

## STED-Mikroskopie

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201511018  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201511018

## Fluoreszierende Rhodamine und fluorogene Carbopyronine für die STED-Mikroskopie lebender Zellen

Alexey N. Butkevich,\* Gyuzel Yu. Mitronova, Sven C. Sidenstein, Jessica L. Klocke, Dirk Kamin, Dirk N. H. Meineke, Elisa D'Este, Philip-Tobias Kraemer, Johann G. Danzl, Vladimir N. Belov\* und Stefan W. Hell\*

**Abstract:** Helle und photostabile Rhodamine und Carbopyronine mit Absorptionsmaxima im Bereich von  $\lambda = 500$ – $630$  nm wurden entwickelt, die nach Anwendung von Halo-Tag-Technologie, gefolgt von einer Färbung mit  $1 \mu\text{M}$  Lösungen der Farbstoff-Ligand-Konjugate, die spezifische Markierung von Zellskelettfilamenten ermöglichen. Die Synthese, die photophysikalischen Eigenschaften und die Fluorogenität sowie die Struktur-Eigenschafts-Beziehungen der neuen Farbstoffe werden diskutiert. STED-Fluoreszenzmikroskopie lieferte Ein- und Zweifarbenbilder von lebenden Zellen mit einer optischen Auflösung von 40–60 nm.

**F**luoreszierende Farbstoffe finden breite Anwendung als unverzichtbare Marker in der optischen Mikroskopie von biologischen Proben.<sup>[1]</sup> Die selektive, empfindliche und stabile Bildgebung der Zellmikrostruktur hängt von der optimalen Kombination mehrerer chemischer, biologischer und physikalischer Faktoren ab. Die Verfügbarkeit und richtige Wahl der Fluoreszenzmarker – fluoreszierende Proteine (FPs) oder synthetische Farbstoffe – sind entscheidende Faktoren für den Erfolg des gesamten Markierungs- und Abbildungsverfahrens. Synthetische Farbstoffe bieten dank ihrer besseren Helligkeit und Photostabilität eine vielversprechende Alternative zu FPs.

Hier präsentieren wir eine Reihe zellgängiger Fluoreszenzmarker für lebende Zellen und wenden sie in hochauflösender Ein- und Zweifarbenfluoreszenzmikroskopie mittels

stimulated emission depletion (STED) an.<sup>[2]</sup> Für eine spezifische Markierung der intrazellulären Proteine in lebenden Zellen verwendeten wir eine gängige und zuverlässige Methode, die auf HaloTag-Fusionsproteinen basiert.<sup>[3]</sup> Dabei wird das Zielprotein genetisch an ein künstliches Enzym (modifizierte Dehalogenase aus *Rhodococcus rhodochrous*) gebunden (fusioniert). Das Enzym ist dazu in der Lage, selektiv und schnell eine kovalente Bindung mit dem Substrat zu bilden.

Die Auswahl geeigneter Farbstoffe für intrazelluläre Markierungen von lebenden Zellen ist aufgrund der Anforderungen an die Zellgängigkeit begrenzt. Einige Rhodamine,<sup>[4]</sup> Carbopyronine<sup>[5]</sup> und Siliconrhodamine (*SiR*),<sup>[6]</sup> deren Helligkeit vor kurzem verbessert wurde,<sup>[1h]</sup> können die äußere Plasmamembran intakter Zellen durchdringen.<sup>[7]</sup> Leider ist die spektrale Vielfalt photostabiler fluoreszierender Farbstoffe, die sich für die spezifische Markierung intrazellulärer Strukturen und gleichzeitig für die hochauflösende Mikroskopie eignen, sehr begrenzt. Weiterhin sind nur wenige dieser Farbstoffe kommerziell erhältlich (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).


In kommerziellen STED-Mikroskopen kommen Laser in drei spektralen Bereichen für die stimulierte Emission zum Einsatz:  $\lambda = 592/595$ ,  $660$  und  $765/775$  nm.<sup>[8]</sup> Ein roter ( $\lambda \geq 620$  nm) oder sogar IR-Laser ist vorteilhaft, da dieser lebende Zellen weniger beeinträchtigt und unerwünschte Autofluoreszenz, Photobleichen und Lichtstreuung vermindert. Deshalb konzentriert sich diese Studie auf die Entwicklung und Charakterisierung von zellgängigen Rhodamin- und Carbopyronin-Farbstoffen für die hochauflösende Mikroskopie mit dem orangefarbenen ( $\lambda = 618$  nm) oder IR-STED-Laser ( $\lambda = 775$  nm).


Es stellte sich heraus, dass membrängängige Farbstoffe vorzugsweise elektrisch neutral oder Zwitterionen mit einem kurzen Abstand zwischen den Ladungen sind. Zudem weisen sie eine möglichst kompakte Struktur, ein relativ geringes Molekulargewicht ( $M < 700$  Da) und einige Heteroatome auf, die als Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren wirken können. Diese Merkmale ermöglichten eine Auswahl bekannter<sup>[4b,6]</sup> sowie die Synthese neuer grün, gelb und rot emittierender Rhodamine, Carbopyronine und Siliconrhodamine (Schema 1). Die spektralen Eigenschaften der untersuchten Farbstoffe dieser Art sind in Tabelle 1 und Abbildung S2 der Hintergrundinformationen zusammengefasst. Bisher sind lediglich 6'-Carboxyisomere erfolgreich zur Markierung von Proteinen durch die Halo- oder SNAP-tag-basierte Selbstmarkierungstechnik eingesetzt worden.<sup>[9]</sup> Deshalb wurde hier stets das 6'-Carboxyisomer des Farbstoffs


