

## Hochauflösende Lebendzellmikroskopie und Mikrofluidik- unterstützte Zelltransduktion

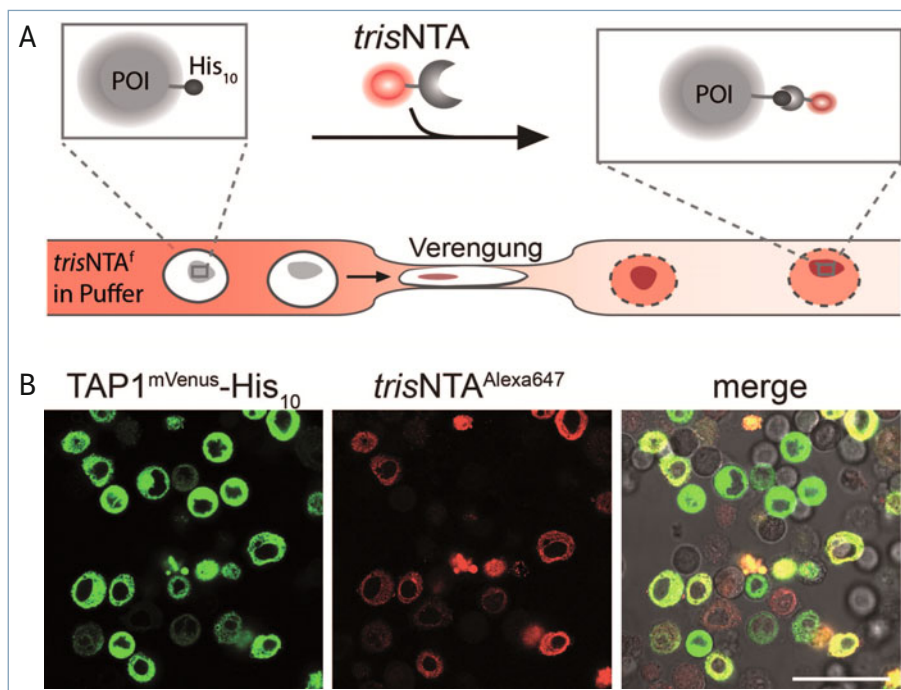
# Selektive Proteinmarkierung mit Nano- meterpräzision in lebenden Zellen

RALPH WIENEKE

INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, BIOCENTER, UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

Many dynamic biological processes are regulated by protein-protein interactions and protein localization. Experimental techniques and tools with high precision are required to gain a deeper understanding of biological processes. Microfluidic cell squeezing facilitated the high-throughput labeling of proteins by high-affinity probes and nanobodies. The method combines target-specific tracing of proteins with the fine-tuned delivery of nanomolar concentrations and allows the live-cell super-resolution microscopy.

