twin Cities (Abschluss 2005). Gegenwärtig arbeitet er an der Northwestern University bei Chad Mirkin an seiner Promotion. Er beschäftigt sich mit der Entwicklung von Detektionssystemen unter Verwendung Biomolekül-funktionalisierter Goldnanopartikel.



David Giljohann studierte an der Northwestern University (Bachelor-Abschluss 2003) und promovierte dort anschließend nach seiner Doktorarbeit unter Anleitung von Chad Mirkin (2009). Seine Forschung konzentriert sich auf die Entwicklung Oligonucleotid-modifizierter Nanopartikel, einschließlich Nanofackeln sowie Antisense-DNA- und RNA-Goldnanopartikel.



Pinal Patel erhielt seinen Bachelor-Abschluss 1999 an der Towson University. Im Anschluss daran war er beim United States Department of Defense beschäftigt. Gegenwärtig arbeitet er an der Northwestern University unter der Anleitung von Chad Mirkin an seiner Promotion. Seine Forschung konzentriert sich auf die Bestimmung der Aufnahme und intrazellulären Lokalisierung von Oligonucleotid-modifizierten Goldnanopartikeln.

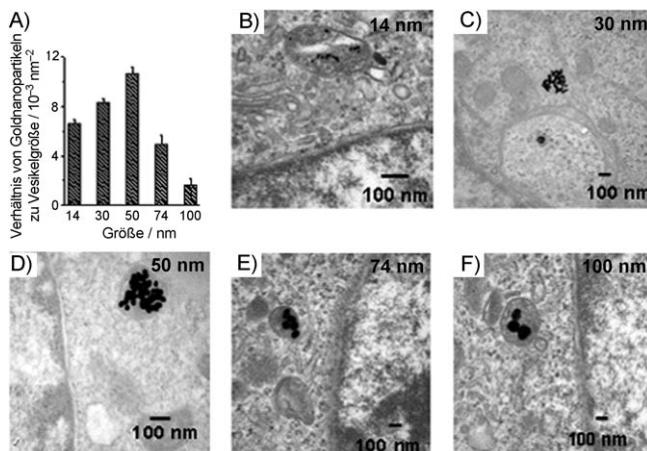


Abbildung 1. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen und Messungen von Goldnanopartikeln in Zellen. A) Nanopartikelzahl pro Vesikelgröße für verschiedene Nanopartikelgrößen. B–F) TEM-Bilder von 14, 30, 50, 74 bzw. 100 nm großen Goldnanopartikeln, die in den Vesikeln einer HeLa-Zelle eingeschlossen sind. Wiedergabe nach Lit. [19] mit Genehmigung der American Chemical Society, Copyright 2006.

Citrat funktionalisierte Goldnanokonjugate über eine Clathrin-vermittelte Endozytose in Zellen eintreten.^[21]

Bei vielen Untersuchungen mit Zellen werden citratbedeckte AuNPs als Synthesevorstufen für kovalente Konjugate mit zusätzlichen Funktionen genutzt, da sich erwiesen hat, dass eine weitere Derivatisierung das Aufnahmevermögen erhöht,^[22] die intrazelluläre Lokalisierung verändert^[23,24] oder eine Funktion vermittelt, die eine zelluläre Antwort hervorruft kann.^[25,26]



Dwight Seferos promovierte 2006 an der University of California, Santa Barbara, in der Arbeitsgruppe von Guillermo Bazan und war anschließend als Postdoktorand an der Northwestern University im Labor von Chad Mirkin tätig. Gegenwärtig ist er Assistant Professor im Department of Chemistry an der University of Toronto.



Matthew Massich schloss seine Studium 2004 an der University of St. Thomas ab und arbeitet gegenwärtig an seiner Promotion bei Chad Mirkin an der Northwestern University. Er untersucht die biologische Antwort auf Oligonukleotid-funktionalisierte Goldnanopartikel in therapeutischen und diagnostischen Anwendungen.

Citratbedeckte Partikel sind im Allgemeinen keine idealen Strukturen für Internalisierungsstudien und Untersuchungen in Zellen. Sie neigen unter bestimmten Bedingungen zur Aggregation, und es kann schwierig sein, mit ihnen zu arbeiten. In den nächsten Abschnitten beschreiben wir die wichtigsten Klassen von Goldnanokonjugaten mit Liganden, die für Zellexperimente entworfen wurden.

3. Amine

Neben den Methoden von Turkevich und Frens wurden alternative Synthesen für Goldnanopartikel entwickelt. Die Brust-Schiffрин-Methode ermöglicht die Synthese monodisperser Goldnanopartikel mit 1–3 nm Durchmesser,^[27] die durch eine Monoschicht aus Alkanthiolaten stabilisiert sind. Durch Substitutionen kann die Zusammensetzung der Monoschicht so verändert werden, dass sie spezifische Funktionalitäten für die beabsichtigte Verwendung der Nanopartikel enthält.^[28] Entsprechend wurden für verschiedene biologische Anwendungen Goldnanokonjugate entworfen, die mit einer Monoschicht von Alkanthiolat-Molekülen mit Amin-Endgruppen funktionalisiert sind (in der Folge als „Amin-funktionalisiert“ bezeichnet).

3.1. Gentransfektion

Die Beeinflussung biologischer Systeme auf genetischer Ebene ist eines der grundlegenden Konzepte der Experimentalbiologie und stellt die Entwicklung neuer Therapien in Aussicht.^[29] Demzufolge wird fortwährend nach der besten Methode zur Steuerung der Genexpression gesucht. Wegen ihrer einfachen Synthese und der großen chemischen Variationsbreite wurden Amin-funktionalisierte Nanopartikel eingesetzt, um genetisches Material in Zellmodelle zu transferieren.^[26,30]

Die Amingruppen auf der Oberfläche sind bei physiologischem pH-Wert positiv geladen, und daher wechselwirken Amin-funktionalisierte Nanokonjugate elektrostatisch mit negativ geladenen Nucleinsäuren. Studien von Rotello et al. haben gezeigt, dass 2-nm-Goldnanopartikel, die mit einer gemischten Monoschicht aus quaternisierten Aminen und ungeladenen Oberflächengruppen funktionalisiert sind, DNA-Plasmide binden und effizient in 293T-Zellen transportieren können.^[26] Tatsächlich können die Nanokonjugate diese Zellen effizienter transfizieren als das häufig verwendete Transfektionsmittel Polyethylenimin (PEI, 60 kDa), ein kationisches Polymer. Die Forscher stellten auch fest, dass die Leistungsfähigkeit der Nanopartikel-vermittelten Gentransfektion durch das Verhältnis von positiv geladenen quaternisierten Amin- zu negativ geladenen Phosphatgruppen auf der DNA beeinflusst wird sowie durch die relative Menge und Länge der oberflächengebundenen ungeladenen Thiolkette. Auf diesen Beobachtungen aufbauend, zeigten sie, dass mit Lysinresten funktionalisierte Goldnanopartikel einen handelsüblichen Vektor beim Transport von DNA-Plasmiden um den Faktor 28 übertreffen.^[31]

Die Eignung Amin-funktionalisierter Nanokonjugate für den Gentransport wurde auch von Klibanov et al. nachgewiesen.^[30] In ihrer Studie wurden Kombinationen aus Thiol-modifiziertem PEI (2 kDa) und Dodecyl-PEI (2 kDa) während der AuNP-Synthese als Tenside oder Komplexierungsmittel eingesetzt. Über die PEI-Konzentration ließ sich ein Durchmesser der funktionalisierten Nanopartikel im Bereich von 2.3–4.1 nm einstellen. Die resultierenden Nanokonjugate transportieren Plasmid-DNA wirksamer in COS-7-Zellen als PEI allein.

3.2. Wirkstofftransport

Ortsspezifischer Transport, Stabilität und programmierte Freisetzung eines Wirkstoffs an physiologische Zielstrukturen sind die Hauptanforderungen an molekulare und makromolekulare Therapeutika.^[32] Die anpassbare Oberflächenstruktur von Goldnanokonjugaten eröffnet die Möglichkeiten, mehrere Wirkstoffe aufzunehmen sowie Moleküle auf der Oberfläche eines einzigen Nanoteilchens gezielt auszuwählen und zu schützen, wodurch der Transport und die Wirksamkeit der als Fracht gebundenen Therapeutika verbessert werden sollen. Solche neuartigen Nanokonjugate mit AuNPs als Kernstrukturen wurden entworfen und synthetisiert.^[33] Feldheim et al. haben kürzlich gezeigt, wie multivalente AuNPs, die mit Derivaten eines wichtigen HIV-Antagonisten functionalisiert sind, die Virenbildung in einem Zellmodell höchst wirksam unterdrücken.^[34]

Rotello et al. haben ein 2 nm großes kationisches Goldnanokonjugat entwickelt, das mit Thiol-modifizierten Alkylaminen functionalisiert ist. Diese Liganden enthalten photochemisch aktivierbare *o*-Nitrobenzylester-Gruppen, die durch Bestrahlung im Nah-UV-Bereich gespalten werden können (Abbildung 2).^[35] Dadurch wird das positiv geladene Alkylamin freigesetzt, und es entsteht ein negativ geladenes Carboxylat-funktionalisiertes Nanoteilchen. Diese Ladungs-umkehr ist ein wirksames Mittel, um eine negativ geladene Fracht, z. B. ein Oligonukleotid, von der Nanopartikeloberfläche zu lösen. Solche kationischen Nanopartikel mit photochemisch spaltbaren Linkern inhibieren die Transkription der gebundenen Oligonukleotide; die Transkriptionsaktivität kann jedoch im Anschluss an die Spaltungsreaktion wieder erlangt werden. Zudem wurde das Eindringen der gebundenen Oligonukleotide in MEF-Zellen nachgewiesen. Fluoreszenzexperimente zeigen, dass die gebundene DNA nach der lichtinduzierten Spaltung von der Nanopartikeloberfläche in die Zelle abgegeben wird, wo sie dann im Zellkern lokalisiert ist. Eine ähnliche Strategie wurde für Krebsmedikamente entwickelt.^[36]

