

Gold, wie auch andere Metalle, verändern beim Verkleinern in den Nanometerbereich ihre bekannten Eigenschaften spontan und dramatisch. Es gelten dann nicht mehr die klassischen physikalischen Gesetze für makroskopische Metalle, sondern quantenmechanische Regeln. Hieraus erfolgen völlig neue Anwendungsmöglichkeiten, die einen nicht unerheblichen Teil der derzeitigen Nanowissenschaften prägen. Zum Beispiel besitzt Gold auf der Nanometerskala die Fähigkeit mit DNA zu interagieren. Darüber hinaus zeigen Gold-Nanopartikel größenabhängig eine ausgeprägte Zelltoxizität, indem sie unter anderem Mitochondrien schädigen, was sehr schnell zum Zelltod durch Nekrose führt.

Giftiges Gold

Konsequenzen der Verkleinerung

Von Günter Schmid und Wolfgang Brandau

Gold, seit Jahrtausenden als schönstes, edelstes und teuerstes Metall bekannt, war Anlass für Morde und Kriege. Alchemisten versuchten über Jahrhunderte, Gold aus anderen Materialien herzustellen – natürlich vergeblich. Es steht heute mehr denn je im Fokus internationaler Interessen als Währungsreserve oder in der Schmuckindustrie. Wissenschaftlich hat man dem Element Gold dagegen lange Zeit nicht allzu große Aufmerksamkeit geschenkt, da es als reaktionsträges Metall eine nur beschränkte chemische Vielfalt aufweist. In Lehrbüchern sind noch heute die Kapitel über Gold, verglichen mit denen über andere Metalle, meist die kürzesten.

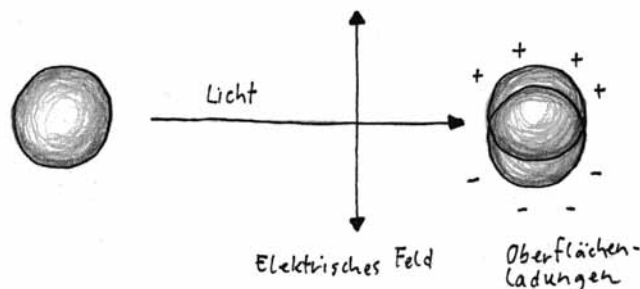
Im Zuge der rasanten Entwicklung der Nanowissenschaften und der sich daraus ableitenden Nanotechnologie in den vergangenen ein bis zwei Jahrzehnten steht Gold jedoch aus verschiedenen Gründen im Zentrum internationalen Inte-

resses und zwar nicht in seiner massiven „schönen“ Form als resistentes gelbes Metall, vielmehr in Form so genannter Nanopartikel, also Teilchen mit nur wenigen bis mehreren hundert Nanometern (nm) Durchmesser.

Bevor auf die Besonderheit solcher Teilchen eingegangen werden soll, sei ein kurzer historischer Abriss erlaubt. Die „goldene“ Farbe dieses einmaligen Elementes lässt

sich heute am besten mit Hilfe der Einsteinschen Relativitätstheorie verstehen. Der allgemein bekannte „silberne“ Glanz fast aller Metalle ist in der nahezu totalen Reflexion des sichtbaren Lichts begründet, wie aus der Alltäglichkeit von Spiegeln jedermann bekannt ist. In dem äußerst schweren Atomkern von Gold (atomare Masse 197) werden die den Atomkern umkreisenden Elektronen auf so große Geschwindigkeiten

beschleunigt, dass ihre Masse stark zunimmt. Nach Einstein kann bekanntlich kein Teilchen Lichtgeschwindigkeit erreichen, da dessen Masse dann unendlich würde. Die geschwindigkeitsbedingte



(1) Die Entstehung eines oszillierenden Dipols aus Oberflächenladungen durch das elektrische Feld sichtbaren Lichts auf der Oberfläche einer Goldnanopartikel.

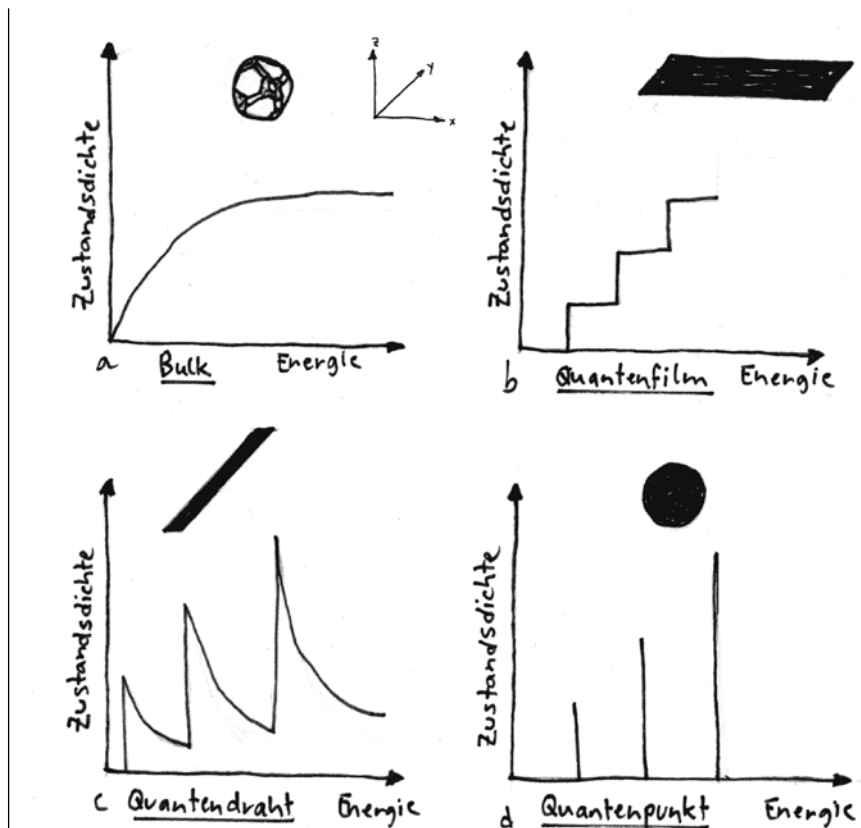


Günter Schmid. Foto: Max Greve

Massenzunahme der kernnahen Elektronen im Goldatom führt nun zu markanten Verschiebungen von deren Energieniveaus. Das Niveau der d-Orbitale wird angehoben, das der kernnahen s-Orbitale dagegen abgesenkt. Man bezeichnet dieses Phänomen auch als relativistischen Effekt. Durch diesen werden nun Anteile auftretenden sichtbaren Lichts vom Gold absorbiert und nicht reflektiert. Bekanntlich sieht unser Auge bei einem farbigen Material immer nur den „Rest“ des Lichtes, der nicht absorbiert wird. Im Falle des Goldes ist das eben die so geschätzte gelbe Farbe. Im Übrigen unterliegen natürlich auch andere sehr schwere Elemente dem relativistischen Einfluss. Nicht immer sind jedoch die Konsequenzen mit einer Farbänderung verbunden. Aus hier nicht näher diskutierbaren Gründen können sich die relativistischen Einflüsse zum Beispiel auch auf den Schmelzpunkt auswirken. Der flüssige Zustand von Quecksilber bei Raumtemperatur ist ein derartiges Beispiel.