DOI: 10.1007/s12268-019-1002-5  
© Springer-Verlag 2019

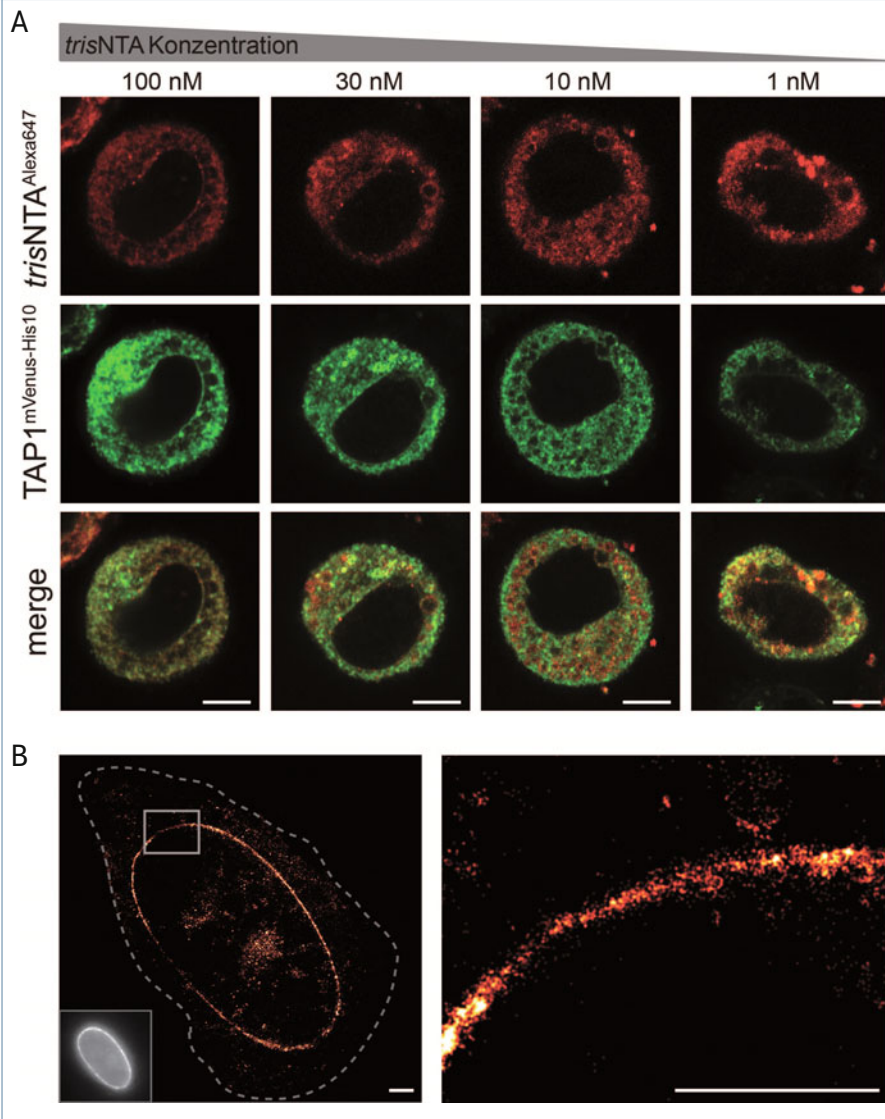


▲ **Abb. 1:** Proteinmarkierung für die Lebendzellmarkierung. **A,** Einschleusung von Fluorophorkonjugaten in lebende Zellen durch *cell squeezing*. Zur Einbringung des Cargos (hier: *trisNTA*-Fluorophorkonjugate) werden Zellen durch mikrometergroße Verengungen eines Mikrofluidikchips gepresst. Der Durchfluss durch die Kapillare verursacht die Bildung von transienten Poren in der Plasmamembran und ermöglicht die passive Diffusion der Probe ins Cytosol. Das Zielprotein (POI, *protein of interest*; hier: His-Tag-Protein) kann selektiv von der Probe markiert werden. **B,** Lebendzellmarkierung im Hochdurchsatz von transient transfizierten HeLa-Zellen, die für ein His-Tag-markiertes Protein codieren, mittels *trisNTA*-Fluorophor-Interaktion und visualisiert nach *cell squeezing* durch Laser-Scanning-Mikroskopie. Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$  (B).

■ Protein-Protein-Interaktionen sind eine fundamentale Antriebskraft von biologischen Prozessen. Die räumliche und zeitliche Kontrolle der Proteinlokalisierung ist dabei ein wichtiger Zellmechanismus, um Signalwege zu regulieren. Um verbesserte Einblicke in biologische Mechanismen zu bekommen, ist eine direkte Beobachtung von intrazellulären Prozessen essenziell. Für die Analyse komplexer biologischer Systeme sind experimentelle Werkzeuge wichtig, die die Proteinlokalisierung mit höchster Präzision und Genauigkeit wiedergeben. Weitverbreitet sind fluoreszenzbasierte Mikroskopietechniken. Diese erfordern Verfahren, mit deren Hilfe die Fluoreszenzprobe bzw. -sonde in das System spezifisch eingebracht werden kann. Eine Strategie zur Proteinverfolgung ist die Fusion mit autofluoreszierenden Proteinen oder sich selbst markierenden Tags (z. B. SNAP-Tag etc.), die selektiv mit Fluorophoren ausgestattet werden können. Organische Fluorophore haben im Vergleich zu autofluoreszierenden Proteinen erhöhte Photostabilitäten und Quantenausbeuten, allerdings ist die selektive und zielgerichtete Proteinanbringung wie auch deren unmittelbare Einschleusung in Zellen schwierig. Die Echtzeitverfolgung von intrazellulären Molekülen birgt daher zwei wesentliche Herausforderungen: (1) die Entwicklung von selektiven Proteinmarkierungsstrategien und (2) die effiziente Zelltransduktion. Bei der Lebendzellmikroskopie sind Methoden vielversprechend, die einen hohen Durchsatz und eine hohe Effizienz für die In-Zell-Markierung aufweisen und die für die hochauflösende Mikroskopie zugänglich sind. Minimale Protein-Tags und Proteinmarkierungen auf endogenem Level sollen dabei den Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen und Dynamiken so gering wie möglich halten.