Eine andere Studie von Rotello et al. demonstriert eine alternative Methode zur Freisetzung von Molekülen aus derartigen Wirkstofftransportern. Goldnanopartikel mit einer gemischten Monoschicht aus Alkylthiol-Liganden mit Amin-Endgruppen und Fluorophormarkierungen werden entweder von HepG2- oder MEF-Zellen aufgenommen. In Zellen mit einer erhöhten intrazellulären Konzentration des Thiolgruppen enthaltenden Peptids Glutathion führt die

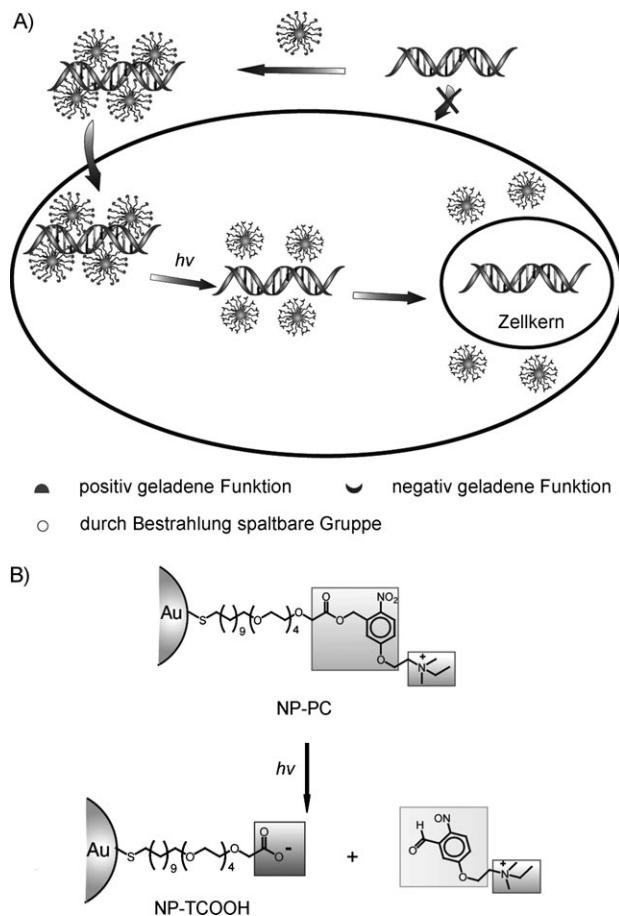


Abbildung 2. A) DNA-Freisetzung aus dem durch Licht spaltbaren AuNP-Komplex (NP-PC) nach UV-Bestrahlung innerhalb der Zelle. B) Lichtinduzierte Umwandlung an der Oberfläche von NP-PC. Nach Lit. [35].

Verdrängung durch Substitution zur passiven Freisetzung der Liganden aus dem Nanokonjugat.^[37]

3.3. Stabilität

Neben der Bereitstellung funktioneller Gruppen tragen Liganden an der Oberfläche auch zur Stabilität der AuNPs bei. Diese Stabilität ist wichtig im Hinblick auf eine Verwendung der Nanokonjugate als Therapeutika, weil sie im Zellinneren und im Blutkreislauf beständig sein müssen. In einer Studie von Rotello et al. wurde der Effekt der Oberflächenladung auf die Stabilität Amin-funktionalisierter Goldnanopartikel untersucht.^[38] Sie verwendeten 2 nm große Goldnanopartikel, die mit Kombinationen aus positiv geladenen Ammonium-, negativ geladenen Carboxylat- und fluoreszierenden Liganden functionalisiert waren. Verschiedene Thiol-Spezies wurden auf ihre Eignung getestet, an der Nanopartikeloberfläche gebundene Liganden zu verdrängen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Erhöhung der positiven Ladung auf der Nanopartikeloberfläche einen schnelleren Austausch der Liganden bewirkt, während bei starker negativ geladenen Nanokonjugaten kein messbarer Ligandenaus-

tausch auftritt.^[38] Dieser Befund ist in Einklang mit einer Studie unserer Arbeitsgruppe zur Stabilität von 13 nm großen Oligonukleotid-Goldnanopartikel-Konjugaten, die ergab, dass negativ geladene thiolierte Oligonukleotidliganden im Zellinneren oder durch niedermolekulare Verbindungen wie Glutathion nicht leicht verdrängt werden.^[25]

4. Oligonukleotide

Über das letzte Jahrzehnt haben andere Arbeitsgruppen und wir DNA-funktionalisierte Goldnanokonjugate (DNA-AuNPs) synthetisiert, charakterisiert und verwendet.^[4] Diese Nanomaterialien bestehen aus einem Goldnanopartikel-Kern, der mit einer dichten Schale aus synthetischen Oligonukleotiden funktionalisiert ist. DNA-AuNPs zeigen kooperative Eigenschaften, die aus ihren multivalenten Oberflächen resultieren,^[39–43] und diese Eigenschaften wurden z.B. zur programmierbaren Kristallisation^[44–46] und für enzymfreie biodiagnostische Assays genutzt.^[47,48] Die optischen, katalytischen und Bindungseigenschaften von DNA-AuNPs sind für vielfältige kolorimetrische,^[11,49,50] elektronische,^[7] Scanner-^[51] und Raman-basierte^[52] Nachweisstrategien verwendet worden, von denen einige kürzlich kommerzialisiert und von der US-amerikanischen Food and Drug Administration zugelassen wurden.^[51]

4.1. Synthese

Dicht mit synthetischen Oligonukleotiden funktionalisierte Nanokonjugate werden durch Mischen von Oligonukleotiden mit Alkanthiol-Endgruppen und citratbedeckten AuNPs synthetisiert. Die Oligonukleotid-Liganden verdrängen das Citrat von den AuNPs unter Bildung einer Gold-Thiol-Bindung. Zur Reaktionsmischung wird NaCl zugefügt, um die Ladungsabstoßung abzuschirmen. Dadurch können mehr Oligonukleotide chemisch an die Nanopartikeloberfläche binden, und es kann sich eine dichte Oligonukleotid-Monoschicht bilden (Abbildung 3). AuNPs mit 15 nm Durchmesser können an ihrer Oberfläche etwa 250 Oligonukleotid-Moleküle chemisorbieren, sodass multivalente Strukturen entstehen.^[53] Die Methoden zur Funktionalisierung von Partikeln mit 2 bis 250 nm Durchmesser wurden optimiert.^[54,55] Die resultierenden multivalenten Materialien haben neue Eigenschaften, die bei Oligonukleotiden oder AuNPs alleine nicht auftreten.

4.2. Eigenschaften

Eine ungewöhnliche, aber mittlerweile gut verstandene Eigenschaft von DNA-AuNPs ist ihr Vermögen, komplementäre Nucleinsäuren mit hoher Affinität zu binden.^[56] Multivalente Teilchen zeigen um zwei Größenordnungen höhere Bindungskonstanten als die analogen molekularen Oligonukleotide mit gleicher Sequenz.^[40] Experimentelle Daten und theoretische Modelle haben gezeigt, dass diese Eigenschaft wahrscheinlich auf die dichte Packung und die

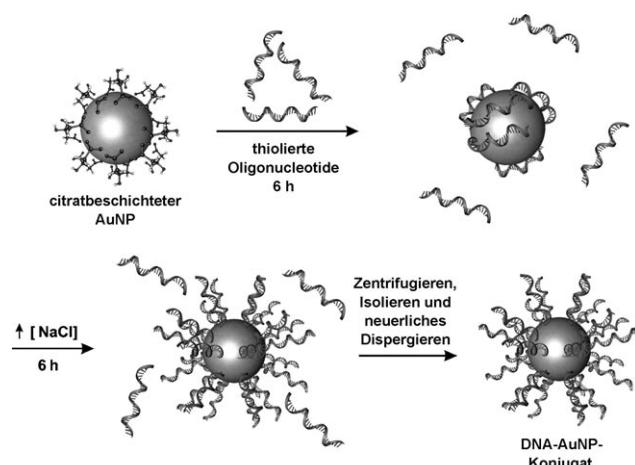


Abbildung 3. Synthese eines Oligonukleotid-Goldnanokonjugats: Oligonukleotide mit Alkanthiol-Endgruppen werden zu citratstabilisierten AuNPs gegeben und ersetzen die Citratliganden unter Bildung von Gold-Thiol-Bindungen. Anschließend zugegebenes Salz schirmt die Abstoßung zwischen den Strängen ab und führt zu einer dichten Monoschicht aus Oligonukleotiden.

hohe lokale Konzentration der Oligonukleotide auf der Goldoberfläche zurückzuführen ist.^[41,57] Zusätzlich sind die Oligonukleotide auf der AuNP-Oberfläche einander nahe genug, sodass die Gegenionen, die mit einem Oligonukleotid assoziiert sind, auch auf die negativen Ladungen benachbarter Oligonukleotide abschirmend wirken. Diese zusätzliche Ladungsabschirmung stabilisiert den Oligonukleotid-Doppelstrang, sodass für DNA-AuNPs höhere effektive Bindungskonstanten ermittelt werden als für die molekularen Oligonukleotide. Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigen größere Partikel, die mehr DNA pro Partikel, aber weniger DNA pro Flächeneinheit aufweisen, Affinitäten, die mit dem molekularen System vergleichbar und niedriger als die von Goldnanokonjugat-Strukturen sind.^[58] Es konnte nachgewiesen werden, dass die höhere Bindungskonstante der DNA-AuNP zur besseren intrazellulären Bindung der Zielmoleküle führt und dadurch die Effizienz der Antisense-Genregulierung erhöht (siehe Abschnitt 4.4.1).^[25]

