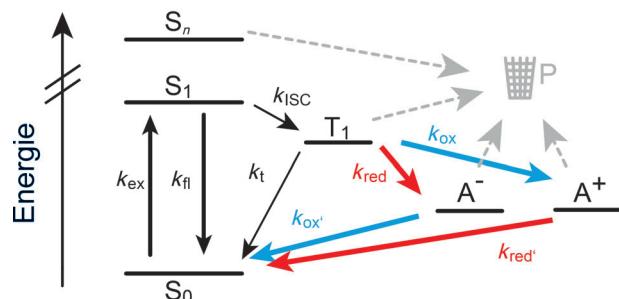


# Zwillingssrekombination als Photostabilisierungsmechanismus für Fluoreszenzfarbstoffe\*\*

Phil Holzmeister, Andreas Gietl und Philip Tinnefeld\*

**Abstract:** Entgegen der üblichen Annahme aufgrund von Photozerstörungswegen durch höher angeregte Zustände zeigen wir, dass eine weitere Verbesserung der Photostabilität mit diffusionsbasierten Photostabilisierungsstrategien möglich ist. Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie offenbart, dass Thiolationen effektiv Triplett-Zustände durch photoinduzierten Elektronentransfer löschen. Dabei entsteht selten ein Radikal anion, sondern der Farbstoff kehrt durch einen nahezu instantan erfolgenden Elektronen-Rücktransfer (Zwillingssrekombination) effizient in den Grundzustand zurück. Für gewöhnlich verwendete Reduktionmittel wie Ascorbinsäure oder Trolox wird hingegen keine Zwillingssrekombination beobachtet. Der Mechanismus vermeidet die Bildung von Radikalkationen und verbessert die Photostabilität von Fluorophoren. Wir zeigen, dass eine Kombination aus  $\beta$ -Mercaptoethanol und klassischem reduzierenden und oxidierenden System für einige Farbstoffe die besten Resultate liefert.

In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte beim Verständnis von Einzelmolekül-Photoblinken und -Bleichen erzielt, woraus sich eine Gruppe von Rezepturen sowohl für Einzelmolekülmessungen als auch für Superauflösungsmikroskopie entwickelt hat.<sup>[1]</sup> Konzepte zur Stabilisierung der Fluoreszenzintensität und Photostabilität von organischen Farbstoffen beinhalten üblicherweise Sauerstoffentzug durch eines von mehreren enzymatischen Sauerstoffentzugssystemen<sup>[2]</sup> und die Entvölkernung verschiedener reaktiver Zwischenprodukte, wie Triplett- und Radikalionen-Zustände. Triplett-Zustände werden zum Beispiel durch Cyclooctatetraen entvölkert oder durch Elektronentransferreaktionen mit Oxidationsmitteln wie Methylviologen (MV), Nitrobenzylalcohol oder Troloxchinon (TXQ), und Reduktionmitteln wie Trolox (TX) und Ascorbinsäure (AA). Nach dem ROXS-Prinzip<sup>[3]</sup> werden durch Photoionisierung oder (Triplett)-Oxidation gebildete Radikalkationen durch Reduktionsmittel wieder in den Grundzustand zurückgeführt. Alternativ werden von reduzierenden Photostabilisatoren verursachte



**Abbildung 1.** Photophysikalisches Modell organischer Farbstoffe in Anwesenheit von Reduktions- und Oxidationsmitteln. Der Farbstoff wird wiederholt vom Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  angeregt ( $k_{ex}$ ) und kann zu  $S_0$  unter Emission eines Photons zurückkehren. Gelegentlich verursacht das Intersystem Crossing ( $k_{ISC}$ ) einen Übergang des Farbstoff in den Triplett-Zustand  $T_1$ . Von hier konkurrieren mehrere Wege zur Rückkehr nach  $S_0$  ( $k_t$ ) mit der Reduktion zu einem Radikal anion-Zustand  $A^-$  ( $k_{red}$ , rot), von wo der Farbstoff nach  $S_0$  reoxidiert wird ( $k_{ox}$ , blau). Diese Elektronentransferreaktionen können auch in umgekehrter Reihenfolge ablaufen. Photobleichen (graue Pfeile) tritt hauptsächlich von Zuständen mit langer Lebensdauer und höher angeregten Zuständen ( $S_n$ ) auf.

