

# Maßgeschneiderte Aufwärtskonvertierungsnanopartikel zur Detektion von Proteinwechselwirkungen in lebenden Zellen

Christoph Drees, Athira Naduviledathu Raj, Rainer Kurre, Karin B. Busch, Markus Haase\* und Jacob Piehler\*

**Abstract:** Nanopartikel mit der Fähigkeit zur Aufwärtskonvertierung („upconversion nanoparticles“, UCNP) wandeln nahinfrarotes in sichtbares Licht bei wesentlich geringeren Anregungsleistungsdichten als in klassischer Zweiphotonenmikroskopie um. In dieser Studie haben wir < 50 nm UCNP für die Anwendung als effiziente Lanthanoid-basierte Donoren für den Resonanzenergietransfer (LRET) in lebenden Zellen entwickelt. Durch die Optimierung der Dotierung und Kern-Schale-Struktur für höhere Anregungsdichten konnten wir nicht nur verstärkte UCNP-Emission, sondern auch massiv erhöhte sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz beobachten. Für die Applikation von UCNP in komplexer biologischer Umgebung haben wir eine biokompatible Oberflächenfunktionalisierung mit einem Nanobody, der Grün fluoreszierendes Protein (GFP) erkennt, entwickelt. Hierdurch wurde die schnelle und spezifische Bindung an GFP-markierte Fusionsproteine in der äußeren Mitochondrienmembran sowie die Detektion von Proteininteraktionen mittels LRET erreicht.

**L**anthanoid-dotierte Aufwärtskonvertierungsnanopartikel („upconversion nanoparticles“, UCNP) wandeln zwei oder mehr Nahinfrarot(NIR)-Photonen in ein UV/Vis-Photon um.<sup>[1]</sup> Durch die langlebigen, metastabilen Energieniveaus der Lanthanoidionen können NIR-Photonen sequenziell von Aufwärtskonvertierungsmaterialien absorbiert werden. Daher ist Photonen aufwärtskonvertierung bei geringen bis moderaten Anregungsdichten deutlich effizienter als andere nichtlineare optische Prozesse wie Zweiphotonenfluoreszenz.<sup>[1b,n,2]</sup> Infolgedessen können UCNP mit unwesentlichem

Hintergrund angeregt werden, wodurch sich vielversprechende Besonderheiten für biologische Analysen ergeben.<sup>[1a,3]</sup>

Eine massive Einschränkung von UCNP ist ihre geringe Quantenausbeute verglichen mit dem Volumenmaterial. Diese ergibt sich aus Energieverlusten an Kristalldefekten und Energiemigration zur Oberfläche der Nanopartikel.<sup>[4]</sup> Ferner werden in der Regel geringe Konzentrationen der optisch aktiven Erbium- und Thuliumionen (z.B.  $[\text{Er}^{3+}] = 2\%$ ) verwendet, um Energieverluste durch Kreuzrelaxationen zu vermeiden, was zu geringen Absorptionsquerschnitten führt.<sup>[1b]</sup> Es existieren mehrere Lösungsansätze, wie die Nutzung von Wirtmaterialien mit niedrigen Phononenenergien,<sup>[1b]</sup> Kristallmodifikationen, diverse Schale-Konzepte<sup>[5]</sup> und Kopplung von Oberflächenplasmonen.<sup>[6]</sup> Hier haben wir deutlich höhere Dotierungen als traditionell üblich eingesetzt, weil gezeigt wurde, dass hohe Lanthanoidkonzentrationen massiv gesteigerte UCNP-Intensität bei erhöhten Anregungsdichten hervorrufen.<sup>[7]</sup>

Aufregende Möglichkeiten ergeben sich aus dem Lanthanoidresonanzenergietransfer (LRET) von UCNP auf Akzeptoren wie fluoreszierende Farbstoffe,<sup>[8]</sup> photodynamische Verbindungen<sup>[9]</sup> oder Goldnanopartikel.<sup>[10]</sup> Verglichen mit traditionellem Förster-Energietransfer (FRET) ermöglicht aufwärtskonvertierter LRET eine hochspezifische Detektion sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz,<sup>[11]</sup> die üblicherweise nicht direkt unter Bedingungen für UCNP auftritt. Entsprechend stellten zahlreiche Studien UCNP-basierte LRET-Biosensoren zur Detektion diverser molekularer Spezies vor.<sup>[11,12]</sup> Allerdings basiert eine Mehrheit dieser Sensoren auf der LRET-abhängigen Löschung von UCNP,<sup>[11]</sup> welche nicht robust genug für die Anwendung in Lebendzellmikroskopie ist: Durch die geringe Quantenausbeute stellen Nur-Kern-UCNP eher lichtschwache Sonden dar. Löschprozesse, die sich durch den Verlust von Emissionsintensität äußern, erschweren eine adäquate Detektion und Quantifizierung. Dagegen liefern Kern-Schale-UCNP eine wesentlich höhere Emissionsintensität, dies jedoch auf Kosten einer geringeren Energietransfereffizienz. Entsprechend existiert eine kritische Schalendicke für besten LRET-Ertrag.<sup>[13]</sup> Außerdem wird typischerweise eine relativ große Zahl an Akzeptormolekülen pro UCNP für eine effiziente Löschung benötigt, was in zellulären Anwendungen nicht erwünscht ist.


