



Carboxylierte photoschaltbare Diarylethene als Biomarkierungen für hochauflösende RESOLFT-Mikroskopie

Benoît Roubinet[†], Mariano L. Bossi[†], Philipp Alt[†], Marcel Leutenegger, Heydar Shojaei, Sebastian Schnorrenberg, Shamil Nizamov, Masahiro Irie,* Vladimir N. Belov* und Stefan W. Hell*

Abstract: Reversibel photoschaltbares 1,2-Bis(2-ethyl-6-phenyl-1-benzothiophen-1,1-dioxid-3-yl)perfluorocyclopenten (EBT) mit fluoreszierender „geschlossener“ Form wurde mit vier oder acht Carboxygruppen versehen und an Antikörper gebunden. Die carboxylierten Derivate wiesen geringe Aggregation, effizientes Photoschalten in wässrigen Puffern, gezieltes Färben von zellulären Strukturen und gute photophysikalische Eigenschaften auf. Abwechselnde Bestrahlung mit UV und blauem Licht relativ geringer Intensität führte zu reversibler photochemischer Isomerisierung zwischen zwei stabilen Strukturen über mehrere dutzend Schaltzyklen. Dies ermöglichte die Verwendung der Farbstoffe für hochauflösende RESOLFT-Mikroskopie („reversible switchable optical linear fluorescence transitions“). Hierbei konnte eine optische Auflösung von 75 nm an zellulären Tubulin-Filamenten erzielt werden.

Die optische „Nanoskopie“, sowie die hierfür benötigten fluoreszierenden Proteine und synthetischen Farbstoffe, haben die Fluoreszenzmikroskopie als eine der leistungsfähigsten Methoden der Biowissenschaften wieder aufleben lassen. Durch das lichtinduzierte Schalten fluoreszierender Moleküle zwischen einem dunklen und einem leuchtenden Zustand wurde die Beugungsgrenze überwunden und die

räumliche Auflösung in der optischen Mikroskopie grundlegend erhöht.^[1] Beispielsweise konnte mit reversibel photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen (Dreiklang, rsEGFP), die mehrere tausend E/Z-Isomerisierungen vollführen, in der Fluoreszenzmikroskopie und unter Verwendung des RESOLFT-Prinzips^[1a] eine optische Auflösung von 30–40 nm demonstriert werden.^[2] Aufgrund der thermischen Stabilität des nichtfluoreszierenden und des fluoreszierenden Zustandes und einer ausreichend hohen Quantenausbeute der Photoisomerisierung kann zwischen diesen beiden Zuständen mit geringen Lichtintensitäten und relativ geringem Photobleichen wiederholt hin- und hergeschaltet werden. In der Regel eignen sich die photoschaltbaren fluoreszierenden Proteine für die RESOLFT-Mikroskopie sehr viel besser als synthetische Farbstoffe. Künstliche photochrome fluoreszierende Farbstoffe,^[3] die in Silicagel-Nanokügelchen eingebettet sind, vollführen ca. 10–30 Schaltzyklen und verbessern die optische Auflösung.^[4] Kürzlich wurde ein thiolunterstütztes Photoschalten eines Cy3-Alexa647-Konjugates in Gegenwart von Kaliumiodid (KI) unter RESOLFT-Bedingungen realisiert. Dabei war es zum Beispiel möglich, Tubulin-Filamente mit einem Abstand von 130 nm getrennt voneinander abzubilden.^[5] Bisher war es allerdings noch nicht möglich, RESOLFT-Mikroskopie mit nennenswert verbesserter Auflösung an biologischen Proben unter Verwendung synthetischer organischer Fluorophore, die eine reversible photochemische Transformation vollführen und zwischen zwei stabilen Strukturen schalten, zu verwirklichen.

Die benötigten Eigenschaften für einen RESOLFT-Schalter – ausreichende Photostabilität, thermische Stabilität der fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Formen, hohe Variation der Fluoreszenz beim Schalten (Kontrastverhältnis > 90 %), hohe Helligkeit [Produkt aus Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_f) und Extinktionskoeffizient (ϵ)], zufriedenstellende Schaltkinetik, klare Trennung der Absorptionsbanden der beiden Isomere – wurden bereits für synthetische photochrome Farbstoffe in organischen Lösungsmitteln gezeigt.^[3,4] Allerdings waren diese Eigenschaften in wässrigen Lösungen (auch in Gegenwart von löslichkeitsverbessernden Resten und polaren ionischen Gruppen)^[6] nur schwach ausgeprägt. Oft wurden diese enttäuschenden Ergebnisse mit Dichromophor-Verbindungen mit separaten photochromen und fluoreszierenden Einheiten erhalten. In diesem Fall wird kein Licht emittiert, da ein resonanter Energietransfer (RET) von der fluoreszierenden Einheit (RET-Donor) zur farbigen Form der photochromen Einheit (RET-Akzeptor) stattfindet.^[7] Alternativ wurde gezeigt, dass auch beim Elektronentransfer (vom angeregten Zustand des

