

Diamant-Quantensensoren in der Biologie

Yuzhou Wu,* Fedor Jelezko,* Martin B Plenio* und Tanja Weil*

Einzelmolekül-Kernresonanz · Hyperpolarisation ·
NV-Diamanten · Quantensensoren ·
Wirkstofftransport

Die gegenwärtig verfügbaren Techniken der molekularen Bildgebung, die atomare Auflösung erzielen, benötigen extreme Arbeitsbedingungen wie niedrige Temperaturen, Vakuum sowie große Proben volumina. Quantensensoren, die auf der spinabhängigen Photolumineszenz von Stickstoff-Fehlstellen(NV)-Zentren basieren, haben ein großes Potenzial für die Detektion einzelner Moleküle mit atomarer Auflösung bei Raumtemperatur. In Diamant-Nanopartikeln können NV-Zentren gezielt implantiert werden, sodass einzigartige Nanosensoren entstehen, die in lebende biologische Systeme eindringen können. Aus diesen Gründen könnte die Diamant-Sensorik einen noch nie dagewesenen Einblick in die Struktur und Funktion von einzelnen Biomolekülen unter physiologischen Bedingungen liefern, sodass sich biologische Prozesse bis auf das Quantenniveau und mit atomarer Auflösung beobachten ließen. Die theoretischen Grundlagen der Diamant-Quantensensoren und die aktuellen Entwicklungen von ihrer Herstellung bis zu den verschiedenen Sensor-Techniken werden in diesem Kurzaufsatz erörtert.

1. Einleitung

Die molekulare Bildgebung und Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse, Kernresonanzspektroskopie, Elektronenmikroskopie und Rastertunnelmikroskopie nimmt eine zentrale Rolle für den wissenschaftlichen Fortschritt in verschiedensten Disziplinen ein. Die meisten gegenwärtig verfügbaren Techniken, die in der Lage sind, eine atomare Auflösung zu erzielen, erfordern tiefe Temperaturen, Vakuum, die Verfügbarkeit von Kristallen oder große Proben volumina. Diese speziellen Anforderungen begrenzen die

Anwendungsmöglichkeiten insbesondere auf dem Gebiet der Lebenswissenschaften, in denen die optische Einzelmolekül-Spektroskopie und die Rasterkraftmikroskopie im Prinzip die einzigen Methoden sind, die Einblicke in die molekulare Struktur ermöglichen. Allerdings reicht die Auflösung

dieser Methoden nicht aus, um einzelne Atome zu erkennen.

Quantensensoren auf Basis der vom Spin abhängigen Photolumineszenz einzelner Stickstoff-Fehlstellen (NVs) in Diamant bieten hier ein außerordentliches Potenzial für die atomare Bildgebung.^[1] Der gegenwärtige Fortschritt auf dem Gebiet der Diamant-Quantensensorik verspricht wie keine andere Technik, das lange gehegte Ziel der Einzelmoleküldetektion mit atomarer Auflösung bei Raumtemperatur zu erreichen.^[1,2] Es besteht die begründete Hoffnung, dass die Diamant-Quantensensorik zukünftig wichtige Erkenntnisse für das Verständnis von Biomolekülen in ihrer natürlichen, z.B. zellulären Umgebung sowie von grundlegenden biologischen Phänomenen liefern wird.

Dieser Kurzaufsatz beschreibt das neue und sich schnell entwickelnde Gebiet der nanoskaligen Quantensensorik auf Basis von NV-Zentren in Diamant und beleuchtet die möglichen Anwendungen der molekularen Bildgebung mit höchster Auflösung in „lebenden“ biologischen Systemen. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen und die bislang am weitesten entwickelten Techniken der Diamant-Quantensensorik eingeführt. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die chemische Herstellung von qualitativ hochwertigen Diamant-Quantensensoren und die Funktio-

[*] Dr. Y. Wu, Prof. Dr. T. Weil
Institut für Organische Chemie III, Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm (Deutschland)
E-Mail: Yuzhou.Wu@uni-ulm.de
Tanja.Weil@uni-ulm.de

Prof. Dr. F. Jelezko
Institut für Quantenoptik, Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm (Deutschland)
E-Mail: fedor.jelezko@uni-ulm.de

Prof. Dr. M. B. Plenio
Institut für Theoretische Physik
Albert-Einstein-Allee 11, 89069 Ulm (Deutschland)
E-Mail: martin.plenio@uni-ulm.de

nalisierung der Diamant-Oberflächen gelegt, die letztlich eine Sensorik in einer lebenden biologischen Umgebung erst ermöglichen. Es wird besonders auf das große Potenzial und die weitreichenden Herausforderungen der Biosensorik unter physiologischen Bedingungen eingegangen.

2. Theorie der Diamant-Quantensensorik

Ein „perfekter“ Diamant-Kristall ist für sichtbares Licht wegen der großen optischen Bandlücke von $E = 5.48 \text{ eV}$ (dies entspricht einer Wellenlänge von $\lambda \approx 226 \text{ nm}$) transparent. Äußerst selten findet man auch natürlich vorkommenden Diamant, der lebendige Farben aufweist. Die Herkunft dieser Farbe kann auf plastische Deformationen des Diamant-Gitters oder, viel wichtiger für unsere Zwecke, auf Substitutions- und Fehlstellendefekte in der Gitterstruktur zurückgeführt werden, die in der Lage sind, sichtbares Licht zu absorbieren und zu emittieren. Hunderte solcher lumineszenter Defekte sind bislang bekannt^[3] und wurden bereits ausführlich analysiert, um ihre grundlegenden optischen und Elektronen-spin-Eigenschaften zu bestimmen und in einigen Fällen ihre chemische Zusammensetzung aufzuklären.^[4] Verunreinigungsdefekte basieren auf einer breiten Anzahl von Elementen wie Bor, Nickel, Silicium und, am häufigsten in Diamant vorkommend, Stickstoff, dessen Farbzentren von besonderer Bedeutung für die Anwendungen in der biologischen Diamant-Sensorik sind.

2.1. Stickstoff-Fehlstellenzentren und andere Farbzentren in Diamant

Das NV-Zentrum^[5] ist ein Punktdefekt in der Diamantgitterstruktur, der aus einem Substitutions-Stickstoffatom besteht, das sich direkt neben einer Gitterfahle befindet und das entlang der [111]-Richtung im Kristall orientiert ist (Abbildung 1a). Es existiert in verschiedenen Ladungszuständen, z.B. einer neutralen Form, NV^0 , und dem negativ geladenen NV^- . Während beide Formen in der Lage sind, mit sichtbarem Licht in Wechselwirkung zu treten, sind die optischen und elektronischen Eigenschaften des NV^- -Defekts weit besser verstanden und scheinen somit geeigneter für Anwendungen in der Sensorik und Quantentechnologie zu sein.

Das NV^- -Zentrum weist eine scharfe optische Null-Phononen-Linie bei $\lambda = 637 \text{ nm}$ ($E = 1.945 \text{ eV}$) und breite Schwingungsseitenbanden auf. Unter Belichtung zeigt sich eine weitere, sehr schwache Null-Phononen-Linie bei $\lambda = 1042 \text{ nm}$ ($E = 1.190 \text{ eV}$), die auf eine elektronische Struktur, wie in Abbildung 1b dargestellt, schließen lässt. Es ist bemerkenswert, dass NV^- und andere Farbzentren auch bei starker und dauerhafter Laserbestrahlung nicht bleichen. Dies trifft auch auf NV^- -Defekte zu, die sich in nanometergroßen Diamanten befinden und einer intensiven Bestrahlung ausgesetzt sind. Weiterhin verhalten sich Absorptions- und Emissionswellenlängen bis zu kleinsten Größen von $< 10 \text{ nm}$ ^[6] (sogar 2 nm ^[7] für den Silicium-Defekt) unabhängig von der Größe des Diamanten. Diese Eigenschaften alleine unterstreichen bereits das enorme Anwendungspotenzial von fluoreszenten Nanodiamanten (NDs) als Biomarker.^[8] Als eine weitere wichtige Eigenschaft von fluoreszenten NDs gilt,



Yuzhou Wu ist Gruppenleiterin am Institut für Organische Chemie III an der Universität Ulm. Ihre Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Bio-Nanotechnologie, der Herstellung von präzisen Nanoarchitekturen und der Biofunktionalisierung von Nanomaterialien für die Biomedizin und Bildgebung. Für ihre Forschung hat sie zahlreiche Preise erhalten, wie den Promotionspreis und den Forschungsbonus der Universität Ulm.



Martin B. Plenio ist Direktor am Institut für Theoretische Physik an der Universität Ulm. Sein breites Forschungsspektrum umfasst die Quanteninformationswissenschaften, die Erforschung von Quanteneffekten in biologischen Systemen, die Quantenoptik und Quantentechnologien. Er erhielt zahlreiche Auszeichnungen wie eine Alexander von Humboldt-Professur, die Maxwell-Medaille, die Born-Medaille des Institutes für Physik und der Deutschen Physikalischen Gesellschaft sowie ein Synergy Grant des Europäischen Forschungsrats.



Fedor Jelezko ist Direktor am Institut für Quantenoptik und Mitglied des Zentrums für Integrierte Quantenwissenschaften und Quantentechnologien (IQST) an der Universität Ulm. Seine Forschungsinteressen liegen an der Grenze der fundamentalen Quantenphysik und der Anwendung von Quantentechnologien für die Informationsverarbeitung, Kommunikation, Sensorik und Bildgebung. Er hat mehrere Auszeichnungen erhalten, insbesondere den Walter-Schottky-Preis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft und die Mitgliedschaft in der Heidelberger Akademie der Wissenschaften.



Tanja Weil ist Direktorin des Instituts für Organische Chemie III an der Universität Ulm. Ihre Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Herstellung von präzisen makromolekularen Architekturen und Biohybrid-Polymeren sowie deren Anwendungen auf den Gebieten der Biomedizin und Bildgebung. Ihr wurden die Otto-Hahn-Medaille der Max-Planck-Gesellschaft, der Wissenschaftspreis der Stadt Ulm sowie ein Synergy Grant des Europäischen Forschungsrats verliehen.

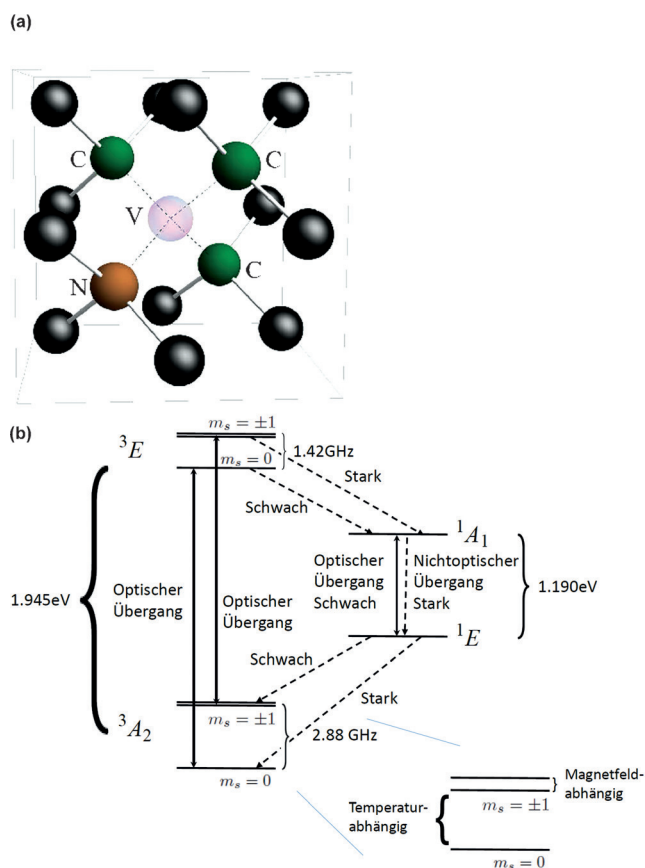


Abbildung 1. a) Das NV-Zentrum in Diamant – ein Substitutions-Stickstoffatom in Nachbarschaft zu einer Fehlstelle, die durch ein fehlendes Kohlenstoffatom gebildet wird. b) Die „dangling bonds“ bilden ein elektronisches Spin-1-System mit einem optischen Übergang bei $E = 1.945$ eV. Optische und Infrarot-Übergänge (durchgezogene Pfeile) und schwache, nichtstrahlende Übergänge (gestrichelte Pfeile) ermöglichen die Beobachtung der spinabhängigen Fluoreszenz und optischer Elektronenspinpolarisation.