Die Anwendung von UCNP im Kontext lebender Zellen birgt weitere Herausforderungen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung,<sup>[14]</sup> welche für die Markierung von zytoplasmatischen Proteinen besonders hohe Ansprüche stellt. Um eine minimale Beeinträchtigung der konjugierten Proteine im

[\*] C. Drees, Prof. Dr. J. Piehler  
Abteilung für Biophysik  
Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück  
Barbarastraße 11, 49076 Osnabrück (Deutschland)  
E-Mail: piehler@uos.de

A. N. Raj, Prof. Dr. M. Haase  
Institut für Chemie Neuer Materialien  
Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück  
Barbarastraße 7, 49069 Osnabrück (Deutschland)  
E-Mail: markus.haase@uni-osnabrueck.de

Dr. R. Kurre  
Center for Advanced Light Microscopy  
Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück  
Barbarastraße 11, 49076 Osnabrück (Deutschland)

Prof. Dr. K. B. Busch  
Fachbereich Biologie, Universität Münster  
Schlossplatz 5, 48149 Münster (Deutschland)

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201603028> zu finden.

Zytoplasma zu gewährleisten, müssen die Nanopartikel klein gehalten werden (hydrodynamischer Durchmesser  $< 50$  nm).<sup>[15]</sup> Zur Bewältigung von unspezifischer Bindung an intrazelluläre Komponenten oder Erkennung durch metabolische Maschinerien<sup>[16]</sup> wird eine angemessene Oberflächenpassivierung benötigt, die nichtspezifische Wechselwirkungen stört, jedoch kolloidale Stabilität gewährleistet. Darüber hinaus erfordert die spezifische Anbindung an Zielproteine in komplexen zellulären Umgebungen bioorthogonale Funktionalisierungsstrategien. Bisher existieren nur wenige Beispiele für Lebendzellmarkierung mit UCNP, die Antigen-Antikörper-<sup>[17]</sup> und Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen<sup>[18]</sup> nutzen. Über Aufwärtskonvertierungs-basierten LRET (ucLRET) von spezifisch gebundenen UCNP zu fluoreszierenden Akzeptoren in lebenden Zellen ist bislang jedoch nichts berichtet worden.

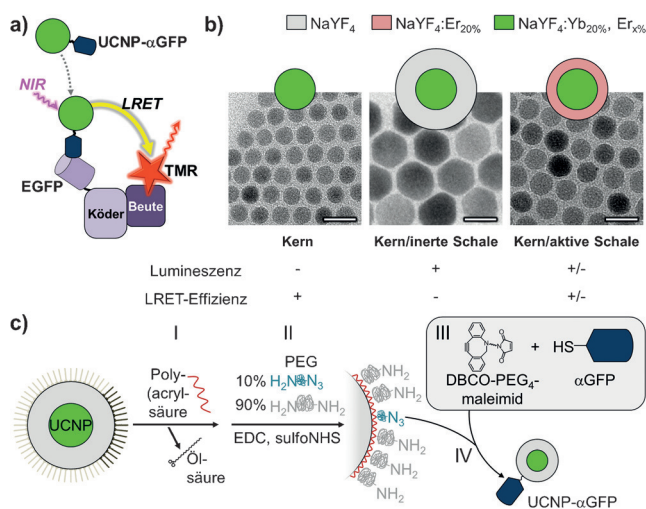
Hier haben wir diese Herausforderungen adressiert, mit dem Ziel, UCNP wie in Abbildung 1a dargestellt als nanoskopische Reporter zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen zu entwickeln. Zur minimalen Beeinträchtigung der Proteinfunktion innerhalb der Zelle haben wir unseren Blick auf UCNP-Durchmesser unter 30 nm gerichtet – Dimensionen im Bereich großer Protein-komplexe. Für die bessere Nutzung der photophysikalischen Eigenschaften der UCNP haben wir einen Aufbau für Lebendzellmikroskopie mit Dauerstrichanregung bei 978 nm mit Leistungsdichten bis zu  $20 \text{ kW cm}^{-2}$  implementiert (Abbildung S1a). Im Unterschied zur konventionellen Piko- oder Femtosekundenanregung mit einem Ti:Saphir-Laser rufen

diese Bedingungen keine anderen nichtlinear-optischen Phänomene hervor (Abbildung 1b) und gewährleisten die selektive Anregung des Akzeptors mittels LRET. Die Lebendzellproben wurden in eine Inkubationskammer (Abbildung S1a) montiert und in wässriger Pufferlösung immigriert. Ein Erhitzen der Proben durch die Absorption des Wassers bei 980 nm wurde durch kurze Belichtungszeiten (50 ms) vermieden.