Was passiert beim Verkleinern?

Im Jahre 1857 machte kein Geringerer als Michael Faraday eine epochale Entdeckung. Er ließ Goldchlorid in wässriger Lösung mit weißem Phosphor reagieren, wobei sich die gelbliche Farbe des Goldsalzes in ein tiefes Purpurrot verwandelte. Er erkannte wohl, dass der Grund für die Farbe in der Bildung kleiner Goldpartikel lag („finely divided metallic state“). Den physikalischen Hintergrund dieser Erscheinung konnte er aber nicht wissen. Man bezeichnet derartige Systeme heute noch als kolloidale Lösungen, wobei der Begriff „Lösung“ physikalisch nicht korrekt ist, da die farbigen Teilchen keinen molekularen Charakter aufweisen, sondern wegen ihrer Größe im Bereich von mehreren Dutzend Nanometern (nm) einfallendes Licht noch streuen (Tyndall-Effekt). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts hat vor allem



(2) Der Übergang vom 3D Bulk-Metall (a) über den 2D- (b) und 1D-Zustand (c) zum Quantenpunkt (0D) (d). Die elektronischen Veränderungen werden aus den energieabhängigen elektronischen Zustandsdichten ersichtlich. Im 3D-Zustand existiert ein kontinuierlicher Zusammenhang, bei 2D ergibt sich eine treppenförmige Abhängigkeit, bei 1D existieren bereits relativ scharf ausgeprägte Energieniveaus, während im 0D-Zustand diskrete elektronische Energieniveaus zu erkennen sind, vergleichbar mit den Zuständen in Atomen und Molekülen. Aus diesem Grunde werden derartige Quantenpunkte häufig auch als große Atome bezeichnet.

Wilhelm Ostwald die „Welt der vernachlässigten Dimensionen“, wie er es nannte, intensiv bearbeitet und die Grundlagen für unser heutiges Verständnis gelegt. Eine quantitative Beschreibung des Phänomens der Farbgebung kolloidaler Goldpartikel erfolgt in der so genannten Mie-Theorie. Diese erfasst nicht nur die Teilchengröße, sondern auch deren Form sowie das die Teilchen umgebende Medium. Diese drei Faktoren beeinflussen die Farbe der Goldnanopartikel, die von hellrot über purpur bis blau variieren kann. Neben dem wissenschaftlichen Interesse an derartigen Goldpartikeln besteht seit historischen Zeiten ein Verwendungszweck: das Färben von Glas zum so genannten Rubinglas.

Die physikalischen Gründe für die Farbänderungen beim Übergang vom metallischen (Bulk) Gold zu Nanopartikeln erklären sich aus der Wechselwirkung von sichtbarem Licht mit den Oberflächenelektronen der Partikel. Diese führt zu einem oszillierenden System, das, abhängig von Größe, Form und umgebendem Medium, spezifische Frequenzen des Lichts absorbiert und die Komplementärfarbe sichtbar werden lässt. Der Vorgang ist schematisch in Abbildung (1) gezeigt.

Außer der Farbe ändert sich durch die Verkleinerung in den Nanometerbereich zum Beispiel auch der Schmelzpunkt. Von 1064 °C des metallischen Goldes kann sich der Schmelzpunkt bis auf etwa

500 °C für Partikel in der Größenordnung von ein bis zwei Nanometern erniedrigen. Grund ist der mit kleiner werdendem Durchmesser steigende Anteil der Oberflächenatome, die koordinativ schlechter abgesättigt und damit leichter beweglich sind.

Es gibt aber größenabhängige physikalische Phänomene, die sehr viel grundlegender und bedeutsamer sind als Farb- oder Schmelzpunktänderungen. Dies sind in erster Linie die Änderungen der elektronischen Verhältnisse in Nanopartikeln. Die allseits bekannten typischen metallischen Eigenschaften wie zum Beispiel die elektrische Leitfähigkeit sind die Konsequenz sich überlappender besetzter und leerer elektronischer Energieniveaus (Bänder), die zur dreidimensionalen (3D) freien Beweglichkeit der Valenzelektronen führt (Elektronengas). In einem nur wenige Atomlagen dicken zweidimensionalen (2D) Film können sich die Elektronen nur noch horizontal

gen, sondern quantenmechanischen Regeln folgen. Diese dramatischen Änderungen seien im Folgenden kurz erläutert. In Abbildung (2) ist schematisch der Übergang von einem 3D Bulk-Metall über den 2D- und 1D-Zustand zum nulldimensionalen Quantenpunkt sowie die damit verbundenen Änderungen der elektronischen Zustände gezeigt.

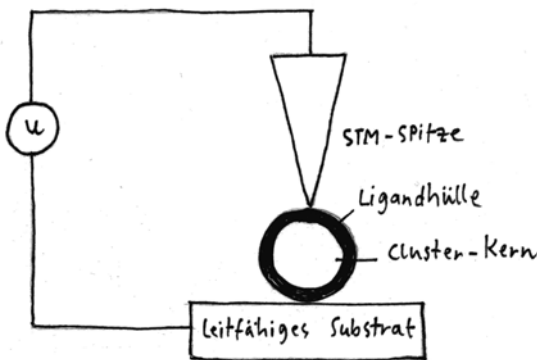
Die entscheidende Frage ist nun, wie groß beziehungsweise klein eine Ansammlung von Atomen sein muss, um diese Quantisierung zu erreichen, oder anders ausgedrückt: wann wird ein Metall zum Metall? Eine Antwort kann nur experimentell erarbeitet werden, das heißt man muss die elektronischen Gegebenheiten an unterschiedlich großen Metallpartikeln untersuchen, um den Übergang vom Bulk zum Quantenpunkt (oder umgekehrt) zu finden. In aufwändigen präparativen Arbeiten wurden über etwa zwei Jahrzehnte unterschiedlich große Metallpartikel synthetisiert und ihre

physikalischen Eigenschaften untersucht. Dabei durfte man sich nicht auf eine einzige Untersuchungsmethode beschränken, da jede Methode nur eine Charakteristik liefert. Erst aus der Summe mehrerer Untersuchungsmethoden lässt sich dann eine zuverlässige Aussage ableiten. Unabhängig von der Art der Untersuchung ist eine Tatsache festzuhalten: Das elektronische Ver-

halten ist temperaturabhängig. Bei sehr tiefen Temperaturen können schon größere Metallpartikel Quantisierungseffekte zeigen, während sie beispielsweise bei Raumtemperatur noch typische Bulk-Eigenschaften aufweisen. Aus praktischen Gründen ist es naheliegend, Raumtemperatur als Bezugstemperatur zu wählen. In diesem Aufsatz kann natürlich nicht auf alle erfolgten Untersuchungen eingegangen werden. Vielmehr soll

