

Stark fluoreszierende halbleitende Polymerpunkte für Biologie und Medizin

*Changfeng Wu und Daniel T. Chiu**

Stichwörter:

Bildgebungsverfahren · Fluoreszenz ·
Halbleiter · Polymerpunkte ·
Sensoren



In den letzten Jahren haben halbleitende Polymernanopartikel beträchtliches Interesse geweckt, und zwar aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften als Fluoreszenzsonden. Diese Nanopartikel, die vorwiegend aus π -konjugierten Polymeren bestehen und Polymerpunkte (P-Punkte) genannt werden, wenn sie eine kleine Partikelgröße und eine hohe Helligkeit aufweisen, wurden für eine ganze Reihe verschiedener Anwendungen vorgestellt, darunter auch Fluoreszenzbildgebung und Biosensorik. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über kürzlich erzielte Ergebnisse hinsichtlich der photophysikalischen Eigenschaften von P-Punkten, die die Vorzüge dieser Substanzklasse als Fluoreszenzmarker unterstreichen. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Oberflächenfunktionalisierung und der biomolekularen Konjugation der P-Punkte sowie deren Anwendungen für die Zellmarkierung, In-vivo-Bildgebung, Einzelpartikelverfolgung, Biosensorik und den Wirkstofftransport.

1. Einführung

Die Entwicklung von Fluoreszenzbildgebungstechniken hat effiziente Verfahren zur Untersuchung vieler grundlegender Prozesse in den Lebenswissenschaften zur Verfügung gestellt.^[1,2] Außerdem wurden verschiedene auf Fluoreszenz basierende Assays zur Überwachung eines breiten Bereichs an biologischen Phänomenen entwickelt, z.B. Konformationsdynamik, Wechselwirkungen und die Verteilung von Biomolekülen in Organellen, Zellen oder Geweben.^[3,4] In jüngster Zeit haben hochentwickelte Varianten der Fluoreszenzbildgebung die Möglichkeit eröffnet, biomolekulare Wechselwirkungen auf der Einzelmolekülebene zu verfolgen^[5–7] und subzelluläre Strukturen mit einer räumlichen Auflösung im Nanometerbereich abzubilden.^[8–11] Diese Fortschritte haben Informationen über zelluläre Prozesse wie Genexpression, Proteintransport, Signalweiterleitung und Regulationswege mit bislang unerreichter Detailliertheit geliefert. In vielen Fällen erfordert die Fluoreszenzdetektion exogene Fluorophore, um ein Auslesen eines Signals zu ermöglichen oder den Bildkontrast zu erhöhen. Das Potenzial der Fluoreszenztechnik hängt ganz wesentlich von der Leistung des Fluorophors ab. Die Fluorophoreigenschaften, z.B. Fluoreszenzhelligkeit und Photostabilität, bestimmen weitestgehend die Nachweisgrenze, Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens.

Organische Farbstoffe scheinen die vielseitigsten Fluorophore zu sein, die in der biologischen Bildgebung und in Bioassays eingesetzt werden.^[12] Es steht eine breite Vielfalt an Farbstoffmolekülen, z.B. Fluoresceine, Rhodamine und Cyanine, für verschiedene Experimente zur Verfügung, und ihre optischen Eigenschaften können nach verschiedenen Strategien fein abgestimmt werden. Die intrinsischen Grenzen der herkömmlichen Farbstoffe, wie ein geringes Absorptionsvermögen und schlechte Photostabilität, bereiten jedoch große Schwierigkeiten bei der weiteren Entwicklung von hochempfindlichen Bildgebungstechniken und Hochdurchsatz-Assays. Infolgedessen besteht ein beträchtliches Interesse an helleren und stabileren Fluoreszenzsonden. Zum

Beispiel zeigen Phycobili-Proteine eine höhere Fluoreszenzhelligkeit als kleine organische Fluorophore und genetisch kodierte Fluoreszenzproteine stellen leistungsfähige Werkzeuge zur Untersuchung zellulärer Prozesse dar.^[13–15] Es besteht auch ein großes Interesse an der Entwicklung von hell fluoreszierenden Nanopartikeln, darunter auch Halbleiter-Quantenpunkte (Q-Punkte) und farbstoffbeladene Nanopartikel. Insbesondere Q-Punkte sind eines der am besten verstandenen Gebiete der Nanotechnologie, die in den letzten zehn Jahren in der Biologie Fuß gefasst hat.^[16–18] Sie bieten breite Absorptionsbanden und – verglichen mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen – vielfarbige, enge und symmetrische Emissionen mit besserer Helligkeit und Photostabilität. Mit Fluoreszenzfarbstoffen beladene Polymer- oder Siliciumdioxidnanopartikel zeigen aufgrund einer großen Zahl an Fluorophoren pro Partikel sowie der schützenden Matrix ebenfalls eine höhere Helligkeit und bessere Photostabilität als molekulare Farbstoffe.^[19–21]

Eine vielversprechende Strategie zur Erzeugung von sehr hell fluoreszierenden Sonden basiert auf der Entwicklung von Nanopartikeln, die aus stark fluoreszierenden halbleitenden Polymeren bestehen. Die Entwicklung von fluoreszierenden halbleitenden Polymeren als aktives Material für Polymer-Leuchtdioden (Polymer-LEDs) macht kontinuierlich Fortschritte.^[22–25] Halbleitende Polymere wurden auch umfangreich als hochempfindliche chemische und biologische Sensoren eingesetzt.^[26–35] Halbleitende Polymernanopartikel wurden ursprünglich zur Herstellung dünner Schichten mit

Aus dem Inhalt

1. Einführung	3165
2. Polymerpunkte als Fluoreszenzsonden	3167
3. Eigenschaften und Leistungsfähigkeit	3169
4. Funktionalisierung und Biokonjugation	3175
5. Biologische Anwendungen	3178
6. Aktuelle Herausforderungen und Trends	3186
7. Zusammenfassung und Ausblick	3187

[*] Prof. D. T. Chiu
Department of Chemistry, University of Washington
Seattle, WA 98195 (USA)
E-Mail: chiu@chem.washington.edu
Prof. C. Wu
State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics
College of Electronic Science and Engineering
Jilin University, Changchun, Jilin 130012 (China)

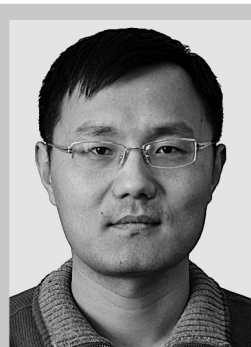
nanoskaligen Domänen für optoelektronische Bauteile entwickelt.^[36–39] Diese fluoreszierenden Nanomaterialien haben kürzlich viel Aufmerksamkeit sowohl für optoelektronische als auch biologische Anwendungen auf sich gezogen.^[40–44] Insbesondere bei biologischen Anwendungen können aus halbleitenden Polymeren bestehende Nanopartikel in vielen verschiedenen Formen mit wichtigen funktionellen Auswirkungen vorhanden sein. Zum Beispiel können halbleitende Polymernanopartikel aus hydrophoben halbleitenden Polymeren^[45–80] oder aus Polyelektrolyten oder hydrophilen Polymeren,^[81–88] als selbstorganisierte Nanopartikel aus amphiphilen Polymeren,^[89–93] als hydrophobe halbleitende polymerbeladene Poly(D,L-lactid-co-glycolid)(PLGA)-Partikel,^[94–97] als in Phospholipid verkapselte oder PEG-beschichtete hydrophobe Polymernanopartikel^[98–102] und als halbleitende polymerbeschichtete anorganische Nanopartikel hergestellt werden.^[103–105] Bei diesen Nanopartikeln hängen die Fluoreszenzeigenschaften, kolloidale Stabilität und funktionelle Leistung eng von Partikelgröße, Zusammensetzung, innerer Struktur und den Oberflächeneigenschaften ab.

Um unsere Diskussionen verständlicher zu machen, definieren wir „Polymernanopartikel“ gemäß der Beschreibung in einem früheren Aufsatz.^[40] Ein Polymernanopartikel wird als eine nanometergroße Einheit (typische Partikelgröße < 100 nm) betrachtet, die eine separate diskontinuierliche Phase darstellt, die von einem kontinuierlichen freifließenden Medium (üblicherweise einer Flüssigkeit mit geringem Molekulargewicht, meistens Wasser) umgeben ist. Basierend auf der klassischen Kategorisierung in der Kolloidchemie, schließt diese Definition echte Lösungen von Makromolekülen in einem Lösungsmittel mit geringem Molekulargewicht aus,^[40] obwohl hyperverzweigte Polymermoleküle in einem guten Lösungsmittel eine dreidimensionale Morphologie einnehmen können. Die meisten kolloidalen Polymernanopartikel bestehen aus einem lyophoben Polymerinneren, aber Polyelektrolyte können ebenfalls zur Bildung von Nanopartikeln gezwungen werden. Die Definition von Polymernanopartikeln unterscheidet diese auch von solchen, die direkt auf einem Substrat gezüchtet oder in einer Polymermatrix dispergiert wurden, sowie von anderen hoch dispersen Kompositmaterialien, die halbleitende Polymere enthalten.^[40]

Für die meisten biologischen Anwendungen sind kleine fluoreszierende Nanopartikel besonders attraktiv, wie sich an den enormen Anstrengungen ablesen lässt, die in den letzten zehn Jahren in halbleitende Q-Punkte investiert wurden, wobei die Bezeichnung „Punkt“ die ursprüngliche Beschrei-

bung ihrer geringen Partikelgröße widerspiegelt.^[16–18] Seitdem wurden verschiedene fluoreszierende Punkte für biologische Anwendungen entwickelt, einschließlich Siliciumpunkten,^[106,107] Kohlenstoffpunkten^[108,109] und farbstoffdotierten Siliciumdioxidpunkten.^[20] Um mit diesen kleinen Punkten konsistent zu sein, bezieht sich der Ausdruck „P-Punkt“ spezifisch auf eine kleine Untergruppe von halbleitenden Polymernanopartikeln, die eine mit Q-Punkten vergleichbare Partikelgröße (< 20–30 nm für verkapselte Q-Punkte^[110]) aufweisen. In vielen Fällen können in die P-Punkte nichtfluoreszierende Moleküle für eine Oberflächenmodifizierung oder eine multimodale Bildgebung eingebaut sein. Die fluoreszierenden halbleitenden Polymere sollten jedoch die Hauptkomponente der P-Punkte darstellen; intuitiv sollten P-Punkte daher einen Volumenanteil oder eine Gewichtskonzentration von mindestens 50 % und vorzugsweise mehr als 80–90 % halbleitender Polymere umfassen. Der Volumenanteil bestimmt weitestgehend die Fluoreszenzhelligkeit eines P-Punkts mit einer gegebenen Partikelgröße. Diese Anforderung dient zur Unterscheidung der P-Punkte von farbstoffbeladenen Latexkugeln oder anderen Nanopartikeln, die nur einen kleinen Anteil halbleitender Polymere enthalten und denen daher die ausgezeichneten, den P-Punkten inhärenten optischen Eigenschaften fehlen. Zudem sollten P-Punkte ein hydrophobes Polymerinneres aufweisen, da hydrophile Spezies in den Partikeln quellen können, was die kolloidale Stabilität verringert, unspezifisches Markieren verursacht (über elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund von ionischen Gruppen) und die Packungsdichte der Fluorophore sowie die Fluoreszenzhelligkeit beeinträchtigt.^[65]

Die jüngste Forschung hat gezeigt, dass P-Punkte ausgezeichnete Eigenschaften als Fluoreszenzsonden bieten. Dazu gehören außerordentliche helle Fluoreszenz, eine hohe Emissionsrate, eine ausgezeichnete Photostabilität, kein Blinken und fehlende Toxizität.^[45–67] Insbesondere haben wir kürzlich eine systematische Charakterisierung der optischen Eigenschaften und Leistungen von P-Punkten als Zellmarker, insbesondere für Fluoreszenzbildgebung und Durchflusszytometrie, durchgeführt.^[56,58] Dabei haben wir festgestellt, dass die Einzelpartikel-Helligkeit und die Zellmarkierungshelligkeit von P-Punkten um mehr als eine Größenordnung höher sind als die von anorganischen Q-Punkten mit vergleichbaren Partikelgrößen.^[56,58] Außerdem haben wir mehrere einfache, aber doch leistungsstarke Ansätze zur Einführung von funktionellen Gruppen und der Steuerung der Oberflächenei-



Changfeng Wu promovierte 2008 in der Gruppe von Prof. Jason McNeill an der Clemson University. Dann arbeitete er als Postdoktorand bei Prof. Daniel T. Chiu an der University of Washington. Seit 2012 ist er an der Fakultät der Jilin University beschäftigt. Seine aktuelle Forschung beschäftigt sich mit der Entwicklung von fluoreszierenden Nanopartikeln sowie Spektroskopie- und Bildgebungstechniken für biologische Anwendungen.



Daniel T. Chiu hat derzeit die A. Bruce Montgomery Professur für Chemie inne und ist Professor für Bioengineering an der University of Washington. In seiner Forschungsarbeit befasst er sich mit der Entwicklung von neuen nanotechnologischen Verfahren und Nanomaterialien für biologische Prozesse auf der Einzelzell- und Einzelmolekülebene sowie mit der Anwendung dieser neuen Techniken auf wichtige biomedizinische Probleme.

enschaften von P-Punkten entwickelt, denn eine erfolgreiche Funktionalisierung ist eine Vorbedingung für einen Einsatz dieser neuen Nanosonden für Zellmarkierungen, In-vivo-Bildgebung und als vielseitige Biosensoren.^[56–67] Diese Entwicklungen haben einen Einstieg in die Nanobiotechnologie und Nanomedizin eröffnet und geben eine neue Richtung vor, die von den etablierten Bereichen der konjugierten Polymere für optoelektronische Bauteile und konjugierte Polyelektrolyt-Biosensoren abweicht. Die überlegenen Eigenschaften der P-Punkte gegenüber denen anderer Fluoreszenzsonden sind die Grundlage für ihr Potenzial in Biologie und Medizin als sehr helle In-vitro- und In-vivo-Sonden.

Der Schwerpunkt in dieser Übersicht liegt auf jüngsten Fortschritten und dem aktuellen Stand von Herstellung, Fluoreszenzeigenschaften, Biokonjugation und biologischen Anwendungen von P-Punkten, die wir als Nanopartikel definieren, die zu einem Volumen- oder Gewichtsanteil von mehr als 50 % aus hydrophoben halbleitenden Polymeren bestehen und einen Durchmesser von weniger als 20–30 nm aufweisen. Andere halbleitende, auf Polymeren basierende Nanopartikel werden, sofern von Bedeutung, ebenfalls berücksichtigt. In Abschnitt 2 stellen wir kurz die Geschichte der halbleitenden Polymere und fluoreszierenden Polymer-nanopartikel vor. Dann diskutieren wir die Fluoreszenzeigenschaften der P-Punkte und bewerten deren Leistung in bestimmten Schlüsselbereichen (Abschnitt 3). Da Biokonjugation einer der entscheidenden Schritte bei der Übertragung von P-Punkten auf biologische Anwendungen ist, werden in Abschnitt 4 jüngste Studien zur Herstellung von funktionalisierten P-Punkten und Biokonjugaten beschrieben. Abschnitt 5 stellt eine Reihe neuer Entwicklungen bei der Verwendung von funktionalisierten P-Punkten bei der zellulären Bildgebung, In-vivo-Bildgebung, der Einzelpartikelverfolgung, bei Biosensoren und dem Wirkstofftransport vor. Schließlich betrachten wir die Perspektiven bei der Entwicklung von P-Punkten sowie einige Herausforderungen, die in Forschungsarbeiten noch behandelt werden müssen. Diese Fragen sollen weitere Untersuchungen zur Entwicklung von vielseitigen P-Punkt-Sonden inspirieren und zu neuen Entdeckungen führen.

2. Polymerpunkte als Fluoreszenzsonden

2.1. Halbleitende Polymere

Um die allgemeinen Eigenschaften entsprechender Nanopartikel und insbesondere der P-Punkte zu verstehen, ist eine kurze Beschreibung der halbleitenden Polymere erforderlich. Die meisten organischen Polymere sind Isolatoren. Weisen sie jedoch π -konjugierte Strukturen auf, können Elektronen sich durch eine Überlappung der π -Elektronenwolken über Springen, Tunneln und ähnliche Mechanismen entlang der Polymerhauptkette bewegen. Im Allgemeinen sind diese π -konjugierten Polymere in ihren ursprünglichen Zuständen Halbleiter mit breiter Bandlücke, die so genannten halbleitenden Polymere. In den 1970ern wurde entdeckt, dass konjugierte organische Polymere und Oligomere durch starkes Dotieren metallisch werden können.^[111,112] Der Be-

griff des Dotierens leitet sich aus der anorganischen Halbleiterchemie ab. Beim Dotieren eines konjugierten Polymers handelt es sich jedoch entweder um eine Oxidation oder Reduktion des π -Elektronensystems, was p-Dotierung bzw. n-Dotierung genannt wird. Konjugierte Polymere erschienen besonders attraktiv, da man sich erhoffte, mit ihnen eine neue Generation von Polymermaterialien zu erhalten, welche die einstellbaren elektrischen und optischen Eigenschaften von Metallen oder Halbleitern aufweisen, dabei aber die attraktiven mechanischen Eigenschaften und Verarbeitungsvorteile der Polymere behalten sollten.^[113]

Im Allgemeinen zeigen halbleitende Polymere eine direkte Bandlücke, was zu einer effizienten (erlaubten) Absorption oder Emission an der Bandkante führt. In Abhängigkeit von der Polymerart kann ein halbleitendes Polymer eine starke Fluoreszenz zeigen, die mithilfe der Halbleiter-Bandtheorie beschrieben werden kann. Bei einer Photoanregung wird ein Elektron vom höchsten besetzten Energieband (dem π -Band) in das niedrigste unbesetzte Energieband (das π^* -Band) angeregt, was zur Bildung eines gebundenen Zustands (Exziton) eines angeregten Elektrons und Lochs im π -Band führt. Die Rekombination des angeregten Elektrons mit dem Loch führt zu einem Fluoreszenzphoton. Die Wellenlänge des absorbierten Lichts wird durch die Energie der π - π^* -Bandlücke bestimmt und kann durch Veränderung der molekularen Struktur des Polymers abgestimmt werden.

Es wurden halbleitende Polymere mit Emissionsfarben entwickelt, die den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums abdecken.^[114] Wichtige Beispiele für fluoreszierende halbleitende Polymere umfassen Polyfluorene (wie PDHF und PFO), Poly(phenylenethinylene) (PPE), Poly(phenylenvinylene) (wie MEH-PPV und CN-PPV), Fluoren-basierte Copolymere (wie PFPV, PFBT und PF-DBT5) sowie damit verwandte Derivate. Abbildung 1 zeigt die Strukturformeln und Akronyme dieser fluoreszierenden halbleitenden Polymere. In vielen Fällen können die photoerzeugten Elektron-Loch-Paare dissoziieren, um freie Ladungsträger zu bilden, die durch das System wandern. Die freien Ladungsträger können entweder unter Bildung von Triplets kombinieren oder durch andere strahlungslose Prozesse (für die Fluores-

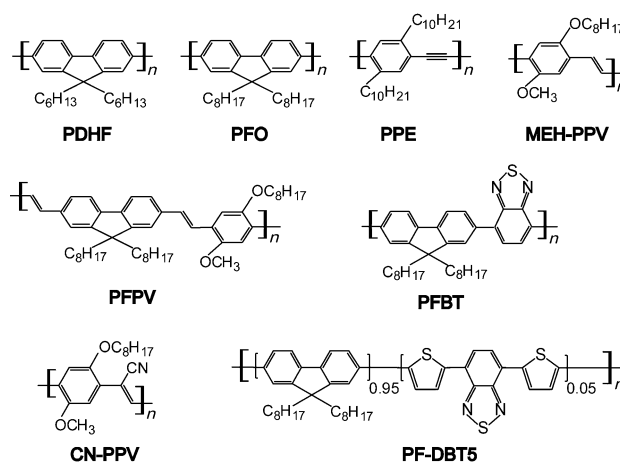


Abbildung 1. Strukturformeln stark fluoreszierender halbleitender Polymere.

zenz unerwünschte Prozesse) deaktiviert werden. Sie können auch gesammelt werden, um elektrischen Strom zu erzeugen (erwünschte Prozesse für die Photovoltaik). Die abstimmbaren elektrischen und optischen Eigenschaften sowie die vielseitigen chemischen Eigenschaften machen halbleitende Polymere zu einer faszinierenden Materialklasse für optoelektronische Bauteile. Es wurden zahlreiche Beispiele mit ihnen als aktive Materialien für eine ganze Reihe optoelektronischer Bauteile vorgestellt, darunter auch organische LEDs für Flachbildschirme,^[22–25] photovoltaische Bauteile für eine Sonnenenergieumwandlung^[115,116] sowie Dünnschichttransistoren.^[117–119]

2.2. Von konjugierten Polyelektrolyt-Biosensoren zu hydrophoben Polymerpunkten

Fluoreszierende konjugierte Polymere wurde außer in LEDs noch in einem breiten Bereich biologischer Anwendungen eingesetzt.^[26–35] Die Anwendungen konjugierter Polymere in Fluoreszenz-Biosensoren haben im vergangenen Jahrzehnt enorm zugenommen. 1999 berichteten Whitten und Mitarbeiter über eine effiziente Fluoreszenzlöschung eines konjugierten Polyelektrolyts mit Dimethylviologen.^[26] Die durch die Löschung bedingte hohe Empfindlichkeit wurde einer starken Assoziierung zwischen dem anionischen Polyelektrolyt und dem kationischen Löscher sowie einem effizienten Transport der Exzitonen zu den Löschorten zugeschrieben. Die Fluoreszenzlöschung wurde auf einen dominanten Elektronentransfermechanismus zurückgeführt, obwohl auch die analytinduzierte Polymeraggregation zu der Löschreaktion beigetragen haben könnte. Seitdem sind konjugierte Polyelektrolyte die erste Wahl unter den konjugierten Polymeren für Biosensoren. Die Signalverstärkung, die aus der effizienten Exzitonenwanderung in konjugierten Polymeren resultiert, wird genutzt, um neue Sensorsysteme mit einer einmaligen Empfindlichkeit zu erzeugen. Eine Übersicht über die Vorteile der konjugierten Polyelektrolyt-Biosensoren wurde bereits an anderer Stelle gegeben.^[31–35]

Zur gleichen Zeit bestand eine klare Motivation, stark fluoreszierende Nanopartikel zu entwickeln, da fluoreszierende Farbstoffe für viele hochentwickelte Bildgebungsverfahren und Hochdurchsatz-Assays nicht ausreichend hell und photostabil sind. Für die Herstellung von fluoreszierenden Nanopartikeln wurden eher hydrophobe konjugierte Polymere anstelle von konjugierten Polyelektrolyten gewählt, da 1) konjugierte Polyelektrolyte stark mit ionischen Seitenketten funktionalisiert sind, die eine beträchtliche nichtspezifische Markierung durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorrufen können, 2) Seitenkettenmodifizierungen mit ionischen Gruppen in konjugierten Polymeren verglichen mit ihren hydrophoben Gegenstücken die Fluoreszenz-Quantenausbeute gewöhnlich verringern, 3) die Synthese von konjugierten Polyelektrolyten im Allgemeinen komplizierte und aufwändige Modifizierungen der Polymerstruktur erfordern, während viele hydrophobe konjugierte Polymere mit einer Vielzahl von Emissionsfarben kommerziell erhältlich sind, und 4) konjugierte Polyelektrolyte wasserlöslich sind und in wässrigen Lösungen eine ausgedehnte stabähnliche

Struktur einnehmen; daher ist es aufgrund von Abstoßungs- und Solvationseffekte in einer wässrigen Umgebung problematisch, dicht gepackte Nanopartikel aus konjugierten Polyelektrolyten zu bilden.

