

Rhodamine NN: eine neue Klasse maskierter Fluoreszenzfarbstoffe**

Vladimir N. Belov,* Christian A. Wurm,* Vadim P. Boyarskiy, Stefan Jakobs und Stefan W. Hell*

Maskierte Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Einführung einer photochemisch labilen Gruppe in einem nichtfluoreszierenden Zustand gehalten. Durch Bestrahlung mit UV-Licht kommt es zur Abspaltung der Maskierungsgruppe und somit zur Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffs.^[1a-c] Der Bedarf an maskierten Fluoreszenzfarbstoffen für die Mikroskopie biologischer Proben ist sehr hoch, da diese unter anderem zur Analyse von Proteindynamiken,^[1d,e] für die Mehrfarben-Fluoreszenzmikroskopie^[1f] und für die optische Nanoskopie^[1g] eingesetzt werden können. Als Maskierungsgruppen werden oftmals *o*-Nitrobenzyl-Gruppen genutzt. Aufgrund ihrer schwierigen Synthese und der Freisetzung unerwünschter Nebenprodukte bei der Photolyse ist die Einsetzbarkeit dieser Farbstoffe jedoch begrenzt.

Hier berichten wir über die Synthese und Charakterisierung einer neuen Klasse maskierter Fluoreszenzfarbstoffe: Die Rhodamin-NN-Farbstoffe zeichnen sich durch eine 2-Diazoketon-Gruppe (COCNN) aus, die in ein Spiro-9H-xanthen-Fragment eingebaut ist (Verbindungen **3** und **9-R** in Schema 1 bzw. Schema 3). Die kleine 2-Diazoketon-Gruppe ist das Kernelement dieser neuen Klasse maskierter Rhodamine mit außergewöhnlichen Eigenschaften: Rhodamin NN kann leicht hergestellt, an Biomoleküle konjugiert und mit Wellenlängen unterhalb von 420 nm schnell zu hell fluoreszierenden Derivaten demaskiert werden, ist in wässrigen Puffern sowie in verschiedenen Einbettungsmedien einsetzbar und eignet sich gut für den Einsatz in der Lichtmikroskopie.

In der Lichtmikroskopie können die neuen maskierten Rhodamine einzeln oder in Kombination mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen und schaltbaren Rhodamin-Spiroamiden verwendet werden.^[2] Somit ist es möglich, neue Bildgebungsverfahren zu nutzen, die auf der stufenweisen Aktivierung und Detektion verschiedener Fluorophore be-

ruhen. Die Kombination der neuen Rhodamin-NN-Farbstoffe **9-R** mit dem photochromen Spiroamid von Rhodamin S^[2e] und einem nicht maskierten *N,N,N',N'*-Tetramethylrhodamin ergibt ein monochromatisches Multimarker-Mikroskopieschema,^[3] das trotz Verwendung von Fluorophoren mit ähnlichen Absorptions- und Emissionsspektren eine niedrige gegenseitige Beeinflussung („crosstalk“) zwischen den einzelnen Fluoreszenzkanälen aufweist.^[2d,4]

Rhodamine sind sehr photostabile und helle Fluoreszenzfarbstoffe, die leicht chemisch modifiziert^[5] und maskiert werden können.^[6] Cumarine^[7] und Fluorescein^[8] können ebenfalls als maskierte Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.^[9] Als photolabile Einheiten enthalten die meisten maskierten Verbindungen eine 2-Nitrobenzyl-Gruppe oder Derivate mit einer Alkyl- oder Carboxygruppe in α -Stellung zum Phenylring (an der CH₂-Gruppe) und/oder ein bis zwei Methoxygruppen am aromatischen Ring.^[10] Für eine Biokonjugation müssen diese Verbindungen zusätzlich über eine freie Carboxygruppe verfügen. Jedoch ist die Synthese von maskierten Rhodaminen mit einer freien („zweiten“) Carboxygruppe sehr schwierig und mit geringen Ausbeuten verbunden.^[6a]

Die 2-Nitrobenzyl-Gruppe und ihre Derivate sind sperrig, außerdem kommt es bei ihrer Photolyse zur Freisetzung hoch reaktiver 2-Nitrosobenzaldehyde oder 2-Nitrosobenzophenone. Es wird vermutet, dass diese Verbindungen oder deren Oligomere für lebende Zellen toxisch sind. Da sie außerdem farbig sind, besteht die Gefahr, dass sie optische Messungen stören.