Radikal anionen durch Oxidationsmittel aus der Lösung wieder in den Grundzustand überführt (Abbildung 1).<sup>[3a,4]</sup>

Während solche Photoschutzrezepturen die Photostabilität für manche Fluoreszenzfarbstoffe bis zu 5000-fach erhöhen und mehr als  $10^8$  Photonen von einzelnen Molekülen unter biologisch relevanten Bedingungen emittiert werden können,<sup>[5]</sup> wird die Photostabilität für andere Farbstoffe weniger verbessert, insbesondere für solche die unterhalb von 600 nm angeregt werden.<sup>[3a,6]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass die Anregung mit Licht kürzerer Wellenlängen mit Photozerstörungswegen über höher angeregte Zustände einhergeht, die nicht mit den diffusionsbegrenzten Schutzmechanismen üblicher Photostabilisierungsrezepturen blockiert werden können.<sup>[5,7]</sup> Aber selbst wenn die Absorption zu höher angeregten Singulett-Zuständen der erste Schritt auf dem Weg zum Photobleichen ist, könnte die Ereigniskette dorthin immer noch längerlebige Zustände beinhalten, die mit passenden Zusatzreagentien entvölkert werden können.<sup>[8]</sup>

Wir stellen hier die Reduktion mit effizientem Elektronen-Rücktransfer (Zwillingssrekombination, ZR) als einen Photoschutzmechanismus vor, der die Photostabilität von Farbstoffen im Wellenlängenbereich unter 600 nm deutlich verbessert. Unsere Messungen deuten darauf hin, dass die erhöhte Photobleichtendenz bei kürzeren Wellenlängen mit photooxidierten Zuständen zusammenhängt, die durch ZR vermieden werden. Dazu wird lediglich eine einzige aliphatische

[\*] P. Holzmeister, A. Gietl, Prof. Dr. P. Tinnefeld  
Technische Universität Braunschweig  
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie  
Hans-Sommer-Straße 10, 38106 Braunschweig (Deutschland)  
E-Mail: p.tinnefeld@tu-braunschweig.de

[\*\*] Wir bedanken uns bei Bettina Wünsch, Thorben Cordes, Marco Monecke und Dominik Pfennig für fruchtbare Diskussionen. Diese Arbeit wurde gefördert durch das BMBF (13N11461) und die DFG (TI 329/6-1). P.H. ist dankbar für ein Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310300> zu finden.

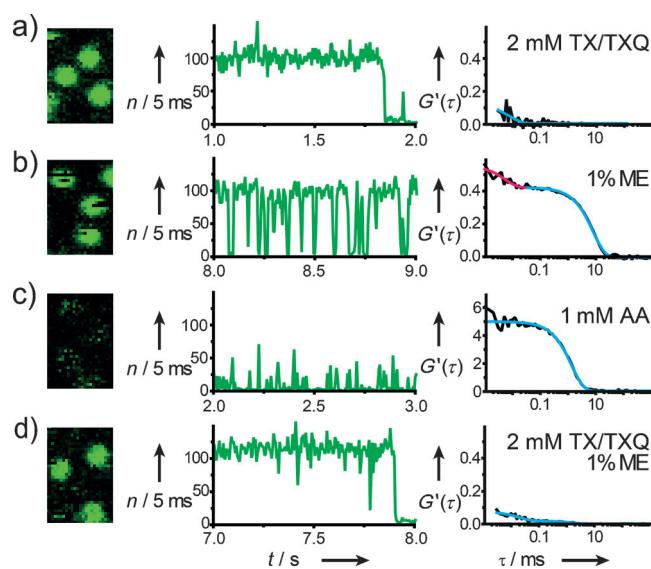
tische Thiolverbindung benötigt. Diesen Mechanismus leiten wir aus Messungen an einzelnen Farbstoffmolekülen ab, die mithilfe von Oligonukleotiden auf einer BSA/Biotin/Neuroavidin-Oberfläche immobilisiert sind.