Die Gruppe um McNeill hat als erstes die Bildung von hydrophoben Halbleiter-P-Punkten vorgestellt, die hervorragende Eigenschaften als vielversprechende Bildgebungs-sonden zeigen.^[45–55] In unserer jüngsten Arbeit haben wir die erfolgreiche Bildung von P-Punkt-Biokonjugaten vorgestellt und deren außergewöhnliche Helligkeit im Vergleich zu kommerziell erhältlichen farbstoffmarkierten Antikörpern und Q-Punkten mit vergleichbaren Partikelgrößen nachgewiesen.^[56–67,104] Zwar befinden sich diese halbleitenden Polymere als fluoreszierende Nanopartikel noch im Frühstadium der Entwicklung, sie haben aber bereits immenses Interesse geweckt.^[40–44] Es gab beachtliche Bemühungen, vielseitige halbleitende Polymernanopartikel (eine kleine Untergruppe davon sind die P-Punkte) zu erzeugen, ihre Eigenschaften und Funktionen einzustellen und deren Leistung für biomedizinische Untersuchungen zu verbessern. Die Forschungsbemühungen umfassen die Nutzung neuer Herstellungsverfahren,^[45,46,69,70,72] die Untersuchung von Nanopartikel-Bildungsmechanismen,^[120,121] Sondierung der Photophysik der Nanopartikel,^[47,49,54,122,123] Charakterisierung der Fluoreszenzleistung,^[48,51,56,58] Abstimmung der Emissionsfarbe,^[47,49,71,89] das Manipulieren der Partikeloberfläche,^[56–58,64–66,98,102] die Verkapselung von anorganischen Materialien,^[96,97,99,104,105] Entwicklung von Nanopartikelsensoren,^[52,59,60,62,74,77] die Bildung von zellulären Strukturen,^[56,57,63–66] sowie das In-vivo-„Targeting“ bei kleinen Tieren.^[58,72]

Kürzlich wurden konjugierte Polyelektrolyte auch für Fluoreszenzbildgebungsanwendungen genutzt.^[32–35] In einigen Fällen können konjugierte Polyelektrolyte aufgrund der polyvalenten elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen mit Biomolekülen selektiv zelluläre Ziele in vitro markieren oder in vivo verschiedene Proteinaggregate eindeutig einfärben.^[124–126] Konjugierte Polyelektrolyte mit hypervverzweigten Strukturen können so synthetisiert werden, dass sie in Wasser löslich sind.^[127–129] Amphiphile konjugierte Polymere und Oligomere können sich auch selbst zu sphärischen Partikeln oder Micellstrukturen ausordnen, die abstimmbare optische Eigenschaften zeigen^[89–91] und als Bildgebungs-sonden und Transportvektoren dienen.^[92,93] Darüber hinaus können herkömmliche lineare konjugierte Polyelektrolyte oder hydrophile halbleitende Polymere, die stark mit hydrophilen Gruppen funktionalisiert sind, in Gegenwart von Salzen, Säuren oder entgegengesetzt geladenen Spezies ebenfalls in Nanopartikel umgewandelt werden.^[81–88] Es ist jedoch hervorzuheben, dass diese auf Polyelektrolyten oder stark funktionalisierten konjugierten Polymeren basierenden Nanopartikelstrukturen sich von P-Punkten unterscheiden, die hauptsächlich aus dichtgepackten hydrophoben Polymeren bestehen. Zwar gibt es einige Übersichten, welche teilweise die Herstellung und Eigenschaften von halbleitenden Polymernanopartikeln abdecken,^[35,40–44] eine umfassende und aktuelle Übersicht über P-Punkte als fluoreszierende Sonden und deren biologische Anwendung fehlt jedoch noch. Dieser Aufsatz legt den Schwerpunkt auf kleine P-Punkte (<20–

30 nm) mit einem hohen Volumenanteil (> 50 %) an hydrophobem konjugiertem Polymer. Die geringe Partikelgröße, der hohe Volumenanteil an halbleitendem Polymer sowie eine dicht gepackte Fluorophorstruktur sind Schlüsselfaktoren für die Entwicklung einer neuen Generation heller Bildgebungs sonden und empfindlicher nanopartikelbasierender Sensoren.

2.3. Herstellungsverfahren

Herstellungsverfahren für verschiedene konjugierte Polymernanopartikel wurden bereits in einer früheren Übersicht detailliert beschrieben.^[40] Kurz gesagt, können konjugierte Polymernanopartikel direkt aus Monomeren mit niedrigem Molekulargewicht zu Nanopartikeln synthetisiert werden (direkte Polymerisation) oder aus bereits synthetisierten Polymeren mit hohem Molekulargewicht hergestellt werden (Post-Polymerisation). Der direkte Polymerisationsansatz geht zurück bis in die 1980er; damals wurden mehrere Nanopartikelsysteme aus leitfähigen Polymeren vorgestellt.^[130,131] Erst kürzlich wurde dieser Ansatz auf fluoreszierende halbleitende Polymere ausgeweitet, um daraus Nanopartikel herzustellen.^[69–71,132] Anders als leitfähige Polymere, die durch oxidative Polymerisation in wässrigen Medien hergestellt werden können, werden fluoreszierende halbleitende Polymere häufig durch übergangsmetallkatalysierte Kupplungen synthetisiert. Die Reaktionen müssen mit den im direkten Polymerisationsverfahren verwendeten Dispersionslösungsmitteln kompatibel sein. Im Unterschied dazu kann der Post-Polymerisationsansatz auf die immense Bibliothek von kommerziell erhältlichen halbleitenden Polymeren zurückgreifen und erfordert keinerlei Ausstattung und Fachwissen zur organischen und Polymersynthese. Bisher wurden fluoreszierende halbleitende Polymernanopartikel meistens mithilfe des letzten Ansatzes hergestellt.

Typische Verfahren für den Post-Polymerisationsansatz umfassen die Miniemulsion und Wiederausfällungstechniken, bei denen gewöhnlich halbleitende Polymere in einem organischen Lösungsmittel als Ausgangslösung verwendet werden. Für Nanopartikel, die für biologische Anwendungen gedacht sind, ist Wasser als endgültiges Dispersionsmedium bevorzugt. Beim Miniemulsionsverfahren können halbleitende Polymernanopartikel aus der emulgierten Tropfenlösung gebildet werden, was im Allgemeinen ein mit Wasser nicht mischbares Lösungsmittel erfordert. Beim Wiederausfällungsverfahren wird das Polymer durch rasches Mischen der Polymerlösung mit Wasser ausgefällt, was ein mit Wasser mischbares Lösungsmittel erfordert.

Landfester und Mitarbeiter haben als Erste fluoreszierende halbleitende Polymernanokügelchen unter Verwendung des Miniemulsionsverfahrens erhalten, die dann zur Herstellung von nanoskaligen Mehrphasendünnschichten für Photovoltaik-Bauteilen und LEDs verwendet wurden.^[36–38] Bei einer typischen Herstellung über Miniemulsion wurde eine Lösung eines halbleitenden Polymers in einem organischen Lösungsmittel wie Chloroform in Wasser emulgiert, um stabile Tropfen zu bilden. Außerdem war ein Tensid (z.B. Natriumdodecylsulfat) im Wasser vorhanden. Nach dem

Verdampfen des organischen Lösungsmittels wurde eine stabile Dispersion der Polymernanopartikel in Wasser erhalten. Das Wiederausfällungsverfahren wurde als erstes von Masuhara und Mitarbeitern genutzt, um Polythiophenpartikel mit Durchmessern von 40–400 nm herzustellen,^[39] und wurde später von McNeill und Mitarbeitern zur Herstellung von P-Punkten modifiziert.^[45–54] Beim Wiederausfällungsverfahren wurde eine verdünnte Polymerlösung in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel rasch in Wasser injiziert und vermischt. Der plötzliche Abfall der Löslichkeit in Kombination mit den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten oder Segmenten der einzelnen Ketten führte zu einer Suspension aus stark fluoreszierenden P-Punkten.

3. Eigenschaften und Leistungsfähigkeit

3.1. Partikelgröße und Morphologie

Das Miniemulsionsverfahren erzeugt durch Variieren von Polymer- und Tensidkonzentrationen in der Lösungsmittelmischung typischerweise konjugierte Polymerpartikel mit einem Durchmesser von 40 nm bis 500 nm.^[38] Abbildung 2 A

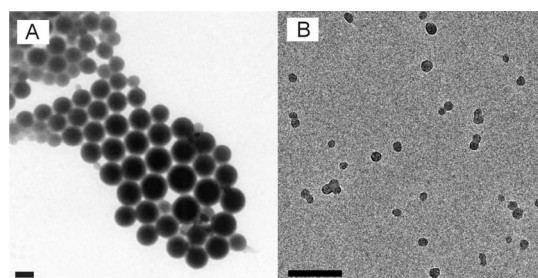


Abbildung 2. Partikelgrößen von mittels verschiedener Methoden hergestellten Nanopartikel aus halbleitenden Polymeren. A) TEM-Aufnahme von Nanopartikeln eines leitfähigen Poly(*p*-phenylen)-Polymers, das nach der Miniemulsionsmethode hergestellt wurde. Wiedergabe nach Lit. [36] mit freundlicher Genehmigung. B) TEM-Aufnahme von P-Punkten aus PFBT-Polymer, hergestellt nach dem Wiederausfällungsverfahren. Maßstab in (A) und (B): 100 nm. Wiedergabe nach Lit. [51] mit freundlicher Genehmigung.

zeigt eine typische Transmissionselektronenmikroskopie-(TEM)-Aufnahme von Nanopartikeln, die nach dem Miniemulsionsverfahren aus einem leitfähigen Poly(*p*-phenylen)-Polymer hergestellt wurden.^[36] In einem besonderen Fall wurden ca. 13 nm große Nanopartikel eines PPV-Derivats durch eine Miniemulsionstechnik unter Verwendung von stark verdünnten Polymerlösungen in Dichlormethan zusammen mit einem großen Überschuss an Poly(ethylenglycol) (PEG) als nichtionischem Tropfenstabilisator hergestellt (halbleitendes Polymer/PEG: ca. 0.57 Gew.-%).^[100] Erst vor kurzem wurden mehrere Arten von kleinen Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 2 bis 5 nm unter Verwendung eines ähnlichen Herstellungsverfahrens und ähnlicher Vorstufenlösungen erhalten.^[101] Die Vorgehensweise und Parameter müssen jedoch noch weiter optimiert werden,

da die Ausbeute dieses Verfahrens recht gering zu sein scheint.

Das Miniemulsionsverfahren wurde auch verwendet, um aus halbleitendem Polymer bestehende Partikel herzustellen. In einigen Untersuchungen wurden durch die Miniemulsionstechnik mit halbleitenden Polymeren beladene PLGA-Partikel hergestellt (halbleitendes Polymer/PLGA: ca. 1 Gew.-%),^[94,95] allerdings waren die Partikel etwa 250 nm groß und wiesen eine relativ geringe Fluorophorkonzentration auf (ca. 1 Gew.-%). Bei einem vergleichbaren Herstellungsverfahren über Miniemulsion wurden halbleitende Polymere in einer Phospholipidmatrix verkapselt, um funktionalisierte Partikel mit ungefähr 100 nm Durchmesser und einer Fluorophorkonzentration von ca. 8,5 Gew.-% zu bilden.^[98] Des Weiteren kann das Miniemulsionsverfahren genutzt werden, um halbleitende polymerbasierte Kompositpartikel (> 100 nm) zu erzeugen, die aus anorganischen Materialien wie Eisenoxid und Metallnanopartikeln bestehen.^[96,97,99]

Mit dem Wiederausfällungsverfahren werden zuverlässig P-Punkte mit Durchmessern von 5 bis 30 nm erzeugt, während der Miniemulsionsansatz üblicherweise Partikel mit 40 bis 500 nm ergibt.^[45–54,56–58,63–66] Da bei der Bildung von Nanopartikeln im Wiederausfällungsprozess die Interketten-Aggregation und der Intraketten-Kollaps miteinander konkurrieren, kann die Partikelgröße durch Anpassen der Polymerkonzentration in der Vorstufenlösung variiert werden.^[46,51] Abbildung 2B zeigt eine typische TEM-Aufnahme von P-Punkten aus PFBT, die nach diesem Wiederausfällungsverfahren hergestellt wurden.^[57] Etwas überraschend findet sich eine Kugelform, bedenkt man die starre Hauptkette des π -konjugierten Polymers.^[133] In diesem Größenbereich dominiert jedoch womöglich die große Grenzflächenspannung zwischen dem Polymer und Wasser, sodass die thermodynamisch begünstigte Kugelform resultiert.^[134,135] Aufgrund der starken hydrophoben Wechselwirkungen und der großen Oberflächenspannung weisen aus hydrophoben halbleitenden Polymeren bestehende P-Punkte typischerweise innere Strukturen aus dicht gepackten Chromophoren auf, was sich in dem hocheffizienten Energietransfer innerhalb der Nanopartikel zeigt.^[43,47,49,52,58–61,65,66] Die Phasenstruktur der P-Punkte ist typischerweise amorph (glasartige Phase); die kristalline Phase kann bei bestimmten Polymeren, z. B. PFO, partiell in der Glasmatrix gebildet werden.^[50]

Konjugierte Polyelektrolyte und hydrophile halbleitende Polymere können mithilfe von Salzen, Säuren oder entgegengesetzt geladenen Spezies als Partikel ausgefällt werden.^[81–85,87] Die Fällung eines PPE-Polymers mit hydrophilen Amin- und PEG-Gruppen aus einer DMSO-Lösung in Salze enthaltendem Wasser führte zur Bildung von Partikeln mit Durchmessern um 500 nm.^[81] Mit ähnlichen hydrophilen Polymeren wurden kleinere Partikel mit Durchmessern von 10 nm bis 100 nm durch ein Lösungsmittelaustausch-Verfahren hergestellt, das eine sequenzielle Ultrafiltration von mit Essigsäure behandelten Polymeren umfasste.^[82–85] Im Unterschied zu den hydrophoben P-Punkten mit dicht gepackten Chromophor-Strukturen, bestehen die auf Polyelektrolyt basierenden Nanopartikel aufgrund ihrer hydrophilen Natur aus lose aggregierten Polymerketten.^[32,85] Konjugierte Polyelek-

trolyte können jedoch mit hyperververzweigten Strukturen synthetisiert werden und dann in Wasser eine dreidimensionale Morphologie bilden.^[127–129] In diesen Strukturen werden die Partikelgrößen im Wesentlichen durch die Segmentflexibilität und Generationszahl bestimmt, sodass über die Polymersynthese eine einheitliche Partikelgröße eingestellt werden kann. Zudem können amphiphile Polymere und Oligomere sphärische Aggregate mit Partikelgrößen im Bereich von zehn bis mehreren hundert Nanometern bilden.^[89,90,92,93] Diese Aggregate können Micellstrukturen^[90] oder Vesikel aufweisen,^[136] aber die innere Struktur der Partikel ist aus den berichteten Daten nicht eindeutig ersichtlich.^[89,92,93]

Die physikalische Größe einer Nanopartikelsonde hängt eng mit ihrer Leistungsfähigkeit in biologischen Anwendungen zusammen. Zwar gibt es durchaus biologische Anwendungen, für die sich auch große Partikel eignen, aber die meisten Anwendungen in Bildgebung und Bioassays erfordern kleine Nanopartikelmarker. Zum Beispiel kann die Größe von großen fluoreszierenden Nanopartikeln zu einer sterischen Hinderung führen, welche die Funktion der anhaftenden Biomoleküle stört, z. B. die Zielfindungsgenauigkeit und die Bindungsaffinität. In Anwendungen, an denen dynamische Prozesse beteiligt sind, können große Nanopartikel den Austausch von anhaftenden Biomolekülen signifikant stören und den Zugang zu beengten zellulären Orten behindern. Um dem entgegenzuwirken, wurde die Entwicklung von kleinen und kompakten Nanopartikelsonden umfassend erforscht.^[137,138] Was die Fluoreszenzhelligkeit pro Partikel angeht, so richtet sich die Zahl an Fluorophoren in einem Partikel nach dem Partikelvolumen bei einer gegebenen Chromophor-Packungsdichte. Die Partikelgröße bestimmt zusammen mit der Fluorophor-Packungsdichte den Absorptionsquerschnitt der fluoreszierenden Polymerpartikel. In dieser Hinsicht sind hydrophobe P-Punkte deutlich im Vorteil, da sie dicht gepackte Chromophorstrukturen aufweisen.

3.2. Absorption und Fluoreszenz

Die optischen Eigenschaften der P-Punkte wurden systematisch charakterisiert und auf ihren Nutzen als Fluoreszenzmarker hin bewertet.^[45,46,48,51,56,58,59,65,66] Durch Wiederausfällungsverfahren hergestellte P-Punkte zeigen im Vergleich mit dem Polymer in einer THF-Lösung gewöhnlich verbreiterte und blauverschobene Absorptionsspektren.^[46] Dies stimmt mit einer Abnahme der Konjugationslänge aufgrund von Biegen, Verdrehung und Abknicken der Polymerhauptkette überein. In Abhängigkeit von dem Polymer zeigen P-Punkte breite Absorptionsbanden im Bereich von 350 nm bis 600 nm (Abbildung 3B), was für die Fluoreszenzmikroskopie und Laseranregung ein günstiger Wellenlängenbereich ist. Die Lichtsammelfähigkeit eines fluoreszierenden Partikels bei einer gegebenen Wellenlänge wird durch den Absorptionsquerschnitt beschrieben, der aus dem Absorptionsspektrum bestimmt werden kann. Eine Analyse der UV/Vis-Absorptionsspektren bei bekannten P-Punkt-Konzentrationen ergab, dass der maximale Absorptionsquerschnitt einzelner Partikel (ca. 15 nm Durchmesser) im

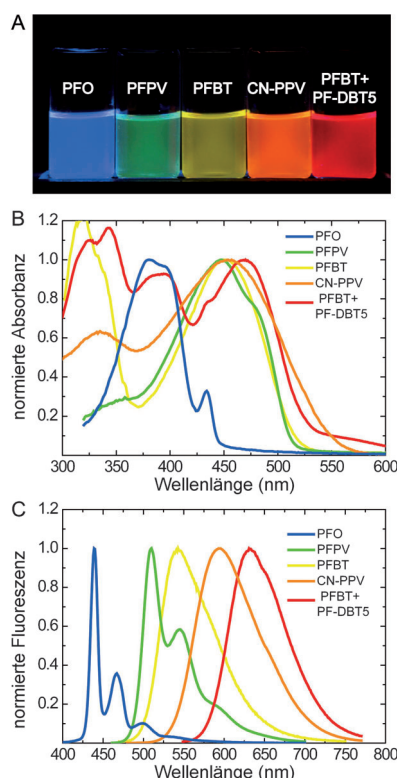


Abbildung 3. Fluoreszenzspektren von P-Punkten. A) Eine Photographie wässriger P-Punkt-Suspensionen unter UV-Beleuchtung. B) und C) Absorptions- bzw. Emissionsspektren. Wiedergabe der Spektren der P-Punkte aus PFO, PFPV und PFBT mit freundlicher Genehmigung nach Lit. [51]. Wiedergabe der Spektren der CN-PPV-P-Punkte mit freundlicher Genehmigung nach Lit. [63]. Wiedergabe der Spektren der P-Punkte aus der Polymermischung (PFBT + PF-DBT5) mit freundlicher Genehmigung von Lit. [58].

sichtbaren und Nahultraviolettbereich in einer Größenordnung von 10^{-13} cm^2 lag und somit rund zehn- bis hundertmal größer war als der von CdSe-Q-Punkten; ihre Helligkeit war um rund drei Größenordnungen höher als die von typischen organischen Fluoreszenzfarbstoffen.^[51,56,58]

Aus verschiedenen hydrophoben Polymeren hergestellte P-Punkte zeigten im sichtbaren Bereich mehrfarbige Emissionen (Abbildung 3). Meistens zeigten die P-Punkte eine im Vergleich zum Polymer in einem organischen Lösungsmittel geringfügig rot verschobene Fluoreszenz. Dies wurde einer Zunahme von durch einen Kettenzusammenbruch verursachten Wechselwirkungen zwischen den Ketten zugeschrieben, die einen Anteil an aggregierten Spezies erzeugten.^[46] Die resultierende energetische Störung erzeugte zusammen mit einem multiplen Energietransfer im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum des Polymers in THF-Lösung eine Netto-Rotverschiebung, wie das für dünne Schichten oft beobachtet worden ist.^[139] Die Fluoreszenz-Quantenausbeute ist definiert als Verhältnis der Zahl emittierter Photonen zur Zahl absorbierter Photonen und beschreibt den Wirkungsgrad einer Fluoreszenzsonde. Je nach Polymer zeigten die P-Punkt-Spezies in frühen Berichten mäßige Quantenausbeuten von 1 % bis 20 %.^[46] Unsere Gruppe hat kürzlich über mehrere neue Varianten von P-Punkten berichtet, die eine

hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute im Bereich von 50–60 % aufwiesen,^[58,63] was mit der von anorganischen Q-Punkten vergleichbar ist.

