

Funktionale Hybride aus Proteinen und anorganischen Nanopartikeln**

Christof M. Niemeyer*

Stichwörter:

Chaperone · Enzyme · Nanostrukturen · Proteine · Supramolekulare Chemie

Professor Manfred T. Reetz
zum 60. Geburtstag gewidmet

Dem rationalen Aufbau von Hybridmaterialien aus anorganischen Nanopartikeln und Biomolekülen durch Prinzipien der Selbstorganisation gilt gegenwärtig ein großes Interesse.^[1] Dies liegt am breiten Anwendungsspektrum solche Hybride für die Life Sciences wie auch für die Material- und die Nanowissenschaften und beruht auf den einzigartigen Eigenschaften der beiden Bausteine. Die anorganischen Nanopartikel verfügen über stark größenabhängige optische, elektrische, magnetische oder elektrochemische Materialeigenschaften, während sich Biomoleküle, beispielsweise Proteine und Nucleinsäuren, durch ihre evolutionär optimierte Bindungsspezifität und Funktionalität in biochemischen Prozessen auszeichnen. Wege ihrer im Vergleich zu Proteinen deutlich einfacheren Synthese und Handhabung wurden zunächst Nucleinsäuren zur Funktionalisierung von Nanopartikeln genutzt, um diese mit hochspezifischen Bindungseigenschaften auszustatten.^[2] Auch Proteine lassen sich zur Erweiterung der Bindungseigenschaften anorganischer Partikel einsetzen.^[3] Eine besondere Herausforderung besteht jedoch darin, über die Bindungseigenschaften von Proteinen hinaus auch deren intrinsische Funktionalität, beispielsweise optische, kataly-

tische, mechanische oder schaltbare Funktionen, mit den speziellen Eigenschaften von Nanopartikeln zu kopeln.^[4,5]

Vor diesem Hintergrund beschäftigten sich erste Studien mit den optischen Wechselwirkungen zwischen Cadmium-chalkogenid-Halbleiterpartikeln (CdS, CdSe, CdTe), die häufig als Quantenpunkte (quantum dots, QDs) bezeichnet werden, und Proteinen, die durch Chemisorption auf der QD-Oberfläche gebunden sind.^[6,7] QDs zeigen breite Anregungs- und durch ihre Größe einstellbare Photoluminesenzspektren mit sehr schmalen Emissionsbanden, die das gesamte sichtbare Spektrum abdecken. Dies ermöglicht die simultane Anregung unterschiedlich großer Partikel bei einer einzigen Wellenlänge. Da QDs darüber hinaus über eine außergewöhnliche Photostabilität und hohe Quantenausbeuten verfügen, finden sie zunehmend Anwendung als lumineszente Sonden zur Markierung biologischer Systeme.^[3f-k] Mamedova et al. konnten zeigen, dass bei kovalenter Verknüpfung des 67-kDa-Proteins Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) mit Cystein-stabilisierten 2-nm-CdTe-QDs durch Glutardialdehyd Konjugate entstehen, die bevorzugt nur ein Molekül des zigarrenförmig-ellipsoiden BSA (ca. $6 \times 6 \times 10$ nm) pro QD enthalten.^[6] Durch Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie wurde überprüft, dass die Tertiärstruktur der Proteine in den Hybriden weitgehend intakt ist. Wegen der räumlichen Nähe des BSA zur Oberfläche des Halbleiterpartikels traten in den Konjugaten starke Wechselwirkungen zwischen den angeregten Zuständen der biologischen und anorganischen Komponenten auf. So

wurde die Lumineszenz der beiden normalerweise bei 340 nm emittierenden aromatischen Tryptophanreste des BSA komplett gelöscht. Dahingegen war die Amplitude des Emissionspeaks der CdTe-QDs etwa zweifach und dessen Fläche etwa dreifach größer als bei unkonjugierten Teilchen. Diese verstärkte Lumineszenz wurde einem Antenneneffekt zugeschrieben, bei dem die von den Proteinen eingefangene Energie konzentriert und durch einen Resonanzenergietransfer auf das Nanopartikel übertragen wird – analog wie dies beim klassischen Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET; auch als Förster-Energietransfer bezeichnet) geschieht.^[6]