dass sowohl der Grundzustand als auch der angeregte Zustand des NV⁻-Zentrums zwischen den magnetischen $m_s = 0$ - und den $m_s = \pm 1$ -Zuständen des elektronischen Spintripletts eine Nullfeld-Magnetresonanz bei 2.88 GHz bzw. 1.42 GHz aufweisen. Dieser Elektronenspin hat eine beeindruckend lange Kohärenzzeit (T_2) und Relaxationszeit (T_1), die in hochreinen Diamanten sogar bei Raumtemperatur noch Millisekunden betragen kann.^[9] Die gleichzeitige Verfügbarkeit von optischen und elektronischen Übergängen macht das NV⁻-Zentrum besonders interessant für eine Vielzahl von Anwendungen in der Sensorik. Ein wesentlicher Aspekt ist hierbei, dass sogar für einzelne NV⁻-Zentren der elektronische Spin-Zustand über die spinabhängige Photolumineszenz detektiert werden kann, da diese zwischen den $m_s = 0$ - und $m_s = \pm 1$ -Zuständen unterscheidet^[10] und somit eine optisch detektierte magnetische Resonanz am Einzelmolekül (ODMR) realisiert.^[11] Das zugrunde liegende Prinzip der Diamant-Quantensensorik und die vielseitigen Anwendungen werden in den Abschnitten 4.1–4.3 ausführlicher behandelt. Interessanterweise ermöglicht dieselbe zugrunde liegende Physik durch optisches Pumpen innerhalb weniger

Mikrosekunden selbst bei Raumtemperatur die Polarisation des Elektronenspin-Tripletts in den $m_s = 0$ -Zustand. Die daraus resultierende Hyperpolarisation des Elektronenspins kann auf Kernspins übertragen werden,^[12] was zahlreiche Anwendungen in der Magnetresonanztomographie (MRT) eröffnet, die in Abschnitt 4.4 genauer diskutiert werden soll.

Ungeachtet der aktuellen Fokussierung der Forschung auf das NV⁻-Zentrum ist eine Vielzahl von weiteren Farbzentren bekannt, von denen einige eine ähnliche Kombination der optischen Übergänge, Magnetresonanz der elektronischen Spinzustände und spinabhängigen Fluoreszenz aufweisen. Seit kurzem findet auch die Silicium-Fehlstelle (SiV⁻) in dieser Hinsicht eine wachsende Aufmerksamkeit, da sie eine starke Null-Phononen-Linie bei $\lambda = 737$ nm ($E = 1.68$ eV) und ein elektronisches Spin-1/2-System aufweist, dessen Struktur bereits in einigen Aspekten aufgeklärt werden konnte.^[13]

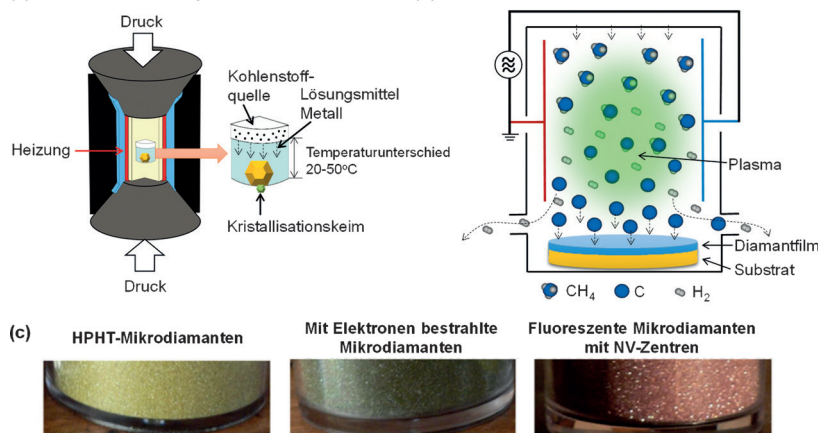
3. Herstellung und Funktionalisierung von Diamant-Quantensensoren

Inzwischen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, um Diamant-Quantensensoren herzustellen. Sie können beispielsweise durch die Implantierung von Farbzentren sowohl in makroskopischen Diamanten als auch in Diamantanopartikeln erzeugt werden. Als „makroskopisch“ werden mikrometer- bis millimetergroße Diamantkristalle bezeichnet, die sich ideal dazu eignen, um In-vitro-Sensorik-Arrays herzustellen. Ihre Herstellung ist weniger schwierig, da Farbzentren besonders stabil sind, wenn diese sich mehr als 2 nm unterhalb der Diamantoberfläche befinden. Dagegen sind nanometergroße Diamanten (Nanodiamanten, NDs) besonders interessant für die Biosensorik, da sie als Nanosensoren in Lösung in Zellen, Gewebe und lebende Organismen transportiert werden können. Allerdings ist es wegen des sehr hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses wesentlich anspruchsvoller, qualitativ hochwertige NDs mit stabilen Farbzentren herzustellen. Die in NDs implantierten Farbzentren können leicht durch Oberflächenfunktionalitäten gestört werden, die allerdings erforderlich sind, um eine akzeptable kolloidale Stabilität, Biokompatibilität und Biofunktionalität zu erreichen. Dies ist besonders für biomedizinische Anwendungen essenziell. In diesem Abschnitt werden verschiedene Methoden für die Herstellung von makroskopischen Diamanten und ND-Partikeln mit Farbzentren kurz umrissen und miteinander verglichen. Insbesondere werden wir auf die Herausforderungen eingehen, qualitativ hochwertige NDs herzustellen und diese für In-vivo-Anwendungen zu funktionalisieren.

3.1. Herstellung makroskopischer Diamanten für die Diamant-Quantensensorik

Makroskopische Diamantkristalle können über zahlreiche Synthesemethoden hergestellt werden, beispielsweise über das Hochdruck-Hochtemperatur(HPHT)-Wachstum und das Verfahren der chemischen Gasphasenabscheidung

(a) Hochdruck Hochtemperatur-Diamantwachstum (b) Diamantwachstum über chemische Gasabscheidung

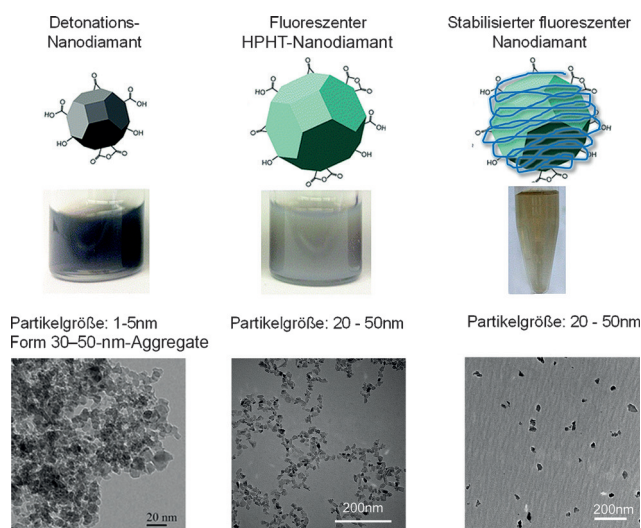
**Abbildung 2.** HPHT-Wachstum und CVD-Herstellung von Diamant und Bildung der NV-Zentren im Diamant.

(CVD; Abbildung 2). Das HPHT-Wachstum ist die Hauptherstellungsmethode für synthetische Diamanten und ermöglicht ein hohes Maß an Kontrolle über die Qualität und Geometrie der hergestellten Diamanten. Die meisten über diese Methode erhaltenen Diamanten bestehen aus kleinen Körnern des Typs Ib (die Klassifikation von Diamanten mit isolierten Stickstoffverunreinigungen, die sich im Diamant verteilt befinden) mit Größen von einigen Mikrometern bis zu ca. 10 mm.^[14] Diese Diamanten enthalten oft bereits Substitutions-Stickstoffatome, die P1-Zentren genannt werden und vom Lösungsmittel, dem Metall und der Kohlenstoffquelle sowie von Gasrestmengen im HPHT-Reaktor stammen können. Um die Gitterfehlstellen zu produzieren, können diese Diamanten mit hochenergetischen Partikeln wie Elektronen, Protonen, Neutronen, Ionen oder Gammapartikeln bestrahlt werden. Bei Temperaturen von ungefähr 800 °C erzeugen die Substitutions-Stickstoffatome eine Verzerrung im Diamantgerüst und fangen so die sich bewegenden Fehlstellen unter Bildung der NV-Farbzentren ein (Abbildung 2c).^[15]

Eine weitere gängige Methode des Wachstums von synthetischen Diamanten ist die CVD.^[16] Bei niedrigen Drücken (unterhalb des Atmosphärendrucks) wird eine Mischung aus kohlenstoffreichen Gasen (typischerweise in Zusammensetzungen von Methan/Wasserstoff 1:99) mittels Plasma zwischen zwei Elektroden in Fragmente gebrochen, die anschließend auf einer Oberfläche in einem Diamantfilm wieder angeordnet werden (Abbildung 2b). Aus diesem Grund werden die CVD-Diamanten normalerweise als dünne Filme gewonnen. NV-Zentren können während des CVD-Prozesses erzeugt werden, indem der Diamantfilm in Gegenwart einer Gasmischung aus 0–0.1 % N₂, 0.7 % CH₄ und 99.2 % H₂^[17] hergestellt wird. Die Konzentration der NV-Zentren variiert mit der Menge der dotierten Stickstoffatome. Aus diesem Grund können sogar einzelne Defekte hergestellt werden, indem einzig der Stickstoffanteil optimiert wird.

3.2. Herstellung von Nanodiamantpartikeln für die Diamant-Quantensensorik

NDs können über verschiedene Methoden hergestellt werden, beispielsweise über Detonation,^[18] Laserablation,^[19] Ionenbestrahlung^[20] und die Chlorierung von Carbiden.^[21] Die meisten dieser Methoden führen lediglich zu polykristallinen NDs sowie ultrananokristallinen NDs (Abbildung 3), mit nur wenigen nanoskaligen kristallinen Domänen, die sich nicht für Anwendungen in der Quantensensorik eignen. Ideale NDs für die Quantensensorik sollten sehr stabile Farbzentren in einem hoch kristallinen Diamantgerüst aufweisen, vorzugsweise mit einer kontrollierbaren Anzahl an Farbzentren auf einer räumlich genau festgelegten Posi-

**Abbildung 3.** Vergleich von ultrananokristallinen Detonationsdiamanten, von fluoreszenten HPHT-NDs mit NV-Zentren und von fluoreszenten NDs nach Oberflächenstabilisierung.^[22]

on. Aus diesem Grund sind die NDs, die für die Entwicklung als Quantensensoren genutzt werden können, normalerweise monokristallin und werden durch hochenergetisches Mahlen von HPHT-Diamant-Mikrokristallen^[6] und plasmaunterstützte CVD^[22] gewonnen. Wie in Abschnitt 3.1 dargestellt, können über das HPHT-Wachstum Typ-Ib-Diamanten mit wenigen Mikrometern Durchmesser (> 20–50 µm) hergestellt werden. Über einen mechanischen Mahlschritt können aus diesen HPHT-Mikrodiamanten dekontaminierte NDs hergestellt werden, die nach einer Aufreinigung mit Säuren (normalerweise werden hoch oxidative Säuren wie 1:1:1-Mischungen aus HClO₄, HNO₃ und H₂SO₄ verwendet) in hohen Reinheiten vorliegen.^[6b] Durch eine Zentrifugationsaufreinigung können diese NDs in unterschiedliche Größen von wenigen Nanometern bis zu einigen zehn Nanometern voneinander getrennt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die

durch HPHT-gewonnenen, synthetischen Diamanten bereits Stickstoffdefekte aufweisen (P1-Zentren), können sie für die Produktion von stabilen und hell fluoreszierenden NV-reichen NDs herangezogen werden. Um nun die NV-Zentren zu bilden, werden die gemahlene NDs in Graphit-Tabletten eingebettet, um eine bequeme Bestrahlung und ein Tempern ähnlich wie für makroskopische Diamanten zu ermöglichen. Anschließend Oxidationsverfahren, wie die Säurebehandlung oder thermische Oxidation, ermöglichen die Reinigung der NDs aus den Graphit-Tabletten, um die durch das Tempern hervorgerufenen Oberflächenkontamination zu entfernen und so die Helligkeit der NDs zu erhöhen. Die über diese Methode gewonnenen NV-Zentren verhalten sich normalerweise stabil nach der Implantation, allerdings ist es derzeit eine schwierige Aufgabe, ausschließlich fluoreszente NDs zu gewinnen. Die alternative Strategie ist eine Bestrahlung und das Tempern von HPHT-Mikrodiamanten, um diese anschließend zu NDs zu zermahlen,^[6] ein Ansatz, der inzwischen weit verbreitet ist und sogar von mehreren Unternehmen kommerzialisiert wurde.^[23] Bei diesem Verfahren können einige NV-Zentren während des Mahlvorgangs zerstört werden, sodass extrem hohe Konzentrationen an NV-Zentren im mikrokristallinen Ausgangsmaterial vorhanden sein müssen, was schwer zu erreichen ist. Die Produktion von monokristallinen NDs kann weiterhin über die CVD erzielt werden,^[22] allerdings ist der Einbau von Stickstoffatomen in die kleinen Nanokristalle über diesen Ansatz sehr ineffizient.^[24] Dagegen ist die CVD-Methode vielversprechender für die Herstellung von NDs, die SiV-Zentren aufweisen, da das Plasmaätzen des Siliciumsubstrats, auf dem die CVD-Diamanten gewachsen sind, bereits eine Siliciumquelle darstellt. Es können ferner andere Defekte bequem durch alternative Gase eingefügt werden, beispielsweise Bor-Defekte unter Verwendung von Trimethylboran.^[25]