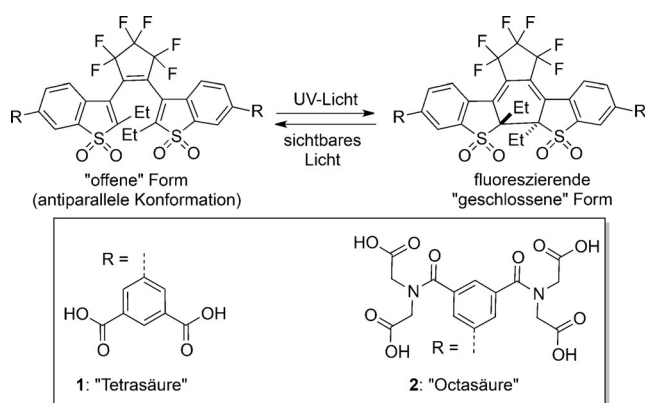
[†] Dr. B. Roubinet,^[†] Dr. M. L. Bossi,^[†] Dipl.-Biophys. P. Alt,^[†] Dr. M. Leutenegger, Dr. H. Shojaei, M. Sc. S. Schnorrenberg, Dr. S. Nizamov, Dr. V. N. Belov, Prof. Dr. S. W. Hell
Abteilung Nanobiophotonik
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: vbelov@gwdg.de
shell@gwdg.de
Homepage: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/200/>
Prof. Dr. M. Irie
Research Center for Smart Molecules
Department of Chemistry, Rikkyo University
Nishi-Ikebukuro 3-34-1, Toshimaku, Tokyo (Japan)
E-Mail: iriem@rikkyo.ac.jp

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201607940> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

Fluorophores zur „geschlossenen Form“ der photochromen Einheit) ein Photoschalten der Emission ohne schädigendes Auslesen durch das Anregungslicht möglich ist.^[8] In jedem Fall ist es aber schwierig, die inhärente Hydrophobie des relativ großen und komplexen molekularen Schalters durch Hinzufügen polarer oder geladener Gruppen zu kompensieren.

Große Erwartungen auf diesem Gebiet wurden mit den neuen photochromen Sulfonen verbunden, die von 1,2-Bis(2-alkyl-6-aryl-1-benzothiophen-3-yl)perfluorocyclopenten abgeleitet sind (Schema 1).^[9] Bei Beleuchtung mit UV-Licht wandelt sich die „offene“ Form in die fluoreszierende gelbe „geschlossene Form“ um.^[10] Eine Bestrahlung mit sichtbarem (blauem) Licht stellt das „offene“ Isomer wieder her. Bemerkenswerterweise emittiert die fluoreszierende „geschlossene“ Form grünes Licht mit Quantenausbeuten bis 0,92,^[11] wobei die photochrome (Schalt-) und die fluoreszierende (Signal-)Funktion in einer Einheit kombiniert sind. Ausgehend von diesen Sulfon-Derivaten entwarfen wir photochemisch schaltbare Fluorophore mit einer reaktiven Gruppe, deren Funktion in wässrigen Puffern erhalten bleibt. Diese Schalter sollten in kommerziell erhältlichen RESOLFT-Mikroskopen mit geringen Lichtintensitäten von 1–10 kW cm⁻² in Form von Biokonjugaten eingesetzt werden, wobei die Schaltzeiten idealerweise im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich liegen sollten.



Schema 1. Photoschaltbare EBT **1** und **2**, ausgestattet mit vier bzw. acht Carbonsäuregruppen. Siehe Tabelle 1 für die spektralen Eigenschaften der „offenen“ (OF, nichtfluoreszierenden) und der „geschlossenen“ (CF, fluoreszierenden) Formen.^[12] Für die Herstellung und Eigenschaften der Verbindungen mit R = H und R = Ph siehe Lit. [9a, b, c] bzw. [9d, e].