In einer ähnlichen Studie von Willard et al. wurden ca. 3 nm große CdSe-ZnS-Kern-Schale-Partikel durch Chemisorption mit biotinyliertem BSA (bBSA) verknüpft, das zuvor mit 2-Iminothiolan mit etwa 20 Thiolgruppen pro Protein aktiviert worden war (Abbildung 1a).^[7] Die gebildeten Konjugate enthielten im Schnitt zwei Moleküle BSA pro QD. Über die Biotingruppen des bBSA wurde Tetramethylrhodamin-markiertes Streptavidin (TMR-STV) angekuppelt, sodass ein FRET-System erhalten wurde. Tatsächlich ließ sich beobachten, dass durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an TMR-STV die Emission der Nanopartikeln gelöscht wurde, während die des TMR anstieg. Der Anteil der durch FRET gelöschten Emission hing von der relativen Menge an TMR-STV ab, die den bBSA-modifizierten QDs zugefügt wurde. Bei einem Moläquivalent wurden nur etwa 11%, bei fünf Äquivalenten hingegen bis zu 54% der Lösung durch einen FRET-Mechanismus verursacht. Bei

[*] Prof. Dr. C. M. Niemeyer

Universität Dortmund
Fachbereich Chemie
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund
(Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-mail: cmn@chemie.uni-dortmund.de

[**] Ich danke P. Alhorn für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

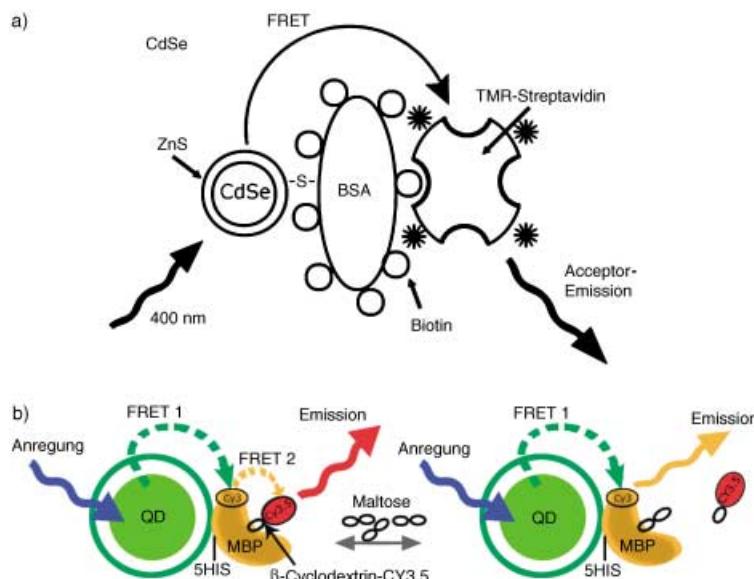


Abbildung 1. Optische Kommunikation zwischen Proteinen und Halbleiter-Nanoteilchen.
a) Schematische Darstellung eines FRET-Systems, aufgebaut durch Chemisorption von Thiol-modifiziertem biotinyliertem Rinderserumalbumin (BSA) an CdSe-Quantenpunkte (QDs) und anschließende Kupplung von Tetramethylrhodamin-markiertem Streptavidin (TMR-STV).^[7]
b) Maltose-Nanosensor bestehend aus CdSe-ZnS-QDs (Emissionswellenlänge 530 nm), die mit rekombinantem Maltose-Bindungsprotein (MBP) beschichtet sind. MBP enthält ein Pentahistidin-Segment (5His) und einen kovalent gekoppelten Cy3-Fluorophor. Die Bindungsstelle des MBP ist mit einem β -Cyclodextrin-Cy3.5-Konjugat belegt, das sich durch freie Maltose verdrängen lässt.^[8]

weiterer Erhöhung der TMR-STV-Konzentration sank der FRET-Anteil wieder ab. Als alternative Energietransfer-Mechanismen für die Lösung kommen beispielsweise eine Selbstlöschung durch Aggregation der QDs wie auch Elektronentransfer vom QD zum TMR infrage.^[7]