[\*] Dr. A. N. Butkevich, Dr. G. Y. Mitronova, M. Sc. S. C. Sidenstein, B. Sc. J. L. Klocke, Dr. D. Kamin, M. Sc. D. N. H. Meineke, Dr. E. D'Este, Dr. P.-T. Kraemer, Dr. J. G. Danzl, Dr. V. N. Belov, Prof. Dr. S. W. Hell

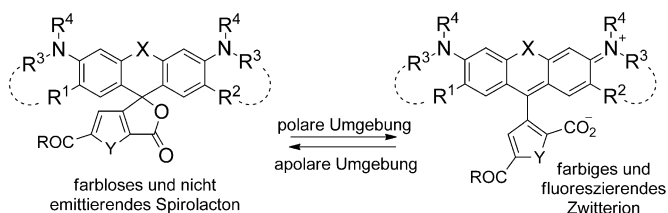
Abteilung für NanoBiophotonik  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (MPIBPC)  
Am Faßberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: abutkev@gwdg.de  
vbelov@gwdg.de  
shell@gwdg.de

Homepage: <http://www.mpiibpc.gwdg.de/abteilungen/200/>

 Hintergrundinformationen und ORCID's der Autoren zu diesem

 Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511018> 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.



**1a-k:** R = OH; **1a-k-Halo:** R = NH[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O]<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Cl

**X = O, Y = CH=CH (Rhodamine):**

- a) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = F<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>- (**1a**, 500R);  
 b) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = F, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Me (**1b**, 515R);  
 c) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Me (**1c**, 520R);  
 d) R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup> = R<sup>2</sup>-R<sup>3</sup> = -(CH<sub>2</sub>OH)=CHCMe<sub>2</sub>-, R<sup>4</sup> = Me (**1d**, 580R).

**X = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Y = CH=CH (Carbopyronine):**

- e) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = Me (**1e**, 580CP);  
 f) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = Me (**1f**, 610CP);  
 g) R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = F, R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = Me (**1g**, 620CP);  
 h) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = F, R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = Me (**1h**, 630CP).

**X = Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Si-Rhodamine):**

- i) Y = CH=CH, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = Me (**1i**, SiR);  
 j) Y = S, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = Me (**1j**, 650SiR);  
 k) Y = CH=CH, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = F, R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = Me (**1k**, 670SiR).

**Schema 1.** Zellgängige Fluoreszenzfarbstoffe für die STED-Mikroskopie lebender Zellen (siehe Tabelle 1 für spektrale Eigenschaften) im Gleichgewicht zwischen dem nicht-fluoreszierenden farblosen Spirolacton und dem fluoreszierenden farbigem Zwitterion.

**Tabelle 1:** Spektrale Eigenschaften zellgängiger Farbstoffe in wässrigem PBS-Puffer (pH 7.4) bei Raumtemperatur; STED bei  $\lambda = 587$  (**1a**), 618 (**1b,c**) und 775 nm (**1d-k**).

| Farbstoff            | Absorption<br>$\lambda_{\text{max}}$ nm<br>( $\epsilon$ , M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) | Emission<br>$\lambda_{\text{max}}$ nm<br>( $\Phi_{\text{fl}}^{\text{[a]}}$ ) | Helligkeit<br>rel. zu<br>SiR <sup>[b]</sup> | $D_{0.5}^{\text{[c]}}$ | Fluoreszenz-<br>lebensdauer<br>$\tau$ , ns |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|
| 500R ( <b>1a</b> )   | 501 (88000)                                                                                  | 523 (0.93)                                                                   | 2.15                                        | 32.5                   | 4.2                                        |
| 515R ( <b>1b</b> )   | 515 (56000)                                                                                  | 543 (0.86)                                                                   | 1.26                                        | 19.6                   | 4.1                                        |
| 520R ( <b>1c</b> )   | 521 (52000)                                                                                  | 546 (0.79)                                                                   | 1.08                                        | 7.5                    | 4.0                                        |
| 580R ( <b>1d</b> )   | 581 (58000)                                                                                  | 607 (0.95)                                                                   | 1.45                                        | < 5.6                  | 3.9                                        |
| 580CP ( <b>1e</b> )  | 582 (90000)                                                                                  | 607 (0.69)                                                                   | 1.63                                        | 34.6                   | 3.6                                        |
| 610CP ( <b>1f</b> )  | 609 (100000)                                                                                 | 634 (0.59)                                                                   | 1.55                                        | 36.4                   | 3.1                                        |
| 620CP ( <b>1g</b> )  | 617 (73000)                                                                                  | 647 (0.17)                                                                   | 0.33                                        | 62.8                   | 1.0                                        |
| 630CP ( <b>1h</b> )  | 628 (6700)                                                                                   | 660 (0.06)                                                                   | 0.01                                        | 72.7                   | 0.4                                        |
| SiR ( <b>1i</b> )    | 645 (93000)                                                                                  | 661 (0.41)                                                                   | 1 (Ref.) <sup>[e]</sup>                     | 64.5                   | 2.7                                        |
| 650SiR ( <b>1j</b> ) | 650 (42000)                                                                                  | 672 (0.36)                                                                   | 0.40                                        | < 5.6                  | 2.5                                        |
| 670SiR ( <b>1k</b> ) | 670 (150)                                                                                    | 696 (0.03)                                                                   | 0.0001                                      | –                      | 1.9 <sup>[d]</sup>                         |

