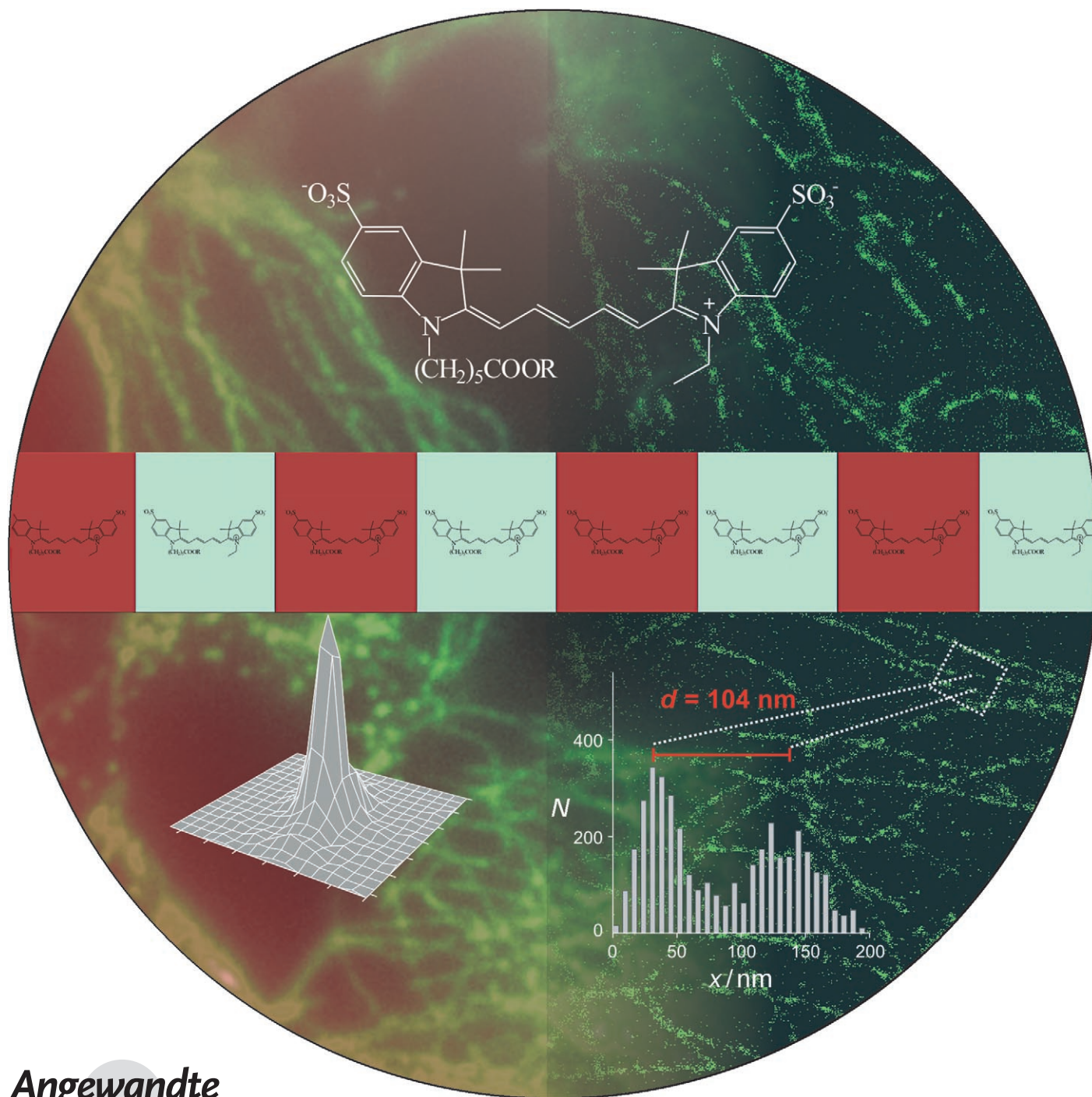


Fluoreszenzmikroskopie unterhalb der optischen Auflösungsgrenze mit konventionellen Fluoreszenzsonden**

Mike Heilemann,* Sebastian van de Linde, Mark Schüttpelz, Robert Kasper, Britta Seefeldt, Anindita Mukherjee, Philip Tinnefeld und Markus Sauer*