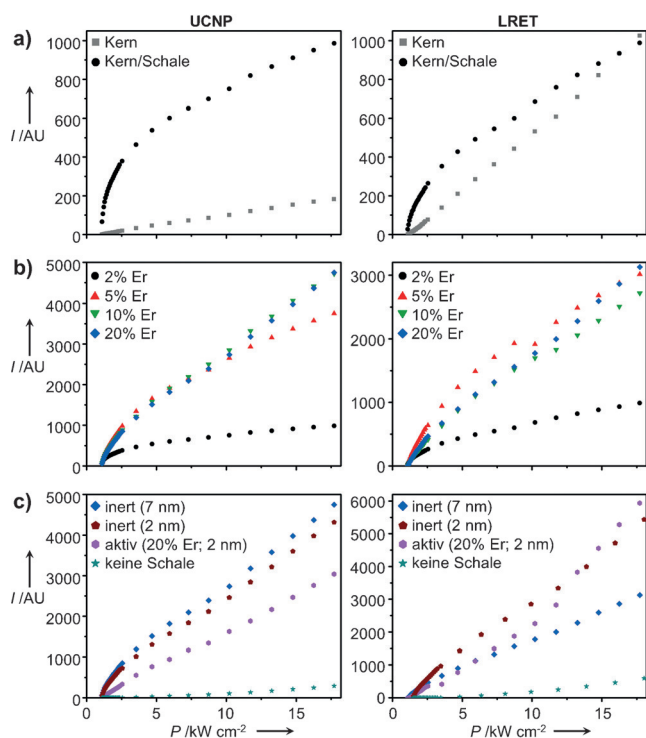
Um eine Balance zwischen UCNP-Emission und LRET-Effizienz bei derartig hohen Anregungsleistungsdichten zu erreichen, haben wir die Zusammensetzung der UCNP hinsichtlich Kern-Schale-Architekturen und Dotierungsdichten überdacht. Zunächst untersuchten wir systematisch den Einfluss einer inerten Schale, der  $\text{Er}^{3+}$ -Konzentration im Nanopartikelkern wie auch einer aktiven Schalenarchitektur (Abbildung 1b). Monodisperse hexagonale UCNP (Abbildung S2–S5) wurden wie vorher beschrieben synthetisiert<sup>[19]</sup> und durch Austausch von Ölsäureliganden auf der UCNP-Oberfläche gegen Polyacrylsäure (PAA) in Wasser solubilisiert (Abbildung 1c). Anschließend wurden die PAA-umhüllten UCNP mit PEG funktionalisiert, um die Erkennung durch intrazelluläre Abbaumaschinerien zu minimieren.<sup>[16]</sup> PEGylierte UCNP wurden spezifisch mittels Klick-Chemie und einem kurzen Vernetzer mit einem rekombinanten Nanobody gegen GFP funktionalisiert, um räumliche Nähe zum Nanopartikel zu gewährleisten (Abbildung 1c). Dieses ca. 10 kDa schwere Protein, abgeleitet von Lama-Antikörpern aus einer einzelnen schweren Kette bestehend, bindet äußerst schnell GFP-Fusionsproteine mit subnanomolarer Affinität.<sup>[20]</sup>

Um die photophysikalischen Eigenschaften von UCNP im Hinblick auf Helligkeit und Energietransfereffizienz zu ermitteln, haben wir einen oberflächenbasierten In-vitro-Test entwickelt. Negativ geladene, PAA-umhüllte UCNP wurden auf einen mit positiv geladenem Polyethylenimin (PEI) funktionalisierten Deckglas immobilisiert. PEI wurde zuvor mit Tetramethylrhodamin (TMR) gekuppelt, das als LRET-Akzeptor für die grüne Emission der UCNP ( $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ ;  $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ ; Abbildung S6) wirkt. Die TMR-Emission bei 978-nm-Anregung kann ausschließlich LRET zugeschrieben werden (Abbildung S7), da Zweiphotonenanregung nicht bei diesen Leistungsdichten erfolgt. Als Ausgangspunkt haben wir gängige Kern/inerte-Schale-UCNP ( $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}_{20\%}\text{Er}_{2\%}$ ,  $d_{\text{Kern}} = 11 \text{ nm}$ ;  $r_{\text{Schale}} = 7 \text{ nm}$ ) genommen, die zwei bis drei Größenordnung heller als das Nur-Kern-Pendant sind.<sup>[4a]</sup>

Bei Erhöhen der Anregungsleistung von 1 auf  $18 \text{ kW cm}^{-2}$  wurde ein erheblicher Anstieg der UCNP-Emission (ca.  $17 \times$ ) und LRET (ca.  $37 \times$ ) beobachtet (Abbildung 2a). Bei Leistungsdichten über  $2.5 \text{ kW cm}^{-2}$  nahm die Steigung der Kurve jedoch merklich ab. Dagegen stiegen sowohl UCNP-Emission als auch LRET von Nur-Kern-UCNP bis zu einer Anregungsleistung von  $18 \text{ kW cm}^{-2}$  linear an (Abbildung 2a). Unter diesen Bedingungen wurden ähnliche Niveaus von sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz verglichen mit Kern-Schale-Partikeln erhalten, während die UCNP-Emissionsintensität lediglich 1/5 betrug, was eine höhere LRET-Effizienz, wahrscheinlich durch größere Nähe zum Akzeptor in Abwesenheit einer Schale, bestätigte. Es ist anzumerken, dass



