

Rot fluoreszierende Proteine: spezielle Anwendungen in der Bildgebung und Perspektiven

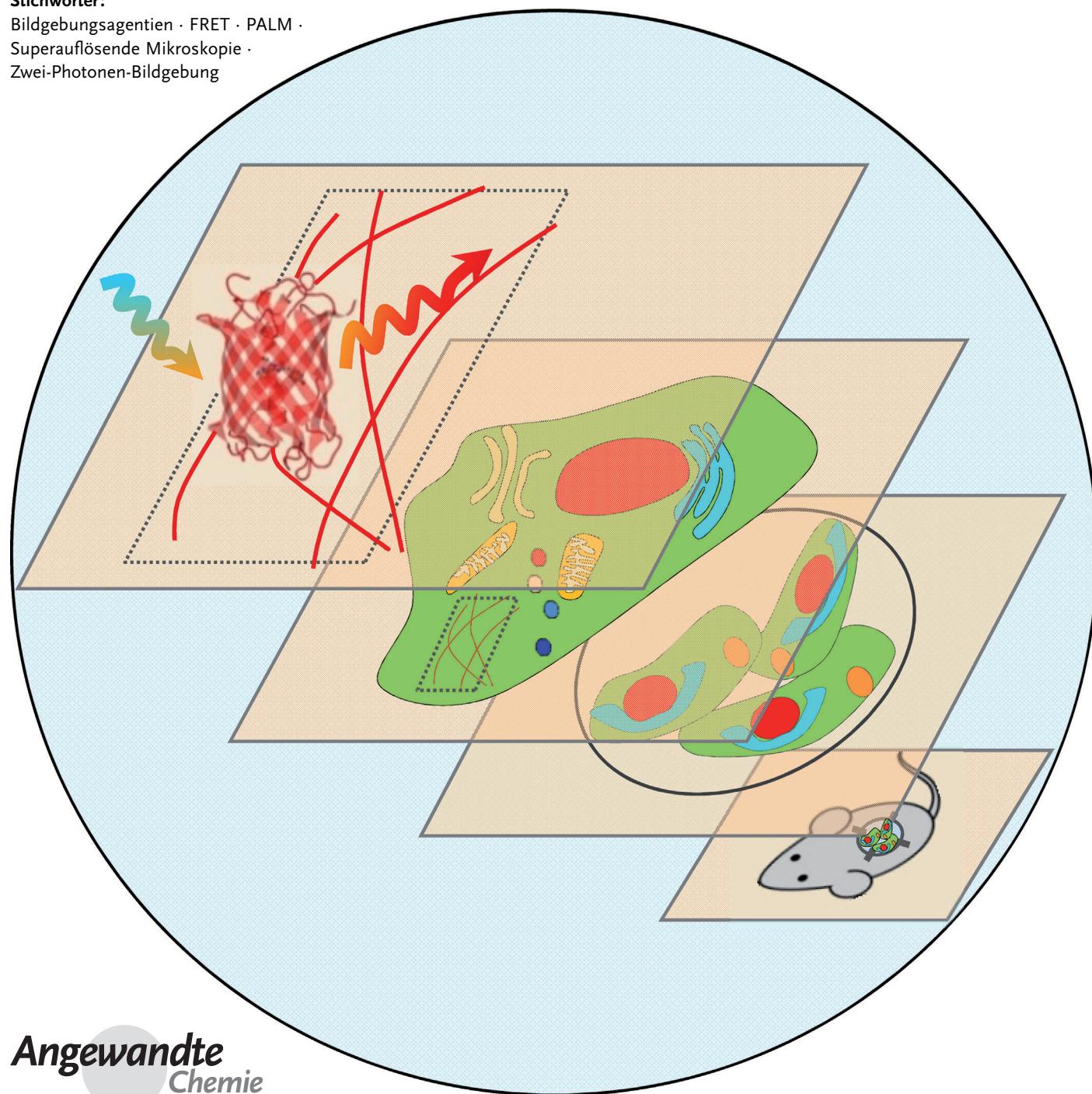
*Daria M. Shcherbakova, Oksana M. Subach und Vladislav V. Verkhusha**

Stichwörter:

Bildgebungsagentien · FRET · PALM ·

Superauflösende Mikroskopie ·

Zwei-Photonen-Bildgebung



Während der letzten Jahre wurden zahlreiche rotverschoben fluoreszierende Proteine (RFPs) entwickelt. Die verbesserten RFPs eröffnen einmalige Möglichkeiten, biologische Vorgänge auf Molekül ebene ebenso zu verfolgen wie in gesamten Organismen. Hier wird die Beziehung zwischen den Eigenschaften von RFPs unterschiedlichen Phänotypen und ihren Anwendungen in verschiedenen Abbildungstechniken beschrieben. Bereits eingeführte und in der Entwicklung befindliche Bildgebungsverfahren werden in Zusammenhang mit herkömmlichen RFPs, mit im langwelligen Rot fluoreszierenden Proteinen, RFPs mit einer großen Stokes-Verschiebung, fluoreszierenden Schaltuhren, irreversibel lichtaktivierbaren und reversibel mit Licht schaltbaren RFPs besprochen. Vorteile und Grenzen spezifischer RFPs werden für jedes Verfahren aufgezeigt. Aktuelle Fortschritte beim Verständnis der chemischen Umwandlungen roter Chromophore geben einen Ausblick auf künftige RFP-Phänotypen und die damit jeweils möglichen neuen Abbildungsverfahren.

1. Einleitung

Genetisch verankerte fluoreszierende Protein (FPs) ermöglichen eine spezifische und gezielte Markierung von Proteinen, Organellen, Zellen, Geweben und ganzen Organismen. Dadurch sind FPs den synthetischen organischen Farbstoffen für In-vivo-Abbildungsverfahren überlegen. Einmal in der Zelle exprimiert, benötigen FPs außer molekularem Sauerstoff keine zusätzlichen Enzyme oder Cofaktoren, um den Chromophor zu bilden. In den meisten Fällen kann das Zielprotein genetisch mit einem FP fusioniert werden, ohne seine Funktion zu beeinträchtigen, und in lebenden Zellen freigesetzt werden. Demgegenüber bestehen die Vorteile organischer Fluoreszenzfarbstoffe (zusammengefasst in Lit. [1]) unter anderen in ihrer geringen Größe, die die Funktion des markierten Proteins nur wenig beeinflusst, und manchmal in den günstigeren photophysikalischen Eigenschaften wie größerer Helligkeit oder Photostabilität. Organische Farbstoffe lassen sich im Allgemeinen jedoch nur in fixierten Zellen einsetzen. Moderne FPs mit neuem Phänotyp und verbesserten photophysikalischen Eigenschaften ermöglichen auch einen effizienten Einsatz in lebenden Zellen.

FPs sind in vielen verschiedenen Fluoreszenzfarben über das gesamte sichtbare Spektrum verfügbar, von kurzwelligem Violett bis zu langwelligem Rot. Rotverschobene FPs (RFPs) ergänzen andere spektrale FP-Varianten in Mehrfarben-Anwendungen und haben eine Reihe von Vorteilen. Insbesondere zeichnet sich die rotverschobene Anregung und Fluoreszenz durch eine niedrigere Autofluoreszenz, weniger Lichtstreuung und eine geringere Phototoxizität bei längeren Wellenlängen aus. Diese Eigenschaften prädestinieren RFPs als Sonden für In-vivo-Bildgebung, insbesondere zur Darstellung tiefliegender Gewebe und für Ansätze, die ein geringes Hintergrundrauschen erfordern, wie superauflösende Einzelmolekültechniken.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	10883
2. Herkömmliche rotverschobene FPs	10884
3. Langwellig rot fluoreszierende Proteine	10888
4. RFPs mit großer Stokes-Verschiebung	10888
5. Fluoreszierende Schaltuhren	10889
6. Photoaktivierbare RFPs	10889
7. Reversibel lichtschaltbare RFPs	10891
8. Chromophorchemie	10893
9. Ausblick	10894

Das Entwerfen neuer FPs für neue Bildgebungsverfahren ist ein sich rasch entwickelndes Feld. In jüngerer Zeit wurden zahlreiche RFPs mit unterschiedlichen Phänotypen konstruiert. Aktuell lassen sich mindestens sechs verschiedene RFP-Typen unterscheiden: herkömmliche RFPs, im langwelligen Rot fluoreszierende Proteine, RFPs mit großer Stokes-Verschiebung, fluoreszierende Schaltuhren, photoaktivierbare RFPs und reversibel mit Licht schaltbare RFPs. Jeder dieser Typen ermöglicht andere Bildgebungsanwendungen.

Die Unterschiede der FP-Farben röhren von der Variabilität der Chromophore und ihrer unmittelbaren Umgebung her. Moderne RFPs wurden entwickelt, während man die zugehörigen Chromophore und ihre Bildung untersuchte.^[2] Von daher kennen wir nun die grundlegenden Mechanismen der autokatalytischen und lichtinduzierten chemischen Umwandlungen der roten Chromophore. Dies ermöglicht es, Übergänge zwischen den Chromophorstrukturen zu manipulieren, um die gewünschten FP-Phänotypen zu erhalten.

In diesem Aufsatz beschreiben wir zunächst bestehende und in der Entwicklung befindliche Anwendungen von RFPs, darunter auch Techniken, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, intrazelluläre dynamische Vorgänge zu verfolgen und Abbildungen am lebenden Objekt und mit Superauflösung zu erzeugen. Die nötigen Eigenschaften der FPs werden für jeden Ansatz diskutiert. Dann fassen wir die

[*] Dr. D. M. Shcherbakova,^[+] Dr. O. M. Subach,^[+] Dr. V. V. Verkhusha
Department of Anatomy and Structural Biology and
Gruss-Lipper Biophotonics Center
Albert Einstein College of Medicine
1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461 (USA)
E-Mail: vladislav.verkhusha@einstein.yu.edu

[†] Diese Autorinnen trugen zu gleichen Anteilen zu dieser Arbeit bei.

Grundsätze der Chromophor-Umwandlungen in RFPs zusammen. Schließlich stellen wir unsere Sicht des Entwurfs künftiger RFPs und ihres Einflusses auf die Bildgebungsverfahren dar.

2. Herkömmliche rotverschobene FPs

Dauerhaft fluoreszierende oder so genannte herkömmliche RFPs können anhand ihrer spektralen Eigenschaften in orangefarbene FPs (Emissionswellenlänge 550–570 nm), rote FPs (570–620 nm) und langwellige rote FPs (Emission oberhalb 620 nm) unterschieden werden. Ins langwellige Rot verschobene RFPs werden getrennt behandelt, um ihre Bedeutung für die Bildgebung hervorzuheben.

Die wichtigsten spektralen und biochemischen Eigenschaften von RFPs sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Charakteristisch sind Helligkeit, Photostabilität, Oligomerisierungszustand, Reifungsgeschwindigkeit (Proteinfaltung und Chromophorbildung) und Cytotoxizität. Die Helligkeit eines FP wird als Produkt aus Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute bestimmt. In Zellen müssen außer der intrinsischen Helligkeit des FPs auch noch die Reifungseffizienz und die Expressionsstärke als Einflussfaktoren für die scheinbare Helligkeit des Fluoreszenzsignals berücksichtigt werden. Andere RFP-Charakteristika sind in den Fußnoten zu Tabelle 1 definiert.

Die Cytotoxizität der FPs bestimmt ihre Eignung für die Zellmarkierung. Ungiftige FPs werden dauernd und stark exprimiert, die Zellen bleiben lebensfähig und teilen sich effizient über viele Generationen. Cytotoxizität kann durch eine unspezifische intrazelluläre FP-Oligomerisierung und die Bildung großer Aggregate ausgelöst werden.^[3] Durch Optimierung der Proteinlöslichkeit gelang die Herstellung weniger toxischer Varianten, sogar bei tetrameren RFPs wie DsRed.^[3a,4] Sie kann in Bakterienzellen bestimmt werden, indem man die durchschnittliche Koloniegröße und die Zahl der Kolonien, die FP stark und konstitutiv exprimieren, ermittelt. Bei Säugerzellen bringt man die FPs unter Kontrolle eines starken Promoters und verfolgt Intensität und Verteilung der zellulären Fluoreszenz über mehrere Generationen.^[3a] Tetrameres E2-Orange und DsRed-Express2 sind auf diese Art optimiert worden.^[3a,5]



Daria Shcherbakova erhielt den M.S. in Chemie im Jahr 2005 und promovierte in bioorganischer Chemie im Jahr 2009; beide Abschlüsse stammen von der Staatlichen Universität Moskau. 2010 wechselte sie als Postdoktorandin in die Gruppe von Dr. Verkhusha. Sie erforscht die Entwicklung von Fluoreszenzsonden, und molekularen Biosensoren sowie deren Anwendungen.

Moderne RFPs haben weitere verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu den herkömmlichen RFPs der ersten Generation. mOrange2 und TagRFP-T^[6] sind wesentlich photostabiler (Tabelle 1) als ihre Vorläufer mOrange^[7] und TagRFP^[8]. Andere orangefarbene FPs wie mKO2^[9] und mKO^[10] sind heller und reifen schneller, sind aber noch immer relativ photolabil. Ein neues FP, mRuby,^[11] zeichnet sich durch die größere Helligkeit aus (Tabelle 1). Zum Vergleich mit RFPs vergleichbarer spektraler Eigenschaften: Die Helligkeit der orangeroten synthetischen Alexa-Farbstoffe beträgt $88 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Alexa546) bzw. $61 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Alexa568 und Alexa594).^[1b] Damit ist Alexa546 1.4 mal heller als mKO^a, Alexa 568 1.6 mal weniger hell als tdTomato und Alexa594 1.6 mal heller als mRuby.

Obwohl die neuen RFPs für spezielle Anwendungen einige Vorteile haben, sind manche der früheren RFPs noch konkurrenzfähig. Das verbreitete mCherry-Protein^[7] ist wegen der hohen Photostabilität und den guten Ergebnissen in Fusionen mit anderen Proteinen oft die Markierung der Wahl. Bei einer Reihe von Anwendungen wie der Markierung von Organellen oder dem Förster-Energietransfer (FRET) liefert das helle Tandem-Dimer tdTomato^[7] optimale Ergebnisse.