Fluoreszenztechniken, die die optische Auflösungsgrenze durchbrechen, können Einblicke in die intrazelluläre Organisation auf molekularer Ebene ermöglichen. In diesem Zusammenhang spielen optisch reversibel schaltbare Moleküle, so genannte Photoschalter, eine Schlüsselrolle.^[1,2] Eine Herausforderung allerdings bleibt das Markieren von Zielmolekülen, z.B. intrazellulären Strukturen, mit effizienten Photoschaltern. In aktuellen Arbeiten werden dazu entweder photoschaltbare fluoreszierende Proteine^[3] oder Paare von Fluoreszenzfarbstoffen, bestehend aus einem Reporter und einem Aktivator in genauer räumlicher Anordnung zueinander, eingesetzt.^[4]

Hier wird gezeigt, dass konventionelle Fluoreszenzfarbstoffe direkt als effiziente Photoschalter fungieren können, ohne dass ein Aktivatorfluorophor benötigt wird. Reversibles Schalten zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand wird durch Bestrahlung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen erreicht.^[5] Das Konzept der Bildgebung unterhalb der Auflösungsgrenze beruht dabei auf der stochastischen optischen Rekonstruktion (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM).^[4,6,7] Die wiederholte Aktivierung nur weniger Sonden durch Licht mit anschließender nanometergenauer Lokalisation liefert die Koordinaten für jede einzelne Fluoreszenzsonde, die schließlich zu einem Bild zusammengesetzt werden. Im Unterschied zu früheren Arbeiten^[4,7] wird hier ein direkter Ansatz gewählt: Carbocyaninfarbstoffe wie Cy5 oder Alexa647 werden ohne Aktivator als Photoschalter eingesetzt, sodass komplizierte Mehrfachmarkierungen von Antikörpern oder anderen Zielmolekülen nicht erforderlich sind. Wir bezeichnen diesen direkten Ansatz als dSTORM (direct STORM), und zeigen beispielhaft anhand der Fluoreszenzmikroskopie an Mikrotubuli- und Actinfilamenten in Säugerzellen, dass die optische Auflösungsgrenze durchbrochen und eine Auflösung von 21 nm erreicht werden kann.

Um die Begrenzung der optischen Auflösung in der konventionellen Mikroskopie zu umgehen, sind unterschiedliche Ansätze entwickelt worden. Zu nennen sind hier die Mikroskopie mit stehenden Wellen (standing wave microscopy, SWM),^[8] aber auch Ansätze wie 4PI^[9] und I⁵M^[10] sowie SSIM (saturated structured-illumination microscopy),^[11] und

schießlich dynamische Konzepte wie DSOM (dynamic saturation optical microscopy).^[12] Kürzlich wurde mit hochauflösenden Mikroskopiemethoden eine laterale Auflösung von 20 bis 30 nm und eine axiale Auflösung von 50 bis 60 nm erreicht, wie beispielsweise mit stimulierter Emission (stimulated emission depletion, STED),^[1,13–15] STORM,^[4,6,7] durch Verwendung photoaktivierbarer Proteine (photoactivated-localization microscopy, PALM)^[3] und weiteren verwandten Techniken.^[16–19] Während bei der STED-Mikroskopie die optische Auflösung durch effiziente Desaktivierung des angeregten Singulettzustands erreicht wird, beruhen STORM und PALM auf reversiblen optischen Übergängen (reversible saturable optical fluorescence transitions, RESOLFT)^[20] zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand, die vergleichbar stabil sind. Diese fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Zustände können, im Falle von photoschaltbaren Molekülen, durch Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge und relativ niedriger Intensität ineinander umgewandelt werden. Mithilfe von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie können die Signale einzelner Fluorophore getrennt detektiert werden, wenn diese einen Mindestabstand zueinander haben, der vom Mikroskop aufgelöst werden kann. Die genaue Position einzelner Farbstoffmoleküle kann nun nanometergenau durch Angleichen einer Gauß-Funktion an die Punktabbildungsfunktion (point-spread function, PSF) bestimmt werden.^[21–25] Dabei hängt die Genauigkeit der Positionsbestimmung im Idealfall nur von der Zahl der Photonen und der Standardabweichung der PSF ab und kann mit σ/\sqrt{n} angenähert werden.^[21] Durch den Einsatz von effizient und reversibel schaltbaren Fluorophoren kann deren Emissionsprofil zeitlich moduliert werden, sodass zum gleichen Zeitpunkt nur ein kleiner Teil aktiviert ist und fluoresziert.