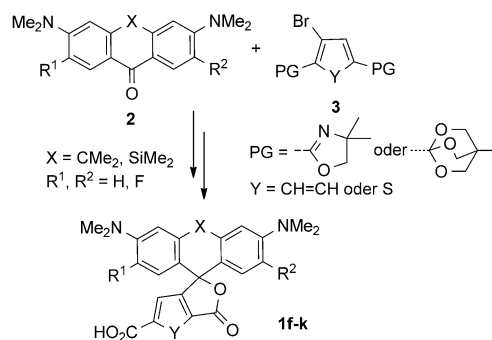
[a] Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen. [b] Relative

Helligkeit =  $(\epsilon \times \Phi_{\text{fl}})_{\text{Farbstoff}} / (\epsilon \times \Phi_{\text{fl}})_{\text{SiR}}$ . [c] Erläuterungen siehe Abbildung 1 und Text.

[d] In Methanol mit 1% (v/v) von Trifluoressigsäure. [e] Ref. = Referenz.

isoliert und an das bekannte O<sub>2</sub>-HaloTag-Amin (siehe Rest R in Schema 1) gebunden.<sup>[3]</sup>

Carbopyronine und Si-Rhodamine **1f-k** wurden, wie in Schema 2 dargestellt, aus Anthronen bzw. 10-Silaanthronen (Dibenzo[*b,e*]silin-10(5*H*)-onen) **2** synthetisiert. Dieser modulare Ansatz ermöglichte es, das trizyklische Fragment des Fluorophors und den biscarboxylierten aromatischen Ring unabhängig voneinander auszuwählen. Carbopyronin **1e** wurde aus einem geeigneten Carbofluorescein-*O*,*O'*-ditriflat<sup>[5f]</sup> und BocNHMe<sup>[4d]</sup> (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl) durch Buchwald-Hartwig-Amidierung hergestellt (Synthesebeschreibung siehe Hintergrundinformationen). Zwei Fluor substituente direkt am Rhodaminfluorophor (515R) verur-

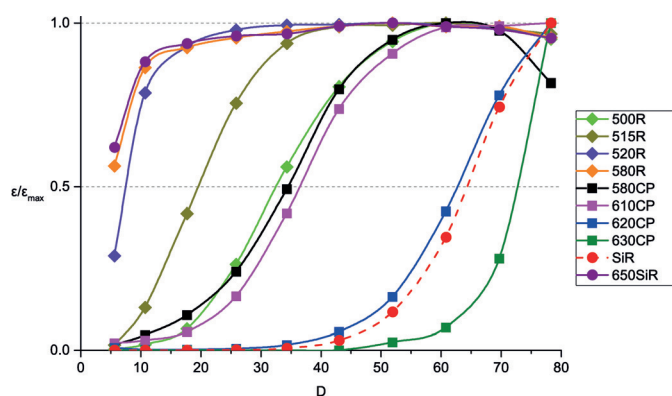


**Schema 2.** Allgemeiner Zugang zu rot emittierenden Carbopyroninen **1f-h** und Si-Rhodaminen **1i-k** mit freier Carboxygruppe für Biokonjugation. PG = Schutzgruppe.

sachten geringfügige hypsochrome und hypsofluore Verschiebungen (vgl. Daten für 515R und 520R in Tabelle 1). Ähnliche Fluorierungen der Carbopyronine **1g,h** und des Si-Rhodamins **1k** führten zu Rotverschiebungen der Absorptions- und Emissionsmaxima, sodass die Spektren der neuen Vertreter einen Anregungsbereich von  $\lambda = 600$ –670 nm aufweisen (Tabelle 1). Allerdings haben die fluorierten Farbstoffe **1h** und **1k** niedrige Fluoreszenzquantenausbeuten und -lebensdauern.

Fluorogenität – ein ausgeprägter Anstieg der Fluoreszenz als Ergebnis eines spezifischen intrazellulären Vorgangs<sup>[10]</sup> – wurde vor kurzem für das SiR-Konjugat mit dem HaloTag-Amin sowie den SNAP-Tag- und CLIP-Tag-Liganden<sup>[6h]</sup> sowie für SiR-Derivate, die sich in lebenden Zellen an Aktin- oder Tubulin-Netzwerke binden, berichtet.<sup>[6k]</sup> Bei Bindung an die jeweilige Zielstruktur nimmt die Fluoreszenzemission dieser Konjugate signifikant zu, weil das Gleichgewicht gegenüber dem ungebundenen Zustand (oder gegenüber unspezifischer Bindung an andere Proteine oder hydrophobe Strukturen) zur fluoreszierenden Zwitterionenform verschoben wird (Schema 1). Es war nun von Interesse, wie die Fluorogenität der neuen Farbstoffe mit ihren Eigenschaften als Marker für lebende Zellen korreliert.