Diese Arbeiten zeigen, dass sich spezifische Bindungsereignisse von Proteinen mithilfe der einzigartigen optischen Eigenschaften anorganischer Nanoteilchen untersuchen lassen. Darüber hinaus legen die Studien nahe, dass solche Hybridkonjugate auch für homogene Bindungssassays genutzt werden können, mit denen beispielsweise Nukleinsäure-Hybridisierungen, Antikörper-Antigen- oder auch Enzym-Substrat-Wechselwirkungen analysierbar sind.^[7] Tatsächlich umgesetzt werden konnte dies kürzlich von Medintz et al., die über den Einsatz von definierten QD-Protein-Hybridren als spezifische chemische Sensoren für Saccharide berichteten.^[8] Hierzu wurden CdSe-ZnS-Kern-Schale-QDs mit einem Durchmesser von ca. 3 nm verwendet, die mit einer Ligandenhülle aus Dihydroliponsäure stabilisiert waren. Diese Teilchen

wurden mit einer rekombinanten Variante des Maltose-Bindungsproteins (MBP) beschichtet, die ein C-terminales Pentahistidin-Fragment enthielt und über einen definierten Cysteinrest kovalent mit einem Cy3-Fluorophormolekül modifiziert war (Abbildung 1b). Jeder QD enthielt etwa zehn MBP-Moleküle, deren Bindungsstellen mit β -Cyclodextrin(β -CD)-Cy3.5-Konjugaten belegt waren. In diesen wohldefinierten Hybriden wirkte das Cy3 als „FRET-Übermittlungsstation“, indem es als Donor/Acceptor den Energietransfer vom QD zum β -CD-Cy3.5 verbrückte. Da das β -CD-Cy3.5 durch freie Maltose aus dem MBP verdrängt wird, bewirkte die Zugabe dieses Disaccharides einen raschen Anstieg der Cy3-Emission. Hierdurch waren Konzentrationen bis zu 0.1 μM Maltose nachweisbar.

In einer alternativen Nanosensor-Konfiguration wurden die Bindungsstellen des MBP mit einem β -CD-QSY9-Konjugat belegt. QSY9 ist ein nicht-fluoreszierter Farbstoff, der sehr effizient die Emission der QDs löscht. Maltose und andere Zucker, die eine α -1,4-glucosidische Bindung enthalten, verdrängen das β -CD-QSY9-Konjugat, wo-

durch sich die Photolumineszenz der QDs verstärkt. Auch mit dieser Anordnung konnten ähnliche Nachweisempfindlichkeiten erzielt werden wie mit dem in Abbildung 1b gezeigten Doppel-FRET-System. Die FRET-Effizienzen des β -CD-QSY9- und des β -CD-Cy3.5-Systems wurden zu etwa 75 % bzw. 20 % bestimmt. Im β -CD-Cy3.5-Konjugat erhielt das Cy3.5 die Energie der QDs entweder direkt (ca. 6 %) oder über die zehn MBP-gebundenen Cy3-Farbstoffmoleküle (ca. 14 %). Diese Arbeit ist damit nicht nur als ein innovativer Ansatz zu bewerten, mit dem sich die Bindung von Zuckermolekülen in ein optisches Signal umwandeln lässt, sondern erbrachte auch tiefere Einblicke in Energietransferprozesse in QD-Protein-Konjugaten. Während in vorangegangenen Arbeiten nicht geklärt werden konnte, ob der Energietransfer hauptsächlich auf FRET oder aber auf anderen Mechanismen basiert, beispielsweise Elektronentransfer oder Oberflächenaktivierung,^[7] bestätigt die jetzige Studie eindeutig FRET als den dominanten Prozess.^[8] Sie macht darüber hinaus deutlich, dass unser Verständnis von der Energetik auf molekularer Ebene und den chemischen Prozessen innerhalb solcher QD-gebundenen optischen Systeme gegenwärtig noch sehr unvollständig ist.^[8]