Aufbauend auf unseren früheren Arbeiten zu photoschaltbaren Cyaninfarbstoffen^[5] zeigen wir, dass konventionelle Fluorophore wie Cy5 und Alexa647 sehr effizient und reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand geschaltet werden können (Abbildung 1 a), ohne dass ein zweiter Fluorophor als Aktivator dienen muss.^[4,6,7,26] Auf diese Weise können hochauflösende Bilder von intrazellulären Strukturen rekonstruiert werden, wobei käufliche Fluoreszenzsonden, beispielsweise eine große Zahl an Cy5- und Alexa647-markierten Antikörpern, Fab-Fragmenten, Proteinen, Peptiden oder anderen (Bio-)Molekülen, eingesetzt werden können.

Der Nachweis, dass einzelne Cy5- oder Alexa647-Moleküle reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand geschaltet werden können, wurde mit einem Cy5-markierten DNA-Doppelstrang erbracht, der auf einer Glasoberfläche immobilisiert und unter wässrigem Puffer mikroskopiert wurde (Abbildung 1 a). Analog zu früheren Arbeiten^[5] konnten einzelne Cy5-Moleküle und strukturell ähnliche Farbstoffe wie Alexa647 ohne Aktivator mehrere hundert Mal reversibel geschaltet werden. Bei der Bestrahlung mit 647 nm emittieren einzelne Farbstoffmoleküle eine konstante Zahl an Photonen, typischerweise mehrere tausend,^[5,6] bevor sie in einen nichtfluoreszierenden Zustand übergehen. Die Geschwindigkeitskonstante des Ausschaltens, k_{off} , ist linear abhängig von der An-

[*] Dr. M. Heilemann, S. van de Linde, Dr. M. Schüttelpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, Dr. A. Mukherjee, Prof. Dr. M. Sauer
Angewandte Laserphysik & Laserspektroskopie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-2958
E-Mail: heileman@physik.uni-bielefeld.de
sauer@physik.uni-bielefeld.de
Homepage: <http://www.physik.uni-bielefeld.de/experi/d3/>

Prof. Dr. P. Tinnefeld
Angewandte Physik – Biophysik, und Center for NanoScience
Ludwig-Maximilians-Universität
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)

[**] Die Autoren bedanken sich bei K. H. Drexhage für hilfreiche Diskussionen und die Bereitstellung von Alexa647-Phalloidin, und bei Dr. G. Wiebusch für technische Hilfe. Die Arbeit wurde im Rahmen des Biophotonik-Programms vom Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert.

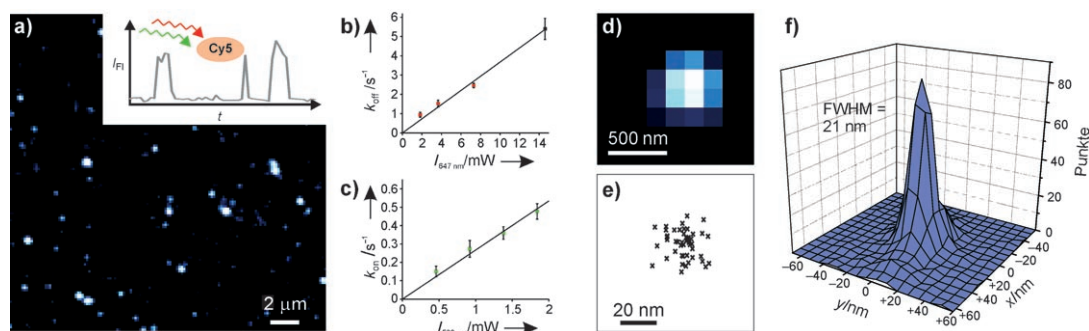


Abbildung 1. Grundprinzip von dSTORM mit dem Carbocyaninfarbstoff Cy5. a) Fluoreszenzbild im TIRF-Modus von Cy5-markierter, auf Glasdeckgläsern immobilisierter DNA in wässrigem Puffer. Durch gleichzeitige Anregung mit rotem (647 nm) und grünem (514 nm) Laserlicht wurden einzelne Cy5-Moleküle reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand geschaltet. b,c) Die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} des Schaltprozesses für Cy5-markierte DNA in Abhängigkeit von der Laserintensität. d) Abbildungsfunktion (PSF) eines einzelnen Cy5-Farbstoffs an einer DNA. Die Position eines einzelnen aktivierten Farbstoffmoleküls wird durch Angleichen einer Gauß-Funktion an die Abbildungsfunktion genau bestimmt. e) Mehrfache Positionsbestimmung einer einzelnen Cy5-markierten DNA, die reversibel zwischen dem fluoreszierenden und dem nichtfluoreszierenden Zustand geschaltet wurde. f) Die Überlagerung der Positionsbestimmung von über 50 Cy5-DNA-Molekülen ergibt eine Genauigkeit von (21 ± 1) nm.