Um den Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf das relative Vorhandensein der farbigen Zwitterionenform zu untersuchen, wurden für unsere Farbstoffe Reihen von Absorptionsspektren in wässrigen Dioxanlösungen mit 10–100% Wassergehalt (Dielektrizitätskonstanten  $D$  von 5.6–78; Abbildung 1) aufgenommen.<sup>[6h]</sup> Wie erwartet, steigt bei Erhöhung des Wassergehalts die Konzentration der ringgeöffneten, farbigen und damit fluoreszierenden Form jedes Farbstoffes. In allen Lösungen, außer den stark Dioxan-reichen, liegen die Rhodamine **1b-d** als Zwitterionen vor. Im Unterschied dazu liegen die Carbopyronine **1e-h** und das Si-Rhodamin **1i** in wässrigen Lösungen mit mehr als 50% Dioxan ( $D < 34.3$ ) überwiegend als farbloses Lacton vor. Für das Thiophenderivat von SiR (650SiR, **1j**)<sup>[11]</sup> scheint die Zyklisierung zum Lacton sehr ungünstig zu sein, da die angulare Spannung des mit dem



**Abbildung 1.** Normierte Absorption  $\epsilon/\epsilon_{\max}$  bei  $\lambda_{\max}$  von **1a–j** in wässrigem Dioxan gegen die Dielektrizitätskonstante  $D$  der Lösung. Die Kreuzung einer interpolierten Kurve mit der Geraden  $\epsilon/\epsilon_{\max} = 0.5$  entspricht dem  $D_{0.5}$ -Wert.<sup>[12]</sup> Die Absorbanz von **580CP (1e)**, **650SiR (1j)** und den Rhodaminen **1a–d** ist nicht monoton, wenn  $D > 65$  (vgl. Lit. [6h]).

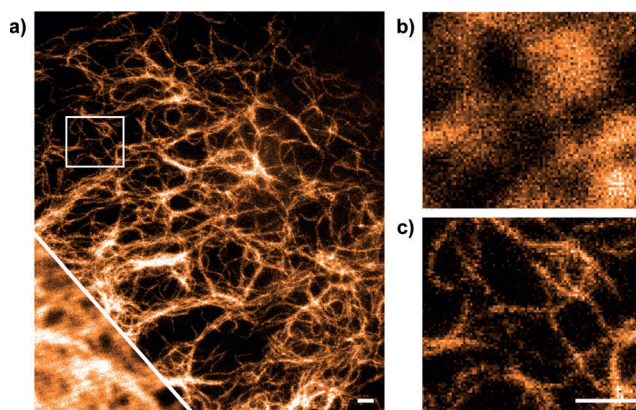
Thiophenring kondensierten [5,6]-Spirocyclus die Ringchlussreaktion verhindert.

Wir definieren den  $D_{0.5}$ -Wert eines Farbstoffs als Dielektrizitätskonstante seiner Lösung in wässrigem Dioxan, bei der die normierte Absorption  $A/A_{\max}$  (oder Extinktion  $\epsilon/\epsilon_{\max}$ ) des Farbstoffs die Hälfte des Maximalwerts über den gesamten Dioxan-Wasser-Gradienten zeigt (Abbildung 1). Auf dieser Skala entsprechen die niedrigen  $D_{0.5}$ -Werte den nicht fluorogenen Farbstoffen (Rhodamine **520R** und **580R (1c,d)** sowie **SiR-Thiophen 1j**). Die mittleren (20–40) für fluoridierte Rhodamine **1a,b** und Carbopyronine **1e,f** und hohen  $D_{0.5}$ -Werte (60–70) für **SiR** und **1g**<sup>[13]</sup> kennzeichnen fluorogenes Verhalten. **1k** ( $D_{0.5} > 70$ ) liegt in der farblosen Lactonform vor und ist wahrscheinlich zu dunkel für die Mikroskopie. Die Gegenwart von Fluoratomen (Rhodamin **1b** gegenüber **1c** und Carbopyronine **1g,h** gegenüber **1f**) oder von  $\text{CF}_3\text{CH}_2$ -Gruppen am Fluorophor (**1a** gegenüber **1c**) begünstigt selbst in polaren Lösungen die Verschiebung des Gleichgewichts in Schema 1 zur Lactonform (Abbildung 1). Dies kann durch die Destabilisierung der positiven Ladung an der C-9-Position des Fluorophors erklärt werden. Im Unterschied dazu hat der Austausch der *N,N*-Dimethylamino- (**1f**) gegen *N*-Methylaminogruppen (**1e**) keine wesentlichen Auswirkungen auf die  $D_{0.5}$ -Werte. Dies spiegelt sich auch in den geringen Unterschieden zwischen den  $\sigma_p$ -Konstanten der  $\text{Me}_2\text{N}$ - und  $\text{MeNH}$ -Substituenten ( $-0.83$  gegenüber  $-0.70$  nach Hammett) wider.<sup>[14]</sup> Gemäß dieser Tendenz zeigen die fluoridierten Carbopyronine **1g,h** ähnlich wie **SiR** starke Fluorogenität. Für **1g** und **1h** wurden bei kovalenter Bindung an das HaloTag-Protein mehr als zehnfache Anstiege der Emissionsintensitäten beobachtet (Abbildung S3). Die Konjugate der Rhodamine **1b–d**-Halo, des Carbopyronins **1f**-Halo (**610CP**) und des Si-Rhodamins **1j**-Halo (**650SiR**) sind weit weniger fluorogen.