Aliphatische Thiole, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) oder  $\beta$ -Mercaptoethylamin, zeigen Photoschutzwirkung, ohne dabei Fluoreszenz zu löschen (siehe Lit. [9], zit. Lit.), und werden daher seit vielen Jahren in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Ihnen werden viele nützliche Eigenschaften, wie antioxidative Eigenschaften, Triplett-Lösung, Sauerstoffentzug und Entfernen reaktiver Sauerstoffspezies zugeschrieben.<sup>[4,9b,10]</sup> Seit kurzem werden sie auch bevorzugt in der Superauflösungsmikroskopie verwendet, da einzelne Fluoreszenzfarbstoffe in Anwesenheit von Thiolen durch UV- und sichtbares Licht reversibel an- bzw. ausgeschaltet werden können.<sup>[11]</sup> Obwohl Thiole häufig als Photostabilisatoren eingesetzt werden, wurden sie noch nicht im Kontext aktueller Photostabilisierungsstrategien, die sich auf die Entvölkerung reaktiver Zwischenprodukte fokussieren, untersucht.

Für unter 600 nm absorbierende Farbstoffe wie Atto532, Alexa532 oder Alexa568 ist die nicht zufriedenstellende Fluoreszenz durch ein Bild einzelner Moleküle und eine Intensitätsspur in Abbildung 2a veranschaulicht. Alexa568 fluoresziert zwar in Gegenwart von Reduktions- und Oxidationsmitteln (2 mM Mischung aus TX/TXQ;<sup>[3b]</sup> enzymatischer Sauerstoffentzug bei allen Messungen) kontinuierlich ohne zu Blinken, aber bleicht schnell.

Wird ME anstelle der gewöhnlichen ROXS-Reagentien verwendet, wird eine deutlich erhöhte Photostabilität in Kombination mit häufigem Blinken beobachtet (Abbildung 2b, Abbildungen S1 b-d zeigen Fluoreszenzspuren mit zunehmender ME-Konzentration). Dieses Blinken im Millisekundenbereich tritt auch auf, wenn ein klassisches Reduktionsmittel wie AA eingesetzt wird. Quantitativ erscheint das Blinken allerdings sehr unterschiedlich (vergleiche Bilder und Spuren in Abbildung 2b,c) und zudem ist die Photostabilität mit ME deutlich höher als mit AA. Da ME ein Reduktionsmittel ist, ordnen wir die Fluoreszenzunterbrechungen (Dunkelzustände) Radikalionen zu, die durch eine photoinduzierte Reduktion des Triplett-Zustands gebildet werden.<sup>[12]</sup> Das Verschwinden der Aus-Zustände in Gegenwart von Oxidationsmitteln (TX/TXQ-Mischung, Abbildung 2d)<sup>[3b]</sup> stützt diese Interpretation. Eine solche Kombination eines Thiols mit ROXS-Reagentien optimiert Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen, da das Blinken minimiert wird, aber eine hohe Photostabilität erhalten bleibt.

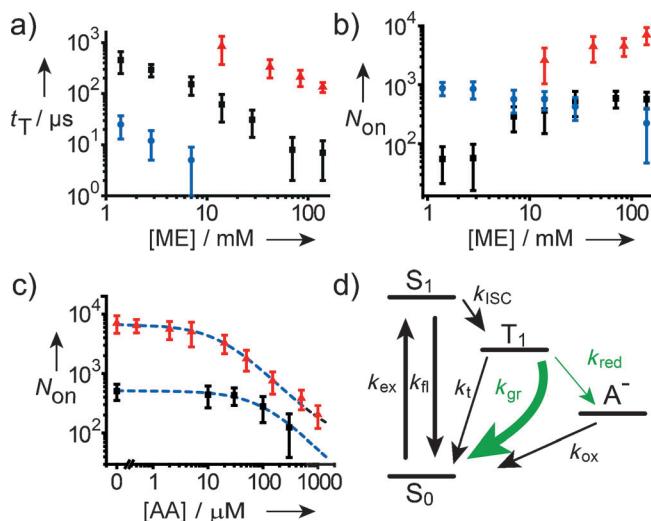
Die Daten werfen die Frage auf, wie sich der Wirkmechanismus der Thiolverbindung von dem der klassischen Reduktionsmittel AA oder TX, die üblicherweise in ROXS-Rezepturen verwendet werden, unterscheidet.<sup>[3a,b]</sup> Daher analysieren wir die Intensitätsfluktuationen im Detail. Eine Autokorrelations(AC)-Analyse (Abbildung 2b, Abbildung S2; siehe die Hintergrundinformationen für Details der AC-Analyse) offenbart Intensitätsfluktuationen auf zwei Zeitskalen in Gegenwart von Thiolen. Die kurze Komponente ordnen wir dem Triplett-Zustand zu, der mit zunehmender ME-Konzentration schneller entvölkert wird (Abbildung S1 b-d). Interessanterweise nimmt dabei die Photosta-