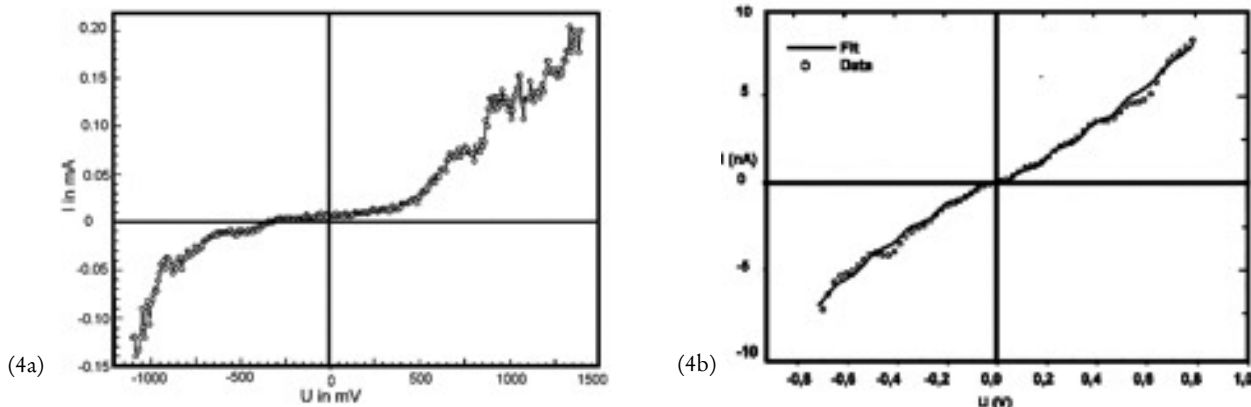
im Folgenden nur die modernste und vielleicht aussagekräftigste Untersuchungsmethode kurz vorgestellt und die Frage nach der entscheidenden Teilchengröße beantwortet werden: Die so genannte Rastertunnelspektroskopie (engl. Scanning Tunneling Spectroscopy, STS), die sich von der bekannten Rastertunnelmikroskopie (STM) ableitet. Diese Methode erlaubt einen direkten „Blick ins Innere“ einer Nanopartikel. Sie beruht auf dem direkten elektrischen Kontakt zwischen einer im Idealfall atomar feinen Metallspitze (Tip) und einer individuellen Partikel. Beim Anlegen einer geeigneten Spannung zwischen Spitze und leitfähigem Substrat, auf dem die Partikel ruht, ergeben sich charakteristische Strom-Spannungskennlinien, aus denen auf den elektronischen Zustand im Innern des Teilchens geschlossen werden kann. In Abbildung (3) ist eine derartige Anordnung skizziert, wobei klar ist, dass die Kontaktierung einer derart kleinen Partikel eine große experimentelle Herausforderung darstellt.

Wie aus Abbildung (3) ersichtlich, berührt die Spitze nicht direkt den Kern der Partikel, sondern eine Art Schutzschicht. Diese ist aus mehreren Gründen erforderlich: Die Synthese und Isolierung derartiger Partikel ist nur mit derlei Schutzhüllen möglich. Praktisch bestehen diese aus geeigneten Ligandmolekülen, die über kovalente Bindungen mit den Oberflächenatomen verbunden sind. Für die STS-Untersuchungen muss die Spitze einen gewissen Abstand vom Metallkern haben, damit eine Kapazität aufgebaut werden kann. Derart ligandstabilisierte Metallnanopartikel unterschiedlicher Größe wurden auf diese Weise untersucht. Wie sich herausstellte, zeigte sich erst bei einer Kerngröße von 1,4 Nanometern ein Quantisierungseffekt bei Raumtemperatur, erkenntlich an einem stufenförmigen Verlauf der Strom-Spannungskennlinie. Nichtquantisierte Partikel zeigen eine lineare Strom-Spannungskennlinie, die dem Ohm'schen Gesetz, also



(3) Skizze einer STS-Anordnung zur Untersuchung der elektronischen Eigenschaften einer einzelnen Metallnanopartikel.

bewegen, während in einem eindimensionalen (1D) Draht die Elektronenbeweglichkeit auf eine Richtung beschränkt ist. Schließlich stelle man sich eine Nulldimensionalität (0D) vor, also eine derart kleine Spezies, dass freie elektronische Beweglichkeit in keine Richtung mehr möglich ist. Solche Partikel werden als Quantenpunkte bezeichnet, da sie nun nicht mehr den klassischen physikalischen Gesetzen unterlie-



(4a) Strom-Spannungscharakteristik von $\text{Au}_{55}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_{12}\text{Cl}_6$ bei Raumtemperatur.
 (4b) Eine Abfolge sich wiederholender Elektronenübergänge.

der klassischen Physik, folgt. Sogar geringfügig größere Partikel von zum Beispiel 1,8 Nanometern verhalten sich bei Raumtemperatur noch klassisch. Abbildung (4) zeigt die mittels STS-Messung erhaltene Strom-Spannungscharakteristik einer ligandstabilisierten Goldpartikel der chemischen Zusammensetzung $\text{Au}_{55}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_{12}\text{Cl}_6$, deren Metallkern aus 55 Goldatomen einen Durchmesser von nur 1,4 Nanometern besitzt.

Die Strom-Spannungskennlinie in Abbildung (4a) bedeutet, dass zwischen etwa -500 mV und +500 mV kein Strom fließt. Der Grund liegt darin, dass bei -500 mV ein einzelnes Elektron durch die Ligandhülle in den Au_{55} -Kern übergeht, dort den Übertritt weiterer Elektronen durch elektrische Abstoßung (Coulomb-Blockade) so lange verhindert, bis dieses Elektron bei entsprechender Spannung an die Gegenelektrode übergeht und das nächste Elektron den Clusterkern erreichen kann. Bei mehrfacher Wiederholung des Vorgangs entsteht so eine Treppe, wie sie in Abbildung (4b) gezeigt ist.

Übergänge diskreter einzelner Elektronen (Single Electron Transition, SET), wie sie hier beobachtet werden, sind nur möglich, wenn in dem Metallkern diskrete Ener-

gieniveaus existieren, also quantenmechanisches Verhalten gegeben ist. Dass dies in dem Cluster $\text{Au}_{55}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_{12}\text{Cl}_6$ bei Raumtemperatur der Fall ist, macht ihn zu einer bedeutsamen Spezies.

Die Existenz diskreter Energieniveaus im Au_{55} -Clusterkern lässt sich unmittelbar demonstrieren, wenn die Strom-Spannungscharakteristik in modifizierter Form bei tiefen Temperaturen registriert wird, nämlich indem anstelle der Stromstärke I die erste Ableitung dI/dV aufgetragen wird. Anstelle des in Abbildung (4a) gezeigten horizontalen Niveaus führt dies zu einem breiten Minimum, in welchem die einzelnen Energieniveaus direkt sichtbar werden. Aus Abbildung (5) ist dies deutlich zu ersehen.

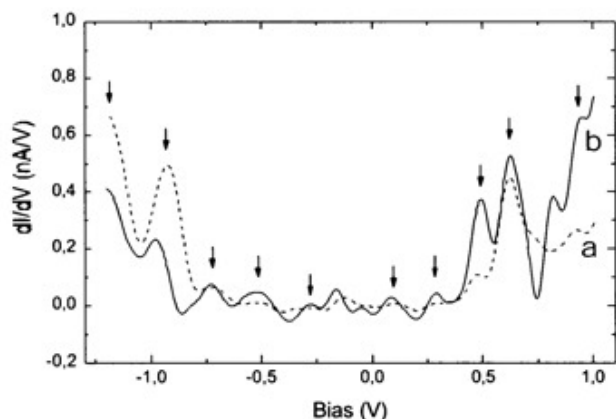
Übrigens: Das Wort „Cluster“ wird gewöhnlich anstelle des Ausdrucks „Nanopartikel“ benutzt, wenn das betreffende Teilchen eine konkrete chemische Zusammensetzung aufweist und nicht, wie die üblichen Nanopartikel, eine – wenn auch enge – Größenverteilung besitzt.