Die Fluorogenität eines Farbstoffes kann auch auf andere experimentelle Weise ermittelt werden. Die Größe der Emissionsänderung nach der unspezifischen und reversiblen Bindung eines Farbstoffs mit Rinderalbuminserum (BSA) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS; Abbil-

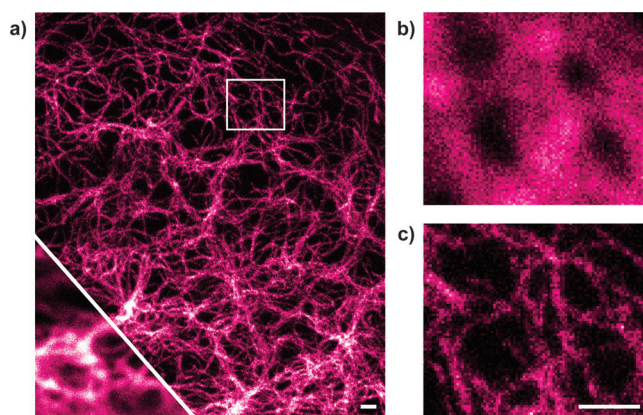
dung S4)<sup>[6h,k]</sup> korreliert mit der Fluorogenität des Farbstoffs in Gegenwart des HaloTag-Proteins. Interessanterweise führt die Zugabe von kationischem Cetyltrimethylammoniumbromid statt anionischem SDS zu einer reduzierten Emissionsintensität (Abbildung S4), was darauf schließen lässt, dass die Fluorogenität von **1g,h** und **SiR** (zumindest teilweise) durch die Stabilisierung des positiv geladenen Farbstoffkerns durch nahe zur Bindungsstelle liegende, negativ geladene Aminosäurereste des HaloTag-Proteins verursacht wird.

Die drei Rhodamine **500R (1a)**, **515R (1b)**<sup>[4b]</sup> und **520R (1c)** emittieren im grünen Spektralbereich. Ihre Fluoreszenzemission kann mit STED-Lasern im Bereich von  $\lambda = 590$  bis 620 nm unterdrückt werden, was sie zu möglichen Alternativen für die fluoreszierenden Proteine YFP und Citrin macht. Um die Anwendbarkeit der Farbstoffe **1a–c** in der optischen „Nanoskopie“ zu demonstrieren, wurden lebende Zellen mit einem Plasmid, das für ein Vimentin-HaloTag-Fusionsprotein codiert, transfiziert und 20 min in  $1\ \mu\text{M}$  Lösungen der Amide **500R**-, **515R**- und **520R**-Halo inkubiert (**500R**-, **520R**-Halo: HeLa-Zellen; Abbildung 2; **515R**-Halo:



**Abbildung 2.** Konfokal- und STED-Aufnahmen (Rohdaten) von Vimentinfilamenten in einer lebenden HeLa-Zelle, die ein Vimentin-HaloTag-Fusionsprotein exprimiert und mit **520R (1c-Halo)**;  $1\ \mu\text{M}$  für 20 min inkubiert wurde. a) STED-Bild mit der entsprechenden Konfokalaufnahme in der unteren linken Ecke. b) und c) zeigen jeweils Vergrößerungen der in (a) markierten Region der Konfokal- und STED-Aufnahme. Die optische Auflösung beträgt ca. 40 nm (siehe Abbildung S9). Maßstabsbalken: 500 nm; Anregungsleistung: 1.6  $\mu\text{W}$ ; STED-Leistung: 14 mW; Pixelverweildauer: 20  $\mu\text{s}$ ; Pixelgröße: 18 nm für das STED-, 20 nm für das Konfokalbild. Jede Linie wurde zweimal abgerastert, und die entsprechenden Pixel wurden aufsummiert.

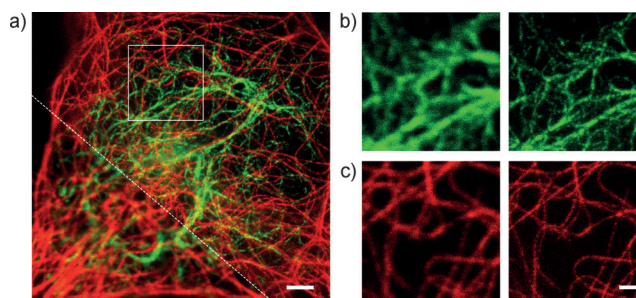
HeLa-, U2Os- und Ptk2-Zellen). Nach zehnmütigem Waschen in farbstofffreiem Zellkulturmedium zeigten die erfolgreich transfizierten Zellen eine helle und gleichmäßige Fluoreszenz der Vimentinfilamente ohne unspezifische Hintergrundemission. STED-Mikroskopie dieser Zellen ergab für **500R** (587-nm-STED-Wellenlänge) und **520R** (618-nm-STED-Wellenlänge) optische Auflösungen von ca. 40 nm sowie für **515R** (618-nm-STED-Wellenlänge) ca. 50 nm (Abbildungen S7–S9). Die Photostabilitäten der Rhodamine **515R** und **520R** gegenüber der von Citrin wurden unter konstanten STED-Bedingungen verglichen (Abbildung S10) und steigen in der Reihe Citrin < **515R** < **520R**.