**Abbildung 2.** Konfokale Bilder ( $1.2 \times 1.7 \mu\text{m}^2$ ,  $2 \text{ ms px}^{-1}$ ,  $50 \text{ nm px}^{-1}$ , Farbskala  $0-150 \text{ Photonen px}^{-1}$ ), 1 s Ausschnitte aus Fluoreszenzspuren in Abwesenheit von Sauerstoff und AC-Funktionen (rechts, Offset abgezogen  $G'(\tau) = G(\tau) - 1$  mit biexponentieller Anpassung (blau, rot) für Alexa568-Moleküle. a) Im ROXS Puffer (TX/TXQ) emittiert das Molekül stabil, aber bleicht schnell. Es kann keine signifikante AC-Amplitude beobachtet werden. b) ME verursacht Blitzen des Farbstoffs, welches im Scan und in der Spur sichtbar ist. Die AC-Analyse offenbart Intensitätsfluktuationen auf zwei Zeitskalen: schnelle Triplett-Dynamik und Dynamik im ms-Bereich (Redox-Blitzen). c) Das Reduktionsmittel AA ruft ebenfalls Blitzen hervor, aber die Anzahl detekтирter Photonen vor dem Blitzen ist stark reduziert im Vergleich zu (b). d) Das beste Resultat wird mit einer Kombination aus ROXS und ME erreicht, womit das Fluorophor ohne signifikant zu blinken emittiert und länger lebt als ohne ME.

bilität immer weiter zu. Das Blitzen aufgrund der Bildung von Radikalionen (lange Komponente der AC) erscheint hingegen unabhängig von der ME-Konzentration. Ausgehend von einem biexponentiellen Abfall der AC-Funktion berechnen wir die Übergangsraten und die Zahl der detektierten Photonen, bevor der Farbstoff in einen Triplett- ( $N_T$ ) oder Radikal-Zustand ( $N_{\text{on}}$ ) übergeht. Die Triplett-Lebensdauern  $t_T$  verschiedener Farbstoffe, einschließlich Atto532, Alexa568 und Atto647N, nehmen gleichermaßen ab (Abbildung 3a). Ein analoger Effekt der Triplett-Entvölkering wird erreicht, wenn statt der ME-Konzentration der pH-Wert erhöht wird (Abbildung S3), was darauf hindeutet, dass das Thiolat anion die aktive Spezies ist (in Übereinstimmung mit Lit. [13]).

Üblicherweise nimmt  $N_{\text{on}}$  mit zunehmender Reduktionsmittelkonzentration ab, weil die Reduktion mit direkten Triplett-Singulett-Übergängen ( $k_t$ ) konkurriert und bei höheren Konzentrationen auch Singulett-Lösung einsetzt.<sup>[12]</sup> Bei Atto647N und Alexa568 nimmt  $N_{\text{on}}$  aber überraschenderweise mit der Thiolkonzentration zu (Abbildung 3b). Im Fall von Atto532 wird  $N_{\text{on}}$  zwar leicht reduziert, aber deutlich weniger, als vom ROXS-Konzept und der effizienten Triplett-Lösung in Abbildung 3a zu erwarten wäre. Dieser Unterschied im Einfluss von Thiolen auf die Photophysik verglichen mit dem üblichen Reduktionsmittel AA lässt sich leicht mit konfokalen Scans immobilisierter Alexa568-Moleküle