Auch wenn die derzeitigen Methoden einen Zugang zu NDs mit verschiedenen Größen und Farbzentren bieten, ist es immer noch schwierig, die hohen Anforderungen der Quantensorik an diese Materialien zu erfüllen. Idealerweise sollten NDs für quantenmechanische Anwendungen eine kontrollierte Anzahl von NV-Zentren enthalten, und diese stabilen NV-Zentren sollten sich mindestens 2 nm unter der Diamantoberfläche befinden. Aus diesem Grund sollten die NDs eine regelmäßige Form mit einer nur geringen Größenverteilung aufweisen. Wenn ein einzelnes NV-Zentrum als Spinsensor verwendet werden soll, muss der entsprechende Nanokristall eine kontrollierte Größe und Form mit einem präzise lokalisierten NV-Zentrum haben. Aus diesem Grund werden neue Verfahren für eine kontrollierte Diamantsynthese dringend benötigt. Ein großes Potenzial bietet hierbei das HPHT-Wachstum von kleinsten Diamantkristallen, um so direkt NDs mit einer regelmäßigen Gestalt zu gewinnen. Wenn sich das HPHT-Wachstum ausgehend von einem stickstoffhaltigen, molekularen Keim steuern ließe, könnte es im Prinzip gelingen, NDs mit nur einem NV-Zentrum in der Mitte zu produzieren, die für die Quantensorik ideal wären.

3.3. Funktionalisierung von ND-Sensoren für biologische Anwendungen

Nach der Herstellung von qualitativ hochwertigen NDs mit NV-Zentren werden insbesondere für Anwendungen in der Biosensorik weitere Oberflächenfunktionen benötigt, die die kolloidale Stabilität in einer biologischen Umgebung verbessern. Wegen der großen relativen Oberfläche und der elektrostatischen Wechselwirkungen durch das Vorhandensein zahlreicher Carbonsäuregruppen können die jeweiligen Biomoleküle einfach auf der ND-Oberfläche unspezifisch adsorbiert werden.^[27] In frühen Versuchen ermöglichte dieser Ansatz die Detektion von einigen Biomolekülen: Die Adsorption des Eisenspeicherproteins Ferritin auf der Oberfläche der NDs ermöglichte die nicht-invasive Detektion von Eisenatomen im Apoferritinkäfig.^[27b] Zusätzlich konnten verschiedene funktionelle Gruppen auf die Oberfläche von NDs gebunden werden, die wie bereits beschrieben^[8c,28] eine kovalente Anbindung von Biomolekülen ermöglichen (Abbildung 4). Eine derartige Oberflächenmodifikation ist derzeit die einzige Methode, um NDs mit biologischen Funktionalitäten auszustatten, und sie wurde bereits angewendet, um Antikörper,^[29] DNA,^[29] Enzyme^[30] oder weitere funktionale Proteine^[31] anzubinden. Allerdings neigen die rohen, aus der direkten Synthese stammenden NDs leicht dazu, Aggregate zu bilden, was zum Teil auf ihr hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis zurückzuführen ist. Die Aggregationsneigung ist in biologischen Medien besonders ausgeprägt,

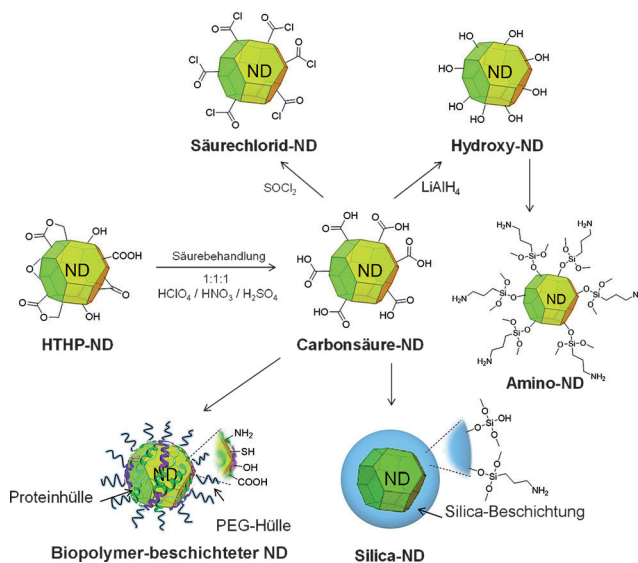


Abbildung 4. Funktionalisierung von NDs über direkte chemische Reaktionen und eine biologisch verträgliche Beschichtung. Die ursprünglich mittels HTHP hergestellten NDs tragen unkontrolliert eingeführte funktionelle Gruppen auf ihrer Oberfläche, und die Umsetzung mit Säuren ermöglicht lediglich die Herstellung von NDs mit terminalen Carbonsäuregruppen auf ihrer Oberfläche. Diese Carbonsäuregruppen auf den NDs können anschließend in Säurechloride sowie Hydroxy- und Aminogruppen^[8c,28] überführt werden, die weitere chemische Modifikationen z. B. mit Biomolekülen ermöglichen. Die säurebeschichteten NDs können weiterhin mit einer Silica-Hülle^[33] oder einer positiv geladenen Biopolymerhülle^[35] ausgestattet werden, wodurch die Oberflächeneigenschaften der NDs drastisch geändert werden.

wodurch es sehr schwierig ist, derart hergestellte Diamanten unter diesen Bedingungen als einzelne NDs zu detektieren (Abbildung 3). Die Oberflächenchemie von NDs ist weiterhin begrenzt durch die unkontrollierte Aggregationsneigung, die bis hin zum Ausfällen der NDs aus der Lösung führt. Weiterhin kann wegen der geringen Anzahl an Oberflächenfunktionen nur eine geringe Dichte an Biomolekülen über eine direkte kovalente Anknüpfung an die NDs erzielt werden.

Kürzlich rückten biokompatible, nicht-kovalente Oberflächenbeschichtungen in den Fokus, um NDs in biologischen Medien zu stabilisieren und um die Konjugationschemie auf der Diamantoberfläche effizienter zu gestalten. Erste Studien haben gezeigt, dass NDs, die eine Schicht des Blutplasmaproteins Serumalbumin adsorbieren, eine erhöhte Stabilität aufweisen, sodass sogar eine Detektion einzelner Partikel in lebenden Zellen mithilfe stimulierter Emissions-Depletions-(STED)-Mikroskopie^[32] möglich war. In diesem Zusammenhang wurden bereits unterschiedliche Beschichtungsmaterialien, beispielsweise anorganische und polymere Materialien, untersucht (Abbildung 4). So wurde z. B. eine Silica-hülle auf der ND-Oberfläche eingeführt, die die Partikeloberfläche bioverträglich, stabil und mittels Silica-Konjugationschemie einfach funktionalisierbar werden ließ.^[33] Das hydrophile Polymer Polyethylenglycol (PEG) wurde an die Silica-Hülle geknüpft, um die kolloidale Stabilität der Hybridteilchen über einen breiten pH-Bereich (pH 2–10) oder sogar in 1M NaCl und Zellkulturmedium weiter zu erhöhen.^[33a] Alternativ können auch Polymere als verträgliche Beschichtungen fungieren. PEG-basierte Polymere wurden direkt kovalent an NDs gebunden.^[34] PEG-Beschichtungen erwiesen sich als besonders verträglich mit biologischen Medien und weisen nur eine geringe unspezifische Adsorption von Plasmaproteinen auf, sodass sie sich wegen ihrer geringen Zell- und Gewebetoxizität besonders für In-vivo-Anwendungen eignen.^[34b,c] Allerdings ermöglichen klassische PEG-Polymere keine nachfolgenden Funktionalisierungen, was eine der Hauptlimitationen dieser Methode ist. Kürzlich konnte eine Beschichtungsstrategie über Biopolymere entwickelt werden, die auf einem PEG-Hybridpolymer basiert, das aus nativem Albumin gewonnen wird.^[35] NDs, die von diesen Biopolymeren eingekapselt wurden, verhalten sich sehr stabil in allen getesteten biologischen Pufferlösungen sowie über einen breiten pH-Bereich (pH 2–8), ohne Aggregation zu zeigen. Weiterhin bietet dieses aus Proteinen gewonnene Biopolymer eine große Anzahl an orthogonalen funktionellen Gruppen, die aus den Seitenketten der Aminosäurebausteinen stammen und sich einfach nachträglich funktionalisieren lassen (Abbildung 4).

4. Diamant-Sensorik – Methoden und Anwendungen

Die einzigartige Möglichkeit, einen einzelnen langlebigen Elektronenspin im Grundzustand optisch auslesen zu können, ist ein wesentliches Element für die magnetische Sensorik auf der Nanoskala, die in diesem Abschnitt genauer beleuchtet werden soll. Im Vergleich mit anderen Magnet-

feldsensortechniken, wie der magnetischen Resonanzkraftmikroskopie, sind einzelne NV-Zentren hier wegen ihrer hohen Stabilität besonders interessant. Zudem hat ein einzelnes NV-Zentrum nur ein schwaches magnetisches Moment (ähnlich dem magnetischen Moment eines einzelnen Elektronenspins) und stört daher das zu untersuchende Objekt nur wenig. Darüber hinaus ermöglichen die hohe Photostabilität und das Ausbleiben von Fluoreszenz-Bleichvorgängen von Farbzentren deren Anwendung für die Sensorik über resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET).