2.1. RFPs in Biosensoren und bimolekularer Fluoreszenzkomplementierung

Genetisch codierte Biosensoren ermöglichen die Sichtbarmachung und Quantifizierung der Änderung von enzymatischen Aktivitäten, Proteinkonformationen und Metabolitkonzentrationen sowie einiger anderer physiologischer Vorgänge in Zellen, Geweben und ganzen Organismen.^[12] Weil langwelligeres rotes Licht tiefer in Gewebe eindringt und weniger Autofluoreszenz anregt, sind RFPs attraktive Verbindungen für Biosensoren in Geweben und Tiermodellen.

Es gibt zwei Haupttypen von FP-Biosensoren: FRET-basierte Biosensoren und Einzel-FP-Biosensoren. Ein aktueller Trend auf diesem Arbeitsgebiet ist die Entwicklung spektral kompatibler FRET-Biosensoren für die gleichzeitige Abbildung mehrerer biologischer Vorgänge in einer einzelnen Zelle.^[13] Als FRET-Akzeptoren erwiesen sich mKO2 und mKO^a mit schneller und effizienter Reifung als sehr geeignet



Oksana Subach legte 1996 den M.S. in Chemie ab und promovierte im Jahr 2000 in bioorganischer Chemie an der Staatlichen Universität Moskau. Sie arbeitete anschließend als Postdoktorandin im Institut für Naturstoffchemie derselben Universität und ab 2007 im Department of Anatomy and Structural Biology des Albert Einstein College of Medicine in New York. Ihre Forschung dreht sich um Entwicklung und Anwendung fortschrittlicher fluoreszierender Proteine und die Untersuchung der chemischen Mechanismen der Umwandlung ihrer Chromophore.

für cyangrüne FP-Donoren.^[10,14] Diese Proteine sind auch gute FRET-Donoren, wenn sie mit langwellig rot fluoreszierenden FP-Akzeptoren gekoppelt werden. Die entstehenden FRET-Paare wären dann auch kompatibel mit dem gängigen cyan-FP(CFP)/gelb-FP(YFP)-FRET-Paar.

Einzel-FP-Biosensoren beruhen auf einer reversiblen Änderung der Spektren auf spezifische Stimuli hin (Abbildung 1b, Tabelle 2). Solche Biosensoren wurden entwickelt, um Änderungen von pH, Chlorid- und Metallionenkonzentrationen und Redoxpotential nachzuweisen. Der Hauptvorteil dieser Biosensoren gegenüber FRET-basierten Sensoren liegt in dem viel größeren dynamischen Messbereich.^[15] Die meisten dieser Sensoren fluoreszieren grün. Vervollständigt wird die Auswahl von einigen wenigen roten Einzel-FP-Sensoren wie der Biosensor zum Nachweis des Nucleosidtransports, der auf dem pH-responsiven mNectarin beruht.^[16] Die künftige Entwicklung orangeroter Sensoren könnte den gleichzeitigen Nachweis verschiedener Prozesse in einer lebenden Zelle ermöglichen.

Ein großer Fortschritt bei der Entwicklung neuer Biosensoren wurde kürzlich erzielt, als Bakterienkolonien auf die Expression fluoreszierender Sonden im Periplasma durchmustert wurden. Dabei wurde eine Reihe von blauen, grünen und roten Calciumionen-Biosensoren mit einem Messbereich von 1000–11 000 % gefunden.^[17] Diese Biosensoren beruhen auf zirkulär permutierten FPs (cpFPs), die neue N- und C-Termini in Zentrum einer β-Fass-Struktur tragen. Der rote Calcium-Biosensor auf Basis des zirkulär permutierten mApple wurde zusammen mit einer CFP-YFP-Sonde auf Adenosin-5'-triphosphat zur gleichzeitigen Bildgebung in einer einzelnen Zelle eingesetzt.

Zusätzlich zu den normalen Biosensoren werden auch geteilte Varianten herkömmlicher FPs zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Tests mit bimolekularer Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) verwendet.^[18] Geteilte FPs bestehen aus zwei nichtfluoreszierenden FP-Teilen, aus denen sich eine fluoreszierende FP-Fass-Struktur rekonstituiert, wenn die Teile nahe zusammengebracht werden (Abbildung 1c, Tabelle 2). BiFC ist meist irreversibel, und es braucht eine gewisse Zeit, bis sich in dem rekonstituierten FP-Molekül ein reifer Chromophor gebildet hat. Dennoch ist dieser Ansatz wegen der Einfachheit und Empfindlichkeit manchmal einem FRET-basierten Test vorzuziehen. Unter den verfügbaren RFP-basierten Systemen kann



Vladislav Verkhusha legte den M.S. in Biophysik am Moskauer Institut für Physik und Technologie ab und promovierte in chemischer Kinetik und Katalyse an der Staatlichen Universität Moskau. Seine Postdoktorandenzeit verbrachte er am Osaka Bioscience Institute und in Forschungszentren der Japan Science and Technology Corporation in Kyoto und Tokio. 2002 wurde er zum Assistantprofessor an der University of Colorado berufen. 2006 wechselte er an das Albert Einstein College of Medicine in New York, an dem er nun eine Professur innehat. Seine Forschung umfasst die Entwicklung von Fluoreszenzsonden, Biosensoren, Hochdurchsatz-Screenings und Bildgebungsverfahren.

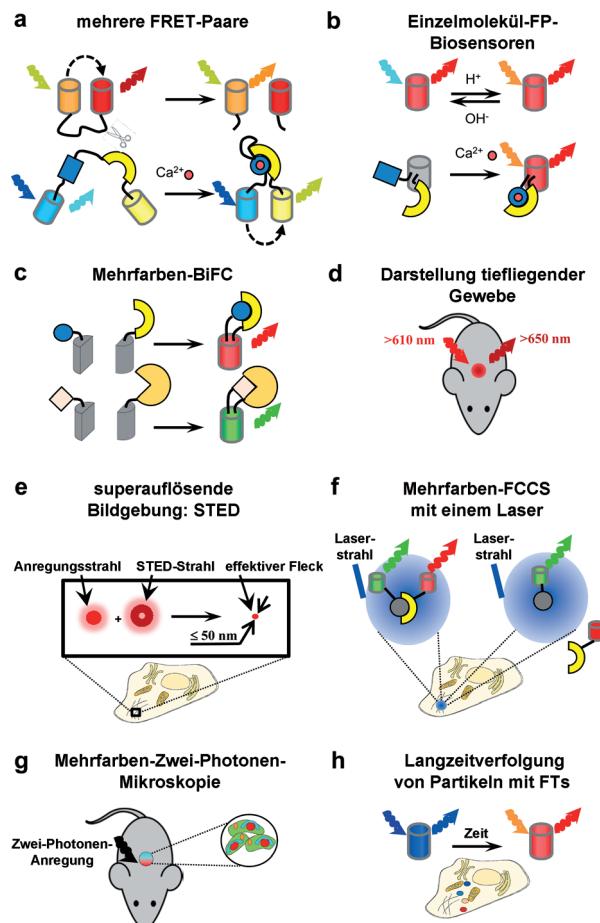


Abbildung 1. Anwendungen permanent fluoreszierender FPs unterschiedlicher Phänotypen. Die Zylinder stellen FPs dar, die entsprechend ihrem spektralen Emissionsbereich eingefärbt sind. Farbige Pfeile deuten das entsprechende Anregungs- oder Emissionslicht an. a) Mehrere spektral unterscheidbare FRET-Biosensoren können für die gleichzeitige Abbildung dieser Paare eingesetzt werden. Eine Kombination aus orangefarbem FP mit langwelligem RFP-Caspase-Biosensor (oberer Abbildungsteil) und CFP-YFP-Calcium-Biosensor (unterer Abbildungsteil) sind als Beispiele abgebildet. b) Einzelmolekül-FP-Biosensoren: Eine Verschiebung des Anregungs-/Emissionsmaximums (oberer Abbildungsteil, pH-Sensor) oder eine Veränderung der Intensität (unterer Abbildungsteil, Calciumsensor) aufgrund spezifischer Stimuli ist das Mess-Signal dieser Biosensoren. c) Mit Mehrfarben-BiFC lassen sich mehrere unabhängige Paare wechselwirkender Proteine identifizieren. d) Die Darstellung tiefliegender Gewebe erfordert FPs im langwelligen Rot mit Anregungs- und Emissionsmaxima im NIRW (650–690 nm), um die beste Lichtdurchlässigkeit und die niedrigste Autofluoreszenz zu erreichen. e) Die meisten käuflichen STED-Mikroskope haben einen 638-nm-Anregungsstrahl (roter Kreis), der von einem Donut-förmigen STED-Strahl (750 nm) überlagert wird. Letzterer löscht an der Peripherie der Anregungsfläche sofort die Fluoreszenz der FPs und verringert damit die Fluoreszenzemission auf einen Fleck von wenigen zehn Nanometern (roter Punkt). Mit FPs kann so aktuell eine Auflösung von ca. 50 nm erreicht werden.^[29] f) Bei der Mehrfarben-Einzelzells-FCCS wird mit einer einzigen Wellenlänge eine Gruppe von LSSFPs angeregt, die bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren. g) Bei der Mehrfarben-Zwei-Photonen-Mikroskopie kann eine subzelluläre Auflösung in tiefliegenden Geweben durch Anregung einer Gruppe von LSSFPs (die bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren) mit zwei Photonen einer Wellenlänge erzielt werden. h) Eine langsame Veränderung der FT-Farbe ermöglicht die Verfolgung von Partikeln innerhalb einer Zelle für eine längere Zeitspanne.

Tabelle 1: Spektrale und biochemische Eigenschaften moderner RFPs.

Protein	$\lambda_{\max}(\text{abs})$ [nm]	$\lambda_{\max}(\text{em})$ [nm]	ε [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	Φ	Helligkeit ^[a] [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$pK_a^{[b]}$	Photostabilität [s] ^[c]	Oligomerisierung ^[d]	Weitere Eigenschaften	Lit.
FPs mit autokatalytischer Chromophorbildung										
Herkömmliche FPs								Reifung bei 37°C $t_{1/2}$ [h]		
mOrange2	549	565	58 000	0.60	35	6.5	228	M	4.5	[6]
mKO	551	563	105 000	0.61	64	4.2	n.b. ^[e]	M	1.8	[10]
TagRFP-T	555	584	81 000	0.41	33	4.6	337	M	1.7	[6]
mRuby	558	605	112 000	0.35	39	5.0	127 ^[f]	M	2.8	[11]
mCherry	587	610	72 000	0.22	16	<4.5	96	M	0.25	[7]
tdTomato	554	581	138 000	0.69	95	4.7	98	TD	1	[7]
Langwellige-rote FPs										
mKate2	588	633	62 500	0.40	25	5.4	93 ^[g]	M	<0.33	[48]
Katushka	588	635	65 000	0.34	22	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	D	0.33	[38]
mNeptune	600	650	67 000	0.20	13	5.4	226 ^[h] 48 ^[g] 34.5 ^[f]	M	0.6	[31] [32] [33]
TagRFP657	611	657	34 000	0.10	3.4	5.0	205 ^[g]	M	2.1	[32]
eqFP650	592	650	65 000	0.24	16	5.7	30 ^[i]	D	schnell	[33]
eqFP670	605	670	70 000	0.06	4.2	4.5	206 ^[h]	D	schnell	[33]
E2-Crimson	611	646	126 000	0.23	29	4.5	105 ^[g] 3 ^[j]	T	0.4	[4] [33]
605	646	58 500	0.12	7.1						
LSSFPs										
LSSmOrange	437	572	52 000	0.45	23.4	5.7	21 ^[h]	M	2.3	[43]
mKeima	440	620	14 400	0.24	3.5	6.5	19	M-D	4.5	[44]
LSSmKate1	463	624	31 200	0.08	2.5	3.2	60 ^[h]	M	1.7	
LSSmKate2	460	605	26 000	0.17	4.4	2.7	44 ^[h]	M	2.5	[45]
FTs										
Slow-FT	402	465	33 400	0.35	12	2.6	n.b. ^[e]	M	9.8	
	583	604	84 200	0.05	4	4.6	n.b. ^[e]		28	[49]
Medium-FT	401	464	44 800	0.41	18	2.7	n.b. ^[e]	M	1.2	
	579	600	73 100	0.08	6	4.7	n.b. ^[e]		3.9	[49]
Fast-FT	403	466	49 700	0.30	15	2.8	n.b. ^[e]	M	0.25	
	583	606	75 300	0.09	7	4.1	n.b. ^[e]		7.1	[49]
mK-GO	500	509	35 900	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	6.0	n.b. ^[e]	M	6	[50]
	548	561	42 000	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	4.8	n.b. ^[e]			
Irreversibel photoaktivierbare FPs										
	$\lambda_{\max}(\text{abs})$ [nm]	$\lambda_{\max}(\text{em})$ [nm]	ε [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	Φ	Helligkeit ^[a] [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$pK_a^{[b]}$	Photostabilität [s] ^[c]	Kontrast ^[d]	Photoaktivierung/ Photoschalten [nm]	
PAmCherry1	(404)	n.b. ^[e]	6500	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	4000	405	[51]
	564	595	18 000	0.46	8.3	6.3	91 ^[f]			
PATagRFP	(278)	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	540	405	[52]
	562	595	66 000	0.38	25	5.3	161 ^[f]			
PAmKate	(442)	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	100	405	[53]
	586	628	25 000	0.18	4.5	5.6	433 ^[h]			
Dendra2	490	507	45 000	0.50	23	6.6	45	300	405/488	[54]
	553	573	35 000	0.55	19	6.9	378			
mEos2	506	519	56 000	0.84	47	5.6	42	n.b. ^[e]	405	[55]
	573	584	46 000	0.66	30	6.4	323			
mKikGR	505	515	49 000	0.69	34	6.6	14	400	405	[56]
	580	591	28 000	0.63	18	5.2	21			
mClavGR2	488	504	19 000	0.77	15	8.0	17	n.b. ^[e]	405	[67]
	566	583	32 000	0.53	17	7.3	175			
mIrisFP	(386)	n.b. ^[e]	12 000	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	473	[57]
	486	516	47 000	0.54	25	5.4	n.b. ^[e]			
NijiFP	(446)	n.b. ^[e]	21 000	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	405	473	[58]
	546	578	33 000	0.59	19	7.6	n.b. ^[e]			
PSmOrange	(ca. 375)	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	488	[37]
	469	507	41 100	0.64	26	7.0	n.b. ^[e]			
	(ca. 440)	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	405	561	[440]
	526	569	42 000	0.65	27	7.3	n.b. ^[e]			
	548	565	113 300	0.51	58	6.2	489 ^[k]	560	480-540	[37]
	636	662	32 700	0.28	9.2	5.6	1580 ^[k]			
Reversibel photoschaltbare FPs										
rsCherry	572	610	81 000	(0.009)	0.7	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	3(20)	450 550	[51] [59])
	572	610	80 000	(0.02)	1.6	(6.0)	n.b. ^[e]			
rsCherryRev	572	608	41 800	0.0017	0.07	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	3(7)	550 450	[60] [59])
	572	608	42 300	0.0051	0.22	(5.5)	n.b. ^[e]			
rsTagRFP	440	585	15 300	0.0013	0.02	n.b. ^[e]	n.b. ^[e]	20	570 440	[60]
	567	585	36 800	0.11	4	6.6	n.b. ^[e]			