regungsleistung (Abbildung 1 b). Die Reaktivierung mit k_{on} bei Bestrahlung mit 514 nm ist ebenso linear von der Leistung abhängig (Abbildung 1 c). Die benötigte Leistung für die Reaktivierung ist etwa 200-mal höher als für Methoden mit Aktivatorfluorophor, sie liegt jedoch noch immer im μ W- bis mW-Bereich.^[4,7] Da sich die lineare Abhängigkeit von k_{on} und k_{off} des reversiblen Schaltprozesses von den Bestrahlungsintensitäten zur Steuerung der Zahl aktiver Moleküle nutzen lässt, können unterschiedlich dicht markierte Proben mikroskopiert werden.

Fluoreszenzbilder wurden mit Totalreflexionsmikroskopie (total internal reflection fluorescence, TIRF) aufgenommen. Die gleichzeitige Bestrahlung mit 647 und 514 nm mit Anregungsintensitäten, welche an die Markierungsdichte der Probe angepasst wurden, sorgte dafür, dass sich nur ein kleiner Anteil der Fluorophore zum gleichen Zeitpunkt im fluoreszierenden Zustand befand. Die genaue Position einzelner Fluorophore wurde durch Angleichung einer Gauß-Funktion an die gemessene Abbildungsfunktion (Abbildung 1 d) mit hoher Präzision ermittelt, um aus tausenden von Einzelaufnahmen ein dSTORM-Bild zu konstruieren.^[7] Durch die Überlagerung vieler wiederholter Positionsbestimmungen einzelner Cy5-Moleküle an einer DNA (Abbildung 1 e) wurde eine Genauigkeit der Positionsbestimmung von 21 nm ermittelt (Abbildung 1 f).

Die elegante und einfache Anwendung von dSTORM zeigt sich an der Bildgebung filamentöser Strukturen des Zytoskeletts (Abbildung 2 und 3). Zur Immunfluoreszenz von Mikrotubuli wurden COS-7-Zellen zunächst mit einem primären Antikörper und anschließend mit Alexa647-markierten Fab-Fragmenten behandelt. Durch stochastisches An- und Ausschalten einer Subpopulation an Alexa647-Farbstoffen mit darauffolgender Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle wurden hochaufgelöste Bilder der Mikrotubuli konstruiert. Zur Konstruktion eines Bilds wurden dabei typischerweise 5000–40000 Einzelaufnahmen mit einer Aufnahme Frequenz von 5 bis 40 Hz und einer Gesamtmessdauer von 8 min aufgenommen. Während dieser Zeit wurde keine

nennenswerte mechanische Verschiebung beobachtet, die eine Korrektur erforderte.

Im Unterschied zu Bildern, die durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie erhalten wurden, sind in mit dSTORM konstruierten Bildern eines Mikrotubulinetzwerks dank der deutlich höheren Auflösung einzelne Mikrotubuli erkennbar (Abbildung 2 c und e). Aus den Schnittprofilen solcher einzelner Mikrotubuli konnte eine mittlere Breite von 35 bis 50 nm bestimmt werden (Abbildung 2 f und g), die näher an der tatsächlichen Breite eines Mikrotubulis (ca. 25 nm) liegt als Messungen in anderen Arbeiten,^[27] weil dSTORM mit kleineren markierten Fab-Fragmenten auskommt und nicht auf eine Kombination aus primären und mehrfach markierten sekundären Antikörpern angewiesen ist.^[7] Die effektive Auflösung von dSTORM ist durch den Einsatz kleinerer Fluoreszenzsonden somit erhöht. Des Weiteren können zahlreiche käufliche Fluoreszenzsonden (primäre Antikörper, Fab-Fragmente, Peptide usw.) direkt eingesetzt werden.

Anhand von Alexa647-markiertem Phalloidin, einem bicyclischen Heptapeptid, das an Actinfilamente bindet, wird der Vorteil von dSTORM im Vergleich zu anderen Methoden nochmals demonstriert (Abbildung 3). Hierzu wurden G-Actinmonomere zunächst auf Glas polymerisiert und die Struktur der entstandenen F-Actinfilamente mikroskopiert. Die konstruierten dSTORM-Bilder zeigen einzelne aufgelöste Actinfilamente mit deutlich höherem Kontrast als konventionelle Fluoreszenzmethoden (Abbildung 3 a und b). F-Actinfilamente spielen eine entscheidende Rolle in unterschiedlichen Bewegungsprozessen, wie bei der Muskelkontraktion und bei Transportprozessen. In vivo werden einzelne F-Actinfilamente mit einem charakteristischen Durchmesser von 7 nm nur selten beobachtet, weitaus häufiger jedoch in Bündeln mit typischen Breiten von 35 nm.^[28] dSTORM-Bilder von Actinfilamenten in COS-7-Zellen zeigen eine deutliche verbesserte Auflösung (Abbildung 3 c–e), und in einigen dichtgepackten Filamenten konnten Unterstrukturen mit Breiten von 100 nm aufgelöst werden (Abbildung 3 f).