4.1. Optische Sensorik mit Diamanten

Optische Techniken, die während der vergangenen beiden Dekaden entwickelt wurden, bieten heute eine hohe Empfindlichkeit, die die Detektion einzelner Fluorophore ermöglicht.^[36] Fluoreszenzmarker erlauben inzwischen sogar eine Empfindlichkeit, die nicht durch Lichtstreuung beschränkt ist.^[37] Allerdings sind diese superauflösenden Bildgebungstechniken durch die begrenzte Photostabilität der Farbstoffe limitiert. Die STED-Mikroskopie erreicht inzwischen routinemäßig eine Auflösung von 20–50 nm,^[38] aber eine höhere Auflösung benötigt sehr hohe Intensitäten des Depletionstrahls, was zum schnellen Bleichen der Fluoreszenzmarker führt. Andere superauflösende Bildgebungstechniken basieren auf der Auswertung von so genannten „Blinking“-Vorgängen (Fluoreszenz-An- und -Aus-Zeiten) von einzelnen Farbstoffen, die wiederum eine hohe Photostabilität speziell gegen irreversible Bleichvorgänge aufweisen müssen, um eine hohe Auflösung zu erzielen.^[39] Aus diesem Grund sind Farbzentren in NDs mit ihrer äußerst hohen Photostabilität sehr vielversprechende Lichtquellen für die Superauflösungsmikroskopie, wenn die relativ großen Abmessungen der NDs keine Beschränkung darstellen. Erste Experimente, die mit NV-Zentren im makroskopischen Diamant durchgeführt wurden, zeigen Auflösungen von bis zu 6 nm.^[40] Erst kürzlich wurde die STED-Mikroskopie mit NV-dotierten NDs demonstriert,^[41] und es konnten Auflösungen von bis zu 10 nm erzielt werden.^[42]

Eine weitere vielversprechende optische Technik für die nanoskalige Präzisionssensorik ist der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET). Der FRET-basierten Sensorik liegt die scharfe Abstandsabhängigkeit des Energietransfers zwischen zwei einzelnen Farbstoffen zugrunde. Die einzigartige Photostabilität der Farbzentren eröffnet neue Möglichkeiten, um die FRET-basierten Detektionstechniken zu verbessern. Es wurde bereits gezeigt, dass einzelne NV-Zentren in 20 nm großen Diamantkristallen den hocheffizienten Nachweis einzelner Moleküle ermöglichen, die auf der Diamantoberfläche adsorbiert wurden.^[43] Die dynamische Bandbreite der FRET-Mikroskopie ist zwar begrenzt, jedoch kann dieses Hindernis unter Verwendung der Rastersonden-FRET-Techniken überwunden werden, indem ein Donor, beispielsweise ein NV-Zentrum in einem Diamant-Nanokristall, an der Spitze eines Rasterkraftmikroskops angefügt wird.^[44]

4.2. Detektion von externen Elektronenspins mittels NV-Zentren

Nanometergroße Diamanten mit NV-Zentren sind vielversprechende Nanosensoren in einer biologischen Umgebung, da sie sich durch eine hohe Biokompatibilität, eine intensive Fluoreszenz und eine hohe Empfindlichkeit für magnetische Felder bei Raumtemperatur auszeichnen. Der Triplettgrundzustand des NV-Zentrums kann als nanoskaliges Magnetometer verwendet werden.^[1,45] Der NV-Defekt kann wegen seiner präzisen Lokalisation im Diamantgitter als ein punktförmiger magnetischer Dipol betrachtet werden, dessen Energie durch die Gegenwart externer Spins verändert wird. Solche Energieänderungen (die als Verschiebung der Spektrallinien, Störungen des Spinechos oder verstärkte Relaxation der NV-Zentren aufgenommen werden), können über die optisch detektierte magnetische Resonanz der NV-Zentren ausgelesen werden. Die Detektion von externen Elektronenspins mithilfe solch eines Diamant-Magnetometers^[46] könnte einzigartige Möglichkeiten bieten, um Biomoleküle sogar in ihrer zellulären Umgebung zu studieren. Schnell fluktuierende externe Spins wurden bereits über die verstärkte Relaxation der NV-Zentren gemessen. In diesem Fall wird das Rauschen der externen Spins als Signal gemessen (Störungs- oder Dekohärenzmikroskopie).^[47]

Typischerweise besteht das Ziel der gängigen Sensorsysteme in der Verringerung des Rauschens, um einen optimalen Zugang zu einem kohärenten Signal zu erhalten. Bei der Dekohärenzmikroskopie stellt das Rauschen selbst das Signal dar. Die Empfindlichkeit dieser Technik kann die ultimative Grenze bis zu der Detektion eines einzigen paramagnetischen Ions erreichen.^[48] Sie kann ferner auf die Detektion von Biomolekülen erweitert werden, beispielsweise wenn paramagnetische Ionen an Proteine geknüpft werden.^[49] Der Nachweis von einzelnen Elektronenspins kann auch auf Proteine angewendet werden, in denen Spins bereits nativ vorhanden sind und die eine bestimmte Funktion ausüben, beispielsweise in eisenreichen, magnetischen Proteinen wie dem Ferritin.^[27b,50]

Die Detektion von Ferritin (ein Protein, das in der Lage ist, Eisen in zahlreichen Organismen zu speichern) über magnetisches Rauschen, das durch das paramagnetische Eisen im Inneren des Proteinkäfigs induziert wird, konnte bereits mit einer Empfindlichkeit im Bereich der Einzelmoleküldetektion verwirklicht werden.^[27b,50] Es konnte eine signifikante Verringerung sowohl der Kohärenz- (T_2) als auch der Relaxationszeit (T_1) des NV-Zentrums aufgrund des Ferritins auf der Oberfläche der NDs erhalten werden (Abbildung 5). Auf diesem Weg eröffnen nanoskopische Magnetfeldsensoren auf der Basis einzelner Defekte in Diamant eine neue Sensortechnologie, die das Potenzial bietet, wichtige biologische Prozesse aufzuklären, z. B. den Elektronentransfer in einer zellulären Umgebung. Die bemerkenswerte Empfindlichkeit, zusammen mit dem nicht-invasiven Charakter dieses Nachweisverfahrens, könnte einen Zugang zur Aufklärung quantenmechanischer Eigenschaften in biologischen Systemen liefern, beispielsweise in Elektronentransfer- und Radikalpaardynamiken, die typischerweise nicht über Ensemble-Messungen und hoch invasive Messsysteme nachweisbar sind.^[51]

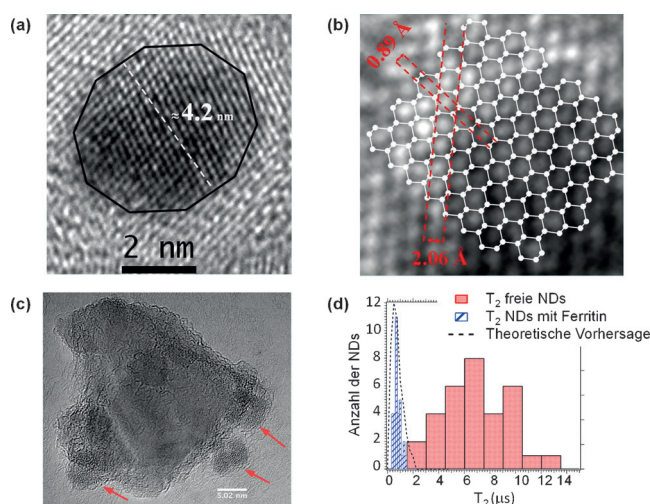


Abbildung 5. Die Detektion von Eisenatomen im Inneren des Ferritins über NV-Zentren in NDs mit der Empfindlichkeit eines einzelnen Proteins. a) Hochaufgelöste transmissionselektronenmikroskopische (HR-TEM-)Aufnahme eines ND. b) Das Kohlenstoffgitter des ND gemäß der HR-TEM-Abbildung. c) HR-TEM-Abbildung von Ferritin-Proteinen, die auf der ND-Oberfläche adsorbiert wurden (einige Ferritine wurden durch rote Pfeile gekennzeichnet). d) Nachweis von Ferritin durch die signifikante Verringerung der Kohärenzzeit (T_2).

4.3. NMR-Spektroskopie an einzelnen Molekülen über Diamantspins

Die Kernspinresonanz(NMR)-Spektroskopie ist eine der leistungsstärksten Bildgebungstechniken in den Lebenswissenschaften. Sie ermöglicht die Rekonstruktion von Proteinstrukturen über die Entschlüsselung von Wechselwirkungen zwischen Kernspins in komplexen Molekülen.^[52] Die Empfindlichkeit konventioneller NMR-Techniken (basierend auf der Induktionsdetektion) ist auf große Spinsysteme beschränkt. Es besteht allerdings ein wachsendes Interesse an der Entwicklung neuer NMR-Detektionsmethoden. Die NV-basierte Magnetometrie ist eine der vielversprechendsten Entwicklungen auf diesem Forschungsgebiet.

Das magnetische Moment eines einzelnen Atomkerns ist schwach und etwa 1000-mal geringer als das eines Elektrons. In unmittelbarer Nähe eines NV-Zentrums (wenige Nanometer) kann aber schon ein einzelner Kernspin detektierbare Felder in der Größenordnung von einigen Mikrottesla erzeugen, die sogar die Ortsbestimmung einzelner Kernspins ermöglichen.^[53] Die schwierigste Aufgabe bei NV-basierten NMR-Experimenten ist die Positionierung des NV-Zentrums in unmittelbarer Nähe des gewünschten Moleküls unter gleichzeitiger Beibehaltung langer Kohärenzzeiten. Es ist anzumerken, dass sich die Kohärenzzeit von NV-Defekten in Gegenwart von aus parasitären Spins an der Diamantgrenzfläche resultierendem Rauschen um Größenordnungen verbessern lässt, indem Spinechos verwendet werden.^[54] Die Optimierung solcher Echosequenzen ermöglicht eine Situation, in der ein wesentlicher Teil des Rauschens eliminiert werden kann, aber der schmale spektrale Kanal für die Sensorik weiterhin geöffnet bleibt. Vor wenigen Jahren gelang die Detektion von NMR-Signalen in 100-nm³-Volumina der

Flüssigprobe an der Diamantoberfläche^[55] und in einer mikrofluidischen Vorrichtung mit einer räumlichen Auflösung von unter 500 nm.^[56] Für Feststoffproben mit langer Kohärenzzeit der Kernspins (^{29}Si in Quarz und Kernspins, die über Wasserstoffbrücken an der Diamantoberfläche gebunden sind) reicht die Empfindlichkeit bereits für den Nachweis eines einzelnen Kernspins innerhalb weniger Sekunden Messzeit aus (Abbildung 6).^[57]

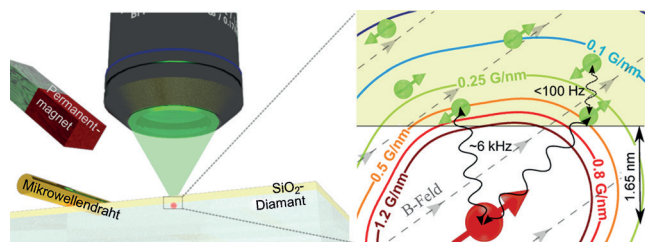
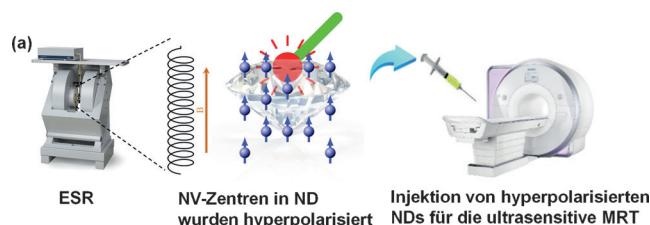


Abbildung 6. NMR-Spektroskopie von ^{29}Si -Kernen mit einem stark gekoppelten Sensor. Links: Experimenteller Aufbau. Verdünnte, unpolarisierte Kernspins in einer Silica-Schicht wechselwirken mit einem Elektronenspin auf einer (100)-Diamantoberfläche, die mit optischer Mikroskopie ausgelesen werden kann. Rechts: Der starke Kopplungsbe- reich. Ein flaches NV-Zentrum in Diamant (2 nm unter der Oberfläche) koppelt mit in der Nähe befindlichen ^{29}Si -Kernen in einer Silica-Schicht aufgrund der Hyperfeinkopplung. Die Konturlinien zeigen die Stärke der effektiven, von den Kernspins ausgehenden magnetischen Gradienten. Wiedergabe aus Lit. [57] mit Genehmigung, Copyright Nature Publisher Group.