Bei biologischen Untersuchungen werden Nucleinsäuren häufig durch enzymatische Hydrolyse abgebaut und somit inaktiviert.^[59,60] Ein weiteres Kennzeichen von DNA-AuNPs ist die Beständigkeit gegenüber dem Abbau durch Enzyme wie DNase I.^[25] Für diese verbesserte Stabilität wurden zwei Ursachen vorgeschlagen: Die dichte Packung der DNA auf der Partikeloberfläche könnte einerseits die Enzymsbindung sterisch behindern, sodass die unzugängliche, partikelgebundene DNA durch das Enzym nicht angegriffen und gespalten würde. Andererseits könnte die mit der dicht gepackten DNA verbundene hohe lokale Ionenkonzentration die Enzymaktivität hemmen; beispielsweise ist bekannt, dass hohe Na^+ -Konzentrationen die Aktivität von Enzymen verringern.^[61,62] Um zu klären, welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, wurden kürzlich Experimente durchgeführt.^[63] Bei Salzkonzentrationen, die die enzymatische Aktivität nicht beeinflussen, werden molekulare DNA und DNA-AuNPs ähnlich schnell enzymatisch abgebaut, bei Salzkonzentrationen, die

die enzymatische Aktivität beeinflussen, sinkt die Abbaugeschwindigkeit für DNA-AuNPs jedoch beträchtlich verglichen mit derjenigen für molekulare DNA. Demzufolge ist die lokale Na⁺-Konzentration entscheidend für die erhöhte Stabilität der DNA. Die Beständigkeit der DNA-AuNPs gegenüber einem enzymatischen Abbau ist eine bemerkenswerte Eigenschaft, die diese Strukturen zu vielversprechenden Kandidaten für die Einschleusung von Nucleinsäuren in Zellen macht, wo der Oligonucleotid-Abbau bisher ein Hauptproblem darstellte.

4.3. Aufnahme in Zellen

Die vielleicht überraschendste Eigenschaft von DNA-AuNPs ist ihre Fähigkeit, in zahlreiche Zelltypen einzutreten. Diese leichte Aufnahme in Zellen wurde nicht erwartet, weil die Strukturen von einer dichten Hülle aus polyanionischer DNA umgeben sind (ca. 100 DNA-Moleküle auf der Oberfläche jedes 13 nm großen Goldpartikels), während Strategien zur Internalisierung von Oligonucleotiden in Zellen üblicherweise erfordern, dass DNA-Moleküle mit positiv geladenen Agentien komplexiert werden. Die meisten Forscher würden tatsächlich prognostiziert haben, dass die Nanopartikel wegen ihrer hohen negativen Ladung nicht in Zellen eindringen.^[64] Bemerkenswert ist, dass bei allen bisher untersuchten Zelltypen (das sind über 30 Zelllinien, Primär- und Nervenzellen; siehe Tabelle 2) die DNA-AuNPs direkt dem Kulturmedium zugefügt werden können und anschließend in großer Zahl von den Zellen aufgenommen werden (Abbildung 4). Obwohl die Zahl an aufgenommenen Partikeln bei einer Quantifizierung durch ICP-MS abhängig von Zelltyp, Konzentration und Inkubationszeit variierte, zeigte sich doch,

Tabelle 2: Zelltypen, die multivalente DNA-Goldnanokonjugate aufnehmen. Die Internalisierung wurde massenspektrometrisch und durch zellassoziierte Fluoreszenzmessungen bestimmt.

Zelltyp	Bezeichnung oder Quelle
Brust	SKBR3, MDA-MB-321, AU-565
Gehirn	U87, LN229
Blase	HT-1376, 5637, T24
Dickdarm	LS131
Hals	HeLa, SiHa
Haut	C166, KB, MCF, 10 A
Niere	MDCK
Blut	Sup T1, Jurkat
Leukämie	K562
Leber	HepG2
Niere	293T
Eierstock	CHO
Makrophage	RAW 264.7
Neuronen des Hippocampus	primär, Ratte
Astrociten	primär, Ratte
Gliazellen	primär, Ratte
Blase	primär, Mensch
Erythrocyten	primär, Maus
Periphere einkernige Blutzelle	primär, Maus
T-Zellen	primär, Mensch
Beta-Zellen	primär, Maus
Haut	primär, Maus

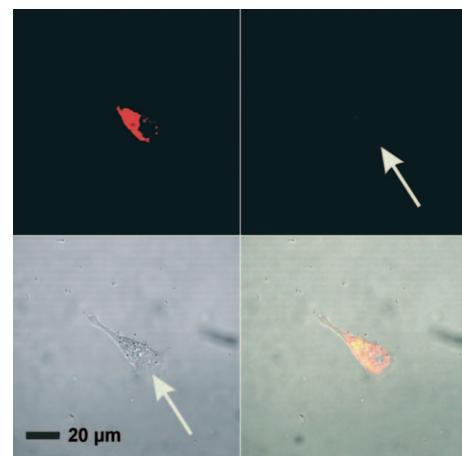


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von C166-EGFP-Zellen nach 48 h Inkubation mit Goldnanokonjugaten, die mit doppelt fluorophormarkierten Oligonucleotiden (3'-Cy3 und 5'-Cy5.5) funktionalisiert sind, zeigen nur die Fluoreszenz von Cy5.5 (706–717 nm, links oben). Im Emissionsbereich von Cy3 (565–615 nm) wird praktisch keine Fluoreszenz beobachtet (rechts oben). Transmissions- und Überlagerungsbilder sind im unteren linken bzw. rechten Quadranten gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen die Lage der Zelle. Wiedergabe nach Lit. [25] mit Genehmigung der American Association for the Advancement of Science, Copyright 2006.

dass diese Internalisierung eine allgemeine Eigenschaft von DNA-AuNPs ist. Die Dichte der DNA auf der Partikeloberfläche erwies sich als das entscheidende Kriterium für die DNA-AuNP-Aufnahme. Bei DNA-Oberflächenbeladungen über ca. 18 pmol cm⁻² können mehr als eine Million DNA-AuNPs pro Zelle aufgenommen werden.^[65] Die Bedeutung der multivalenten Oligonucleotid-Anordnung für die Aufnahme durch die Zellen bestätigt ein Vergleich der DNA-AuNPs mit anderen AuNP-Typen. Unter fast identischen Bedingungen nehmen HeLa-Zellen beispielsweise nur einige Tausend citratbedeckte Goldpartikel auf,^[19] aber über eine Million DNA-AuNPs.^[65] Fluoreszenzspektroskopische Studien zeigen, dass die thiolierten Oligonucleotide nach der Aufnahme in die Zelle an den AuNPs gebunden bleiben (Abbildung 4).

Angesichts dieser überraschenden Fähigkeit der DNA-AuNPs, in Zellen einzudringen, ist der Aufnahmemechanismus von großem Interesse. Die biophysikalische Charakterisierung von DNA-AuNPs nach der Behandlung mit einem serumhaltigen Medium zeigt Änderungen in Ladung und Größe der Nanokonjugate. Unter Zellkulturbedingungen haben die Nanopartikel eine größere positive Ladung und größere Durchmesser (bestimmt durch Messung des Zeta-Potentials und der Lichtstreuung), was durch die Adsorption von Proteinen verursacht wird.^[65] Die Wechselwirkung von multivalenten Nanopartikelkonjugaten mit Proteinen liefert einen möglichen Mechanismus für die Erkennung und nachfolgende Internalisierung dieser stark negativ geladenen Teilchen; die Einzelheiten hierzu werden noch intensiv untersucht.

4.4. Anwendungen in Zellen

Nucleinsäure-basierte Methoden zur Detektion und Steuerung der Genexpression haben die grundlegenden Studien zu Genrouten und -funktionen wesentlich beeinflusst.^[29] Methoden zur Steuerung der Genexpression umfassen die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden^[66] und kleiner interferierender RNA (siRNA),^[67] die durch Watson-Crick-Paarung an Messenger-RNA (mRNA) binden können. Nachdem die Möglichkeit einer „Gentherapie“ auf der Grundlage von Nucleinsäuren vor über 20 Jahren erkannt wurde, haben sich bei der Entwicklung Probleme hinsichtlich des Eintritts in die Zellen, des Transports intakter Oligonukleotide und der Wirksamkeit ergeben.^[68] Um die Nucleinsäuren in die Zellen einzuschleusen, wurden verschiedene Transfektionsreagentien entwickelt, z.B. kationische Lipide und Polymere,^[69] modifizierte Viren,^[70] Dendrimere,^[71] Liposomen^[72] und Nanopartikel.^[26,73] Allerdings begrenzen Toxizität und unspezifische Effekte dieser Agentien die Menge an Oligonukleotiden, die sicher angeliefert werden kann. Ein ideales Genregulationssystem sollte – vom Standpunkt der gegenwärtigen Forschung aus gesehen – große Aufnahmeeffizienz über alle Zelltypen, hohe Stabilität in Zellen, große Bindungsaffinität für die Ziel-Nucleinsäuren und sehr geringe Toxizität aufweisen. Vor kurzem wurden DNA-AuNPs als Agentien eingeführt, die einige Probleme bei der Anwendung von Nucleinsäuren in Zellen verringern.^[25]

4.4.1. Antisense-Genregulation

Wir nahmen an, dass DNA-AuNPs wegen ihrer verbesserten Bindungseigenschaften wie starke „Schwämme“ für mRNA wirken und die Translation in Proteine verhindern könnten. Als Beweis für diese Vermutung entwickelten wir DNA-AuNPs, die an mRNA-Sequenzen binden, die für das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP) codieren, das in Maus-Endothelzellen exprimiert wird. Die Nanopartikel wurden mit einer Antisense-Sequenz versehen, die komplementär zu einer inneren codierenden Region der mRNA für eGFP ist.^[25] Quantitative Messungen der Expression durch Fluoreszenzassays zeigen, dass diese Partikel die im direkten Vergleich verwendete lipidkomplexierte DNA übertreffen. Erste Experimente zeigten einen Rückgang um ungefähr 20%, und durch weitere Optimierung der experimentellen Parameter und Konjugatstruktur konnte eine Genabschaltung von mehr als 75% erzielt werden (Abbildung 5).