[a] Die Helligkeit in wird bestimmt als das Produkt aus Extinktionskoeffizient ε und Quantenausbeute Φ . [b] pK_a ist der pH-Wert, bei dem die Fluoreszenz halbmaximal ist. [c] Zeit, nach der die Intensität des Fluoreszenzsignals auf 50% abgefallen ist. Um die verschiedenen Effizienzen der FP-Anregung und des Mikroskopaufbaus auszugleichen, wurden die Werte auf die spektrale Ausbeute einer Lampe, die Durchlässigkeitsprofile der Filter, einen zweifarbigem Spiegel, der für das Ausbleichexperiment verwendet wurde, und das Absorptionsspektrum des FP normiert. [d] M, D, TD und T stehen für Monomer, Dimer, Tandem-Dimer bzw. Tetramer. [e] n.b.: nicht bestimmt. [f] Relativ zu mCherry bestimmt.^[7] [g] Relativ zu mKate2 bestimmt.^[48] [h] Relativ zu mKeima bestimmt.^[44] [i] Das Auftreten maximaler blauer Fluoreszenzintensität und halbmaximaler roter (oder orangefarbener) Fluoreszenzintensität bezeichnet charakteristische Zeiten für FTs. [j] Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten vor und nach der Photoumwandlung. [k] Relativ zu mOrange2 bestimmt.^[6]

Tabelle 2: RFP-Phänotypen und Eigenschaften, die für spezifische Anwendungen erforderlich sind.

Anwendung	RFP-Phänotyp	wichtigste erforderliche Eigenschaften
FRET-Abbildung	herkömmliche RFPs, langwellige rote FPs, LSSFPs	Helligkeit, Photostabilität, pH-Stabilität, schnelle und vollständige Reifung
Abbildung von Einzel-FP-Biosensoren	cpFPs, LSSFPs	reversible Veränderung des Spektrums auf einen spezifischen Auslöser hin, Helligkeit, Photostabilität, effiziente Reifung
Mehrfarben-BiFC	geteilte RFPs	Helligkeit, Photostabilität, pH-Stabilität, schnelle und effiziente Komplementierung
Abbildung tiefliegender Gewebe	Langwellige rote FPs	Anregung/Emission im oder nahe dem NIRW, Helligkeit, geringe Cytotoxizität
STED	Langwellige rote FPs	Photostabilität, Helligkeit, liegt monomer vor
FCCS	LSSFPs	Helligkeit, Photostabilität, schnelle und vollständige Reifung, liegt monomer vor
Zwei-Photonen-Mikroskopie	LSSFPs	Zwei-Photonen-Helligkeit, Zwei-Photonen-Photostabilität
Langzeitverfolgung mit FTs	FTs	Helligkeit, Photostabilität, effiziente Reifung beider Formen, hoher Kontrast zwischen den Fluoreszenzen der beiden Formen
Zeitraffer-Aufnahmen mit selektiver Photomarkierung	PAFPs, PSFPs	Photoaktivierungskontrast, Wellenlänge des Lichts für die Photoaktivierung, Photostabilität der umgewandelten Form, geringe Phototoxizität
Langzeit-Bildgebung mit Photomarkierung im lebenden Organismus	PAFPs, PSFPs	ins langwellige Rot verschobene Fluoreszenz, geringe Cytotoxizität, längere Wellenlänge des Lichtes zum Umschalten, Photostabilität, intrazelluläre Lebensdauer
PALM-basierte Techniken	PAFPs, PSFPs, rsFPs	Photoaktivierungskontrast, Einzelmolekül-Helligkeit (Photonenausbeute), Ermüdungsresistenz (der rsFPs), monomerer Zustand
Photochromer FRET	rsFPs	Verschiebung der Absorptionsspektren eines Akzeptors nach lichtinduzierter Umschaltung, hohe Extinktionskoeffizienten, Photostabilität, vollständige Reifung
RESOLFT	rsFPs	Helligkeit, Ermüdungsresistenz, Photostabilität, schnelle Umschaltbarkeit mit Licht, Photoumwandlungskontrast, monomerer Zustand

nur das mKate-Derivat split-Lumin effizient unter physiologischen Bedingungen bei 37°C reifen und könnte mit geteilten FPs anderer Farben kombiniert werden.^[18b]

Eine weitere Methode wurde genutzt, um mit einem FP-basierten Ansatz die Zellzyklusphase sichtbar zu machen. Die sequenzielle Expression von zwei verschiedenen FP-Fusionskonstrukten (z.B. mKO2 fusioniert an Cdt1 und mAG fusioniert an Geminin) ergab ein Fucci-Biosensorsystem.^[9] Aufgrund der zellzyklusabhängigen Proteolyse oszilliert die Proteinexpression von Cdt1 und Geminin gegenläufig. Daher markiert mKO2-hCdt1 die Zellkerne während der G1-Phase orange, während mAG-hGem die Kerne während der S/G2/M-Phasen grün markiert. Das Fucci-System ermöglicht es, die Koordination zwischen Zellzyklus und morphologischen Änderungen bei neuralen Vorläuferzellen^[19] und das Fortschreiten des Zellzyklus während der Differenzierung, der Metastasierung von Tumoren^[9] und der Entwicklung von Zebrafisch-Embryos zu verfolgen.^[20]

2.2. RFPs zur Darstellung tiefliegender Gewebe

Die zerstörungsfreie Darstellung dicker (auch lebender) Proben erfordert eine optische Aufteilung, um Licht außerhalb der Brennebene auszublenden. Dies lässt sich unter anderem mit Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie und Zwei-Photonen(2P)-Bildgebung erzielen.

Lichtscheiben-Mikroskopietechniken umfassen SPIM (selective plane illumination microscopy, Mikroskopie mit selektiver Ebenenausleuchtung),^[21] OPFOS-Mikroskopie (orthogonal-plane fluorescence optical sectioning microscopy),^[22] HILO-Mikroskopie^[23] (highly inclined and laminated optical sheet microscopy) und davon abgeleitete Verfahren. Bei SPIM wird eine Probe von der Seite in einem genau de-

finierten Volumen um die Brennebene der Mikroskopoptik beleuchtet (eine Übersicht findet sich in Lit. [24]). Die Beleuchtungsebene und der Strahlengang für den Nachweis stehen senkrecht aufeinander. Hauptvorteil des SPIM-Ansatzes ist die schnelle Aufnahme von Bildern. RFPs wurden bislang für SPIM und andere LSFM-Techniken kaum eingesetzt.

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie bringt vor allem bei der Darstellung tiefliegender Gewebe hervorragende Ergebnisse, weil Fluoreszenz von außerhalb der Brennebene und Lichtstreuung stark verringert werden und dies mit der besseren Gewebedurchdringung durch infrarotes Licht kombiniert wird.^[26] Außerdem wird beim Zwei-Photonen-Bildgebung das Ausbleichen der Sonden in dicken Proben insgesamt reduziert, weil es auf die Brennebene beschränkt bleibt.^[25] Da allerdings die Intensitäten der Zwei-Photonen-Anregung mit Femtosekundenpulsen ein etwa zehnfach schnelleres Ausbleichen nach sich ziehen als bei der Ein-Photonen-Anregung,^[26] sind die Ergebnisse der 2P-Aufnahmen für dünne Proben weniger gut.

2P-Bildgebung mit herkömmlichen orangefarbenen und roten FPs wird durch die geringe Energieausbeute eingeschränkt, die die modengekoppelten durchstimmbaren Titan-Saphir-Standardlaser in den meisten kommerziellen 2P-Mikroskopen oberhalb von 1000 nm auszeichnet. Um den Helligkeitsverlust oberhalb von 1000 nm auszugleichen, greift man auf optische parametrische Oszillatoren (OPO) zurück. Zwei-Photonen-Quellen für OPO-Femtosekundenpulse liefern Licht zwischen 1000 nm und 1600 nm Wellenlänge mit einer maximalen Energieausbeute bei ca. 1200 nm. Während OPO-Systeme als Einzellösungen kommerziell erhältlich sind, wurden sie als Mikroskop-Lichtquellen für biologische Anwendungen erst vor kurzem verfügbar gemacht. Außerdem wurden Spezialanfertigungen für Zwei-Laser-zwei-Pho-

tonen-Mikroskope, die Fluorophore in den Bereichen 750–1040 nm und 1100–1600 nm anregen können, beschrieben.^[27] Ein häufiger Einsatz der Zwei-Photonen-OPO-Quellen sollte die Möglichkeiten von RFPs in der Zwei-Photonen-Bildgebung ausweiten.

Aus der Charakterisierung der Ein-Photonen-Anregung von FPs kann man ihr Verhalten bei Zwei-Photonen-Anregung nicht uneingeschränkt ableiten.^[28] Anders als der Ein-Photonen-Absorptionsquerschnitt (also der Extinktionskoeffizient) reagiert der Absorptionsquerschnitt einer Zwei-Photonen-Anregung auf ein elektrisches Feld in der Umgebung des Chromophors in einem FP und wird durch geladene Aminosäuren und das Netz von Wasserstoffbrücken in der Mikroumgebung des Chromophors beeinflusst. Es ist auch nicht möglich, die optimale Wellenlänge für die Zwei-Photonen-Anregung aus dem Ein-Photonen-Anregungsspektrum abzuleiten. Außerdem unterscheiden sich die Reaktionen des Photobleichens für Ein- und Zwei-Photonen-Bestrahlung.^[26] Daher benötigt man RFPs, die speziell für die Zwei-Photonen-Anregung optimiert sind (Tabelle 2).

3. Langwellig rot fluoreszierende Proteine

Die Entwicklung von hellen FPs für langwelliges Rot ist ein rasch wachsendes Gebiet. Diese FPs sind FPs anderer Farben bei der Darstellung von Geweben oder ganzen Organismen überlegen, weil Säugergewebe wegen der starken Absorption von Hämoglobin unterhalb von 650 nm für langerwelliges Rotlicht durchlässiger ist.^[30] Um den Erfordernissen für die Darstellung tiefliegender Gewebe gerecht zu werden, wurden in letzter Zeit einige neue FPs für langwelliges Rotlicht entwickelt. Am langwelligsten fluoreszieren monomeres mNeptune^[31] und TagRFP657,^[32] dimeres eqFP650^[33] und eqFP670^[33] und tetrameres E2-Crimson^[4] (Tabelle 1). E2-Crimson, eqFP650 und eqFP670 wurden spezifisch auf geringe Cytotoxizität hin optimiert.

Ausgehend von bakteriellen Phytochromen wurden außerdem mehrere FPs für nahes Infrarot entwickelt, so IFP1.4^[34] und iRFP.^[35] Die Fluoreszenz dieser Proteine geht auf einen exogenen Tetrapyrrol-Chromophor, Biliverdin, zurück, der in Säugerzellen verbreitet vorkommt. Bakterielle Phytochrome sind vielversprechende Verbindungen, von denen aus künftig langwellig rot und infrarot fluoreszierende Proteine entwickelt werden können. Die gegenwärtig in diesem Bereich verfügbaren FPs stehen organischen Farbstoffen in ihrer Helligkeit noch nach. Das hellste FP für langwelliges Rot, E2-Crimson, erreicht nur ein Drittel der Helligkeit von Alexa647.^[1b] Die Verbesserung genetisch codierter langwellig rot fluoreszierender Sonden ist eine wichtige Aufgabe.

3.1. Langwellig rot fluoreszierende Proteine für die Ganzkörper-Bildgebung

Eine optimale Sonde für die Ganzkörper-Bildgebung sollte ein Anregungs- und Emissionsspektrum zwischen 650 und 950 nm im Nahinfrarotbereich (near-infrared optical

window, NIRW) haben, in dem Säugergewebe die geringste Absorption durch Hämoglobin, Melanin und Wasser aufweisen^[30] (Abbildung 1d, Tabelle 2). Die Absorption des Gewebes im NIRW fällt so drastisch ab, dass sogar schwach emittierende dunkelrote FPs deutlich bessere Ergebnisse liefern als helle grüne FPs.^[36] Keines der herkömmlichen langwellig roten FPs, die bislang entwickelt wurden, hat ein Anregungsmaximum innerhalb des NIRW. Der praktische Nutzen von FPs für die Bildgebung tiefliegender Gewebe kann überprüft werden, indem man die scheinbare Helligkeit bei Anregungswellenlängen in der Nähe des NIRW in lebenden Tieren bestimmt. In aktuellen Untersuchungen wurden langwellig rot fluoreszierende Proteine in verschiedenen Ansätzen verglichen, z. B. durch Injektion von Proben gereinigter FPs^[36,37] oder von Säugerzellen, die FPs exprimieren,^[38] in Tiere oder durch die direkte Expression von FPs in *Xenopus*-Embryonen^[38] oder in transgenen Mäusen.^[39] mKate2, mNeptune, eqFP650 und Katushka übertrafen die übrigen roten und langwellig roten FPs. Wichtig ist gleichzeitig, dass langwellig rote FPs für Untersuchungen an Tieren nur gering cytotoxisch sind.