**Abbildung 3.** Analyse des Löschmechanismus von Thiolen. Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von Gauß-Verteilungen (Abbildung S2). a) Die Triplett-Lebensdauern  $t_T$  von Atto532 (blaue Kreise), Alexa568 (schwarze Quadrate) und Atto647N (rote Dreiecke) sind indirekt proportional zur ME-Konzentration. b) Entsprechende  $N_{on}$  für dieselben Farbstoffe zeigen ein deutlich unterschiedliches Verhalten. c)  $N_{on}$  in Anwesenheit von 1% ME nehmen ab, wenn AA mit ME um die Triplett-Lösung konkurriert. Die gestrichelte Linien sind Anpassungen ( $N_{on} = N_T / (1 - \Phi_{zr}^0 / (1 + \alpha [AA] t_T))$ ) an die experimentellen Daten, wobei  $N_T$  und  $t_T$  auf die Werte in Abwesenheit von AA festgesetzt sind. Mit statistischer Gewichtung erhält man  $\Phi_{zr}^0$  von 99.0% (Atto647N) und 99.6% (Alexa568) und  $\alpha$  von  $4.0 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (Atto647N) und  $5.4 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (Alexa568) (siehe Text und die Hintergrundinformationen). d) ZR-ROXS-Schema, bei dem ZR erfolgreich mit der Bildung von Radikalionen konkurriert.

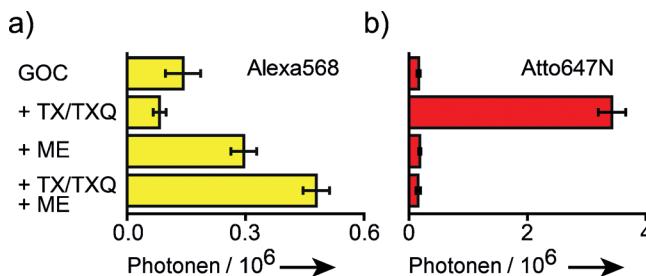
demonstrieren (Abbildung S4). Weil eine Zunahme der AA-Konzentration die Bildung von Dunkelzuständen immens beschleunigt (reduzierte  $N_{on}$ ), sind die Moleküle in Abwesenheit von Sauerstoff kaum zu detektieren. Stattdessen verbessert eine Zunahme der ME-Konzentration die Sichtbarkeit der Moleküle, weil sich diese seltener in einem Dunkelzustand befinden. Daraufhin quantifizieren wir den Effekt der AA-Konzentration auf  $N_{on}$  in Anwesenheit von 1% ME für die Farbstoffe Atto647N und Alexa568. Abbildung 3c zeigt, dass  $N_{on}$  für niedrige AA-Konzentrationen konstant bleibt und nur beeinflusst wird, wenn die Konzentration hoch genug ist, damit AA mit dem vorhandenen Thiolat um die Triplett-Lösung konkurriert. Die kürzere Triplett-Lebensdauer von Alexa568 im Vergleich zu Atto647N (Abbildung 3a) erklärt, warum die Abnahme von  $N_{on}$  bei Atto647N schon bei niedrigeren Konzentrationen einsetzt. Des Weiteren stellen wir fest, dass  $N_T$  für Atto647N konstant bleibt, während  $N_{on}$  reduziert wird (Abbildung S5). Dies stützt die Annahme, dass die Reduktion vom  $T_1$ - und nicht vom  $S_1$ -Zustand stattfindet.

Aus all diesen Informationen schließen wir, dass Thiolat-Ionen tatsächlich Triplett-Löscher sind. Allerdings wirken sie, im Gegensatz zu AA oder TX, nicht nur einfach als Reduktionsmittel, sondern sie können einen zusätzlichen Triplett-Löschmechanismus hervorrufen. Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit einem Mechanismus, bei dem die Reduktion gefolgt von ZR mit der Reduktion gefolgt vom Verlassen des