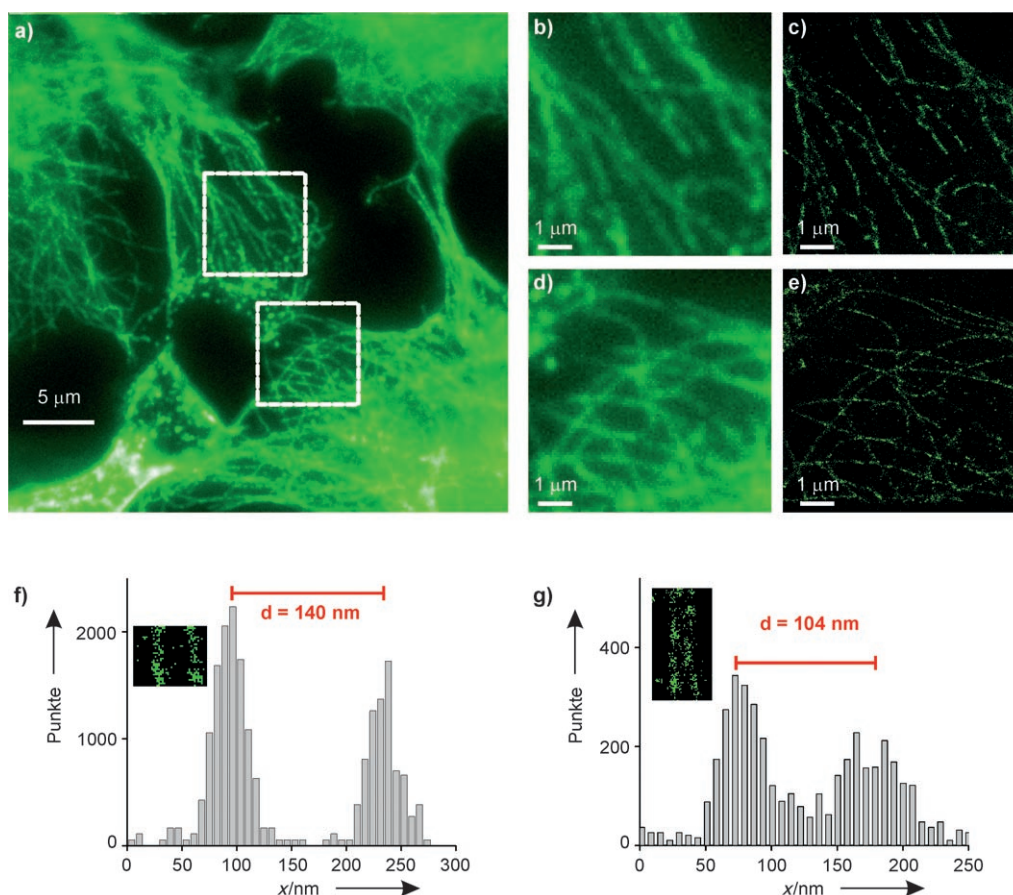


Abbildung 2. dSTORM an Mikrotubuli in COS-7-Zellen. a) Immunfluoreszenzbild von Mikrotubulin mit einem primären Antikörper und einem Alexa647-Fab-Fragment als Markierungen. b,d) Konventionelle Fluoreszenzbilder und c,e) dSTORM-Bilder der markierten Bereiche in (a). f,g) Schnittprofile von benachbarten Mikrotubuli im Abstand von 140 und 104 nm mit entsprechendem dSTORM-Bild.

Die mit dSTORM erhaltenen Ergebnisse stimmen dabei quantitativ mit jenen von alternativen Methoden überein.^[29]

Einsatz von Fusionsproteinen zur indirekten Markierung mit organischen Farbstoffen möglich (z.B. mit einem SNAP-

Darüber hinaus können in Schnittprofilen weitere kleine Strukturen mit Abständen von wenigen Nanometern erkannt werden.