Weitere Maskierungsgruppen mit der benötigten Absorption im UV-Bereich sind ebenso recht groß und lipophil, und ihre Synthese sowie das Einbringen in Zellen ist oftmals schwierig. Beispielsweise wurde beschrieben, dass 2-(*N,N*-Dimethylamino)-5-nitrophenol eine Reihe photolabiler Phenylester bildet.^[11] 7-Diethylamino-4-(hydroxymethyl)-2*H*-chromen-2-on bildet Ester, die durch Bestrahlung bei 412 nm leicht gespalten werden können.^[12] Auch Derivate von 8-Brom-7-hydroxychinolinen^[13] und 6-Brom-7-hydroxycumarinen^[14] wurden als lichtempfindliche Schutzgruppen vorgeschlagen. Jedoch entstehen bei der Photolyse derart maskierter Verbindungen ebenfalls lichtabsorbierende Nebenprodukte.

Wir haben uns entschlossen, maskierte Fluoreszenzfarbstoffe ohne große Markierungsgruppen zu erzeugen. Ein kleines 2-Diazoketon-Fragment wäre eine ideale Maskierungsgruppe, sofern es möglich wäre, es in die farblose Form eines Farbstoffs zu integrieren und diesen dann durch Photolyse in seine fluoreszierende Form zu überführen. Rhodamine eignen sich sehr gut für diesen Zweck, da sie eine Carboxygruppe enthalten, die mit einem Spiro-9*H*-xanthen-Rest ein farbloses, nichtfluoreszierendes Lacton oder Lactam

[*] Dr. V. N. Belov, Dr. C. A. Wurm, Dr. V. P. Boyarskiy, Dr. S. Jakobs, Prof. Dr. S. W. Hell
Abteilung NanoBiophotonik
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2506
E-Mail: vbelov@gwdg.de
cwurm@gwdg.de
shell@gwdg.de

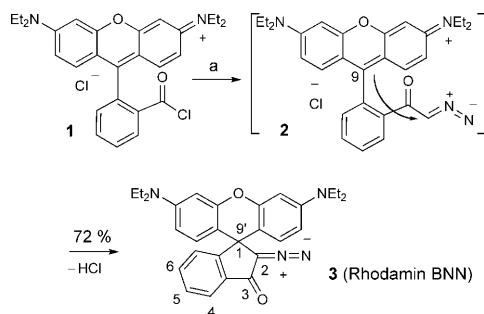
Homepage: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/200/>

[**] Diese Arbeit wurde durch den Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Preis der DFG (an S.W.H.) und die Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Die Autoren danken Donald Ouw (MPI), Reinhard Machinek, Dr. Holm Frauendorf und ihren Mitarbeitern (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen) für die Aufnahme von Spektren.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000150> zu finden.

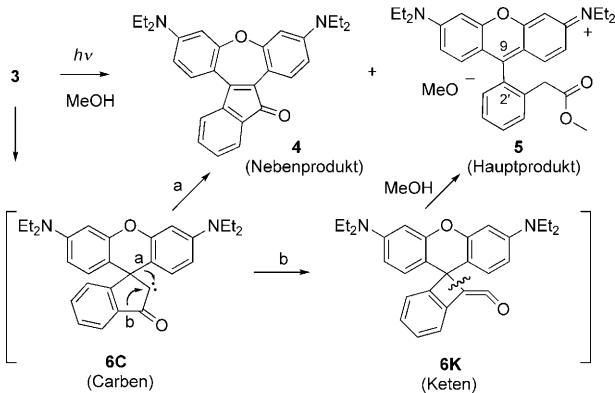
bilden. Des Weiteren kann diese Carboxyfunktion in ein 2-Diazoketon umgewandelt werden.

Zur Realisierung dieser Maskierungsstrategie haben wir Diazomethan mit Rhodamin-B-Säurechlorid **1** umgesetzt und in hoher Ausbeute das gelbe kristalline Diazoketon **3** erhalten (Schema 1).^[15] Im Verlauf der Maskierungsreaktion greift das positiv geladene C9-Atom des Xanthens am negativ geladenen Kohlenstoffatom der Diazogruppe im Zwischenprodukt **2** an. Unter Abspaltung eines Protons entsteht dann ein stabiler Fünfring.