Um P-Punkte in Zwei-Photonen-Fluoreszenzanwendungen zu nutzen, haben McNeill und Mitarbeiter als erste darüber berichtet, dass P-Punkte Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitte mit bis zu $2.0 \times 10^5 \text{ GM}$ zeigten, was den bislang größten für Nanopartikel mit Durchmessern um 20 nm berichteten Wert darstellt (Abbildung 4D).^[48] Die Werte für

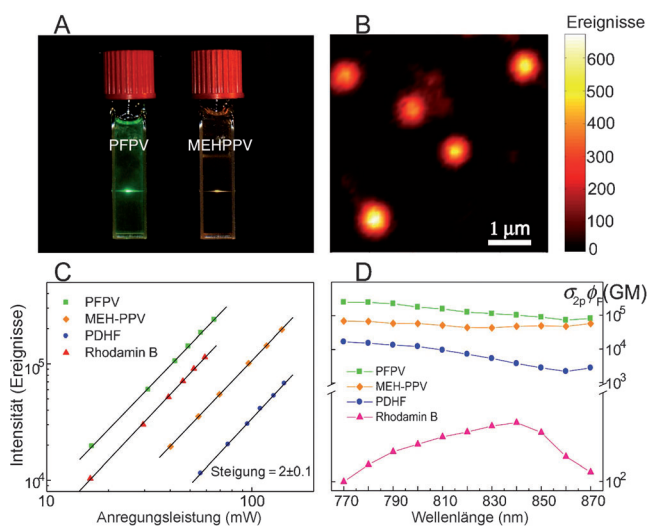


Abbildung 4. Fluoreszenz von P-Punkten nach Zwei-Photonen-Anregung. A) Photographie von wässrigen P-Punkt-Suspensionen, die mit einem modengekoppelten Ti:Saphir-Laser bei 800 nm angeregt wurden. B) Einzelpartikel-Aufnahme von PFPV-Punkten mit Zwei-Photonen-Anregung. C) Doppellogarithmische Auftragung der Zwei-Photonen-Fluoreszenzintensitäten gegen die Anregungsleistung. D) Halb-logarithmische Auftragung der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitte (σ_{2p}) gegen die Anregungswellenlänge. Nachdruck nach Lit. [48] mit freundlicher Genehmigung.

den Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt sind um drei bis vier Größenordnungen höher als die Werte von herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen und um eine Größenordnung höher als die von anorganischen Quantenpunkten. In einer späteren Untersuchung stellten Moon et al. Nanopartikel mit ca. 8 nm Durchmesser durch Ultrafiltration von mit Weinsäure behandelten hydrophilen PPE-Derivaten her. Die Wissenschaftler bestimmten Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitte von 10^3 – 10^4 GM und stellten eine Zwei-Photonen-Bildgebung von Endothelzellen in einem Gewebemodell vor.^[84]

Erst kürzlich berichteten Mecking und Mitarbeiter über die Synthese von fluoreszierenden Nanopartikeln, die aus auf Poly(arylenethinyl)en basierenden Polymeren durch ein direktes Polymerisationsverfahren unter Beteiligung einer Sonogashira-Kupplung in einer wässrigen Miniemulsion hergestellt wurden.^[71] Die Nanopartikel wiesen Größen von 60–120 nm auf. Die bestimmten Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitte lagen im Bereich von 10^6 bis 10^7 GM , in guter Übereinstimmung mit den Werten der P-Punkte nach Berücksichtigung des Partikelvolumens. Diese Untersuchungen

Tabelle 1: Photophysikalische Eigenschaften von PFBT-P-Punkten, IgG-Alexa 488 und Qdot 565.^[a]

Sonde (Größe)	PFBT-Punkt (ca. 10 nm)	Alexa 488 ^[b,c] (ca. 1 nm)	Qdot 565 ^[b] (ca. 15 nm)
Maximum der Absorption/Fluoreszenz	460 nm/540 nm	496 nm/519 nm	UV/565 nm
Extinktionskoeffizient bei 488 nm	$1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$5.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$2.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Quantenausbeute	0.3	0.9	0.3–0.5
Fluoreszenzlebensdauer	0.6 ns	4.2 ns	ca. 20 ns

[a] Wiedergabe nach Lit. [56] mit freundlicher Genehmigung. [b] Die Daten für Alexa 488 und Qdot 565 entsprechen den von Invitrogen bereitgestellten Spezifikationen. [c] Die Parameter für Alexa 488 gelten für ein einzelnes Farbstoffmolekül. Eine IgG-Alexa-488-Sonde hat einen hydrodynamischen Durchmesser von 12 nm und umfasst im Mittel 6 Farbstoffmoleküle, ihre Helligkeit entspricht aufgrund von Selbstlöschung jedoch etwa 2–4 Farbstoffmolekülen.

bestätigen durchweg das Potential von P-Punkten für Multiphotonenfluoreszenz-Bildgebungsanwendungen.

Eine nützliche Abschätzung der Fluoreszenzhelligkeit ist durch das Produkt aus dem maximalen Absorptionsquerschnitt und der Fluoreszenz-Quantenausbeute gegeben. Tabelle 1 fasst die photophysikalischen Eigenschaften der am besten untersuchten PFBT-P-Punkte sowie die Eigenschaften von zwei üblicherweise verwendeten, von Invitrogen erworbenen Sonden zusammen (Qdot 565 und fluoreszierendes IgG-Alexa 488 mit etwa 6 Farbstoffmolekülen pro Immunglobulin G (IgG)).^[56] Die photophysikalischen Daten deuten darauf hin, dass PFBT-P-Punkte mit ca. 10 nm Durchmesser bei einer typischen Laseranregung mit 488 nm etwa 30-mal heller sind als die IgG-Alexa-488- und Qdot-565-Sonden. Der Absorptionsquerschnitt der PFBT-P-Punkte bei 488 nm ist etwa halb so groß wie der maximale Absorptionsquerschnitt bei 450 nm. Wir führten einen direkten Vergleich durch, um die Helligkeit der drei Sonden in der Einzelpartikelbildgebung experimentell zu bewerten.^[56] Mit einer relativ geringen Anregungsleistung aus einem 488-nm-Laser wurden für einzelne PFBT-P-Punkte deutlich sehr helle, annähernd beugungsbegrenzte Punkte beobachtet; die IgG-Alexa-488- und Q-Punkte zeigten sehr viel geringere Intensitäten und wurden bei gleicher Anregung und gleichen Nachweisbedingungen von der Kamera kaum erfasst. Fluoreszenzintensitätsverteilungen von mehreren tausend Partikeln zeigten, dass die PFBT-P-Punkte ca. 30-mal heller als IgG-Alexa 488 und Qdot 565 waren (Abbildung 5A), was mit dem auf den photophysikalischen Parametern basierenden Helligkeitsvergleich übereinstimmt. In einem ähnlichen Einzelpartikel-Helligkeitsvergleich (Abbildung 5B)^[58] stellten wir fest, dass gemischte P-Punkte (PB-Punkte) aus PFBT und dem rot emittierenden Polymer PF-DBT5 ungefähr 15-mal heller als ein bei 655 nm emittierender Q-Punkt waren. In einem separaten Vergleich sind PFBT-P-Punkte (ca. 15 nm) um eine Größenordnung heller als farbstoffbeladene Polystyrolkugeln (ca. 20 nm).^[53] Basierend auf diesen

Vergleichen sind P-Punkte unter den fluoreszierenden Nanopartikeln mit ähnlicher Größe wohl am hellsten.

3.3. Fluoreszenzlebensdauer, Emissionsrate und Photostabilität

In Abhängigkeit von dem Polymer variiert die Fluoreszenzlebensdauer von P-Punkten im Allgemeinen zwischen 100 ps und 1 ns, was durch zeitkorreliertes Einzelphotonen-zählen (TCSPC, time-correlated single photon counting; Abbildung 6A) bestimmt wurde. Die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, k_R , und die Geschwindigkeitskonstante für strahlungslose Prozesse, k_{NR} , können durch Kombination der Quantenausbeute [$\phi = k_R/(k_R + k_{NR})$] und der Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauer [$\tau = (k_R + k_{NR})^{-1}$] abgeschätzt werden. P-Punkte haben Fluoreszenz-Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von 10^8 bis 10^9 s^{-1} , was denen von typischen Fluoreszenzfarbstoffen ähnelt (etwa 10^8 s^{-1}), während einzelne Quantenpunkte Konstanten auf-

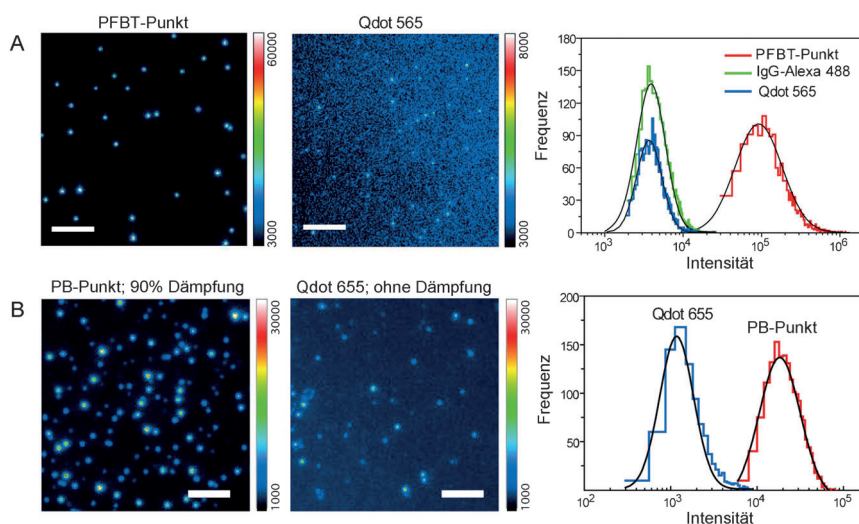


Abbildung 5. Vergleich der Einzelpartikel-Fluoreszenzhelligkeit. A) Einzelpartikel-Fluoreszenzaufnahmen von PFBT-P-Punkten und Qdot-565-Partikeln, die unter identischer Anregung bei 488 nm und identischen Detektionsbedingungen erhalten wurden. Maßstab: 5 μm . Das rechte Bild zeigt die aus den Einzelpartikel-Fluoreszenzdaten erhaltenen Intensitätsverteilungen. Wiedergabe nach Lit. [56] mit freundlicher Genehmigung. B) Einzelpartikel-Fluoreszenzaufnahmen von PB-Punkt und Qdot 655. Bei gleicher Anregung mit 488 nm wurde ein neutraler Dichtefilter mit einer optischen Dichte von 1 verwendet, um die Fluoreszenzaufnahmen der PB-Punkte zu erhalten, für Qdot 655 wurde jedoch keine Dämpfung verwendet. Maßstab: 4 μm . Das rechte Bild zeigt die aus den Einzelpartikel-Fluoreszenzdaten erhaltenen Intensitätsverteilungen. Wiedergabe nach Lit. [58] mit freundlicher Genehmigung.

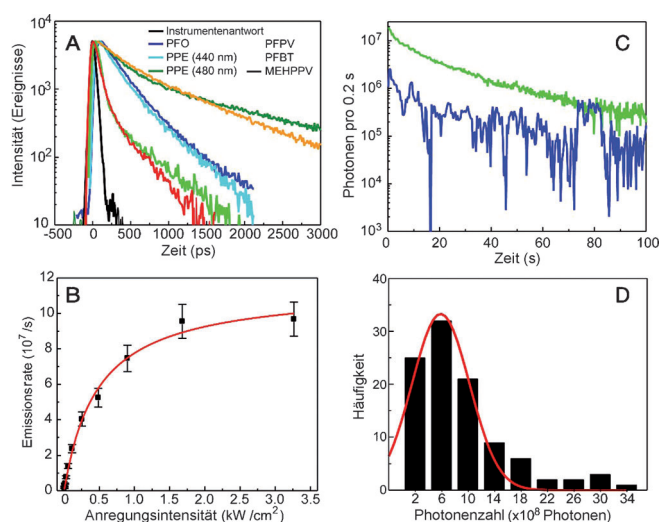


Abbildung 6. Fluoreszenzlebensdauer, Einzelpartikel-Sättigung und Photobleichungsuntersuchungen der P-Punkte. A) Fluoreszenzlebensdauer der P-Punkte, gemessen mit der TCSPC-Technik. B) Fluoreszenz-sättigung einzelner PFBT-P-Punkte mit zunehmender Anregungsintensität. C) Photobleichungskurven einzelner PFBT-P-Punkte. D) Histogramm der Photonenzahl einzelner PFBT-P-Punkte mit einem Durchmesser von etwa 10 nm. Wiedergabe nach Lit. [51] mit freundlicher Genehmigung.

weisen, die rund zwei Größenordnungen geringer sind.^[140] In Experimenten wird die tatsächliche Emissionsrate häufig durch Sättigung begrenzt. Dies gilt insbesondere für Experimente unter Verwendung hoher Anregungsintensitäten, wie Einzelmolekülbildgebung und Partikelverfolgung. Die Photonemissionsrate R hängt von der Laseranregungsintensität I ab, was gemäß der Sättigungsgleichung $R = R_s(I/I_s)(1 + I/I_s)^{-1}$ sehr gut durch zwei Parameter beschrieben wird: die maximale Emissionsrate R_s und die Sättigungsintensität I_s .^[141] Typische Fluoreszenzfarbstoffe zeigen aufgrund einer Triplett-Sättigung eine gesättigte Emissionsrate in der Größenordnung von 10^6 s^{-1} .^[142] Dieses Bild ist bei P-Punkten mit multiplen dicht gepackten Chromophoren komplexer. Wie in Abbildung 6B dargestellt, zeigte das Fluoreszenzsignal eines PFBT-P-Punkts ein Leistungssättigungsverhalten, aus dem die Sättigungsemissionsrate durch Anpassen der Sättigungsgleichung an die Daten erhalten wurde. Statistische Analysen von mehreren P-Punkten ergaben Sättigungsemissionsraten im Bereich von 10^7 bis 10^9 s^{-1} .^[51] Die mittlere Sättigungsemissionsrate war rund 100-mal höher als die von typischen molekularen Farbstoffen und um mindestens 3 Größenordnungen höher als die von kolloidalen Halbleiter-Quantenpunkten. Die hohe Emissionsrate von P-Punkten ist ein Vorteil für Hochgeschwindigkeitsanwendungen, z. B. Durchflusszytometrie und hochentwickelte dynamische Bildgebung.

Die Photostabilität eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Nanopartikels kann durch die Photobleichungs-Quantenausbeute (ϕ_B) charakterisiert werden. Dies ist die Zahl an Molekülen, die photogeleicht wurden, geteilt durch die Gesamtzahl der absorbierten Photonen über einen gegebenen Zeitraum. Typische Fluoreszenzfarbstoffe weisen Photoblei-

chungs-Quantenausbeuten im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-6} auf.^[143] Bei wässrigen P-Punkt-Suspensionen variiert die Photobleichungskinetik von einem Polymer zum nächsten erheblich.^[51] Je nach Polymer ergaben Abschätzungen der Photobleichungs-Quantenausbeute Werte in einem Bereich von 10^{-7} bis 10^{-10} , wobei die aus den Messungen der Photobleichungskinetik erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten verwendet wurden. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute geteilt durch die Photobleichungs-Quantenausbeute führt zur Gesamtzahl von Photonen, die ein Nanopartikel vor dem Photobleichen emittiert (Photonenzahl). Die Photonenzahl eines PFBT-P-Punkts mit 15 nm Durchmesser wurde auf 10^9 geschätzt, was rund 3–4 Größenordnungen mehr ist als bei typischen Fluoreszenzfarbstoffen.^[51,56]

Einzelpartikel-Photobleichungsuntersuchungen bieten mehr Informationen über die Photostabilität von P-Punkten (Abbildung 6C). Statistische Analysen von mehreren Photobleichungskurven deuteten auf ein Mittel von rund 6×10^8 Photonen hin, die pro Partikel mit 10 nm Durchmesser emittiert wurden, wobei einige Partikel mehr als 10^9 Photonen emittierten (Abbildung 6D). Diese Zahlen liegen um mehr als eine Größenordnung höher als die für einzelne Q-Punktpartikel, deren Gesamtphotonenzahl auf 10^7 pro Partikel emittierte Photonen bestimmt wurde.^[144] Die Photobleichungskurven konnten grob in zwei Typen unterteilt werden, wie durch die in Abbildung 6C dargestellten Kurven beispielhaft dargestellt. Wie die grüne Kurve andeutet, zeigten die meisten P-Punkte ein kontinuierliches Photobleichungsverhalten, ohne dass Fluoreszenz-Blinken beobachtet werden konnte, aber dunklere Partikel blinken häufig etwas (blaue Kurve). Diese Beobachtungen stimmen mit dem größenabhängigen Blinken überein, das bei anderen halbleitenden Polymeren beobachtet wurde.^[48,145] Die Fluoreszenz von kleineren (dunkleren) Partikeln fluktuiert aufgrund der kleinen Zahl emittierender Chromophore und der reversiblen An-Aus-Dynamik, die erhebliche Schwankungen im Anteil der Chromophore im „An-Zustand“ verursacht. Größere Partikel ($> 10 \text{ nm}$ Durchmesser) wiesen eine vergleichsweise stabile Fluoreszenz auf, da hier eine größere Zahl an Chromophoren zur Fluoreszenz beiträgt. Beim Einsatz dieser P-Punkte als Fluoreszenzsonden für die Bildgebung oder in Einzelmolekülexperimenten ist deren stabile Fluoreszenz im Vergleich zu der von herkömmlichen Farbstoffen und Quantenpunkten günstiger; letztere zeigen häufig in einem Zeitraum von Mikrosekunden bis mehrere Hundert Sekunden ein deutliches Blinken.^[146]

3.4. Kolloidale Stabilität und chemische Stabilität

Die Stabilität von Nanopartikeln für biologische Anwendungen lässt sich durch drei Aspekte beschreiben. Dies sind die Fragen, ob die Nanopartikel resistent gegen Aggregation, stabil gegen Dissoziation und Zersetzung und in Gegenwart von biologisch relevanten Ionen und reaktiven Spezies chemisch stabil sind.

Hinsichtlich des ersten Aspekts zeigen „nackte“ P-Punkte eine ausgezeichnete kolloidale Stabilität in deionisiertem Wasser über Monate ohne Anzeichen von Aggregation oder

Ausfällung. Der Mechanismus, über den diese intrinsisch hydrophoben Nanopartikel eine Aggregation in Wasser umgehen und eine gute kolloidale Stabilität zeigen, wurde jedoch nicht vollständig verstanden. Kee und Mitarbeiter schlugen vor, dass die Oxidation der halbleitenden Polymere während der P-Punkt-Bildung zu teilweise ionisierten Defekten führt, die ihrerseits die Nanopartikelsuspension stabilisieren.^[121] Zeta-Potential-Messungen zeigten, dass P-Punkte im neutralem pH-Bereich eine negativ geladene Oberfläche mit einem Zeta-Potential von etwa -40 mV und einer Oberflächenladungsdichte von $(1.39\text{--}1.70) \times 10^{-2} \text{ C m}^{-2}$ aufwiesen. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie, Röntgen-Photoelektronenspektroskopie und Elementaranalyse bestätigten das Vorhandensein von chemischen Defekten, die die P-Punkte hydrophil und so gut in Wasser dispergierbar machten.

Allerdings neigen „nackte“ P-Punkte in Lösungen, die entweder eine mäßige Ionenstärke aufweisen oder zweiwertige Metallionen enthalten, zu Aggregation.^[64] Wir haben gezeigt, dass Oberflächenmodifizierungen die kolloidale Stabilität von P-Punkten deutlich verbessern können.^[56,57,64–66] Zum Beispiel können P-Punkte mit Additiven wie Rinderserumalbumin (BSA) passiviert werden, die eine langfristige kolloidale Stabilität aufrechterhalten und in Markierungsexperimenten nichtspezifische Bindungen reduzieren.^[56] BSA-passivierte P-Punkte sind in einem physiologischen pH-Bereich von 4 bis 9 sowie in verschiedenen Puffern (HEPES, PBS, Tris und Boratpuffer) 6 Monate oder länger stabil.^[56,57,64–66] Erst vor kurzem berichtete unsere Gruppe über ein einfaches Verfahren zum Beschichten von hydrophoben P-Punkten mit einer Oberflächenschicht aus Polyelektrolyten.^[64] Die Polyelektrolytbeschichtung führt zu robusten und stabilen P-Punkten in Lösungen mit hoher Ionenstärke oder solchen, die mehrwertige Metallionen in hohen Konzentrationen enthalten.

Die Nanopartikelstabilität ist auch stark davon abhängig, ob die Nanopartikel über die Zeit leicht dissoziieren oder sich zersetzen. Da die P-Punkt-Bildung vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen getrieben wird, können hydrophile Seitenketten erhebliche Störungen der Assoziationsstärke zwischen verschiedenen Teilen der Polymerkette oder zwischen Polymerketten verursachen und so die Nanopartikelstabilität beeinflussen. Zum Beispiel wurden eher lose Aggregate anstelle von stabilen und kompakten Nanopartikeln gebildet, wenn Nanopartikel unter Verwendung von Polymeren mit stark funktionalisierten hydrophilen Seitenketten hergestellt wurden. Ihre Aggregationsneigung wurde durch viele Faktoren beeinflusst, z.B. durch Polymerkonzentration, Ionenstärke und Temperatur.^[85] Vor kurzem haben wir die Stabilität und innere Struktur von P-Punkten, die aus PFBT-Polymeren mit verschiedenen Dichten von hydrophilen Seitenkettengruppen hergestellt wurden, systematisch untersucht.^[65] Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die P-Punkt-Dissoziation mit zunehmender Dichte der hydrophilen Seitenketten beträchtlich erhöht. Polymere mit einer geringen Dichte hydrophiler Seitenketten bildeten stabile und kompakte P-Punkte, während die mit einer hohen Dichte hydrophiler Seitenketten dazu neigten, instabile und lockere Nanopartikel zu bilden.^[65]

Die Integrität von Nanopartikeln in biologischen Anwendungen hängt auch von deren chemischer Reaktivität gegenüber ionischen Spezies und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einer physiologischen Umgebung ab. Zum Beispiel zersetzen Kupferionen und ROS in physiologischen Konzentrationen Q-Punkte beträchtlich, was zu einem Verlust von Lumineszenz und der Freisetzung von toxischen Cd-Ionen führt.^[147,148] Wir untersuchten die Stabilität von P-Punkten in Gegenwart von biologisch relevanten Ionen und ROS (Abbildung 7). Die Fluoreszenz der P-Punkte wurde

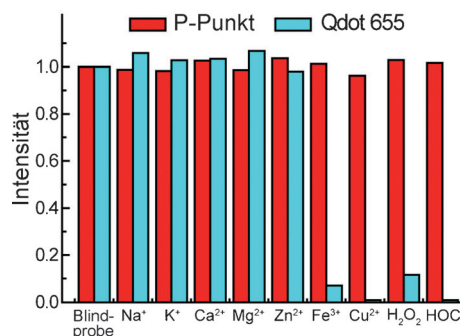


Abbildung 7. Chemische Stabilität von P-Punkten in Gegenwart von biologisch relevanten Ionen und ROS in wässrigen Lösungen. Als Referenz dienten Qdot-655-Nanokristalle. Die Konzentration betrug für jedes Metall $500 \mu\text{M}$. Bei ROS-Stabilitätstests betrugen die Konzentrationen von H_2O_2 und Chlor 0.1 Gew.-% bzw. 0.004 Gew.-%.

durch keines der biologisch relevanten Ionen, die wir untersuchten, beeinträchtigt, darunter auch Zink und Kupfer, die in biologischen Systemen mit am häufigsten anzutreffen sind. Zwei verbreitete und stabile ROS in physiologischer Umgebung, hypochlorige Säure (HOCl) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), beeinträchtigten die Fluoreszenz der P-Punkte nicht. Im Gegensatz dazu wurden anorganische Q-Punkte bei jeweils gleichen Konzentrationen von H_2O_2 und Eisenionen beträchtlich und von HOCl und Kupferionen vollständig gelöst. Die stabile Fluoreszenz von P-Punkten kann deren Aufbau aus hydrophoben Polymeren zugeschrieben werden, die nicht dazu neigen, chemische Wechselwirkungen mit Metallionen und ROS einzugehen. Diese Eigenschaften bieten einen beträchtlichen Vorteil für die Verwendung von P-Punkten in In-vivo-Sonden.