Nach einer Musterung vieler Substituenten, die an die Positionen C2(2') und C6(6') von 1,2-Bis(1-benzothiophen-1,1-dioxid-3-yl)perfluorocyclopenten gebunden wurden, haben wir uns für einen symmetrischen Kern mit 2(2')-Ethyl- und 6(6')-Phenyl-Substituenten entschieden (Schema 1, Farbstoffe **1** und **2**).^[11] Diese Gruppen und das Fehlen starker Elektronendonoren an der Positionen C6,6' gewährleisten eine relativ geringe (jedoch nicht zu geringe) Quantenausbeute der Ringöffnungsreaktion (Tabelle 1). Dies war ausreichend, um eine große Zahl an Anregungs- und Emissionszyklen des geschlossenen Isomers in einem Ausleseprozess zu erreichen,

Tabelle 1: Photophysikalische Eigenschaften der freien Farbstoffe **1** und **2** in wässrigem PBS-Puffer (pH 7.4).

		1	2
$\lambda_{\text{max abs}}$ [nm]/ ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	OF ^[a]	340/12 400	337/16 500
$\lambda_{\text{max abs}}$ [nm]/ ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	CF	450/35 000	448/45 000
$\lambda_{\text{max em}}$ [nm]	CF	534, 558	522, 550
Φ_{f} ^[b]	CF	0.48	0.57
τ [ns]	CF	1.72 ± 0.05	2.04 ± 0.05
$\Phi_{\text{OF} \rightarrow \text{CF}}$ ^[c]		0.19 ± 0.04	0.23 ± 0.04
$\Phi_{\text{CF} \rightarrow \text{OF}}$ ^[d]		1.2 × 10 ⁻³ ± 3 × 10 ⁻⁴	2.0 × 10 ⁻³ ± 3 × 10 ⁻⁴

[a] Absorptionsmaximum niedrigster Energie. [b] Fluoreszenzquantenausbeute; Fluorescein in 0.1 M wäss. NaOH wurde als Standard verwendet. [c] Bei 365 nm. [d] Bei 470 nm (siehe die Hintergrundinformationen).

bevor die Rückisomerisierung zur offenen Form stattfindet (Löschung/Wiederauffrischung). Starke Elektronendonoren an den C6,6'-Positionen verlangsamen dagegen die Ringöffnungsreaktion drastisch^[11a,c] und begünstigen möglicherweise den photochemischen Abbau der geschlossenen Form. Ethylgruppen (nicht Methylgruppen) an den C2(2')-Positionen sind essenziell, um die Fluoreszenzquantenausbeute in hochpolaren Lösungsmitteln zu erhöhen.^[11b] Die photophysikalischen Eigenschaften der neu synthetisierten Farbstoffe **1** und **2** in wässrigen Puffern sind in Tabelle 1 zusammengefasst (die Absorptions- und Emissionsspektren sind in Abbildung S6 dargestellt). Die Unterschiede zwischen den gemessenen Eigenschaften in wässriger Lösung und Methanol (Tabelle S2) sind nicht groß. Zum Beispiel sind die Emissionseffizienzen und die Fluoreszenzlebensdauer in PBS mit pH 7.4 nur um 20–30 % verringert, wobei für Verbindung **1** geringfügig stärkere Abweichungen beobachtet wurden.

Es war eine schwierige Aufgabe, die hydrophilen Reste zu überprüfen, auszuwählen und die am besten geeigneten Substituenten an den Farbstoffkern zu binden, um die Aggregation des freien Farbstoffes und der Biokonjugate in wässriger Lösung zu verhindern. Eine Vielzahl von Ansätzen wurde bereits beschrieben, um hydrophile, wasserlösliche Diarylethene mit Sulfon-,^[13] Carbonsäure-^[11,14] und Hydroxygruppen oder Inositolresten^[14] sowie Polyethylenglykol-Ketten^[14a,15] herzustellen. Die polaren Gruppen sind notwendig, da die Kerne der besten synthetischen Schalter immer hydrophob sind und diese Verbindungen Nanoaggregate bilden,^[13b] schlecht wasserlöslich sind^[14a] oder Cyclodextrine als Zusatzstoff benötigen, um die Löslichkeit zu erhöhen.^[13a] Des Weiteren fehlt den meisten dieser Verbindungen die reaktive Gruppe zur Biokonjugation. Wir haben festgestellt, dass die Präsenz mehrerer Carbonsäuregruppen den Farbstoffen **1** und **2** die erforderlichen Eigenschaften verleihen, obwohl nach allgemeiner Ansicht die Carbonsäure schlechtere Löslichkeitseigenschaften aufweist als die entsprechende Sulfon- oder Phosphor-(Phosphon-)Säure. In der Tat liefern vier oder acht Carboxylgruppen eine recht gute Löslichkeit bei pH > 5 in Wasser und hemmen die Aggregation (in mikromolarer Konzentration) sogar nach Photocyclisierung (das geschlossene Isomer aggregiert leichter).^[15a] Im Unterschied zu den meisten anderen polaren Gruppen kann die Carbonsäure relativ einfach in eine reaktive Gruppe