**Abbildung 1.** Konzepte und Strategien zur Entwicklung eines LRET-Reportersystems. (a) UCNP, mit einem Anti-GFP-Nanobody (aGFP) funktionalisiert, binden ortsspezifisch an ein EGFP-Köderfusionsprotein. Die Wechselwirkung mit einem akzeptormarkierten Beuteprotein wird mittels ucLRET-sensibilisierter Fluoreszenz detektiert. (b) Verschiedene Architekturen und vorhergesagte Eigenschaften der UCNP in dieser Studie. Cartoons und Transmissionselektronenmikrographen. Balken: 20 nm. (c) Biofunktionalisierung von UCNP einschließlich Solubilisierung in Polyacrylsäure (PAA) (I), PEGylierung mit einer Mischung aus homo- und heterobifunktionalem Polyethylenglykol (PEG) (II) und Konjugation mit Nanobodies mittels ortsspezifisch konjugiertem Dibenzylcyclooctin (DBCO; III) für die kupferfreie Klick-Reaktion mit Oberflächenaziden (IV).



**Abbildung 2.** Leistungsabhängigkeit der UCNP-Emission (links) und LRET (rechts) diverser UCNP-Spezies. (a) Vergleich von Kern- und Kern/inerte-Schale-UCNP. (b) Vergleich verschiedener Er<sup>3+</sup>-Konzentrationen im Kern- von Kern/inerte-Schale-UCNP. (c) Schalenvarianten. 20% Er<sup>3+</sup> im Kern. Falls nicht anders genannt: Kern:  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb<sub>20%</sub>,Er<sub>2%</sub> ( $d \approx 11$  nm), inerte Schale:  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> ( $r \approx 5$  nm). Die Daten wurden aus Mikroskopieexperimenten mit einem 978-nm-Dauerstrichlaser und Filtern für die grüne Emissionsbande der UCNP (500–570 nm) und LRET (593–604 nm) extrahiert. Aufgrund der experimentellen Einstellungen sind UCNP- und LRET-Kanal nicht vergleichbar.

sogar bei höchster Anregungsleistung kein signifikantes Aufheizen der Inkubationskammer zu beobachten war.

Um den Einfluss von Kreuzrelaxationen zu erforschen, wurden Kern-Schale-Nanopartikel mit verschiedenen Er<sup>3+</sup>-Konzentrationen von 2% bis zu 20% analysiert (Abbildung 2b). Im Unterschied zur leistungsabhängigen Sättigung der UCNP-Emission und des LRET von 2% Er<sup>3+</sup>-UCNP führten höhere Dotierungskonzentrationen zu einem wesentlich höheren, fast linearen Anstieg der UCNP-Emission und des LRET. Dadurch wurde, für 5% im Vergleich zu 2% Er<sup>3+</sup>, eine etwa 5-fach höhere Emissionsintensität und ein ungefähr 3-fach höheres LRET-Signal erreicht. Eine vergleichbare Verstärkung der UCNP-Emission und des LRET wurde für Partikel mit 10% und 20% Er<sup>3+</sup> beobachtet. Da die optischen Eigenschaften der UCNP von erhöhten Er<sup>3+</sup>-Konzentrationen profitierten, betrachteten wir die Kombination von 20% Er<sup>3+</sup>-UCNP mit einer dünnen Schale (2 nm), bestehend aus entweder inertem  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> oder dotiertem  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Er<sub>20%</sub> (Abbildung 1b). Wir spekulierten, dass die Aufwärtskonvertierung zwischen Yb<sup>3+</sup> und Er<sup>3+</sup> im Kern stattfinden könnte und dass im letzteren Fall die Energie mithilfe der Er<sup>3+</sup>-Ionen in der Schale zur Oberfläche migrieren könnte. UCNP mit einer dünnen inerten Schale

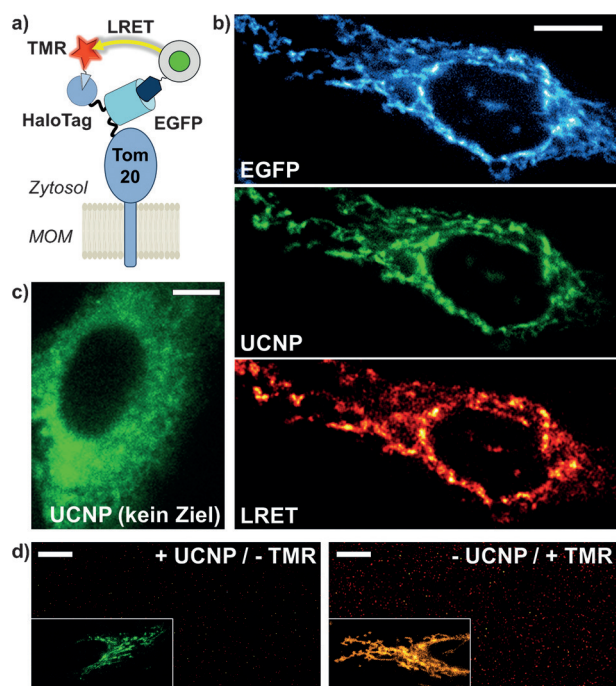
zeigten ähnliche Emissionsintensitäten wie Nanopartikel mit einer dicken Schale, jedoch zweifach verstärkten LRET (Abbildung 2c).