Lösungsmittelkäfigs konkurriert (Abbildung 3d), was auch für Alkylsulfide beobachtet wurde.<sup>[14]</sup> Für diesen Mechanismus wird eine schwache Abhängigkeit von  $N_{on}$  von der Thiolatkonzentration erwartet. In erster Näherung sollte  $N_{on}$ , ebenso wie die ZR-Ausbeute ( $\Phi_{zr}$ , der Anteil der ZR-Ereignisse bezogen auf alle Thiolatreduktionen einschließlich ZR und Entkommen der Radikale), unabhängig von der Thiolatkonzentration sein. Beachtet man zusätzlich die intrinsische Rate  $k_t$ , die mit der Thiolatreaktion konkurriert, sollte  $N_{on}$  mit zunehmender Thiolatkonzentration etwas abnehmen. Andererseits zeigen Farbstoffe oft auch ohne redoxaktiven Reagenzien ein Blinken, das langsamer als Triplett-Blinken ist und durch Photooxidation oder durch Reduktion durch redoxaktive Gruppen in der unmittelbaren Umgebung des Farbstoffs verursacht werden kann (z. B. durch Guanosin in der zur Immobilisierung verwendeten DNA oder durch Wechselwirkung mit der BSA-beschichteten Oberfläche).<sup>[3a,4]</sup> Da solche Einflüsse mit zunehmender Thiolatkonzentration verringert sind, kann  $N_{on}$  auch etwas ansteigen.

Ein Vergleich der Zahl detekterter Photonen vor Übergängen in den Triplett-Zustand zur Zahl der Photonen vor Übergängen in den Radikal-Zustand ( $\Phi_{zr} = 1 - N_T / N_{on}$ ) zeigt, dass die Ausbeute  $\Phi_{zr}$  für alle untersuchten Farbstoffe bei etwa 99% liegt. Die Ähnlichkeit der Ausbeuten ist plausibel, da das gebildete Thiyil-Radikal ungeladen ist und die Farbstoffe eine vergleichbare Größe haben. Wie für einen ZR-Mechanismus erwartet, nimmt  $\Phi_{zr}$  für Atto647N mit zunehmender Viskosität von 99.0 auf fast 99.5% zu (Abbildung S6). Je höher die Viskosität ist, desto niedriger wird die Wahrscheinlichkeit, dass die Produkte der anfänglichen Reduktion den Lösungsmittelkäfig verlassen können. Die Zunahme um 0.5% bedeutet eine Verdopplung der Zahl detekterter Photonen, bevor ein Radikal entsteht. Die Tatsache, dass die Aus-Zeiten mit zunehmender Thiolatkonzentration nicht abnehmen (Abbildung S7), bestätigt unsere Interpretation eines Zwillingsrekombinations(ZR)-ROXS-Mechanismus anstatt eines Zweikomponenten(tc)-ROXS-Mechanismus.<sup>[3b]</sup> Der leichte Anstieg der Aus-Zeiten ist im Einklang mit der berichteten Sauerstoffentzug-Eigenschaft von Thiolen.<sup>[10b,13a]</sup>

Um das optimale Photostabilisierungssystem für blaue/grüne Farbstoffe oder sogar ein generelles System für alle Farbstoffe zu erhalten, untersuchen wir das Photobleichen von einzelnen Molekülen mithilfe von interner Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie. Für Alexa568 sehen wir, dass die Photostabilität in Gegenwart von Thiolen zunimmt und das beste Ergebnis mit einer Kombination von ME und tc-ROXS, durch das verbleibendes Blinken unterdrückt wird, erreicht wird (Abbildung 4a, Abbildung S8 und Video 1). Dagegen weist Atto647N, obwohl  $N_{on}$  zunimmt (Abbildung 3b), ein deutlich abweichendes Verhalten auf (Abbildung 4b). Während Atto647N extrem photostabil mit tc-ROXS ist,<sup>[3a]</sup> ist Photobleichen mit Thiolen scheinbar etwa 20-fach verstärkt. Allerdings stellt eine Reaktivierung mit UV-Licht (405 nm) die Fluoreszenz wieder her, was zeigt, dass die Farbstoffe nicht irreversibel geblichen sind (Abbildung S9). Es ist bekannt, dass Thiole neben Photoschutzwirkung auch die reversible Bildung von langlebigen Dunkelzuständen hervorrufen, welche wahrscheinlich durch Photoaddition verursacht werden.<sup>[11a,d,13b]</sup> Daher können die meisten Farb-