3.2. Langwellig rote FPs bei superauflösender Bildgebung

Langwellig rot fluoreszierende Proteine haben ihre Anwendung auch in der superauflösenden Bildgebung gefunden. Die rotverschobene Anregung von E2-Crimson^[4] und TagRFP657^[32] wurde zur superauflösenden STED-Mikroskopie (STED, stimulated emission depletion)^[40] mit einem kommerziellen STED-Mikroskop unter Laseranregung bei 635–640 nm genutzt (Abbildung 1e). Weil E2-Crimson ein Tetramer ist, kann es hauptsächlich zur Markierung ganzer Zellen und des Lumenraums von Organellen dienen. TagRFP657 als Monomer wurde mit einzelnen Zellproteinen fusioniert, um damit STED-Bilder zu erhalten.^[32] Die Hauptforderung an diese FPs für eine effiziente STED-Abbildung ist hohe Photostabilität (Tabelle 2 und 3).

4. RFPs mit großer Stokes-Verschiebung

Eine große Stokes-Verschiebung (large Stokes shift, LSS), also ein Abstand zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum von mehr als 100 nm, ist ein wichtiges Merkmal einer Untergruppe von FPs, die als LSSFPs bezeichnet werden. Mit LSSFPs erhält man spektral auflösbare Farben für Mehrfarben-Abbildungsverfahren. Neben grünen^[41] und gelben^[42] LSSFPs gibt es das orangefarbene LSSmOrange^[43] und drei rote LSSFPs, nämlich mKeima,^[44] LSSmKate1 und LSSmKate2^[45] (Tabelle 1). Alle rotverschobenen LSSFPs absorbieren bei 440–460 nm und fluoreszieren im roten Spektralbereich. LSSmOrange strahlt unter den rotverschobenen LSSFPs am hellsten. LSSmKate2 übertrifft mKeima durch hohe pH-Stabilität, Photostabilität und Helligkeit. Außerdem fehlt ein zusätzliches Anregungsmaximum im gelben Bereich. Die Überprüfung von LSSmKate2 in stabil exprimierenden Säugerzellen zeigte die niedrige Zytotoxizität.^[45]

4.1. LSSFPs in FCCS-, Zwei-Photonen- und FRET-Verfahren

Die spektralen Eigenschaften von LSSFPs sind von Vorteil für Mehrfarben-Anwendungen mit einer einzelnen Anregungswellenlänge (Tabelle 2). Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS) ist eine Unterart der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS), die darauf optimiert ist, die Wechselwirkung von Proteinen mit vergleichbaren Molekulargewichten zu untersuchen. Bei der Zwei-Farben-FCCS ist der Grad der Kreuzkorrelation zwischen den beiden Signalen ein Maß für den prozentualen Anteil der wechselwirkenden Paare. Im Unterschied zu FRET hängt FCCS nicht von der engen Nachbarschaft oder einer vorteilhaften Orientierung der FPs zueinander ab.^[46] Ein Zwei-Farben-FCCS-Aufbau mit einem Laser ist dem mit zwei Lasern überlegen, da die präzise Ausrichtung der beiden Laser auf das gleiche konfokale Volumenelement nicht erforderlich ist. Das LSSFP mKeima wurde effizient zusammen mit CFP mit dem gleichen Laser angeregt, was eine Zwei-Farben-FCCS^[44] ergab (Abbildung 1 f). Diese Strategie wurde mit den FPs blau fluoreszierendes Protein, grünes LSSFP, LSSmOrange und LSSmKate1 bis zu einer Vier-Farben-FCCS ausgeweitet.^[43]

Das relativ langsame Schalten zwischen den Wellenlängen in kommerziellen Zwei-Photonen-Mikroskopen schränkt die Abbildung schneller dynamischer Ereignisse mit mehrfarbigen Sonden ein. Die Verwendung von roten LSSFPs zusammen mit cyan fluoreszierenden Proteinen ermöglichte eine Zwei-Farben-zwei-Photonen-Bildgebung in Echtzeit^[45,47] (Abbildung 1 g).

Rote LSSFPs sind attraktive Sonden für FRET-Verfahren. Sie sind mögliche Donoren für langwellige rote FPs und mögliche Akzeptoren für blaue FPs. Der große Abstand der Anregung eines roten LSSFP-Donors und der Emission eines roten LSSFP-Akzeptors von den Spektren der entsprechenden FRET-Partner sollte ein schwaches Hintergrundsignal und eine hohe Empfindlichkeit der FRET-Messung sicherstellen. Die LSSFP-basierten FRET-Paare lassen sich auch mit anderen FRET-Paaren kombinieren (Abbildung 1 a). So wurde kürzlich ein FRET-Paar aus LSSmOrange-mKate2 in Kombination mit einem CFP-YFP-FRET-Biosensor eingesetzt, um gleichzeitig zwei Prozesse in einer einzelnen Zelle abzubilden.^[43]

4.2. LSSFPs in Biosensoren mit einem FP

Ratiometrische Biosensoren mit einem FP (Abbildung 1 b) konnten mit LSSFP-Varianten entwickelt werden, die durch einen spezifischen Stimulus zwischen zwei Zuständen geschaltet werden können und die entweder eine große Stokes-Verschiebung oder eine reguläre Stokes-Verschiebung ihrer Fluoreszenz haben. Die entsprechende Umwandlung des Chromophors zwischen einem neutralen und einem anionischen Zustand (siehe Abschnitt 8) stellt die Basis für einen solchen Biosensor dar. Ein pH-Biosensor, pHRed mit einer Emission bei 610 nm, wurde aus mKeima entwickelt.^[61] Das Mess-Signal ist eine ratiometrische Änderung der Anregungsmaxima bei 440 nm und 585 nm. Ratiometrische Sensoren sind anderen Sensortypen vorzuziehen,

weil sie nicht von Artefakten wie veränderlichen Protein-Konzentrationen, Zelldicke, Zellbewegung und Anregungsintensität beeinflusst werden. Außerdem ist mit dem pHRed-Biosensor eine Zwei-Farben-Abbildung in Kombination mit dem grünen ATP-Sensor Perceval möglich.^[61]

5. Fluoreszierende Schaltuhren

Ein fluoreszierendes Schaltuhrprotein (FT) verändert seine Fluoreszenzfarbe über die Zeit. Dieses Phänomen beruht auf einer langsamen Chromophorbildung mit einer Übergangs- und einer endgültigen Form des Chromophors, die in unterschiedlichen Spektralbereichen fluoreszieren. Der zeitlich vorhersehbare Ablauf der Farbwechsel ermöglicht die quantitative Analyse zeitlicher und räumlicher Vorgänge *in vivo* (Abbildung 1 h). Im Unterschied zu den in Abschnitt 6 beschriebenen photoaktivierbaren FPs, die geeignet sind, schnelle intrazelluläre Dynamik zu verfolgen, werden FTs typischerweise eingesetzt, um relativ langsame Prozesse zu untersuchen.

Es gibt zwei Typen von FTs. Die einen leiten sich von mCherry ab. Die monomeren schnellen, mittleren und langsamten FTs (Fast-, Medium- bzw. Slow-FT; Tabelle 1) ändern ihre Fluoreszenz im Laufe der Zeit von Blau nach Rot.^[49] Die blauen und roten Formen der FTs sind hell und pH-stabil. Die Umwandlung der blauen in die rote Form verläuft vollständig. Unter Bestrahlung mit intensivem violettem Licht kommt es jedoch zu einer messbaren Umwandlung der blauen in die rote Form, was den Einsatz kompliziert (Tabelle 2). Ein FT eines anderen Typs ist monomeres Kusabira Green Orange (Mk-GO; Tabelle 1). Es ändert im Laufe der Zeit seine Farbe von Grün nach Orange.^[50] Im Unterschied zu den von mCherry abgeleiteten FTs reifen die beiden Formen von Mk-GO unabhängig voneinander. Die grüne Variante verschwindet nach der Reifung der orangefarbenen Variante nicht. Es verschiebt sich lediglich das Verhältnis Orange zu Grün von anfänglich etwa 0.1 auf 0.7 nach vollständiger Reifung. Die Lichtempfindlichkeit von mK-GO wurde zwar nicht untersucht, doch sollte die unabhängige Reifung der beiden Formen eine durch Belichtung ausgelöste Umwandlung von Grün nach Orange verhindern.

Monomere FTs können eingesetzt werden, um das Alter mit FT markierter Proteine zu bestimmen. Mit Medium-FT^[49] und mK-GO^[50] ließ sich auch das Alter von Kompartimenten bestimmen, die an Autophagie und Encocytose beteiligt waren.

6. Photoaktivierbare FPs

FPs, deren Fluoresenzeigenschaften durch Licht reguliert werden, sind für verschiedene selektive Photomarkierungstechniken vom Verfolgen von Partikeln bis zu superauflösenden Abbildungsverfahren geeignet. Diese Gruppe von FPs wird als photoaktivierbare FPs (PAFPs) bezeichnet. Wichtige Eigenschaften der PAFPs sind der Photoaktivierungskontrast und die Helligkeit von Ausgangs- und photoaktivierter Form. Der Photoaktivierungskontrast ist das Ver-

hältnis der Fluoreszenzintensität nach der Photoaktivierung zur Fluoreszenzintensität vor der Photoaktivierung. Im Fall der lichtschaltbaren FPs (FSFPs) ist er definiert als das Intensitätsverhältnis zwischen zwei fluoreszierenden Formen vor und nach der Umwandlung durch Licht.^[62] Der stärkere Kontrast ergibt ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis. Ein anderer Parameter, der zu berücksichtigen ist, ist die Lichtintensität, die notwendig ist, um die Lichtaktivierung auszulösen: sie sollte nicht so hoch sein, dass sie die Zelle schädigt, aber auch nicht so niedrig, dass es zu spontaner Lichtaktivierung kommen kann.

Gegenwärtig sind drei Typen irreversibler roter PAFFPs in Gebrauch: Dunkel-zu-Rot-photoaktivierbare PamCherry-ähnliche RFPs, Grün-zu-Rot-schaltbare Kaede-ähnliche RFPs und Orange-zu-langwelligem-Rot-lichtschaltbare FPs, zu denen das kürzlich entwickelte FsmOrange gehört.

Dunkel-zu-Rot-PAFFPs wie PamCherry^[51] und PATagRFP^[52] (Tabelle 1) durchlaufen eine Aktivierung von einem dunklen Zustand zu einer roten Fluoreszenz, wenn sie mit violettem Licht von 405 nm bestrahlt werden. PATagRFP übertrifft PamCherry an Helligkeit und Lichtstabilität. Das aktuell neu entworfene Dunkel-zu-langwelligem-Rot-wechselnde PamKATE ergänzt die beiden genannten PAFFPs spektral.^[53]

Kaede-ähnliche PSFPs werden mit violettem Licht von einer grün in eine rot fluoreszierende Form umgewandelt. Monomeres Dendra2,^[54] mEos2^[55] und mKikGR^[56a] sind gegenwärtig die besten PSFPs dieser Gruppe (Tabelle 1). Über ein rationales Design erhielt man kürzlich aus herkömmlichem monomerem cyan FP ein Grün-zu-Rot-PSFP, mClavGR2.^[56b]

Ausgehend von EosFP^[63] und Dendra2-Varianten wurden mehrere FPs mit einem komplexen Phänotyp entwickelt, der sowohl Eigenschaften irreversibler als auch reversibler PSFPs aufweist. Zunächst kommt es ähnlich wie bei den Kaede-ähnlichen PSFPs bei Bestrahlung mit violettem Licht zu einem irreversiblen Umschalten von IrisFP,^[64] seiner monomeren Variante mIrisFP^[57] und NijiFP^[58] in gleichzeitig grüne und rote Formen. Die anschließende Bestrahlung der grünen Formen dieser FPs mit 488 nm und wenig intensiven Lasern mit 405 nm führt zu einem reversiblen An- und Ausschalten des grünen Chromophors. Die Bestrahlung der roten Formen mit Licht von 532 nm überführt die roten Chromophore in den „Aus“-Zustand, während eine Bestrahlung mit 440 nm sie wieder einschaltet (Tabelle 1).

Das vor kurzem beschriebene PSmOrange^[37] ist in seinem Ausgangszustand orange und fluoresziert nach Bestrahlung mit blaugrünem Licht im langwirksamen Rot (Tabelle 1). Die rotverschobene Emission beider Formen im Vergleich zu grün-nach-rotem PSFPs und das langwirksame Licht zur Auslösung des Umschaltvorgangs sind von Vorteil für Anwendungen in lebenden Zellen (Tabelle 2).

6.1. PAFFPs als Photomarkierungen für eine Langzeit-Bildgebung

PAFFPs können als selektive Photomarkierungen eines bestimmten Proteins, einer spezifischen Organelle oder einer Zelle dienen. Die Markierung eines Proteins durch Fusion

mit PAFFPs dient der Untersuchung von Dynamik und Durchsatz von Proteinen. An markierten Organellen lassen sich Teilungs- und Verschmelzungereignisse nachvollziehen. Die Verfolgung von Zellen dient der Untersuchung von Entwicklung, Carcinogenese und Entzündungsreaktionen.^[87] Spezifische Eigenschaften, die PAFFPs für Langzeit-Abbildungen *in vivo* prädestinieren, sind der Photoaktivierungs-kontrast, die Wellenlänge des Anregungslichts, die Photostabilität der aktivierte Form, die (geringe) Phototoxizität und die Durchsatzgeschwindigkeit von PAFP oder dem Fusionsprotein (Tabelle 2). Die letzten drei Parameter bestimmen den Zeitraum, während dessen das markierte Objekt verfolgt werden kann.