Nunmehr wurden über zehn Jahren Arbeit zur Synthese und Charakterisierung von DNA-AuNPs aufgewendet. Die Funktionalisierung der AuNPs ist aber nicht auf DNA-artige Oligomere beschränkt, sondern sie können auch mit maßgeschneiderten Oligonukleotiden codiert werden, die ihnen verbesserte Eigenschaften verleihen – von einer erhöhten Spezifität für die Zielstruktur bis hin zu einer katalytischen Umsetzung in der biologischen Umgebung.^[74,75] Vor kurzem wurden Nanopartikelkonjugate mit verbrückten Nucleinsäuren (locked nucleic acids, LNAs) synthetisiert und untersucht.^[76,77] LNAs enthalten verbrückte Zuckergruppen in ihren Rückgraten, wodurch die Bindungsaffinität und die Stabilität der Doppelstränge zunehmen.^[78] AuNPs, die dicht

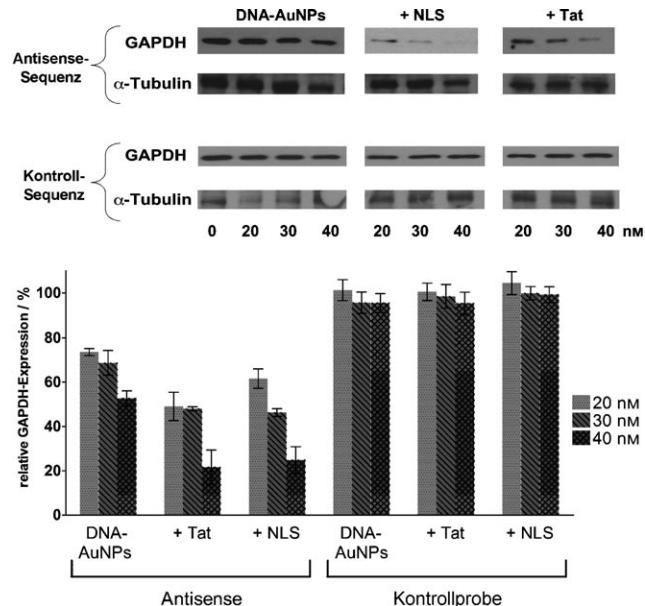


Abbildung 5. A) Typische Western-Blots zeigen die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in HeLa-Zellen, die mit Goldnanokonjugaten unterschiedlicher Zusammensetzung in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden. Die GAPDH-Expression wird in Abhängigkeit von der Dosis und der Sequenz vermindert. α -Tubulin wird als Ladekontrolle gezeigt. B) Relative Abnahme der GAPDH-Expression in HeLa-Zellen. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle und für die nachfolgende Normierung des GAPDH-„Knockdowns“ verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von wenigstens drei Western-Blots. Wiedergabe nach Lit. [102] mit Genehmigung der National Academy of Sciences, Copyright 2008.

mit LNAs funktionalisiert sind, bilden bemerkenswert stabile Doppelstränge mit komplementären Nucleinsäuren und sind unter biologischen Bedingungen einfach zu handhaben und zu verändern. Bei Anwendungen in Zellen ergeben LNA-modifizierte AuNPs einen effektiveren Gen-„Knockdown“ als analoge DNA-modifizierte AuNPs.^[77]

4.4.2. Intrazelluläre Detektion und Abbildung

Oligonukleotid-Sonden für den Nachweis und die Visualisierung intrazellulärer RNA – einschließlich jener, die zur In-situ-Färbung verwendet werden,^[79,80] „molecular beacons“^[81,82] und Sonden für den resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET)^[83,84] – sind wichtige Hilfsmittel, um die biologische Aktivität in lebenden Systemen zu quantifizieren. Zellen nehmen molekulare Sonden jedoch nicht ohne weiteres auf, was die Verwendung von Transfektionsreagentien oder Mikroinjektionen erforderlich macht. Solche Bildgebungsagentien mit Oligonukleotid-Struktur können eine begrenzte Stabilität infolge Nuclease-Abbaus aufweisen, was zu einem großen Hintergrundsignal führt und den spezifischen Nachweis der Zielstrukturen erschwert.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden Strukturen wie chemisch modifizierte „molecular beacons“^[85] oder entsprechende Peptid-Konjugate entwickelt.^[86] Unsere Arbeitsgruppe synthetisierte vor kurzem „Nanofackeln“ (nano-flares), die sich die Eigenschaften von DNA-AuNPs

zunutze machen, als neuartige Sonden für die intrazelluläre Detektion.^[87–89] Nanofackeln sind Oligonucleotid-funktionalisierte Goldnanopartikel, die mit kurzen Fluorophor-markierten Komplementärsträngen hybridisiert sind. Sie wurden so konzipiert, dass sie ein intrazelluläres Fluoreszenzsignal liefern, das mit der Konzentration eines bestimmten Nucleinsäure- oder anderen Zielmoleküls korreliert. Ist kein Zielmolekül vorhanden, befindet sich der Fluorophor nahe an der Nanopartikeloberfläche, und seine Fluoreszenz ist gelöscht. Durch Binden des Zielmoleküls wird der Fluorophor freigesetzt, und es wird ein Signal erzeugt, das in einer lebenden Zelle gemessen werden kann. Nanofackeln können verschiedene Zelltypen aufgrund des Expressionsprofils unterscheiden und liefern in Echtzeit ein halbquantitatives Bild der Genexpression in einer lebenden Probe (Abbildung 6).

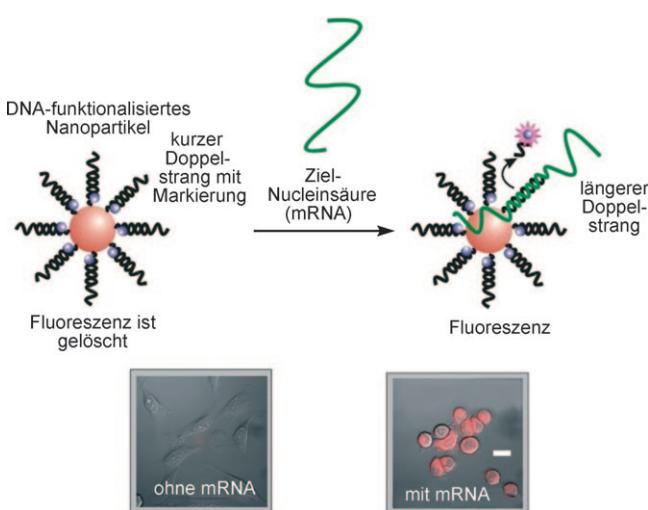


Abbildung 6. Nanofackeln sind Goldnanokonjugate mit Oligonucleotidsequenzen, die komplementär zu einer spezifischen Ziel-Nucleinsäure (Messenger-RNA) sind und mit kurzen fluoreszierenden Sequenzen hybridisiert sind. In Abwesenheit des Zielmoleküls leuchten die Nanofackeln nicht, weil ihre Fluoreszenz durch die Goldnanopartikel gelöscht wird. In Gegenwart des Zielmoleküls wird die kurze fluoreszierende Sequenz der Fackel durch Bildung eines längeren (energetisch günstigeren) Doppelstrangs verdrängt. Das Ergebnis ist ein Fluoreszenzsignal innerhalb der Zelle, das das Vorliegen der Zielbindung anzeigen. Unten: Fluoreszenzmikroskopiebilder von entsprechenden Zellen, Maßstab: 20 µm. Wiedergabe nach Lit. [87] mit Genehmigung der American Chemical Society, Copyright 2007.

Weil diese Nanopartikel dicht mit Oligonucleotiden funktionalisiert sind, werden mehrere Probleme umgangen, die gewöhnlich mit dem Nachweis intrazellulärer RNA verbunden sind: die Schwierigkeit beim Zelleintritt, die Toxizität und die mangelnde Stabilität in Zellen. Die Sonden benötigen weder eine Mikroinjektion noch Hilfsreagentien, um in Zellen einzudringen, und sie sind resisterter als molekulare Nucleinsäuren gegenüber enzymatischem Abbau, wodurch das Hintergrundsignal verringert und das Detektionsvermögen verbessert wird.

4.4.3. RNA-Interferenz

Ergänzend wird auch an Konjugaten geforscht, die mit einer Schicht von RNA-Liganden funktionalisiert sind und an dem wichtigen RNA-Interferenz(RNAi)-Weg eingreifen. Wir haben kürzlich RNA-AuNPs synthetisiert und anschließend ohne Einsatz von Transfektionsreagentien in Zellen eingebracht.^[90] Bei der herkömmlichen RNAi verwendet man molekulare RNAs, die extrem kurze Halbwertszeiten (Abbau durch RNasen) und deshalb eine beschränkte Wirksamkeit aufweisen.^[91,92] Bei RNA-Gold-Nanokonjugaten schützt das Vorliegen als dichte Monoschicht die oberflächenimmobilierte RNA vor nichtspezifischem Abbau sowohl in Zellkulturnmedien als auch im Zellinneren. Diese Strukturen sind in serumhaltigen Medien sechsfach stabiler als molekulare RNA, und diese erhöhte Stabilität beruht nicht auf chemischen Modifizierungen der RNA-Molekülstruktur. Wir haben ferner gezeigt, dass die RNA-Gold-Nanokonjugate eine beständigere Genstummschaltung ergeben. Wegen ihrer verbesserten Stabilität und der guten Aufnahme in Zellen sollten diese Strukturen zukünftig in der Grundlagenforschung sowie bei der therapeutischen Anwendung von RNAi eine wichtige Rolle spielen.