umgewandelt werden. Wir haben Mono-*N*-hydroxysuccinimidester hergestellt und die herkömmlichen Kupplungsbedingungen verwendet. Damit konnten wir die beiden neuen hydrophilen Diarylethene **1** und **2** erfolgreich an sekundäre Antikörper binden. Bemerkenswerterweise bleiben die photochromen und fluoreszierenden Eigenschaften der freien Farbstoffe **1** und **2** in den Biokonjugaten erhalten. Diese wurden in konventioneller (konfokaler) und in hochauflösender RESOLFT-Mikroskopie verwendet.

Die Diarylethene **1** und **2** wurden über drei verschiedene Wege gewonnen: durch eine Suzuki-Miyaura-Reaktion des C6(6')-Diiodids^[11a] (Schema S2,S3) entweder mit (3,5-Diformylphenyl)boronsäure (Weg A; 23% Ausbeute über 2 Syntheseschritte), mit 5-(Dihydroxyboryl)isophthalsäure (Weg B; 46% Ausbeute) oder mit dem Pinakolester der 3,5-Di(*tert*-butoxycarbonyl)phenylboronsäure (Weg C; 13% Ausbeute über 2 Schritte).^[16] Zusätzlich wurde eine Jones-Oxidation in Weg A bzw. eine Säurebehandlung (mit CF₃COOH in CH₂Cl₂) in Syntheseweg C verwendet. Um die Hydrophilie zu erhöhen und die Aggregation noch besser zu verhindern, haben wir Diarylethen **2** mit acht Carboxygruppen hergestellt. Dies wurde durch eine ähnliche Strategie mit einer Ausbeute von 41% erreicht, indem eine Suzuki-Miyaura-Reaktion gefolgt von der Spaltung von *tert*-Butylestern unter sauren Bedingungen verwendet wurde.^[16] Die amino-reaktiven Mono-NHS-Ester dieser Farbstoffe wurden durch sukzessive Zugabe abgemessener Mengen an *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) zu den Lösungen von **1** oder **2** und *N*-Hydroxysuccinimid in DMF mit katalytischen Mengen an *N,N*-Dimethylpyridin-4-amin (DMAP) bereitgestellt.^[16] Der stabile Mono-NHS-Ester von **1** wurde durch präparative RP-HPLC isoliert, der Mono-NHS-Ester von **2** konnte hingegen nur in Lösung erzeugt und nicht isoliert werden. Die sekundären Antikörper wurden mit diesen Mono-NHS-Estern markiert und mittels Gelfiltration gereinigt.^[16] Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und UV-VIS-Spektroskopie wurde der Markierungsgrad bestimmt („degree of labeling“, DOL; Tabelle S1). Wir haben den DOL-Wert variiert, um die beste Immunfluoreszenzfärbung und die bestmöglichen Bildaufnahmen sowohl unter konfokalen als auch unter RESOLFT-Bedingungen zu erhalten.

Die erhaltenen Konjugate mit sekundären Antikörpern waren hoch fluoreszierend und photochrom. Wir haben sie zur Immunmarkierung von Tubulin-Filamenten und Zellkernporen in Vero-Zellen verwendet. Konfokale Messungen (Abbildung S1) zeigten ihre selektive Bindung an den primären Antikörper und somit eine Färbung des Tubulin-Netzwerk in der gesamten fixierten Zelle. Zellen die mit den Farbstoffen **1** und **2** immunmarkiert wurden, wurden für Pump-Probe-Fluoreszenzmessungen in einem modifizierten konfokalen Mikroskop mit Weitfeldbeleuchtung verwendet (Abbildung S2). Dazu wurden die gefärbten Zellen auf einem Objektträger mit einer Vertiefung, die mit PBS (pH 7.4) gefüllt war, fixiert. Mit Laserlicht der Wellenlängen 375 nm beziehungsweise 491 nm wurde zwischen der offenen und geschlossenen Form geschaltet. Die Messungen wurden durch einen 10-ms-Puls von 491-nm-Licht (17 kW cm⁻²) initialisiert, um alle Fluorophore in der Beobachtungszone in den dunklen

Zustand zu versetzen. Danach wurde eine Pulssequenz bestehend aus einem 20- μ s-Puls von 375-nm-Licht (0.8 kW cm⁻²), einer 500- μ s-Beleuchtungspause, einem 10-ms-Puls von 491-nm-Licht (17 kW cm⁻²) und einer weiteren 2-ms-Beleuchtungspause verwendet. Diese Pulssequenz wurde 200 Mal wiederholt (in Abbildung 1 und S3 werden 100 bzw.