Die Bedeutung dieses Befundes hat weit reichende Konsequenzen. Der beschriebene SET bedeutet nichts anderes, als dass sich derartige Partikel als Einelektronenschalter praktisch nutzen lassen

sollten. Dies bedeutet die Existenz des kleinsten denkbaren elektrischen Schalters. Freilich gibt es bis heute noch keinen praktischen Einsatz, da die technische Umsetzung noch nicht gelungen ist. Diese Umsetzung stellt eine riesige Herausforderung dar, da organisierte Quantenpunkte untereinander vernetzt und letztlich mit der makroskopischen Welt verbunden werden müssen. Wie dem auch sei, wissenschaftlich ist mit dieser Entdeckung ein Durchbruch gelungen. Zuletzt sei in Abbildung (6) ein so genanntes Kalottenmodell von $\text{Au}_{55}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_{12}\text{Cl}_6$ gezeigt. Man erkennt Teile der Phenylringe der $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ -Liganden auf der Oberfläche sowie ein nach vorne zeigendes Chloratom auf einer der sechs quadratischen Flächen des kuboktaedrischen Au_{55} -Clusterkerns.

Gold in der Medizin

Aufgrund seiner Reaktionsträgheit wurde Gold in der Vergangenheit in der Medizin nur selten verwendet. Einige Goldverbindungen wurden mit mehr oder weniger Erfolg in der Behandlung rheumatischer Erkrankungen eingesetzt. Der Nutzen dieser Therapien konnte zwar durch den Einsatz radioaktiven Goldes etwas verbessert werden, hat sich aber nach wie vor, entweder aufgrund der



(5) Visualisierung der elektronischen Energieniveaus im Au₅₅-Clusterkern von Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₆ bei 7 K (Pfeile). Die beiden Kurven a und b resultieren aus Messungen an unterschiedlichen Stellen auf der Clusteroberfläche, aber in gleichem Abstand der Messspitze. Die Energieabstände betragen 170 mV.

schlechten Wirksamkeit oder wegen der hohen Nebenwirkungsrate beim Einsatz von Goldsalzen nicht durchgesetzt. Die Hauptverbreitung erfährt Gold aufgrund seiner Korrosionsbeständigkeit nach wie vor in der Zahnmedizin als Zahnersatz oder -füllstoff. Reines Gold ist als „Zahngold“ nicht geeignet, da es viel zu weich ist, so dass Goldlegierungen verwendet werden. Die berichteten allergischen Reaktionen auf Zahngold lassen sich am ehesten durch Legierungszusätze erklären.

Erst in den letzten Jahren sind verstärkt Ansätze zu beobachten, Gold für therapeutische Zwecke einzusetzen. Zum einen wird versucht, Goldkolloide in Tumoren anzureichern und anschließend eine laserinduzierte thermische Behandlung durchzuführen. Auf der anderen Seite sollen Goldnanopartikel als Transporter für Medikamente oder Wirkstoffe eingesetzt werden. In all diesen Therapieansätzen ist Gold nicht der eigentliche therapeutische Wirkstoff, sondern wird lediglich indirekt als „carrier“ genutzt.

Die Wechselwirkung von Au₅₅-Clustern mit DNA

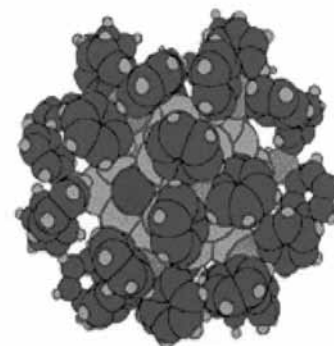
Aus zahlreichen Experimenten ist bekannt, dass die P(C₆H₅)₃ Ligandmoleküle im festen Zustand

von Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₆ dauerhaft gebunden sind. In Lösung können sich diese Moleküle jedoch leicht bewegen, dissoziieren auch von der Oberfläche ab und können so möglicherweise durch noch stärker bindende Moleküle ersetzt werden. Stärkere Liganden sind unter anderem solche, in denen nicht nur ein Atom des betreffenden Moleküls an die Clusteroberfläche gebunden ist wie hier das Phosphoratom, sondern mehrere Atome sozusagen einen Teil einer Schale bilden. Man nennt solche Moleküle auch Chelatliganden. Die DNA bildet mit ihren so genannten großen Furchen ein solches System. Der Zufall will es, dass die Höhe dieser großen Furchen recht genau dem 1,4 Nanometer-Durchmesser des Au₅₅-Kerns entspricht. Die bildhafte Darstellung einer Molecular Modelling-Rechnung in Abbildung (7) zeigt den perfekten „Sitz“ ligandfreier Au₅₅ Cluster in diesen großen Furchen.

Die chemische Wechselwirkung zwischen den Goldpartikeln und der DNA erfolgt über die negativ geladenen Phosphatgruppen, die im Gerüst der DNA zahlreich vorhanden sind. Zusätzliche Wechselwirkungen mit den Basenpaaren sind jedoch nicht auszuschließen. Die Abspaltung der ursprünglichen Phosphin-Liganden erfolgt aus den

oben genannten Gründen. Um das ursprüngliche wasserunlösliche Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₆ wasserlöslich zu machen, eine Voraussetzung, um mit der in wässriger Lösung vorliegenden DNA wechselwirken zu können, wurde das hydrophobe P(C₆H₅)₃ durch das wasserlösliche P(C₆H₅)₂C₆H₄SO₃H oder dessen Na⁺-Salz ersetzt. Dieser Befund legt naturgemäß nahe, dass derart veränderte DNA in einem biologisch aktiven System nicht mehr funktionsfähig sein kann oder, mit anderen Worten: Au₅₅-Nanopartikel müssen zelltoxisch sein!

In der Tat zeigen Versuche mit mehr als einem Dutzend humaner Tumorzelllinien eine ungewöhnlich starke Zelltoxizität, die diejenige des bei vielen Tumorerkrankungen klinisch eingesetzten cis-Platins zum Teil erheblich übertrifft. Beispielsweise benötigt man zur Erreichung des so genannten IC₅₀-Wertes, die Menge, die erforderlich ist, um 50 Prozent der Zellen abzutöten, bei Metastatic Melanoma-Zellen nur



(6) Kalottenmodell von Au₅₅[P(C₆H₅)₃]₁₂Cl₆. Der kuboktaedrische Au₅₅-Kern ist an seinen zwölf Ecken durch zwölf P(C₆H₅)₃-Moleküle und im Zentrum der sechs quadratischen dreimal drei-Flächen durch je ein Chloratom koordiniert.

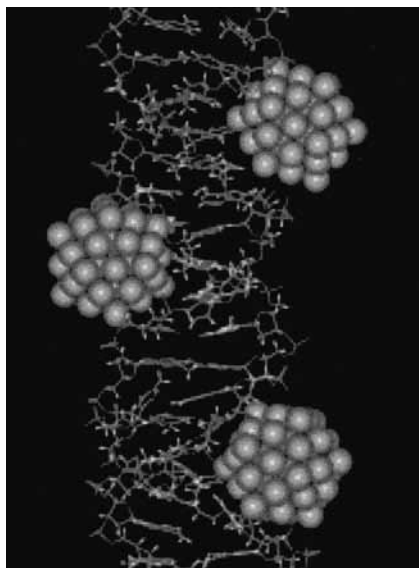
etwa ein halbes Prozent der cis-Platin-Menge bei einem Drittel der Einwirkungszeit!