**Abbildung 4.** Absolute Zahl detekterter Photonen bis zum Photobleichen (Mittelwert + SD von mindestens drei Messungen) in verschiedenen Puffern. „GOC“: enzymatischer Sauerstoffentzug in Tris pH 8.6, „+ TX/TXQ“: GOC + 2 mM TX/TXQ; „+ ME“: GOC + 1% ME; „+ TX/TXQ + ME“: GOC + 2 mM TX/TXQ und 1% ME. a) Für Alexa568 nimmt die Photonenzahl mit ME verglichen mit konventionellem tc-ROXS zu und das beste Ergebnis wird mit ME und TX/TXQ erreicht. b) Im Fall von Atto647N reduziert die Zugabe von ME aufgrund von langlebigen Dunkelzuständen die Photonenzahl (Abbildung S9). Unter „GOC“- und „+ ME“-Bedingungen weisen die Moleküle deutliches Blinken auf (Abbildung 2).

stoffe mit UV-Licht sowohl an- als auch ausgeschaltet werden, was für die Superauflösungsmikroskopie genutzt wird.<sup>[11b-d]</sup> Das erklärt, warum die Photostabilität von Atto647N in Gegenwart von Thiolen niedriger erscheint (Abbildung 4b). Eine stärkere Stabilisierung könnte daher durch UV-Reaktivierung erreicht werden. Ebenso zeichnet sich für andere Farbstoffe, einschließlich Atto532, Alexa532 und Alexa488, eine verbesserte Photostabilisierung mit tc-ROXS oder mit ZR-ROXS ab (Abbildung S10). Nichtsdestotrotz kann eine UV-Photoaktivierung die Gesamtphotonenzahl in Gegenwart von Thiolen in allen Fällen weiter erhöhen.<sup>[11c]</sup> Eine verbesserte Photostabilität mit ZR-ROXS ist naheliegend, weil die Farbstoffe weniger lange in potenziell reaktiven Radikal-anion-Zuständen verweilen und insbesondere Radikalkationen-Zustände vermieden werden. Die Verbesserung im Vergleich zu tc-ROXS zeigt auch, dass die verbliebenen Photozerstörungswege für kurzwellige Farbstoffe nicht nur mit höher angeregten Zuständen zusammenhängen. Auch wenn eine aktive Rolle von Redoxmitteln wie AA und MV beim Photobleichen nicht ausgeschlossen werden kann, so hat es den Anschein, dass insbesondere semioxidierte Formen als Zwischenstufe für Photobleichen fungieren (Abbildung S11 und Diskussion in den Hintergrundinformationen).

Hier stellen wir die Zwillingsrekombination als Photostabilisierungsmechanismus in der Einzelmolekül-Biophysik vor. Unsere Daten weisen darauf hin, dass Thiole im Unterschied zu klassischen Reduktionsmitteln wie AA und TX eine ZR-Ausbeute von über 99 % aufweisen und damit Triplett- und Redox-Blinken selbst in Abwesenheit von Oxidationsmitteln verringern. Da Thiole auch langlebige Dunkelzustände induzieren können, kann die Zahl detekterter Photonen bis zum scheinbaren Photobleichen abnehmen (Atto647N) oder zunehmen (Alexa568), abhängig vom individuellen Schutz durch ZR im Vergleich zur Tendenz zu Schalten. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer besseren Photostabilisierung durch diffusionsbegrenzte Mechanismen, da gegenwärtige Rezepte empfindliche photooxidierte Zu-

stände beinhalten.<sup>[5,7]</sup> Unsere Ergebnisse erweitern den ROXS-Mechanismus und stoßen eine (neuerliche) Suche nach photostabilisierenden Substanzen an, die eine hohe ZR-Ausbeute aufweisen, ohne Schalten zu verursachen. Der hier präsentierte Photostabilisierungsmechanismus ähnelt dem Mechanismus selbstheilender Farbstoffe, mit dem Unterschied, dass keine kovalente Bindung erforderlich ist und die Schutzeinheit stetig erneuert wird.<sup>[15]</sup>