### Zelltransduktion im Hochdurchsatz durch mechanische Membrandeformation

Eine Haupteinschränkung von Proteinmarkierungsstrategien ist, dass die verwendeten



▲ **Abb. 2:** Kontrollierte Cargoeinschleusung und hochauflösende Lebendzellmikroskopie. **A**, einstellbare und kontrollierbare Markierung von His-Tag-Proteinen durch Screening der Reporterkonzentration. Sogar beim *cell squeezing* von 1 nM *trisNTA*-Probe wurde eine hohe Markierungsdichte erhalten. **B**, rekonstruiertes dSTORM-Bild von His-Tag-Lamin-A, markiert mit 100 nM *trisNTA*-ATTO655 in einer lebenden HeLa-Kyoto-Zelle. Eine erhöhte Auflösung ( $< 40$  nm) wurde durch dSTORM-Bildgebung in lebenden Zellen (links und Vergrößerung rechts) im Vergleich zum Weitfeldbild (linke Ecke, unten) erhalten. Die Aufnahmen erfolgten per Laser-Scanning-Mikroskopie (A) oder dSTORM (B) eine Stunde nach dem *cell squeezing*. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m (A); 2  $\mu$ m (B).

Proben oftmals nicht zellpermeabel sind, was wiederum ihre Anwendung auf extrazelluläre Proteine oder fixierte und permeabilisierte Zellen einschränkt. Das intrazelluläre Einbringen von Reportergruppen ist deshalb ein Schlüsselschritt für die Erforschung von Zelldynamiken. Ideale Eigenschaften für Zelltransduktionssysteme sind eine minimale Störung der Zelle, Skalierbarkeit, Zelltyp- und Materialunabhängigkeit, eine präzise Dosierung sowie geringe Kosten.

Die verbesserte Präzision von modernen Mikroproduktionstechniken hat neue mechanische Zellmanipulationsmöglichkeiten erschlossen. Beispiele sind das Zellkomprimieren (*cell squeezing*), Nanonadeln und das Bersten von Blasen in Kavitäten (*exploding*

*cavitation bubbles*) [1]. Das Zellkomprimieren basiert auf der schnellen Deformation von Zellen beim Durchlaufen von mikrometergroßen Kapillaren innerhalb eines Mikrofluidikchips (**Abb. 1A**, [2]). Die Verengungen sind ein Drittel bis halb so groß wie der Zelldurchmesser (6–10  $\mu$ m). Mithilfe extern angelegter Drücke ( $\sim 30$  psi) werden die Zellen mechanisch durch die Verengungen gepresst (*squeezed*), und durch die viskoelastische Deformation der Zellmembran wird eine transiente Zellpermeabilisierung erreicht. Dies ermöglicht die schnelle passive Aufnahme von Proben in das Zellinnere durch Mikroöffnungen in der Plasmamembran, die anschließend durch zellintrinsische Reparaturmechanismen wieder verschlossen werden.