Interessant ist der Vergleich der Toxizität der 1,4 Nanometer-Au₅₅-Partikel mit kleineren und größeren Goldnanopartikeln. Um keine zusätzlichen Unterschiede in die Vergleiche mit einzubeziehen, waren

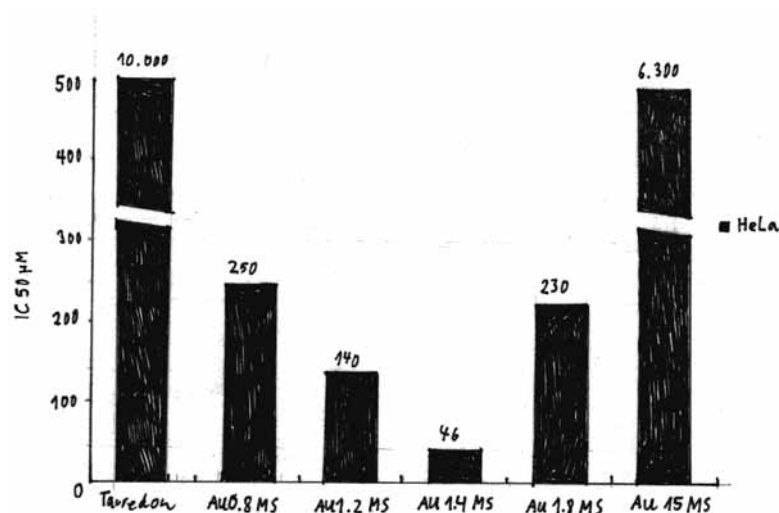
alle anderen Partikel mit den gleichen Phosphin-Molekülen geschützt wie Au₅₅. Am Beispiel von HeLa-Zelllinien sei gezeigt, wie schon kleine Abweichungen von der offensichtlich idealen 1,4 Nanometer-Größe zu weniger Toxizität führt. In Abbildung (8) sind die IC₅₀-Werte von Au-Nanopartikeln mit 0,8 bis 15 Nanometern, alle mit monosulfoniertem Triphenylphosphin (MS) belegt, dargestellt. Zusätzlich wurde mit Tauredon, einem kommerziell erhältlichen Thiomalat-Goldkomplex, verglichen.

Die Einführung weiterer Sulfonsäuregruppen in den Liganden unter Beibehaltung der Größe des Clusters (1,4 nm) ändert nichts an der Toxizität (IC₅₀: 30 μ M). Dagegen hat der Austausch der Donoratome des Liganden (Phosphor gegen Schwefel) einen signifikanten Einfluss.

Im Gegensatz zu Au1.4MS ist der entsprechende Komplex mit Glutathion, einem natürlich vorkommenden, schwefelhaltigen, Antioxidans bei gleicher Größe wesentlich weniger toxisch, was entweder durch die deutlich stärkere Gold-Schwefel-Bindung oder die reduzierende und damit zellschonende Wirkung des Glutathions erklärt werden kann.



(7) Au₅₅ Cluster, eingebettet in die chelatarig wirkenden großen Furchen von DNA.



(8) IC₅₀ Werte (Mengenangaben in Micromol, μ M) für unterschiedlich große Gold-Nanopartikel. Die benötigte Menge ist mit 46 μ M für den Au₅₅-Cluster (Au1.4MS) eindeutig am niedrigsten, das heißt die Toxizität ist am höchsten.

Zelltod: Nekrose oder Apoptose?

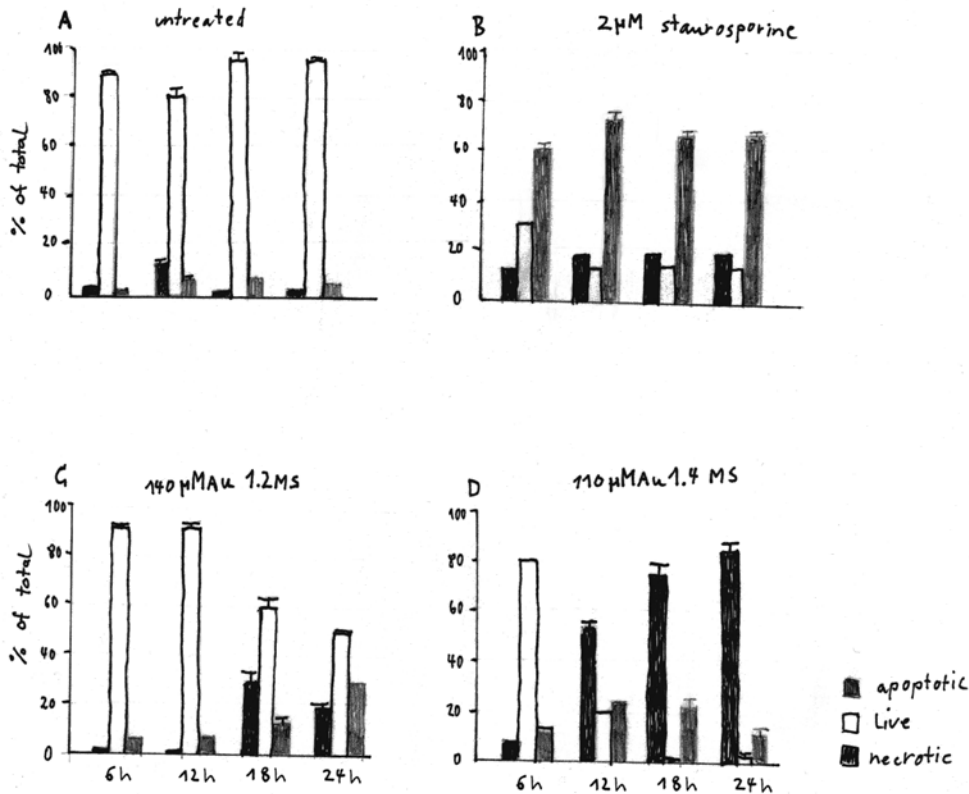
Zur Beantwortung der Frage nach der Ursache der Toxizität müssen zunächst die Mechanismen des Zelltods betrachtet werden. Grundsätzlich sind zwei Mechanismen des Zelltods bekannt. Schnell wirkende metabolische Zellgifte, Zerstörung der Zellorganellen oder mechanische Überbeanspruchung wie Verbrennungen oder Erfrierungen führen zu Schädigungen, die letztendlich zum Platzen der Zelle und zur Freisetzung des Zellinhaltes führen (Nekrose). Da diese Zellinhalte hochentzündlich sind, geht eine Nekrose immer mit einer Entzündung einher. Im Gegensatz dazu wird die Apoptose durch ein „Selbstmordprogramm“ aktiv von der Zelle selbst ausgeführt. Sie ist der natürliche Weg des Organismus, Zellen, zum Beispiel während der Gewebserneuerung, gezielt und streng kontrolliert abzutöten. Über eine Kaskade verschiedener Prozesse werden Zellorganellen oder Zellkerne in kleine, von einer Membran umgebenen, Vesikel fragmentiert und anschließend durch „Fresszellen“ (Phagozyten) entsorgt. Da hierbei die Zellmembran intakt bleibt, treten keine entzündlichen Reaktionen auf.