4.4.4. Detektion von Zellen

Über die intrazellulären Anwendungen hinaus haben Tan et al. auch einen kolorimetrischen Nachweis für Krebszellen auf der Grundlage von DNA-AuNPs entwickelt. AuNPs wurden mit einer Monoschicht aus spezifischen Aptameren funktionalisiert, um eine hohe Affinität für Oberflächenrezeptoren zu erreichen, die durch eine Krebszelllinie (CCRF-CEM) exprimiert werden.^[93] Die Aptamer-funktionalisierten Nanokonjugate sammeln sich auf den Zelloberflächen, was zur Wechselwirkung ihrer Oberflächenplasmonenresonanzen und zu einer Rotverschiebung in den Extinktionsspektren führt und damit direkt die Bindung an die Zielstruktur anzeigen. Wegen der großen Extinktion der AuNPs können Krebszellen mit dem bloßen Auge oder mit einem Spektrometer erkannt werden, wodurch teure Geräte überflüssig werden. Die Methode ist möglicherweise brauchbar für die Diagnose von Krebs und anderen Krankheiten.

5. Peptide

Bei den zielführenden Teilen von Proteinen handelt es sich häufig um kurze Oligopeptidabschnitte. Peptidische Kernlokalisationssignale wurden beispielsweise eingesetzt, um die intrazelluläre Lokalisation zu ändern und die Wirksamkeit konjugierter Biomoleküle zu steigern.^[94] Solche Signalsequenzen bestehen häufig aus einem Strang positiv geladener Aminosäuren wie Arginin und Alanin, die beim Transport durch die Kernhülle mit Importin A wechselwirken.^[95] Sequenzen, die sich vom HIV-Tat-Protein (CY-GRKKRRQRRR) und der Integrin-Bindungsdomäne (CKKKKKGGRGDMFG) ableiten, wurden umfassend untersucht, um exogene Proteine und künstliche Materialien in den Kern zu transportieren.^[23,96–99]

5.1. Peptid-Nanokonjugate

Unlängst wurden Beispiele für Peptid-Goldnanopartikel-Konjugate beschrieben: Feldheim, Franzen et al. verknüpften Peptide mit Goldnanopartikeln durch Anheften an Rinderserumalbumin (BSA) und anschließende elektrostatische Assoziation.^[23,100] Die resultierenden Nanokonjugate treten in Kultur in den Kern von HepG2-Zellen ein. Bemerkenswerterweise können die Nanokonjugate nur dann in den Kern dieser Zellen eindringen, wenn sie mit Peptiden funktionalisiert sind, die sowohl rezeptorvermittelte Endocytose (RME) als auch ein Kernlokalisationsignal (NLS) enthalten (Abbildung 7). Dieselben Forscher untersuchten mit Peptiden und Polyethylenglycol (PEG) modifizierte AuNPs auf ihre Zellgängigkeit hin. Interessant ist, dass sogar Teilchen mit großen PEG-Molekülen (Molekulargewicht von 5000) in der Monoschicht aktiv internalisiert werden.^[101] Diese Studien weisen auf Möglichkeiten beim Design multifunktionaler Konjugate hin.

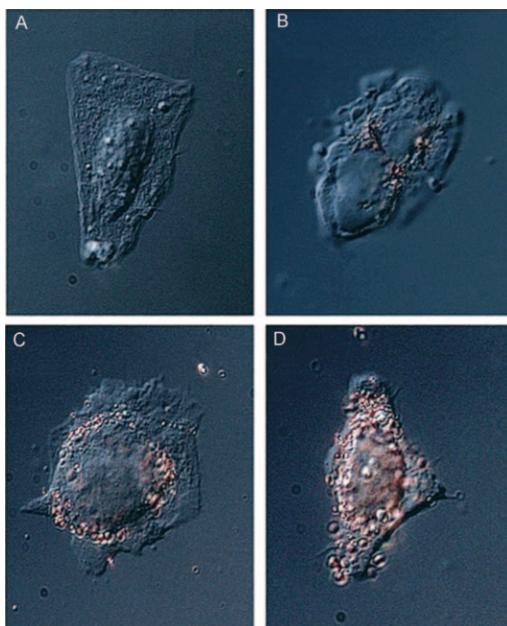


Abbildung 7. Aufnahmen von Nanopartikel-Peptid-Komplexen, die 2 h mit HepG2-Zellen inkubiert waren. Komplexiert waren: A) das Kernlokalisationspeptid, B) das Peptid für die Rezeptor-vermittelte Endozytose, C) das adenovirale Faserprotein und D) sowohl das Kernlokalisationspeptid als auch das Peptid für die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Wiedergabe nach Lit. [23] mit Genehmigung der American Chemical Society, Copyright 2003.

5.2. Peptid/DNA-Goldnanopartikel-Konjugate

Wir haben Goldnanokonjugate synthetisiert, die mit Antisense-Oligonucleotiden und NLS- oder HIV-Tat-Peptiden funktionalisiert sind.^[102] Unsere Synthesestrategie nutzt thioierte Oligonucleotide und Peptide mit endständigen Cystein-Resten zur Funktionalisierung der AuNP-Oberfläche. Da die Oligopeptide und Oligonucleotide entgegengesetzt geladen sind, muss Salz zugegeben werden, um die Biomoleküle während der Synthese gegeneinander abzu-

schirmen. Beim Test in Zellkulturen wurden die entstandenen Konjugate in die Zellen aufgenommen und waren dann in der perinukleären Region lokalisiert. Folglich sind diese Teilchen sehr wirksam bei der Genstummschaltung (> 75 % Abnahme bei der Expression des Zielproteins).

5.3. Multifunktionale und Mehrkomponenten-DNA-Nanokonjugate

Die Vielseitigkeit von Nanokonjugaten kann durch den Einbau mehrerer funktioneller Gruppen in jedes Konstrukt gesteigert werden, oder indem sie mit mehreren Funktionen entworfen werden. Unsere Arbeitsgruppe hat unlängst gezeigt, dass Nanofackeln (siehe Abschnitt 4.4.2) sowohl für den intrazellulären mRNA-Nachweis als auch für den Gen-„Knockdown“ angepasst werden können.^[88] Diese Nanofackeln dringen in die Zelle ein und binden mRNA an einer Stelle, die für den Gen-„Knockdown“ geeignet ist. Dadurch verringern sie die relative Häufigkeit der mRNA, während sie gleichzeitig eine Fluoreszenz emittieren und dadurch die Gen-Regulation im Inneren der Zelle anzeigen. Auf diesem Weg ist es möglich, die Folgen einer Veränderung am zellulären System in Echtzeit zu beobachten. Zudem kann man mit der Nanofackel-Methode im Prinzip alle Arten zellsortierender genetischer Screenings aufbauen.

Um die gute Aufnahme von DNA-AuNPs in Zellen zu nutzen, wurden weitere therapeutische Nanokonstrukte entworfen. Zum Beispiel sind Pt^{IV}-Komplexe für die Chemotherapie untersucht worden, um die Nebenwirkungen von Cisplatin zu reduzieren. Arbeiten der Gruppen von Lippard und Mirkin haben gezeigt, dass AuNPs mit Oligonucleotiden und Cisplatin-Vorstufen modifiziert werden können. Diese Konstrukte transportieren wie ihre kanonischen DNA-Genstücke den Wirkstoff effizient zu den Zellen.^[127] Als Cisplatin-Vorstufe dient ein Pt^{IV}-Komplex, der in den sauren Endosomen der Zelle reduziert und als aktives Cisplatin entlassen wird. Zusätzlich können weitere funktionelle Gruppen (in diesem Fall eine Carbonsäurefunktion) an der Cisplatin-Vorstufe angebracht werden, um eine einfache Konjugation an die Oligonucleotide über Amidbindungen zu ermöglichen. In zukünftigen Arbeiten sollte die Regulierung der Genexpression zur Chemosensibilisierung der Zellen während der Wirkstoffverabreichung untersucht werden. Solche Mehrkomponenten-Konjugate sollten die erforderliche Menge an Chemotherapeutikum reduzieren und die systemische Toxizität verringern.

