



Intrazelluläre Thermometrie mithilfe fluoreszierender Gold-Nano-cluster**

Li Shang, Florian Stockmar, Naghmeh Azadfar und G. Ulrich Nienhaus*

Zelluläre Prozesse hängen empfindlich von der Temperatur ab, da diese die Dynamik und Reaktivität der unzähligen Biomoleküle in den Zellen bestimmt.^[1] Präzise Messungen der Temperatur und ihrer Variation innerhalb von Zellen können daher zu Fortschritten in der Zellbiologie und der Biomedizin beitragen.^[2] Fluoreszierende Nanopartikel sind dabei von besonderem Interesse, weil sie sowohl zur Bildgebung als auch zur Temperaturmessung auf der Nanoskala verwendet werden können.^[3] Diverse Nanomaterialien, z.B. Halbleiterquantenpunkte (quantum dots, QDs),^[4] mit seltenen Erden dotierte Nanopartikel^[5] und Polymer-basierte Nanogelee^[6] haben bereits großes Potenzial als Nanothermometer in biologischen Systemen, besonders in lebenden Zellen, gezeigt. Lin et al.^[7] haben beispielsweise QDs zur Erfassung der räumlich heterogenen Wärmeproduktion in lebenden Zellen verwendet.

Fluoreszierende Gold-Nanocluster (AuNCs) erlangten in jüngster Zeit bemerkenswerte Aufmerksamkeit. Durch ihre sehr geringe Größe (Durchmesser < 2 nm), kolloidale Stabilität, gute Biokompatibilität und einfache Synthese^[8] haben sich AuNCs in einer Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen als hervorragend einsetzbar erwiesen, beispielsweise für die Biosensorik,^[9] In-vitro- und In-vivo-Bildgebung^[10] sowie Krebstherapie.^[11] Wir zeigen hier, wie AuNCs wegen ihrer stark temperaturabhängigen Fluoreszenzlebensdauer und -intensität im physiologischen Temperaturbereich (15–45 °C) als vielseitige Nanothermometer eingesetzt werden können. Mithilfe der auf zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (time-correlated single photon counting, TCSPC)

basierenden Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) demonstrieren wir das große Potenzial von AuNCs für die lokale Temperaturmessung in lebenden Zellen.

Liponsäure-ummantelte AuNCs wurden entsprechend einer publizierten Methode synthetisiert.^[12] Diese AuNCs haben einen Durchmesser von (1.6 ± 0.3) nm (siehe Abbildung S1 und S2 in den Hintergrundinformationen) und fluoreszieren stark im nah-infraroten Bereich. Außerdem haben sie eine hervorragende kolloidale Stabilität in biologischen Medien, was entscheidend für ihre Funktion als Fluoreszenzmarker in biologischen Anwendungen ist.^[13]

Abbildung 1 A zeigt die ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzemissionsspektren der AuNCs in Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS). Die Intensität nimmt bei einer Erhöhung der Temperatur von 10 auf 45 °C um 67 % ab. Die Temperaturauflösung beträgt etwa 0.1–0.3 °C unter der Annahme, dass ein Intensitätsunterschied von $0.5\% \text{ °C}^{-1}$ notwendig ist, um einen