Es ist hilfreich, wenn PAFFPs im Anfangsstadium mit Licht abgebildet werden können, das keine Photoaktivierung auslöst. Daher sind Kaede-ähnliche Proteine wie mKikGR,^[56a] mEos2,^[55] Dendra2^[54] und ihre Derivate gegenwärtig die bevorzugten monomeren Markierungen für verschiedene Arten von Langzeit-Experimenten. Dendra2 ist von besonderem Interesse, denn es lässt sich mit blauem Licht umwandeln, das für Zellen weniger schädlich ist als violettes Licht.^[54] Das Protein wurde eingesetzt, um das Metastasierungsverhalten individueller Tumorzellen in lebenden Mäusen zu verfolgen^[87b] und um die Actinpolymerisation in invasiven Strukturen von Mausmakrophagen und Adenocarcinomzellen abzubilden.^[88] Neue Möglichkeiten zum Verfolgen von Partikeln ergaben sich mit der Entwicklung von PSmOrange.^[37] Dieses PSFP ist spektral getrennt vom cyan/grünen PSCFP2-Protein^[54] und ermöglicht daher die gleichzeitige Beobachtung von vier unterschiedlichen Zellpopulationen. Orange und langwirksame rote Farben von PSmOrange sind von gewöhnlichem mCherry unterscheidbar. Weil für die lichtgesteuerte Umwandlung blaugrünes Licht notwendig ist, das von Geweben zehnfach weniger stark absorbiert wird als violettes Licht, kann PSmOrange auch im Inneren lebender Mäuse umgewandelt werden^[37] (Abbildung 2a).

Neue Anwendungen können sich durch den Einsatz von PAFFPs in FRET-Bildgebungsverfahren ergeben. Ein einfacher Ansatz kann auf der Photoaktivierung eines spezifischen PAFP in einem Zellkompartiment und der anschließenden Beobachtung von FRET zwischen dem PAFP-Donor und einem herkömmlichen RFP-Akzeptor in einer anderen Zellregion beruhen. Ein anderer möglicher Ansatz wäre das durch FRET erleichterte Photoschalten, in dem die Umwandlung von PAFP durch FRET von einem FP-Donor ausgelöst wird. Dieser Ansatz könnte dabei helfen, Proteinwechselwirkungen innerhalb der Zelle zu kartieren.

6.2. PAFFPs bei superauflösenden Abbildungsverfahren

Der Phänotyp von PAFP ist entscheidend für photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM)^[65] und die ähnlichen superauflösenden Fluoreszenz-PALM-Methoden^[76] (FPALM; Tabelle 3, Abbildung 2b). PALM beruht auf der Abbildung eines einzelnen Moleküls. Die Helligkeit dieses Moleküls, definiert als Zahl der emittierten Photonen, und der Kontrast zwischen dem Hintergrund und der Photonenausbeute infolge der Photoaktivierung sind entscheidende

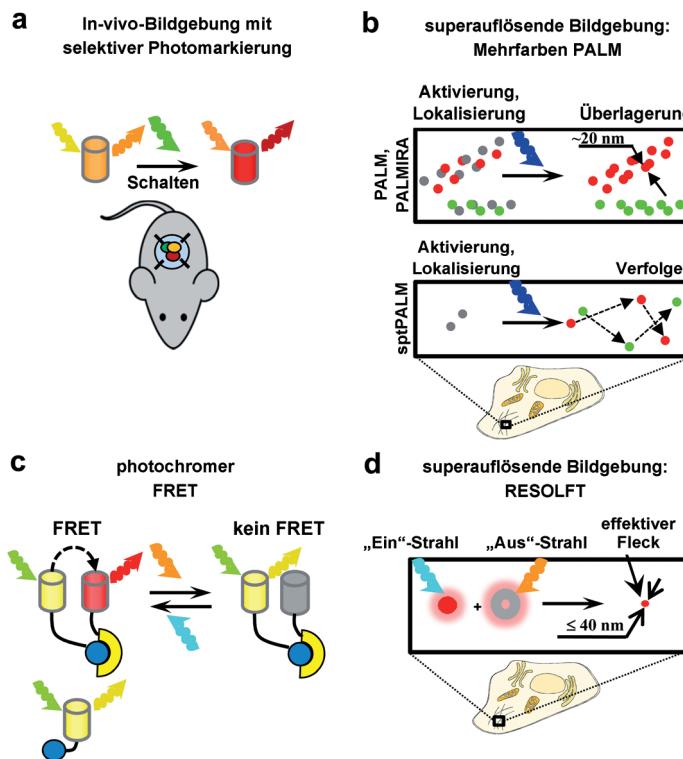


Abbildung 2. Anwendungen für irreversibel und reversibel schaltbare RFPs. Die Zylinder stellen RFPs dar, die entsprechend ihrem spektralen Emissionsbereich eingefärbt sind. Farbige Pfeile deuten das entsprechende Anregungs-, Emissions- und Aktivierungslicht an. a) Zur Bildgebung am lebenden Organismus mit selektiver Photomarkierung können PSFPs im Tier umgeschaltet werden, und die markierten Zellen lassen sich dann verfolgen. b) PALM-basierte Verfahren beruhen auf der genauen Lokalisierung (ca. 20 nm)^[65] einzelner PAFP-Moleküle (farbige Punkte). Der Zyklus für die Erzeugung der Abbildung umfasst die stochastische Photoaktivierung der PAFP-Moleküle, die Erfassung der Fluoreszenz und das anschließende Ausbleichen der lichtaktivierten Moleküle. Der Zyklus wird viele Male wiederholt, um ein superauflöstes Bild zu erzeugen. sptPALM ermöglicht die Nachverfolgung lokalisierter einzelner Moleküle in lebenden Zellen. c) Für den photochromen FRET werden rsFPs eingesetzt, die beim lichtinduzierten Umschalten ihre Absorption ändern. Ein FRET läuft mit einem rsFP im „Ein“-Zustand ab, nicht aber mit dem rsFP im „Aus“-Zustand. Mit pcFRET kann man also ein Kontrollbild der gleichen Probe ohne FRET erhalten, indem man den FRET zeitweise ausschaltet. d) Die RESOLFT-Mikroskopie setzt einen „Ein“-Strahl (blauer Pfeil) und einen überlagerten Donut-förmigen „Aus“-Strahl (gelber Pfeil) ein, um den beugungsbegrenzten Fleck eingeschalteter rsFPs so zu verfeinern, dass er kleiner ist als die Beugungsgrenze (roter Punkt). Gegenwärtig wird eine Auflösung mit FPs von 40 nm erzielt.^[66]

Eigenschaften der FPs für diese Methodengruppe (Tabelle 2 und 3). Da bei PALM-Verfahren ein höherer Kontrast auch eine höhere räumliche Ausbeute bedeutet, sind rotverschobene FPs, deren Abbildungsqualität durch eine schwächere Hintergrund-Autofluoreszenz ausgezeichnet ist, bevorzugte PALM-Sonden.

Die Dunkel-nach-Rot-PAFPs PAmCherry^[51] und PATagRFP^[52] sind wertvolle Sonden für Zwei-Farben-PALM. Anders als Kaede-ähnliche Grün-nach-Rot-PSFPs zeigen diese Proteine keine grüne Fluoreszenz, was ihren kombinierten Einsatz mit grünen PAFPs ermöglicht. Durch Zwei-Farben-PALM mit PAmCherry und PAGFP wurden Cluster von Transferrin-Rezeptoren und Clathrinmolekülen mit

25 nm Auflösung dargestellt.^[51] PATagRFP zusammen mit PAGFP wurde in einer Zwei-Farben-PALM zur Einzelpartikelverfolgung (sptPALM) in lebenden Zellen eingesetzt.^[52] Mit dem sptPALM-Verfahren lässt sich gut die Stöchiometrie von colokalisierten oder wechselwirkenden Proteinen auf Einzelmolekülebene untersuchen. FPALM-Bildgebung von drei PAFPs gleichzeitig in lebenden oder fixierten Zellen gelang mit dem Dunkel-zu-langwelligroten PAmKATE zusammen mit PAmCherry1 und Dendra2.^[53] PSmOrange wurde ebenfalls in der PALM-Bildgebung eingesetzt, wobei zum ersten Mal zur Aktivierung Licht der Wellenlänge 488 nm eingestrahlt wurde.^[37]

Die Photoaktivierung von PAmCherry ist auch mit einer Zwei-Photonen-Bestrahlung möglich. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um intrazelluläre Strukturen bei hoher Auflösung (< 50 nm laterale und < 100 nm axiale Auflösung) in einer Tiefe von ungefähr 8 µm mit 3D-PALM darzustellen.^[80] Außerdem wurde PAmCherry in einer Kombination von PALM- und SPIM-Techniken in 3D-Superauflösung für die Abbildung einer lebenden Zelle verwendet.^[89]

Unter den Kaede-ähnlichen PSFPs sind tdEosFP, mEos2 und Dendra2 die bevorzugten Sonden für PALM. tdEosFP^[90] zeichnet sich durch einen hohen Umschaltkontrast und eine hohe Photonausbeute aus. Das Protein erbrachte gute Ergebnisse in 2D-^[91] und 3D-^[92]PALM-Methoden. Der Einsatz von tdEosFP in 3D-interferometrischer PALM (iPALM) mit simultaner Multiphase-Interferometrie von Photonen aus jedem fluoreszierenden Molekül ermöglichte die Kartierung der nanoskaligen Proteinorganisation in Adhäsionszentren.^[92] Da kleinere Sonden für Markierungen durch Proteinfusion besser geeignet sind, weil sie eine genauere Lokalisation ermöglichen, ist monomeres mEos2 eine gute Alternative zu dem doppelt so großen dimeren tdEosFP.^[55,93] Monomeres Dendra2 diente in einem Polarisations-FPALM-Experiment zur Bestimmung der Orientierung einzelner Moleküle in zellulären Strukturen.^[82] In Versuchsaufbauten zur superauflösenden Bildgebung wurden die reversibel und irreversibel schaltbaren mIrisFP und NijiFP in einer Kopplung mit einer selektiven „Pulse-Chase“-Photomarkierung verwendet.^[57,58]

7. Reversibel lichtschaltbare RFPs

Reversibel lichtschaltbare FPs (rsFPs) können wiederholt zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand umgeschaltet werden. Diese Eigenschaft ermöglicht neue Anwendungen in der Bildgebung. Wichtige in neuerer Zeit entwickelte rote rsFPs sind vor allem rsCherry,^[59] rsCherryRev^[59] und rsTagRFP^[60] (Tabelle 1). Die Bestrahlung von rsTagRFP mit 550–570 nm schaltet den rot fluoreszierenden Zustand, der bei 567 nm absorbiert, in einen dunklen Zustand mit einer Absorption von 440 nm um. Bestraht man mit 430–450 nm, wandelt sich der dunkle Zustand wieder in den fluoreszierenden Zustand um. rsCherry und rsCherryRev sind rote rsFPs, die mit Licht der Wellenlängen

Tabelle 3: Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie-Techniken mit FPs.

Superauflösende Weitfeldansätze nutzen die Möglichkeit, Fluoreszenzsonden wie FPs und organische Farbstoffe mithilfe verschiedener Übergänge in einem fluoreszierenden Molekül an- und auszuschalten (Übersichtsartikel siehe Lit. [67]). Diese Techniken lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die erste beruht auf einer Bestrahlung in einer definierten Anordnung, die zweite auf der Lokalisation von Molekülen. Die erste Gruppe hängt von nichtlinearen abbildenden Molekülen insgesamt ab, während die zweite sich auf den optischen Nachweis einzelner Moleküle und die anschließende Rekonstruktion ihrer Koordinaten stützt.

Techniken auf Basis der Abbildung von Molekülgruppen

Zu diesen Fluoreszenztechniken gehören unter anderem die stimulierte Unterdrückung der Emission (STED, stimulated emission depletion),^[68] die Grundzustandsabreicherung (GSD, ground-state depletion),^[69] SSIM (saturated structured illumination microscopy)^[67b] und der reversible, sättigbare optische Fluoreszenzübergang (RESOLFT, reversible saturable optical fluorescence transition).^[70] STED nutzt den Übergang zwischen dem fluoreszierenden Singulett- und dem Grundzustand einer Sonde. Dieselben Zustände werden bei SSIM genutzt, während an GSD fluoreszierende Singulett- und langlebige dunkle Triplettzustände beteiligt sind. RESOLFT beruht auf reversibel umschaltbaren Sonden mit metastabilen fluoreszierenden und dunklen Zuständen.

Bei STED wird die Probe mit zwei synchronisierten ultraschnellen Lichtstrahlen beleuchtet: dem Anregungslaserpuls und dem colinearen Abreicherungslaserpuls. Die entstehende Donut-förmige Abreicherungszone um den beugungsbegrenzten Anregungsfleck erzeugt einen konzentrierten effektiven Fluoreszenzfleck mit einer gesteigerten Auflösung bis zu mehreren zehn Nanometern in lateraler Richtung. Ein superaufgelöstes Bild wird erzeugt, indem man mit den beiden Strahlen die Probe abrastert. Für die Abreicherung der angeregten FP-Zustände benötigt STED extrem intensives Licht (10 MW cm^{-2}), wodurch die Abbildung lebender Zellen eingeschränkt wird.^[67a, 71] Weil die gleiche Stelle mehrfach bestrahlt wird, um ein Bild zu erzeugen, ist die wichtigste Eigenschaft einer Fluoreszenzsonde für dieses Verfahren ihre Photostabilität. Helle Sonden, die durch die Wellenlänge des Abreicherungslasers überhaupt nicht angeregt werden, sind ebenfalls gut einsetzbar. Mit STED mit FPs wurde eine Auflösung von ca. 50 nm erreicht.^[29]

GSD erfordert eine geringere Lichtintensität (ca. 10 kW cm^{-2})^[69] als STED. Bei SSIM wird das Beleuchtungsmuster durch die Interferenz zweier überlagerter Strahlen erzeugt, mit denen die Probe abgerastert wird.^[72] Die mäßigen Lichtstärken für SSIM (ca. 100 W cm^{-2}) ermöglichen auch die Abbildung lebender Zellen.