Die Emission der UCNP mit Er<sup>3+</sup>-dotierten Schale war etwa 30% schwächer als die der Partikel mit inerte Schale, vermutlich aufgrund von Oberflächenlöschung. Erstaunlicherweise war die Leistungsabhängigkeit des LRET der Aktivschale-UCNP nicht-linear (Exponent  $\approx 1.6$ ) und erreichte ein ähnliches Niveau wie UCNP mit einer inerten Schale bei 18 kW cm<sup>-2</sup> (Abbildung 2c). Emission und LRET von Nur-Kern- $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb<sub>20%</sub>,Er<sub>20%</sub>-UCNP waren signifikant verringert im Vergleich zu allen anderen Systemen, was auf eine starke Energiemigration zur und Lösungsprozesse an der Oberfläche hindeutet (Abbildung 2c). Zusammengekommen verstärkte die Kombination aus erhöhter Anregungsleistungsdichte und dünnenschaligen  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb<sub>20%</sub>,Er<sub>20%</sub>/ $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>-Nanopartikeln die UCNP-Emission und LRET um mehr als zwei Größenordnungen verglichen mit Standard- $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb<sub>20%</sub>,Er<sub>2%</sub>/ $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>-Kern-Schale-Partikeln bei geringen Leistungsdichten.

Auf der Basis dieser verbesserten Sonden haben wir biokompatible UCNP mit Anti-GFP-Nanobodies (UCNP- $\alpha$ GFP, <50 nm; Abbildung 1c) funktionalisiert und ihre Anbindung an GFP-Fusionsproteine in lebenden Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden biofunktionalisierte UCNP in HeLa-Zellen mikroinjiziert, die stabil Tom20, fusioniert an monomeres EGFP und HaloTag<sup>[21]</sup> (Tom20-EGFP-HaloTag) exprimierten. Tom20 ist eine Untereinheit der heterooligomeren Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex)<sup>[22]</sup> und dient als Marker für das mitochondriale Netzwerk, welches durch seine charakteristische Form einen robusten Nachweis der UCNP-Bindequalität erlaubt. Durch optionale Markierung des HaloTag mit TMR-HaloTag-Ligand-Konjugaten war Tom20-EGFP-HaloTag geeignet, UCNP-basierten LRET auf TMR als Akzeptor zu untersuchen (Abbildung 3a).

Nach der Mikroinjektion kolokalisierten UCNP- $\alpha$ GFP quantitativ mit der EGFP-Fluoreszenz von Tom20-EGFP-HaloTag im mitochondrialen Netzwerk (Abbildung 3b). In Abwesenheit der UCNP war kein Signal bei 978-nm-Anregung detektierbar (Abbildung S8). Dagegen waren UCNP- $\alpha$ GFP homogen in HeLa-Zellen ohne GFP-markiertes Zielprotein verteilt. Diese Beobachtungen bestätigten die freie Diffusion von funktionalisierten UCNP innerhalb der Zelle und eine hochspezifische subzelluläre Bindung (Abbildung 3c). Das ausgedehnte mitochondriale Netzwerk, das sehr anfällig gegen Stress, d.h. potenzielles lokales Erhitzen durch UCNP-Anregung, ist, blieb während der Bindung und Analyse der UCNP erhalten. Diese Ergebnisse deuteten auf volle Zellviabilität und minimalen Einfluss der Organellfunktion durch die funktionalisierten UCNP und deren Anregung bei hohen Leistungsdichten hin. Der Vergleich mit den In-vitro-UCNP-Monoschichtexperimenten ergab einen Schätzwert von 1–10 gebundenen Partikeln pro  $\mu$ m<sup>2</sup> an der äußeren Mitochondrienmembran. Nach der Bindung der UCNP- $\alpha$ GFP wurde ein deutlicher uLRET auf TMR-markiertes Tom20-EGFP-HaloTag detektiert (Abbildung 3b). Dagegen ergab sich kein TMR-Signal über dem Detektorrauschen, wenn entweder UCNP oder TMR nicht anwesend



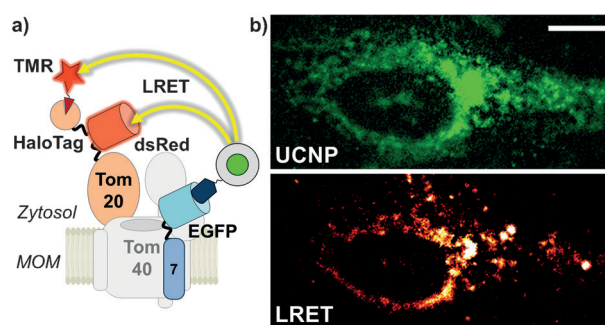


**Abbildung 3.** Selektive Bindung von UCNP-aGFP als Reporter in lebenden Zellen. (a) Cartoon zur Untersuchung: Das Fusionsprotein Tom20-EGFP-HaloTag, lokalisiert in der äußeren Mitochondrienmembran (MOM), ermöglicht die Bindung von UCNP-aGFP mittels EGFP und eines optionalen LRET-Akzeptors (TMR) durch Markierung des HaloTag mit TMR. (b) Selektive Bindung von UCNP-aGFP nach Injektion in HeLa-Zellen, die stabil Tom20-EGFP-HaloTag, markiert mit TMR, exprimieren. Oben: EGFP-Fluoreszenz bei Anregung mit 488 nm. Mitte: UCNP-Emission (500–570 nm) bei Anregung mit 978 nm. Unten: sensibilisierte TMR-Emission (593–607 nm) bei Anregung mit 978 nm. (c) UCNP-aGFP nach Injektion in HeLa-Zellen, die kein GFP-Fusionsprotein exprimieren. (d) Keine sensibilisierte TMR-Emission (593–607 nm) bei Anregung mit 978 nm in Abwesenheit von TMR (links) oder UCNP (rechts). Einsätze: UCNP-Emission bei Anregung mit 978 nm (links) und TMR-Emission bei Anregung mit 520–550 nm (rechts). Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