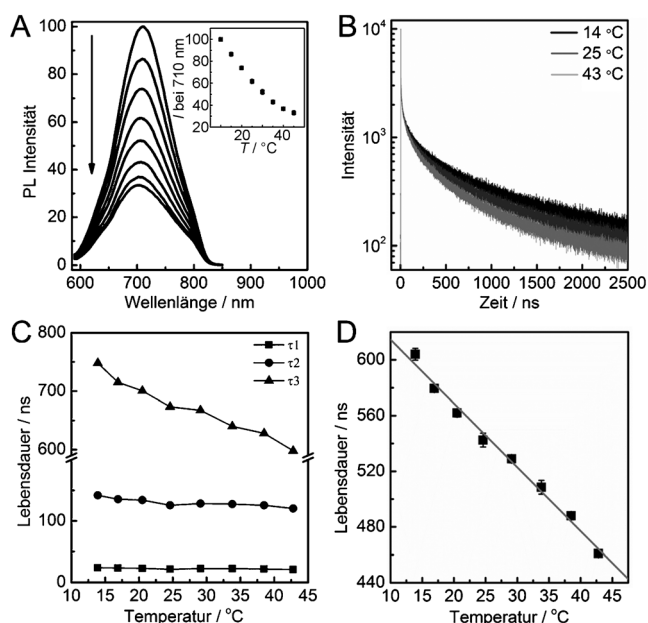


Abbildung 1. Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Liponsäure-ummantelten AuNCs in Pufferlösung. A) Fluoreszenzspektrum (Anregung bei 580 nm) für verschiedene Temperaturen (10–45 °C; von oben nach unten). Der eingebettete Graph zeigt die Intensität bei 710 nm in Abhängigkeit von der Temperatur. B) Fluoreszenzzerfälle bei 14 °C (schwarz), 25 °C (grau), 43 °C (hellgrau). C) Temperaturabhängigkeit der drei Exponentialfunktionen, die zur Anpassung an die Fluoreszenzzerfälle benötigt wurden. D) Mittlere Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von der Temperatur und die zugehörige lineare Regression (graue Linie).

[*] Dr. L. Shang, F. Stockmar, N. Azadfar, Prof. Dr. G. U. Nienhaus
Institut für Angewandte Physik und Centrum für Funktionelle Nanostrukturen (CFN), Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
76131 Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: uli.nienhaus@kit.edu
Homepage: <http://www.aph.kit.edu/nienhaus/>
Prof. Dr. G. U. Nienhaus
Institut für Toxikologie und Genetik
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Deutschland)
Prof. Dr. G. U. Nienhaus
Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign
Urbana, IL 61801 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Centrums für Funktionelle Nanostrukturen (CFN) und des Schwerpunktprogramms SPP1313 unterstützt. Wir danken außerdem Radian Popescu und Prof. Dr. Dagmar Gerthsen für ihre Hilfe bei den HR-TEM-Messungen. Weiterhin danken wir noch Alexander Hepting für den Bau der temperaturgesteuerten Probenkammer.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306366> zu finden.

Temperaturunterschied festzustellen.^[14] Anders als bei QDs, die starke Temperatur-abhängige spektrale Verschiebungen zeigen,^[4a,7] ist die Form des Emissionsspektrums von AuNCs im untersuchten Temperaturbereich konstant.

Mit der Verringerung der Intensität bei steigender Temperatur beschleunigt sich auch der Fluoreszenzzerfall der AuNCs (Abbildung 1B). Liponsäure-ummantelte AuNCs zeigen einen charakteristischen, nichtexponentiellen Fluoreszenzzerfall, der mit einer Summe von drei Exponentialfunktionen angepasst werden kann, die einer kurzen ($\tau_1 \approx 24$ ns), einer mittleren ($\tau_2 \approx 130$ ns) und einer langen (600 ns $< \tau_3 < 750$ ns) Lebensdauer entsprechen. Die Temperaturabhängigkeit wird von der Komponente mit langer Lebensdauer dominiert (Abbildung 1C). Der Lumineszenz-Mechanismus der AuNCs ist noch nicht vollkommen verstanden. Untersuchungen an Thiol-funktionalisierten AuNCs ergaben Hinweise, dass die Komponente mit langer Lebensdauer (typischerweise > 500 ns) mit dem Au^I-Thiolat-Komplex auf der AuNC-Oberfläche assoziiert ist.^[15] Die (intensitätsgewichtete) mittlere Lebensdauer variiert annähernd linear mit der Temperatur; die Anpassung ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.9952 (Abbildung 1D). Folglich reagiert nicht nur die Emissionsintensität, sondern auch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer empfindlich auf Temperaturvariationen. Für Temperaturmessungen in biologischen Systemen ist die Fluoreszenzlebensdauerermessung sogar interessanter, da sie im Unterschied zu Intensitätsmessungen invariant gegenüber lokalen Änderungen der Fluoreszenzmarkerkonzentration oder der Fluoreszenzanregung ist. Zudem liegt die mittlere Fluoreszenzlebensdauer mit > 500 ns zwei Größenordnungen über jener der Autofluoreszenz der Zelle. Folglich können AuNCs in biologischen Proben mithilfe von FLIM mit Lebensdauerfilterung^[16] praktisch ohne Autofluoreszenzhintergrund abgebildet werden. Die lange Fluoreszenzlebensdauer verlangsamt jedoch die Datenerfassung.