Bei der Nekrose wird, wie oben schon erwähnt, der Zellinhalt, also auch die DNA freigesetzt. Diese freiliegende DNA kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid nachgewiesen werden. Da Propidiumiodid jedoch nicht durch intakte Zellmembranen diffundieren kann, wird DNA innerhalb einer intakten Zellmembran, also auch in apoptotischen Zellen nicht angefärbt.

Während der Apoptose wird auf der Membranoberfläche verstärkt Phosphatidylserin präsentiert, das mit fluoreszenzmarkiertem Annexin-V sehr spezifisch angefärbt werden kann.

Mit diesen beiden Fluoreszenzfarbstoffen kann daher sehr genau zwischen beiden Mechanismen und somit auch zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden.

Unterschiedliche Zelllinien wurden mit Au1.4MS und Au1.2MS inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde mittels Durchflusszytometrie die jeweilige Anzahl der lebenden, der apoptotischen beziehungsweise der nekrotischen Zellen bestimmt. Als negative Kontrollen wurden unbehandelte Zellen herangezogen. Als positive Kontrolle diente die Inkubation mit dem Apo-



(9) Bestimmung der Anzahl der lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation. A: unbehandelt, B: Staurosporin, C: Au1.2MS nm, D: Au1.4MS.

ptose induzierenden Alkaloid Staurosporin (Abb. 9).

Während die unbehandelten Zellen nahezu keinen Effekt zeigten (A), wurde der Zelltod nach Inkubation mit Staurosporin nahezu ausschließlich durch Apoptose verursacht (B). Im Falle der Goldnanopartikel zeigt sich ein differenzierteres Bild. Nach Inkubation mit Au 1.4 MS geht der Zelltod relativ langsam vonstatten und wird bei insgesamt geringerer Toxizität sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose verursacht (C). Au 1.4 MS tötet die Zellen schneller ab und nach anfänglicher Apoptose überwiegt die Nekrose als Ursache deutlich (D).

Bei kritischen biologischen Prozessen wie zum Beispiel der Blutgerinnung oder der Apoptose – es soll ja lediglich das Blut in der Wunde gerinnen oder nur eine einzelne, geschädigte Zelle abgetötet werden – bedarf es eines ausgefeilten „Feintunings“. Dieses wird oft durch Kaskaden nach-

geschalteter, von einander abhängigen Reaktionen, deren einzelne Schritte enzymatisch kontrolliert werden, erreicht. In der Steuerung der Apoptose sind proteolytische Enzyme aus der Familie der Caspasen (Cysteinyl-Aspartat spezifische Proteasen) wichtige Stellschrauben bei dieser Feinsteuerung. Eine direkte Messung der Caspase-Aktivitäten sollte eine weitere Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ermöglichen.

Hierzu wurden die Zellen erneut mit Au 1.4 MS und mit Staurosporin inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Aktivität der Caspasen 3 und 7 bestimmt.

Aus Abbildung (10) geht hervor, dass Staurosporin die Caspaseaktivität innerhalb von sechs bis zehn Stunden versechsfacht, während nach Inkubation mit Au 1.4 MS lediglich ein geringer Effekt (Faktor 2) zu beobachten ist.

Die zentrale Rolle der Caspasen bei der Vermittlung der Apoptose

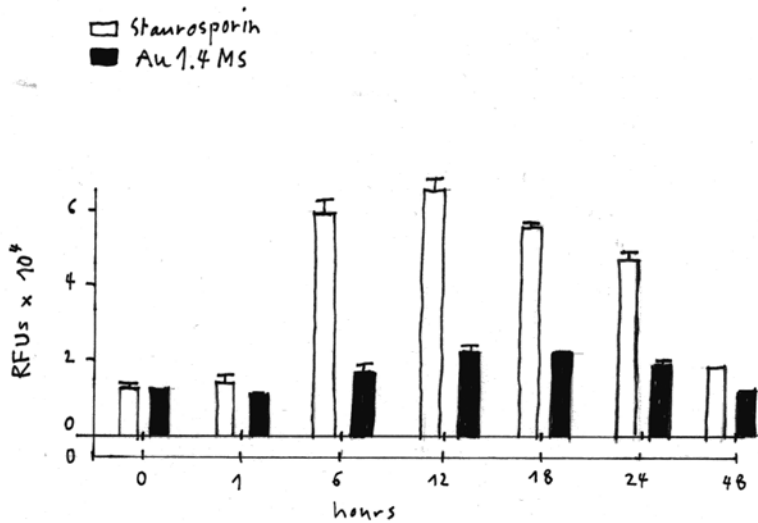
wird dadurch belegt, dass durch Zusatz eines Caspase-Inhibitors die Apoptose unterdrückt werden kann, während die Nekrose davon nicht beeinflusst werden sollte.

Bei Zusatz des Caspase-Inhibitors erhöht sich die Überlebensrate der Staurosporin behandelten Zellen von 47 Prozent auf etwa 90 Prozent, während die mit Au 1.4 MS behandelten Zellen keinerlei Anstieg in der Überlebensrate zeigen (Abb. 11).

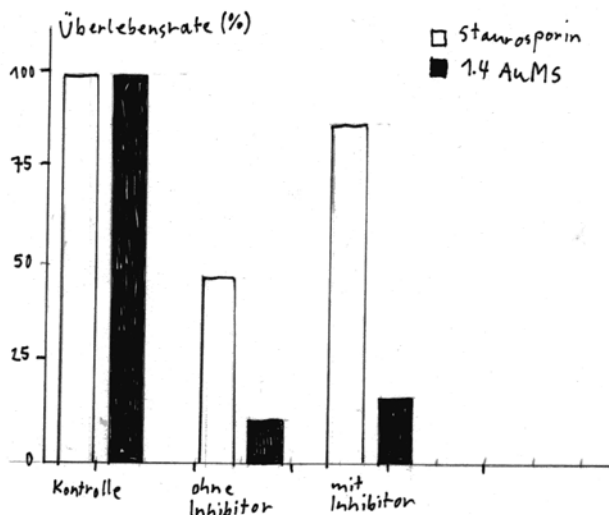
All diese Befunde führen zu dem Schluss, dass die hohe Toxizität von Au 1.4 MS auf der Einleitung einer Zellnekrose beruht und nicht, oder nur zum kleineren Teil durch einen programmierten Zelltod vermittelt wird.

Ursachen der Nekrose – „oxidativer Stress“?

Wie oben erwähnt, können die verschiedensten Ursachen als Auslöser für ein nekrotisches Geschehen



(10) Caspase-Aktivität nach Inkubation von HeLa Zellen mit Au1.4MS beziehungsweise Staurosporin.