Die meisten Nanopartikel neigen in wässrigen Lösungen zu rascher Koagulation, wodurch sie ihre Größenabhängigen Eigenschaften verlieren. Deshalb wird intensiv nach formbeständigen dreidimensionalen Stabilisatoren gesucht, mit denen die Nanoteilchen umhüllt werden können, ohne deren optische Eigenschaften oder ihre Zugänglichkeit für externe Stimuli zu behindern. Ishii et al. berichteten kürzlich über die biomolekulare Verkapselung von CdS-Nanoteilchen durch Chaperon-Proteine, die auch eine gezielte Freisetzung des eingeschlossenen Gastes ermöglichen.^[9] Die Chaperone GroEL und *T.th* können denaturierte Proteine in ihrem zylindrischen Hohlraum aufnehmen und, nach deren Rückfaltung, wieder freisetzen, indem durch ATP eine Konformationsänderung des Hohlraums der Chaperone induziert wird. Das *Escherichia coli*-Protein GroEL besteht aus zwei supramolekularen Ringen, von denen jeder aus sieben Unter-

einheiten eines 60-kDa-Proteins aufgebaut ist. Die beiden Ringe liegen gestapelt in einer Doppeldecker-Anordnung vor, sodass ein zylindrischer Hohlraum mit einem Durchmesser von ca. 4.5 nm und einer Wandstärke von ca. 4.6 nm gebildet wird (Abbildung 2). Das Chaperon *T.th* stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* HB8. Es besteht aus einem GroEL-ähnlichen Tetradecamer, das durch das 70-kDa-Proteinaggregat [cpn10] abgedeckt wird. Hohlraumgröße und Wandstärke des *T.th*-cpn-Komplexes ähneln denen von GroEL.

Zur Komplexbildung wurde eine Dimethylformamidlösung von ca. 2–4 nm großen CdS-Partikeln mit einer wässrigen Tris-HCl-Pufferlösung der Chaperone gemischt. Die Bildung von Einschluskomplexen wurde mit CD-Spektroskopie, analytischer Größenausschlusschromatographie und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) nachgewiesen. So zeigten TEM-Aufnahmen klar das Vorhandensein einer dunklen Region im Zentrum der *T.th*-cpn-CdS-Nanopartikel-Komplexe, verursacht durch das eingelagerte CdS-Teilchen. Eine statistische Analyse ergab, dass etwa 75 % der *T.th*-cpn-Kom-

plexe eine solche Einlagerung aufwiesen, während keinerlei CdS-Partikel an der Außenhülle der Proteine beobachtet wurden.

Die charakteristische Photolumineszenz der QDs in den Chaperon-Nanopartikel-Komplexen war über ungewöhnlich lange Zeiträume stabil (beispielsweise mehr als 400 Tage im Falle des GroEL-Komplexes), während die Photolumineszenz in Abwesenheit von GroEL innerhalb von etwa zwei Stunden verschwand. Die außergewöhnliche Stabilität der Nanoteilchen konnte auch durch wiederholtes Erhitzen und Abkühlen der QD-Chaperon-Komplexe belegt werden. Es wurde beobachtet, dass bei erhöhten Temperaturen, z.B. bei 70°C, die Photolumineszenz der *T.th*-cpn-CdS-Komplexe zwar gelöscht wird, beim Abkühlen auf 4°C jedoch wieder einsetzt. Diese Regeneration der Lumineszenz konnte wiederholt werden, solange die Lösungen nicht über die Denaturierungstemperatur der Chaperone hinaus erwärmt wurden. Diese Grenze lag für die *T.th*-cpn-Komplexe bei etwa 80°C. Auch die GroEL-CdS-Komplexe zeigten dieses temperaturabhängige Lumineszenzverhalten, das jedoch bei 20-minütiger Erwärmung auf

60°C irreversibel wurde. Diese Temperatur liegt gerade unterhalb der Denaturierungstemperatur von GroEL. Auch DMF-Lösungen reiner CdS-Partikel zeigten das temperaturabhängige Lumineszenzprofil, das jedoch bereits bei 30°C unter Ausfällung eines kolloidalen CdS-Niederschlags irreversibel wurde.