Wir haben den Einsatz von AuNCs zur intrazellulären Temperaturmessung mit FLIM an menschlichen Krebszellen (HeLa) analysiert. Liponsäure-ummantelte AuNCs werden von HeLa-Zellen über Clathrin-vermittelte Endozytose effizient aufgenommen.^[17] Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden beträchtliche Mengen von AuNCs in den HeLa-Zellen gefunden, was auch mit intensitätsbasierter konfokaler Mikroskopie gezeigt werden konnte (siehe Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Anschließend wurde die Umgebungstemperatur der HeLa-Zellen mit einer temperaturgesteuerten Probenkammer variiert. FLIM-Aufnahmen wurden erstellt, indem an die Lebensdauerdaten eines jeden einzelnen Bildpunktes eine Summe aus drei Exponentialfunktionen angepasst wurde (Abbildung 2). Die Befunde zeigen eindeutig, dass die lange Lebensdauerkomponente im Bereich von 600 bis 1000 ns von den aufgenommenen AuNCs herrührt und nicht von der Autofluoreszenz. Mit steigender Temperatur verringerte sich die Fluoreszenzlebensdauer signifikant. Die mittlere Lebensdauer der AuNCs fiel von 970 ns bei 14 °C auf 670 ns bei 43 °C.

Abbildung 3 zeigt, dass die Fluoreszenzlebensdauer der AuNCs in HeLa-Zellen nicht scharf definiert, sondern durch eine Verteilung charakterisiert ist. Außer der intrinsischen

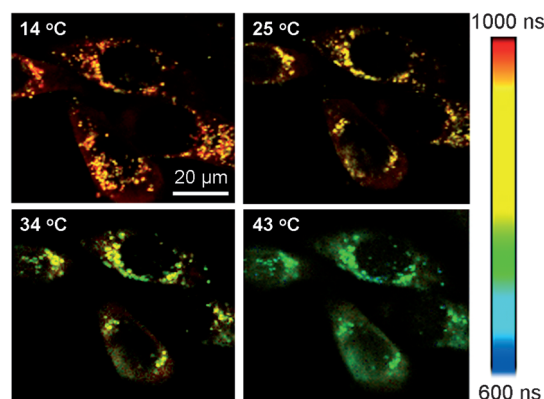


Abbildung 2. Typisches FLIM-Bild von HeLa-Zellen mit AuNCs bei vier Temperaturen.

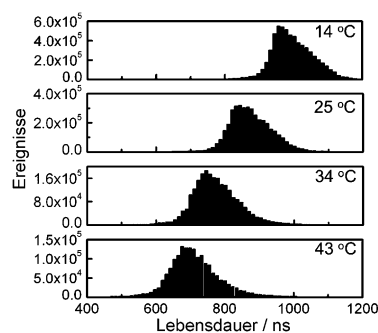


Abbildung 3. Histogramm der mittleren Lebensdauern von intrazellulären AuNCs bei verschiedenen Temperaturen.