Das diffusionsbestimmte Einschleusen einer Vielzahl von Cargos einschließlich Proteinen, Nukleinsäuren, Quantenpunkten (*quantum dots*), Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes*) und anderen Nanomaterialien konnte bereits gezeigt werden [3–5]. Stärken des *cell squeezing* sind die Einfachheit der Mikrofluidikvorrichtung, die ohne bewegliche Teile oder eine externe Energieversorgung auskommt, und dass die Transduktion unabhängig von der Cargobeschaffenheit (Ladung, Größe, Hydrophobizität) ist. Die Technologie hat sowohl Anwendbarkeit bei einer Vielzahl von Zelltypen mit Durchsätzen von bis zu einer Million Zellen pro Sekunde wie auch eine hohe Transduktionseffizienz gezeigt. In der Lebendzellmikroskopie hat das Zellkomprimieren Anwendung gefunden, da es das Einschleusen von kleinen Proteininteraktionspaaren und Antikörperfragmenten im Hochdurchsatz erlaubt [6, 7]. In Verbindung mit der präzisen Einstellung der intrazellulären effektiven Probenkonzentration im nanomolaren Bereich konnte so ein verbessertes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erhalten werden.

#### Hochaffine und selektive Proteinmarkierung durch ein minimalistisches Interaktionspaar

Proteinmarkierungsstrategien erfordern eine hohe Spezifität, eine schnelle und effiziente Anbringung der fluoreszierenden Probe bei geringen Konzentrationen sowie Biokompatibilität unter physiologischen Bedingungen. Generische Methoden, die sich nicht auf die Proteinfunktion, -dynamik oder -lokalisierung auswirken, sind kritisch für die Untersuchung und Visualisierung von Proteinen in lebenden Zellen. Ein attraktives Markierungssystem basiert auf dem multivalenten Analogon von *N*-Nitrilotriessigsäure (*trisNTA*) und einem genetisch codierten His-Tag. Dabei ermöglicht *trisNTA* die ortsspezifische, stöchiometrische und reversible Markierung von His-markierten Proteinen mit (sub-)nanomolarer Affinität ( $K_d \sim 10$  nM) [8]. Das *trisNTA*-His-Tag-Interaktionspaar wurde bereits für die Proteinmarkierung *in vitro* und in der hochauflösenden Mikroskopie eingesetzt, eine weitere Herausforderung war die Anwendung in der Lebendzellmikroskopie [9]. Um eine effiziente Zelleinbringung im Hochdurchsatz zu gewährleisten, wurde das Zellkomprimieren herangezogen. Verschiedene Säugetierzelllinien wurden zuerst mit unterschiedlichen Plasmiden transient transfiziert, die für His-Tag-markierte Proteine mit diver-