Die CdS-Nanoteilchen werden im Hohlraum der Chaperone durch die ca. 4.5 nm dicke Proteinschicht elektrisch isoliert. Dies konnte durch Fluoreszenztitration mit Methylviologen (MV^{2+}) gezeigt werden, von dem bekannt ist, dass es als Elektronenacceptor den angeregten Singulettzustand von CdS-QDs löscht. Die für den GroEL-CdS-Komplex bestimmte Stern-Volmer-Konstante war mehr als 15fach geringer als die von isolierten CdS-Partikeln in DMF. Dies zeigt, dass die Dicke der Proteinhülle ausreicht, um die Partikel vom Elektronentransfer abzuschirmen.

Über die Verkapselung von Halbleiter-Nanoteilchen durch Proteine,^[10] wie auch über veränderte optische und physikalisch-chemische Eigenschaften von Nanoteilchen als Folge einer (bio)-organischen Umhüllung und der daraus resultierenden Abschirmung vom wässrigen Lösungsmittel, war bereits zuvor berichtet worden.^[11] Die Verwendung von Chaperonen bietet jedoch ganz neue Möglichkeiten, nämlich die durch einen chemischen Impuls induzierte Freisetzung der eingeschlossenen Partikel. So wurden die anorganischen Gäste bei Behandlung der GroEL-CdS-Komplexe mit ATP in Gegenwart von Mg^{2+} und K^+ aufgrund der hierdurch ausgelösten Konformationsänderung der Proteinstruktur innerhalb weniger Sekunden freigesetzt. Dies führte zur Bildung kolloidalen Substanzen und zur spontanen Löschung der Fluoreszenz. Kein Effekt trat ein, wenn entweder ATP oder Mg^{2+} fehlte oder wenn ADP anstelle von ATP verwendet wurde. Diese Arbeit ist ein eindrucksvolles Beispiel für die Integration hochspezifischer biologischer Mechanismen in die Materialforschung. Man darf erwarten, dass dieser Ansatz viele konzeptionell neuartige Ansätze zur Entwicklung bioresponsiver Funktionseinheiten nach sich ziehen wird.

Über ein weiteres faszinierendes Beispiel für die Kopplung von biomole-

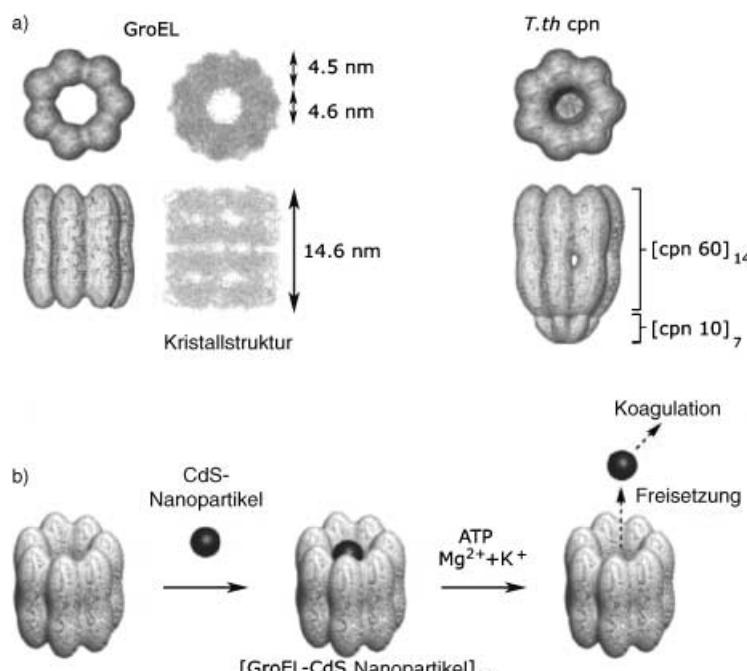


Abbildung 2. Chaperon-Proteine als ATP-responsive Behälter für den Einschluss und die Freisetzung von Halbleiter-Nanoteilchen. a) Aufsicht und Seitenansicht von GroEL und *T.th* cpn. b) Bildung von GroEL-CdS-Nanopartikel-Komplexen durch Einschluss der CdS-Teilchen in den zylindrischen Hohlraum von GroEL und ATP-induzierte Freisetzung des Gastes. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung nach Lit. [9].