Da RESOLFT ein Wechseln zwischen zwei metastabilen Zuständen einer Sonde beinhaltet, werden geringe Lichtintensitäten im Bereich von $1\text{--}10 \text{ W cm}^{-2}$ benötigt. RESOLFT kann daher als superauflösende Mikroskopie an lebenden Zellen angewendet werden.^[73] Typischerweise sind ungefähr 1000 Schaltzyklen erforderlich, um eine 10-fach bessere Auflösung zu erhalten.^[67b] Die kritische Eigenschaft der Sonde ist daher die Ermüdungssistenz.^[74] Vor kurzem wurde durch RESOLFT mit einem sehr photostabilen rsFP eine Auflösung von 40 nm in lebenden Zellen erreicht.^[66]

Techniken auf Basis einer Einzelmolekül-Abbildung

Zu diesen Techniken gehören photoaktivierte Lokationsmikroskopie (PALM),^[65] stochastisch-optische Rekonstitutionsmikroskopie (STORM),^[76] direkte STORM (dSTORM),^[77] Grundzustand-Abreicherungsmikroskopie (GSDIM, ground-state depletion microscopy),^[78] BaLM (bleaching-blinking assisted localization microscopy)^[79] und verschiedene verwandte Ansätze wie Einzelpartikelverfolgungs-PALM (sptPALM, single-particle tracking PALM)^[52], 3D-PALM,^[80] 3D-iPALM,^[81] PALM mit unabhängig laufender Datenerfassung (PALMIRA, PALM with independently running acquisition),^[59] Polarisations-FPALM,^[82] PALM mit Stroboskop-Beleuchtung (S-PALM),^[83] PALM für lebende Zellen,^[84] Mehrfarben-PALM^[51] und andere. Alle Verfahren nutzen das Umschalten zwischen dem fluoreszierenden und dem dunklen Zustand der Fluoreszenzsonde, mit Ausnahme von GSDIM, wo der Übergang zwischen dem fluoreszierenden Singulett- und dem langlebigen dunklen Triplett-Zustand ausgenutzt wird.

Bei PALM wird eine kleine Zahl einzelner PAFP-Moleküle stochastisch mit geringer Lichtintensität photoaktiviert, dann abgebildet und ausgebleicht. Dieser Vorgang wird viele Male wiederholt, um Bilder von entfernt liegenden Untergruppen von Molekülen aufzunehmen. Dann wird die Bildergruppe verarbeitet, um einzelne Moleküle zu lokalisieren, indem man die Brennpunkte in den jeweiligen Spreizfunktionen ermittelt. Die endgültige superaufgelöste Abbildung erhält man schließlich, indem man alle lokализierten Einzelmolekülpositionen verschmilzt. EinzelmolekülNachweise sind mit einem erheblichen Hintergrundrauschen verbunden. Um dieses zu reduzieren, wurde PALM anfangs in Kombination mit einem TIRF-Abbildungsmodus (total internal reflection) gezeigt,^[65] während die vergleichbare FPALM-Methode in einem weiter gefassten Format implementiert wurde.^[75] PALM mit PAFPs ergab eine laterale Auflösung von 20 nm.^[65]

STORM und verwandte Verfahren beruhen auf den gleichen Prinzipien wie PALM, doch werden historisch photochemische umwandelbare organische Farbstoffe eingesetzt. PALM und STORM benötigen viel niedrigere Lichtintensitäten für Photoaktivierung und Bildgebung ($1\text{--}100 \text{ W cm}^{-2}$) als STED.^[65, 85] Bei PALM- und STORM-basierten Ansätzen hängt die präzise Lokalisation eines einzelnen Moleküls von der Zahl der emittierten Photonen durch ein photoaktiviertes Molekül (Photonenausbeute) ab. Eine bessere Einzelmolekül-Helligkeit ergibt eine höhere Auflösung. Neben der Photonausbeute ist auch der hohe Photoaktivierungskontrast von PAFPs vorteilhaft, um ein größeres Signal-Rausch-Verhältnis und damit eine höhere Auflösung zu erhalten.

Während für PALM typischerweise PAFPs verwendet werden, greift man für die verwandte Methode PALMIRA auf rsFPs zurück. PALMIRA erhöht die Geschwindigkeit, mit der die Daten aufgenommen werden, um etwa den Faktor 100.^[86] Eine Auflösung von ca. 45 nm wurde mit PALMIRA mit rsFps erreicht.^[79] PALM wurde auch für einen Einsatz mit herkömmlichen Fluoreszenzsonden in BaLM ausgeweitet. Die BaLM-Bildgebung beruht auf einem intrinsischen „An“-/„Aus“-Blinken der fluoreszierenden Chromophore. Mit BaLM wurde eine laterale Auflösung von ca. 50 nm erreicht.^[79]

550–560 nm und 440–450 nm hin- und hergeschaltet werden können.^[59] Das rsTagRFP zeigt eine größere Helligkeit und einen 6-fach höheren Umschaltkontrast als rsCherry und rsCherryRev.

Aufgrund des Unterschieds in den Absorptionsspektren des fluoreszierenden und des dunklen Zustands von rsTagRFP kann dieses Molekül als Akzeptor für photochromen FRET (pcFRET) mit gelben FPs als Donoren kombiniert werden^[60, 94] (Abbildung 2c, Tabelle 2). pcFRET ist ein

lichtinduziertes reversibles FRET-Umschalten, das erreicht wird, indem man die Absorption des FRET-Akzeptors verändert. pcFRET erleichtert den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen und ist als interne Kontrolle für FRET geeignet.

Reversibel schaltbare Phänotypen können für superauflösende Techniken Vorteile bieten. In der Praxis wurde die superauflösende Bildgebung mit rsFps allerdings durch die mangelnde Ermüdungsfestigkeit der FPs beschränkt, die nur

etwa hundertmal reversibel umgeschaltet werden konnten ohne auszubleichen (Tabelle 3). Außerdem reichen Helligkeit und Kontrast der besten roten rsFPs nicht an die von roten PAFPs und PSFPs heran (Tabelle 1). Bis heute wurden drei Typen superauflösender Techniken auf rsFP-Basis beschrieben: die reversiblen sättigbaren optischen (Fluoreszenz)-Übergänge (RESOLFT),^[67a] PALM mit unabhängiger Datenerfassung (PALMIRA)^[59] und PALM mit Zweifarben-Stroboskop-Beleuchtungsmikroskopie (S-PALM).^[83] Mit dem tetrameren asFP595 als rotem rsFP wurden in RESOLFT Bakterien abgebildet.^[95] Dabei wurde eine laterale Auflösung von 50–100 nm erreicht. Mit rsCherryRev für eine Zeitraffer-PALMIRA-Abbildung des endoplasmatischen Reticulums lebender Zellen kam man bis zu einer Auflösung von etwa 75 nm.^[59] Ermüdungsfestere rote rsFPs sollten künftig die Ergebnisse mit RESOLFT und PALMIRA verbessern und zur Verbreitung dieser Techniken beitragen, mit denen man intrazelluläre Vorgänge mit superauflösender Genauigkeit untersuchen kann (Tabelle 3).

8. Chromophorchemie

Die sich schnell entwickelnden Anwendungsmöglichkeiten für die Bildgebung erfordern die Verbesserung der RFP-Sonden. Ein rationales Design neuer RFPs beruht auf Kenntnissen über die Prinzipien von Bildung und Funktion der Chromophore. Studien zu Kristallographie,^[2f,g,96] Mutagenese, Isotopenuntersuchungen,^[2i,97] Fließgleichgewichts- und zeitauf lösender Spektroskopie,^[97,98] Massenspektrometrie,^[37,96a] elektronischen Strukturberechnungen^[99] und der Synthese von Modellchromophoren^[100] wurden durchgeführt, um die Umwandlungen der roten Chromophore aufzuklären. Es gibt inzwischen genügend Informationen, um neue RFPs auf der Grundlage einer rationalen Strategie zu entwerfen.

RFPs enthalten ein chromophorbildendes Tripeptid aus den konservierten Aminosäuren Tyr66 und Gly67 und dem variablen Rest 65 (die Nummerierung entspricht dem GFP von *Aequorea victoria*). Eine zentrale 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-5-imidazolon-Struktur ist allen roten Chromophoren gemeinsam, während die Modifikation des Proteinrückgrats in Position 65 variiert. So entsteht eine ganze Reihe bekannter rotverschobener Chromophore (Abbildung 3).

Es gibt zwei Haupttypen roter Chromophore: DsRed-ähnliche^[101] und Kaede-ähnliche^[2c] Chromophore (Abbildung 3). Das DsRed-ähnliche Chromophor bildet sich als Ergebnis einer autokatalytischen oder photoinduzierten Transformation des Tripeptids X65-Tyr66-Gly67, während für das Kaede-ähnliche rote Chromophor das Tripeptid His65-Tyr66-Gly67 charakteristisch ist und die Transformation nur photochemisch ausgelöst wird.

Heute gibt es drei Hauptfamilien von RFPs mit dem DsRed-ähnlichen Chromophor: Derivate von DsRed,^[101] eqFP578^[38] und eqFP611.^[102] Es ließ sich nachweisen, dass der

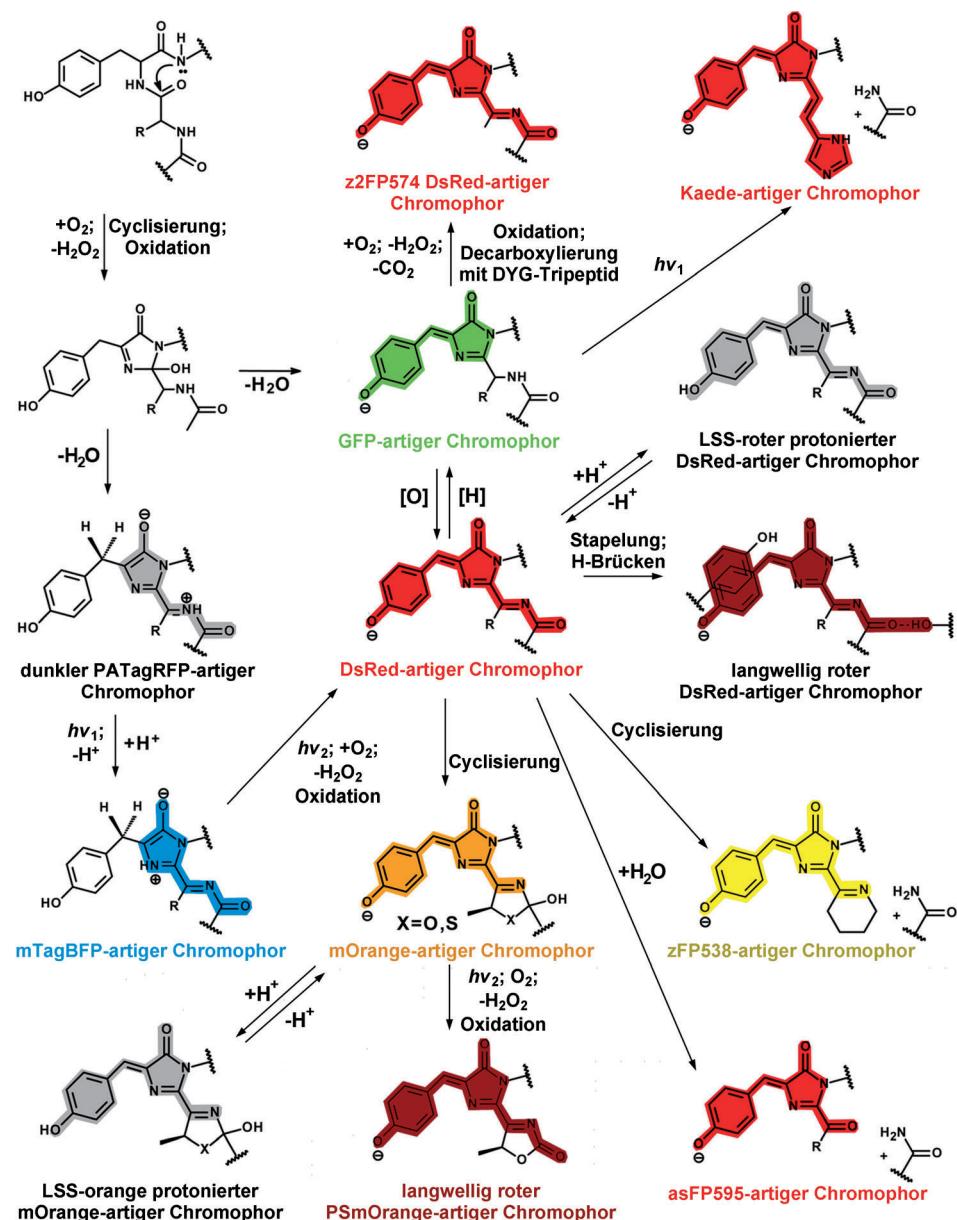


Abbildung 3. Mechanismen der Synthesen der Chromophore vom Typ DsRed, Kaede, mOrange, zFP538, asFP595, langwelliges DsRed, PSmOrange, LSS-Rot und LSS-Orange. Die rote, dunkelrote, orange, blaue, grüne und gelbe Farbe der Chromophorstrukturen entspricht dem spektralen Erscheinungsbild ihrer Fluoreszenz; graue Farbe bezeichnet einen nichtfluoreszierenden Zustand. Übergänge, die durch Licht der Wellenlängen 405 oder 488 nm induziert werden können, sind durch $h\nu_1$ und $h\nu_2$ gekennzeichnet. [O] und [H] weisen auf Oxidations- bzw. Reduktionsmittel hin. Die Chromophore sind in der *cis*-Konfiguration gezeigt, auf die Darstellung von *trans*-Chromophoren oder von *cis-trans*-Isomerisierungen wurde verzichtet.

chemische Mechanismus der Reifung des DsRed-ähnlichen Chromophors zunächst die Bildung der N-Acylimin-C=N-Bindung beinhaltet, die charakteristisch für den mTagBFP-Chromophor^[103] ist, dann wird die C^a-C^b-Doppelbindung in der Tyr66-Seitenkette gebildet^[2b, 99] (Abbildung 3). Es gibt nur ein DsRed-ähnliches RFP, für das die Reifung über eine Zwischenstufe wie beim GFP-Chromophor nachgewiesen wurde.^[2d] Untersuchungen an verschiedenen FPs mit unterschiedlichen Phänotypen (Dunkel-nach-rotes PAmCherry,^[2a] mCherry-basierte FTs,^[2e] mTagBFP^[103a] und mTagBFP2^[103b]) stützen die Struktur der mTagBFP-ähnlichen blauen Zwischenstufe.