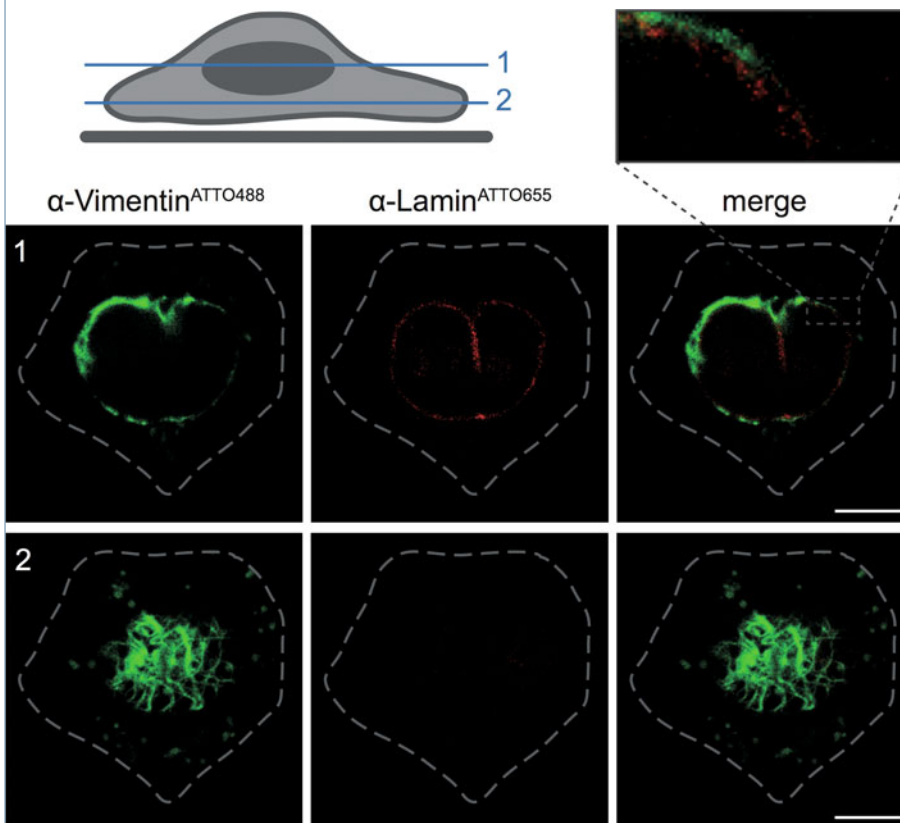
sen subzellulären Lokalisationen codieren. Nachfolgend wurden die Zellen in Gegenwart von nanomolaren *tris*NTA-Konzentrationen (100–300 nM) durch den Mikrochip gedrückt (*squeezed*, **Abb. 1A**) und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) untersucht [7]. Bereits bei subnanomolaren Konzentrationen von *tris*NTA ließen sich die Zielproteine mit hoher Präzision und geringer Hintergrundfluoreszenz visualisieren. Charakteristisch waren eine effiziente *tris*NTA-Aufnahme (bis zu 80 Prozent) und hohe Zellüberlebensraten (> 90 Prozent). In lebenden Zellen resultierte die Proteinmarkierung in sehr hohen Markierungsdichten, was an sehr guten Ko-Lokalisationen zwischen His-Tag-Protein und *tris*NTA-Probe ersichtlich war (Pearson-Koeffizienten:  $r > 0,80$ ). Eine starke Korrelation zwischen dem Expressionslevel der His-Tag-Proteine und *tris*NTA wurde beobachtet (**Abb. 1B**). Die *tris*NTA-Aufnahme war unabhängig von der Zelllinie (HEK293T, HeLa, CHO-K1 etc.), und die intrazelluläre His-Tag-Markierung war in hohem Maße reproduzierbar ( $n > 20$ ). Hervorzuheben ist, dass die Zelltransduktion bereits in Gegenwart von nur 1 nM *tris*NTA sehr effizient war und auch hier eine spezifische Markierung des His-Tag-markierten Proteins erreicht wurde (**Abb. 2A**). Die genaue Bestimmung der intrazellulären Probenkonzentration ergab, dass etwa ein Drittel des eingesetzten *tris*NTAs (100 nM) effektiv in das Zellinnere transferiert wurde, was die hohe His-Tag-Sensitivität der *tris*NTA-Probe in der dichten cytosolischen Umgebung unterstreicht. Die hochaffine und stöchiometrische *tris*NTA/His-Tag-Interaktion und insbesondere die kleine Größe beider Verbindungen bringen Fluorophore sehr nah an das Zielprotein und sind vorteilhaft für hochauflösende Mikroskopietechniken. Das Zellkomprimieren wurde ausgenutzt, um eine präzise Anpassung und Regulierung der intrazellulären *tris*NTA-Konzentration zu erreichen und somit signifikant das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu verbessern. So konnte durch Markierung von Lamin A mithilfe des minimalen *tris*NTA/His-Tag-Paares die Kernhülle via hochauflösender Lebendzellmikroskopie (hier: *direct optical reconstruction microscopy*, dSTORM) sichtbar gemacht und Auflösungen von bis zu 40 nm erzielt werden (**Abb. 2B**). Die mechanische Zelltransduktion im Hochdurchsatz (über eine Million Zellen pro Sekunde) war von Vorteil, da die

intrazelluläre Probenkonzentration sehr gut an das Proteinexpressionslevel angepasst werden konnte, um Hintergrundsignale zu verhindern, die aus überschüssiger Reporterprobe resultieren. Neben einer räumlichen Kontrolle der Proteinmarkierung konnte auch eine zeitliche Kontrolle erhalten werden. Das *cell squeezing* einer photoaktivierbaren *tris*NTA-Verbindung eröffnete die dynamische *in vivo*-Markierung von Proteinen auf Einzelzellebene. Durch das Einschleusen einer Vielzahl von fluoreszenzmarkierten *tris*NTAs konnte so das Anwendungsspektrum von der konventionellen zur hochauflösenden Lebendzellmikroskopie erweitert werden. Da die *tris*NTA-Markierung orthogonal zu anderen Proteinmarkierungsmethoden (z. B. SNAP-Tagging) in lebenden Zellen ist, konnte ferner das Multiplexing (Bildgebung von mehreren Proteinen) durch simultanes Einbringen von zwei Reporterproben in Echtzeit gezeigt werden.