3.5. Toxizität

Biokompatibilität ist ein wesentlicher Aspekt, der für auf biologische Anwendungen gerichtete fluoreszierende Nanopartikel zu berücksichtigen ist. So haben mehrere Gruppen Toxizitätsuntersuchungen an P-Punkten durchgeführt, die alle eine sehr geringe Toxizität der P-Punkte belegen. Christensen und Mitarbeiter untersuchten eine mögliche zytotoxische Wirkung von hydrophoben P-Punkten mit Durchmesser um 18 nm .^[68] Sie bewerteten die Lebensfähigkeit von mit zunehmenden Mengen PFBT-P-Punkten inkubierten Zellen unter Verwendung von CellTiter Blue, einem Farbstoff, der die Lebensfähigkeit und Proliferation von Zellen

verfolgt. Der Prozentsatz lebender J774A1-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit P-Punkten war bei allen untersuchten Konzentrationen nicht anders als bei der Kontrolle, was belegt, dass P-Punkte keinen merklichen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und das Wachstum von Zellen ausüben. Zudem zeigten Bilder von mit Nanopartikeln beladenen Zellen eine normale Morphologie ohne jegliche Störung der Aktin-Mikrofilamente. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass P-Punkte bei maximaler Arbeitskonzentration keine signifikante zytotoxische Wirkung auf diese Zelllinie haben. Um die Möglichkeit einer durch P-Punkte induzierten entzündlichen Reaktion zu untersuchen, kontrollierten die Autoren die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) an mit P-Punkten beladenen J774A1-Zellen auf mRNA-Ebene. Wie in Abbildung 8A gezeigt, waren die mRNA-

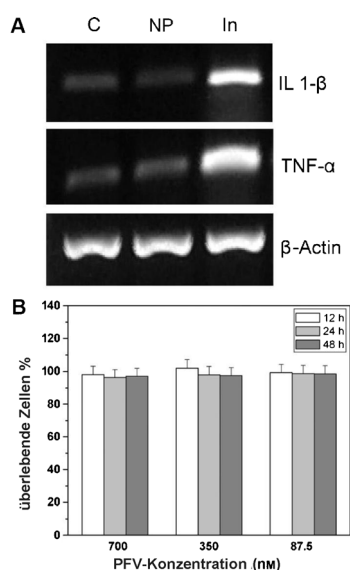


Abbildung 8. Untersuchung der Zelltotoxicität von P-Punkten. A) Überwachung von Entzündungsmarkern in mit P-Punkten behandelten Zellen. J774A1-Zellen wurden 4 h lang mit 2 nM (4 ppm) PFBT-P-Punkten inkubiert. Aus jeder Probe wurde RNA extrahiert, die gesamte RNA wurde mittels RT-PCR auf die Expression von TNF- α , IL-1 β und Actin untersucht und das vervielfältigte Produkt wurde durch Agarose-Elektrophorese abgetrennt. Es sind drei unabhängige Beobachtungen dargestellt: „C“: Vehikelkontrolle; „NP“: 2 nM (4 ppm) PFBT-P-Punkte und „In“: Interferon- γ (60 ng mL⁻¹) + LPS (100 ng mL⁻¹) als Positivkontrolle. Wiedergabe nach Lit. [68] mit freundlicher Genehmigung. B) Metabolische Lebensfähigkeit von NIH/3T3-Fibroblasten nach Inkubation mit großen Partikeln aus halbleitendem Polymer bei verschiedenen Konzentrationen über 12, 24 bzw. 48 h. Wiedergabe nach Lit. [94] mit freundlicher Genehmigung.

Spiegel für TNF- α und IL-1 β in mit P-Punkten inkubierten Zellen identisch zu denen von nicht mit P-Punkten behandelten Zellen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass P-Punkte keine inflammatorische Wirkung auf diesen Zelltypen ausüben.

Moon und Mitarbeiter untersuchten die zytotoxische Wirkung von Nanopartikeln (ca. 97 nm), die aus einem hydrophilen PPE-Polymerderivat hergestellt wurden.^[82] Dafür

wurden BHK-Zellen mit verschiedenen Mengen der Nanopartikel inkubiert. Lebende Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten unter Verwendung des CellTiter-Glo-Assay-Systems quantifiziert, das ATP als einen Indikator für metabolisch aktive Zellen misst. Die Ergebnisse zeigten eine minimale Inhibierung der Lebensfähigkeit schon bei 264 μ M Nanopartikeln im Verlauf einer einwöchigen Zellkultur. Liu und Mitarbeiter untersuchten die Zytotoxizität von großen halbleitenden Polymerpartikeln (Durchmesser ca. 220 nm) und mit halbleitendem Polymer beladenen PLGA-Partikeln.^[94] Die metabolische Lebensfähigkeit von NIH/3T3-Zellen veränderte sich nach Inkubation mit Suspensionen dieser großen halbleitenden Polymerpartikel nicht, selbst nicht bei 700 nm über zwei Tage (Abbildung 8B). Die nichttoxischen Eigenschaften der auf halbleitenden Polymeren basierenden Nanopartikel stimmt mit früheren Studien überein, bei denen konjugierte Polymere (z. B. Polyanilin-, Polypyrrol- und Polythiophenderivate) als elektroaktive Biomaterialien bei Gewebe-Engineering-Anwendungen eingesetzt wurden.^[149]

4. Funktionalisierung und Biokonjugation

4.1. Verkapselungsverfahren

Wie in Abschnitt 3 diskutiert, zeigen P-Punkte ausgezeichnete Eigenschaften als Fluoreszenzsonden. Für weit verbreitete biologische Anwendungen müssen zuerst Probleme hinsichtlich der Steuerung der Oberflächeneigenschaften und der Biokonjugation der P-Punkte gelöst werden. Analog zur Funktionalisierung von Q-Punkten wurden anfangs auf Verkapselung oder Einbettung basierende Ansätze genutzt, um Nanopartikel mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche herzustellen. So wurden zur Bildung von Nanopartikeln halbleitende Polymere in Materialien wie Siliciumdioxid,^[46] Phospholipid^[98,99] und PLGA-Polymeren verkapselt oder eingebettet.^[94,95]

Die Siliciumdioxid-Verkapselung ist eine weithin angewendete Strategie, um die Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln zu erleichtern.^[16,20,150] Dieser Ansatz lieferte in Siliciumdioxid eingebettete P-Punkte mit einer Partikelgröße von ca. 10–20 nm, wobei sich eine 2–3 nm dicke Siliciumschale um den P-Punkt herum bildete. Neben der Verkapselung mit Siliciumdioxid wurden halbleitende Polymere auch in große PLGA-Partikel eingebettet.^[94,95] Die hydrodynamischen Durchmesser der mit halbleitenden Polymeren beladenen PLGA-Partikel in Wasser lagen im Bereich von 240 bis 270 nm (gemessen mit dynamischer Lichtstreuung, DLS). Die Fluorophorkonzentrationen in diesen PLGA-Partikeln waren jedoch eher sehr niedrig. In einer alternativen Strategie verkapselten Green und Mitarbeiter hydrophobe halbleitende Polymere in Phospholipid-Micellen.^[98] Die verkapselten Nanopartikel hatten in Wasser einen mittleren Durchmesser von 80–100 nm. Die Zugabe von Lipid-PEG-COOH während der Verkapselung führte zu mit Carbonsäuren funktionalisierten Partikeln, die mit BSA konjugiert werden konnten. Basierend auf dieser Strategie, verkapselte die gleiche Gruppe sowohl halbleitende Polymere als auch Eisenoxidnanopartikel in Phospholipid-Micellen.^[99] Mit diesen Partikelsuspensionen

wurde dann eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt, um deren MRT-Aktivität zu zeigen und deren Wirksamkeit als potenzielle bimodale Bildgebungssonden nachzuweisen.

Auch wenn die oben beschriebenen Verkapselungs- oder Einbettungsmethoden bei der Funktionalisierung der Oberfläche von halbleitenden Polymernanopartikeln einigermaßen erfolgreich sind, gibt es hinsichtlich Partikelgröße und Helligkeit pro Partikel doch Grenzen. Mit dem Einbettungsverfahren in Siliciumdioxid können zwar relativ kleine Partikelgrößen erhalten werden, aber die Siliciumdioxidschale (2–3 nm) ist in biologischen Umgebungen womöglich anfällig gegenüber einer Hydrolyse, und aminfunktionalisierte Siliciumdioxidoberflächen verursachten zudem eine signifikante unspezifische Absorption unter den Nanopartikeln und an der zellulären Oberfläche. Bei PLGA-verkapselten Partikeln (230–270 nm) und Phospholipid verkapselten Partikeln (80–100 nm) waren die Partikelgrößen für viele zelluläre und auf subzelluläre Bereiche zielende Anwendungen zu groß. Zudem waren die Konzentrationen der fluoreszierenden Polymere in Bezug auf die Verkapselungsmaterialien in der Vorstufenmischung sehr gering: etwa 1 % bei der PLGA-Verkapselung^[94,95] und ca. 8.5 % bei der Phospholipid-Verkapselung.^[98] Diese Prozentzahlen deuten auf vergleichsweise geringe Fluorophor-Beladungskonzentrationen in den fertigen Nanopartikeln hin, die ähnlich gering oder sogar noch geringer sind als bei mit Fluoreszenzfarbstoffen beladenen Latexkugeln. Daher ziehen diese Verkapselungsstrategien keinen vollen Nutzen aus den optischen Eigenschaften von halbleitenden Polymeren zur Bildung von Nanopartikeln mit dicht gepackten Polymerfluorophoren. Infolgedessen ist die Fluoreszenzhelligkeit pro Partikel aufgrund der geringen Fluorophorkonzentrationen begrenzt, auch wenn die große Partikelgröße die Helligkeit in einigen Fällen kompensieren sollte.

4.2. Amphiphile Polymer-Cofällungsverfahren

Zur Herstellung heller kleiner P-Punkt-Sonden, die spezifische zelluläre Ziele erkennen und markieren, ist ein zuverlässiges Verfahren zur Funktionalisierung und Konjugation hoch erwünscht. Unsere Gruppe hat mehrere Verfahren entwickelt, welche die anspruchsvolle Aufgabe der P-Punkt-Biokonjugation und spezifischen Zellansteuerung erfolgreich lösen.^[56–58,63–66] Die erste Strategie basiert auf dem Einschluss von heterogenen Polymerketten in einem einzelnen P-Punkt während der Nanopartikelbildung. Gleichzeitig mit den halbleitenden Polymeren wird während der P-Punkt-Herstellung eine kleine Menge amphiphiler Polymere, die funktionelle Gruppen tragen, ausgefällt, um die Nanopartikeloberfläche zu modifizieren und zu funktionalisieren. Die nachfolgende Konjugation verknüpft die P-Punkte kovalent mit Biomolekülen, die zelluläre Ziele durch spezifische Antigen-Antikörper- oder Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen markieren. Diese Funktionalisierungs- und Biokonjugationsstrategie kann ohne weiteres auf beliebige fluoreszierende halbleitende Polymere angewendet werden.

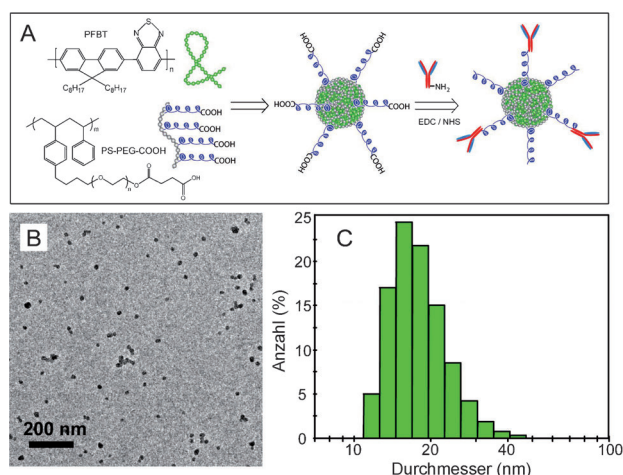


Abbildung 9. Funktionalisierte P-Punkte für eine biomolekulare Konjugation. A) Oberflächenfunktionalisierung von PFBT-P-Punkten mit einem amphiphilen Polymer PS-PEG-COOH. B) TEM-Aufnahme der funktionalisierten PFBT-P-Punkte. C) Hydrodynamischer Durchmesser der funktionalisierten PFBT-P-Punkte, gemessen mit DLS. Wiedergabe nach Lit. [56] mit freundlicher Genehmigung.

Als ein Beispiel wurde ein amphiphiles kammförmiges Polystyrol-Polymer PS-PEG-COOH zur Funktionalisierung von stark fluoreszierenden PFBT-P-Punkten genutzt (Abbildung 9A).^[56] Funktionalisierte P-Punkte wurden unter Verwendung einer Vorstufenlösungsmischung mit einer konstanten PFBT-Konzentration und PS-PEG-COOH/PFBT-Anteilen von 0 bis 20 Gew.-% hergestellt. Die Größe und Morphologie der funktionalisierten PFBT-P-Punkte wurden mit TEM (Abbildung 9B) und DLS charakterisiert (Abbildung 9C). Beide Messungen zeigten vergleichbare Partikelgrößen mit einem mittleren Durchmesser von ungefähr 15 nm. Was die Fluorophordichte angeht, erzeugte diese Funktionalisierungsstrategie Nanopartikelsonden mit guter Qualität, bei denen wirksame Fluorophore mehr als 80 % der P-Punkte ausmachten. Dagegen sind die effektiven Fluorophorkonzentrationen bei Q-Punkten und farbstoffbeladenen Kugeln aufgrund des Vorhandenseins einer dicken Verkapselungshülle (bei Q-Punkten) oder der Selbstlöschung der Farbstoffe (bei den farbstoffdotierten Kugeln) auf wenige Prozent des Partikelvolumens oder Gewichts begrenzt.

In einer weiteren Studie wurde fluoreszierendes PFBT-Polymer zusammen mit einer geringen Menge Poly(styrol-co-maleinsäureanhydrid) (PSMA) ausgefällt, und die resultierenden P-Punkte wurden ebenfalls erfolgreich an der Oberfläche funktionalisiert.^[57] Die carboxyfunktionalisierten P-Punkte wurden weiter mit niedermolekularen Amin-Azid- und Amin-Alkin-Verbindungen zur Reaktion gebracht, um P-Punkte für eine bioorthogonale Markierung auf der Basis von Klick-Chemie zu bilden (Abbildung 10A). DLS- und TEM-Messungen zeigten, dass sowohl die Carboxy-P-Punkte als auch die mit kleinen Molekülen konjugierten P-Punkte vergleichbare Partikelgrößen mit einem mittleren Durchmesser von etwa 15 nm aufwiesen. Gelelektrophorese ergab jedoch eine Verschiebung der Migrationsbanden (Abbildung 10B), und zwar aufgrund der verringerten Ladungen der P-Punkt-Konjugate verglichen mit den carboxyfunktio-

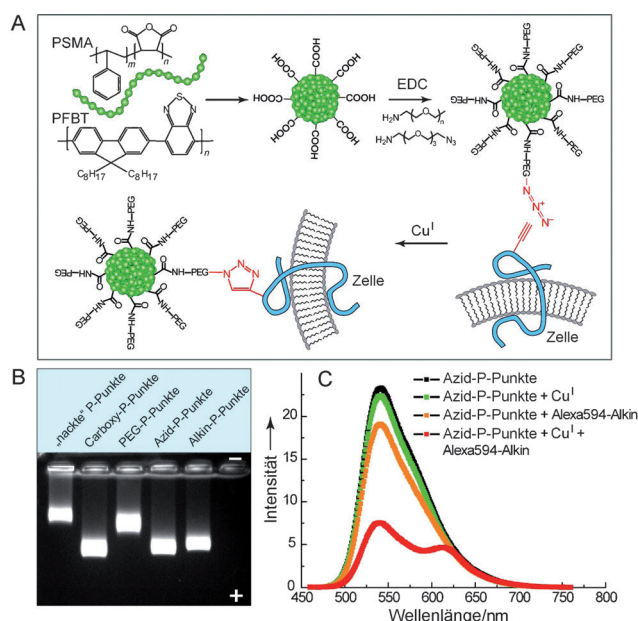


Abbildung 10. „Klickbare“ P-Punkte für bioorthogonales Markieren. A) P-Punkt-Funktionalisierung und nachfolgendes bioorthogonales Markieren über Klick-Chemie. B) Gelelektrophorese von P-Punkten mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen. C) Fluoreszenz-assay unter Verwendung von Alkin-Alexa-594-Farbstoff, um das Vorhandensein von Azidgruppen auf der P-Punkt-Oberfläche zu verifizieren. Wiedergabe nach Lit. [57] mit freundlicher Genehmigung.

nalisierten P-Punkten. Des Weiteren wurde ein Fluoreszenz-assay unter Verwendung von Alkin-Alexa-594-Farbstoff durchgeführt, um das Vorhandensein von Oberflächen-Azidgruppen zu verifizieren, das auf die ausgezeichnete Reaktivität von Azid-P-Punkten gegenüber einer terminalen Alkingruppe in einer kupferkatalysierten Klick-Reaktion hindeutet (Abbildung 10C). All diese Ergebnisse belegen eindeutig die erfolgreiche Carboxyfunktionalisierung der P-Punkte sowie alle nachfolgenden Oberflächenmodifizierungen.

4.3. Direkte Funktionalisierungsmethoden

Bei den Verkapselungsverfahren und der Cofällung mit amphiphilen Polymeren wurde die Biokonjugation durch die Reaktion von funktionellen Gruppen an der P-Punkt-Oberfläche mit Biomolekülen erreicht. Die resultierenden P-Punkt-Biokonjugate wurden erfolgreich für Zellmarkierungen,^[56] bioorthogonales Markieren^[57] und In-vivo-Tumor-„Targeting“ eingesetzt.^[58] Die funktionellen Moleküle in den oben beschriebenen Abläufen waren jedoch vorwiegend durch nichtkovalente hydrophobe Assoziation mit den P-Punkten verbunden. Das Fehlen einer kovalenten Bindung bei dieser hydrophoben Assoziation kann ein beträchtlicher Nachteil sein, da die funktionellen Moleküle infolge Quellung oder innerer Reorganisation der Polymerhauptkette von den Nanopartikel abfallen oder dissoziieren können, was wiederum die Markierungseffizienz und Empfindlichkeit von Zell-Assays verringert. Zudem ist es mit dieser Oberflä-

chenmodifizierungsmethode recht schwierig, die Dichte der funktionellen Gruppen auf der P-Punkt-Oberfläche exakt zu steuern.

Um diese Nachteile zu überwinden, hat unsere Gruppe einen Ansatz unter Einführung kovalent gebundener funktioneller Gruppen im Anfangsstadium der Polymersynthese vorgestellt.^[65] P-Punkte, die aus diesen Polymeren gebildet wurden, können direkt für eine Biokonjugation verfügbare funktionelle Gruppen aufweisen, wodurch zusätzliche Oberflächenmodifizierungsschritte vermieden werden. Wir finden, dass chemische Modifizierungen von halbleitenden Polymeren mit hydrophilen Gruppen weit verbreitet genutzt wurden, um den konjugierten Polyelektrolyten und amphiphil konjugierten Polymeren Wasserlöslichkeit und Funktionalisierung zu verleihen. Konjugierte Polyelektrolyte und hydrophile konjugierte Polymere wurden in Nanopartikelform mit funktionellen Gruppen hergestellt.^[33,82,85] Zudem können amphiphil konjugierte Oligomere, die mit Azidgruppen und biologischen Liganden, z.B. Mannose, vorfunktionalisiert sind, sich selbst zu Nanopartikeln organisieren, die selektiv Proteine, Bakterien und funktionalisierte Kügelchen binden.^[91]

Eine direkte Funktionalisierung zur Bildung von P-Punkten aus hydrophoben halbleitenden Polymeren erfordert jedoch andere Methoden. Dazu gehören sehr verschiedene Überlegungen, und die Anforderungen daran können gelegentlich ganz entgegengesetzt ausfallen. Zum Beispiel haben wir gefunden, dass der Grad der hydrophilen Funktionalisierung eine entscheidende Rolle bei der Festlegung der Stabilität und Fluoreszenzleistung der endgültigen P-Punkte spielt.^[65] Die Dichte der hydrophilen Gruppen muss aber niedrig gehalten werden, um die Stabilität und Leistungsfähigkeit von P-Punkten für biologische Anwendungen aufrechtzuerhalten.

Um die Wirkung der hydrophilen Seitenketten auf die Stabilität und Leistungsfähigkeit der P-Punkte zu untersuchen, wurde eine Reihe von PFBT-Polymeren mit Carboxygruppen in den Seitenketten mit molaren Anteilen von ungefähr 2 %, 14 % und 50 % synthetisiert (bezeichnet als PFBT-C2, PFBT-C14 bzw. PFBT-C50; Abbildung 11). Fluoreszenzspektroskopie zeigte, dass sich die Fluoreszenz-Quantenausbeute von 30 % auf 17 % verringerte, wenn die

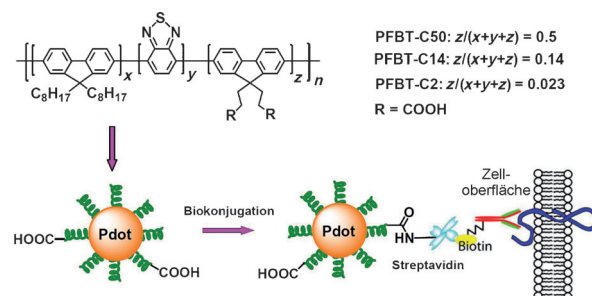


Abbildung 11. Direkt funktionalisierte P-Punkte mit unterschiedlich vielen Seitenketten-Carboxygruppen. Biokonjugation wurde an den PFBT-C2-P-Punkten durchgeführt und die resultierenden P-Punkt-Biokonjugate erwiesen sich beim Zell-Targeting, als spezifisch. Wiedergabe nach Lit. [65] mit freundlicher Genehmigung.

Dichte der hydrophilen funktionellen Gruppen von 2 % auf 50 % zunahm. Ein Vergleich der Fluoreszenzhelligkeit einzelner Partikel ergab, dass die tatsächliche Fluorophorpackungsdichte in den PFBT-C50-P-Punkten sehr viel geringer war als in den PFBT-C2- und PFBT-C14-P-Punkten, was darauf hindeutet, dass sich die hydrophilen Seitenketten auf die inneren Strukturen und die Kompaktheit der verschiedenen P-Punkte auswirkte. Um dies weiter zu bestätigen, wurde eine Farbstoffdotierungs- und Auswaschungsmethode entwickelt, um die Kompaktheit der Fluorophorpackung sowie die Bindungsstärke der Polymermoleküle in den PFBT-P-Punkten mit verschiedenen Dichten von hydrophilen Seitenketten zu untersuchen.