**Abbildung 3.** Konfokal- und STED-Aufnahmen (Rohdaten) von Vimentinfilamenten in einer lebenden HeLa-Zelle, die ein Vimentin-HaloTag-Fusionsprotein exprimiert und mit *610CP* (1 f-Halo; 1  $\mu\text{m}$  für 20 min) inkubiert wurde. a) STED-Bild mit der entsprechenden Konfokalaufnahme in der unteren linken Ecke. b) und c) zeigen jeweils Ansichten der in (a) markierten Region der Konfokal- und STED-Aufnahme. Die optische Auflösung beträgt ca. 50 nm (siehe Abbildung S13). Maßstabsbalken: 500 nm; Pixelverweildauer: 20  $\mu\text{s}$ ; Pixelgröße: jeweils 20 nm. Jede Linie wurde zweimal abgerastert, und die entsprechenden Pixel wurden aufsummiert.

Im roten Spektralbereich (775-nm-STED-Wellenlänge) wurden das HaloTag-Amid des Rhodamins *580R* (1d-Halo) sowie die Carbopyronin- (1e–h-Halo) und Si-Rhodaminamide (1i–k-Halo) als fluoreszierende Marker für Vimentin-HaloTag-Konstrukte untersucht. Die drei Farbstoffe *580R*, *580CP* und *610CP* (Abbildung 3) lieferten gleichmäßig helle Bilder ohne Hintergrund. Die STED-Mikroskopie ergab optische Auflösungen von  $< 70$ ,  $\leq 60$  und ca. 50 nm für *580CP*, *580R* bzw. *610CP* (Abbildungen S11–S13). Bei den Farbstoffen *620CP* und *650SiR* war die Helligkeit der Bilder deutlich niedriger (Abbildungen S15 und S16). Die difluorierten Farbstoffe *630CP* und *670SiR* lieferten keine ausreichend hellen Bilder.

Die beiden Farbstoffe *580R* und *580CP* können mit *SiR* (1i)<sup>[6h,k]</sup> im Zweifarben-STED-Verfahren kombiniert werden, da die Emissionen aller drei Farbstoffe mit einem einzigen STED-Laser bei  $\lambda = 775$  nm ausgeschaltet werden können. Damit wird eine perfekte Überlagerung der beiden Farbkanäle gewährleistet.<sup>[4e]</sup> Während *SiR* bei  $\lambda \approx 640$  nm angeregt und seine Fluoreszenz im Bereich von  $\lambda = 650$ –700 nm selektiv detektiert wird, werden *580R* und *580CP* bei  $\lambda \approx 560$  nm oder  $\lambda \approx 590$  nm angeregt und im Bereich von  $\lambda = 605$ –625 nm detektiert und ermöglichen damit eine klare Farbtrennung (Abbildung S5) mit geringer Farbüberlagerung in den Detektionskanälen im Fall von *580R*. Die Abbildungen 4 und S17 zeigen Zweifarben-STED-Bilder lebender HeLa-Zellen (Vimentinfilamente entsprechend mit *580R* oder *580CP* markiert; Tubulin mit *SiR*-Tubulin gefärbt).<sup>[6k]</sup> Aus beiden Abbildungen wird deutlich, dass der höhere Wirkungsquerschnitt für STED im langwelligeren „roten“ Farbkanal zur besseren optischen Auflösung des *SiR*-Farbstoffes führt. Eine getrennte Regelung der STED-Leistung für jeden Farbkanal würde die Auflösung im „grünen“ Kanal verbessern und die Signalintensität im „roten“ Farbkanal verstärken.



**Abbildung 4.** Zweifarben-STED-Aufnahme (Rohdaten) von Vimentin (grün) und Tubulin (rot) einer lebenden HeLa-Zelle. Die Vimentinfilamente wurden mit *580R* in der Form 1d-Halo (1  $\mu\text{m}$ ) mittels HaloTag-Fusionsprotein angewendet, während endogenes Tubulin direkt mit dem *SiR*-Tubulin-Marker<sup>[6k]</sup> (0.5  $\mu\text{m}$ ) gefärbt wurde. a) STED-Bild mit der entsprechenden Konfokalaufnahme in der unteren linken Ecke. b) und c) zeigen jeweils Ansichten der in (a) markierten Region der Konfokal- und STED-Aufnahme der beiden Farbkanäle. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ ; Pixelverweildauer: 40  $\mu\text{s}$  für den *SiR*-Tubulin-Kanal (rot), 20  $\mu\text{s}$  für den *580R*-Vimentin-Kanal (grün); Pixelgröße: jeweils 20 nm. Die Farbkanäle wurden pixelweise aufgenommen; jede Linie wurde zweimal abgerastert, und die entsprechenden Pixel wurden aufsummiert.

Zusammenfassend entspricht ein  $D_{0.5}$ -Wert (Schema 1, Tabelle 1) der Fluorogenität und dem Anteil des fluoreszierenden Zwitterions eines Farbstoffs. Diese Eigenschaften können durch die elektronischen Effekte der Substituenten erklärt und für neue Farbstoffe vorhergesagt werden. Das fluorogene Verhalten eines Farbstoffs kann durch die Verwendung von Fluoratomen in den Alkylketten (z. B. in *500R*) oder direkt am Farbstoffkern (*515R*, *620CP*) sowie am Arenring beim *meso*-C-9-Kohlenstoffatom<sup>[15]</sup> begünstigt werden. Die hier dargestellten Grundlagen des Farbstoffbaus sind auch für die Entwicklung neuer fluorogener Farbstofftypen (z. B. Rhodole, Ge.<sup>[6c]</sup> und P-Rhodamine<sup>[16]</sup>) nützlich. Wir erwarten, dass die Farbstoffe *500R*, *515R*, *520R*, *580R*, *580CP*, *610CP*, *620CP* und *650SiR* und die strukturell ähnlichen Vertreter bei Verwendung mit SNAP- und CLIP-Tags ähnlich gute oder sogar bessere Eigenschaften zeigen werden, da die Erkennungseinheiten dieser Tags hydrophiler als der HaloTag-Ligand sind.