Heterogenität der nackten AuNCs trägt auch die lokale chemische Umgebung innerhalb der Zellen zu dieser Verteilung bei (siehe Abbildung S4 und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).^[2b,7,18]

Es ist deutlich zu sehen, dass die Fluoreszenzlebensdauer im untersuchten Temperaturbereich in Zellen viel größer als in Puffer ist. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Bildung einer Korona aus Biomolekülen um die aufgenommenen Nanopartikel zurückzuführen, die die photophysikalischen Eigenschaften der AuNCs ändert.^[19] Tatsächlich zeigten In-vitro-Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit von AuNCs in Gegenwart von Serumproteinen eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer (siehe Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Aktuelle Arbeiten zeigten weiterhin, dass die Proteinadsorption zu einer signifikanten Änderung der photophysikalischen Eigenschaften von fluoreszierenden Nanopartikeln führen kann.^[20] Die drastischen Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer (sowie ihrer Temperaturabhängigkeit) zwischen zellulärer Umgebung und Pufferlösung unterstreichen, dass es unbedingt notwendig ist, die Effekte der Nano-Bio-Wechselwirkungen bei der Entwicklung von fluoreszierenden Nanomaterialien für biologische Anwendungen, beispielsweise die intrazelluläre Thermometrie, mit in Betracht zu ziehen.^[4c,21]

Wir haben das Verhalten unserer AuNCs als Nanothermometer sorgfältig charakterisiert. Wir konnten lokale Än-

derungen der Temperatur innerhalb einer Zelle mit hoher Empfindlichkeit untersuchen; Einzelmolekülempfindlichkeit wurde jedoch noch nicht erzielt. Im Bereich 14–43 °C liegt die Temperaturauflösung bei 0.3–0.5 °C, bestimmt über die Temperaturabhängigkeit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer der AuNCs in HeLa-Zellen (Abbildung 4A). Folglich

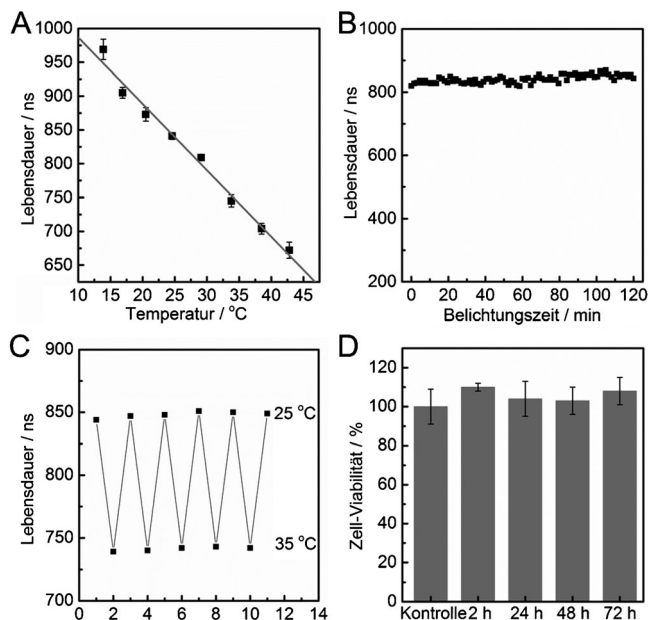


Abbildung 4. Charakterisierung der AuNCs als Fluoreszenzthermometer in HeLa-Zellen. A) Mittlere Fluoreszenzlebensdauer intrazellulärer AuNCs in Abhängigkeit von der Temperatur und die zugehörige lineare Anpassung (graue Linie). B) Fluoreszenzlebensdauer intrazellulärer AuNCs in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Die Anregungsintensität wurde konstant auf 2.8 kW cm^{-2} gehalten. C) Lebensdauer intrazellulärer AuNCs bei fünf Temperaturzyklen zwischen 25 und 35 °C. D) Mit einem MTT-Test bestimmte Viabilität von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Zellen wurden vor Beginn des Experiments mit AuNCs inkubiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für drei unabhängige Experimente.