### Mini-Antikörper für die Proteinmarkierung auf endogenem Level

Die Proteinmarkierung durch Antikörper erlaubt die Visualisierung von endogenen Proteinen. Eine Einschränkung für die Proteinverfolgung in lebenden Zellen ist deren Zellimpermeabilität und Reduktion im Cytosol. Eine attraktive Alternative sind Nanobodies, die aus lediglich einer einzigen Proteinkette bestehen und nur ein Zehntel so groß, sehr kompakt und im Cytosol der Zelle stabil sind [10, 11]. Um Nanobodies für die hochauflösende Lebendzellmikroskopie zu nutzen, wurden sie zuerst stöchiometrisch mit organischen Fluorophoren ausgestattet. Hinsichtlich der verringerten Häufigkeit von endogenen Proteinen im Vergleich zu überexprimierten Proteinen ist die Verwendung von hell leuchtenden Fluorophoren essenziell, um die Sensitivität zu erhöhen. Zwei fluorophormarkierte Nanobodies ( $\alpha$ -Lamin und  $\alpha$ -Vimentin) wurden generiert und für das Markieren von endogenen Proteinen in genetisch unveränderten Zellen verwendet [6]. Auch hier erwies sich die einstellbare und kontrollierbare Einschleusung mittels *cell squeezing* als sehr hilfreich. So konnten das Cytoskelett mittels Vimentindekoration und die Kernhülle durch  $\alpha$ -Lamin-Nanobodies auf endogenem Level markiert und per LSM visualisiert werden. Die Antigenpezifität beider Nanobodies war selbst bei subnanomolaren intra-





▲ **Abb. 3:** Lebendzellmarkierung endogener Proteine. Zwei-Farben-Lebendzellmarkierung von endogenem Lamin und Vimentin. Fluorophormarkierte  $\alpha$ -Lamin-ATTO655- und  $\alpha$ -Vimentin-ATTO488-Nanobodies wurden simultan in HeLa-Kyoto-Zellen durch *cell squeezing* eingeschleust. Die Vergrößerung des  $\alpha$ -Vimentin-markierten Netzwerks gibt die dreidimensionale Organisation um den Zellkern wieder. Die jeweiligen konfokalen Z-Ebenen sind im Schema angegeben. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels Laser-Scanning-Mikroskopie. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

zellulären Konzentrationen (< 100 nM) noch gegeben. Kontrolliertes Einschleusen von  $\alpha$ -Lamin erlaubte weiterhin die Visualisierung der nativen Kernhülle mit nanometergenauer Präzision via *dSTORM* (Auflösung: < 55 nm). Das gleichzeitige *cell squeezing* von  $\alpha$ -Vimentin und  $\alpha$ -Lamin ermöglichte das Markieren von zwei endogenen Proteinnetzwerken (**Abb. 3**) und erweitert das Repertoire für das Multiplexen von endogenen Proteinen via Immunfluoreszenz in lebenden Zellen.

### Zusammenfassung

Die Proteinmarkierung im Hochdurchsatz mittels *cell squeezing* ist vielseitig in der Probenauswahl (z. B. *tris*NTA, Nanobodies, zellimpermeable Fluorophore) und bezüglich des verwendeten Zelltyps. Es erlaubt eine schnelle Zelltransduktion bei subnanomolaren Konzentrationen mit exakt einstellbarer und kontrollierbarer Proteinmarkierungsdichte, was wiederum effektiv zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz beiträgt. Diverse Cargos können unabhängig von Ladung, Größe oder Hydrophobizität eingeschleust werden. Die Cargomenge für die Manipulation von lebenden Zellen kann präzise angepasst und der biologische Effekt fein abgestimmt wer-