6. Antikörper

Mit Antikörpern markierte Goldnanokonjugate werden in der Immunhistochemie seit fast 40 Jahren eingesetzt.^[15] Vor kurzem gab es jedoch wegen der Entwicklung von Goldnanokonjugaten für Studien an lebenden Zellen einen erneuten Aufschwung. Die Herstellungsmethoden für Antikörper-Gold-Nanokonjugate umfassen Adsorption,^[15] N-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester-Chemie^[103] und Oligonucleotid-gerichtete Immobilisierung.^[104] Antikörper können an AuNPs

über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen adsorbierten oder über native Thiolgruppen in ihrer Struktur chemisorbieren.^[105] Die Stabilität der nach dieser Methode synthetisierten Konjugate ist jedoch begrenzt, weil die Proteine leicht desorbieren.^[106] Um stabilere Strukturen zu bilden, können AuNPs, die mit NHS-Ester-haltigen Monoschichten funktionalisiert sind, mit den primären Aminogruppen der Antikörper zur Reaktion gebracht werden. Alternativ können DNA-AuNPs mit Antikörpern hybridisiert werden, die an komplementäre Oligonukleotide konjugiert sind.^[106]

6.1. Bildgebung

AuNPs wurden mit Antikörpern, die spezifisch sind für Krebs-assoziierte Proteine, modifiziert und verwendet, um Krebszellen abzubilden. In einem Beispiel wurden Konjugate mit Antikörpern des Rezeptors für den epithelialen Wachstumsfaktor (EGFR) mit Mundepithelzellen inkubiert. Lichtmikroskopische Experimente zeigen, dass die Konjugate mit sechsmal größerer Affinität an krebsartige Zellen binden als an Kontrollzellen; damit könnte die Methode nützlich sein zum Nachweis von Krebszellen.^[107]

6.2. Photothermische Therapie

Mit Antikörpern konjugierte Goldnanostäbchen^[108] und -nanoschalen,^[109] die auf Krebszellen abzielen, sind als photothermische Therapiemittel entwickelt worden. So wurden Nanoschalen, die mit Antikörpern gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2) konjugiert waren, mit Krebszellen inkubiert, die HER2-Rezeptoren überexprimieren. Diese Zellen wurden dann mit Nahinfrarot-Licht einer Frequenz bestrahlt, die die Oberflächenplasmonen der Nanoschale anregt. Die Lichtabsorption führt zur Erhitzung und dadurch zum Zelltod.^[110] Wegen mangelnder Bindung an die Zelloberflächen zeigen mit Kontroll-Antikörpern konjugierte Nanoschalen diese Wirkung nicht. Solche Konjugate werden auch als Materialien entwickelt, die eine photothermische Therapie mit der Fähigkeit zur Bildgebung im Nah-IR-Bereich verbinden.^[107, 110]

7. Lipide

Seit kurzem gehören Lipide neben Oligonukleotiden, Peptiden und Antikörpern zu den Biomolekülen, die zur Modifizierung von AuNPs verwendet werden. Unsere und andere Arbeitsgruppen haben biomimetische Nanostrukturen mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) durch Adsorption von Lipiden und Proteinen an der Oberfläche von AuNPs synthetisiert.^[111] Dabei werden thiolierte Lipide oder Alkanthiole neben Apolipoprotein A1 (APOA1), einer Eiweißkomponente von HDL, auf der Oberfläche der AuNPs adsorbiert. Als nächstes wird ein zweites Lipid auf der AuNP-Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Lipidenden und den thiolierten Spezies adsorbiert. Vor diesen Studien waren keine einfachen Synthesemethoden für

HDL mit vorgegebener Größe, Form und Zusammensetzung beschrieben worden. Da immer deutlicher wird, dass diese Parameter die physiologischen Eigenschaften der HDLs beeinflussen, könnten solche Strukturen als Therapeutika und Bildgebungsagentien nützlich sein.^[111, 112]

7.1. Therapeutika

Natürliches HDL ist entscheidend am Transport von Cholesterin aus Makrophagen in atherosklerotischen Plaques und an der Ausscheidung aus dem Körper beteiligt, und die Steigerung des HDL-Spiegels könnte einen Ansatz bieten, Atherosklerose vorzubeugen oder zu behandeln. In diesem Zusammenhang synthetisierte unsere Arbeitsgruppe HDL-AuNPs, deren Größe sowie Protein- und Lipidgehalt ähnlich dem von natürlichem HDL sind (Abbildung 8). Mithilfe

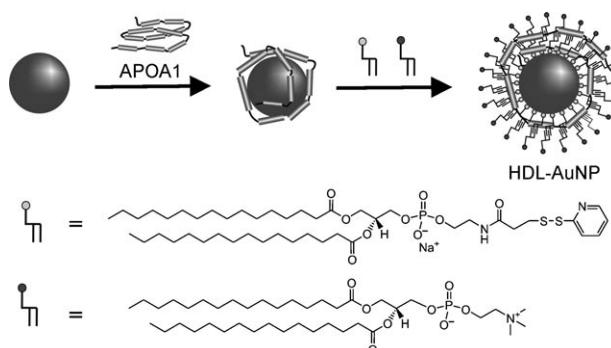


Abbildung 8. Synthese kugelförmiger HDL-Nanopartikel mit Templat unter Verwendung von Peptiden mit Thiol-Endgruppen und dem Protein (APOA1). Wiedergabe nach Lit. [111] mit Genehmigung der American Chemical Society, Copyright 2009.

dieser Nanostrukturen kann die Stärke der Wechselwirkungen zwischen HDL und Cholesterin bestimmt werden. Bei der ersten Verwendung dieser Konjugate zeigten wir, dass HDL-AuNPs ein fluoreszierendes Cholesterin-Analogon mit hoher Affinität ($K_d = 4 \text{ nm}$) binden.^[111] Unseres Wissens ist dies die erste gemessene Bindungskonstante für irgendeine Form von HDL und ein Cholesterin-Derivat, sodass nunmehr ein Vergleichswert vorliegt, anhand dessen die Bindungsfähigkeit zukünftiger Konstrukte und ihr Potenzial als neue Therapeutika zu bewerten sind.

7.2. Bildgebung

Neben dem Cholesterin-Transport wurden AuNP-HDL-Mimetika auch zur Abbildung von Makrophagen *in vivo* eingesetzt.^[112] Die Makrophagendichte ist ein Indikator für gefährliche atherosklerotische Plaques und somit ein wichtiges Ziel für die Bildgebung. Mäuse mit cholesterinreicher Diät stellen ein etabliertes Modell für Atherosklerose dar. Nach der Injektion von HDL-AuNPs zeigten tomographische Bilder der Mausaorta eine Anhäufung der Nanopartikel, was darauf hindeutet, dass diese HDL-AuNPs zur Abbildung bei Atherosklerose verwendet werden könnten.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Goldnanokonjugate haben sich in grundlegenden zellbiologischen Anwendungen schon als nützlich erwiesen. Wie bei allen Nanomaterialien weiß man auf der molekularen Ebene noch nicht viel über die Wechselwirkungen zwischen Goldnanokonjugaten und Zellen, und die Designkriterien, die schließlich zu einer therapeutischen Verwendung führen können, werden noch formuliert. In diesem Abschnitt diskutieren wir Herausforderungen, die unserer Meinung nach zur Weiterentwicklung von Goldnanokonjugaten in nutzbare Therapeutika führen werden.

8.1. Mechanismen der Aufnahme in Zellen

Mehrere Arbeitsgruppen haben inzwischen die Internalisierung von Goldnanokonjugaten in üblichen Zelllinien-Modellen bestätigt. Wegen ihrer unterschiedlichen Oberflächenzusammensetzung, Größe und Form wird sich der Aufnahmemechanismus bei den verschiedenen Klassen von Goldnanokonjugaten wahrscheinlich unterscheiden. Tatsächlich kann man sogar die Beschichtung von AuNPs modifizieren, um das Aufnahmevermögen einer Zelle für ein AuNP anzupassen.^[24,113] Mit positiv geladenen Aminen oder Peptiden funktionalisierte AuNPs wechselwirken wahrscheinlich über diese positiven Reste mit der negativ geladenen Zelloberfläche.^[26] Bei Antikörper-Konjugaten oder denen, die peptidische Internalisierungssignale enthalten, spielen wahrscheinlich Wechselwirkungen mit spezifischen Zelloberflächen-Antigenen eine Rolle.^[23] Negativ geladene Goldnanokonjugate folgen noch einem anderen Aufnahmeweg. Untersuchungen durch unsere und andere Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die Aufnahme durch die Zelle mit einer Wechselwirkung zwischen Proteinen und der Nanopartikeloberfläche einhergehen könnte.^[21,65] Die Identifizierung der Proteine, die es den negativ geladenen Goldnanokonjugaten ermöglichen, in die Zelle einzudringen, gestaltet sich als schwierige Aufgabe.

8.2. Zielerkennung

Mithilfe von Goldnanokonjugaten lassen sich auf höchst wirksame Weise Substanzen in Zellen einschleusen. Wir haben beschrieben, dass es auf der Grundlage der einzigartigen Eigenschaften dieser Materialien möglich ist, multivalente Arzneimittel und Antisense-Wirkstoffe zu entwerfen. Diese Wirkstoffe können verwendet werden, um zelluläre Funktionen zu steuern, die Genexpression zu regulieren und intrazelluläre Analyte effizienter als molekulare Systeme zu detektieren, was teilweise auf Verbundeigenschaften und eine nachgewiesene Fähigkeiten zur Aufnahme in verschiedenartige Zellen zurückzuführen ist. Für die Weiterentwicklung solcher Materialien in Therapeutika ist es wichtig, spezifische Zellen und letztlich Gewebe oder Organe gezielt ansteuern zu können. Strategien für den gezielten Transport können auf Biomolekülen wie Antikörpern,^[108] Aptameren,^[114] Peptiden^[23] oder niedermolekularen Liganden beruhen.^[115]

Für Zielführungsstrategien müssen multifunktionale Partikel entwickelt werden, die gezielt Oligonucleotide oder andere Wirkstoffe in Zellen transportieren. Zum Beispiel sollten Antikörper, die die Oberflächenrezeptoren der entsprechenden Zielzellen erkennen, eine zellspezifische Aufnahme bewirken und die nichtspezifische Aufnahme begrenzen, aber sie dürfen auch die Aktivität und die gewünschten Eigenschaften der Nanokonjugate nicht beeinträchtigen. Bei multivalenten DNA-AuNPs müssen Reste wie Antikörper so angeheftet werden, dass der DNA-Funktionalisierungsgrad und die Eigenschaften, die aus der dichten Anordnung der DNA resultieren, nicht eingeschränkt werden. Obwohl dies nicht einfach ist, sind schon cofunktionalisierte AuNPs synthetisiert worden, die Peptide einbauen, ohne dass Auswirkungen auf die Bindung an komplementäre Nucleinsäuren auftreten.^[102] Diese Befunde sind vielversprechende Schritte auf dem Weg zu zielgerichteten multivalenten Nanokonjugat-Therapeutika.