Quantitative Absorptions- und Fluoreszenzanalysen haben gezeigt, dass die Farbstoffauswaschung und PFBT-Dissoziation in den P-Punkten stark von der Dichte der hydrophilen Seitenketten abhing. Zum Beispiel wurden aus den PFBT-C50-P-Punkten etwa 10 % PFBT und 50 % Farbstoffmoleküle ausgewaschen, aus den PFBT-C2-P-Punkten jedoch kein PFBT und nur 6 % Farbstoff. Diese Ergebnisse sowie die Analyse eines Förster-Energietransfers (FRET) haben gezeigt, dass PFBT-C2-P-Punkte starke Bindungen zwischen den Ketten und eine dicht gepackte innere Struktur durch hydrophobe Wechselwirkungen aufwiesen, im Gegensatz zu den PFBT-C50-P-Punkten, die eine hohe Dichte von hydrophilen Seitenketten aufwiesen. Zudem wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt, um die Rolle von nichtspezifischen Wechselwirkungen beim Markieren von Zellen mit PFBT-C2-, PFBT-C14- und PFBT-C50-P-Punkten zu bestimmen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass PFBT-C50-P-Punkte verglichen mit PFBT-C2-P-Punkten eine starke unspezifische Zellmarkierung zeigen. Basierend auf diesen Ergebnissen stellt die geringe Dichte der funktionellen Gruppen einen Schlüsselfaktor für die direkte Funktionalisierung von P-Punkten für biologische Anwendungen dar. Wir führten mit den PFBT-C2-P-Punkten eine Biokonjugation durch, und die resultierenden P-Punkt-Biokonjugate ergaben beim Zell-„Targeting“ eine gute Spezifität. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Funktionalisierung mit geringer Dichte für Biokonjugationen und biologische Anwendungen ausreichend war.

In einer ähnlich gelagerten Untersuchung hat unsere Gruppe eine Vernetzungsstrategie entwickelt, um funktionelle Polymermoleküle kovalent mit P-Punkten zu verknüpfen.^[66] Bei diesem Verfahren wurde zunächst ein PFBT-Polymer mit Amingruppen in der Seitenkette synthetisiert und dann wurde ein funktionelles Polymer wie Poly(isobutylen-alt-maleinsäureanhydrid) (PIMA) oder PSMA als Vernetzer verwendet. Jedes Vernetzermolekül enthielt mehrere reaktive Einheiten, die spontan mit den Amingruppen der Seitenketten des Polymers reagierten, um eine kovalente Verknüpfung mit dem halbleitenden Polymer zu bilden und gleichzeitig Carboxygruppen für eine Biokonjugation zu liefern. Zusätzlich zur Herstellung stabiler funktionalisierter P-Punkte kann dieser Ansatz zuverlässig P-Punkte mit einer Partikelgröße von 10 nm oder weniger erzeugen, die mit den meisten anderen Methoden nur schwer erhältlich sind. Wir haben mit diesen kleinen vernetzten P-Punkten eine Biokonjugation durchgeführt, und die resultierenden Konjugate wurden zur Markierung von Oberflächenmarkern von

Brustkrebszellen und den Mikrotubuli von Gebärmutterhalskrebszellen verwendet. Diese Anwendung hat sich bei der biologischen Bildgebung sowie bei Durchflusszytometrie-Experimenten als nützlich erwiesen.

5. Biologische Anwendungen

5.1. Zellmarkierung über Endozytose

Die Vorzüge der P-Punkte – große Helligkeit, hohe und stabile Emissionsrate, ausgezeichnete Photostabilität und fehlende Toxizität – sind für experimentell anspruchsvolle biologische Anwendungen vielversprechend. Anfänglich wurden zelluläre In-vitro-Bildgebungsanwendungen von P-Punkten mit einer unspezifischen Markierungsmethode wie Endozytose durchgeführt.^[51] Dabei schienen „nackte“ hydrophobe P-Punkte ohne jegliche Verkapselungsschicht in Zellkulturmedien stabil zu sein, und die Fluoreszenzbildgebung deutete klar auf die Aufnahme der „nackten“ P-Punkte in die Zellen hin. Die starke Fluoreszenz der P-Punkte ermöglichte die Anwendung einer geringeren Konzentration davon in der Zellkultur: Zum Beispiel konnte P-Punkt-Fluoreszenz in Zellen bei Konzentration von nur 155 pm (270 ppb) nachgewiesen werden.^[68] Die intrazelluläre Fluoreszenz-Colokalisierung von „nackten“ P-Punkten und Texas-Red-Dextran (TR-dex) deutete darauf hin, dass die Aufnahme in die Zelle durch einen üblichen endozytotischen Mechanismus erfolgt. Die Colokalisierung von „nackten“ PFBT-P-Punkten mit einer Immunfluoreszenz eines Anti-LAMP-1-Antikörpers bestätigte, dass der endgültige Zellbestimmungsort der „nackten“ P-Punkte Lysosome waren. Die Inhibierung der Aufnahme von Phosphorinositid-3-Kinase-Inhibitoren deutete darauf hin, dass die zelluläre Aufnahme von „nackten“ P-Punkten eher durch eine konstitutive Makropinozytose als durch einen Clathrin-abhängigen oder Caveolin-abhängigen Mechanismus stattfand.^[68] Makropinozytose ist ein unspezifischer Mechanismus der Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit, wobei die Inhalte der Vesikel schließlich an Lysosome geliefert wird. Das Eindringen von nackten P-Punkten über diesen Mechanismus bedeutet, dass Makrophagenzellen die Nanopartikeloberfläche nicht erkennen und die „nackten“ P-Punkte einfach als Teil der extrazellulären Flüssigkeit in die Makropinosomen eingeführt werden.

Zellmarkierung über Endozytose wurde auch unter Verwendung von Nanopartikeln durchgeführt, die durch Verkapseln oder Einbetten von halbleitenden Polymeren in die Partikelmatrix hergestellt wurden. Zum Beispiel wurden mit halbleitenden Polymeren beladene PLGA-Partikel mit MCF-7-Brustkrebszellen inkubiert; im Zellzytoplasma wurde daraufhin eine helle Fluoreszenz detektiert, was auf eine effiziente zelluläre Aufnahme hindeutet.^[94] Dabei wurde Folsäure mit einer Amin-Endgruppe an die Partikel konjugiert, um spezifisch Folatrezeptoren anzusteuern, die in den kultivierten Krebszellen überexprimiert sind. Fluoreszenzbildgebungsuntersuchungen zeigten, dass die Internalisierung der Folsäure-funktionalisierten Partikel in MCF-7-Krebszellen effizienter war als die der nichtfunktionalisierten, und zwar

aufgrund der durch den Folatrezeptor vermittelten Endozytose.^[94] In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde die zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität von mehreren Arten von Phospholipid-verkapselten halbleitenden Polymerpartikeln untersucht, einschließlich solcher, die mit magnetischen Nanopartikeln beladen waren.^[98,99] Die Daten ergaben eindeutige Belege für das Potenzial von P-Punkten als nichttoxische Fluoreszenzmarker sowie als multifunktionale Bildgebungssonden.

Zusätzlich zu auf hydrophoben halbleitenden Polymeren basierenden Nanopartikeln wurden auch verschiedene konjugierte Polyelektrolyt-Nanopartikel und amphiphil konjugierte Polymernanopartikel als zelluläre Bildgebungssonden untersucht.^[33,35,82,84,87,92,93,127,151] Die zelluläre Aufnahme von auf Polyelektrolyten basierenden Nanopartikeln trat vorwiegend durch Makropinozytose oder rezeptorabhängige Endozytose auf und war abhängig von den funktionellen Oberflächengruppen sowie den Zelllinien. Es ist festzuhalten, dass molekular (als solvatisierte Moleküle und nicht als Nanopartikel) vorliegende konjugierte Polyelektrolyte ein breites Forschungsgebiet für Fluoreszenz-Biosensorik und -Bioassays darstellen, während die zielinduzierte Polymeraggregation über elektrostatische Wechselwirkungen weit verbreitet als Transduktionsmechanismus zur Zielfindung genutzt wird.^[32,34,35]

5.2. Immunfluoreszenzmarkierung

Auch wenn das Potenzial von P-Punkten als zelluläres Kontrastmittel durch die Endozytose-basierte Markierung nachgewiesen wurde, handelt es sich doch um einen unspezifischen Prozess, und es fehlt die Spezifität von bestehenden Markierungsmethoden mit organischen Fluorophoren und Q-Punkten, die im Allgemeinen Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen umfassen. Bei der Biokonjugation für die Immunfluoreszenz-Markierung von zellulären Zielen werden weit verbreitet Streptavidin und Immunglobulin G (IgG) eingesetzt. Unsere Gruppe hat nun ein Biokonjugationsverfahren zur Bildung von P-Punkt-IgG- und P-Punkt-Streptavidin-Sonden (hydrodynamischer Durchmesser ca. 10–20 nm) entwickelt und deren Fähigkeit zur spezifischen Markierung von EpCAM untersucht; dieser Oberflächenmarker für Epithelzellen wird derzeit zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen genutzt. Abbildung 12 A zeigt, dass die P-Punkt-IgG-Sonden erfolgreich EpCAM-Rezeptoren auf der Oberfläche von lebenden humanen MCF-7-Brustkrebszellen markierten, nachdem die Zellen mit dem monoklonalen primären Anti-EpCAM-Antikörper inkubiert wurden. Wurden die Zellen nur mit

P-Punkt-IgG und ohne den primären Antikörper inkubiert, wurde keine Zellmarkierung nachgewiesen (Abbildung 12 B), was belegt, dass die P-Punkt-IgG-Konjugate für das Ziel hochspezifisch sind. Auf die gleiche Weise markierten die P-Punkt-Streptavidin-Sonden, zusammen mit dem primären Anti-EpCAM-Antikörper und biotinyliertem Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper, ebenfalls effizient EpCAM auf der Oberfläche von lebenden MCF-7-Zellen, ohne dass eine unspezifische Bindung nachweisbar war. Des Weiteren verglichen wir unter Verwendung eines Mikrodurchflusszytometers die Markierungshelligkeit der P-Punkt-Biokonjugate mit der von kommerziell erhältlichen Q-Punkt-Streptavidin- und Alexa-IgG-Sonden (Abbildung 12 C und D). Die quantitativen Analysen der Durchflusszytometriedaten zeigten, dass die mittlere Intensität der mit P-Punkt markierten Zellen etwa 25-mal heller war als die von mit Q-Punkt markierten und etwa 18-mal heller als die von mit Alexa-IgG markierten Zellen. Die Markierungshelligkeit wurde auch durch Analyse von Fluoreszenzbildern von entweder mit P-Punkt-Streptavidin oder Q-Punkt-Streptavidin markierten MCF-7-Zellen quantifiziert: Die mit P-Punkten markierten Zellen waren ca. 20-mal heller als die mit Q-Punkt markierten, was mit den Daten der Durchflusszytometrie übereinstimmt. Diese Ergebnisse beweisen eindeutig die außergewöhnliche Fluoreszenzhelligkeit von P-Punkten und deren Potenzial für die zelluläre Bildgebung sowie für biologische Assays.

Erst kürzlich hat unsere Gruppe über CN-PPV-P-Punkte berichtet, die einen kleinen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 10 nm und eine helle orangefarbene Fluoreszenz mit einer Quantenausbeute um 60 % aufwiesen.^[63] Die erfolgreiche Funktionalisierung und Biokonjugation erzeugte CN-PPV-P-Punkt-Streptavidin-Sonden, die spezifische Zellober-

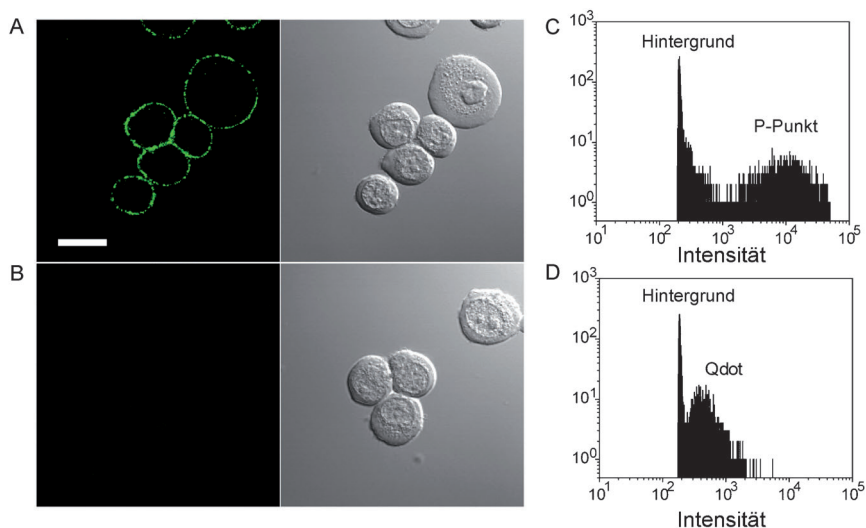


Abbildung 12. Spezifisches Zell-Targeting von P-Punkt-Biokonjugaten. A) Fluoreszenzaufnahme des Zelloberflächenmarkers EpCAM auf naheinander mit primärem anti-EpCAM-Antikörper und P-Punkt-IgG-Konjugaten inkubierten MCF-7-Zellen. Der Maßstab steht für 10 µm. B) Fluoreszenzaufnahme der Kontrollprobe, in der die Zellen nur mit P-Punkt-IgG (ohne primären Antikörper) inkubiert wurden. C) Fluoreszenzintensitätsverteilungen von mit P-Punkt-Streptavidin markierten MCF-7-Zellen. D) Fluoreszenzintensitätsverteilung von mit Qdot-565-Streptavidin-markierten MCF-7-Zellen, die unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie unter (C) erhalten wurde. Wiedergabe nach Lit. [56] mit freundlicher Genehmigung.

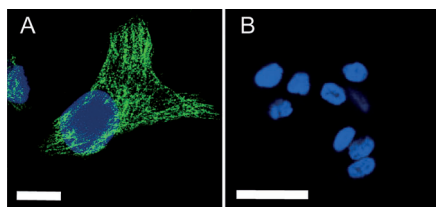


Abbildung 13. Spezifische subzelluläre Bildgebung von P-Punkt-Biokonjugaten. A) Fluoreszenzaufnahme von Mikrotubuli-Strukturen in nacheinander mit biotinylierten Anti- α -Tubulin-Antikörper und CN-PPV-Streptavidin-Sonden inkubierten HeLa-Zellen. Maßstab: 10 μ m. B) Fluoreszenzbildgebung der Kontrollprobe, in der die Zellen nur mit P-Punkt-Streptavidin (ohne primären Antikörper) inkubiert wurden. Wiedergabe nach Lit. [63] mit freundlicher Genehmigung.

flächenmarker und Mikrotubuli-Strukturen in Säugetierzellen markierten (Abbildung 13). Bei einer Durchflusszytometriemessung zur Untersuchung der spezifischen Markierung eines Zelloberflächenmarkers durch die P-Punkt-Streptavidin-Sonden zeigten die markierten Zellen eine viel stärkere Fluoreszenz als die Kontrollproben, was die Helligkeit und Spezifität der P-Punkt-Sonden belegt. Für die Markierung von Mikrotubuli wurden HeLa-Zellen fixiert, permeabilisiert und dann mit biotinylierten monoklonalen Anti- α -Tubulin-Antikörpern inkubiert. Die mit P-Punkt-Streptavidin-Sonden in Gegenwart oder Abwesenheit des biotinylierten Antikörpers inkubierten HeLa-Zellen wurden unter einem konfokalen Mikroskop betrachtet. Die positiv markierten Zellen zeigten eine helle Fluoreszenz aus gut aufgelösten Tubuli-Strukturen, ohne dass im Kontrollexperiment unspezifische Bindung nachweisbar war. Unter den gleichen Markierungsbedingungen wurden mit den größeren PFBT-Streptavidin-Sonden keine Bilder von subzellulären Strukturen mit ähnlich hoher Qualität beobachtet. Der Grund hierfür wurde der kompakten und geringen Größe (ca. 10 nm) der CN-PPV-P-Punkte zugeschrieben, die im Vergleich zu den PFBT-Punkten (ca. 20 nm) eine sehr geringe unspezifische Bindung in der gedrängten subzellulären Umgebung zeigen. Diese Ergebnisse zeigen, dass kompakte und stark fluoreszierende P-Punkte für die subzelluläre Bildgebung sowie bioanalytische Assays vielversprechende Sonden darstellen.

Große Partikel mit eingebetteten halbleitenden Polymeren wurden auch erfolgreich für die Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen verwendet. Zum Beispiel beschrieben Liu und Mitarbeiter PLGA-verkapselte halbleitende Polymerpartikel (230–260 nm), die durch Variieren von PLGA-PEG-NH₂ und PLGA-OCH₃ in verschiedenen molaren Verhältnissen mit Amingruppen funktionalisiert wurden.^[95] Eine weitere Konjugation von aminfunktionalisierten Partikeln mit dem Antikörper Trastuzumab erzeugte biokonjugierte Nanopartikel, die SK-BR-3-Brustkrebszellen von MCF-7-Brustkrebszellen und NIH/3T3-Fibroblasten unterscheiden konnten, indem die spezifische Bindungsaffinität zwischen Trastuzumab und dem HER2-Rezeptor genutzt wird, der auf der Zellmembran der SK-BR-3-Brustkrebszellen überexprimiert wird.

5.3. Bioorthogonale Markierung über Klick-Chemie

Die bekannteste Klick-Reaktion ist die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, die in ganz unterschiedlichen Forschungsbereichen von den Materialwissenschaften bis hin zur chemischen Biologie Anwendung findet.^[152–156] Sowohl Azido- als auch Alkingruppen gelten bei biologischen Anwendungen als bioorthogonale chemische Reporter, da sie nicht mit nativen biologisch funktionellen Gruppen wechselwirken. Diese bioorthogonalen Reporter können unter Verwendung der Biosynthesemaschinerie der Zelle in ein Zielbiomolekül eingebaut werden, und sie bieten Ansatzpunkte für eine nachfolgende chemische Markierung mit exogenen Sonden. Um die Zellmarkierung mit P-Punkten und Klick-Chemie nachzuweisen, haben wir neu synthetisierte Proteine, die mit bioorthogonalen nichtkanonischen Aminosäure-Markern modifiziert wurden, visualisiert.^[57] Bei diesem Prozess wurden die neu synthetisierten, in Zellen vorliegenden Proteine mit einer Azid- oder Alkin-Gruppe tragenden Aminosäure, z.B. Azidohomoalanin (AHA) bzw. Homopropargylglycine (HPG), metabolisch markiert. Die Proteine waren dann über eine hoch selektive Klick-Reaktion einer Markierung mit fluoreszierenden P-Punkten zugänglich. Konfokale Bildgebung zeigte eine helle Fluoreszenz für die AHA-markierten Zellen, die über eine Klick-Reaktion mit P-Punkt-Alkin markiert wurden (Abbildung 14). Im Negativkontrolllexperiment wurde keine Zellmarkierung beobachtet, was zeigt, dass die P-Punkt-Alkin-Markierung für zelluläre Ziele hoch spezifisch ist.

Die „klickbaren“ P-Punkte wurden auch zum gezielten Ansteuern von Glykoproteinen verwendet.^[57] Das Verfahren umfasste eine metabolische Markierung von Glykanen mit einer Monosaccharidvorstufe, die mit einer Azidgruppe funktionalisiert war.^[157] Die Azidzucker wurden kovalent mit Bildgebungssonden versehen. Dann wurden MCF-7-Zellen drei Tage lang mit *N*-Azidoacetylgalactosamin (GalNAz) inkubiert, um die O-verknüpften Glykoproteine mit Azidgruppen anzureichern. Die mit GalNAz behandelten Zellen wurden über eine Klick-Reaktion mit P-Punkt-Alkin versehen und nachfolgend unter einem konfokalen Mikroskop angeschaut. Zellen, die positiv mit P-Punkt-Alkin markiert waren, zeigten eine helle Zellmarkierung. Bei der Negativkontrolle, deren Zellen Azidgruppen fehlten, wurde keine Fluoreszenz beobachtet, was zeigt, dass die klickbaren P-Punkte für Glykoproteine hoch spezifisch waren. Dabei ist zu beachten, dass die sehr niedrigen P-Punkt-Konzentrationen von ungefähr 50 nM, die für die Markierungsuntersuchungen verwendet wurden, um Größenordnungen geringer waren als die mit kleinen Farbstoffmolekülen im Allgemeinen verwendeten Konzentrationen (typischerweise im μ M-Bereich). Die P-Punkt-Markierung über Klick-Reaktionen war zudem für diese Ziele hochspezifisch, ohne dass es zu einer nennenswerten Hintergrundmarkierung kam.