waren, wodurch die Selektivität von ucLRET unterstrichen wird (Abbildung 3d). Konventionelle FRET-Experimente, die an dem gleichen System, jedoch ohne UCNP, durchgeführt wurden, bekräftigten die einzigartige Selektivität von ucLRET in Bezug auf die Akzeptoremission (Abbildung S9).

Als Nachweis für die Verwendbarkeit von UCNP als nanoskopische Sonden für Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels LRET in lebenden Zellen untersuchten wir die Wechselwirkungen zwischen Tom20 und Tom7, das eine andere Untereinheit des TOM-Komplexes ist. Da beide Proteine nicht unmittelbar miteinander wechselwirken, aber mit Tom40<sup>[23]</sup> assoziiert und durch dieses räumlich voneinander getrennt sind (Abbildung 4a), ist der Abstand zwischen Tom20 und Tom7 zu groß für die eindeutige Detektion mit konventionellen FRET-Sonden.

Tom7, an monomeres EGFP fusioniert, wurde mit Tom20-dsRed-HaloTag in HeLa-Zellen koexprimiert und mit UCNP-aGFP bzw. TMR markiert (Abbildung 4a). Die spezifische Bindung von UCNP-aGFP an EGFP-Tom7 wurde durch Kolokalisation mit dem mitochondrialen Netzwerk



**Abbildung 4.** Detektion weit voneinander entfernter Wechselwirkungspartner. (a) UCNP-aGFP wurden an EGFP-Tom7 in der äußeren Mitochondrienmembran angeheftet, das mit Tom20-dsRed-HaloTag, markiert mit TMR, koexprimiert worden war. (b) Visualisierung der indirekten Tom7-Tom20-Wechselwirkung durch ucLRET. Oben: UCNP-Emission (500–570 nm) bei Anregung mit 978 nm. Unten: sensibilisierte TMR-Emission (593–607 nm) bei Anregung mit 978 nm. Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

bestätigt (Abbildung S10). Bemerkenswerterweise wurde LRET-sensibilisierte TMR-Emission in dieser Untersuchung detektiert (Abbildung 4b) und somit etabliert, dass auch indirekte Wechselwirkungen über größere Abstände visualisiert werden können.

Das Verfolgen und die Manipulation von Proteinwechselwirkungen in lebenden Zellen, ohne biologische Funktionen zu beeinflussen, ist eine aktuelle Herausforderung in der molekularen Zellbiologie.<sup>[24]</sup> Nanopartikelbasierte Ansätze haben in diesem Feld großes Potenzial, doch es bedarf noch großer Anstrengungen, um maßgeschneiderte physikochemische und biologische Eigenschaften zu erreichen und damit zelluläre Fragestellungen mit minimaler Beeinflussung beantworten zu können. Hier konnten wir UCNP als LRET-Reportersonden für Proteinwechselwirkungen im Zytoplasma lebender Zellen entwickeln. Dieser Erfolg wurde durch Ausnutzen der speziellen photophysikalischen Eigenschaften von UCNP bei erhöhter Anregungsleistungsdichte ermöglicht. Durch die Steigerung der Dotierungskonzentration und eine optimierte Schalendicke konnten wir die sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz um zwei Größenordnungen verstärken. Daher konnten Partikel mit Durchmessern unter 30 nm verwendet werden, was eine ungehinderte Mobilität im Zytoplasma und einen reduzierten Einfluss durch Proteinvernetzung sicherstellt. Eine sehr dünne biokompatible Oberflächenfunktionalisierung in Kombination mit schneller und effizienter Anbindung über einen Anti-GFP-Nanobody ermöglicht vielseitige Anwendungen dieser UCNP als nanoskopische Reporter von Proteinwechselwirkungen in lebenden Zellen. Die gut kontrollierte, präzise Anbindung der UCNP im Zytoplasma ohne Beeinträchtigung der Zellviabilität konnten wir experimentell bestätigen. So gelang es uns, direkte und indirekte Protein-Protein-Wechselwirkungen durch aufwärtskonvertierten LRET in lebenden Zellen zu detektieren. Im Unterschied zu konventionellen FRET-Reportern ergab die Detektion von sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz in ucLRET keinen wesentlichen Hintergrund. Daher können In-situ-Analysen zur Nähe von Molekülen mit hoher Genauigkeit erreicht werden. Dies bietet enormes Potenzial für

die Aufklärung der räumlich-zeitlichen Organisation von Proteinkomplexen in Zellen.