Schema 1. Synthese von Rhodamin BNN (**3**) durch Umwandlung von Rhodamin-B-Säurechlorid (**1**) in die Spiro-Diazoketon-Form: a) CH_2N_2 in $\text{THF}, \text{Et}_3\text{N}$, 0°C – 20°C , 12 h.

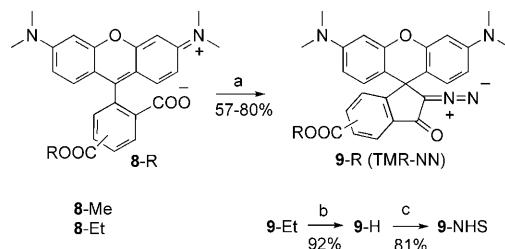
Anschließend haben wir die Photolyse der maskierten Modellverbindung **3** untersucht (Schema 2). Nach Bestrahlung mit UV-Licht wurden die beiden Produkte **4** und **5** in der Reaktionsmischung detektiert und isoliert. Die Bildung des



Schema 2. Bei der Bestrahlung von (maskiertem) Rhodamin BNN (**3**) in Methanol mit UV-Licht (320 nm) entsteht der hell fluoreszierende Ester **5** als Hauptprodukt; laut HPLC- und UV/Vis-Spektren beträgt das Mengenverhältnis der Verbindungen **5** und **4** ca. 3:1 (in Methanol).

nichtfluoreszierenden Ketons **4** kann durch die Umstellung der Bindung „a“ im Carben-Intermediat **6C** erklärt werden. Das rote und fluoreszierende Hauptprodukt **5** entsteht durch eine Wolff-Umlagerung vom Carben **6C** zu Keten **6K** (mit einer Wanderung der Bindung „b“) gefolgt von der Addition von Methanol an das hochreaktive Keten und dem Bruch der Bindung zum quartären Kohlenstoffatom.^[16a]

Zur Biokonjugation werden Verbindungen mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe benötigt. Um eine freie Carboxygruppe im Benzoylrest des Diazoketons **9-R** (Schema 3) zur Verfügung zu stellen, wurden die Methyl- und



Schema 3. Synthese von maskiertem TMR-NN. Umwandlung von 5(6)-Alkoxykarbonyl-*N,N,N',N'*-tetramethylrhodamin **8-R** in das Diazoketon **9-R**: a) $(\text{COCl})_2$ in CH_2Cl_2 , 20°C , 2–4 h; 2 m $\text{Me}_3\text{SiCH}=\text{N}=\text{N}^{[16b]}$ in Diethylether, CH_2Cl_2 , Et_3N , 0 – 20°C , 11–18 h; b) 1 m wässr. NaOH , EtOH , THF , 20°C , 16 h; c) N,N,N',N' -Tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)isoharnstoff-tetrafluoroborat, DMF , $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, 20°C , 2 h.

Ethylester von 5/6-Carboxy-*N,N,N',N'*-tetramethylrhodamin **8-R** als Ausgangsmaterial hergestellt.^[15] Auf diesem Weg gelingen die Synthese und Verseifung von Estern mit einem maskierten Rhodamin-Fragment, ohne das Spiro-Diazoketon-Fragment abzubauen. Eine Mischung der regioisomeren *N*-Hydroxysuccinimidyl-Ester **9-NHS** wurde dann für die Immunmarkierungsexperimente eingesetzt.

Das Absorptionsspektrum von **3** (Abbildung 1) zeigt drei Maxima bei 241 nm ($\varepsilon = 60000$), 268 nm ($\varepsilon = 33000$) und 312 nm ($\varepsilon = 17000$). Die α -Benzoyldiazoalkane weisen bei etwa 320 nm eine Absorption mit $\varepsilon = 12000$ auf. Das Maximum bei 312 nm entspricht dem am Benzoyldiazomethan-Chromophor lokalisierten elektronischen Übergang, an dem eventuell auch das $9H$ -Xanthen-Fragment beteiligt ist. Da während der Photolyse aufgrund des effizienten Energietransfers jedoch die schwächste Bindung des Moleküls ge-