Hier haben wir gezeigt, dass kleine, einfach mit Farbstoffen markierte Fluoreszenzsonden, die in großer Zahl kommerziell erhältlich sind, zur hochauflösenden Mikroskopie unterhalb der Auflösungsgrenze eingesetzt werden können. Die Grundlage hierfür ist der reversible optische Schaltprozess von Fluoreszenzfarbstoffen wie Cy5 und Alexa647, der durch simultane Einstrahlung von zwei Wellenlängen gesteuert wird. Eine Auflösung von ca. 20 nm kann erreicht werden, ohne dass ein Aktivatorfarbstoff in der Nähe des Fluoreszenzfarbstoffs positioniert werden muss, was in Experimenten zu Schwierigkeiten führen kann. Insbesondere ist damit auch der

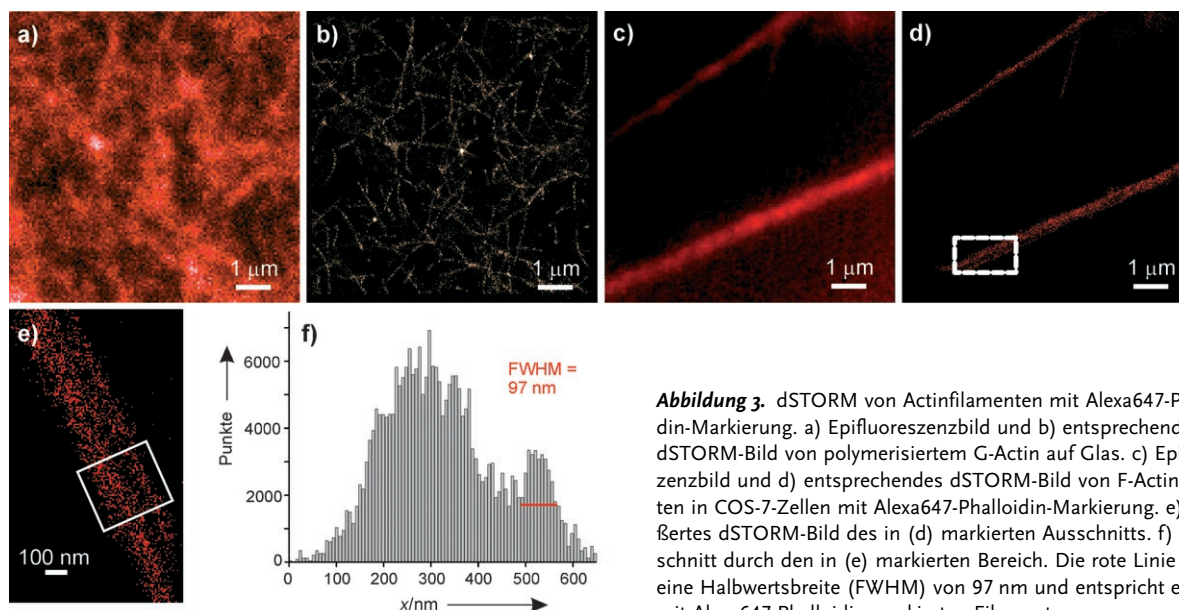


Abbildung 3. dSTORM von Actinfilamenten mit Alexa647-Phalloidin-Markierung. a) Epifluoreszenzbild und b) entsprechendes dSTORM-Bild von polymerisiertem G-Actin auf Glas. c) Epifluoreszenzbild und d) entsprechendes dSTORM-Bild von F-Actinfilamenten in COS-7-Zellen mit Alexa647-Phalloidin-Markierung. e) Vergrößertes dSTORM-Bild des in (d) markierten Ausschnitts. f) Profilschnitt durch den in (e) markierten Bereich. Die rote Linie zeigt eine Halbwertsbreite (FWHM) von 97 nm und entspricht einem mit Alexa647-Phalloidin markierten Filament.

Tag).^[30] Da auch weitere Fluoreszenzfarbstoffe wie Cy5.5, Cy7^[7] und Alexa680 optisch geschaltet werden können, sollte sich dSTORM auf einfache Weise zu einer Mehrfarbenmethode ausbauen lassen, um auch Wechselwirkungen von Biomolekülen mit hoher Auflösung zu untersuchen.