Die vorgestellten Experimente eröffnen spannende Möglichkeiten für neuartige bioanalytische Anwendungen von UCNPs, z. B. für die nichtinvasive photochemische Manipulation durch uLRET. Eine weitere substanzielle Optimierung von UCNPs nach dem Vorbild der Strategien dieser Arbeit wird die Anwendung von deutlich kleineren UCNPs ermöglichen. Auf diese Weise können eine noch geringere Beeinträchtigung von Proteinfunktion, ein leichteres Einbringen der Partikel ins Zytosol und eine höhere räumliche Auflösung gewährleistet werden.

## Danksagung

Wir danken Gabriele Hikade, Hella Kenneweg, Junel Sotolongo Bellon und Wladislaw Kohl für technische Assistenz und Domenik Liße, Christian Richter, Jörg Nordmann, Thorben Rinkel und Changjiang You für nützliche Ratschläge. Diese Projekt wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 944) und von der Europäischen Kommission (FET-open 686841 – MAGNEURON).

**Stichwörter:** Aufwärtskonvertierung · Biosensoren · LRET · Nanopartikel · TOM-Komplex

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 11668–11672  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 11840–11845

- [1] a) F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen, X. Liu, *Analyst* **2010**, 135, 1839–1854; b) M. Haase, H. Schafer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5808–5829; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 5928–5950; c) X. Liu, C. H. Yan, J. A. Capobianco, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1299–1301; d) F. Auzel, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 139–173; e) B. Zhou, B. Shi, D. Jin, X. Liu, *Nat. Nanotechnol.* **2015**, 10, 924–936; f) H. H. Gorris, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 3584–3600; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 3668–3686; g) F. Wang, X. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 976–989; h) D. K. Chatterjee, M. K. Gnanasammandhan, Y. Zhang, *Small* **2010**, 6, 2781–2795; i) D. Vennerberg, Z. Lin, *Sci. Adv. Mater.* **2011**, 3, 26–40; j) J. F. Suyver, A. Aebischer, D. Biner, P. Gerner, J. Grimm, S. Heer, K. W. Krämer, C. Reinhard, H. U. Güdel, *Opt. Mater.* **2005**, 27, 1111–1130; k) B. M. van der Ende, L. Aarts, A. Meijerink, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 11081–11095; l) A. Gnach, A. Bednarkiewicz, *Nano Today* **2012**, 7, 532–563; m) C. T. Xu, Q. Zhan, H. Liu, G. Somesfalean, J. Qian, S. He, S. Andersson-Engels, *Laser Photonics Rev.* **2013**, 7, 663–697; n) G. Chen, H. Agren, T. Y. Ohulchanskyy, P. N. Prasad, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1680–1713.
- [2] a) D. R. Gamelin, H. U. Güdel, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 235–242; b) F. E. Auzel, *Proc. IEEE* **1973**, 61, 758–786.
- [3] H. S. Mader, P. Kele, S. M. Saleh, O. S. Wolfbeis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 582–596.
- [4] a) F. Wang, J. Wang, X. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7456–7460; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 7618–7622; b) J.-C. Boyer, F. C. J. M. van Veggel, *Nanoscale* **2010**, 2, 1417–1419.
- [5] a) F. Zhang, R. Che, X. Li, C. Yao, J. Yang, D. Shen, P. Hu, W. Li, D. Zhao, *Nano Lett.* **2012**, 12, 2852–2858; b) X. Liu, X. Kong, Y. Zhang, L. Tu, Y. Wang, Q. Zeng, C. Li, Z. Shi, H. Zhang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 11957–11959; c) H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 13721–13729; d) Y. Wang, L. Tu, J. Zhao, Y. Sun, X. Kong, H. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 7164–7169; e) N. J. J. Johnson, A. Korinek, C. Dong, F. C. J. M. van Veggel, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 11068–11071; f) F. Vetrone, R. Naccache, V. Mahalingam, C. G. Morgan, J. A. Capobianco, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 2924–2929; g) D. Yang, C. Li, G. Li, M. Shang, X. Kang, J. Lin, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 5923–5927; h) B. Voss, M. Haase, *ACS Nano* **2013**, 7, 11242–11254; i) S. Dühnen, M. Haase, *Chem. Mater.* **2015**, 27, 8375–8386; j) T. Rinkel, A. N. Raj, S. Dühnen, M. Haase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1164–1167; *Angew. Chem.* **2016**, 128, 1177–1181.