Um die NV-basierte NMR-Technik auf die Strukturaufklärung von Biomolekülen anzuwenden, muss die spektrale Auflösung des NV-Magnetometers verbessert werden, um dipolare Kopplungen und chemische Verschiebungen erkennen zu können. Solch eine Verbesserung könnte einerseits durch die Entwicklung neuer Messverfahren ähnlich zur zweidimensionalen NMR^[58] und andererseits durch eine Verbesserung der Kohärenzzeit der NV-Zentren nahe der Grenzfläche erreicht werden. Vielversprechende neue Techniken ermöglichen es inzwischen, das magnetische Rauschen unter Verwendung neuer Verfahren zu entfernen, die im Kontext der Quanteninformationsverarbeitung entwickelt wurden.^[59]

4.4. Hyperpolarisation von Diamanten für die molekulare Bildgebung

Die Kernspintomographie (MRT) ist eine der wichtigsten Bildgebungstechniken in der Medizin. Aufgrund der langwelligen Radiofrequenzen der Photonen ist sie nicht durch Streuungen limitiert und ermöglicht somit, Gewebe nicht-invasiv abzubilden. Ein Hauptnachteil dieser Technik ist die geringe Empfindlichkeit, die zum Teil auf die geringe Polarisation der Kernspins bei niedrigen Temperaturen zurückzuführen ist. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass sich die Empfindlichkeit der MRT durch die dynamische Kernspinpolarisation (DKP) von NDs verbessern lässt (Abbildung 7).^[60]



(b) Empfindlichkeit und räumliche Auflösung der klinischen Bildgebung

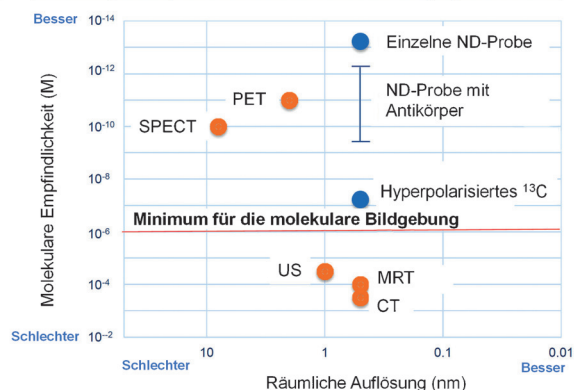


Abbildung 7. Hyperpolarisation von NV-Zentren in NDs für die Signalverstärkung in der MRT. a) Illustration des Prozesses der Hyperpolarisation durch NV-Zentren für die Signalverstärkung in der MRT. b) Vergleich der Empfindlichkeit und Ortsauflösung von klinisch angewendeten Bildgebungstechniken und der hyperpolarisierten MRT. PET: Positronenemissionstomographie, SPECT: single-photon emission computed tomography, US: Ultraschall, CT: Computertomographie. Verglichen mit herkömmlichen MRT-Systemen könnten hyperpolarisierte ND-Proben die gleiche räumliche Auflösung wie MRT, allerdings gepaart mit einer extrem hohen Empfindlichkeit für die molekulare Bildgebung, erreichen.

Ein zentrales Element dieses Polarisationsverfahrens ist das optische Pumpen, das es ermöglicht, Elektronenspins von NV-Zentren innerhalb weniger Mikrosekunden selbst bei Raumtemperatur zu polarisieren (Hyperpolarisation). Diese Polarisation kann über etablierte NMR-Verfahren, die auf der Hartmann-Hahn-Resonanz,^[12] dem Solideffekt^[61] oder der Resonanz zwischen Elektronen- und Kernspins über vermiedene Kreuzung von Energieniveaus^[62] basieren, auf Kernspins überführt werden. Bislang ist die Polarisation von NDs wegen der ungeordneten Orientierung der NV-Zentren noch weitaus schwieriger als bei makroskopischem Diamant. Allerdings konnten vor kurzem fortgeschrittene DKP-Verfahren entwickelt werden, die diesen Aspekt bereits adressieren^[60b] und sich in ersten Experimenten bewährt haben.^[60c]

Der größte Vorteil von NV-Defekten für die DKP betrifft jedoch das optische Pumpen, das es ermöglicht, ein einzelnes NV-Zentrum für die Polarisation einer Vielzahl von Kernspins auf einer äußerst kurzen Zeitskala zu realisieren.^[12] Weiterhin können die Experimente bei geringen Feldern und bei Raumtemperatur ohne Effizienzeinbußen durchgeführt werden. Hyperpolarisierte NDs weisen lange (mehr als eine Minute) Relaxationszeiten^[63] auf, und für makroskopische Diamanten konnten bei Raumtemperatur bereits Relaxationszeiten im Bereich von Stunden gemessen werden, was für Anwendungen in der MRT wichtig wäre. Weiterhin er-

möglichen NV-Defekte auch die Polarisierung von externen Kernspins, wenn diese sich nahe der Diamantoberfläche befinden,^[64] und ermöglichen so die Konstruktion von Durchflusszellen, in denen hoch polarisierte Moleküle in Volumina, die sich für die NMR-Detektion eignen, gewonnen werden könnten.^[65]

4.5. Selbstorganisierte ND-Strukturen

Die skalierbare Realisierung von geordneten Strukturen von NV-Zentren in Diamant bleibt eine zentrale Herausforderung auf dem Weg zu einer effizienten Quanteninformationsverarbeitung, Quantensimulation und Quantensensorik-Anwendungen. Zwar sind bereits Techniken auf Basis von implantierten NV-Zentren in makroskopischen Diamantkristallen oder Hybridbauteilen entwickelt worden, sie sind aber durch die erreichbare räumliche Auflösung und durch die technischen Schwierigkeiten in der Massenfertigung begrenzt. Ein neuer Ansatz für eine Anordnung von NV-Zentren basiert auf den einzigartigen Möglichkeiten biologischer Systeme zur präzisen Selbstorganisation und deren hoher räumlicher Auflösung, die bereits diskutiert und demonstriert wurde.^[66] Eine Realisierung von miteinander über biologische Strukturen verbundenen NDs gelang durch die Synthese kleiner ND-Komplexe mit SP1 (Stable Protein 1). Erste Schritte zur Bildung regelmäßiger Anordnungen von NDs auf SP1-Arrays wurden bereits gemacht (Abbildung 8).^[66] Ein wichtiges Ergebnis auf dem Weg zum Aufbau geordneter ND-Strukturen war die Bildung zahlreicher Dimere und Trimere mit größeren geordneten Strukturen, beispielsweise einem Sieben-ND-Hexagon.

Fernab von periodischen 1D- und 2D-Mustern ermöglicht das DNA-Origami-Verfahren, das auf der Faltung eines gro-

ßen Einzelstrang-DNA-Moleküls durch zahlreiche kleinere, so genannte „Stapelstränge“ beruht, die Bildung von komplexen und präzise steuerbaren Strukturen, die von aperiodischen Arrays bis zu wirklichen dreidimensionalen Architekturen reichen.^[67] Basierend auf den selektiven Watson-Crick-Basenpaarungen konnten präzise definierte 2D- oder 3D-DNA-Nanostrukturen entwickelt werden. Hybridanordnungen auf Grundlage von DNA-Nanostrukturen bieten eine ideale Plattform, um die Entfernung sowie die Orientierungsabhängigen elektronischen und optischen Eigenschaften von Fluorophoren und Nanopartikeln zu untersuchen. Bislang hat die geringe kolloidale Stabilität bei hohen Ionenstärken, auch von beschichteten NDs, deren Verknüpfung mit DNA-Nanostrukturen beschränkt. Vor kurzem wurde eine biopolymerbasierte Beschichtung vorgestellt, mit der sich NDs sogar bei hohen Ionenstärken effizient verkapseln lassen und die eine hohe kolloidale Stabilität verleiht, die für die DNA-Anbindung essenziell ist (siehe Abschnitt 3.3). Mit Vitamin H (Biotin) funktionalisierte und perfekt dispergierte NDs konnten aufgrund der starken Wechselwirkung von Biotin mit dem Protein Streptavidin genauestens in vordefinierte 1D-, 2D- und 3D-Geometrien angeordnet werden (Abbildung 8).^[68] Derartige Anordnungen bieten einzigartige Möglichkeiten zur Herstellung selbstorganisierter Spingitter oder plasmonverstärkter Spinsensoren sowie verbesserter Fluoreszenzmarker.

5. Diamant-Sensorik in lebenden Systemen – Fortschritte und Herausforderungen

Die Anwendung der Diamant-Sensorik für die Aufklärung verschiedenster biologischer Fragen, beispielsweise zur Struktur und Dynamik von Proteinen in lebenden Zellen, ist ein aufstrebender neuer Forschungszweig. Über die Vorteile der traditionellen optischen Bildgebung hinaus könnten NDs auch in lebenden biologischen Systemen als Sonden zum Nachweis kleinster magnetischer Felder, von Kern- und Elektronenspins, Drücken und Temperatur unter Verwendung der in Abschnitt 4 beschriebenen Techniken mit nanoskopischer und sogar atomarer Präzision angewendet werden.^[1,69] Aus diesem Grund sind Diamant-Magnetfeldsensoren ein ausgesprochen vielversprechendes Mittel, um die Struktur und Dynamik von Biomolekülen in einer biologischen Umgebung unter physiologischen Bedingungen aufzuklären. Um dieses Fernziel zu erreichen, müssen allerdings noch einige große Hürden überwunden werden. In diesem Abschnitt werden kurz die aktuellen Fortschritte bei NV-Diamantmaterialien für biologische Anwendungen diskutiert, wobei das Potenzial und die Herausforderungen dieser Technik hervorgehoben werden.

5.1. Biologische Verträglichkeit von NDs

Aufgrund ihres sehr stabilen Kohlenstoffgitters werden Diamanten in der Regel als stabil, bioinert und biokompatibel betrachtet.^[70] Der Anwendungsbereich von Diamant-Nanopartikeln für In-vitro- und In-vivo-Studien muss den-

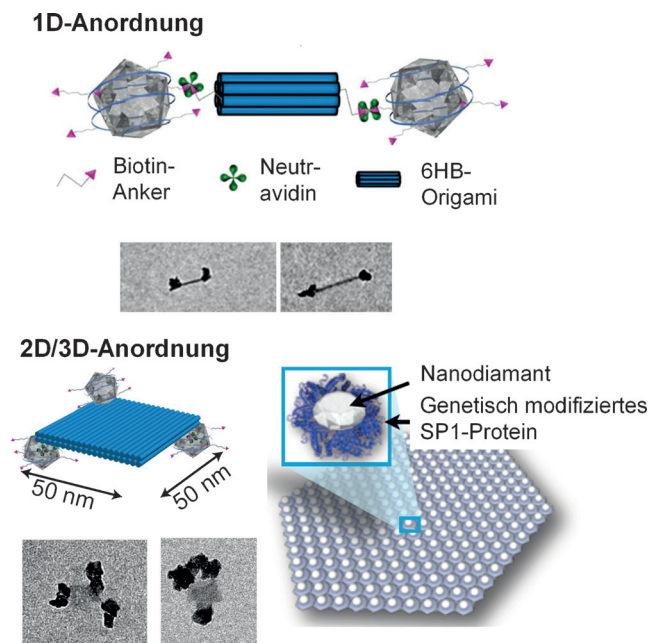


Abbildung 8. Selbstorganisation von NDs auf einem DNA-Origami-Template und einem Proteintemplate (SP1).

noch sorgfältig untersucht werden, um ihre mögliche „Nanotoxizität“ (d. h. die Toxizität infolge ihrer nanoskopischen Größe) zu ergründen. Bis heute lassen zahlreiche In-vitro-Zytotoxizitätsstudien darauf schließen, dass sich NDs bioverträglicher verhalten als andere Nanomaterialien, wie Kohlenstoffnanoröhrchen sowie halbleitende oder metallische Nanopartikel, und bislang keine Zelltoxizität in verschiedenen Zelllinien induzieren.^[71] Langzeitstudien von NDs in der Zellkultur zeigen weiterhin, dass NDs keine chromosomalen oder genetischen Schäden verursachen und sich gleichmäßig in Tochterzellen verteilen, ohne die Teilung und Differenzierung der Zellen zu beeinträchtigen.^[72] Intensive In-vivo-Studien an Mäusen und *Caenorhabditis elegans* lassen weiterhin auf eine vielversprechende Biokompatibilität schließen, ohne dabei in Lebertoxizität, systemischen Entzündungen oder sonstigen nachteiligen Wirkungen auf die Nachkommen zu resultieren.^[73]

Kürzlich wurde auf einige potenzielle Risiken von NDs hingewiesen, wie das Auftreten einer erhöhten Gesamtmenge an reaktiven Sauerstoffspezies in humanen Hepatozyten,^[74] das Herbeiführen leichter DNA-Schädigungen in embryonalen Stammzellen^[75] sowie die Langzeitakkumulation in der Leber, der Milz und der Lunge im Zusammenspiel mit einer langsamen Ausscheidung.^[76] Wie jedes andere nicht körpereigene Material können NDs abhängig von den angewendeten Konzentrationen Nebenwirkungen in vitro und in vivo hervorrufen. Auf der Grundlage der bislang veröffentlichten In-vitro- und In-vivo-Studien gehören NDs jedoch zu den biokompatibleren Nanopartikeln mit einem vielversprechenden Biosicherheitsprofil. NDs von unterschiedlicher Größe, mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen und Verabreichungswegen werden wahrscheinlich auch eine unterschiedliche Verteilung und potenzielle Nebenwirkungen aufweisen. Aus diesem Grund muss die biologische Verträglichkeit von NDs sorgfältig untersucht werden, wenn diese als In-vivo-Sensoren profiliert werden sollen. Durch eine Verbesserung der Qualität der ND-Sensoren (beispielsweise durch eine Größenoptimierung, Verengung der ND-Größenverteilungen, Verbesserung der Kolloidstabilität unter In-vivo-Bedingungen sowie Funktionalisierung der ND-Oberfläche) werden NDs bereitstehen, die sich für die jeweiligen In-vitro- und In-vivo-Anwendungen optimal eignen.