sind unsere Nanopartikel konkurrenzfähig mit anderen Nanopartikel-basierten fluoreszierenden Thermometern;^[4b,5a,6] sie sind sogar besser als viele andere molekulare optische Thermometer (siehe Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen).^[22] Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Fluoreszenzlebensdauer der AuNCs innerhalb der HeLa-Zellen unter kontinuierlicher Anregung von bis zu 2.8 kW cm^{-2} über 2 h hinweg praktisch konstant blieb (Intensitätsabfall $< 5\%$, Abbildung 4B). Weiterhin ist die Temperaturantwort der AuNCs komplett reversibel bei periodischen Temperaturwechseln und zeigt keine thermische Hysterese (siehe Abbildung 4C für fünf Wechsel zwischen 25 und 35 °C). Ein MTT-Test hat keine nachteiligen Effekte der AuNCs auf HeLa-Zellen innerhalb von 72 h gezeigt (Abbildung 4D), was eine exzellente Biokompatibilität der intrazellulären Nanothermometer nahelegt. Zusammengefasst ist unser AuNC-System vergleichbar mit den besten bislang bekannten optischen Nanothermometern.^[3b,5c,7]

Des Weiteren haben wir die Fähigkeit unserer AuNC-Nanothermometer untersucht, intrazelluläre Temperaturunterschiede in HeLa-Zellen zu messen. Dazu wurde mit einer speziell für diesen Zweck angefertigten Probenkammer (siehe Schema S1 und Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen) ein Temperaturgradient an die Zellen angelegt. Wie erwartet wurde eine Änderung des Lebensdauerprofils einer Zelle in Abhängigkeit von der horizontalen Position beobachtet (Abbildung 5). Für eine detaillierte Ana-

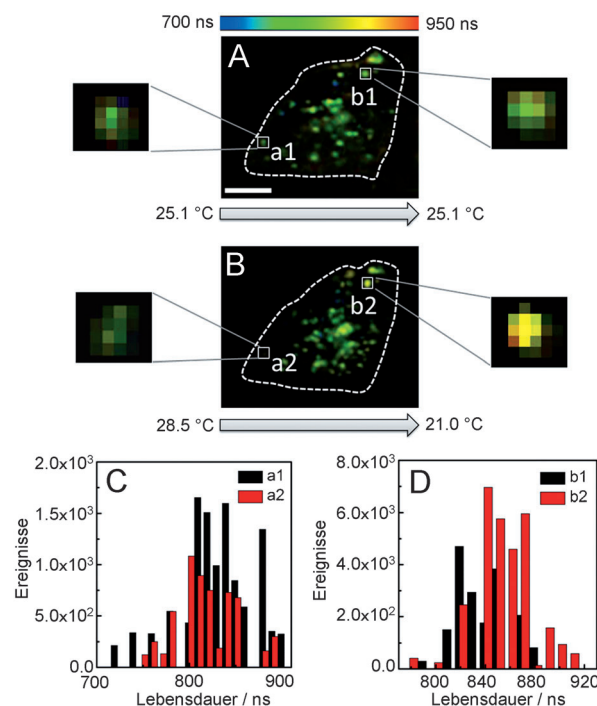


Abbildung 5. Bestimmung von Temperaturvariationen innerhalb von HeLa-Zellen mithilfe von AuNC-Fluoreszenzthermometrie. Die FLIM-Bilder von HeLa-Zellen mit AuNCs wurden A) bei konstanter Temperatur und B) nach Anlegen eines Temperaturgradienten an die Zelle (Maßstab 10 µm) aufgenommen. Die Temperaturen wurden mithilfe der Kalibrierungsgeraden aus Abbildung 4A bestimmt. C, D) Lebensdauerverteilung von zwei ausgewählten AuNC-Anhäufungen innerhalb einer Zelle mit konstanter Temperatur (a1 und b1) und in Gegenwart des Temperaturgradienten (a2 und b2).

lyse wurden zwei Ansammlungen von AuNCs (a und b in Abbildung 5) mit einer mittleren Fluoreszenzlebensdauer von ca. 834 ns (bei 25.1 °C) ausgewählt. Nach Anlegen des Temperaturgradienten verringerte sich die Lebensdauer von Anhäufung a auf 815 ns. Mithilfe der Kalibrierungsgeraden aus Abbildung 4A resultiert daraus ein Temperaturanstieg von 1.9 °C. Im Unterschied dazu ließ die Lebensdaueränderung von Anhäufung b einen Temperaturabfall um 2.0 °C erkennen. Die Befunde bestätigen, dass sich unsere AuNCs zur Messung von Temperaturvariationen auf der subzellulären Ebene eignen.