den. Durch die Einfachheit und Robustheit dieser Methode kann sie auf mehrere Proben für das Multiplexing, aber auch auf andere Mikroskopietechniken, wie z. B. Kryoelektromikroskopie, erweitert werden. Besonders das Einschleusen von mehreren Proben gleichzeitig ist eine große Herausforderung für Transduktionssysteme. Für die Visualisierung dynamischer Prozesse sind *in situ* kontrollierbare Markierungsmethoden interessant, um Proteine mit höchster Auflösung in Raum und Zeit zu verfolgen oder lichtgesteuerte *pulse-chase*-Experimente durchzuführen. Durch das Einschleusen verschiedener, zellimpermeabler Proben, wie z. B. Inhibitoren, Prodrugs oder Proteinkomplexe, und die Verwendung komplexerer Zelllinien (humane Immunzellen, aus Patienten gewon-

nene Zellen oder embryonale Stammzellen) können weitere Anwendungsfelder für die hochauflösende Lebendzellmikroskopie erschlossen werden.

### Danksagung

Der Autor bedankt sich für finanzielle Unterstützung bei der VolkswagenStiftung (Az. 91 067), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Cluster of Excellence EXC 115, Macromolecular Complexes) und dem Graduiertenkolleg CLiC (GRK 1986).

### Literatur

- [1] Stewart MP, Sharei A, Ding X et al. (2016) In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature* 538:183–192
- [2] Sharei A, Zoldan J, Adamo A et al. (2013) A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2082–2087
- [3] Lee J, Sharei A, Sim WY (2012) Nonendocytic Delivery of Functional Engineered Nanoparticles into the Cytoplasm of Live Cells Using a Novel, High-Throughput Microfluidic Device. *Nano Lett* 12:6322–6327
- [4] Li J, Wang B, Juba BM et al. (2017) Microfluidic-Enabled Intracellular Delivery of Membrane Impermeable Inhibitors to Study Target Engagement in Human Primary Cells. *ACS Chem Biol* 12:2970–2974
- [5] Sharei A, Trifonova R, Jhunjhunwala S et al. (2015) *Ex Vivo* Cytosolic Delivery of Functional Macromolecules to Immune Cells. *PLoS One* 10:e0118803
- [6] Klein A, Hank S, Raulf A et al. (2018) Live-cell labeling of endogenous proteins with nanometer precision by transduced nanobodies. *Chem Sci* 9:7835–7842
- [7] Kollmannsperger A, Sharei A, Raulf A et al. (2016) Live-cell protein labelling with nanometre precision by cell squeezing. *Nat Commun* 7:10372
- [8] Lata S, Reichel A, Brock R et al. (2005) High-Affinity Adaptors for Switchable Recognition of Histidine-Tagged Proteins. *J Am Chem Soc* 127:10205–10215
- [9] Wieneke R, Raulf A, Kollmannsperger A et al. (2015) SLAP: Small Labeling Pair for Single-Molecular Super-Resolution Imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 54:10216–10219
- [10] Helma J, Cardoso MC, Muyldermans S et al. (2015) Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J Cell Biol* 209:633–644
- [11] Schumacher D, Helma J, Schneider AFL et al. (2018) Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 57:2314–2333

### Korrespondenzadresse:

Dr. Ralph Wieneke  
Institut für Biochemie, Biocenter  
Goethe-Universität Frankfurt a. M.  
Max-von-Laue-Straße 9  
D-60438 Frankfurt a. M.  
Tel.: 069-79829477  
Fax: 069-79829495  
wieneke@em.uni-frankfurt.de

### AUTOR



#### Ralph Wieneke

1999–2005 Chemiestudium an der Universität Marburg, 2009 Promotion in bioorganischer Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. A. Geyer. 2009 Gastwissenschaftler an der Universität Göttingen im Labor von Prof. Dr. C. Steinem. 2010–2014 Postdoktorand an der Universität Frankfurt a. M. unter der Leitung von Prof. Dr. R. Tampé. Seit 2014 eigenständige Arbeiten auf dem Gebiet der optochemischen Biologie mit Fokus auf der Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Untersuchung und Manipulation von Membran-assoziierten Prozessen.