5.2. NDs für den Wirkstofftransport

Die gegenwärtig am meisten beforschten Anwendungen von NDs in biologischen Systemen konzentrieren sich hauptsächlich auf den Transport von Wirkstoffen. Als Träger von Wirkstoffen weisen NDs zahlreiche Vorteile auf, da sie sich durch Fluoreszenz nachweisen lassen und weil ihre Oberflächenfunktionalisierung die Beladung mit verschiedenen Wirkstoffen sowie die Anheftung von Signalmolekülen für die zellspezifische Anbindung erleichtert. Die erste Generation von ND-Wirkstofftransportern wurde durch eine einfache Adsorption der lipophilen Wirkstoffmoleküle auf der Oberfläche der NDs erzielt.^[77] Diese ND-Wirkstoff-Komplexe bestanden aus 4–6 nm großen primären ND-De-naturationspartikeln, die sich in Lösung in 100–200 nm große

Aggregate zusammenlagern, die in der Lage sind, größere Mengen an Wirkstoffen aufzunehmen und deren Blutzirkulationszeit, Plasma-Halbwertszeit sowie Verweildauer im Tumorgewebe deutlich zu verbessern.^[77,78] Verschiedene Krebswirkstoffe wurden auf diese Weise transportiert.^[77,79] Außerdem gab es Fortschritte bei der gezielten Ansteuerung von Tumorzellen in einem gerichteten Wirkstofftransport, der kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen, der intrazellulären Verfolgung von Verbleib und Transport sowie der Vermeidung von Chemoresistenz.^[34b,80] Die Herstellung stabiler und definierter Nanopartikel mit schmalen Größenverteilungen ist mit dieser Methode allerdings anspruchsvoll, was die Risiken unspezifischer Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen sowie unvorhersehbarer Nebenwirkungen erhöht.^[81] ND-Transporter der zweiten Generation konnten durch Oberflächenmodifikationen von einzelnen ND-Partikeln mit stabilisierenden Polymeren,^[82] Wirkstoffmolekülen,^[29,83] wie dem Antikrebsmittel Doxorubicin (DOX),^[84] sowie Platinkomplexen^[85] erzielt werden, die kovalent an die NDs gebunden wurden. Hierbei zeigten einige sogar eine Stimulus-induzierte Freisetzung des Wirkstoffs.^[83b,84,85] Unter all diesen kovalenten Modifikationen erwies sich eine Polyglycerinhülle^[84,85] als besonders vielversprechend, da sie die ND-Stabilität deutlich erhöht und somit vielseitige Perspektiven bietet, vor allem für die Verbesserung des Transports von hydrophilen Wirkstoffen, z. B. von Platinkomplexen, da keine Agglomeration in Säugerzellen beobachtet wurde. Allerdings besteht nach wie vor die schwierige Aufgabe, nach Beladung mit hydrophoben Wirkstoffen eine ausreichende kolloidale Stabilität beizubehalten.^[27a] Vor kurzem haben wir den Transport von Wirkstoffen durch NDs untersucht, die eine Albumin-Biopolymerbeschichtung aufwiesen. Diese zeigten, wie in Abschnitt 3.3 dargelegt, eine ausgezeichnete Stabilität unter biologischen Bedingungen. Wirkstoffmoleküle wurden kovalent an das Albumingerüst über einen säurelabilen Linker konjugiert.^[35] Sogar nach einer hohen Beladung mit hydrophoben Wirkstoffen zeigten die so erhaltenen ND-Wirkstoff-Konjugate eine außerordentliche Stabilität in biologischen Flüssigkeiten ohne detektierbare Aggregatbildung. Erste In-ovo-Daten mit Brustkrebs-Xenotransplantaten auf chorioallantoischen Membranen von Hühnerembryos (CAM) zeigten ebenfalls eine verbesserte Wirkung an den Tumoren, die nach Behandlung mit den ND-Wirkstoff-Konjugaten eine geringere Größe aufwiesen.^[35] Alle diese Versuche lassen darauf schließen, dass die Oberflächenbeschichtung und Modifikation von NDs eine wirksame Strategie ist, um NDs als effiziente Wirkstofftransporter zu etablieren (Abbildung 9).

5.3. Potenzial und Herausforderungen der Diamant-Sensorik in biologischen Systemen

Die oben diskutierte Evaluation der biologischen Verträglichkeit und die Studien zum Wirkstofftransport unterstreichen das Potenzial des Einsatzes von NDs in lebenden biologischen Systemen. Weiterhin wurden in den vorigen Abschnitten die einzigartigen Möglichkeiten der Quantensensorik auf Basis von NV-Zentren vorgestellt.

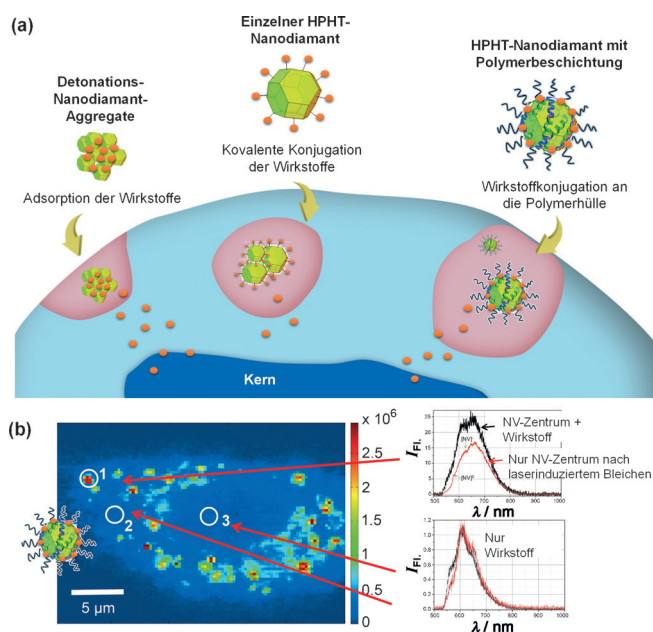


Abbildung 9. ND-basierte Wirkstofftransporter. a) Vergleich von verschiedenen ND-basierten Wirkstofftransportstrategien. Detonations-NDs bilden Aggregate, die Wirkstoffmoleküle adsorbieren können und ferner eine unkontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe ermöglichen.^[27a, 77, 78, 79b] Nicht beschichtete HPHT-NDs mit kovalent verknüpften Wirkstoffen neigen häufig zur Aggregatbildung in biologischen Systemen.^[29, 83a] Polymerbeschichtete HPHT-NDs ermöglichen die Beladung von Wirkstoffmolekülen in der Polymerhülle und eine Stimulus-induzierbare Wirkstofffreisetzung.^[34c, 35] b) Konfokale Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen von DOX, das kovalent an HPHT-NDs angebunden wurde.^[35] Kreis 1 hebt eine repräsentative Emission in der Zelle hervor, die überlappende Emissionsspektren der NV-Zentren und DOX-Wirkstoffe aufweist. Nach dem Bleichen mit Laserlicht kann die DOX-Emission gelöscht werden, sodass die unter diesen Bedingungen stabile Fluoreszenz der NV-Zentren deutlich beobachtet und aufgenommen werden kann. Die kreisförmigen Markierungen 2 und 3 zeigen die Fluoreszenzspektren im Cytosol und im Kern, die ausschließlich die Emission von DOX aufweisen, was auf die Freisetzung der DOX-Wirkstoffe vom ND-Träger schließen lässt.

Die Kombination dieser Vorteile macht NDs zu vielversprechenden Kandidaten als die kleinsten Sensoren zur Erfassung geringster Magnetfelder und Elektronenspins *in vitro* und schließlich auch *in vivo* in lebenden Zellen als nicht-invasive Nanosensoren zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Biomolekülen in ihrer natürlichen Umgebung. Obwohl dieses Forschungsgebiet gerade erst erschlossen wird, gibt es bereits einige Beispiele für das einzigartige Potenzial von ND-Quantensensoren. Die magnetische Resonanz von einzelnen, fluoreszenten NDs kann optisch in lebenden Hela-Zellen detektiert werden, wobei ihr Ort, ihre Orientierung, ihre Spinzustände und ihre Spin-Kohärenzzeiten mit nanoskaliger Präzision ausgelesen wurden.^[80d] Die Energien der Spinzustände in einzelnen NV-Zentren wurden dabei zur Identifizierung und Verfolgung der NDs mit identischer Fluoreszenz genutzt. Zudem können die Messungen der Kohärenzzeiten Informationen über Änderungen in der lokalen Umgebung liefern und damit einzigartige Einblicke in intrazelluläre Prozesse geben. Ein erfolgreiches Beispiel ist die ND-basierte, hochempfindliche Thermometrie auf der

Nanoskala durch temperaturabhängige Messung der Kohärenzzeiten des NV-Zentrums. Zudem hängt in einem verschwindenden externen Magnetfeld die präzise Position der magnetischen Resonanz von der Temperatur ab und kann daher zur Bestimmung von lokalen Temperaturänderungen genutzt werden (siehe Abbildungen 1 und 10). Mithilfe dieser Technik ist es möglich, die lokale Temperatur in einer lebenden Zelle mit einer Auflösung von 200 nm zu messen.^[69] Analoge Ideen versprechen weiterhin, kleinste Kräfte in Zellen und Proteinen zu detektieren.^[86]

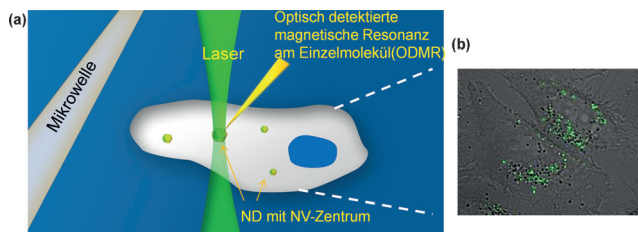


Abbildung 10. Illustration der ND-Quantensensorik in lebenden Zellen. a) Der Versuchsaufbau. b) Abbildung von NDs mit NV-Zentren mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen (grüne Punkte).

Wenn hingegen ein externes magnetisches Feld in der biologischen Probe angewendet wird, hängen die Spin-Kohärenzzeiten der NV-Zentren von der magnetischen Umgebung ab, was im Prinzip die magnetische Abbildung von Proteinen *in vitro*^[27b] und sogar in lebenden Zellen ermöglichen würde. Als ein erstes Beispiel könnten die Magnetosomen abgebildet werden, die in magnetotaktischen Bakterien produziert werden. Die Bildgebung könnte über die optische Detektion der magnetischen Resonanz von NV-Zentren erfolgen, die auf der Oberfläche eines Diamant-Chips implantiert werden.^[87] Weiterhin könnten NV-Zentren, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, Elektronenspins in einer biologischen Umgebung detektieren. Wenn solch eine Elektronenspin-Markierung in das entsprechende Biomolekül von Interesse eingefügt wird, könnte diese Technik die Detektion und Analyse des Biomoleküls mit NV-Zentren in einem lebenden System mit Einzelmolekülempfindlichkeit ermöglichen. Weiterhin könnte die Einzelmolekül-NMR-Technik, die in Abschnitt 4.3 beschrieben wurde, sogar die Detektion von Kernspins erlauben, wodurch ein tieferes Verständnis von zellulären Reaktionen in Echtzeit, sogar in lebenden Zellen, erzielt werden könnte. Die Erkennung von Kernspins ist anspruchsvoller als die von Elektronenspins, da sich die Kernspins wegen ihres höheren Rauschens in einem biologischen System wie auch wegen ihres schwachen magnetischen Moments in sehr großer Nähe zu den NV-Zentren befinden müssen. Wie in Abschnitt 4.3 dargestellt, wird in diesem Zusammenhang gegenwärtig eine Reihe von vielversprechenden Lösungsansätzen verfolgt. Wir erwarten, dass die Hyperpolarisationstechnik auf Basis von NV-Zentren zukünftig eine ultrahohe Auflösung MRT, wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, ermöglichen wird. Die bisherigen Studien konnten die generelle Realisierbarkeit von kontrollierten NV-Zentren als Einzelspinsonden für die nanoskalige Magnetometrie in biologischen Systemen nachweisen, sodass eine Vielzahl von

neuen Möglichkeiten für die quantenbasierte Bildgebung in den Lebenswissenschaften denkbar wird.