Wir haben hier die Anwendung von fluoreszierenden AuNCs zur intrazellulären Temperaturbestimmung vorgestellt. Diese Nanothermometer weisen eine hohe Tempera-

turempfindlichkeit der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer sowie eine exzellente Stabilität im physiologischen Temperaturbereich auf. Sie ermöglichen mithilfe von Fluoreszenzbildgebung präzise, räumlich aufgelöste Temperaturmessungen in biologischen Systemen. AuNCs wurden über Endozytose in Zellen eingebracht und befanden sich schließlich hauptsächlich in den Endosomen/Lysosomen. Gegenwärtig arbeiten wir daran, diese Nanothermometer auch in andere Zellorganellen gezielt einzuschleusen. Die Kombination von fluoreszierenden Nanothermometern mit hochauflösender Lichtmikroskopie^[23] ist ebenfalls abzusehen.

Eingegangen am 22. Juli 2013

Online veröffentlicht am 13. September 2013

Stichwörter: Bildgebung · Fluoreszenz · Gold-Nanocluster · Sensoren · Temperatur

- [1] a) M. Monti, L. Brandt, J. Ikomi-Kumm, H. Olsson, *Scand. J. Haematol.* **1986**, *36*, 353–357; b) O. Zohar, M. Ikeda, H. Shinagawa, H. Inoue, H. Nakamura, D. Elbaum, D. L. Alkon, T. Yoshioka, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 82–89; c) B. B. Lowell, B. M. Spiegelman, *Nature* **2000**, *404*, 652–660; d) M. Guo, Y. Xu, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17863–17867.
- [2] a) K. M. McCabe, M. Hernandez, *Pediatr. Res.* **2010**, *67*, 469–475; b) K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 705.
- [3] a) J. Lee, N. A. Kotov, *Nano Today* **2007**, *2*, 48–51; b) D. Jaque, F. Vetrone, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4301–4326.
- [4] a) L. Martinez Maestro, E. Martín Rodríguez, F. Sanz-Rodríguez, M. C. Iglesias de La Cruz, A. Juarranz, R. Naccache, F. Vetrone, D. Jaque, J. A. Capobianco, J. García Solé, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 5109–5115; b) L. M. Maestro, C. Jacinto, U. R. Silva, F. Vetrone, J. A. Capobianco, D. Jaque, J. G. Solé, *Small* **2011**, *7*, 1774–1778; c) A. E. Albers, E. M. Chan, P. M. McBride, C. M. Ajo-Franklin, B. E. Cohen, B. A. Helms, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9565–9568.
- [5] a) H. S. Peng, M. I. J. Stich, J. B. Yu, L. N. Sun, L. H. Fischer, O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 716–719; b) F. Vetrone, R. Naccache, A. Zamarrón, A. Juarranz de La Fuente, F. Sanz-Rodríguez, L. Martínez Maestro, E. Martín Rodríguez, D. Jaque, J. García Solé, J. A. Capobianco, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3254–3258; c) L. H. Fischer, G. S. Harms, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4640–4645; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4546–4551.
- [6] C. Gota, K. Okabe, T. Funatsu, Y. Harada, S. Uchiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2766–2767.
- [7] J. M. Yang, H. Yang, L. W. Lin, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5067–5071.
- [8] a) L. Shang, S. Dong, G. U. Nienhaus, *Nano Today* **2011**, *6*, 401–418; b) Y. Lu, W. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3594–3623.
- [9] a) C.-C. Huang, C.-T. Chen, Y.-C. Shiang, Z.-H. Lin, H.-T. Chang, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 875–882; b) Y. Liu, K. Ai, X. Cheng, L. Huo, L. Lu, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 951–956; c) Y. Wang, Y. Wang, F. Zhou, P. Kim, Y. Xia, *Small* **2012**, *8*, 3769–3773.