8.3. Toxizität

Etliche Forschungsgruppen haben die Toxizität von Goldnanokonjugaten verschiedener Arten und Größen untersucht. Obwohl die Ergebnisse dieser Studien differieren, können mehrere wichtige Schlüsse gezogen werden. Am wichtigsten ist vielleicht, dass die Toxizität von Goldnanokonjugaten von der chemischen Zusammensetzung der Oberflächenliganden abhängt. Tatsächlich ist es häufig die Oberflächengruppe selbst, die zur Toxizität führt. Es wurde beispielsweise ursprünglich angenommen, dass mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) funktionalisierte Goldnanokonjugate toxisch wirken; anschließend wurde aber festgestellt, dass die Partikel nicht cytotoxisch waren, wenn überschüssiger Ligand durch Waschen entfernt wurde.^[18] Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Toxizität eines Liganden wie CTAB durch Komplexierung mit einem AuNP reduziert wird,^[116] was vermutlich eine Folge der veränderten zellulären Lokalisation ist. Rotello et al. haben ferner gezeigt, wie die chemische Funktionalität und die Ladung von Nanokonjugat-Oberflächenliganden die Toxizität beeinflussen. Amin-funktionalisierte Partikel waren nur schwach toxisch, und Carbonsäure-funktionalisierte Partikel wirkten unter allen untersuchten Bedingungen nicht toxisch.^[117]

Einige neuere Studien haben sich auf die Toxizität von citratbedeckten Nanokonjugaten konzentriert. Eine Studie mit humanen Hautfibroblasten ergab, dass die Zellproliferation, -ausbreitung und -adhäsion durch citratbedeckte Nanokonjugate verlangsamt werden.^[118] Die Autoren bewiesen, dass Actin-Stress die Ursache für diese Effekte ist. Eine zweite, unabhängige Studie beschreibt auch vermindertes Zellwachstum in Gegenwart citratbedeckter Nanokonjugate, und in diesem Fall gibt es Hinweise darauf, dass dies die Folge einer oxidativen Schädigung ist.^[119] Ähnliche Ergebnisse wurden mit ähnlichen Partikeln in Myelom-Zellen beschrieben.^[120] Obwohl in diesen Fällen keine akute und starke Toxizität beobachtet wurde, erfordern die ungünstigen Effekte der citratbedeckten Nanokonjugate weitere Aufmerksamkeit.

Faszinierende neuere Untersuchungen demonstrieren, dass auch die Größe eines Konjugats seine Toxizität bestimmt. Simon, Jähnchen-Dechent et al. untersuchten eine Gruppe Phosphan-funktionalisierter AuNPs mit Durchmessern zwischen 0.8 und 15 nm. Sie entdeckten, dass 1.4 nm große Partikel toxisch waren, während 15 nm große Partikel – selbst bei bis zu 100-fach höheren Konzentrationen – nicht toxisch wirkten.^[121] Im Fall der Partikel mit 1.4 nm Durchmesser gibt es Hinweise, dass die Toxizität durch Nekrose entsteht, jedoch zeigen weder Partikel mit 1.2 nm Durchmesser noch solche mit 1.8 nm Durchmesser diesen Effekt. Chan et al. haben kürzlich die Zellantwort auf Herceptin bedeckte Goldnanopartikel von 2–100 nm Größe erforscht und ermittelt, dass 40 und 50 nm große Partikel die größte Wirkung auf die Signalfunktionen der Zelle ausüben.^[122] Dies sind wichtige Befunde, die näher untersucht werden müssen. Für einen genauen Vergleich müsste man Partikel unterschiedlicher Größen bei festgelegter chemischer Funktionalität der Oberflächen unter Verwendung einer gemeinsamen Synthesestrategie gezielt herstellen.

Goldnanostäbchen und -nanoschalen wurden kürzlich in Mausmodellen getestet. Halas, West et al. haben die Wirksamkeit PEG-beschichteter Nanoschalen, die in Tumore eines Mausmodells injiziert wurden, in einer photothermischen Therapie evaluiert. Die Tumore konnten durch Behandlung mit Licht entfernt werden, und die Tiere blieben über 90 Tage hin gesund, was auf eine geringe In-vivo-Toxizität der Nanokonjugate hindeutet.^[123] Eine Arbeitsgruppe, die die Verwendung CTAB-funktionalisierter Goldnanostäbchen für Bildgebungsverfahren prüfte, fand heraus, dass die Partikel nach der Injektion in die Schwanzvene rasch aus dem Blut ausgeschieden wurden.^[124] Bei ähnlichen Nanostäbchen wurde festgestellt, dass sie nach 72 h in der Leber akkumuliert sind.^[125] Wurde allerdings die Oberflächengruppe gegen PEG ausgetauscht, so waren die meisten Partikel nach 72 h abtransportiert, und nur wenige blieben in der Leber zurück. Diese ersten Tierversuche sind vielversprechend und sollten zu zukünftigen Untersuchungen anregen, um die Bioverteilung von Goldnanokonjugaten in Abhängigkeit von Größe, Form und den chemischen Eigenschaften der Liganden aufzuklären.

Bis jetzt wurde keine Cytotoxizität bei DNA-AuNPs beobachtet.^[25] Es ist wiederum wichtig zu bemerken, dass diese Nanokonjugate eine einzigartige Größe, Ladung und Oberflächenfunktionalität aufweisen, und dass sich ihre Eigenschaften aus der Verbindung von DNA und AuNP ergeben. Für diese Materialien wird ein umfassendes toxikologisches Screening benötigt, um herauszufinden, welche Komponenten der Struktur die biologische Antwort hervorrufen. Erste Studien in unserer Arbeitsgruppe zur angeborenen Immunantwort (charakterisiert durch die Interferon-Produktion) ließen eine vergleichsweise geringe, durch DNA-AuNPs verursachte Produktion von β -Interferon-B erkennen (gegenüber analoger molekularer DNA).^[126] Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um Änderungen im Genexpressionsprofil zu erforschen, die sich mit der Einführung dieser Strukturen ergeben könnten. In-vitro-Assays und Untersuchungen zur Bioverteilung und In-vivo-Toxizität sind im Gange. Obwohl multivalente DNA-AuNPs ihren Nutzen in

Zellkulturansätzen schon bewiesen haben, sind solche Tierversuche erforderlich, um die Chancen für die Entwicklung der Nanomaterialien in nutzbare Therapeutika abzuschätzen.

8.4. Schlussfolgerungen

Während die Eigenschaften von Goldkolloiden über ein Jahrhundert untersucht wurden, ist ihre Anwendung in lebenden Zellen erst vor einigen Jahren bekannt geworden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass multivalente und/oder zusammengesetzte Nanomaterialien hinsichtlich Aufnahme und Wirksamkeit in Zellmodellen gegenüber molekularen Systemen klare Vorteile bieten können. Mehr noch haben diese Studien das grundlegende Konzept der Nanotechnologie bestätigt, dass Zusammensetzung, Oberflächen-derivatisierung, Ladung, Größe und Form für die Eigenschaften der Materialien maßgeblich sind, und diesen die einzigartige Fähigkeit verleihen können, mit einem biologischen System wie einer Zelle zu wechselwirken. Die hervorgehobenen Klassen von Goldnanokonjugaten bilden eine kleine Auswahl möglicher zusammengesetzter Materialien. Die Betrachtung dieser Klassen führt zu der Schlussfolgerung, dass jedes Nanomaterial einzeln untersucht und bewertet werden muss. Dies veranschaulichen Studien, in denen sich die Oberflächenfunktionalität wiederholt als Schlüsselparameter hinsichtlich der Toxizität von Nanopartikeln erwiesen hat. Wenn man aus den frühen Arbeiten mit CTAB-funktionalisierten Nanokonjugaten geschlossen hätte, dass alle Goldnanokonjugate toxisch wirken, dann hätte man interessante Gelegenheiten versäumt, zum Beispiel die Verwendung von DNA-AuNPs für die Genregulation^[25] oder von Amin-funktionalisierten Konjugaten für den Wirkstofftransport,^[36] wo die Toxizität geringer war als bei Polymer-Transportsystemen.^[25] Daher ermutigen wir Forscher, Nanokonjugate zu untersuchen und zu bewerten, aber – wo immer möglich – Verallgemeinerungen zu vermeiden.

Die Herstellung und Verwendung funktionalisierter Goldnanokonjugate bleibt ein aktives Forschungsgebiet, das bedeutende Entdeckungen und neue Herausforderungen bereithält, die nicht nur Chemiker, sondern auch Materialwissenschaftler, Biologen, Ingenieure und Mediziner in ihren Bann ziehen. Die bisherigen Arbeiten geben nur einen flüchtigen Eindruck von den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten für Goldnanopartikel in Biologie und Medizin.

C.A.M. dankt dem Cancer Center for Nanotechnology Excellence (CCNE) (für einen CCNE Award), dem NSF-NSEC und dem U.S. Army Medical Research and Material Command (Nummer W81XWH-08-1-0766) für die Förderung dieser Arbeit. D.S.S. wurde durch ein LUNGevity Foundation–American Cancer Society Postdoctoral Fellowship in Lung Cancer unterstützt. P.C.P. wurde durch ein Ryan Fellowship gefördert.