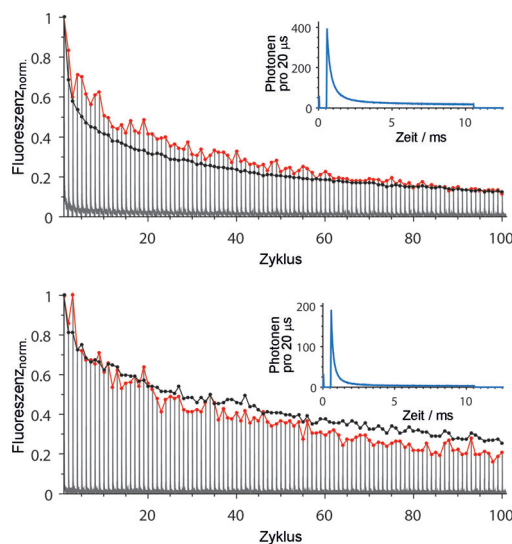


Abbildung 1. Die Fluoreszenzemission von Zellen, die mit Farbstoff **1** (oben) und **2** (unten) immunmarkiert wurden, zeigt die An-/Aus-schaltzyklen bei der im Text beschriebenen Lichtpulssequenz (graue Kurve). Die rote Linie zeigt die maximal detektierte Fluoreszenz im jeweiligen Zyklus, während die schwarze Linie die gesamte Fluoreszenz pro Zyklus darstellt. Das Einschaltbild zeigt einen Schaltzyklus als Mittelwert von 100 Zyklen (blau). Alle Messungen wurden mit 20- μ s-Zeitschritten aufgenommen. Die gezeigten Fluoreszenzintensitäten wurden bezüglich der Totzeit der Sensoren korrigiert.

200 Zyklen gezeigt). Diese Messungen haben gezeigt, dass die Hälfte der Ausgangsfluoreszenz nach 11 Schaltzyklen im Fall von Farbstoff **1** und nach 21 Schaltzyklen im Fall von Farbstoff **2** geblieben ist. Eine biexponentielle Anpassung an die erhaltene Abklingkurve der Ringöffnungsreaktion (Ausschalten) ergab die Zeitkonstanten $\tau_1 = 241 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 1.31 \text{ ms}$ für **1** (79% der Amplitude sind τ_1 zugeordnet und 21% τ_2). Unter den gleichen Beleuchtungsbedingungen ergaben sich für **2** Abklingzeiten von $\tau_1 = 126 \mu\text{s}$ (77%) und $\tau_2 = 674 \mu\text{s}$ (23%). Die verbleibende Fluoreszenz pro Zyklus wurde durch Vergleich der maximalen Fluoreszenz in einem Zyklus und dem mittleren Wert der verbleibenden Fluoreszenz, die in den letzten 100 μs der Beleuchtung mit 491-nm-Licht aufgenommen wurde, ermittelt (Mittelwert aus 100 Zyklen). Die verbleibende Fluoreszenz wurde mit 4.3% für **1** und 1.7% für **2** bestimmt.

Um die Anwendbarkeit der Farbstoffe **1** und **2** für die RESOLFT-Mikroskopie zu demonstrieren, wurden fixierte immunmarkierte Vero-Zellen mit einem modifizierten 1C-RESOLFT-QUAD-Rastermikroskop (Abberior Instruments, Göttingen) aufgenommen. Für die Bildaufnahmen wurde folgende Pulssequenz verwendet: Schalten der Diarylethene in die fluoreszierende geschlossene Form mit 355-nm-Licht (130 W cm⁻²) für 50 μs , 200- μs -Beleuchtungspause, Beleuch-