5.4. In-vivo-Bildgebung

Die Fluoreszenzbildgebung in vivo wird hauptsächlich für die Untersuchung kleiner Tiere genutzt und aufgrund von in

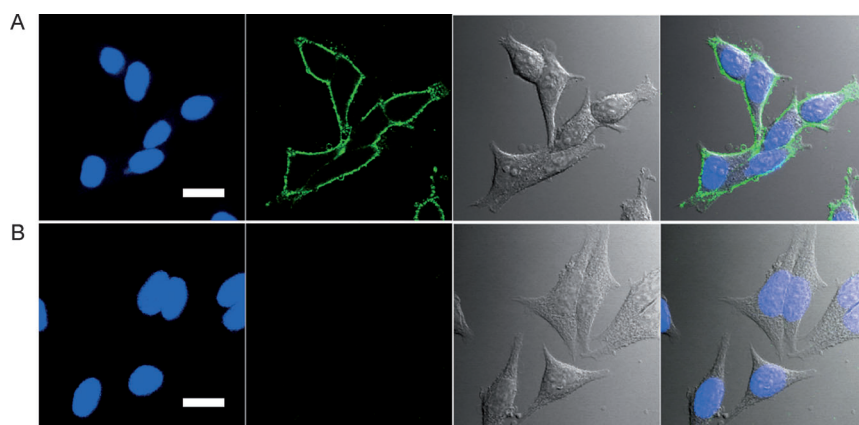


Abbildung 14. Fluoreszenzbildgebung von neu synthetisierten Proteinen in mit AHA behandelten MCF-7-Zellen, die mit P-Punkt-Alkinsonden markiert wurden. A) Positive P-Punkt-Markierung in Gegenwart von Kupfer(I). B) Negativkontrolle für eine P-Punkt-Markierung, die unter den gleichen Bedingungen wie in (A), aber ohne das Reduktionsmittel Natriumascorbat durchgeführt wurde, das Kupfer(I) aus Kupfer(II) erzeugt. Die linken vier Bilder zeigen Fluoreszenzaufnahmen; die grüne Fluoreszenz stammt von den P-Punkten, und die blaue Fluoreszenz stammt vom Kernanfarbstoff Hoechst 34580. Die rechten vier Bilder zeigen Nomarski-Kontrast (DIK) und kombinierten DIK sowie Fluoreszenzaufnahmen. Der Maßstab steht für 20 µm. Wiedergabe nach Lit. [57] mit freundlicher Genehmigung.

biologischen Medien auftretenden, Photonen begrenzenden Störungen, z. B. Streuung, Absorption und Autofluoreszenz, nicht in die Klinik übertragen. Diese Einschränkungen sollte man weitestgehend überwinden können, wenn ein Durchbruch bei der Signalintensität unter Verwendung von exogenen Nahinfrarot(NIR)-Fluoreszenzsonden erreicht wird, die um mehrere Größenordnungen heller sind als die aktuell verwendeten organischen Farbstoffe. In diesem Zusammenhang bieten die halbleitenden Polymernanopartikel ein großes Potenzial, da sie sehr hell und nicht toxisch sind. Kim und Mitarbeiter haben halbleitende Polymernanopartikel bei der Wächterlymphknoten-Kartierung erfolgreich *in vivo* angewendet.^[72] Dafür wurden cyansubstituierte Derivate von Poly(*p*-phenylvinyl) konzipiert, um mehrfarbig fluoreszierende Nanopartikel zu erzeugen (Abbildung 15), die direkt durch eine kolloidale Polymerisation *in situ* in der wässrigen Phase synthetisiert wurden. Eine Variante dieser Nanopartikel (NIR-cvPDs) zeigte polydisperse Größenverteilungen ((60 ± 14) nm), eine breite Absorptionsbande und eine Fluoreszenzemission im roten bis NIR-Bereich mit einem Maximum bei 693 nm bei einer Quantenausbeute von 21 %. Das Potenzial der NIR-cvPDs bei der *In-vivo*-Bildgebung wurde für die Wächterlymphknoten-Kartierung in einem Mausmodell untersucht. Nachdem die NIR-cvPDs intradermal in die Vorderpfote einer Maus injiziert worden waren, flossen die Nanopartikel rasch von der Injektionsstelle in das Lymphsystem ab und reichert sich schließlich im regionalen Lymphknoten an, ohne ein Anzeichen für einen Ausfluss zu den nachfolgenden Lymphknoten. Das Ergebnis war eine scharfe Aufnahme der Wächterlymphknoten. Bioverteilungsuntersuchungen deuteten darauf hin, das lymphatisch abgeflossene Nanopartikel effizient in den Wächterlymphknoten abgefangen wurden, ohne in die nachfolgenden Lymph- und Blutkreisläufe einzudringen.

Der Transport von Bildgebungssonden zu Hirntumoren stellt aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und der komplexen Abhängigkeit von der Sondengröße und den Oberflächeneigenschaften eine der größten Herausforderungen für *In-vivo*-Anwendungen dar.^[158] Wir haben P-Punkt-Biokonjugate entwickelt, die aus maßgeschneiderten halbleitenden Polymermischungen für einen gezielten *In-vivo*-Transport zu Tumoren bestehen.^[158] Die P-Punkte mit einem Durchmesser von etwa 15 nm zeigten ein großes Absorptionsvermögen ($3.0 \times 10^7 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) und eine effiziente tiefrote Emission (Quantenausbeute = 0.56), was diese rund 15-mal heller macht als die bei 655 nm emittierenden Q-Punkte. Die erfolgreiche P-Punkt-Funktionalisierung erzeugte eine biokompatible Oberfläche, die kovalent mit dem tumorspezifischen Peptidliganden Chlorotoxin (CTX) konjugiert werden konnte.

Wir bestimmten die Fähigkeit der P-Punkt-CTX-Konjugate, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen und spezifisch einen Tumor in einem transgenen Mausmodell ND2:SmoA1 anzusteuern. Dafür wurden die P-Punkt-Sonden in die Schwanzvene von Symptome zeigenden ND2:SmoA1-Mäusen sowie von als

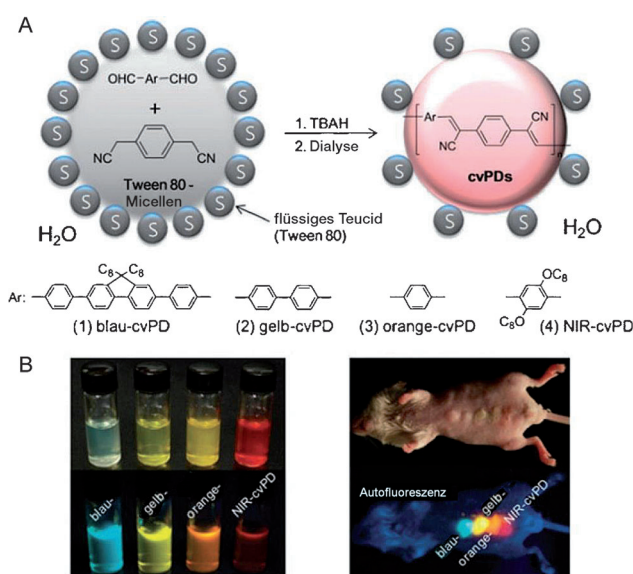


Abbildung 15. Nanopartikel aus halbleitendem Polymer für eine *In-vivo*-Fluoreszenzbildgebung. A) Die Kolloidsynthese von Nanopartikeln mit Cyanvinyl-Grundgerüst durch eine Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH)-katalysierte Knoevenagel-Kondensation im hydrophoben Kern der lösungsmittelfreien wässrigen Micellen. „C₈“ bezeichnet *n*-Octyl-Ketten. B) Echtfarbenaufnahmen von in Wasser dispergierten Polymer-nanopartikeln (links) und einer lebenden Maus (rechts), der Nanopartikel injiziert wurden, unter Raumlicht (oben) und UV-Anregung bei 365 nm für eine Fluoreszenz (unten). Wiedergabe nach Lit. [72] mit freundlicher Genehmigung.

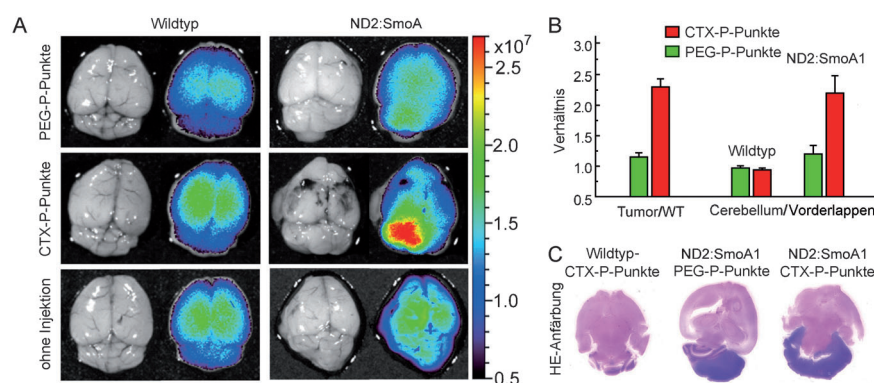


Abbildung 16. P-Punkt-Chlorotoxin-Biokonjugate für ein In-vivo-Tumor-„Targeting“. A) Fluoreszenzaufnahmen von gesunden Hirnen in Wildtyp-Mäusen (links) und Mäusen mit Medulloblastomtumoren ND2:SmoA1 (rechts). Jeder Maus wurden 50 μ L einer 1 μ M Lösung mit entweder nicht zielgerichtetem P-Punkt-PEG (oben) oder zielgerichtetem P-Punkt-CTX (Mitte) über die Schwanzvene injiziert. Einige Mäuse erhielten als Kontrolle keine Injektion (unten). B) Tumor-„Targeting“-Effizienz durch Quantifizierung der Fluoreszenzsignale bei den ND2:SmoA1-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen und Cerebellum gegenüber Frontallappen. C) Histologische Untersuchung der Maushirne von A). Die dunkelvioletten Regionen im mit HE-angefärbten Cerebellum der ND2:SmoA1-Mäuse bestätigte das Vorhandensein des Tumors. Wiedergabe nach Lit. [58] mit freundlicher Genehmigung.

Kontrolle dienenden Wildtyp-Mäusen injiziert. Bei den P-Punkt-Sonden handelte es sich entweder um P-Punkt-CTX oder um P-Punkt-PEG als Kontrolle. Dabei wurden starke Fluoreszenzsignale nur im Bereich des Hirntumors der ND2:SmoA1-Mäuse beobachtet, die diese gezielten Sonden erhielten (Abbildung 16). Die P-Punkt-Fluoreszenz war in den Hirnen der gesunden Tiere nicht sichtbar, was auf eine bevorzugte Akkumulation von P-Punkt-CTX in ND2:SmoA1-Tumoren hindeutet. Die quantitative Auswertung der P-Punkt-Akkumulation und die histologische Analyse stimmten gut mit den biophotonischen Bildern überein, was die selektive Akkumulation der gezielten P-Punkt-CTX-Sonden in den malignen Hirntumoren bestätigt. Die Clearance der Nanopartikel und die Bioverteilung hängen stark von der Partikelgröße ab.^[159,160] Die Verteilungsprofile der P-Punkte in den wesentlichen Clearance-Organen – Leber, Milz und Nieren – wurde analysiert. Die P-Punkt-CTX zeigten sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den ND2:SmoA1-Mäusen eine wie erwartet von der Partikelgröße abhängige^[160] dominante Aufnahme in der Leber, ein signifikant geringeres Signal in der Milz und annähernd keine Verteilung in den Nieren. Das Verteilungsprofil ist vergleichbar mit solchen, über die für anorganische Eisenoxid-Nanopartikel und Q-Punkte mit ähnlicher Partikelgröße berichtet wurde.^[158,160] Diese Studie stellt den ersten Beleg für einen gezielten Transport zu erkrankten Geweben in kleinen Tieren dar. Sie lässt auf ein großes Potenzial von auf P-Punkten basierenden Sonden für In-vivo-Anwendungen wie klinische Krebsdiagnose und Therapie hoffen.

5.5. Einzelpartikelverfolgung

Nanoskalige 2D- und 3D-Einzelpartikelverfolgungsverfahren haben sich als außerordentlich nützlich für die Un-

tersuchung einer breiten Vielfalt von Zellprozessen erwiesen, z.B. von Molekültransport, Membrandynamik und der Bewegung von Motorproteinen.^[5,7] Die Gruppe um McNeill hat die Verwendung von P-Punkten für nanoskalige 2D- und 3D-Verfolgungsanwendungen untersucht.^[53] Um die Helligkeit pro Partikel für die Partikelverfolgung experimentell zu bestimmen, wurden einzelne P-Punkt-Partikel mittels eines mit einem CCD ausgestatteten invertierten Fluoreszenzmikroskops mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 Hz abgebildet. Die detektierten Photonen pro Partikel pro Bild lagen bei mehreren hundert aufeinanderfolgenden Bildern typischerweise zwischen 1×10^6 und 1×10^5 . Die Analyse von 20 typischen Einzelpartikel-Fluoreszenzintensitätskurven ergab ein Mittel von etwa 10^9 pro Partikel insgesamt emittierten Photonen, wobei einige Partikel mehr als 10^{10} Photonen emittierten. Basierend auf

den Signalhöhen von isolierten Nanopartikeln wurde eine theoretische Verfolgungsgenauigkeit von besser als 1 nm geschätzt. Es wurde auch eine intrazelluläre Partikelverfolgung vorgestellt, und diese ergab eine Übereinstimmung der Bewegungsbahnen der Partikel mit dem erwarteten Phänomen, z.B. eine teilweise beschränkte Diffusion sowie reversible und irreversible Bindungen an Zellkomponenten (Abbildung 17). Die Verfolgungsergebnisse zeigen, dass die P-Punkte für die Messung des lokalen Diffusionsvermögens und der nanoskaligen Bewegung von einzelnen Biomolekülen und subzellulären Strukturen in Zellen vielversprechend sind.

In einer damit zusammenhängenden, aber andersartigen Studie berichtete die Gruppe um McNeill über die Verfolgung von einzelnen Ladungsträgern in P-Punkten durch Fluoreszenzmikroskopie mit Videoauflösung.^[54] Bei der kontinuierlichen Abbildung von stationären Nanopartikeln wurden Schwankungen der Fluoreszenzintensität und nanometergroße Verschiebung im Schwerpunkt einzelner P-Punkten beobachtet. Die Schwankungen und Verschiebungen wurden der hüpfenden Bewegung von Loch-Polaronen zugeschrieben, die die Fluoreszenz in der Nachbarschaft des Polarons effizient löschen. Die Analyse der Schwankungen im Fluoreszenzschwerpunkt ergab einen Wert von rund $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}$ für die Loch-Polaron-Mobilität im Nullfeld. Dieser Wert ist ein oder zwei Größenordnungen niedriger als die berichteten Werte aus einer I/V -Analyse. Er stimmt jedoch mit in hohem Maße feststehenden Ladungsträger überein, da die Nanopartikel im Vergleich zu optimal hergestellten dünnen Schichten zusätzlich Konformationsfehlern, chemische Defekte und energetische Fehlordnungen aufweisen sollten. Diese Untersuchung zeigte, dass die Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenzverfolgung zur Messung von Bewegungen im Nanometerbereich und der Mobilität einzelner Ladungsträger innerhalb einer organischen Halbleiterstruktur verwendet werden könnte.

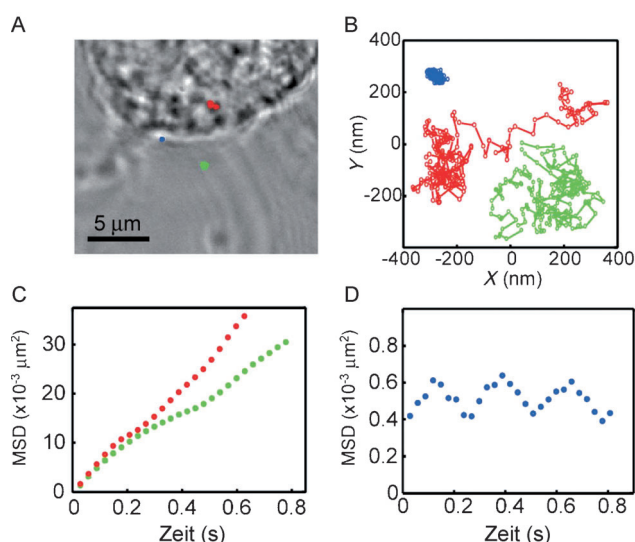


Abbildung 17. Einzelpartikelfluoreszenz-Verfolgung von stark fluoreszierenden P-Punkten. A) Hellfeld-Transmissionsaufnahme einer fixierten Zelle. Die Farbmarkierungen geben die Orte der Partikel an. Blau entspricht einem an die Membran gebundenen Partikel, grün entspricht einem Partikel außerhalb der Zelle und rot entspricht dem Zellinnern. B) Die Bewegungsbahnen, die bei der Fluoreszenzverfolgung für die drei Partikel erhalten wurden. C) Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) der verfolgten PFBT-P-Punkte in einer Zelle (rote Punkte) und außerhalb einer Zelle (grüne Punkte), was Diffusionskonstanten von $3.3 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ bzw. $3.6 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ entspricht. D) Mittlere quadratische Verschiebung der an der Membran haftenden P-Punkte. Wiedergabe nach Lit. [53] mit freundlicher Genehmigung.

5.6. Auf einem Energietransfer basierende P-Punkt-Sensoren

Das Interesse an einer Verwendung des FRET für Sensoranwendungen nimmt stetig zu. FRET-basierte Techniken wurden in einer Vielzahl von Berichten zur Untersuchung von Biomolekül-Konformationen und kurzreichweitigen Wechselwirkungen zwischen Molekülen vorgestellt.^[161–164] Dabei wurde umfassend über konjugierte Polyelektrolyte als sehr empfindliche Biosensoren berichtet, die auf einem außergewöhnlich effizienten, durch eine „Superlöschung“ („superquenching“) charakterisierten Energietransfer basieren.^[27,29,32] In unserer Diskussion hier legen wir den Schwerpunkt auf eine neue Plattform, die aufgrund der dicht gepackten Struktur und des hohen Volumenanteils von Fluorophorpolymeren einen effizienten Energietransfer innerhalb der hydrophoben P-Punkt-Nanopartikel zeigt. Die außergewöhnliche Lichtsammelfähigkeit der halbleitenden Polymere und der effiziente Intrapartikel-Energietransfer verstärken nachweislich die Fluoreszenzhelligkeit pro Partikel, bestimmen die Emissionsfarbe und verbessern die Photostabilität der P-Punkte. Insbesondere können neue Sensorfunktionen geschaffen werden, wenn bestimmte Moleküle mit Sensorfunktionen in die P-Punkte dotiert werden. Der Intrapartikel-Energietransfer vom Polymerdonor zum Farbstoffakzeptor führt zu Emissionen, die empfindlich auf bestimmte Analyte oder auf Umweltveränderungen reagieren.^[52,59,60,77]

Anfangs wurden hydrophobe molekulare Spezies für eine Farbstoffdotierung ausgewählt, da diese ohne Weiteres über

hydrophobe Wechselwirkungen in die hydrophoben P-Punkte eingebaut werden können. Das erste Beispiel für einen P-Punkt-Sensor war die Entwicklung von mit dem phosphoreszierenden Farbstoff Platinocäthylporphyrin (PtOEP) dotierten P-Punkten als Sauerstoffsensor.^[52] Die PtOEP dotierten P-Punkte zeigten einen effizienten Intrapartikel-Energietransfer vom Polymerwirt zum phosphoreszierenden Farbstoff, was zu einer hellen Phosphoreszenz führte, die hoch empfindlich auf die Konzentration von molekularem Sauerstoff reagierte (Abbildung 18 A).

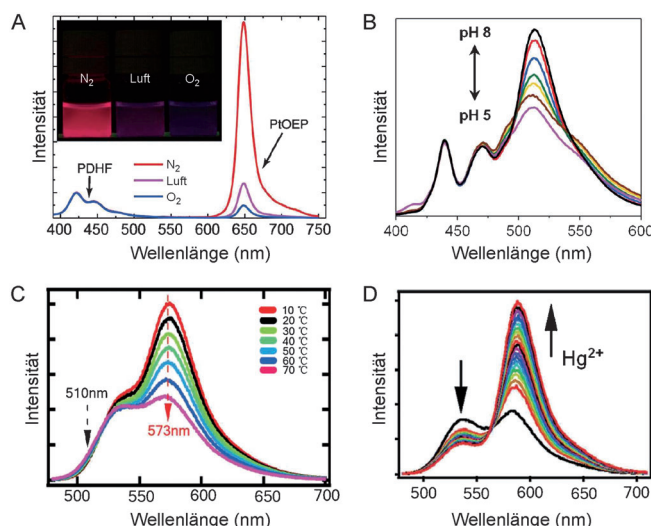


Abbildung 18. Auf einem Energietransfer basierende P-Punkt-Sensoren. A) Sauerstoffabhängiges Emissionsspektrum von mit PtOEP dotierten PDHF-P-Punkten. Der Einschub zeigt mit UV-Licht beleuchtete Photoaufnahmen der wässrigen P-Punkt-Lösungen, die jeweils mit Stickstoff, Luft und Sauerstoff gesättigt wurden. Wiedergabe nach Lit. [52] mit freundlicher Genehmigung. B) Fluoreszenzspektren von mit Fluorescein konjugierten PPE-P-Punkten bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von 5 bis 8. Wiedergabe nach Lit. [60] mit freundlicher Genehmigung. C) Fluoreszenzspektren von mit RhB konjugierten PFBT-P-Punkten bei verschiedenen Temperaturen von 10 °C bis 70 °C. Wiedergabe nach Lit. [59] mit freundlicher Genehmigung. D) Fluoreszenzspektren von mit RhB-SL dotierten PFBT-P-Punkten in wässriger Suspension mit steigender Quecksilberionenkonzentration von 0 auf 0.57 μM . Wiedergabe nach Lit. [77] mit freundlicher Genehmigung.

Unter Verwendung unserer P-Punkt-Funktionalisierungsstrategien war es möglich, eine ganze Reihe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zur Entwicklung von P-Punkt-basierten Sensoren zu verwenden.^[59,60] Unsere Gruppe entwickelte eine pH-empfindliche P-Punkt-Sonde aus dem halbleitenden Polymer PPE und dem pH-empfindlichen Farbstoff Fluorescein.^[60] Der hydrophile Farbstoff wurde kovalent auf die P-Punkt-Oberfläche gebunden, und der Energietransfer vom Polymerdonor zum Farbstoffakzeptor diente als ratiometrische Plattform für einen pH-Sensor. Zum Nachweis einer intrazellulären pH-Wert-Bestimmung wurden HeLa-Zellen verwendet, die diese P-Punkte über Endozytose aufgenommen hatten. Der lineare pH-Bereich für den P-Punkt-Sensor liegt zwischen pH 5.0 und 8.0 (Abbildung 18 B), was für die meisten Zelluntersuchungen geeignet ist.

In einer späteren Untersuchung wurden temperaturempfindliche P-Punkte konstruiert, die auf den halbleitenden Polymeren PFBT und PFPV sowie einem temperaturempfindlichen Farbstoff Rhodamin B (RhB) basierten.^[59] Um den hydrophilen RhB-Farbstoff gleichmäßig in den P-Punkten zu verteilen, wurden die kleinen Farbstoffmoleküle kovalent mit einem hydrophoben Polystyrol verknüpft und dann mit den hydrophoben halbleitenden Polymeren vermischt. Wie auch die pH-Sensoren zeigten die P-Punkte einen effizienten Energietransfer von der Polymermatrix auf die Farbstoffakzeptoren, was zu einer ratiometrischen Temperaturabstufung führte. Diese P-Punkt-Sensoren zeigten eine lineare Fluoreszenzantwort zwischen 10 und 70°C (Abbildung 18C). In HeLa-Zellen wurde eine effiziente zelluläre Aufnahme der P-Punkte beobachtet, und die nachfolgend aufgenommenen Zellbilder und Temperaturbestimmungen waren mit den durch ein Thermoelement gemessenen Ergebnissen konsistent, womit das Potenzial dieser P-Punkte als empfindliche intrazelluläre Temperatursensoren belegt wird.