- [6] a) S. Han, R. Deng, X. Xie, X. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 11702–11715; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 11892–11906; b) S. Schietinger, T. Aichele, H. Q. Wang, T. Nann, O. Benson, *Nano Lett.* **2010**, 10, 134–138; c) H. Zhang, Y. Li, I. A. Ivanov, Y. Qu, Y. Huang, X. Duan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2865–2868; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2927–2930; d) M. Fujii, T. Nakano, K. Imakita, S. Hayashi, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 1113–1120; e) W. Feng, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *Chem. Commun.* **2009**, 4393–4395; f) P. Yuan, Y. H. Lee, M. K. Gnanasammandhan, Z. Guan, Y. Zhang, Q.-H. Xu, *Nanoscale* **2012**, 4, 5132–5137; g) F. Zhang, G. B. Braun, Y. Shi, Y. Zhang, X. Sun, N. O. Reich, D. Zhao, G. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2850–2851.
- [7] a) D. J. Gargas, E. M. Chan, A. D. Ostrowski, S. Aloni, M. V. Altoe, E. S. Barnard, B. Sani, J. J. Urban, D. J. Milliron, B. E. Cohen, P. J. Schuck, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, 9, 300–305; b) J. Zhao, D. Jin, E. P. Scharfner, Y. Lu, Y. Liu, A. V. Zvyagin, L. Zhang, J. M. Dawes, P. Xi, J. A. Piper, E. M. Goldys, T. M. Monro, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, 8, 729–734.
- [8] Y. X. Wu, X. B. Zhang, D. L. Zhang, C. C. Zhang, J. B. Li, Y. Wu, Z. L. Song, R. Q. Yu, W. Tan, *Anal. Chem.* **2016**, 88, 1639–1646.
- [9] a) X. Wang, K. Liu, G. Yang, L. Cheng, L. He, Y. Liu, Y. Li, L. Guo, Z. Liu, *Nanoscale* **2014**, 6, 9198–9205; b) Z. Zhao, Y. Han, C. Lin, D. Hu, F. Wang, X. Chen, Z. Chen, N. Zheng, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 830–837; c) D. K. Chatterjee, L. S. Fong, Y. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1627–1637.
- [10] a) H. Chen, F. Yuan, S. Wang, J. Xu, Y. Zhang, L. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 48, 19–25; b) L. Wang, R. Yan, Z. Huo, L. Wang, J. Zeng, J. Bao, X. Wang, Q. Peng, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6054–6057; *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6208–6211.
- [11] W. Zheng, P. Huang, D. Tu, E. Ma, H. Zhu, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1379–1415.
- [12] a) W. W. Ye, M. K. Tsang, X. Liu, M. Yang, J. Hao, *Small* **2014**, 10, 2390–2397; b) S. Zhang, J. Wang, W. Xu, B. T. Chen, W. Yu, L. Xu, H. W. Song, *J. Lumin.* **2014**, 147, 278–283; c) M. Wang, W. Hou, C.-C. Mi, W.-X. Wang, Z.-R. Xu, H.-H. Teng, C.-B. Mao, S.-K. Xu, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8783–8789; d) M. K. Tsang, W. Ye, G. Wang, J. Li, M. Yang, J. Hao, *ACS Nano* **2016**, 10, 598–605.
- [13] Y. Wang, K. Liu, X. M. Liu, K. Dohnalova, T. Gregorkiewicz, X. G. Kong, M. C. G. Aalders, W. J. Buma, H. Zhang, *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, 2, 2083–2088.
- [14] A. Sedlmeier, H. H. Gorris, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1526–1560.
- [15] F. Etoc, C. Vicario, D. Lisse, J. M. Siaugue, J. Piehler, M. Coppey, M. Dahan, *Nano Lett.* **2015**, 15, 3487–3494.
- [16] D. Lisse, C. P. Richter, C. Drees, O. Birkholz, C. You, E. Rampazzo, J. Piehler, *Nano Lett.* **2014**, 14, 2189–2195.
- [17] M. Wang, C.-C. Mi, W.-X. Wang, C.-H. Liu, Y.-F. Wu, Z.-R. Xu, C.-B. Mao, S.-K. Xu, *ACS Nano* **2009**, 3, 1580–1586.
- [18] a) K. Y. Lee, E. Seow, Y. Zhang, Y. C. Lim, *Biomaterials* **2013**, 34, 4860–4871; b) C. Yao, C. Wei, Z. Huang, Y. Lu, A. M. El-Toni, D. Ju, X. Zhang, W. Wang, F. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8(11), 6935–6943; c) L. L. Li, R. Zhang, L. Yin, K. Zheng, W. Qin, P. R. Selvin, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6121–6125; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 6225–6229.

- [19] a) Y. Wei, F. Lu, X. Zhang, D. Chen, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5733–5737; b) J. Nordmann, B. Voß, R. Komban, K. Kömpe, A. N. Raj, T. Rinkel, S. Dühnen, M. Haase, *Z. Phys. Chem.* **2015**, *229*, 247.
- [20] A. Kirchhofer, J. Helma, K. Schmidthals, C. Frauer, S. Cui, A. Karcher, M. Pellis, S. Muyldermans, C. S. Casas-Delucchi, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, K. P. Hopfner, U. Rothbauer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 133–138.
- [21] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382.
- [22] J. Dudek, P. Rehling, M. van der Laan, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 274–285.
- [23] T. Shiota, K. Imai, J. Qiu, V. L. Hewitt, K. Tan, H.-H. Shen, N. Sakiyama, Y. Fukasawa, S. Hayat, M. Kamiya, A. Elofsson, K. Tomii, P. Horton, N. Wiedemann, N. Pfanner, T. Lithgow, T. Endo, *Science* **2015**, *349*, 1544–1548.
- [24] J. Piehler, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *24*, 54–62.
- Eingegangen am 28. März 2016,  
veränderte Fassung am 29. Juni 2016  
Online veröffentlicht am 11. August 2016
-