tung mit einem ringförmigen 488-nm-Strahl (36 kW cm^{-2}) für 1.2 ms, um die Diarylethene in der Peripherie des Fokus in den dunklen, offenen Zustand zu schalten. Zuletzt wurde die verbleibende Fläche mit dem fluoreszierenden Isomer für $80 \mu\text{s}$ mit einem Gauß-förmigen 488-nm-Lichtstrahl (9.7 kW cm^{-2}) ausgelesen. Die gleiche Pulssequenz wurde verwendet, um die konfokalen Bilder aufzunehmen, jedoch wurde das Ausschalten ausgelassen. Unter Verwendung dieser Pulssequenz war es möglich, RESOLFT-Bilder mit einer Auflösung von $74 \text{ nm FWHM}^{[17]}$ und konfokale Bilder mit einer Auflösung von $175 \text{ nm FWHM}^{[17]}$ aufzunehmen. Die konfokalen und RESOLFT-Aufnahmen sind den Abbildungen 2, S4 (Tubulin-Filamente) und S5 (Kernporen) zu entnehmen. Die relativ hohe konfokale Auflösung (Abbildung 2 und S4) resultiert daraus, dass der Fokus der 355-nm-Aktivierung deutlich kleiner ist als der Fokus der 488-nm-Anregung. Dieser zweistufige Prozess aus Aktivierung und Anregung führt zu einer effektiven Punktspreizfunktion (PSF), die als Produkt aus den PSFs der Aktivierung, Anregung und

Detektion beschrieben werden kann.^[18] Beide Diarylethene zeigen einen hohen Schaltkontrast in den Pump-Probe-Messungen. Obwohl die Ausschalttrate des freien Farbstoffes **2** nur doppelt so hoch ist wie die Rate von Farbstoff **1** (Tabelle 1), zeigte sich in den RESOLFT-Aufnahmen, dass **2** (gebunden an ein Protein) deutlich schneller ausschaltet als **1** (1.5 ms für **2** im Vergleich zu 7 ms für **1**). Dies ist womöglich der Grund für das stärkere Bleichen von **1** und die dadurch schlechtere Auflösung (85 nm) in der RESOLFT-Mikroskopie. Die Auflösung, die in den RESOLFT-Aufnahmen erzielt wurde, wurde hauptsächlich durch das Photobleichen und nicht durch die verbleibende Fluoreszenz nach dem Ausschalten begrenzt.

Bisher bieten reversibel photoschaltbare fluoreszierende Proteine eine deutlich höhere Zahl an Schaltzyklen (ca. $100 \times$ mehr Zyklen).^[19] Trotzdem konnten wir zeigen, dass es möglich ist, reversibel photoschaltbare organische Farbstoffe zu synthetisieren, die in reiner wässriger Lösung funktionieren und in der biologisch relevanten RESOLFT-Mikroskopie Anwendung finden. Das einfache EBT-Grundgerüst bietet eine vielversprechende Kernstruktur, an die vier oder acht Carbonsäuregruppen gebunden wurden. Die Verbindungen **1** und **2** zeigten reversible photoschaltbare Transformationen und schalteten zwischen zwei stabilen Zuständen mit definierten Strukturen in wässrigem PBS-Puffer ohne Stabilisierungsreagenzien oder andere Zusätze. Das Ergebnis der vorliegenden Studie ermöglicht erstmals einen Vergleich von photoschaltbaren synthetischen Farbstoffen mit photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen. Obwohl die Leistung der künstlichen Farbstoffe in der RESOLFT-Mikroskopie derjenigen von photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen (in Bezug auf Photobleichen, Anzahl der möglichen Schaltzyklen und phototoxischer Effekte der UV-Bestrahlung) unterlegen ist, ist die Einfachheit der EBT-Strukturen ermutigend und anregend. Tatsächlich konnten geringe Aggregation, effizientes Photoschalten in wässrigen Puffern und chemische Reaktivität durch Hinzufügen mehrerer frei rotierender Carbonsäuregruppen zu einem hochsymmetrischen Kern relativ einfach erzielt werden. Diese Ergebnisse können für die zukünftige Forschung sehr hilfreich sein. Wir haben vor, weitere reversibel photoschaltbare und bleichstabile Farbstoffe zu entwickeln, die durch Beleuchtung mit Licht von 405 nm und längeren Wellenlängen in eine stabile fluoreszierende Form isomerisieren. Des Weiteren sollte ihre Anwendbarkeit zur Markierung von lebenden Zellen (unter Nutzung der SNAP-tag- und HaloTag®-Technologien) überprüft werden.