kularer Funktionalität mit anorganischen Nanopartikeln berichteten kürzlich Willner et al.^[12] Den Autoren gelang es, durch eine Nanoverdrahtung von Redoxenzymen mit Gold-Nanoteilchen den Elektronenfluss vom Enzym zu einer makroskopischen Elektrode maßgeblich zu verbessern. In vorherigen Arbeiten, die auf der Verwendung von Redox-Vermittlern oder der Immobilisierung der Enzyme in redoxaktiven Polymeren basierten, konnte zwar eine elektrische Kommunikation zwischen Biokatalysator und Elektrode hergestellt werden, die Geschwindigkeitskonstanten der Elektronenübertragung waren jedoch stets deutlich kleiner als Konstanten, die bei der Übertragung zwischen Enzymen und ihren natürlichen Elektronenacceptoren (meistens molekularem Sauerstoff) erreicht werden.^[13] Zur Konstruktion des elektrischen „Nanoanschlusses“ („nanoplug“) wurden zunächst 1.4 nm große Au-Nanocluster, die jeweils mit einer einzelnen *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppe funktionalisiert waren, mit N6-(2-Aminoethyl)-FAD (FAD = Flavin-adenin-Dinucleotid) verknüpft, sodass FAD-funktionalisierte Teilchen erhalten wurden (Abbildung 3). FAD ist der Cofaktor des Redoxenzmys Glucose-Oxidase (GOx). Das Au-FAD-Konjugat wurde dann für die Rekonstitution von apo-GOx eingesetzt, um hierdurch das me-

tallische Partikel in unmittelbare Nähe des enzymatischen Redoxzentrums zu bringen. Die Rekonstitutionskinetik von apo-GOx konnte anhand eines Fluoreszenzanstiegs des FAD verfolgt werden, der vermutlich auf der räumlichen Trennung des FAD vom Nanopartikel durch die Einbettung in die hydrophobe Mikroumgebung des Proteins beruht.

Zwei alternative Wege zur Kupplung des bioanorganischen Hybridsenzys an makroskopische Elektroden wurden untersucht (Abbildung 3). Im einen Fall wurde die Adsorption von Au-Nanopartikel-rekonstituierter GOx an eine mit einer Dithiol-Monoschicht modifizierten Elektrode untersucht (Weg a in Abbildung 3). Im zweiten Fall wurden zunächst die Au-Nanopartikel-FAD-Konjugate an eine Dithiol-Monolage auf der Elektrode chemisorbiert und anschließend die Rekonstitution von apo-GOx vorgenommen (Weg b in Abbildung 3). Beide Methoden führten zu annähernd gleichen Belegungsdichten mit rekonstituierter GOx von ca. 1×10^{12} mol cm⁻². Dies entspricht etwa 60 % der Belegung mit einer statistisch dicht gepackten Monolage von GOx auf der Elektrodenoberfläche. Die cyclovoltammetrische Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der Adsorbate ergab, dass die Oxidation von Glucose unimolekular und mit einer unerwartet

hohen Elektronentransfergeschwindigkeit von 5×10^3 s⁻¹ abläuft. Da dieser Wert etwa siebenfach höher ist als die Elektronentransfergeschwindigkeit nativer GOx mit O₂ liegt der Schluss nahe, dass die Einführung des Au-Nanoteilchens in das Enzym dessen maximale Umsatzgeschwindigkeit erhöht. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die biokatalytischen Eigenschaften des Systems weder durch O₂ noch durch die Anwesenheit oxidierbarer Substanzen, beispielsweise Ascorbinsäure, gestört wird. Darüber hinaus konnte belegt werden, dass die Länge und Struktur der verbrückenden Dithiol-Spacer zwischen der Elektrode und dem Nanopartikel den Elektronentransfer zwischen FAD und Elektrode beeinflussen. Dieser Effekt spiegelt sich auch im Gesamtprozess der bioelektrokatalytischen Oxidation von Glucose wider.