Auch Nanopartikel-basierte Ionensensoren haben einiges Interesse geweckt, und zwar aufgrund ihrer Einfachheit, Selektivität, hohen Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit.^[165,166] P-Punkt-basierte Ionensensoren wurden entwickelt, um biologisch- und umweltrelevante Ionen wie Cu^{2+} , Fe^{2+} und Hg^{2+} nachzuweisen. In einer einzelnen Plattform koordinierten carboxyfunctionalisierte P-Punkte direkt mit Cu^{2+} - oder Fe^{2+} -Ionen, was zu einer Fluoreszenzlöschung aufgrund von P-Punkt-Aggregation führte.^[62] Die Cu^{2+} -induzierte Aggregation konnte durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zu der Lösung rückgängig gemacht werden; die Fe^{2+} -induzierte Aggregation war nicht reversibel. Die selektive Fluoreszenzwiederherstellung ermöglichte den Sensoren eine Unterscheidung zwischen Kupfer- und Eisenionen und die Bestimmung ihrer jeweiligen Konzentrationen. In einer erst kürzlich durchgeführten Untersuchung wurde basierend auf der Farbstoffdotierungsstrategie ein Hg^{2+} -Fluoreszenzsensor entwickelt.^[77] Dieser Hg^{2+} -Sensor wurde aus PFBT-P-Punkten hergestellt, die mit dem molekularen Farbstoff Rhodamin-Spirolactam (RhB-SL) dotiert waren. Die Farbstoffmoleküle waren nicht fluoreszierend, bis sie auf Quecksilberionen trafen, die eine irreversible Reaktion förderten und die nichtfluoreszierenden Farbstoffe in fluoreszierende Rhodamine umwandelten. Das Fluoreszenzintensitätsverhältnis des Farbstoffakzeptors zum PFBT-Donor ermöglichte eine ratiometrische Erfassung von Quecksilberionen. Die Lichtsammelfähigkeit der P-Punkte verstärkte die Fluoreszenzintensität der Rhodamin-Farbstoffe um einen Faktor von 10, was eine empfindliche Detektion von Quecksilberionen in Wasser ermöglichte (Abbildung 18D). Zusammengefasst zeigen die vielseitigen P-Punkt-basierten Sensorplattformen die vielversprechenden Möglichkeiten, die P-Punkte im Hinblick auf chemische Sensoranwendungen bieten.

Erst kürzlich haben Swager und Mitarbeiter eine neue Art von Nanopartikelsensoren vorgestellt, die auf einem Energietransfer von Sensorbiomolekülen, z.B. einer Protease, basieren.^[74] Die Nanopartikel bestanden aus einem stark fluoreszierenden PPE-Polymer mit willkürlich in das PPE-Grundgerüst eingefügten, rot emittierenden Perylen-Einheiten und einer Succinimid-Gruppen tragenden terminalen

Einheit. Unter Ausnutzung der auf dem Energietransfer basierenden Fluoreszenzverstärkung zeigten die aus diesem Polymer hergestellten Nanopartikel eine helle Fluoreszenz mit zwei Maxima sowohl vom PPE-Polymer als auch von der Perylen-Einheit. Beide Emissionsmaxima konnten bei Vernetzung der Nanopartikelschale (Aus-Zustand) durch Reaktion der Succinimid-Gruppen mit einem kurzen Peptid weiter gelöscht werden. Die Vernetzung zwingt die Nanopartikel effizient in einen enger aggregierten und gelöschten Zustand. Als Reaktion auf die Protease wurden die Peptidvernetzer abgespalten und die Spannung wurde freigesetzt, was zu einem „Anschalten“ der Fluoreszenzantwort führte. Sensorassays unter physiologischen Bedingungen zeigten eine 15-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit der Protease (Abbildung 19).^[74]

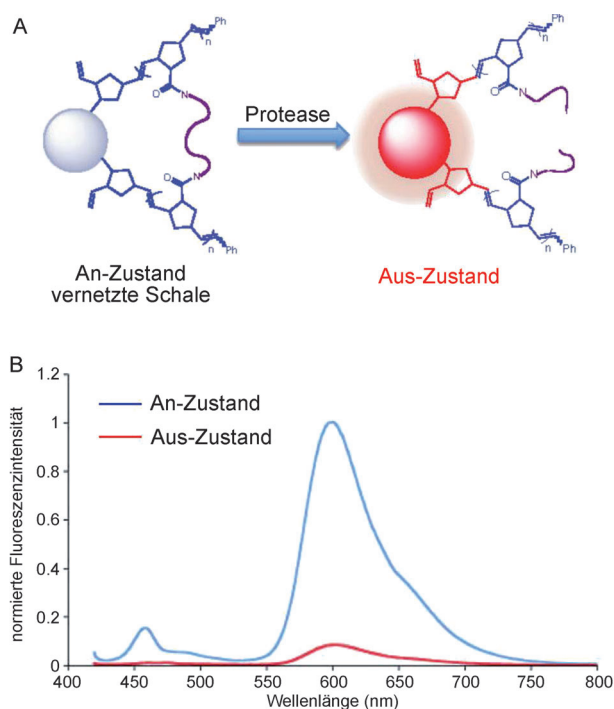


Abbildung 19. Nanopartikel aus halbleitendem Polymer für einen Proteasesensor. A) Schema des durch Protease ausgelösten „Anschaltens“. Die Vernetzung zwingt die Nanopartikel effizient in einen enger aggregierten und gelöschten Zustand. Die Protease spaltet die Peptidvernetzer und setzt die Spannung frei, was zu einem „Anschalten“ der Fluoreszenzantwort führt. B) Fluoreszenzspektren von Schale-vernetzten Nanopartikel-Suspensionen vor (rot) und nach (blau) Inkubation mit Trypsin. Wiedergabe nach Lit. [74] mit freundlicher Genehmigung.

Zusätzlich zu der auf der Farbstoffdotierungsstrategie und dem Energietransfer basierenden Sensorfunktion entwickelten Harbron und Mitarbeiter photoschaltbare P-Punkte, die mit photochromen Spirooxazin oder Diarylethen-Farbstoffen dotiert waren.^[75,76] In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde die Fluoreszenz-Photoschaltung der Diarylethen-dotierten PFBT-Nanopartikel in einer zellulären Umgebung vorgestellt.^[78] Photoschaltbare Sonden sind besonders attraktiv, da sie potenziell in extrem hochauflösenden Bildgebungstechniken verwendet werden können, die Zellstruk-

turen wiedergeben können, die sehr viel kleiner als die beugungsbegrenzten Punktgrößen sind.^[9,11] Die derzeit verfügbaren photoschaltbaren P-Punkte zeigen jedoch im Allgemeinen nicht das binäre An-Aus-Schalten, das für die meisten für eine extrem hochauflösende Bildgebung verwendeten Modelle benötigt wird.

5.7. Wirkstoff- und Gentransport

In der Nanomedizin gibt es intensive Anstrengungen mit dem Ziel, Nanopartikel für einen spezifischen Transport von Wirkstoffen, Hitze oder anderen Substanzen zu den erkrankten Geweben zu verwenden.^[167,168] Mit ihrer flexiblen Polymermatrix bieten konjugierte Polymernanopartikel ein geeignetes System für die Verkapselung von Wirkstoffen und anderen therapeutischen Mitteln. Hydrophobe P-Punkte als Transportsystem können auch Probleme hinsichtlich der Löslichkeit von Wirkstoffen überwinden. Dies hat erhebliche Auswirkungen, da mehr als 40 % der durch kombinatorisches Screening identifizierten Wirkstoffe nur schlecht in Wasser löslich sind.^[169] Diese Wirkstoffe können potenziell in P-Punkte dotiert oder darin verkapselt werden, um zum erkrankten Gewebe transportiert und dort freigesetzt zu werden. Bis heute existieren nur wenige Arbeiten, in denen P-Punkte für einen Wirkstofftransport verwendet werden. Allerdings wurden aus amphiphilen halbleitenden Polymeren und Polyelektrolyten hergestellte Nanopartikel als vielseitige Systeme für den Wirkstoff- und Gentransport eingesetzt. Z. B. synthetisierten Wang und Mitarbeiter konjugierte Polymernanopartikel (ca. 50 nm Durchmesser) durch eine elektrostatische Aggregation des kationischen konjugierten fluoreszierenden Polymers PFO mit anionischer Poly(L-glutaminsäure), die wiederum mit dem Antikrebswirkstoff Doxorubicin konjugiert war (PG-Dox).^[86] Dieses Nanopartikelsystem lieferte Doxorubicin zu den gewünschten Krebszellen, und da Doxorubicin die PFO-Fluoreszenz löscht, konnte die Wirkstoff-Freisetzung anhand des Auftretens der PFO-Fluoreszenz überwacht werden. Die gleiche Gruppe nutzte auch einen kationischen Poly(*p*-phenylvinyl)-Polyelektrolyten in einer Zellkulturuntersuchung, der selektiv an Bakterienzellen band und diese schädigte.^[170] Die hohe negative Ladungsdichte der Bakterienzelloberfläche ermöglichte eine selektive Bindung des kationischen Polymers an Bakterien, nicht jedoch an Säugetierzellen. Bei Bestrahlung mit Licht wurde der Polyelektrolyt angeregt, erzeugte vermutlich ROS und tötete die Bakterienzellen ab. Liu und Mitarbeiter berichteten ebenfalls über ein Wirkstofftransportsystem, das auf mit dem Antikrebsmittel Cisplatin beladenen konjugierten Polyelektrolyt-Nanopartikeln basierte.^[88] Diese Wirkstoff-beladenen Nanopartikel wurden als In-vivo-Fluoreszenzbildgebungssonden vorgestellt, die simultan die langsame und kontinuierliche Wirkstoff-Freisetzung in Nacktmäusen bei intravenöser Verabreichung verfolgten.

Amphiphile und hydrophile halbleitende Polymernanopartikel wurden auch im Hinblick auf einen Gentransport untersucht.^[92] In einer Studie wurde ein lipidmodifiziertes kationisches Poly(fluorenylphenyl)-Polymer (PFPL) mit anhängenden Ammoniumgruppen synthetisiert, das über

elektrostatische Wechselwirkungen an DNA binden konnte. Das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende pCX-EGFP-Plasmid wurde mit diesen PFPL-Nanopartikeln zusammengebracht, um einen Nanopartikel-Plasmid-Komplex zu bilden, der über Endozytose von A549-Zellen aufgenommen wurde. Die grüne Fluoreszenz vom GFP wurde beobachtet (Abbildung 20 A), was zeigt, dass die Nanoparti-

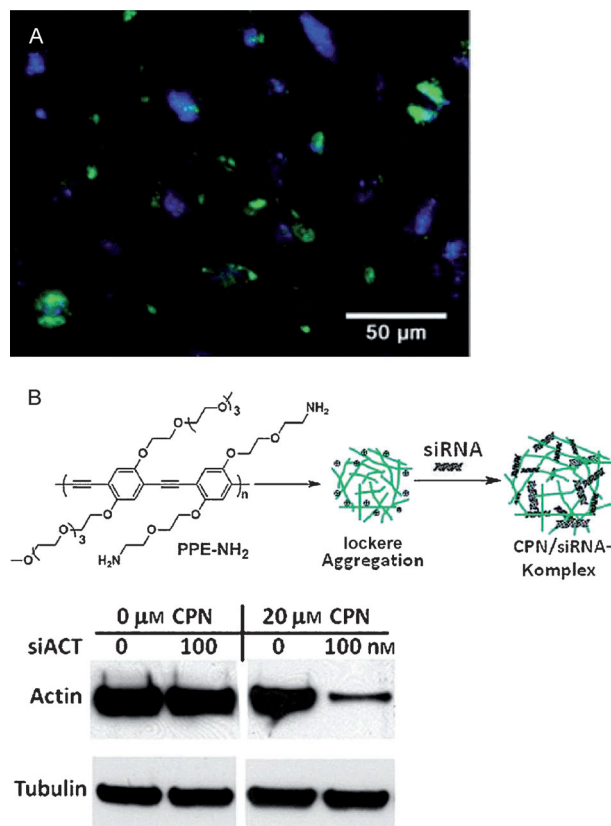


Abbildung 20. Konjugierte Polymernanopartikel für einen Gentransport. A) Lipidmodifizierte kationische PFPL-Nanopartikel für den Transport von für GFP kodierenden pCX-EGFP-Plasmiden. Fluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen nach Inkubation mit PFPL/pCX-EGFP-Nanopartikeln zeigte sowohl die blaue Fluoreszenz von PFPL als auch die grüne Fluoreszenz von GFP, was darauf hindeutet, dass die PFPL-Nanopartikel Plasmide erfolgreich in Zellen überführt haben. Wiedergabe nach Lit. [92] mit freundlicher Genehmigung. B) Locker aggregierte PPE-Nanopartikel zum Transport von kurzer interferierender RNA. Oben ist eine Darstellung von locker aggregierten, mit siRNA komplexierten PPE-Partikeln gezeigt. Unten sind Western-Blots von Actin B (Ziel) und Tubulin (Kontrolle) abgebildet. Durch die CPN/siACT-Transfektion wurde eine signifikante Verringerung des Zielproteins beobachtet. Die Actin B-Expression nahm unter Transfektionsbedingungen um etwa 94 % ab. Wiedergabe nach Lit. [85] mit freundlicher Genehmigung.

kel Plasmide erfolgreich in Zellen für eine weitere Transkription und Translation ablieferten.^[92] In einer weiteren Studie wurde aminhaltiges hydrophiles PPE in Form lose aggregierter Partikel hergestellt.^[85] Diese Partikel bildeten stabile Komplexe mit kurzer interferierender RNA (siRNA). Die Komplexe wurden zu HeLa-Zellen transportiert, und es wurde eine signifikante Herabregulierung des Zielgens be-

obachtet (Abbildung 20B). Zwar befinden sich diese Untersuchungen noch in einem frühen Stadium, aber dennoch deuten sie bereits auf das Potenzial der Verwendung von halbleitenden Polymernanopartikeln sowohl als Bildgebungssonden als auch als Transportvehikel hin.

Kürzlich wurde beträchtliches Interesse an der Entwicklung von Nanopartikel-basierten Photosensibilisatoren geäußert.^[171–176] Derzeitig verfügbare Nanopartikel-Photosensibilisatoren bestehen typischerweise aus in Polymer-/Siliciumdioxid-Nanopartikeln verkapselten photosensibilisierenden Farbstoffen^[171–174] oder solchen, die an eine Q-Punkt-Oberfläche konjugiert sind, was zu einer Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer führt.^[175,176] Diese Strategien werden jedoch durch ein geringes Absorptionsvermögen und/oder einen wenig effizienten Energietransfer eingeschränkt. Durch Einschließen von Photosensibilisatoren in P-Punkte ließen sich wirksame Nanopartikel-Photosensibilisatoren mit großem Absorptionsvermögen und einem hoch effizienten Intrapartikel-Energietransfer erhalten. McNeill und Mitarbeiter haben einen P-Punkt entwickelt, der aus einem mit dem Singulett-Sauerstoff-Photosensibilisator Tetraphenylporphyrin (TPP) dotierten halbleitenden Polymer besteht.^[49] TPP-dotierte P-Punkte haben sich, wie kürzlich vorgestellt, als vielversprechend für die photodynamische Therapie sowohl mit Ein-Photon- als auch mit Zwei-Photonen-Anregung erwiesen.^[55,79,80] Spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass das Polymer effizient Energie absorbiert und zum Porphyrin-Sensibilisator transferiert, was zu einer hoch effizienten Erzeugung von Singulett-Sauerstoff führt. Die Quantenausbeute der Singulett-Sauerstoff-Produktion wurde auf etwa 0.6–0.8 bestimmt, was mit der von derzeit verfügbaren Photosensibilisatoren vergleichbar oder sogar höher ist.^[55] Gelelektrophorese von DNA nach UV-Bestrahlung in Gegenwart der P-Punkte deutete auf eine beträchtliche DNA-Schädigung durch ROS hin. Ähnlich wie die Farbstoff-dotierten P-Punkt-Sensoren ziehen die P-Punkt-Photosensibilisatoren einen Vorteil aus der flexiblen Polymermatrix für eine Verkapselung (ein allgemeines Merkmal von Polymeren) und den einzigartigen optischen Eigenschaften der P-Punkte (großes Absorptionsvermögen und effizienter Intrapartikel-Energietransfer), um die Leistung der dotierenden Funktion zu verbessern.

6. Aktuelle Herausforderungen und Trends

P-Punkte stellen eine neue Klasse fluoreszierender Nanopartikel dar. Wie bei allen neuen Nanopartikeln werden die Gestaltungskriterien für anspruchsvolle biologische Anwendungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, immer noch formuliert. Aufgrund der großen Zahl an verfügbaren halbleitenden Polymeren, die von hydrophoben Polymeren bis hin zu Polyelektrolyten reichen, können wir allgemeine Überlegungen zur Gestaltung von fluoreszierenden Hochleistungs-sonden sowie den auftretenden Herausforderungen anstellen. Unserer Meinung nach sind kleine und helle P-Punkte für die meisten biologischen und Bildgebungsanwendungen und Fluoreszenzassays äußerst wichtig. Hinsichtlich der Leistung der Sonde, etwa bezüglich ihrer Fluoreszenzhelligkeit, haben

verschiedene farbige P-Punkte zuverlässig Quantenausbeuten von 30–60 % gezeigt,^[56,58,63] was mit denen von anorganischen Q-Punkten und vielen niedermolekularen organischen Fluorophoren vergleichbar ist. Demzufolge ist der Absorptionsquerschnitt von P-Punkten der wichtigste Faktor für ihre Fluoreszenzhelligkeit. Der Absorptionsquerschnitt hängt vom Volumenanteil sowie von der Packungsdichte der Fluorophore für eine gegebene Partikelgröße ab. Daher sind hohe Fluorophoranteile und dicht gepackte Strukturen für die Entwicklung heller P-Punkt-Sonden hoch erwünscht. Wir müssen die Herstellungsverfahren für P-Punkte jedoch noch weiter verbessern, sodass wir zuverlässig verschiedene Größen mit einer engen Größenverteilung herstellen können.

Bei der P-Punkt-Funktionalisierung scheint die direkte Funktionalisierung der beste Ansatz zur Modifizierung der Oberfläche von hydrophoben P-Punkten zu sein.^[65] Hydrophile funktionelle Gruppen sind allgemein von Nutzen und können kovalent mit den Seitenketten oder terminalen Einheiten von hydrophoben halbleitenden Polymeren verknüpft werden. Die direkte Funktionalisierung kann die Helligkeit pro Partikel, innere Struktur, Nanopartikelstabilität und unspezifisches Markieren in biologischen Anwendungen beträchtlich beeinflussen. Daher muss die Dichte der funktionellen Gruppen zur Maximierung der Sondenleistung sorgfältig kontrolliert werden.^[65] Zudem ist es äußerst schwierig, die Zahl und geometrische Verteilung der chemischen funktionellen Gruppen zu steuern, da auf der Nanopartikeloberfläche eine Vielzahl reaktiver Stellen vorhanden ist. In zellbasierten Analysen können die multiplen Bindungsstellen der Nanopartikel eine Vernetzung der an der Signalwegaktivierung beteiligten Zelloberflächenproteine verursachen und so die Rezeptorbindungsfähigkeit drastisch herabsetzen. Daher sind für viele biologische Anwendungen P-Punkte mit monofunktionellen Gruppen hoch erwünscht. Diese Herausforderung stellt eine klare Motivation zur Erkundung neuer Ansätze zur Funktionalisierung von P-Punkten mit einer vorbestimmten und genau kontrollierten Zahl funktioneller Gruppen dar.

Hinsichtlich der spektroskopischen Eigenschaften von P-Punkten stellen die sehr breiten Emissionsspektren der derzeit erhältlichen P-Punkt-Spezies einen gravierenden Nachteil dar. Zum Beispiel zeigt PFBT, eine sehr gut untersuchte P-Punkt-Spezies eine Halbwertsbreite (HWB) von etwa 75 nm, was etwa zweimal breiter ist als die von anorganischen Q-Punkten, die im sichtbaren Bereich emittieren. Die meisten biologischen Anwendungen verlangen, dass gleichzeitig mehrere Ziele detektiert werden; spektrale „Multiplex“-Analysen erfordern, dass Sonden Emissionen mit enger Bandenbreite aufweisen. Die breiten Emissionsspektren der herkömmlichen P-Punkt-Spezies schränken deren Nützlichkeit für „Multiplex“-Anwendungen beträchtlich ein. Es besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuer P-Punkt-Varianten, die bei verschiedenen Wellenlängen mit einer engen spektralen Bandweite emittieren können. Erst kürzlich haben wir die Synthese von halbleitenden Polymeren mit Bordipyromethen(BODIPY)-Einheiten beschrieben, die mehrfarbige, hell emittierende P-Punkte mit einer HWB von nur 40–50 nm erzeugen.^[67] Diese P-Punkte sind für „Multiplex“-Anwendungen durchaus vielversprechend. Die

meisten P-Punkt-Spezies zeigen Emissionen im sichtbaren Bereich, mithilfe der Farbstoffdotierungsmethode kann die Fluoreszenz aber bis in den Nahinfrarotbereich verschoben werden, etwa auf 777 nm.^[61] Stark fluoreszierende P-Punkt-Spezies mit breiter Absorption und Emission im NIR-Bereich sind für In-vivo-Anwendungen bevorzugt, da biologische Gewebe diese Wellenlängen in minimalem Ausmaß absorbieren. Diese Anforderungen bieten eine Vielzahl von Forschungsmöglichkeiten für Polymerchemiker, um neue Polymerspezies mit engbandigen und/oder NIR-Emissionen zu untersuchen.

Auch bei der Verwendung von P-Punkten für klinische Studien sind noch detaillierte Untersuchungen erforderlich. In einem kürzlich erschienenen Beitrag^[160] wurden drei Kriterien für die Bewertung von Nanopartikeln hinsichtlich eines potenziellen klinischen Nutzes vorgeschlagen: 1) ein endgültiger hydrodynamischer Durchmesser (HD) unter 5.5 nm, um eine schnelle renale Clearance zu ermöglichen, und/oder 2) eine Formulierung mit vollkommen nichttoxischen Komponenten und/oder 3) biologische Abbaubarkeit zu aus dem Körper entfernbaren Komponenten. Zu diesen drei Gestaltungskriterien ist ebenfalls weitere Forschung erforderlich. Es wird ein besseres Verfahren benötigt, um kleine P-Punkt-Größen sowie Monodispersität zu erhalten. Für nichttoxische Materialien ist eine renale Clearance (HD < 5.5 nm) möglicherweise nicht notwendig. Die Partikelgröße wirkt sich jedoch auf die Bioverteilung und die „Targeting“-Effizienz aus. Die langfristige In-vivo-Toxizität von P-Punkten muss ebenfalls noch untersucht werden, obwohl P-Punkte in Zellkulturuntersuchungen biologisch harmlos zu sein schienen. Unserer Meinung nach sind dies die wesentlichen Aspekte für eine weitere Entwicklung von P-Punkten für eine Vielzahl von biologischen und klinischen Anwendungen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl halbleitende Polymere seit nunmehr drei Jahrzehnten untersucht werden, ist ihre Anwendung in fluoreszierenden Nanopartikeln erst seit einigen Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Halbleitende P-Punkte zeigen faszinierende Eigenschaften als Fluoreszenzsonden, wie eine außerordentliche Helligkeit, hohe und stabile Emissionsraten, eine ausgezeichnete Photostabilität und fehlende Toxizität. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Partikelgröße, Morphologie, innere Struktur und Funktionalisierungsmethoden alle für die Leistungsfähigkeit von P-Punkten in praktischen biologischen Anwendungen entscheidend sind. Darüber hinaus bieten P-Punkte eine einzigartige Plattform zur Entwicklung multifunktionaler Sonden, in denen die außerordentliche Fluoreszenzhelligkeit und der effiziente Intrapartikel-Energietransfer mit einer flexiblen nichttoxischen Polymermatrix kombiniert sind, was eine Dotierung mit vielseitigen Sensormolekülen, Wirkstoffen und Kontrastmitteln ermöglicht.