Eingegangen am 4. August 2009

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] M. A. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, Academic Press, San Diego, **1989**.
- [2] P. P. Edwards, J. M. Thomas, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5576; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5480.
- [3] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
- [4] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607.
- [5] S. Y. Park, A. K. R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Nature* **2008**, *451*, 553.
- [6] 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.
- [7] S. J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *295*, 1503.
- [8] J. Wang, G. D. Liu, A. Merkoci, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3214.
- [9] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science* **2003**, *299*, 1877.
- [10] L. He, M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, M. J. Natan, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9071.
- [11] J. Liu, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6642.
- [12] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547.
- [13] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.
- [14] S. G. Penn, L. He, M. J. Natan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 609.
- [15] W. P. Faulk, G. M. Taylor, *Immunochemistry* **1971**, *8*, 1081.
- [16] G. Frens, *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.
- [17] B. V. Enustun, J. Turkevich, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3317.
- [18] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2005**, *1*, 325.
- [19] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662.
- [20] P. H. Yang, X. S. Sun, J. F. Chiu, H. Z. Sun, Q. Y. He, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 494.
- [21] B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1542.
- [22] E. C. Cho, J. W. Xie, P. A. Wurm, Y. N. Xia, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1080.
- [23] A. G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. Glomm, J. Ryan, M. F. Anderson, S. Franzen, D. L. Feldheim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4700.
- [24] P. Nativo, I. A. Prior, M. Brust, *ACS Nano* **2008**, *2*, 1639.
- [25] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. R. Lytton-Jean, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Science* **2006**, *312*, 1027.
- [26] K. K. Sandhu, C. M. McIntosh, J. M. Simard, S. W. Smith, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 3.
- [27] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801.
- [28] M. J. Hostetler, A. C. Templeton, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, *15*, 3782.
- [29] S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, *AAPS J.* **2005**, *7*, E61.
- [30] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9138.
- [31] P. S. Ghosh, C. K. Kim, G. Han, N. S. Forbes, V. M. Rotello, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2213.
- [32] V. P. Torchilin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1532.
- [33] J. D. Gibson, B. P. Khanal, E. R. Zubarev, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11653.
- [34] M. C. Bowman, T. E. Ballard, C. J. Ackerson, D. L. Feldheim, D. M. Margolis, C. Melander, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6896.
- [35] G. Han, C. C. You, B. J. Kim, R. S. Turingan, N. S. Forbes, C. T. Martin, V. M. Rotello, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3165.
- [36] C. K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z. J. Zhu, S. Menichetti, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1360.
- [37] R. Hong, G. Han, J. M. Fernandez, B. J. Kim, N. S. Forbes, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1078.
- [38] A. Chompooosor, G. Han, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1342.
- [39] J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4640.
- [40] A. K. Lytton-Jean, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12754.
- [41] R. C. Jin, G. S. Wu, Z. Li, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1643.
- [42] S. J. Hurst, H. D. Hill, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12192.
- [43] L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds III, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5535.
- [44] D. Nykypanchuk, M. M. Maye, D. van der Lelie, O. Gang, *Nature* **2008**, *451*, 549.
- [45] S. Y. Park, A. K. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Nature* **2008**, *451*, 553.
- [46] H. D. Hill, R. J. Macfarlane, A. J. Senesi, B. Lee, S. Y. Park, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2341.
- [47] J.-M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **2003**, *301*, 1884.
- [48] S. I. Stoeva, J. S. Lee, J. E. Smith, S. T. Rosen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8378.
- [49] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078.
- [50] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959.
- [51] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, *289*, 1757.
- [52] Y. W. C. Cao, R. C. Jin, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *297*, 1536.
- [53] S. J. Hurst, A. K. Lytton-Jean, C. A. Mirkin, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8313.
- [54] J.-S. Lee, D. S. Seferos, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5430.
- [55] S. J. Hurst, A. K. R. Lytton-Jean, C. A. Mirkin, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8313.
- [56] Y. P. Bao, M. Huber, T. F. Wei, S. S. Marla, J. J. Storhoff, U. R. Muller, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 7.
- [57] H. Long, A. Kudlay, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2918.
- [58] A. K. R. Lytton-Jean, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12754.
- [59] C. Cazenave, M. Chevrier, N. T. Thuong, C. Helene, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 10507.
- [60] T. M. Woolf, C. G. B. Jennings, M. Rebagliati, D. A. Melton, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1763.
- [61] C. Q. Pan, R. A. Lazarus, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6624.
- [62] J. Shack, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 3003.
- [63] D. S. Seferos, A. E. Prigodich, D. A. Giljohann, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 308.
- [64] T. Niidome, L. Huang, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1647.
- [65] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, P. C. Patel, J. E. Millstone, N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3818.
- [66] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543.
- [67] Y. Dorsett, T. Tuschi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 318.
- [68] I. Lebedeva, C. A. Stein, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 403.
- [69] S. J. Hwang, M. E. Davis, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, *3*, 183.
- [70] H. Kamiya, H. Tsuchiya, J. Yamazaki, H. Harashima, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *52*, 153.
- [71] C. S. Braun, J. A. Vetro, D. A. Tomalia, G. S. Koe, J. G. Koe, C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 423.
- [72] M. D. Hughes, M. Hussain, Q. Nawaz, P. Sayyed, S. Akhtar, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 303.

- [73] D. J. Bharali, I. Klejbor, E. K. Stachowiak, P. Dutta, I. Roy, N. Kaur, E. J. Bergey, P. N. Prasad, M. K. Stachowiak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11539.
- [74] T. Kubo, Z. Zhelev, H. Ohba, R. Bakalova, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 54.
- [75] S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 455.
- [76] F. McKenzie, K. Faulds, D. Graham, *Small* **2007**, *3*, 1866.
- [77] D. S. Seferos, D. A. Giljohann, N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1230.
- [78] A. A. Koshkin, P. Nielsen, M. Meldgaard, V. K. Rajwanshi, S. K. Singh, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13252.
- [79] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585.
- [80] W. P. Kloosterman, E. Wienholds, E. de Bruijn, S. Kauppinen, R. H. Plasterk, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 27.
- [81] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303.
- [82] D. L. Sokol, X. Zhang, P. Lu, A. M. Gewirtz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11538.
- [83] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9686.
- [84] P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e57.
- [85] L. Wang, C. Y. J. Yang, C. D. Medley, S. A. Benner, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15664.
- [86] N. Nitin, P. J. Santangelo, G. Kim, S. Nie, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e58.
- [87] D. S. Seferos, D. A. Giljohann, H. D. Hill, A. E. Prigodich, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15477.
- [88] A. E. Prigodich, D. S. Seferos, M. D. Massich, D. A. Giljohann, B. C. Lane, C. A. Mirkin, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2147.
- [89] D. Zheng, D. S. Seferos, D. A. Giljohann, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3258.
- [90] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, A. E. Prigodich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2072.
- [91] Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034.
- [92] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H.-P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173.
- [93] C. D. Medley, J. E. Smith, Z. Tang, Y. Wu, S. Bamrungsap, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1067.
- [94] E. Vives, J. Schmidt, A. Pelegrin, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2008**, *1786*, 126.
- [95] D. S. Goldfarb, J. Gariepy, G. Schoolnik, R. D. Kornberg, *Nature* **1986**, *322*, 641.
- [96] V. Biju, D. Muraleedharan, K. Nakayama, Y. Shinohara, T. Itoh, Y. Baba, M. Ishikawa, *Langmuir* **2007**, *23*, 10254.
- [97] A. M. Derfus, A. A. Chen, D. H. Min, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1391.
- [98] R. E. Lanford, P. Kanda, R. C. Kennedy, *Cell* **1986**, *46*, 575.
- [99] A. K. Oyelere, P. C. Chen, X. Huang, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1490.
- [100] A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. L. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen, D. L. Feldheim, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 482.
- [101] Y. L. Liu, M. K. Shipton, J. Ryan, E. D. Kaufman, S. Franzen, D. L. Feldheim, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2221.
- [102] P. C. Patel, D. A. Giljohann, D. S. Seferos, C. A. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17222.
- [103] X. Qian, X. H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83.
- [104] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685.
- [105] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA, **1996**.
- [106] N. Nitin, D. J. Javier, R. Richards-Kortum, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 2090.
- [107] I. H. El-Sayed, X. H. Huang, M. A. El-Sayed, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 829.
- [108] I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed, *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 129.
- [109] L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13549.
- [110] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 709.
- [111] C. S. Thaxton, W. L. Daniel, D. A. Giljohann, A. D. Thomas, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1384.
- [112] D. P. Cormode, T. Skajaa, M. M. van Schooneveld, R. Koole, P. Jarzyna, M. E. Lobatto, C. Calcagno, A. Barazza, R. E. Gordon, P. Zanzonico, E. A. Fisher, Z. A. Fayad, W. J. Mulder, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3715.
- [113] T. B. Huff, M. N. Hansen, Y. Zhao, J. X. Cheng, A. Wei, *Langmuir* **2007**, *23*, 1596.
- [114] D. J. Javier, N. Nitin, M. Levy, A. Ellington, R. Richards-Kortum, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1309.
- [115] V. Dixit, J. Van den Bossche, D. M. Sherman, D. H. Thompson, R. P. Andres, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 603.
- [116] T. S. Hauck, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Small* **2008**, *4*, 153.
- [117] C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 897.
- [118] N. Pernodet, X. H. Fang, Y. Sun, A. Bakhtina, A. Ramakrishnan, J. Sokolov, A. Ulman, M. Rafailovich, *Small* **2006**, *2*, 766.
- [119] J. J. Li, L. Zou, D. Hartono, C. N. Ong, B. H. Bay, L. Y. L. Yung, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 138.
- [120] R. Bhattacharya, C. R. Patra, R. Verma, S. Kumar, P. R. Greipp, P. Mukherjee, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 711.
- [121] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jähnen-Dechent, *Small* **2007**, *3*, 1941.
- [122] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 145.
- [123] D. P. O'Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne, J. L. West, *Cancer Lett.* **2004**, *209*, 171.
- [124] H. F. Wang, T. B. Huff, D. A. Zweifel, W. He, P. S. Low, A. Wei, J. X. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15752.
- [125] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 343.
- [126] M. D. Massich, D. A. Giljohann, D. S. Seferos, L. E. Ludlow, C. M. Horvath, C. A. Mirkin, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1934.
- [127] S. Dhar, W. L. Daniel, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14652.