Der (dunkle) „Aus“-Zustand des roten PAmCherry hat die gleiche Struktur wie das mTagBFP-ähnliche Chromophor, allerdings ohne blaue Fluoreszenz.^[2a] Nach Bestrahlung mit violettem Licht lagert sich der dunkle Chromophor photochemisch in den rot fluoreszierenden DsRed-ähnlichen Zustand um. PATagRFP hat im dunklen Zustand sehr wahrscheinlich die gleiche Struktur wie die Vorstufe des mTagBFP-ähnlichen Chromophors (Abbildung 3).^[52] Der Mechanismus des reversiblen Photoschaltens wurde an rsTagRFP untersucht.^[94] Dabei wurde eine *cis-trans*-Isomerisierung des DsRed-ähnlichen Chromophors mit gleichzeitiger Protonierung/Deprotonierung als Auslöser des rsTagRFP-Zyklus zwischen dunkel und fluoreszierend nachgewiesen.

Der zweite Typ roter Chromophore, die Kaede-ähnlichen Verbindungen (Abbildung 3), findet sich im roten Zustand von grün-nach-rot-FSFPs.^[2c] Im grünen Zustand haben diese FPs das Chromophor vom GFP-Typ. Nach Bestrahlung mit violettem Licht kommt es zur Photoumwandlung der grünen in die rote Form über eine β-Eliminierung. Im Verlauf dieser Reaktion wird eine His65-N-C^a-Bindung gespalten, und anschließend wird die C^a-C^b-Doppelbindung in der His65-Seitenkette gebildet, wobei das konjugierte π-Elektronensystem ausgeweitet wird und ein Kaede-ähnlicher roter Chromophor entsteht.^[2c]

Unterschiedliche Farbtöne von FPs ergeben sich bei weiteren Transformationen des DsRed-ähnlichen Chromophors. Die Cyclisierung der ersten Aminosäure des Chromophors mit der C=N-Gruppe oder der Carbonylgruppe des N-Acylimins ergibt ein gelbes zFP538-ähnliches Chromophor^[2f] oder ein orangefarbenes Chromophor vom mOrange-Typ^[2g] (Abbildung 3). Nach Bestrahlung des mOrange-ähnlichen Chromophors mit blaugrünem Licht kommt es zur photoinduzierten Oxidation des Chromophors und zur Spaltung der Polypeptidkette. Dadurch wird der im langwelligen Rot fluoreszierende Chromophor vom PSmOrange-Typ mit einem N-Acylimin und einer coplanaren Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung gebildet.^[37] Der autokatalytische Bruch des DsRed-ähnlichen Chromophors in der N-Acylimin-Region des verwandten FPs von *Anemonia sulcata* asFP595 führt zur Bildung des asFP595-ähnlichen Chromophors.^[2h]

In RFPs mit einer großen Stokes-Verschiebung wie LSSmKates^[45] und mKeima^[44] ist die Hydroxygruppe der Tyr66-Seitenkette des DsRed-ähnlichen Chromophors protoniert (Abbildung 3). Das anfänglich protonierte Chromophore geht unter Absorption eines Photons in den angeregten Zustand über. Dann kommt es zu einer Protonenübertragung aus dem angeregten Zustand heraus (excited state proton

transfer, ESPT), wobei die Hydroxygruppe von Tyr66 das Proton abspaltet und ein anionisches Chromophor zurückbleibt, das ein rotes Photon aussendet.^[2i] Die Möglichkeit, einen LSS-Phänotyp rational zu entwerfen, wurde anhand einer Reihe von FPs gezeigt, die zum ESPT fähig sind.^[2j] Ein schaltbarer ESPT, der auf pH-Wechsel reagiert, wurde mit dem Einzel-FP-Biosensor pHRed realisiert, der sich von mKeima ableitet.^[104]

Aus verfügbaren Daten über die Struktur roter Chromophore, ihrer Derivate und der Übergänge zwischen ihnen ziehen wir die folgenden Schlüsse: Erstens können chemische Übergänge zwischen den Chromophorstrukturen entweder autokatalytisch oder lichtinduziert ablaufen oder blockiert werden. Zweitens kann sich ein Chromophor in einem Fluoreszenzzustand oder in einem „farbigen“ Zustand befinden (d.h. es absorbiert Licht ohne zu emittieren). Drittens bestimmen die Aminosäurereste im Chromophor und seine Mikroumgebung die Übergänge zwischen den Chromophorstrukturen, die dadurch die besonderen FP-Phänotypen ausmachen.

Weitere Untersuchungen wie elektronische Strukturberechnungen und chemische Synthese von Modellchromophoren zusammen mit Kristallographie, Massenspektrometrie, biochemischer und photophysikalischer Charakterisierung sollten das chemische und spektrale Verhalten der FP-Chromophore zusätzlich aufklären. So könnte die Synthese von Modellverbindungen eine spezifische Chromophorstruktur unter verschiedenen möglichen Varianten, die aufgrund struktureller oder massenspektrometrischer Untersuchungen vorgeschlagen wurden, bestätigen. Sie könnte auch Aufschluss über den Einfluss chemischer Gruppen auf die spektralen und photochemischen Eigenschaften der Chromophore geben, an deren Aufbau sie beteiligt sind.^[2h, 100]

9. Ausblick

Durch die Optimierung spezifischer RFP-Eigenschaften für besondere Bildgebungsverfahren wird sich die Leistungsfähigkeit der Sonden verbessern lassen (Tabelle 2). RFPs mit größerer Helligkeit und besserer Lichtstabilität insbesondere im langwelligen Rot werden dringend benötigt.

Großer Bedarf besteht auch für RFPs, die für Zwei-Photonen-Anregung optimiert sind. Die Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren, um große Bibliotheken von RFP-Mutanten im Zwei-Photonen-Modus zu durchmustern, ist für diesen Zweck erforderlich.

PALM-basierte superauflösende Bildgebung wird von PAFPs mit verbesserter Einzelmolekül-Helligkeit und Lichtstabilität profitieren. Ein anderer superauflösender Ansatz, RESOLFT, schöpft noch nicht sein volles Potenzial zur Bildgebung in lebenden Zellen mit rsFPs als Sonden aus. Um ein Bild zu erzeugen, müssen die rsFPs eine große Zahl von Schaltzyklen ohne Helligkeitsverlust durchlaufen können. Das kürzlich veröffentlichte lichtstabile grüne rsEGFP regt dabei weitere Entwicklungen der RESOLFT-Abbildung an.^[66] Neue rote rsFPs sollten eine Mehrfarbenvariante dieser Technik verfügbar machen. PALM- und RESOLFT-Verfahren könnten auch von der Entwicklung roter

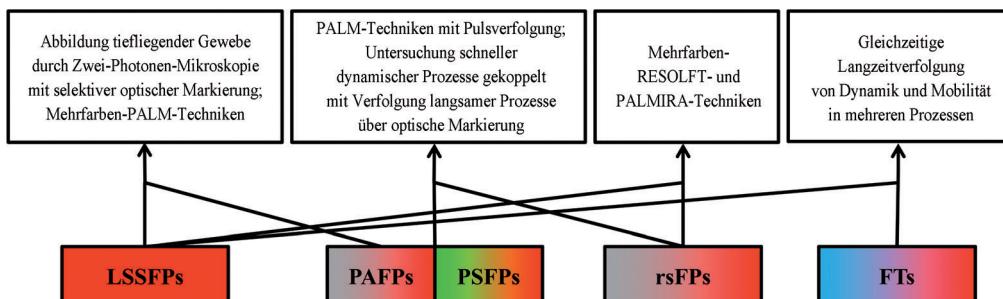


Abbildung 4. Mögliche Anwendungen für RFPs mit kombinierten Phänotypen. Die unterschiedlichen FP-Phänotypen sind in der unteren Reihe notiert. Zwei Phänotypen, die in einem einzelnen FP kombiniert werden können, sind mit einem Pfeil verbunden, der auf die Abbildungsvarianten zeigt, für die das neue FP geeignet ist. Mögliche Kombinationen von LSSFPs, PAFPs/PSFPs, rsFPs und FTs sind dargestellt. Die Hintergrundfarben entsprechen den verschiedenen FP-Phänotypen und deuten die spektralen Eigenschaften der Chromophorfluoreszenz an.

rsFPs profitieren, bei denen die Fluoreszenzanregung von dem lichtinduzierten Umschaltvorgang abgekoppelt ist, sodass eine bessere Steuerung des Geschehens durch Lichteinstrahlung möglich wird. Ein entsprechendes grünes rsFP, Dreiklang genannt, ist seit kurzem verfügbar.^[105]

Es gibt eine große Nachfrage nach Bildgebungsverfahren für die Untersuchung mehrerer zellulärer Vorgänge zur gleichen Zeit. Dazu werden spektral auflösbare orangefarbene, rote und langwellige rote FP-Varianten benötigt. LSSFPs wären für Mehrfarben-FRET, FCCS und Zwei-Photonen-Mikroskopie sehr wertvoll. ESPT in langwellig rot FP könnte entsprechende LSSFPs mit LSSmKate2 oder LSSm-Orange kombinierbar machen. Hilfreich wäre auch eine autokatalytische Chromophorwanderung von Orange nach langwelligem Rot, die als FT-Phänotyp für die Abbildung tiefliegender Gewebe geeignet wäre.

Eine weitere Verschiebung der RFPs hin zum infraroten Spektralbereich wird die Mikroskopie am lebenden Objekt und die Abbildung des ganzen Körpers erleichtern. Dies ist in bakteriellen Phytochromen, die Biliverdin als Fluoreszenzfarbstoff erfordern, zwar bereits eingeführt, doch wären auch Infrarot-FPs aus der GFP-Proteinfamilie nützlich. Kristallstrukturanalysen von RFPs mit dem DsRed-ähnlichen Chromophoren zeigen, dass eine C=O-Gruppe des N-Acylimins aus der Chromophorebene herausragt.^[2b,g] Eine Rotverschiebung bei der FP-Anregung sollte möglich sein, wenn die C=O-Gruppe coplanar zum Chromophor orientiert wird. Diese Eigenschaft lässt sich in dem photoinduzierten langwellig roten PSmOrange-ähnlichen Chromophor beobachten (Abbildung 3). Eine Sonde mit autokatalytischer Bildung dieses Chromophortyps für langwelliges Rot würde die Bildgebung bei Tieren in der NIRW-Region mit GFP-ähnlichen FPs ermöglichen.

Eine andere Strategie zur Entwicklung neuer FPs ist die Kombination unterschiedlicher FP-Phänotypen in einem einzigen Protein. Neu veröffentlichte RFP-Varianten und ihre jeweiligen Anwendungen sind in Abbildung 4 zusammengestellt. Nicht alle FP-Eigenschaften können kombiniert werden; nur Phänotypen mit unabhängigen Chromophor-Transformationswegen können zusammengebracht werden (Abbildung 3). Beispielsweise sind unterschiedliche Aminosäuren an der Bildung der LSS und der photoaktivierbaren Phänotypen beteiligt; ihre Kombination würde ein PA-LSSFP ergeben.

Um eine optimale Fluoreszenzsonde auszuwählen, sollte man alle RFP-Eigenschaften in Bezug zur ausgewählten Mikroskopietechnik, zum biologischen Objekt und zum experimentellen Aufbau bewerten. Verbesserte RFPs bestehender und neuer Phänotypen werden in Zukunft die Entwicklung neuer Abbildungstechniken für zahlreiche herausfordernde Fragestellungen der Biologie anregen.

Die Arbeiten wurden durch die Zuwendungen GM073913 und CA164468 der US National Institutes of Health gefördert.

Eingegangen am 16. Januar 2012
Online veröffentlicht am 31. Juli 2012

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] a) L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142–155; b) I. Johnson, M. T. Z. Spence, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies, 11. Aufl., Life Technologies Corp. USA, 2010.
- [2] a) F. V. Subach, V. N. Malashkevich, W. D. Zencheck, H. Xiao, G. S. Filonov, S. C. Almo, V. V. Verkhusha, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 21097–21102; b) O. M. Subach, V. N. Malashkevich, W. D. Zencheck, K. S. Morozova, K. D. Piatkevich, S. C. Almo, V. V. Verkhusha, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 333–341; c) H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, A. Miyawaki, *Mol. Cell* **2003**, 12, 1051–1058; d) A. A. Pakhomov, V. I. Martynov, *Biochemistry* **2007**, 46, 11528–11535; e) S. Pletnev, F. V. Subach, Z. Dauter, A. Wlodawer, V. V. Verkhusha, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2243–2253; f) S. J. Remington, R. M. Wachter, D. K. Yarbrough, B. Brancaud, D. C. Anderson, K. Kallio, K. A. Lukyanov, *Biochemistry* **2005**, 44, 202–212; g) X. Shu, N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Biochemistry* **2006**, 45, 9639–9647; h) I. V. Yampolsky, S. J. Remington, V. I. Martynov, V. K. Potapov, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Biochemistry* **2005**, 44, 5788–5793; i) K. D. Piatkevich, V. N. Malashkevich, S. C. Almo, V. V. Verkhusha, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10762–10770.
- [3] a) R. L. Strack, D. E. Strongin, D. Bhattacharyya, W. Tao, A. Berman, H. E. Broxmeyer, R. J. Keenan, B. S. Glick, *Nat. Methods* **2008**, 5, 955–957; b) W. Tao, B. G. Evans, J. Yao, S. Cooper, K. Cornetta, C. B. Ballas, G. Hangoc, H. E. Broxmeyer, *Stem Cells* **2007**, 25, 670–678.
- [4] R. L. Strack, B. Hein, D. Bhattacharyya, S. W. Hell, R. J. Keenan, B. S. Glick, *Biochemistry* **2009**, 48, 8279–8281.