Experimentelles

Um die Schalteigenschaften des Carbocyaninfarbstoffes Cy5 in Gegenwart und in Abwesenheit des Aktivatorfarbstoffes Cy3 zu untersuchen, wurde ein DNA-Einzelstrang mit Cy5 und Cy3 in einem Abstand von 9 Basenpaaren markiert.^[4,7] Der komplementäre DNA-Strang wurde am 5'-Ende mit Biotin markiert. Eine doppelsträngige DNA wurde aus äquimolaren Konzentrationen der Einzelstränge in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) mit 50 mM NaCl hybridisiert (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan). Der DNA-Doppelstrang (dsDNA) wurde auf einer Glasoberfläche (LabTek, Nunc), die mit Streptavidin behandelt wurde, abgelegt.^[4] Einzelmolekülmessungen wurden in PBS-Puffer (pH 7.4) und 50 mM β -Mercaptoethylamin (MEA) unter Entfernung von Sauerstoff (0.5 mg mL⁻¹ Glucoseoxidase (Sigma), 40 mg mL⁻¹ Katalase (Roche), 10% (w/v) Glucose (Sigma)) ausgeführt (switching buffer). Die Glaskammern wurden mit Silicondichtungen verschlossen.

Um die Kinetik des Photoschaltens einzelner Cy5-Fluorophore an dsDNA zu bestimmen, wurden die Farbstoffe zunächst durch Bestrahlung mit 647 nm in den nichtfluoreszierenden Zustand gebracht. Für die Zahl der ausgeschalteten Farbstoffe über die Zeit ergab sich ein monoexponentielles Verhalten. Erwartungsgemäß war k_{off} nicht von der Gegenwart eines Aktivatorfarbstoffes abhängig. Die Reaktivierung (k_{on}) der Cy5-Fluorophore in Gegenwart oder Abwesenheit des Aktivatorfluorophors Cy3 wurde durch gleichzeitiges Bestrahlen mit 647 nm und 514 nm ermittelt. Auf diese Weise wurde ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausschalten erreicht, und aus dem Verhältnis der fluoreszierenden Farbstoffe zur Gesamtzahl, $M_{\text{active}}/M_{\text{total}} = k_{\text{on}}/(k_{\text{on}} + k_{\text{off}})$, wurde k_{on} bestimmt.

Affennierenfibroblasten der Zelllinie COS-7 wurden in LabTek8-Kammern (Nunc) kultiviert. Nach 12–24 Stunden wurden die Zellen mit 3.7% Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 10 Minuten fixiert. Die fixierten Zellen wurden fünf Mal mit PBS gewaschen und 15 Minuten in Blockpuffer (PBS mit 5% Ziegen Serum (NGS, Sigma) und 0.5% (v/v) Triton X-100) permeabilisiert. F-Actinfilamente wurden 30 Minuten mit Alexa647-Phalloidin (10^{-6} – 10^{-7} M, bereitgestellt von K. H. Drexhage, Universität Siegen) inkubiert und drei Mal mit PBS 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma) gewaschen. Mikrotubuli wurden zunächst 30 Minuten mit monoklonalen anti- β -Tubulin-Mausantikörpern (2-28-33, Invitrogen) und anschließend weitere 30 Minuten mit Alexa647-markierten Ziege-anti-Maus-F(ab')₂-Fragmenten behandelt, die als sekundäre Antikörper dienen. Ein Markierungsgrad von etwa zwei Farbstoffmolekülen wurde für die F(ab')₂-Fragmente bestimmt. Nach jedem Färbeschritt wurden drei Waschschritte mit PBS 0.1% (v/v) Tween 20 ausgeführt. Der PBS-Puffer wurde vor einer dSTORM-Aufnahme durch den „switching buffer“ ersetzt.

G-Actinmonomere vom Rindermuskel (5 μ M, Sigma) wurden auf unbehandelten LabTek8-Kammern in Gegenwart von 10 mM Imidazol-Hydrochlorid pH 7.2, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM ATP polymerisiert. Anschließend wurde die Oberfläche 60–120 Minuten mit Alexa647-Phalloidin (10^{-5} – 10^{-7} M) inkubiert und drei Mal mit PBS 0.1% (v/v) Tween 20 gewaschen.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Totalreflexionsmodus (TIRF) wurden an einem Olympus IX-71 mit einem Öl-immersionsobjektiv (PlanApo 60x, NA1.45, Olympus) ausgeführt. Licht der Wellenlängen 514 nm und 647 nm von einem Argon-Krypton-Laser (Innova 70C, Coherent) wurde mit einem AOTF selektiert und über einen Strahlteiler (532/647, AHF Analystechnik) in das Mikroskop geleitet. Das Fluoreszenzlicht wurde spektral ge-