Auch wenn die Fluorogenität für fluoreszierende Marker vorteilhaft ist, stehen die  $D_{0.5}$ -Werte der Rhodamine 1a–d (Tabelle 1) nicht im Zusammenhang mit ihren Bildgebungseigenschaften, da alle diese Farbstoffe spezifisch binden und Bilder ohne Hintergrund ergeben. Das hervorragende Verhalten von *580R* in lebenden Zellen trotz der voluminösen und rigiden Struktur des polyzyklischen Gerüsts zeigt, dass die Hydroxylierung des Fluorophors eine vielversprechende Methode zur Herstellung eines wasserlöslichen, zellgängigen und spezifisch bindenden Farbstoffs ist.

Die Auswahl der fluoreszierenden Farbstoffe für die „Nanoskopie“ an lebenden Zellen hängt oft von den verfügbaren Geräten ab. Die grün emittierenden Rhodamine *500R* (1a), *515R* (1b) und *520R* (1c) lieferten herausragende Bilder mit den 587-nm- (1a) oder 618-nm-STED-Lasern (1b,c). Das Rhodamin *520R* ist überragend bezüglich seiner erreichbaren optischen Auflösung und Photostabilität. Diese Eigenschaften sind besonders vorteilhaft bei mehreren, sich wiederho-

lenden STED-Aufnahmen. Somit ist das Rhodamin 520R ein wertvoller Marker für die zeitaufgelöste Verfolgung von dynamischen Vorgängen. Die grün oder gelb emittierenden FP sind lichtbeständiger als die rot emittierenden und ermöglichen eine höhere optische Auflösung in der STED-Mikroskopie. Deswegen bieten die neuen synthetischen Farbstoffe im gesamten spektralen Bereich eine bessere Alternative zu den FPs. Rhodamin 580R (**1d**) sowie die Carbopyronine 580CP (**1e**) und 610CP (**1f**) sind besonders gut für die STED-Mikroskopie an lebenden Zellen mit einem 775-nm-Laser geeignet. Höhere STED-Wellenlängen bieten den Vorteil, weniger mit biologischer Materie in Wechselwirkung zu stehen. Dadurch erlaubt die Kombination von SiR mit 580R oder 580CP hochqualitative „Nanoskopie“ an lebenden Zellen in zwei Farben und ist die natürliche Wahl für den am häufigsten verwendeten 775-nm-STED-Laser.

### Danksagung

Wir danken Prof. Y. Okada (RIKEN Quantitative Biology Center, Osaka, Japan) für das  $\beta$ -Tubulin-Halo-Plasmid, T. Gilat und Dr. E. Rothermel (MPIBPC) für Zellkultur und Transfektion, M. Pulst, J. Bienert (MPIBPC), Dr. M. John, Dr. H. Frauendorf et al. (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen) für UV/Vis-, NMR- und ESI-MS-Spektren, Prof. M. L. Bossi (University of Buenos Aires, Argentinien) für das Bestimmen von Fluoreszenzlebensdauern sowie Dr. S. Vos und Prof. P. Cramer (MPIBPC) für den Zugang zum Tecan-Mikrotiterplatten-Lesegerät. S.W.H. wurde vom BMBF (BMBF 513) unterstützt (Optische Technologien für Biowissenschaften und Gesundheit, FKZ 13N11066). J.G.D. wurde aus Mitteln des People Programmes (Marie Curie Actions) im 7. Rahmenprogramm der EU (FP7/2007–2013) unterstützt (REA grant agreement PIEF-GA-2011–299283).

**Stichwörter:** Carbopyronine · Fluoreszenz · Lebende Zellen · Optische Mikroskopie · Rhodamine

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3290–3294  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 3350–3355