- [5] R. L. Strack, D. Bhattacharyya, B. S. Glick, R. J. Keenan, *BMC Biotechnol.* **2009**, *9*, 32.
- [6] N. C. Shaner, M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 545–551.
- [7] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567–1572.
- [8] E. M. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo, M. E. Bulina, A. S. Scheglov, A. F. Fradkov, A. Gaintzeva, K. A. Lukyanov, S. Lukyanov, T. W. Gadella, D. M. Chudakov, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 555–557.
- [9] A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, A. Miyawaki, *Cell* **2008**, *132*, 487–498.
- [10] H. Tsutsui, S. Karasawa, Y. Okamura, A. Miyawaki, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 683–685.
- [11] S. Kredel, F. Oswald, K. Nienhaus, K. Deuschle, C. Rocker, M. Wolff, R. Heilker, G. U. Nienhaus, J. Wiedenmann, *PLoS One* **2009**, *4*, e4391.
- [12] a) W. B. Frommer, M. W. Davidson, R. E. Campbell, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2833–2841; b) A. Ibraheem, R. E. Campbell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 30–36.
- [13] a) H. J. Carlson, R. E. Campbell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 19–27; b) C. Schultz, A. Schleifenbaum, J. Goedhart, T. W. Gadella, Jr., *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1323–1330.
- [14] Y. Sun, C. F. Booker, S. Kumari, R. N. Day, M. Davidson, A. Periasamy, *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 054009.
- [15] T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10554–10559.
- [16] D. E. Johnson, H. W. Ai, P. Wong, J. D. Young, R. E. Campbell, J. R. Casey, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20499–20511.
- [17] Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y. F. Chang, M. Nakano, A. S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, R. E. Campbell, *Science* **2011**, *333*, 1888–1891.
- [18] a) J. Y. Fan, Z. Q. Cui, H. P. Wei, Z. P. Zhang, Y. F. Zhou, Y. P. Wang, X. E. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *367*, 47–53; b) S. A. Davidson, R. H. Gilkey, H. S. Colburn, L. H. Carney, *J. Acoust. Soc. Am.* **2006**, *119*, 2258–2275.
- [19] T. Sunabori, A. Tokunaga, T. Nagai, K. Sawamoto, M. Okabe, A. Miyawaki, Y. Matsuzaki, T. Miyata, H. Okano, *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1204–1212.
- [20] M. Sugiyama, A. Sakaue-Sawano, T. Iimura, K. Fukami, T. Kitaguchi, K. Kawakami, H. Okamoto, S. Higashijima, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20812–20817.
- [21] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, *Science* **2004**, *305*, 1007–1009.
- [22] A. H. Voie, D. H. Burns, F. A. Spelman, *J. Microsc.* **1993**, *170*, 229–236.
- [23] M. Tokunaga, N. Imamoto, K. Sakata-Sogawa, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 159–161.
- [24] J. Huisken, D. Y. Stainier, *Development* **2009**, *136*, 1963–1975.
- [25] a) B. G. Wang, K. Konig, K. J. Halbhuber, *J. Microsc.* **2010**, *238*, 1–20; b) W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76; c) W. Denk, K. Svoboda, *Neuron* **1997**, *18*, 351–357.
- [26] G. H. Patterson, D. W. Piston, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2159–2162.
- [27] D. Entenberg, J. Wyckoff, B. Gligorijevic, E. T. Roussos, V. V. Verkhusha, J. W. Pollard, J. Condeelis, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1500–1520.
- [28] M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo, T. E. Hughes, A. Rebane, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 393–399.
- [29] B. Hein, K. I. Willig, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14271–14276.
- [30] A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710–711.
- [31] M. Z. Lin, M. R. McKeown, H. L. Ng, T. A. Aguilera, N. C. Shaner, R. E. Campbell, S. R. Adams, L. A. Gross, W. Ma, T. Alber, R. Y. Tsien, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1169–1179.
- [32] K. S. Morozova, K. D. Piatkevich, T. J. Gould, J. Zhang, J. Beversdorf, V. V. Verkhusha, *Biophys. J.* **2010**, *99*, L13–15.
- [33] D. Shcherbo, I. I. Shemiakina, A. V. Ryabova, K. E. Luker, B. T. Schmidt, E. A. Souslova, T. V. Gorodnicheva, L. Strukova, K. M. Shidlovskiy, O. V. Britanova, A. G. Zaraisky, K. A. Lukyanov, V. B. Loschenov, G. D. Luker, D. M. Chudakov, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 827–829.
- [34] X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Science* **2009**, *324*, 804–807.
- [35] G. S. Filonov, K. D. Piatkevich, L. M. Ting, J. Zhang, K. Kim, V. V. Verkhusha, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 757–761.
- [36] N. C. Deliolanis, R. Kasmieh, T. Wurdinger, B. A. Tannous, K. Shah, V. Ntziachristos, *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 044008.
- [37] O. M. Subach, G. H. Patterson, L. M. Ting, Y. Wang, J. S. Condeelis, V. V. Verkhusha, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 771–777.
- [38] D. Shcherbo, E. M. Merzlyak, T. V. Chepurnykh, A. F. Fradkov, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, K. A. Lukyanov, E. A. Bogdanova, A. G. Zaraisky, S. Lukyanov, D. M. Chudakov, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 741–746.
- [39] R. Diéguez-Hurtado, J. Martín, I. Martínez-Corral, M. D. Martínez, D. Megías, D. Olmeda, S. Ortega, *Genesis* **2011**, *49*, 36–45.
- [40] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [41] O. Zapata-Hommer, O. Griesbeck, *BMC Biotechnol.* **2003**, *3*, 5.
- [42] H. W. Ai, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. E. Campbell, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 401–403.
- [43] D. M. Shcherbakova, M. A. Hink, L. Joosen, T. J. Gadella, Jr., V. V. Verkhusha, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7913–7923..
- [44] T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo, A. Miyawaki, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 577–581.
- [45] K. D. Piatkevich, J. Hulit, O. M. Subach, B. Wu, A. Abdulla, J. E. Segall, V. V. Verkhusha, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5369–5374.
- [46] K. Bacia, S. A. Kim, P. Schwille, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 83–89.
- [47] H. Kawano, T. Kogure, Y. Abe, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 373–374.
- [48] D. Shcherbo, C. S. Murphy, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, T. V. Chepurnykh, A. S. Shcheglov, V. V. Verkhusha, V. Z. Pletnev, K. L. Hazelwood, P. M. Roche, S. Lukyanov, A. G. Zaraisky, M. W. Davidson, D. M. Chudakov, *Biochem. J.* **2009**, *418*, 567–574.
- [49] F. V. Subach, O. M. Subach, I. S. Gundorov, K. S. Morozova, K. D. Piatkevich, A. M. Cuervo, V. V. Verkhusha, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 118–126.
- [50] T. Tsuboi, T. Kitaguchi, S. Karasawa, M. Fukuda, A. Miyawaki, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 87–94.
- [51] F. V. Subach, G. H. Patterson, S. Manley, J. M. Gillette, J. Lippincott-Schwartz, V. V. Verkhusha, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 153–159.
- [52] F. V. Subach, G. H. Patterson, M. Renz, J. Lippincott-Schwartz, V. V. Verkhusha, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6481–6491.
- [53] M. S. Gunewardene, F. V. Subach, T. J. Gould, G. P. Penoncello, M. V. Gudheti, V. V. Verkhusha, S. T. Hess, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1522–1528.
- [54] D. M. Chudakov, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2024–2032.
- [55] S. A. McKinney, C. S. Murphy, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, L. L. Looger, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 131–133.
- [56] a) S. Habuchi, H. Tsutsui, A. B. Kochaniak, A. Miyawaki, A. M. van Oijen, *PLoS One* **2008**, *3*, e3944; b) H. Hoi, N. C. Shaner, M. W. Davidson, C. W. Cairo, J. Wang, R. E. Campbell, *J. Mol. Biol.* **2010**, *401*, 776–791.
- [57] J. Fuchs, S. Bohme, F. Oswald, P. N. Hedde, M. Krause, J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 627–630.

- [58] K. B. Bravaya, B. L. Grigorenko, A. V. Nemukhin, A. I. Krylov, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 265–275.
- [59] A. C. Stiel, M. Andresen, H. Bock, M. Hilbert, J. Schilde, A. Schonle, C. Eggeling, A. Egner, S. W. Hell, S. Jakobs, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2989–2997.
- [60] F. V. Subach, L. Zhang, T. W. Gadella, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, V. V. Verkhusha, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 745–755.
- [61] a) G. T. Hanson, T. B. McAnaney, E. S. Park, M. E. Rendell, D. K. Yarbrough, S. Chu, L. Xi, S. G. Boxer, M. H. Montrose, S. J. Remington, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15477–15488; b) J. R. Moore, S. A. Davidson, M. Singh, *Gynecol. Oncol.* **2004**, *95*, 729–732.
- [62] D. M. Chudakov, V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, E. A. Souslova, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1435–1439.
- [63] J. Wiedenmann, S. Ivanchenko, F. Oswald, F. Schmitt, C. Rocker, A. Salih, K. D. Spindler, G. U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15905–15910.
- [64] V. Adam, M. Lelimousin, S. Boehme, G. Desfonds, K. Nienhaus, M. J. Field, J. Wiedenmann, S. McSweeney, G. U. Nienhaus, D. Bourgeois, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18343–18348.
- [65] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [66] 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.
- [67] a) S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158; b) S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32; c) B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, *Cell* **2010**, *143*, 1047–1058.
- [68] T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 954–956.
- [69] S. W. Hell, M. Kroug, *Appl. Phys. B* **1995**, *60*, 495–497.
- [70] S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1347–1355.
- [71] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17565–17569.
- [72] P. Kner, B. B. Chhun, E. R. Griffis, L. Winoto, M. G. Gustafsson, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 339–342.
- [73] M. Andresen, A. C. Stiel, J. Folling, D. Wenzel, A. Schonle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1035–1040.
- [74] J. C. Vaughan, X. Zhuang, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 880–881.
- [75] S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [76] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* **2007**, *317*, 1749–1753.
- [77] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266–6271; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176.
- [78] J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 943–945.
- [79] D. T. Burnette, P. Sengupta, Y. Dai, J. Lippincott-Schwartz, B. Kachar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 21081–21086.
- [80] A. G. York, A. Ghitani, A. Vaziri, M. W. Davidson, H. Shroff, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 327–333.
- [81] G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, H. F. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3125–3130.
- [82] T. J. Gould, M. S. Gunewardene, M. V. Gudheti, V. V. Verkhusha, S. R. Yin, J. A. Gosse, S. T. Hess, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 1027–1030.
- [83] C. Flors, J. Hotta, H. Uji-i, P. Dedecker, R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13970–13977.
- [84] S. T. Hess, T. J. Gould, M. V. Gudheti, S. A. Maas, K. D. Mills, J. Zimmerberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17370–17375.
- [85] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [86] a) A. Egner, C. Geisler, C. von Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A. C. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schonle, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3285–3290; b) siehe Lit. [59].
- [87] a) M. Tomura, N. Yoshida, J. Tanaka, S. Karasawa, Y. Miwa, A. Miyawaki, O. Kanagawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10871–10876; b) D. Kedrin, B. Gligorijevic, J. Wyckoff, V. V. Verkhusha, J. Condeelis, J. E. Segall, J. van Rheezen, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 1019–1021; c) S. L. Griswold, K. C. Sajja, C. W. Jang, R. R. Behringer, *Genesis* **2011**, *49*, 591–598; d) S. Nowotschin, A. K. Hadjantonakis, *BMC Dev. Biol.* **2009**, *9*, 49.
- [88] A. Dovas, B. Gligorijevic, X. Chen, D. Entenberg, J. Condeelis, D. Cox, *PLoS One* **2011**, *6*, e16485.
- [89] F. Cella Zanacchi, Z. Lavagnino, M. Perrone Donnorso, A. Del Bue, L. Furia, M. Faretta, A. Diaspro, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1047–1049.
- [90] G. U. Nienhaus, K. Nienhaus, A. Holzle, S. Ivanchenko, F. Renzi, F. Oswald, M. Wolff, F. Schmitt, C. Rocker, B. Vallone, W. Weidemann, R. Heilker, H. Nar, J. Wiedenmann, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 351–358.
- [91] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M. W. Davidson, E. Betzig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20308–20313.
- [92] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, C. M. Waterman, *Nature* **2010**, *468*, 580–584.
- [93] T. A. Brown, A. N. Tkachuk, G. Shtengel, B. G. Kopek, D. F. Bogenhagen, H. F. Hess, D. A. Clayton, *Mol. Cell Biol.* **2011**, *31*, 4994–5010.
- [94] S. Pletnev, F. V. Subach, Z. Dauter, A. Wlodawer, V. V. Verkhusha, *J. Mol. Biol.* **2012**, *417*, 144–151.
- [95] M. A. Schwentker, H. Bock, M. Hofmann, S. Jakobs, J. Beversdorf, C. Eggeling, S. W. Hell, *Microsc. Res. Tech.* **2007**, *70*, 269–280.
- [96] a) siehe Lit. [2b]; b) siehe Lit. [2e].
- [97] J. N. Henderson, M. F. Osborn, N. Koon, R. Gepshtein, D. Huppert, S. J. Remington, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13212–13213.
- [98] X. Shu, L. Wang, L. Colip, K. Kallio, S. J. Remington, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 460–466.
- [99] K. B. Bravaya, O. M. Subach, N. Korovina, V. V. Verkhusha, A. I. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2807–2814.
- [100] a) I. V. Yampolsky, A. A. Kislukhin, T. T. Amatov, D. Shcherbo, V. K. Potapov, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 96–104; b) I. V. Yampolsky, T. A. Balashova, K. A. Lukyanov, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8077–8082.
- [101] L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldridge, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11990–11995.
- [102] J. Petersen, P. G. Wilmann, T. Beddoe, A. J. Oakley, R. J. Devenish, M. Prescott, J. Rossjohn, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44626–44631.
- [103] a) O. M. Subach, I. S. Gundorov, M. Yoshimura, F. V. Subach, J. Zhang, D. Gruenwald, E. A. Souslova, D. M. Chudakov, V. V. Verkhusha, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1116–1124; b) O. M. Subach, P. J. Cranfill, M. W. Davidson, V. V. Verkhusha, *PLoS One* **2011**, *6*, e28674.
- [104] M. Tantama, Y. P. Hung, G. Yellen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10034–10037.
- [105] 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.