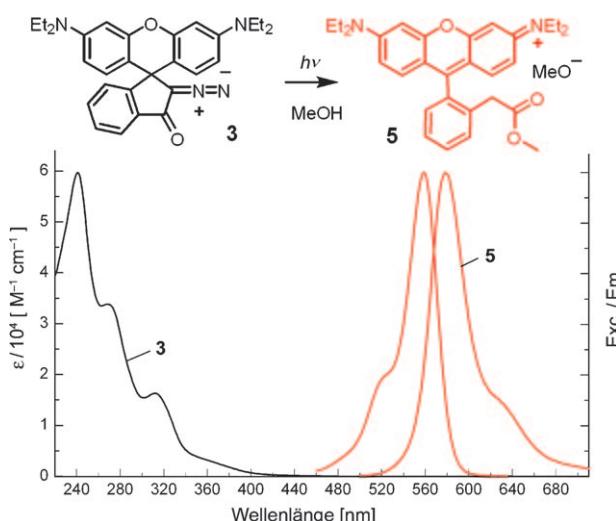


Abbildung 1. Absorption von Rhodamin BNN (**3**; schwarz; linke Achse) in Acetonitril; Absorptions- und Emissionsspektren der demaskierten Substanz **5** in Methanol (rot; rechte Achse).

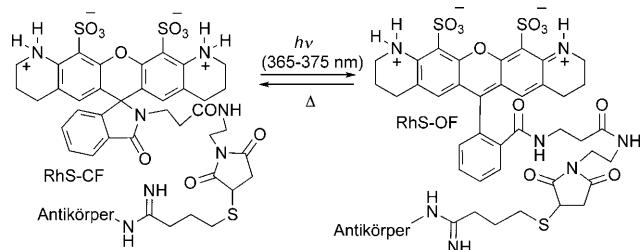
brochen wird, kommt es zur Eliminierung von Distickstoff. Umgebende Lösungsmittel, wie sie in Einbettungsmedien für biologische Proben vorkommen, haben nur einen geringen Einfluss auf die Demaskierungsreaktion (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

Die herausragende Eigenschaft des Absorptionsspektrums von **3** (und **9-R**) ist eine Schulter um 375 nm, die sich bis 420 nm hinzieht. Aufgrund dieses Verlaufs ist es nicht verwunderlich, dass eine effiziente Photoaktivierungs-(Demaskierungs-)Reaktion nicht nur bei Bestrahlung mit 360–375 nm, sondern auch mit 405–420 nm möglich ist (Abbildung S2).

Die Absorptions- und Emissionsmaxima von Rhodamin-Derivat **5**, das nach der Photolyse von Diazoketon **3** isoliert wurde, liegen bei 559 nm ($\epsilon = 66\,000$) und 579 nm (Abbildung 1). Die Fluoreszenz-Quantenausbeute der Verbindung ist 0.37.^[17] Die spektralen Eigenschaften des Produkts nach der Demaskierung unterscheiden sich kaum von denen des ursprünglichen Fluoreszenzfarbstoffs (Tabelle S1). Die Wolff-Umlagerung führt zu einer Verlängerung der Kohlenstoffkette um eine Methylengruppe zwischen dem *o*-substituierten Phenyl- und dem Methoxycarbonyl-Rest in **3**. Somit wird dessen sterische Hinderung gemindert und die Rotation um die Einfachbindung C9-C2' erleichtert (im Vergleich zu der Situation, dass eine 2-Carboxyphenyl-Gruppe direkt an C9 gebunden ist). Die freie Rotation von Molekülgruppen im angeregten Zustand könnte somit Energie abführen und die Wahrscheinlichkeit eines radiativen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergangs reduzieren. Dies hätte einen geringen Verlust an Fluoreszenz-Quantenausbeute zur Folge. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass der demaskierte Farbstoff aufgrund seiner Fluoreszenz-Quantenausbeute (Tabelle S1) gut zur Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder geeignet ist. Weiterhin sollte die geringe Menge des Nebenprodukts **4** nicht bei mikroskopischen Anwendungen stören.