- [1] a) M. Fernández-Suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 929–943; b) M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212; c) L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855–866; d) K. Umezawa, D. Citterio, K. Suzuki, *Anal. Sci.* **2014**, *30*, 327–349; e) S. van de Linde, M. Sauer, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1076–1087; f) T. J. Chozinski, L. A. Gagnon, J. C. Vaughan, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 3603–3612; g) A. G. Godin, B. Lounis, L. Cognet, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 1777–1784; h) J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakina, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 244–250.
- [2] a) C. Eggeling, S. W. Hell, *STED Fluorescence Nanoscopy*, Springer Ser. in Fluorescence (Hrsg.: P. Tinnefeld, C. Eggeling, S. W. Hell), Springer, Berlin-Heidelberg, **2015**, S. 4–25; b) T. J. Gould, P. A. Pellett, J. Bewersdorf, *STED Microscopy*. In: *Fluorescence Microscopy: from Principles to Biological Applications*, **2013**, S. 375–392, Wiley-VCH.
- [3] a) 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. Klauert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382; b) <http://www.promegaconnections.com/tag/halotag>.
- [4] a) M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2410–2433; b) G. Y. Mitronova, V. N. Belov, M. L. Bossi, C. A. Wurm, L. Meyer, R. Medda, G. Moneron, S. Bretschneider, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4477–4488; c) V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. Jakobs, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520–3523; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3598–3602; d) J. B. Grimm, L. D. Lavis, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6354–6357; e) K. Kolmakov, C. A. Wurm, D. N. H. Meineke, F. Göttfert, V. P. Boyarskiy, V. N. Belov, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 146–157.
- [5] a) C. Aaron, C. C. Barker, *J. Chem. Soc. B* **1971**, 319–324; b) J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, N. U. Kemnitzer, A. Zilles, K.-H. Drexhage, *Spectrochim. Acta* **2001**, *##57A*, 2271–2283; c) R. O'Neill, P. V. Fischer (Guava Tech. Inc.), WO 2004/003510A2; d) K.-H. Drexhage, J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, A. Zilles, US 6,828,159 B1; e) K. Kolmakov, V. N. Belov, C. A. Wurm, B. Harke, M. Leutenegger, C. Eggeling, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3593–3610; f) J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig, L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1303–1310.
- [6] a) M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao, Y. Xu, *Chem. Commun.* **2008**, 1780–1782; b) Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, W. Piao, M. Kusakabe, N. Saito, T. Terai, T. Okabe, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5029–5031; c) Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 600–608; d) T. E. McCann, N. Kosaka, Y. Koide, M. Mitsunaga, P. L. Choyke, T. Nagano, Y. Urano, H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2531–2538; e) T. Pastierik, P. Šebelj, J. Medalová, P. Štacko, P. Klán, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3374–3382; f) P. Shieh, M. S. Siegrist, A. J. Cullen, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5456–5461; g) T. Wang, Q.-J. Zhao, H.-G. Hu, S.-C. Yu, X. Liu, L. Liu, Q.-Y. Wu, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8781–8783; h) G. Lukinavičius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Corrêa, Jr., Z.-G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Huppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132–139; i) E. Kim, K. S. Yang, R. J. Giedt, R. Weissleder, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4504–4507; j) B. Wang, X. Chai, W. Zhu, T. Wang, Q. Wu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14374–14377; k) G. Lukinavičius, L. Reymond, E. D'Este, A. Masharina, F. Göttfert, H. Ta, A. Günther, M. Fournier, S. Rizzo, H. Waldmann, C. Blaukopf, C. Sommer, D. W. Gerlich, H.-D. Arndt, S. W. Hell, K. Johnsson, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 731–733; l) P. Horváth, P. Šebelj, T. Šolomek, P. Klán, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 1299–1311; m) Y. Kishida, T. Nagano, K. Hanaoka, *Analyst* **2015**, *140*, 685–695.
- [7] Die Strukturen der zellgängigen Farbstoffe und deren aus dem HaloTag-Amin zugänglichen Amide sind in Abbildung S1 dargestellt. Promega Corp. bietet AMCA, Rhodamin 110, TMR und di-O-acetylierte Derivate von Fluorescein und Oregon Green. Spirochrom verkauft Derivate vom Si-Rhodamin (*SiR*).
- [8] Abberior Instruments GmbH bietet STED-Mikroskope mit gepulsten 595-nm- und 775-nm-STED-Lasern und Leica Microsystems solche mit 592-nm- (gated; CW), 660-nm- (gated; CW) und 775-nm-STED (pulsed); PicoQuant GmbH verkauft ein STED-Mikroskop mit dem 765-nm-Laser.
- [9] a) F. Stagge, G. Y. Mitronova, V. N. Belov, C. A. Wurm, S. Jakobs, *PLoS One* **2013**, *8*, e78745; b) I. R. Corrêa, Jr., B. Baker, A. Zhang, L. Sun, C. R. Provost, G. Lukinavičius, L. Reymond, K. Johnsson, M.-Q. Xu, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 5414–5420.

- [10] a) A. Nadler, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408–2410; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2466–2469; b) Y. Hori, K. Kikuchi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 644–650; c) Y. Chen, K. Tsao, J. W. Keillor, *Can. J. Chem.* **2015**, *93*, 389–398.
- [11] K. Groves, R. Buff (Visen Medical Inc.), WO 2014/144793 A1.
- [12] Bearbeitet mit Origin-9.1-Software und modifizierten Bézier-Kurven; siehe <http://www.originlab.com/doc/Origin-Help/PD-Dialog-Line-Tab> für die Einführung in den Algorithmus. Der  $D_{0.5}$ -Wert für einen Farbstoff kann durch Lösen der Gleichung  $d^2(\epsilon/\epsilon_{\max})/dD^2 = 0$  erhalten werden.
- [13] Der von uns gemessene  $D_{0.5}$ -Wert für SiR (64.5) ist höher als der aufgrund von Abbildung 1 b in Lit. [6h] geschätzte Wert ( $D_{0.5} \approx 30$ ).
- [14] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.
- [15] K. Kolmakov, E. Hebisch, T. Wolfram, L. A. Nordwig, C. A. Wurm, H. Ta, V. Westphal, V. N. Belov, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 13344–13356.
- [16] X. Chai, X. Cui, B. Wang, F. Yang, Y. Cai, Q. Wu, T. Wang, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16754–16758.

Eingegangen am 26. November 2015  
Online veröffentlicht am 4. Februar 2016