(11) Überlebensraten der HeLa Zellen nach Staurosporin- beziehungsweise Au 1.4 MS-Behandlung mit und ohne Zusatz des Inhibitors.

fungieren. Ein wichtiger Mechanismus ist die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies in der Zelle, die zu Veränderungen der Protein- und Lipid-Oxidation sowie zur Schädigung von Zellorganellen führen. Mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen kann direkt die Konzentration dieser reaktiven Sauerstoffspezies gemessen werden. Durch die entsprechenden Messungen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Au 1.4 MS als auch Wasserstoffperoxid als Positiv-Standard intra-

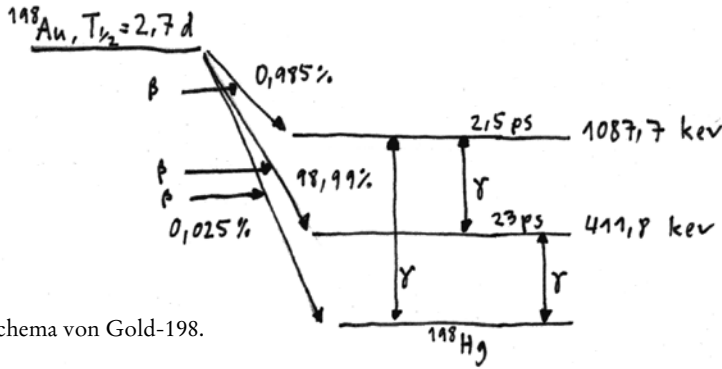
zellulär reaktive Sauerstoffspezies bilden, während diese nach Inkubation mit 15 Nanometer großen Goldpartikeln oder 1.4 Nanometer-Glutathionkomplexen nicht zu beobachten waren. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Au 1.4 MS steht in Einklang mit dessen nachgewiesener hoher katalytischer Oxidationsaktivität, die ihrerseits auf der Partikelgröße und -struktur sowie auf den besonderen elektronischen Eigenschaften basieren (s. oben).

Insbesondere die Schädigung der Mitochondrien, den „Kraftwerken“ der Zelle, führt zum Zusammenbruch der Energieversorgung und somit zum Zelltod durch Nekrose. Die Permeabilität der Mitochondrien-Membran ist ein entscheidender Faktor für deren ordnungsgemäße Funktion. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 steht ein Marker zur Verfügung, der sich in intakten Mitochondrien in hohen Konzentrationen anreichert, dabei dimerisiert und rot fluoresziert. Bei einer „Leckage“ der Mitochondrien wird JC-1 aus den Mitochondrien freigesetzt, dabei verdünnt, das Dimer dissoziiert und besitzt als Monomer eine grüne Fluoreszenz. Mit dieser Methode lassen sich somit intakte und geschädigte Mitochondrien sehr gut unterscheiden. Diese Mitochondrienschädigung konnte für Au 1.4 MS nachgewiesen werden, da nach der Behandlung von HeLa-Zellen die Fluoreszenz innerhalb von 24 Stunden nahezu vollständig von rot nach grün umschlug.

Erste in vivo-Versuche

Aufgrund der hohen Toxizität von Au 1.4 MS in Tumorzellen wurde überlegt, ob sich der Cluster eventuell als Tumortheraeutikum eignen könnte. Zur Beantwortung dieser Frage müssen Experimente im lebenden Organismus durchgeführt werden, da grundlegende Parameter weder simuliert noch in Zellexperimenten geklärt werden können. Beispielsweise können der Transport über die Blutbahn zum Tumor („tumor targeting“) oder die Verstoffwechslung einer Substanz in der Leber nur tierexperimentell erfasst werden. Daher wurden erste orientierte Experimente mit tumortragenden Mäusen durchgeführt.

In immundefizienten Nacktmäusen wurde subkutan ein humanes Nierenkarzinom induziert und die Tiere im dreitägigen Abstand mit 25, 50 oder 75 Milligramm Au 1.4 MS pro Kilogramm Körpergewicht behandelt. Die Wirksamkeit wurde anhand



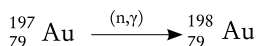
(12) Zerfallsschema von Gold-198.

des Tumorwachstums beurteilt. Die Behandlung mit Au 1.4 MS hat keinerlei Einfluss auf das Tumorwachstum; die Tumore wachsen genau so schnell wie die in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Um die Frage zu beantworten, ob Au 1.4 MS den Tumor überhaupt erreicht, wurden die Tiere am 1. und am 35. Tag nach der letzten Injektion getötet, die wichtigsten Organe und Gewebe (Tumor, Herz, Leber, Lunge und Blut) entnommen und der Goldgehalt mittels Neutronenaktivierungsanalyse (NAA) quantitativ bestimmt.

Die NAA ist eine elegante und überaus empfindliche Analysemethode zur Bestimmung von kleinen Goldmengen. Hierzu wird ein Element, im vorliegenden Fall natürlich vorkommendes $[^{197}\text{Au}]$ Gold, in einem Kernreaktor mit thermischen (langsamen) Neutronen bestrahlt. Dabei wird vom Atomkern ein Neutron eingefangen ohne dass ein Teilchen emittiert wird. Die Massenzahl erhöht sich dadurch um 1, während die Ordnungszahl (Protonenzahl) gleichbleibt.

So entsteht aus $[^{197}\text{Au}]$ Gold das Isotop $[^{198}\text{Au}]$ Gold in einem hochangeregten Zustand, der sehr schnell unter Aussendung eines Gammaquants zum Grundzustand zerfällt.

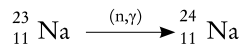


$[^{198}\text{Au}]$ Gold ist radioaktiv und zerfällt mit einer Halbwertszeit von 2,7 Tagen unter Emission von Beta-Strahlung und Gamma-Quanten zu $[^{198}\text{Hg}]$ Quecksilber (s. Schema in Abb. 12).

Durch Messung der Gammastrahlung kann der Goldgehalt der Probe quantitativ bestimmt werden.

Ein wesentlicher Vorteil der NAA ist die Unabhängigkeit von der Probenmatrix. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um biologische, anorganische oder organische Proben handelt – es wird selektiv immer nur die Goldmenge bestimmt.

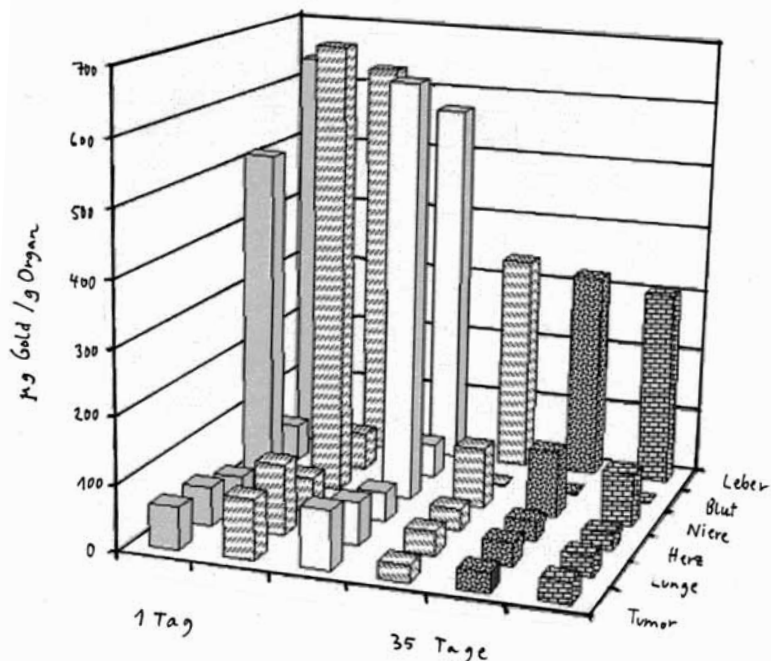
Selbstverständlich werden auch andere in der Probe vorhandene Elemente aktiviert. So entstehen in biologischen Proben über die Reaktion



große Mengen an $[^{24}\text{Na}]$ Natrium. Dieses besitzt allerdings eine Halbwertszeit die mit 15,9 Stunden erheblich kürzer ist als die von $[^{198}\text{Au}]$ Gold (2,7d), so dass man die Proben vor der Analyse „abkühlen“ lassen kann. Darüber hinaus ist es möglich, mit einem hochauflösenden Germaniumdetektor die diskreten Energien der Gammaquanten ($[^{198}\text{Au}]$ Gold: 411,8 keV, 98,99 Prozent) zu messen.