Die hier vorgestellten Studien verdeutlichen, wie zum einen biologische Systeme durch nanostrukturierte anorganische Komponenten verbessert und im Gegenzug die Eigenschaften anorganischer Partikel durch biologische Mechanismen erweitert werden können. Insbesondere die aktuellen Arbeiten^[8,9,12] bereichern die Nanobiotechnologie um gänzlich neue Facetten und werden sicherlich zahlreiche spannende Entwicklungen in diesem noch jungen Forschungsgebiet nach sich ziehen.

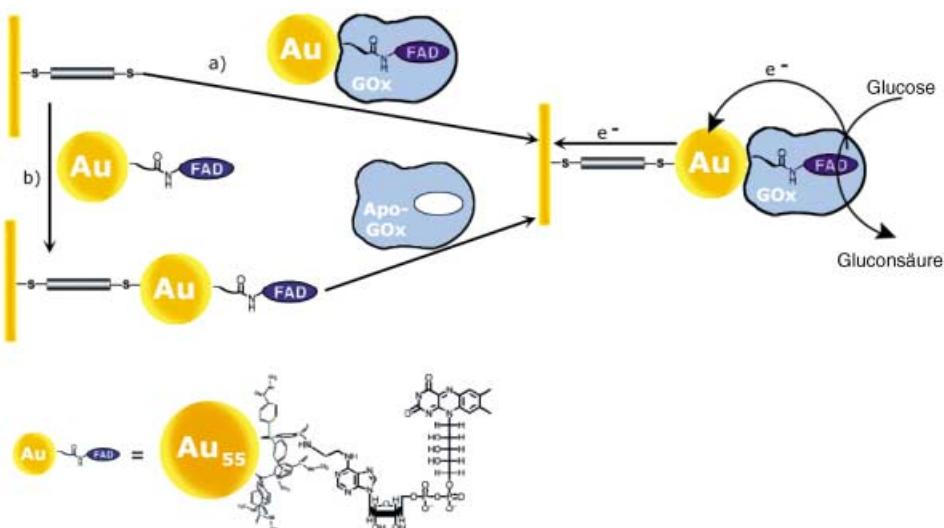


Abbildung 3. Elektrischer „Nanoanschluss“ an Enzyme: Anordnung von Au-Nanopartikel-Glucose-Oxidase(GOx)-Konjugaten an makroskopische Goldelektroden durch zwei alternative Strategien: a) Adsorption von Au-Nanopartikel-rekonstituierter GOx an eine Dithiol-Monolage auf der Gold-elektrode; b) Adsorption von Au-Nanopartikel-FAD-Konjugaten an eine Dithiol-modifizierte Goldelektrode und anschließende Rekonstitution von apo-GOx an den funktionalisierten Partikeln. Die Elektrode wird durch Dithiol-Spacer mit den Nanoteilchen „verdrahtet“. Wiedergabe nach Lit. [12].