Es sollte betont werden, dass noch zahlreiche Schwierigkeiten zu überwinden sind, bevor diese Ideen vollständig umgesetzt werden können. Die hohe Empfindlichkeit des NV-Sensors, die es ermöglicht, winzigste Signale aufzuzeichnen, impliziert auch, dass der Sensor leicht durch eine Vielzahl von Rauschquellen gestört wird, beispielsweise durch Kern- und Elektronenspins, Ladungen und Radikale in ungeordneter Bewegung, die intrinsisch in biologischen Systemen vorhanden sind. Darüber hinaus ist der ND-Sensor nicht stationär und wird sich bewegen und drehen, was zu einer Randomisierung der Signale führt. Lösungen für diese Probleme werden derzeit in Physiklabors entwickelt (siehe Abschnitt 4). Die entsprechenden Verfahren werden aber sicherlich angepasst und auf biologische Umgebungen übertragen werden müssen, um ihre Anwendung zunächst *in vitro* und schließlich *in vivo* zu ermöglichen. Obwohl all diese Aufgaben sicherlich anspruchsvoll sind, konnte die aktuelle Forschung bislang keine grundlegenden Einschränkungen in diese Richtung finden. Daher ist zu erwarten, dass eine ganze Reihe von Anwendungen der ND-Sensorik in der Biologie realisierbar sein wird. Danach wird ihre Leistung im Vergleich zu derjenigen etablierter Techniken im Detail bewertet werden können, um Anwendungsbereiche zu identifizieren, in denen die aktuellen Techniken übertroffen werden und ein neuer Zugang zur Beobachtung biologischer Phänomene eröffnet wird.

6. Zusammenfassung

Der Nachweis und die Analyse der Struktur, Dynamiken und Wechselwirkungen einzelner Moleküle unter nativen Bedingungen mit hoher Empfindlichkeit und einer räumlichen Auflösung im Nanometerbereich ist eine wesentliche Aufgabe mit großen Auswirkungen auf die moderne Wissenschaft und Technologie. Das NV-Zentrum in Diamant ermöglicht 1) nicht-bleichende Fluoreszenzmessungen für die supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie, 2) Elektronenspin- und Kernspindetektion mit großem Potenzial für eine atomare Auflösung unter Umgebungsbedingungen sowie 3) eine Hyperpolarisation durch einfaches optisches Pumpen, um die Empfindlichkeit der MRT zu erhöhen. Darüber hinaus können in Diamant-Nanopartikeln von bis zu 2 nm Größe stabile NV-Zentren implantiert werden, was eine Sensorik im Nanometerbereich auf Einzelmolekülebene ermöglichen würde. Weiterhin können NDs mit Biomolekülen funktionalisiert werden und in biologische Systeme eindringen, wo sie eine vielversprechende Biokompatibilität aufweisen. Daher könnte die Quantensensorik mit NV-Zentren auch auf Zellen übertragen werden, um dort eine Sensorik im Nanobereich, ja sogar in lebenden Zellen, zu ermöglichen. Theoretische und quantenoptische Studien haben bereits die Stärke der Quantensensorik *in vitro* nachgewiesen, und einige wegweisende Studien konnten bereits das große Potenzial für die nanoskalige Sensorik in lebenden Zellen aufzeigen. Wir denken, dass sich die ND-basierte Quantensensorik dank ihrer vielfältigen Möglichkeiten zu einer wegweisenden Me-

thode für die Bildgebung im weiten Feld der Lebenswissenschaften entwickeln wird und einen beispiellosen Zugang und Einblick in die Struktur, Dynamik und Funktion einzelner Biomoleküle unter physiologischen Bedingungen bieten wird.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das ERC Synergy Grant BioQ (319130) und eine Alexander von Humboldt-Professur gefördert. Wir möchten uns bei Dr. Rolf Reuter für zahlreiche hilfreiche Kommentare bedanken.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6586–6598
Angew. Chem. **2016**, 128, 6696–6709

- [1] G. Balasubramanian, I. Y. Chan, R. Kolesov, M. Al-Hmoud, J. Tisler, C. Shin, C. Kim, A. Wojcik, P. R. Hemmer, A. Krueger, T. Hanke, A. Leitenstorfer, R. Bratschitsch, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *Nature* **2008**, 455, 648–651.
- [2] a) F. Dolde, H. Fedder, M. W. Doherty, T. Nobauer, F. Rempp, G. Balasubramanian, T. Wolf, F. Reinhard, L. C. L. Hollenberg, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *Nat. Phys.* **2011**, 7, 459–463; b) L. Rondin, J. P. Tetienne, T. Hingant, J. F. Roch, P. Maletinsky, V. Jacques, *Rep. Prog. Phys.* **2014**, 77, 056503.
- [3] A. M. Zaitsev, *Optical Properties of Diamond: A Data Handbook*, Springer, Berlin, **2001**.
- [4] G. Davies, *Properties and Growth of Diamond*, The Institution of Electrical Engineers (INSPEC), **1994**.
- [5] M. W. Doherty, N. B. Manson, P. Delaney, F. Jelezko, J. Wrachtrup, L. C. L. Hollenberg, *Phys. Rep.* **2013**, 528, 1–45.
- [6] a) J.-P. Boudou, J. Tisler, R. Reuter, A. Thorel, P. A. Curmi, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *Diamond Relat. Mater.* **2013**, 37, 80–86; b) J. P. Boudou, P. A. Curmi, F. Jelezko, J. Wrachtrup, P. Aubert, M. Sennour, G. Balasubramanian, R. Reuter, A. Thorel, E. Gaffet, *Nanotechnology* **2009**, 20, 235602.
- [7] I. I. Vlasov, A. A. Shiryaev, T. Rendler, S. Steinert, S.-Y. Lee, D. Antonov, M. Voros, F. Jelezko, A. V. Fisenko, L. F. Semjonova, J. Biskupek, U. Kaiser, O. I. Lebedev, I. Sildos, P. R. Hemmer, V. I. Konov, A. Gali, J. Wrachtrup, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, 9, 54–58.
- [8] a) K. B. Holt, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2007**, 365, 2845–2861; b) A. M. Schrand, S. A. C. Hens, O. A. Shenderova, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2009**, 34, 18–74; c) V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7, 11–23.
- [9] G. Balasubramanian, P. Neumann, D. Twitchen, M. Markham, R. Kolesov, N. Mizuochi, J. Isoya, J. Achard, J. Beck, J. Tisler, V. Jacques, P. R. Hemmer, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 383–387.
- [10] A. Gruber, A. Dräbenstedt, C. Tietz, L. Fleury, J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski, *Science* **1997**, 276, 2012–2014.
- [11] J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski, J. Bernard, M. Orritt, R. Brown, *Nature* **1993**, 363, 244–245.
- [12] P. London, J. Scheuer, J. M. Cai, I. Schwarz, A. Retzker, M. B. Plenio, M. Katagiri, T. Teraji, S. Koizumi, J. Isoya, R. Fischer, L. P. McGuinness, B. Naydenov, F. Jelezko, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, 111, 067601.
- [13] a) L. J. Rogers, K. D. Jahnke, M. H. Metsch, A. Sipahigil, J. M. Binder, T. Teraji, H. Sumiya, J. Isoya, M. D. Lukin, P. Hemmer, F. Jelezko, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, 113, 263602; b) L. J. Rogers, K. D. Jahnke, M. W. Doherty, A. Dietrich, L. P. McGuinness, C. Müller, T. Teraji, H. Sumiya, J. Isoya, N. B. Manson, F. Jelezko, *Phys. Rev. B* **2014**, 89, 235101.
- [14] a) Z. Z. Liang, X. Jia, H. A. Ma, C. Y. Zang, P. W. Zhu, Q. F. Guan, H. Kanda, *Diamond Relat. Mater.* **2005**, 14, 1932–1935;