Bei der Mehrfarben-Fluoreszenzmikroskopie werden die Fluoreszenzfarbstoffe üblicherweise anhand ihrer Absorptions- und Emissionsspektren unterschieden. Chromatische Aberrationen können hierbei zu Artefakten führen.^[3,18] Um dieses Problem zu umgehen und die Zahl der Anregungsquellen und Detektionskanäle zu reduzieren, haben wir drei Fluorophore kombiniert, die ähnliche Absorptions- und Emissionsspektren aufweisen: 5/6-Carboxy-*N,N,N',N'*-Tetramethylrhodamin (TMR, **8-H**), TMR-NN (**9-R**, siehe Schema 3) und das Spiroamid von Rhodamin S^[2e] (RhS, siehe Schema 4). Zur Unterscheidung dieser drei Farbstoffe, deren fluoreszierende Formen sehr ähnliche Absorptions- und Anregungsspektren aufweisen (Tabelle S1), wurden ihre individuellen Schalt- und Demaskierungscharakteristika genutzt: TMR ist nicht schaltbar, TMR-NN kann durch Beleuchtung mit UV-Licht ($\lambda \approx 420$ nm) demaskiert werden, und das Spiroamid von Rhodamin S kann bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda \leq 375$ nm) aktiviert werden.

Für die Lichtmikroskopie wurden zunächst drei Strukturen innerhalb kultivierter Säugerzellen (PtK2) mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert: das Aktin-Zytoskelett, das Tubulin-Zytoskelett und die Peroxisomen. Zur Anfärbung von F-Aktin wurde Phalloidin-gekuppeltes TMR eingesetzt, während die beiden anderen Strukturen mit sekun-



Schema 4. Durch Photoaktivierung entsteht aus Biokonjugaten der farblosen „geschlossenen“ Spiroamid-Form (RhS-CF) und Antikörpern die hell fluoreszierende „offene“ Form (RhS-OF), die bei erneutem Lichtausschluss wieder in die „geschlossene“ Form (RhS-CF) übergeht.^[15]

dären Antikörpern, die an TMR-NN oder RhS gekuppelt waren, markiert wurden. Die so gefärbten Zellen wurden nach dem in Abbildung 2a gezeigten Schema untersucht: Zuerst wurde Phalloidin-TMR aufgenommen (Anregung 546/12 nm, Emission 600/40 nm; ca. 40 W cm⁻²). Anschließend wurden alle TMR-Moleküle durch intensive Bestrahlung mit grünem Licht (546 nm) irreversibel gebleicht. Da weder die maskierte Form von TMR-NN noch die „geschlossene Form“ von RhS grünes Licht absorbiert, beeinflusst dies die beiden anderen Farbstoffe nicht. Anschließend wurde TMR-NN durch Beleuchtung mit UV-Licht demaskiert (420/30 nm; ca. 35 W cm⁻²; Abbildung S3). Dabei ist wichtig, dass RhS-CF trotz eines Absorptionsmaximums bei

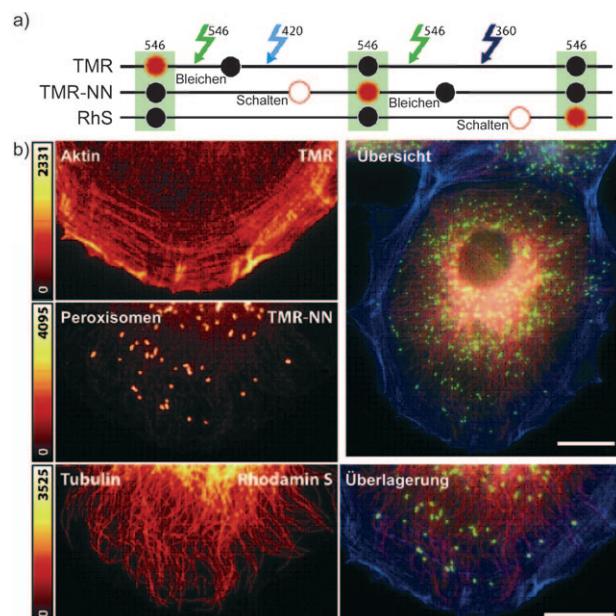


Abbildung 2. Monochromatische Multimarker-Mikroskopie: a) Mikroskopieschema (ausführliche Beschreibung siehe Text). b) Einsatz des Mikroskopieschemas für die Aufnahme immunmarkierter Strukturen in Säugerzellen (PtK2). Als erstes wird das TMR-markierte Aktin-Zytoskelett aufgenommen, dann die TMR-NN-markierten Peroxisomen und schließlich das RhS-markierte Mikrotubuli-Zytoskelett. Zur besseren Unterscheidung wurden in den Übersichts- und Überlagerungsbildern unterschiedliche Farben verwendet. Obwohl etwas Übersprechen erkennbar ist, ist die Aufnahme und Trennung der einzelnen Kanäle ohne weitere Bildverarbeitung möglich. Maßstab 10 µm.