- [1] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158.
- [2] C. A. Mirkin, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2258–2272.
- [3] Beispiele für Gold-Nanopartikel:
a) C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391–2395; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2265–2268; b) S. Connolly, D. Fitzmaurice, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1202–1205; c) M. Li, K. W. K. Wong, S. Mann, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23–26; d) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685–3688; e) histo-chemische Anwendungen: J. Kreuter in *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy* (Hrsg.: M. Donbrow), CRC, Boca Raton, **1992**; Beispiele zu Halbleiter-Nanoteilchen: f) M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2015; g) W. C. W. Chan, S. M. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016–2018; h) H. MattoSSI, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Miculec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150; i) X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41–46; j) J. K. Jaiswal, H. MattoSSI, J. M. Mauro, S. M. Simon, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 47–51; k) M. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. M. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631–635.
- [4] Beispiele für Enzym-Nanopartikel-Konjugate: a) Proteasen: A. Gole, C. Dash, C. Soman, S. R. Sainkair, M. Rao, M. Sastry, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 684–690; N. O. Fischer, C. M. McIntosh, J. M. Simard, V. M. Rotello, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5018–5023; b) Cytochrom C: C. D. Keating, K. M. Kovaleski, M. J. Natan, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9414–9425; C. D. Keating, K. M. Kovaleski, M. J. Natan, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9404–9413, zit. Lit.; c) Elektroden-immobilisierte Adsorbaten aus Nanopartikeln und Enzymen: J. G. Stonehuerner, J. Zhao, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss, R. W. Henkens, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 421–428; A. L. Crumbliss, S. C. Perine, J. G. Stonehuerner, K. R. Tubergen, J. Zhao, J. P. O'Daly, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 483–490; J. Zhao, J. P. O'Daly, R. W. Henkens, J. G. Stonehuerner, A. L. Crumbliss, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 493–502; F. Patolsky, T. Gabriel, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *479*, 69–73; V. Pardo-Yissar, E. Katz, J. Wasserman, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 622–623.
- [5] Kürzlich wurde die enzymatische Manipulation von DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln untersucht: S. R. Nicewarner Pena, S. Raina, G. P. Goodrich, N. V. Fedoroff, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7314–7323; C. S. Yun, G. A. Khitrov, D. E. Vergona, N. O. Reich, G. F. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7644–7645; A. G. Kanaras, Z. Wang, A. D. Bates, R. Cosstick, M. Brust, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 201–204; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 191–194.
- [6] N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach, J. Studer, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 281–286.
- [7] D. M. Willard, L. L. Carillo, J. Jung, A. Van Orden, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 469–474.
- [8] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 630–638.
- [9] D. Ishii, K. Kinbara, Y. Ishida, N. Ishii, M. Okochi, M. Yohda, T. Aida, *Nature* **2003**, *423*, 628–632.
- [10] Zum Wachstum anorganischer Nanopartikel in apo-Ferritin, siehe: a) F. C. Meldrum, V. J. Wade, D. L. Nimmo, B. R. Heywood, S. Mann, *Nature* **1991**, *349*, 684–687; b) F. C. Meldrum, B. R. Heywood, S. Mann, *Science* **1992**, *257*, 522–523; c) K. K. W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D. D. Awschalom, S. Mann, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 279–285; Wachstum von Eisenoxid-Partikeln in Lumazin-Synthase-Kapsidproteinen: d) W. Shenton, S. Mann, H. Cölfen, A. Bacher, M. Fischer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 456–459; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 442–444; zur Verwendung von Viroskapsiden als Wirte für die Erzeugung von Partikeln, siehe: e) T. Douglas, M. Young, *Nature* **1998**, *393*, 152–155; f) Q. Wang, T. Lin, L. Tang, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 477–480; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 459–462; g) W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 253–256; Chaperone als Template für die Organisation von Metall- und Halbleiter-Nanoteilchen: h) R. A. McMillan, C. D. Paavola, J. Howard, S. L. Chan, N. J. Zaluzec, J. D. Trent, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 247–252, siehe auch Lit. [1] und darin zitierte Arbeiten.
- [11] Trioctylphosphinoxid(TOPO)-stabilisierte Halbleiter-QDs lassen sich beispielsweise durch Adsorption eines amphiphilen Polymers (Octylamin-modifizierte Polyacrylsäure) verkapseln. Nach kovalenter Vernetzung der beiden organischen Komponenten sind die Partikel in wässrigen Lösungen stabil gegen Koagulation und zeigen Lumineszenzintensitäten wie in organischen Lösungsmitteln (Lit. [3i], siehe hierzu auch www.qdots.com).
- [12] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science* **2003**, *299*, 1877–1881.
- [13] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1230–1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1180–1218.