Die Ergebnisse der NAA der Organproben sind in Abbildung (12) zusammengefasst.

Au 1.4 MS wird sehr schnell aus dem Blut eliminiert und zu nahezu gleichen Teilen von Leber und Niere aufgenommen. Die Verweildauer im Körper ist relativ lang, so dass auch nach 35 Tagen noch erhebliche Goldmengen im Körper gefunden werden. Die Aufnahme im Tumor ist nachweisbar, unterscheidet sich aber praktisch nicht von anderen Geweben. Auch die Verweildauer im Tumor unterscheidet sich kaum von der in den anderen untersuchten Organen.



(13) Organverteilung von Au 1.4 MS in tumortragenden Mäusen.

Zusammenfassung

Gold, aber auch andere Metalle, verändern beim Verkleinern in den Nanometerbereich ihre bekannten Eigenschaften spontan und dramatisch. Es gelten dann nicht mehr die klassischen physikalischen Gesetze für makroskopische Metalle, sondern quantenmechanische Regeln, die sich vor allem in der Ausbildung diskreter elektronischer Energieniveaus anstelle des dreidimensionalen Elektronengases in massiven Metallen widerspiegeln. Hieraus erfolgen völlig neue Anwendungsmöglichkeiten, die einen nicht unerheblichen Teil der derzeitigen Nanowissenschaften prägen. Aus biologischer Sicht ist bedeutsam, dass Gold-Nanopartikel (Gold-NPs) bei weitem nicht so inert sind, wie lange Zeit angenommen. Im Gegenteil: Auf der Nanometerskala besitzt Gold die Fähigkeit, mit DNA zu interagieren. Darüber hinaus zeigen Gold-NPs größenabhängig eine ausgeprägte Zelltoxizität, indem sie intrazellulär die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induzieren und die Mitochondrien schädigen. Dadurch bricht der Energiestoffwechsel der Zelle zusammen, was sehr schnell zum Zelltod durch Nekrose führt. Die Frage, ob sich Gold-NPs in der Tumorthherapie einsetzen lassen, kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Es ist sicherlich ein besseres tumor targeting nötig, was beispielsweise durch das Einbringen von „Ankermolekülen“ in die Liganden erreicht werden könnte. Durch die nachgewiesene Toxizität von Au 1.4 MS stellen sich auch für die Zukunft zahlreiche neue Fragen. Zum Beispiel sollte untersucht werden, welche Effekte bei der Inhalation dieser Partikel auftreten, um sie in der so genannten „Feinstaub-Diskussion“ entsprechend bewerten zu können.

Summary

Gold and other metals spontaneously and dramatically change their known properties if reduced in size to the nanometre scale. The classical physical laws for macroscopic metals are then no longer valid, but quantum mechanical rules, especially reflected by the formation of discrete electronic energy levels instead of the three-dimensional electron gas in bulk metals. From this, completely novel applications follow, representing a significant part of current nanosciences. From a biological point of view, it is important to note that gold nanoparticles are far from being as inert as has been expected for a long time. On the contrary: on the nanometre scale gold has the ability to interact with DNA. Moreover, gold nanoparticles show pronounced size-dependent cell toxicity by inducing the formation of intracellular reactive oxygen species which damage the mitochondria. As a consequence, the energy metabolism in the cell collapses, leading to a fast cell-death by necrosis. The question whether gold nanoparticles can be used in tumour therapy cannot be conclusively answered. For sure, a better tumour targeting will be necessary that could be reached for example by using ligands modified by “anchor molecules”. By proving the toxicity of Au 1.4 MS, numerous questions can be asked. For instance, it should be investigated which effects will occur by inhalation in order to be able to evaluate them in the present fine-dust discussion.

Literatur

- Schmid, G.: The Relevance of Shape and Size of Au₅₅ Clusters. In: Chem. Soc. Rev. 37 (2008), 1909–1930.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W.: Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, In: Small 3 (2007), 1941–1949.
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S.,

Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., Jahnen-Dechent, W.: Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Triggers Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. In: Small 5 (2009), 2067–2076.

Die Autoren

Günter Schmid studierte Chemie an der Universität München und promovierte dort 1965 in Anorganischer Chemie. 1966 ging er zur Habilitation an die Universität Marburg. Die Habilitation schloss er 1969 ab. 1971 erhielt er dort eine Professur. Von 1975 bis 1976 war er Dekan des Fachbereichs Chemie in Marburg. 1977 folgte Schmid einem Ruf auf eine C4-Professur an die neugegründete Universität Essen, wo er bis zu seiner Emeritierung im Jahr 2002 als Direktor des Instituts für Anorganische Chemie arbeitete. 1987/88 bekleidete er das Amt des Dekans des Fachbereichs Chemie, und von 1988 bis 1992 war er Prorektor für Forschung und Wissenschaftlichen Nachwuchs der Universität Essen. Günter Schmid's wissenschaftliche Interessen konzentrieren sich vor allem auf die Herstellung und Untersuchung von Übergangsmetall-Nanopartikeln zur Anwendung in der Katalyse, in biochemischen und medizinischen Bereichen, nicht zuletzt auch hinsichtlich ihres Einsatzes in zukünftigen Speichermedien. Er publizierte etwa 350 wissenschaftliche Arbeiten, gab fünf Bücher zum Thema Nanotechnologie heraus und ist Mitglied mehrerer Editorial Boards internationaler Fachzeitschriften. Schmid ist Mitglied der Europäischen Akademie zur Erforschung von Folgen wissenschaftlich-technischer Entwicklungen, der European Academy of Sciences und der Bayerischen Akademie der Wissenschaften. 2003 erhielt Günter Schmid den Wilhelm Klemm-Preis der Gesellschaft Deutscher Chemiker.

Wolfgang Brandau studierte von 1975 bis 1980 Chemie an der Universität Konstanz. An der Fakultät für Theoretische Medizin der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg promovierte er 1985 über Radiopharmaka. Er war von 1988 bis 1997 wissenschaftlicher Angestellter an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Dort baute er das radiochemische Labor auf und schrieb seine Habilitationsschrift über Nierenfunktions- und Melanomdiagnostika. 1996 wurde Wolfgang Brandau die *venia legendi* für das Fach Radiopharmazeutische Chemie durch die Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster verliehen. Ein Jahr später folgte die Berufung auf die Professur für Nuklearchemie und Radiopharmazie an der damaligen Universität Essen. Brandau erhielt 1989 den Mallinckrodt Förderpreis der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 1991 den Benningen-Förder-Preis des Ministers für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und den Technologist Award des European Association Nuclear Medicine Congress sowie 1993 den Hans-Creutzig-Preis der Rheinisch-Westfälischen Gesellschaft für Nuklearmedizin.



Wolfgang Brandau. Foto: Max Greve