- [10] a) H. M. A. Muhammed, P. Verma, S. Pal, R. Kumar, S. Paul, R. Omkumar, T. Pradeep, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10110–10120; b) C. Sun, H. Yang, Y. Yuan, X. Tian, L. Wang, Y. Guo, L. Xu, J. Lei, N. Gao, G. J. Anderson, X.-J. Liang, C. Chen, Y. Zhao, G. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8617–8624; c) L. Shang, N. Azadfar, F. Stockmar, W. Send, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G. U. Nienhaus, *Small* **2011**, *7*, 2614–2620; d) C. L. Liu, H. T. Wu, Y. H. Hsiao, C. W. Lai, C. W. Shih, Y. K. Peng, K. C. Tang, H. W. Chang, Y. C. Chien, J. K. Hsiao, J. T. Cheng, P. T. Chou, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7194–7198; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7056–7060.
- [11] a) Y. Wang, J. Chen, J. Irudayaraj, *ACS Nano* **2011**, *5*, 9718–9725; b) H. Chen, B. Li, X. Ren, S. Li, Y. Ma, S. Cui, Y. Gu, *Biomaterials* **2012**, *33*, 8461–8476.
- [12] L. Shang, L. Yang, F. Stockmar, R. Popescu, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G. U. Nienhaus, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4155–4160.
- [13] M. Baker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 957–962.
- [14] a) C. Baleizão, S. Nagl, S. M. Borisov, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, M. N. Berberan-Santos, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3643–3651; b) D. Cauzzi, R. Pattacini, M. Delferro, F. Dini, C. Di Natale, R. Paolesse, S. Bonacchi, M. Montalti, N. Zaccheroni, M. Calvaresi, F. Zerbetto, L. Prodi, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9800–9803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9662–9665.
- [15] a) J. M. Forward, D. Bohmann, J. P. Fackler, R. J. Staples, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6330–6336; b) J. Bomm, C. Günter, J. Stumpe, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 81–85; c) Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D. T. Leong, J. Y. Lee, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16662–16670.
- [16] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684.
- [17] L. Yang, L. Shang, G. U. Nienhaus, *Nanoscale* **2013**, *5*, 1537–1543.
- [18] L. Treuel, G. U. Nienhaus, *Biophys. Rev.* **2012**, *4*, 137–147.
- [19] a) C. Röcker, M. Pötzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 577–580; b) M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786; c) L. Shang, S. Brandholt, F. Stockmar, V. Trouillet, M. Bruns, G. U. Nienhaus, *Small* **2012**, *8*, 661–665.
- [20] a) M. Amelia, R. Flamini, L. Latterini, *Langmuir* **2010**, *26*, 10129–10134; b) E. Perevedentseva, N. Melnik, C. Y. Tsai, Y. C. Lin, M. Kazaryan, C. L. Cheng, *J. Appl. Phys.* **2011**, *109*, 034704; c) L. Shang, R. Dörlich, V. Trouillet, M. Bruns, G. U. Nienhaus, *Nano Res.* **2012**, *5*, 531–542.
- [21] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- [22] a) M. I. J. Stich, S. Nagl, O. S. Wolfbeis, U. Henne, M. Schaeferling, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1399–1406; b) J. Feng, K. Tian, D. Hu, S. Wang, S. Li, Y. Zeng, Y. Li, G. Yang, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8222–8226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8072–8076; c) J. S. Donner, S. A. Thompson, M. P. Kreuzer, G. Baffou, R. Quidant, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 2107–2111.
- [23] P. N. Hedde, G. U. Nienhaus, *Biophys. Rev.* **2010**, *2*, 147–158.