- b) Z. Z. Liang, H. Kanda, X. Jia, H. A. Ma, P. W. Zhu, Q.-F. Guan, C. Y. Zang, *Carbon* **2006**, *44*, 913–917.
- [15] a) G. Davies, M. F. Hamer, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1976**, *348*, 285–298; b) S. J. Yu, M. W. Kang, H. C. Chang, K. M. Chen, Y. C. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17604–17605; c) F. Treussart, V. Jacques, E. Wu, T. Gacoin, P. Grangier, J. F. Roch, *Phys. B* **2006**, *376*, 926–929.
- [16] M. Schwander, K. Partes, *Diamond Relat. Mater.* **2011**, *20*, 1287–1301.
- [17] J. R. Rabeau, S. T. Huntington, A. D. Greentree, S. Prawer, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 134104.
- [18] O. A. Shenderova, D. M. Gruen, *Ultrananocrystalline Diamond: Synthesis Properties and Applications*, William Andrew Publishing, Norwich New York, **2012**.
- [19] D. Amans, A.-C. Chénus, G. Ledoux, C. Dujardin, C. Reynaud, O. Sublemontier, K. Masenelli-Varlot, O. Guillois, *Diamond Relat. Mater.* **2009**, *18*, 177–180.
- [20] T. L. Daulton, M. A. Kirk, R. S. Lewis, L. E. Rehn, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B* **2001**, *175*, 12–20.
- [21] S. Welz, Y. Gogotsi, M. J. McNallan, *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 4207–4214.
- [22] A. Stacey, I. Aharonovich, S. Prawer, J. E. Butler, *Diamond Relat. Mater.* **2009**, *18*, 51–55.
- [23] Firmen-Websites: <http://www.adamasnano.com/>; <http://www.diamondnanotechnologies.com/products>; <http://www.microdiamant.com/>.
- [24] T. A. Kennedy, J. S. Colton, J. E. Butler, R. C. Linares, P. J. Doering, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4190–4192.
- [25] A. S. Barnard, M. Sternberg, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19307–19314.
- [26] a) L. Moore, V. Grobarova, H. Shen, H. B. Man, J. Micova, M. Ledvina, J. Stursa, M. Nesladek, A. Fiserova, D. Ho, *Nanoscale* **2014**, *6*, 11712–11721; b) S. S. Batsanov, S. M. Gavrilkin, A. S. Batsanov, K. B. Poyarkov, I. I. Kulakova, D. W. Johnson, B. G. Mendis, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11166–11172.
- [27] a) M. Chen, E. D. Pierstorff, R. Lam, S.-Y. Li, H. Huang, E. Osawa, D. Ho, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2016–2022; b) A. Ermakova, G. Pramanik, J. M. Cai, G. Algara-Siller, U. Kaiser, T. Weil, Y. K. Tzeng, H. C. Chang, L. P. McGuinness, M. B. Plenio, B. Naydenov, F. Jelezko, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 3305–3309; c) H. D. Wang, C. H. Niu, Q. Yang, I. Badea, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 145703.
- [28] A. Krueger, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1485–1492.
- [29] X.-Q. Zhang, R. Lam, X. Xu, E. K. Chow, H.-J. Kim, D. Ho, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4770–4775.
- [30] Y. Liu, K. Sun, *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 1045–1050.
- [31] B. M. Chang, H. H. Lin, L. J. Su, W. D. Lin, R. J. Lin, Y. K. Tzeng, R. T. Lee, Y. C. Lee, A. L. Yu, H.-C. Chang, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 5737–5745.
- [32] S. Arroyo-Camejo, M. P. Adam, M. Besbes, J. P. Hugonin, V. Jacques, J. J. Greffet, J. F. Roch, S. W. Hell, F. Treussart, *ACS Nano* **2013**, *7*, 10912–10919.
- [33] a) I. Rehor, J. Slegerova, J. Kucka, V. Proks, V. Petrakova, M.-P. Adam, F. Treussart, S. Turner, S. Bals, P. Sacha, M. Ledvina, A. M. Wen, N. F. Steinmetz, P. Cigler, *Small* **2014**, *10*, 1106–1115; b) A. Bumb, S. K. Sarkar, N. Billington, M. W. Brechbiel, K. C. Neuman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7815–7818.
- [34] a) X. Zhang, C. Fu, L. Feng, Y. Ji, L. Tao, Q. Huang, S. Li, Y. Wei, *Polymer* **2012**, *53*, 3178–3184; b) D. Wang, Y. Tong, Y. Li, Z. Tian, R. Cao, B. Yang, *Diamond Relat. Mater.* **2013**, *36*, 26–34; c) L. Zhao, Y.-H. Xu, H. Qin, S. Abe, T. Akasaka, T. Chano, F. Watari, T. Kimura, N. Komatsu, X. Chen, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 5348–5357.
- [35] Y. Wu, A. Ermakova, W. Liu, G. Pramanik, T. M. Vu, A. Kurz, L. McGuinness, B. Naydenov, S. Hafner, R. Reuter, J. Wrachtrup, J. Isoya, C. Förtsch, H. Barth, T. Simmet, F. Jelezko, T. Weil, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 6576–6585.
- [36] W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* **1999**, *283*, 1670–1676.
- [37] S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32.
- [38] K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, S. W. Hell, *Nature* **2006**, *440*, 935–939.
- [39] 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*, 1642–1645.
- [40] E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 144–147.
- [41] K. Y. Han, K. I. Willig, E. Rittweger, F. Jelezko, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3323–3329.
- [42] S. Arroyo-Camejo, M. P. Adam, M. Besbes, J. P. Hugonin, V. Jacques, J. J. Greffet, J. F. Roch, S. W. Hell, F. Treussart, *ACS Nano* **2013**, *7*, 10912–10919.
- [43] J. Tisler, R. Reuter, A. Lammle, F. Jelezko, G. Balasubramanian, P. R. Hemmer, F. Reinhard, J. Wrachtrup, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7893–7898.
- [44] J. Tisler, T. Oeckinghaus, R. J. Stohr, R. Kolesov, R. Reuter, F. Reinhard, J. Wrachtrup, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 3152–3156.
- [45] a) J. R. Maze, P. L. Stanwix, J. S. Hodges, S. Hong, J. M. Taylor, P. Cappellaro, L. Jiang, M. V. G. Dutt, E. Togan, A. S. Zibrov, A. Yacoby, R. L. Walsworth, M. D. Lukin, *Nature* **2008**, *455*, 644–647; b) J. M. Taylor, P. Cappellaro, L. Childress, L. Jiang, D. Budker, P. R. Hemmer, A. Yacoby, R. Walsworth, M. D. Lukin, *Nat. Phys.* **2008**, *4*, 810–816.
- [46] B. Grotz, J. Beck, P. Neumann, B. Naydenov, R. Reuter, F. Reinhard, F. Jelezko, J. Wrachtrup, D. Schweinfurth, B. Sarkar, P. Hemmer, *New J. Phys.* **2011**, *13*, 055004.
- [47] J. H. Cole, L. C. L. Hollenberg, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 495401.
- [48] A. O. Sushkov, N. Chisholm, I. Lovchinsky, M. Kubo, P. K. Lo, S. D. Bennett, D. Hunger, A. Akimov, R. L. Walsworth, H. Park, M. D. Lukin, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 6443–6448.
- [49] F. Z. Shi, Q. Zhang, P. F. Wang, H. B. Sun, J. R. Wang, X. Rong, M. Chen, C. Y. Ju, F. Reinhard, H. W. Chen, J. Wrachtrup, J. F. Wang, J. F. Du, *Science* **2015**, *347*, 1135–1138.
- [50] E. Schäfer-Nolte, L. Schlipf, M. Ternes, F. Reinhard, K. Kern, J. Wrachtrup, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113*, 217204.
- [51] S. F. Huelga, M. B. Plenio, *Contemp. Phys.* **2013**, *54*, 181–207.
- [52] H. Duddack, W. Dietrich, G. Toth, *Structure Elucidation by Modern NMR*, 3. Aufl., Steinkopff, Heidelberg, **1998**.
- [53] a) J. M. Cai, F. Jelezko, M. B. Plenio, A. Retzker, *New J. Phys.* **2013**, *15*, 013020; b) J. Casanova, Z.-Y. Wang, J. F. Haase, M. B. Plenio, *Phys. Rev. B* **2015**, *92*, 042304.
- [54] Y. Romach, C. Müller, T. Unden, L. J. Rogers, T. Isoda, K. M. Itoh, M. Markham, A. Stacey, J. Meijer, S. Pezzagna, B. Naydenov, L. P. McGuinness, N. Bar-Gill, F. Jelezko, *Phys. Rev. Lett.* **2015**, *114*, 017601.
- [55] a) T. Staudacher, F. Shi, S. Pezzagna, J. Meijer, J. Du, C. A. Meriles, F. Reinhard, J. Wrachtrup, *Science* **2013**, *339*, 561–563; b) H. J. Mamin, M. Kim, M. H. Sherwood, C. T. Rettner, K. Ohno, D. D. Awschalom, D. Rugar, *Science* **2013**, *339*, 557–560.
- [56] S. Steinert, F. Ziem, L. T. Hall, A. Zappe, M. Schweikert, N. Götz, A. Aird, G. Balasubramanian, L. Hollenberg, J. Wrachtrup, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1607.
- [57] C. Müller, X. Kong, J. M. Cai, K. Melentijevic, A. Stacey, M. Markham, D. Twitchen, J. Isoya, S. Pezzagna, J. Meijer, J. F. Du, M. B. Plenio, B. Naydenov, L. P. McGuinness, F. Jelezko, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4703.
- [58] a) A. Ajoy, U. Bissbort, M. D. Lukin, R. L. Walsworth, P. Cappellaro, *Phys. Rev. X* **2015**, *5*, 011001; b) J. M. Cai, M. Kost, M. B. Plenio, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11007.
- [59] a) E. M. Kessler, I. Lovchinsky, A. O. Sushkov, M. D. Lukin, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 150802; b) G. Arrad, Y. Vinkler, D. Aharonov, A. Retzker, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 150801.
- [60] a) P. Dutta, G. V. Martinez, R. J. Gillies, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 597–600; b) Q. Chen, I. Schwarz, F. Jelezko, A. Retzker, M. B. Plenio, *Phys. Rev. B* **2015**, *92*, 184420; c) J. Scheuer, I.

- Schwarz, Q. Chen, D. Schulze-Sünninghausen, P. Carl, P. Höfer, A. Retzker, H. Sumiya, J. Isoya, B. Luy, M. B. Plenio, B. Naydenov, F. Jelezko, *New J. Phys.* **2016**, *18*, 013040.
- [61] J. P. King, K. Jeong, C. C. Vassiliou, C. S. Shin, R. H. Page, C. E. Avalos, H. J. Wang, A. Pines, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8965.
- [62] R. Fischer, C. O. Bretschneider, P. London, D. Budker, D. Gershoni, L. Frydman, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *111*, 057061.
- [63] E. Rej, T. Gaebel, T. Boele, D. E. J. Waddington, D. J. Reilly, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8459.
- [64] D. Abrams, M. E. Trusheim, D. R. Englund, M. D. Shattuck, C. A. Meriles, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 2471–2478.
- [65] Q. Chen, I. Schwarz, F. Jelezko, A. Retzker, M. B. Plenio, *Phys. Rev. B* **2015**, *93*, 060408.
- [66] A. Albrecht, G. Koplovitz, A. Retzker, F. Jelezko, S. Yochelis, D. Porath, Y. Nevo, O. Shoseyov, Y. Paltiel, M. B. Plenio, *New J. Phys.* **2014**, *16*, 093002.
- [67] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [68] T. Zhang, A. Neumann, J. Lindlau, Y. Wu, G. Pramanik, B. Naydenov, F. Jelezko, F. Schüder, S. Huber, M. Huber, F. Stehr, A. Högele, T. Weil, T. Liedl, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9776–9779.
- [69] G. Kucsko, P. C. Maurer, N. Y. Yao, M. Kubo, H. J. Noh, P. K. Lo, H. Park, M. D. Lukin, *Nature* **2013**, *500*, 54–58.
- [70] Y. Zhu, J. Li, W. Li, Y. Zhang, X. Yang, N. Chen, Y. Sun, Y. Zhao, C. Fan, Q. Huang, *Theranostics* **2012**, *2*, 302–312.
- [71] a) A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Ōsawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2–7; b) A. M. Schrand, L. Dai, J. J. Schlager, S. M. Hussain, E. Ōsawa, *Diamond Relat. Mater.* **2007**, *16*, 2118–2123; c) K. K. Liu, C. L. Cheng, C. C. Chang, J. I. Chao, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 325102.
- [72] K. K. Liu, C. C. Wang, C. L. Cheng, J. I. Chao, *Biomaterials* **2009**, *30*, 4249–4259.
- [73] a) N. Mohan, C. S. Chen, H. H. Hsieh, Y. C. Wu, H. C. Chang, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3692–3699; b) V. Vijayanthimala, P. Y. Cheng, S. H. Yeh, K. K. Liu, C. H. Hsiao, J. I. Chao, H. C. Chang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7794–7802; c) X. Zhang, J. Yin, C. Kang, J. Li, Y. Zhu, W. Li, Q. Huang, Z. Zhu, *Toxicol. Lett.* **2010**, *198*, 237–243.
- [74] J. Mytych, A. Lewinska, J. Zebrowski, M. Wnuk, *Diamond Relat. Mater.* **2015**, *55*, 95–101.
- [75] Y. Xing, W. Xiong, L. Zhu, E. Ōsawa, S. Hussin, L. Dai, *ACS Nano* **2011**, *5*, 2376–2384.
- [76] Y. Yuan, Y. Chen, J.-H. Liu, H. Wang, Y. Liu, *Diamond Relat. Mater.* **2009**, *18*, 95–100.
- [77] H. Huang, E. Pierstorff, E. Ōsawa, D. Ho, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3305–3314.
- [78] a) E. K. Chow, X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Ōsawa, A. Goga, D. Ho, *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 73ra21; b) J. Xiao, X. Duan, Q. Yin, Z. Zhang, H. Yu, Y. Li, *Biomaterials* **2013**, *34*, 9648–9656.
- [79] a) Lit. [27a]; b) J. Li, Y. Zhu, W. Li, X. Zhang, Y. Peng, Q. Huang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8410–8418.
- [80] a) Y. Li, X. Zhou, D. Wang, B. Yang, P. Yang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16406–16412; b) T. B. Toh, D. K. Lee, W. Hou, L. N. Abdullah, J. Nguyen, D. Ho, E. K. Chow, *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 2683–2691; c) B. Guan, F. Zou, J. Zhi, *Small* **2010**, *6*, 1514–1519; d) L. P. McGuinness, Y. Yan, A. Stacey, D. A. Simpson, L. T. Hall, D. Maclaurin, S. Praver, P. Mulvaney, J. Wrachtrup, F. Caruso, R. E. Scholten, L. C. L. Hollenberg, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 358–363.
- [81] M. Vinante, G. Digregorio, L. Lunelli, S. Forti, S. Musso, L. Vanzetti, A. Lui, L. Pasquardini, M. Giorcelli, A. Tagliaferro, M. Anderle, C. Pederzoli, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 3785–3791.
- [82] A. Krueger, D. Lang, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 890–906.
- [83] a) X. Li, J. Shao, Y. Qin, C. Shao, T. Zheng, L. Ye, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7966–7973; b) K. K. Liu, W. W. Zheng, C. C. Wang, Y. C. Chiu, C. L. Cheng, Y. S. Lo, C. Chen, J. I. Chao, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 315106.
- [84] L. Zhao, Y. H. Xu, T. Akasaka, S. Abe, N. Komatsu, F. Watari, X. Chen, *Biomaterials* **2014**, *35*, 5393–5406.
- [85] L. Zhao, Y. H. Xu, H. Qin, S. Abe, T. Akasaka, T. Chano, F. Watari, T. Kimura, N. Komatsu, X. Chen, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 5348–5357.
- [86] J. M. Cai, F. Jelezko, M. B. Plenio, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4065.
- [87] D. Le Sage, K. Arai, D. R. Glenn, S. J. DeVience, L. M. Pham, L. Rahn-Lee, M. D. Lukin, A. Yacoby, A. Komeili, R. L. Walsworth, *Nature* **2013**, *496*, 486–489.

Eingegangen am 15. Juli 2015

Online veröffentlicht am 27. April 2016