331 nm (in Wasser)^[2e] gegenüber Licht mit $\lambda = 420$ nm (bei den eingesetzten Lichtintensitäten) unempfindlich ist. Dann wurden die Peroxisomen durch Anregung des demaskierten TMR-NN mit grünem Licht aufgenommen. Anschließend wurden die demaskierten Fluorophore wieder irreversibel mit grünem Licht gebleicht. Schließlich wurde das RhS-markierte Mikrotubuli-Zytoskelett aufgenommen. Hierzu wurde RhS durch Bestrahlung mit UV-Licht (360/40 nm; ca. 10 W cm⁻²) aktiviert und unter Verwendung von grünem Licht aufgenommen. Dadurch wird die nichtfluoreszierende geschlossene Form in die hell fluoreszierende offene Form überführt (Schema 4 und Abbildung S4).

Dieses monochromatische Mikroskopieschema nutzt ausschließlich grünes Licht für die Anregung der Fluorophore und nur einen einzigen Detektionskanal. Obwohl etwas Übersprechen („crosstalk“) erkennbar ist,^[15] ist die Aufnahme und Trennung der einzelnen Kanäle ohne weitere Bildverarbeitung möglich. Folglich ist es mit diesem Mikroskopieschema möglich, (Co-)Lokalisationsanalysen unter Verwendung dreier Farbstoffe und eines einzigen Detektionskanals durchzuführen.

Die beschriebene Prozedur zur Herstellung maskierter Fluoreszenzfarbstoffe kann für alle *N,N,N',N'*-Tetraalkylrhodamine, Carbopyronine und eventuell auch für andere kationische Farbstoffe (z.B. Triaryl-methyl-Derivate) eingesetzt werden. Daher kann der vorgestellte Ansatz auf viele weitere (Fluoreszenz-)Farbstoffe (und Anregungsquellen) erweitert werden. Rhodamin NN kann aufgrund seiner kompakten Struktur und der geringen Größe der Maskierungsgruppe die Membranen von lebenden Zellen durchdringen.^[19] In Kombination mit Techniken zur protein-spezifischen Markierung,^[20] wie sie bei Halo- und SNAP-Tag realisiert sind, könnten die hier vorgestellten zellpermeablen maskierten Rhodamine die Möglichkeiten von Lebendzell-Markierungen, die auf der Bindung genetisch kodierter Protein-Tags an organische Fluorophore beruhen, deutlich erweitern. Die räumlich eingeschränkte Photoaktivierung von Rhodamin NN, gefolgt von der Analyse der Bewegung der demaskierten Moleküle, sollte außerdem Messungen der Moleküldynamik ermöglichen (z.B. Bestimmung von Diffusionsparametern oder Flussgeschwindigkeiten). Durch den Einsatz von Rhodamin NN in Nanoskopietechniken^[21] (z.B. (STED) oder Einzelmolekül-schalten gefolgt von der Lokalisierung des Signals^[2e]) sollten zusätzliche Strukturinformationen verfügbar werden. Außerdem sollten Messungen des FRET-Signals von frisch demaskierten fluoreszierenden Flächen, die sich in der Nähe von permanent gefärbten Regionen befinden, weitere Details über die Strukturen dieser kleinen Bereiche (1–10 nm) offenlegen.

Eingegangen am 11. Januar 2010
Online veröffentlicht am 9. April 2010

Stichwörter: Diazofarbstoffe · Fluoreszenz · Markierungsreagentien · Maskierte Fluoreszenzfarbstoffe · Rhodamine