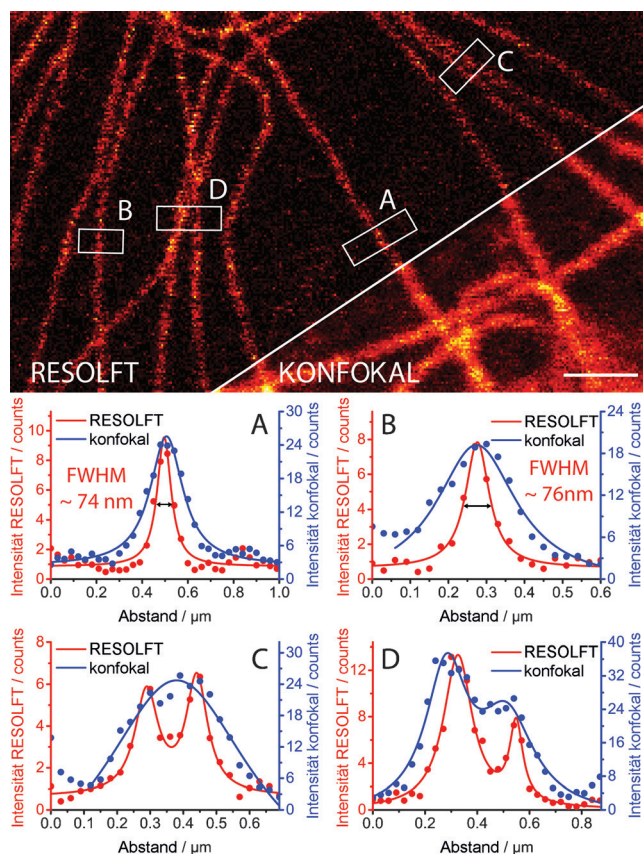


Abbildung 2. RESOLFT-Aufnahmen von fixierten Vero-Zellen, die mit primären Antikörpern gegen α -Tubulin und mit Diarylethen **2**, gebunden an einen sekundären Antikörper, immunmarkiert wurden. Alle Bilder zeigen Rohdaten. Die RESOLFT-Aufnahmen erfolgten vor den konfokalen Aufnahmen. Maßstabsbalken: $1 \mu\text{m}$. Die Linienprofile A–D (gemittelt über 10 nebeneinanderliegende Linien) zeigen die Regionen, die in den RESOLFT-Aufnahmen eingezeichnet sind. Eine Lorentz-Funktion (durchgezogene Linie) wurde jeweils an die Daten (Punkte) für das RESOLFT- (rot) und das konfokale Bild (blau) angepasst. Die FWHM wurden an den Kurven A und B ermittelt, angedeutet durch den kleinen schwarzen Pfeil.

Danksagung

Wir danken Jürgen Bienert (MPIBPC), Dr. Holm Frauen-dorf, Dr. Michael John und deren Kollegen (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen) für die Aufnahme von Spektren. Wir bedanken uns bei Jens Schimpfhauser und Jan Seikowski (MPIBPC) für die Synthese von 1,2-Bis(2-ethyl-6-iod-1-benzothiofphen-1,1-dioxid-3-yl)perfluorocyclopenten und 3,5-Di(*tert*-butoxycarbonyl)phenylboronsäurepinakolester. Wir

sind Dr. Ellen Rothermel (MPIBPC) dankbar für die Vorbereitung und die Immunmarkierung von Zellen. Wir danken Prof. Stefan Jakobs (MPIBPC) für die Zurverfügungstellung des RESOLFT-Mikroskops. Wir danken für die Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Deutschland) im Programm KMU-innovativ: Photonik/Optische Technologien (FKZ 13N12995; an S.W.H.).

Stichwörter: Diarylethene · Fluoreszenz · Optische Mikroskopie · Photochrome Farbstoffe · Wasserlöslichkeit

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15429–15433
Angew. Chem. **2016**, *128*, 15655–15659