filtert (700DF75 und HQ542LP, AHF Analystechnik) und mithilfe einer EMCCD-Kamera abgebildet (Andor Ixon DV897DCS-BV). Zusätzliche Linsen wurden im Detektionsstrahlengang eingebaut, um eine 100- bis 225-fache Vergrößerung und damit eine Abbildungs-pixelgröße von 70 bis 160 nm zu erreichen. Die Anregungsleistungen der beiden Laserlinien wurden an die Probe angepasst, sodass jeweils nur eine auflösbare Unterpopulation zu gleicher Zeit aktiviert war; typischerweise wurden Leistungen von 0.25 mW (514 nm) und 15 mW (647 nm) eingesetzt. Filme aus 5000 bis 40000 Einzelbildern mit Aufnahme-frequenzen von 5 bis 40 Hz wurden aufgenommen. Bei Anregungsleistungen von 15 mW bei 647 nm wurden für einzelne Farbstoffe etwa 300–500 Photonen in 50 ms detektiert, was einer ungefähren Präzision der Ortsbestimmung von 15 bis 20 nm entspricht.^[21] Unter diesen Bedingungen bleibt ein einzelner Farbstoff durchschnittlich während mehrerer Einzelbilder im fluoreszierenden Zustand und emittiert mehrere tausend Photonen pro Schaltzyklus.

Abbildungsfunktionen einzelner Fluoreszenzfarbstoffe wurden in jedem einzelnen Bild mit einer Gauß-Funktion angeglichen, und ihre genaue Position wurde bestimmt. Ausgeschlossen wurden Farbstoffe mit geringer Photonenzahl, unsymmetrischer oder vergrößerter Abbildungsfunktion.^[7] Zur Darstellung der rekonstruierten Bilder wurde jeder Pixel in 10 Unterpixel unterteilt, sodass eine Pixelgröße von 16 bis 7 nm erreicht wurde, und jede Positionbestimmung eines einzelnen Fluorophors wurde einem Unterpixel zugeordnet. Die Helligkeit in den konstruierten Bildern ist ein Maß für die Häufigkeit der Lokalisation an einer bestimmten Stelle.

Eingegangen am 21. Mai 2008

Online veröffentlicht am 22. Juli 2008

Stichwörter: Beugungsgrenze · Fluoreszenzsonden · Imaging-Substanzen · Lokalisierungsmikroskopie · Optische Schalter

- [1] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153.
- [2] M. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 9433.
- [3] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacio, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642.
- [4] B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, *Science* **2008**, 319, 810.
- [5] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3801.
- [6] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, 3, 793.
- [7] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* **2007**, 317, 1749.
- [8] B. Bailey, D. L. Farkas, D. L. Taylor, F. Lanni, *Nature* **1993**, 366, 44.
- [9] S. W. Hell, E. H. K. Stelzer, *Opt. Commun.* **1992**, 93, 277.
- [10] M. G. Gustafsson, D. A. Agard, J. W. Sedat, *J. Microsc.* **1999**, 195, 10.
- [11] M. G. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 133081.
- [12] J. Enderlein, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 87, 095105.
- [13] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780.
- [14] V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, S. W. Hell, *Science* **2008**, 320, 246.
- [15] K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, S. W. Hell, *Nature* **2006**, 440, 935.
- [16] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4258.
- [17] A. Egner, C. Geisler, C. von Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A. C. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schönle, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2007**, 93, 3285.
- [18] C. Flors, J. Hotta, H. Uji-i, P. Dedeker, R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13970.

- [19] H. Bock, C. Geisler, C. A. Wurm, C. von Middendorff, S. Jakobs, A. Schönle, A. Egner, S. W. Hell, C. Eggeling, *Appl. Phys. B* **2007**, 88, 161.
 - [20] S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1347.
 - [21] R. E. Thompson, D. R. Karson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **2002**, 82, 2775.
 - [22] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. Selvin, *Science* **2003**, 300, 2061.
 - [23] K. A. Lidke, B. Rieger, T. M. Jovin, R. Heintzmann, *Opt. Express* **2005**, 13, 7052.
 - [24] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 18911.
 - [25] S. Ram, E. S. Ward, R. J. Ober, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 4457.
 - [26] M. Bates, T. R. Blosser, X. Zhuang, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 94, 108101.
 - [27] K. Weber, P. C. Rathke, M. Osborn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 1820.
 - [28] J. Vandekerckhove, K. Weber, *J. Mol. Biol.* **1978**, 126, 783.
 - [29] E. Chung, D. Kim, Y. Cui, Y.-H. Kim, P. T. C. So, *Biophys. J.* **2007**, 93, 1747.
 - [30] N. Johnsson, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 31.
-