Aus praktischer Sicht verbessert eine Mischung aus tc-ROXS und ME generell das Verhalten von organischen Farbstoffen, wenngleich die relativen Konzentrationen in jedem Einzelfall angepasst werden müssen. Den Triplett-Zustand über ZR zu entvölkern, erscheint insbesondere auch für Einzelmolekülmessungen an diffundierenden Molekülen vielversprechend, weil selbst eine geringe Zahl an ZR-Zyklen die Photonenrate direkt erhöht und die Diffusionszeit generell so kurz ist, dass seltene und langlebige Radikal-Zustände vernachlässigbar sind. Außerdem sind die Substanzen für den ZR-ROXS-Mechanismus biokompatibel. Sie werden häufig in physiologischen Puffern verwendet (z.B. Dithiothreitol (DTT), siehe ZR-ROXS mit DTT in Abbildung S12) und kommen in lebenden Zellen vor (z.B. Glutathion).

Eingegangen am 27. November 2013,  
veränderte Fassung am 15. Januar 2014  
Online veröffentlicht am 8. April 2014

**Stichwörter:** Einzelmolekülstudien · Fluoreszenz · Photophysik · Photostabilisierung · Zwillingsrekombination

- [1] a) T. Ha, P. Tinnefeld, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 595–617; b) E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba, M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1057–1075.
- [2] a) I. Rasnik, S. A. McKinney, T. Ha, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 891–893; b) C. E. Aitken, R. A. Marshall, J. D. Puglisi, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1826–1835.
- [3] a) J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5545–5550; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465–5469; b) T. Cordes, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5018–5019; c) R. Dave, D. S. Terry, J. B. Munro, S. C. Blanchard, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2371–2381.
- [4] J. Widengren, A. Chmyrov, C. Eggeling, P. A. Lofdahl, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 429–440.
- [5] J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I. H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, P. Tinnefeld, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2475–2490.
- [6] A. Le Gall, D. Dulin, G. Clavier, R. Méallet-Renault, P. Bouyer, K. Perronet, N. Westbrook, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1657–1660.
- [7] a) C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 2979–2995; b) X. Kong, E. Nir, K. Hamadani, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4643–4654.
- [8] R. Kasper, M. Heilemann, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Proc. SPIE* **2007**, 66331Z; DOI: 10.1117/12.728221.
- [9] a) T. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama, F. Oosawa, *Nature* **1984**, *307*, 58–60; b) L. Song, C. A. Varma, J. W. Verhoeven, H. J. Tanke, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2959–2968.
- [10] a) P. S. Dittrich, P. Schwille, *Appl. Phys. B* **2001**, *73*, 829–837; b) P. Schäfer, S. van de Linde, J. Lehmann, M. Sauer, S. Doose, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3393–3400; c) L. A. Campos, J. Liu, X.

- Wang, R. Ramanathan, D. S. English, V. Munoz, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 143–146.
- [11] a) M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3801–3806; b) 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; c) S. van de Linde, A. Loschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 991–1009; d) G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027–1036.
- [12] J. Vogelsang, T. Cordes, C. Forthmann, C. Steinhauer, P. Tinnefeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8107–8112.
- [13] a) S. van de Linde, I. Krstic, T. Prisner, S. Doose, M. Heilemann, M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 499–506; b) G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien, X. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18192–18193.
- [14] K. Bobrowski, B. Marciniak, G. L. Hug, *J. Photochem. Photobiol. A* **1994**, *81*, 159–168.
- [15] a) P. Tinnefeld, T. Cordes, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 426–427; b) R. B. Altman, D. S. Terry, Z. Zhou, Q. Zheng, P. Geggier, R. A. Kolster, Y. Zhao, J. A. Javitch, J. D. Warren, S. C. Blanchard, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 68–71; c) J. H. M. van der Velde, E. Ploetz, M. Hiermaier, J. Oelerich, J. W. de Vries, G. Roelfes, T. Cordes, *ChemPhysChem*, **2013**, *14*, 4084–4093.