- [1] Zur Grundidee von RESOLFT: a) S. W. Hell, S. Jakobs, L. Kastrop, *Appl. Phys. A* **2003**, *77*, 859–860. Für Beispiele, s.: b) M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17565–17569; c) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. Wolf Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645. Für Überblickartikel, s.: d) S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32; e) S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [2] a) T. Brakemann, A. C. Stiel, G. Weber, M. Andresen, I. Testa, T. Grotjohann, M. Leutenegger, U. Plessmann, H. Urlaub, C. Eggeling, M. C. Wahl, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 942–947; b) T. Grotjohann, I. Testa, M. Leutenegger, H. Bock, N. T. Urban, F. Lavoie-Cardinal, K. I. Willig, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nature* **2011**, *478*, 204–208; c) J. G. Danzl, S. C. Sidenstein, C. Gregor, N. T. Urban, P. Ilgen, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nat. Photonics* **2016**, *10*, 122–128.
- [3] M. Bossi, V. Belov, S. Polyakova, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7462–7465; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7623–7627.
- [4] J. Fölling, S. Polyakova, V. Belov, A. van Blaaderen, M. L. Bossi, S. W. Hell, *Small* **2008**, *4*, 134–142.
- [5] J. Kwon, J. Hwang, J. Park, G. R. Han, K. Y. Han, S. K. Kim, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17804.
- [6] a) N. Soh, K. Yoshida, H. Nakajima, K. Nakano, T. Imato, T. Fukaminato, M. Irie, *Chem. Commun.* **2007**, 5206–5208; b) S. M. Polyakova, V. N. Belov, M. L. Bossi, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3301–3312.
- [7] a) J. M. Endtner, F. Effenberger, A. Hartschuh, H. Port, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3037–3046; b) L. Giordano, T. M. Jovin, M. Irie, E. A. Jares-Erijman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7481–7489; c) T. Fukaminato, T. Sasaki, T. Kawai, N. Tamai, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14843–14849; d) M. Frigoli, G. H. Mehl, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 636–642.
- [8] T. Fukaminato, T. Doi, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4984–4990.
- [9] a) Y. C. Jeong, S. I. Yang, K. H. Ahn, E. Kim, *Chem. Commun.* **2005**, 2503–2505; b) Y.-C. Jeong, D. G. Park, I. S. Lee, S. I. Yang, K.-H. Ahn, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 97–103; c) Y.-C. Jeong, S. I. Yang, E. Kim, K.-H. Ahn, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5855–5861; d) T. Wu, B. Johnsen, Z. Qin, M. Morimoto, D. Baillie, M. Irie, N. R. Branda, *Nanoscale* **2015**, *7*, 11263–11266; e) M. Bälter, S. Li, M. Morimoto, S. Tang, J. Hernando, G. Guirado, M. Irie, F. M. Raymo, J. Andréasson, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5867–5871; Anwendung in der PALM/STORM-Mikroskopie: f) O. Nevskiy, D. Sysoiev, A. Oppermann, T. Huhn, D. Wöll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, DOI: 10.1002/anie.201606791; *Angew. Chem.* **2016**, DOI: 10.1002/ange.201606791.
- [10] Die „geschlossene“ Form ist gelb und emittiert grünes Licht.
- [11] a) K. Uno, H. Niikura, M. Morimoto, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13558–13564; b) Y. Takagi, T. Kunishi, T. Katayama, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Morimoto, M. Irie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1661–1665; c) F. Gillanders, L. Giordano, S. A. Díaz, T. M. Jovin, E. A. Jares-Erijman, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 603–612.
- [12] Die „offene“ Form weist ein Gleichgewicht zwischen parallelen (*p*) und antiparallelen (*ap*) Isomeren auf. Die fluoreszierende „geschlossene“ Form bildet sich nur aus dem antiparallelen Konformer (eine der Woodward-Hoffmann-Regeln). Übersichten: a) M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716; b) M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 12174–12277;
- [13] a) M. Takeshita, M. Irie, *Chem. Commun.* **1997**, 2265–2266; b) M. Takeshita, N. Kato, S. Kawauchi, T. Imase, J. Watanabe, M. Irie, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9306–9313.
- [14] a) Y. Shoji, A. Yagi, M. Horiuchi, M. Morimoto, M. Irie, *Isr. J. Chem.* **2013**, *53*, 303–311; b) „Photochromic molecule“: M. Irie, C. C. Yamada, JP2012172139, **2012**; c) „Water-soluble photochromic molecule“: H. Tokiwa, M. Irie, K. Ikeda, T. Otsubo (Rikkyo Educational Corporation and Josho Gakuen Educational Foundation), EP 2902402, **2015**.
- [15] a) T. Hirose, M. Irie, K. Matsuda, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2137–2141; b) T. Hirose, M. Irie, K. Matsuda, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 58–66; c) T. Hirose, K. Matsuda, M. Irie, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7499–7508.
- [16] Zu Synthesevorschriften und analytischen Daten, siehe die Hintergrundinformationen. Die Farbstoffe **1** und **2** sind basenempfindlich; unter alkalischen Bedingungen reagieren sie mit Wasser zu einem Produkt mit einem -CF₂CF₂C(O)-Fragment anstelle des ursprünglichen Perfluorocyclopentenringes. Diese Reaktion läuft auch in wasserhaltigem DMSO ab.
- [17] Volle Halbwertsbreite der Lorentz-Anpassung.
- [18] Die Punktspreizfunktion (PSF) beschreibt die räumliche Intensitätsverteilung einer punktförmigen Lichtquelle, die durch ein optisches System abgebildet wird.
- [19] T. Grotjohann, I. Testa, M. Reuss, T. Brakemann, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, *eLife* **2012**, *1*, e00248, DOI: 10.7554/eLife.00248.

Eingegangen am 15. August 2016
Online veröffentlicht am 21. Oktober 2016