Obwohl die Vorteile der P-Punkte gegenüber kleinen Farbstoffmolekülen und anorganischen Q-Punkten auf der Hand liegen, sind die drei Arten von Sonden ohne eine konkrete Anwendung nur schwer vergleichbar. Niedermole-

kulare Farbstoffe werden trotz ihrer nicht optimalen Helligkeit und Photostabilität weit verbreitet als Fluoreszenzmarker in der Fluoreszenzbildgebung und in Assays eingesetzt, und zwar aufgrund der gut bewährten Markierungsprotokolle und der molekularen Abmessungen. P-Punkte und Q-Punkte verhalten sich als Nanopartikel mit Oberflächeneigenschaften, nicht als Moleküle, was ihre Wechselwirkung mit Biomolekülen und auch ihre Anwendung in biologischen Umgebungen kompliziert macht. Die ausgezeichneten Eigenschaften der Nanopartikelmarker können jedoch bei der Lösung hartnäckiger Probleme in Anwendungen helfen, bei denen Helligkeit und langfristige Photostabilität entscheidend sind. Was nun P-Punkte und Q-Punkte angeht, so zeigen die verschiedenen Untergruppen der fluoreszierenden Nanopartikel jeweils für sich ausgeprägte Eigenschaften. P-Punkte bieten eine starke Helligkeit und sind nicht toxisch, Q-Punkte zeigen dagegen enge und symmetrische Emissionen. Wir möchten Forscher dazu ermutigen, Fluoreszenzsonden auf einer Fall-zu-Fall-Basis zu bewerten und auszuwählen und Verallgemeinerungen soweit wie möglich zu vermeiden.

Unserer Meinung nach wird die Entwicklung und Anwendung von P-Punkt-Biokonjugaten auch weiterhin ein aktiver und wichtiger Bereich der Fluoreszenzbildgebung und biomedizinischen Untersuchungen bleiben. Die Forschung im Bereich der P-Punkte wird auch weiterhin mit neuen Entdeckungen und Herausforderungen aufwarten. Dabei bedarf es einer fachübergreifenden Zusammenarbeit zwischen Chemikern, Biologen und Klinikärzten. Wir glauben, dass die Untersuchung neuer P-Punkt-Spezies mit besserer Leistungsfähigkeit, genau kontrollierten Oberflächeneigenschaften und multimodalen Bildgebungs-/Sensorfunktionalitäten zukünftig den Hauptschwerpunkt dieses Bereichs bilden werden. Bei einer Optimierung der P-Punkt-Technologie sollte diese weitreichende und bleibende Auswirkungen auf die biomedizinische Bildgebung, Diagnostik und Therapeutik haben.

Wir danken dem National Institutes of Health, der National Science Foundation, und der University of Washington (USA) für die Unterstützung. C.W. dankt dem „Thousand Talents Program“, der National Science Foundation of China (Nr. 61222568) und der Jilin University (China) für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 30. Juni 2012

Online veröffentlicht am 10. Januar 2013

Übersetzt von Dr. Christiane Feldmann-Leben, Ettlingen

- [1] D. Evanko, *Nat. Methods* **2005**, 2, 901. (Diese Ausgabe umfasst eine Reihe von Übersichtsartikeln zu Fluoreszenzbildgebungstechniken.)
- [2] R. Pepperkok, J. Ellenberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 690.
- [3] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer, **2006**.
- [4] W. T. Mason, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, 2. Aufl., Academic Press, London, **1999**.
- [5] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science* **2003**, 300, 2061.
- [6] X. S. Xie, J. Yu, W. Y. Yang, *Science* **2006**, 312, 228.

- [7] W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12596.
- [8] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642.
- [9] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. W. Zhuang, *Science* **2007**, *317*, 1749.
- [10] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153.
- [11] B. Huang, W. Q. Wang, M. Bates, X. W. Zhuang, *Science* **2008**, *319*, 810.
- [12] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763.
- [13] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509.
- [14] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905.
- [15] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612.
- [16] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013.
- [17] W. C. W. Chan, S. M. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [18] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
- [19] X. J. Zhao, R. P. Bagwe, W. H. Tan, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 173.
- [20] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 113.
- [21] L. Wang, K. M. Wang, S. Santra, X. J. Zhao, L. R. Hilliard, J. E. Smith, J. R. Wu, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 646.
- [22] Q. Pei, G. Yu, C. Zhang, Y. Yang, A. Heeger, *Science* **1995**, *269*, 1086.
- [23] R. H. Friend, R. W. Gymer, A. B. Holmes, J. H. Burroughes, R. N. Marks, C. Taliani, D. D. C. Bradley, D. A. Dos Santos, J. L. Bredas, M. Loglund, W. R. Salaneck, *Nature* **1999**, *397*, 121.
- [24] C. D. Müller, A. Falcou, N. Reckefuss, M. Rojahn, V. Wiederhirn, P. Rudati, H. Frohne, O. Nuyken, H. Becker, K. Meerholz, *Nature* **2003**, *421*, 829.
- [25] H. B. Wu, L. Ying, W. Yang, Y. Cao, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3391.
- [26] L. Chen, D. W. McBranch, H. L. Wang, R. Helgeson, F. Wudl, D. G. Whitten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12287.
- [27] P. S. Heeger, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12219.
- [28] C. H. Fan, S. Wang, J. W. Hong, G. C. Bazan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6297.
- [29] M. R. Pinto, K. S. Schanze, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7505.
- [30] D. T. McQuade, A. E. Pullen, T. M. Swager, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2537.
- [31] S. W. Thomas, G. D. Joly, T. M. Swager, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1339.
- [32] K. Y. Pu, B. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 3408.
- [33] X. L. Feng, L. B. Liu, S. Wang, D. B. Zhu, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2411.
- [34] A. Duarte, K. Y. Pu, B. Liu, G. C. Bazan, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 501.
- [35] C. Zhu, L. Liu, Q. Yang, F. Lv, S. Wang, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4687.
- [36] K. Landfester, R. Montenegro, U. Scherf, R. Guntner, U. Asawapirom, S. Patil, D. Neher, T. Kietzke, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 651.
- [37] T. Piok, S. Gamerith, C. Gadermaier, H. Plank, F. P. Wenzl, S. Patil, R. Montenegro, T. Kietzke, D. Neher, U. Scherf, K. Landfester, E. J. W. List, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 800.
- [38] T. Kietzke, D. Neher, K. Landfester, R. Montenegro, R. Guntner, U. Scherf, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 408.
- [39] N. Kurokawa, H. Yoshikawa, N. Hirota, K. Hyodo, H. Masuhara, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1609.
- [40] J. Pecher, S. Mecking, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6260.
- [41] A. Kaeser, A. P. H. J. Schenning, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 2985.
- [42] D. Tuncel, H. V. Demir, *Nanoscale* **2010**, *2*, 484.
- [43] Z. Tian, J. Yu, C. Wu, C. Szymanski, J. McNeill, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1999.
- [44] K. Li, B. Liu, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 1257.
- [45] C. Szymanski, C. Wu, J. Hooper, M. A. Salazar, A. Perdomo, A. Dukes, J. D. McNeill, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8543.
- [46] C. Wu, C. Szymanski, J. McNeill, *Langmuir* **2006**, *22*, 2956.
- [47] C. Wu, H. Peng, Y. Jiang, J. McNeill, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 14148.
- [48] C. Wu, C. Szymanski, Z. Cain, J. McNeill, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12904.
- [49] C. Wu, Y. Zheng, C. Szymanski, J. McNeill, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1772.
- [50] C. Wu, J. McNeill, *Langmuir* **2008**, *24*, 5855.
- [51] C. Wu, B. Bull, C. Szymanski, K. Christensen, J. McNeill, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2415–2423.
- [52] C. Wu, B. Bull, C. Szymanski, K. Christensen, J. McNeill, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2779–2783; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2741–2745.
- [53] J. Yu, C. Wu, S. Sahu, L. Fernando, C. Szymanski, J. McNeill, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18410–18414.
- [54] J. Yu, C. Wu, Z. Tian, J. McNeill, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 1300.
- [55] J. L. Grimland, C. F. Wu, R. R. Ramoutar, J. L. Brumaghim, J. McNeill, *Nanoscale* **2011**, *3*, 1451.
- [56] C. Wu, T. Schneider, M. Zeigler, J. Yu, P. Schiro, D. Burnham, J. D. McNeill, D. T. Chiu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15410.
- [57] C. Wu, Y. Jin, T. Schneider, D. R. Burnham, P. B. Smith, D. T. Chiu, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9626; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9436.
- [58] C. Wu, S. Hansen, Q. Hou, J. Yu, M. Zeigler, Y. Jin, D. Burnham, J. McNeill, J. Olson, D. T. Chiu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3492; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3430.
- [59] F. Ye, C. Wu, Y. Jin, Y. Chan, X. Zhang, D. T. Chiu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8146.
- [60] Y. Chan, C. Wu, F. Ye, Y. Jin, P. B. Smith, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1448.
- [61] Y. Jin, F. Ye, M. Zeigler, C. Wu, D. T. Chiu, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1468.
- [62] Y. Chan, Y. Jin, C. Wu, D. T. Chiu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2820.
- [63] F. Ye, C. Wu, Y. Jin, M. Wang, Y. Chan, J. Yu, W. Sun, S. Hayden, D. T. Chiu, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1778.
- [64] Y. Jin, F. Ye, C. Wu, Y. Chan, D. T. Chiu, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3161.
- [65] X. Zhang, J. Yu, C. Wu, Y. Jin, F. Ye, D. T. Chiu, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5429.
- [66] J. Yu, C. Wu, X. Zhang, F. Ye, M. E. Gallina, Y. Rong, Y. Wu, W. Sun, Y.-H. Chan, D. T. Chiu, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3498.
- [67] Y. Rong, C. Wu, J. Yu, X. Zhang, F. Ye, M. Zeigler, M. E. Gallina, I. Wu, Y. Zhang, Y. Chan, W. Sun, K. Uvdal, D. T. Chiu, *ACS Nano*, im Druck.
- [68] L. P. Fernando, P. K. Kandel, J. B. Yu, J. McNeill, P. C. Ackroyd, K. A. Christensen, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2675.
- [69] M. C. Baier, J. Huber, S. Mecking, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14267–14273.
- [70] J. Pecher, S. Mecking, *Macromolecules* **2007**, *40*, 7733.
- [71] J. Pecher, J. Huber, M. Winterhalder, A. Zumbusch, S. Mecking, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2776.
- [72] S. Kim, C. K. Lim, J. Na, Y. D. Lee, K. Kim, K. Choi, J. F. Leary, I. C. Kwon, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1617.
- [73] J. Lim, T. M. Swager, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7648; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7486.
- [74] C. Cordovilla, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6932.
- [75] E. J. Harbron, C. M. Davis, J. K. Campbell, R. M. Allred, M. T. Kovary, N. J. Economou, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13707.

- [76] C. M. Davis, E. S. Childress, E. J. Harbron, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 19065.
- [77] E. S. Childress, C. A. Roberts, D. Y. Sherwood, C. L. M. Le-Guyader, E. J. Harbron, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1235.
- [78] Y. Osakada, L. Hanson, B. X. Cui, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3285.
- [79] X. Q. Shen, F. He, J. H. Wu, G. Q. Xu, S. Q. Yao, Q. H. Xu, *Langmuir* **2011**, *27*, 1739.
- [80] X. Q. Shen, L. Li, H. Wu, S. Q. Yao, Q. H. Xu, *Nanoscale* **2011**, *3*, 5140.
- [81] J. H. Moon, R. Deans, E. Krueger, L. F. Hancock, *Chem. Commun.* **2003**, 104.
- [82] J. H. Moon, W. McDaniel, P. MacLean, L. E. Hancock, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8223.
- [83] J. H. Moon, P. MacLean, W. McDaniel, L. F. Hancock, *Chem. Commun.* **2007**, 4910.
- [84] N. A. A. Rahim, W. McDaniel, K. Bardon, S. Srinivasan, V. Vickerman, P. T. C. So, J. H. Moon, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3492.
- [85] J. H. Moon, E. Mendez, Y. Kim, A. Kaur, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 8370.
- [86] X. L. Feng, F. T. Lv, L. B. Liu, H. W. Tang, C. F. Xing, Q. O. Yang, S. Wang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 2429.
- [87] K. Y. Pu, K. Li, B. Liu, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6736.
- [88] D. Ding, K. Li, Z. S. Zhu, K. Y. Pu, Y. Hu, X. Q. Jiang, B. Liu, *Nanoscale* **2011**, *3*, 1997.
- [89] R. Abbel, R. van der Weegen, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Chem. Commun.* **2009**, 1697.
- [90] S. J. Park, S. G. Kang, M. Fryd, J. G. Saven, S. J. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9931.
- [91] K. Petkau, A. Kaeser, I. Fischer, L. Brunsveld, A. P. H. J. Schenning, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17063.
- [92] X. L. Feng, Y. L. Tang, X. R. Duan, L. B. Liu, S. Wang, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1312.
- [93] K. Y. Pu, K. Li, B. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2770.
- [94] K. Li, J. Pan, S. S. Feng, A. W. Wu, K. Y. Pu, Y. T. Liu, B. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3535.
- [95] K. Li, Y. T. Liu, K. Y. Pu, S. S. Feng, R. Y. Zhan, B. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 287.
- [96] J. Geng, K. Li, K.-Y. Pu, D. Ding, B. Liu, *Small* **2012**, *8*, 2421.
- [97] K. Li, D. Ding, D. Huo, K.-Y. Pu, N. N. P. Thao, Y. Hu, Z. Li, B. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *15*, 3107.
- [98] P. Howes, M. Green, J. Levitt, K. Suhling, M. Hughes, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3989–3996.
- [99] P. Howes, M. Green, A. Bowers, D. Parker, G. Varma, M. Kallumadil, M. Hughes, A. Warley, A. Brain, R. Botnar, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9833.
- [100] P. Howes, R. Thorogate, M. Green, S. Jickells, B. Daniel, *Chem. Commun.* **2009**, 2490.
- [101] Z. Hashim, P. Howes, M. Green, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 1797.
- [102] P. K. Kandel, L. P. Fernando, P. C. Ackroyd, K. A. Christensen, *Nanoscale* **2011**, *3*, 1037.
- [103] B. Sun, M. J. Sun, Z. Gu, Q. D. Shen, S. J. Jiang, Y. Xu, Y. Wang, *Macromolecules* **2010**, *43*, 10348.
- [104] Y. Chan, F. Ye, M. Gallina, X. Zhang, Y. Jin, I. Wu, D. T. Chiu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7309.
- [105] W. Sun, S. Hayden, Y. Jin, Y. Rong, J. Yu, F. Ye, Y. Chan, M. Zeigler, C. Wu, D. T. Chiu, *Nanoscale* **2012**, *4*, 7246.
- [106] J. H. Warner, A. Hoshino, K. Yamamoto, R. D. Tilley, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4626; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4550.
- [107] Y. He, Y. L. Zhong, F. Peng, X. P. Wei, Y. Y. Su, Y. M. Lu, S. Su, W. Gu, L. S. Liao, S. T. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14192.
- [108] Y. P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. A. S. Fernando, P. Pathak, M. J. Mezziani, B. A. Harruff, X. Wang, H. F. Wang, P. J. G. Luo, H. Yang, M. E. Kose, B. L. Chen, L. M. Veca, S. Y. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7756.
- [109] S. N. Baker, G. A. Baker, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6726.
- [110] P. Zrazhevskiy, M. Sena, X. H. Gao, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4326.
- [111] H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, A. J. Heeger, *Chem. Commun.* **1977**, 578.
- [112] C. K. Chiang, C. R. Fincher, Jr., Y. W. Park, A. J. Heeger, H. Shirakawa, E. J. Louis, S. C. Gau, A. G. MacDiarmid, *Phys. Rev. Lett.* **1977**, *39*, 1098.
- [113] A. J. Heeger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2660; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2591.
- [114] F. Hide, M. A. Diaz-Garcia, B. J. Schwartz, A. J. Heeger, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 430.
- [115] G. Yu, J. Gao, J. C. Hummelen, F. Wudl, A. J. Heeger, *Science* **1995**, *270*, 1789.
- [116] S. Günes, H. Neugebauer, N. S. Sariciftci, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1324.
- [117] J. H. Burroughes, C. A. Jones, R. H. Friend, *Nature* **1988**, 335, 137.
- [118] Y. Yang, A. J. Heeger, *Nature* **1994**, 372, 344.
- [119] H. Yan, Z. H. Chen, Y. Zheng, C. Newman, J. R. Quinn, F. Dotz, M. Kastler, A. Facchetti, *Nature* **2009**, 457, 679.
- [120] F. Schütze, B. Stempf, C. Jungst, D. Woll, A. Zumbusch, S. Mecking, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 2104.
- [121] S. N. Clifton, D. A. Beattie, A. Mierczynska-Vasilev, R. G. Acres, A. C. Morgan, T. W. Kee, *Langmuir* **2010**, *26*, 17785.
- [122] E. Collini, G. D. Scholes, *Science* **2009**, 323, 369.
- [123] R. E. Palacios, F. R. F. Fan, J. K. Grey, J. Suk, A. J. Bard, P. F. Barbara, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 680.
- [124] R. L. Mcrae, R. L. Phillips, I. B. Kim, U. H. F. Bunz, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7851.
- [125] C. J. Sigurdson, K. Peter, R. Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, M. Polymenidou, P. Schwarz, M. Leclerc, P. Hammarstrom, K. Wuthrich, A. Aguzzi, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 1023.
- [126] A. Åslund, C. J. Sigurdson, T. Klingstedt, S. Grathwohl, T. Bolmont, D. L. Dickstein, E. Glimsdal, S. Prokop, M. Lindgren, P. Konradsson, D. M. Holtzman, P. R. Hof, F. L. Heppner, S. Gandy, M. Jucker, A. Aguzzi, P. Hammarstrom, K. P. R. Nilsson, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 673.
- [127] K. Y. Pu, K. Li, J. B. Shi, B. Liu, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3816.
- [128] K. Y. Pu, J. B. Shi, L. P. Cai, K. Li, B. Liu, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2966.
- [129] K. Li, K. Y. Pu, L. P. Cai, B. Liu, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 2113.
- [130] J. Edwards, R. Fisher, B. Vincent, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1983**, *4*, 393.
- [131] S. P. Armes, J. F. Miller, B. Vincent, *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *118*, 410.
- [132] E. Hittinger, A. Kokil, C. Weder, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1808.
- [133] B. J. Schwartz, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2003**, *54*, 141.
- [134] D. Chandler, *Nature* **2005**, 437, 640.
- [135] P. R. ten Wolde, D. Chandler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6539.
- [136] F. J. M. Hoebe, I. O. Shklyarevskiy, M. J. Pouderoijen, H. Engelkamp, A. P. H. J. Schenning, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1232.
- [137] W. Liu, M. Howarth, A. B. Greytak, Y. Zheng, D. G. Nocera, A. Y. Ting, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1274.
- [138] M. Howarth, W. H. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 397.
- [139] T.-Q. Nguyen, I. B. Martini, J. Liu, B. J. Schwartz, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 237.
- [140] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, *Opt. Lett.* **2001**, *26*, 825.
- [141] T. Plakhotnik, W. E. Moerner, V. Palm, U. P. Wild, *Opt. Commun.* **1995**, *114*, 83.

- [142] T. Plakhotnik, E. A. Donley, U. P. Wild, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, 48, 181.
- [143] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2651.
- [144] W. G. J. H. M. van Sark, P. L. T. M. Frederix, D. J. Van den Heuvel, H. C. Gerritsen, A. A. Bol, J. N. J. van Lingn, C. D. Donega, A. Meijerink, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 8281.
- [145] J. K. Grey, D. Y. Kim, B. C. Norris, W. L. Miller, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 25568.
- [146] J. Yao, D. R. Larson, H. D. Vishwasrao, W. R. Zipfel, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 14284.
- [147] M. C. Mancini, B. A. Kairdolf, A. M. Smith, S. M. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10836.
- [148] S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 7838.
- [149] N. K. Guimard, N. Gomez, C. E. Schmidt, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 876.
- [150] L. Wang, C. Y. Yang, W. H. Tan, *Nano Lett.* **2005**, 5, 37.
- [151] K.-Y. Pu, K. Li, X. Zhang, B. Liu, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4186.
- [152] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192.
- [153] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686.
- [154] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.
- [155] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 644.
- [156] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7108; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974.
- [157] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Cell* **2006**, 126, 851.
- [158] O. Veis, C. Sun, C. Fang, N. Bhattacharai, J. Gunn, F. Kievit, K. Du, B. Pullar, D. Lee, R. G. Ellenbogen, J. Olson, M. Q. Zhang, *Cancer Res.* **2009**, 69, 6200.
- [159] H. S. Choi, W. H. Liu, F. B. Liu, K. Nasr, P. Misra, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 42.
- [160] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 1165.
- [161] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6264.
- [162] S. Hohng, T. Ha, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 956.
- [163] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 301.
- [164] Q. H. Xu, S. Wang, D. Korystov, A. Mikhailovsky, G. C. Bazan, D. Moses, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 530.
- [165] Y. J. Kim, R. C. Johnson, J. T. Hupp, *Nano Lett.* **2001**, 1, 165.
- [166] S. Y. Lin, S. H. Wu, C. H. Chen, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5070; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4948.
- [167] M. D. Wang, D. M. Shin, J. W. Simons, S. M. Nie, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2007**, 7, 833.
- [168] R. Sinha, G. J. Kim, S. M. Nie, D. M. Shin, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5, 1909.
- [169] S. M. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, J. W. Simons, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, 9, 257.
- [170] C. L. Zhu, Q. O. Yang, L. B. Liu, F. T. Lv, S. Y. Li, G. Q. Yang, S. Wang, *Adv. Mater.* **2011**, 23, 4805.
- [171] I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty, P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7860.
- [172] S. Kim, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, R. K. Pandey, P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2669.
- [173] J. R. McCarthy, J. M. Perez, C. Bruckner, R. Weissleder, *Nano Lett.* **2005**, 5, 2552.
- [174] D. Gao, R. R. Agayan, H. Xu, M. A. Philbert, R. Kopelman, *Nano Lett.* **2006**, 6, 2383.
- [175] A. C. S. Samia, X. B. Chen, C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15736.
- [176] J. M. Tsay, M. Trzoss, L. Shi, X. Kong, M. Selke, M. E. Jung, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6865–6871.