- [1] Übersichten zu photolabilen (Schutz-)Gruppen: a) V. N. Rajasekharan Pillai, *Synthesis* **1980**, 1–26; b) C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142; c) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 441–458; d) J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 444–456; e) D. S. Lidke, B. S. Wilson, *Trends Cell Biol.* **2009**, 19, 566–574; f) R. A. Neher, M. Mitkovski, F. Kirchhoff, E. Neher, F. Theis, A. Zeung, *Biophys. J.* **2009**, 96, 3791–3800. Neueste Daten zu photoaktivierbaren Azido-Fluorogenen: S. J. Lord, H. D. Lee, R. Samuel, R. Weber, N. Liu, N. R. Conley, M. A. Thompson, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2010**, DOI: 10.1021/jp907080r.
- [2] a) K. H. Knauer, R. Gleiter, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 116–117; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 113–113; b) H. Willwohl, J. Wolfrum, R. Gleiter, *Laser Chem.* **1989**, 10, 63–72; c) J. Fölling, V. Belov, R. Kunetsky, R. Medda, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, M. Bossi, S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6382–6386; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6266–6270; d) M. Bossi, J. Fölling, V. N. Belov, V. P. Boyarskiy, R. Medda, A. Egner, C. Eggeling, A. Schönle, S. W. Hell, *Nano Lett.* **2008**, 8, 2463–2468; e) V. N. Belov, M. L. Bossi, J. Fölling, V. P. Boyarskiy, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 10762–10776.
- [3] Siehe: M. Andresen, A. C. Stiel, J. Fölling, D. Wenzel, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 1035–1040.
- [4] a) A. S. Schönle, S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 1234–1235; b) siehe Lit. [1f].
- [5] a) M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2410–2433; b) M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 190–212; c) R. P. Haugland, *A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, Invitrogen, Carlsbad, **2005**, S. 11–37; zur Anwendung von Rhodaminen in der Biokonjugation: d) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Amsterdam, **2008**, S. 415–427.
- [6] a) Rhodamin Q: T. J. Mitchison, K. E. Sawin, J. A. Theriot, K. Gee, A. Mallavarapu, *Methods Enzymol.* **1998**, 291, 63–78; K. R. Gee, E. S. Weinberg, D. J. Kozlowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2181–2183; b) Rhodamin 110: L. D. Lavis, T.-Y. Chao, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 252–260; J. Ottl, D. Gabriel, G. Marriott, *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 143–151.
- [7] a) W.-H. Li, Y. R. Zhao, US 7304168, **2007**; b) Y. R. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4653–4663.
- [8] a) R. P. Haugland, K. R. Gee, US 5635608, **1997**; b) T. Kobayashi, Y. Urano, M. Kamiya, T. Ueno, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6696–6697; c) G. A. Krafft, W. R. Sutton, R. T. Cummings, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 301–303.
- [9] Cf.: J. R. R. Majjigapu, A. N. Kurchan, R. Kattani, T. P. Gustafson, A. G. Kutateladze, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12458–12459.
- [10] Verzweigung in α -Stellung ermöglicht die Demaskierungsreaktion: siehe Lit. [8a].
- [11] A. Banerjee, C. Grewer, L. Ramakrishnan, J. Jäger, A. Gameiro, H.-G. A. Breitinger, K. R. Gee, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8361–8367; vergleiche: M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, 4, 1086–1092.
- [12] P. Stegmaier, J. M. Alonso, A. Del Campo, *Langmuir* **2008**, 24, 11872–11879.
- [13] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3419–3422.
- [14] a) T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1193–2000; b) H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, 28, 317–325; c) W. Lin, D. S. Lawrence, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2723–2726; d) H. J.

- Montgomery, B. Perdicakis, D. Fishlock, G. A. Lajoie, E. Jervis, J. G. Guilemette, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1919–1927.
- [15] Die Hintergrundinformationen enthalten die Details und experimentellen Prozeduren.
- [16] Übersicht zu Wolff-Umlagerungen: a) W. Kirmse, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2193–2256; b) N. Hashimoto, T. Aoyama, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4619–4622.
- [17] In Ethanol mit Sulforhodamin B als Standard ($\Phi_{fl.} = 0.68$).
- [18] R. Juskaitis, T. Wilson, *J. Microsc.* **1999**, *195*, 17–22.
- [19] S. W. Hell, V. N. Belov, V. P. Boyarskiy, C. A. Wurm, S. Jakobs, C. Geisler (Max-Planck-Innovation GmbH), PCT/EP/2009/006578, **2009**.
- [20] T. Gronemeyer, G. Godin, K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 453–458.
- [21] a) „Far-Field Optical Nanoscopy“: S. W. Hell in *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology* (Hrsg.: A. Gräslund, R. Rigler, J. Widengren), Springer, Berlin, **2009**, S. 365–398; b) S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158; c) M. Fernández-Suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 929–943; d) D. Evanko, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 19–20; e) S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32; f) X. Zhuang, *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 365–367; g) J. Lippincott-Schwartz, S. Manley, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 21–23; h) B. Huang, M. Bates, X. Zhuang, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 993–1016.
-