

Superhochauflösende LokalisationsmikroskopieDeutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201606791
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201606791**Nanoskopische Bildgebung weicher Materie mittels fluoreszierender Diarylethen-Photoschalter**

Oleksii Nevskyi, Dmytro Sysoiev, Alex Oppermann, Thomas Huhn und Dominik Wöll*

Abstract: Die In-situ-Bildgebung weicher Materie ist grundlegend für ein tieferes Verständnis von Funktionalität auf nanoskopischer Ebene. Während superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopiemethoden mit ihren bis dahin unerreichten Möglichkeiten der Bildgebung die Lebenswissenschaften revolutionierten, wurde dieses Potenzial in den Materialwissenschaften bisher kaum ausgeschöpft. Dabei stellt die begrenzte Verfügbarkeit an geeigneten Farbstoffen zur Überwindung des Beugungslimits eines der wesentlichen Hindernisse für einen breiteren Einsatz superhochauflösender Mikroskopieverfahren dar. Hier berichten wir über einen neuartigen Diarylethen-basierten Photoschalter mit einer stark fluoreszierenden geschlossenen und einer nicht-fluoreszierenden offenen Form. Seine photophysikalischen Eigenschaften, sein Schaltverhalten und seine hohe Photostabilität machen den Farbstoff zum idealen Kandidaten für photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM). Anhand von aus amphiphilen Blockkopolymeren aufgebauten zylindrischen Mizellen belegen wir, wie damit apolare Strukturen mit einer Auflösung jenseits des Beugungslimits optischen Lichts abgebildet werden können.

Die Eigenschaften weicher Materie werden durch deren nanoskopische Struktur bestimmt.^[1] Folglich sind Methoden zur direkten Abbildung von Strukturen im Nanometerbereich für die fortwährende Entwicklung neuer Materialien mit speziellen und adaptiven Eigenschaften für komplexe Anwendungen von herausragender Bedeutung. Oberflächeneigenschaften wie Topologie und Weichheit können durch Rastersondenmikroskopie bestimmt werden,^[2,3] während moderne Elektronenmikroskopiemethoden wie z.B. Raster-elektronenmikroskopie (SEM)^[4,5] und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)^[6–8] bei hinreichend hohem Elektronendichthekontrast Strukturen sogar bis in den Subnanometerbereich auflösen können. Allerdings sind diese erfolgreichen Methoden oft technisch anspruchsvoll und relativ zeitaufwendig. Des Weiteren besitzen Proben weicher Materie oft nur geringen Elektronenkontrast, und die Möglichkeit einer nicht-invasiven, direkten In-situ-Beobachtung der Dynamik jenseits der Oberfläche wäre wünschenswert. In den

letzten Jahren revolutionierte die superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie die optische Bildgebung.^[9–14] Hierbei wird in Kombination mit moderner Optik das photophysikalische oder photochemische Schalten von Fluoreszenzfarbstoffen auf intelligente Art ausgenutzt. Bisher profitierten insbesondere die Lebenswissenschaften von den neuen Möglichkeiten, Strukturen klar jenseits des Beugungslimit optischen Lichts auflösen zu können. Für die Anwendung der superhochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie in den Materialwissenschaften gibt es nur wenige Beispiele,^[15–18] da Konzepte, die beispielweise einen Zusatz von (polaren) Schaltpuffern erfordern, hier meist fehlschlagen. Ein limitierender Faktor für den breiteren Einsatz superhochauflösender Bildgebung ist somit die Verfügbarkeit schaltbarer Farbstoffe mit geeigneten (photo-)physikalischen und (photo)-chemischen Eigenschaften. Hierzu zählen insbesondere eine hohe Photostabilität, anpassbare Schaltraten, möglichst geringe Beeinträchtigung des zu untersuchenden Systems sowie eine einfache Herstellung mit der Möglichkeit der vielfältigen Derivatisierung, um Strukturen und Kompartimente spezifisch zu markieren.^[19]

Diarylethene verkörpern eine leistungsfähige Klasse organischer Photoschalter für Anwendungen wie Datenspeicherung und chemische Sensorik.^[20–22] Trotz ihrer breiten Vielfalt weisen nur die wenigsten Derivate starke Fluoreszenz der geschlossenen Form im sichtbaren Bereich auf, was ihren direkten Einsatz für superhochauflösende Mikroskopie bisher signifikant behinderte. Erfolgreich wurden Strategien zur kovalenten Verknüpfung von Diarylethen-Photoschaltern mit geeigneten Fluorophoren und die Ausnutzung von Energie-^[23] bzw. Elektronentransferprozessen^[24] des daraus resultierenden multichromophoren Systems entwickelt. Diese erfordern allerdings aufwendige Synthesen und führen zu relativ großen Sonden. Die Markierung von Strukturen mit solch ausgedehnten Sonden kann die abzubildenden Strukturen signifikant verändern.^[23,25] Daher zielen wir auf eine geeignete Modifikation des Diarylethen-Photoschalters selbst ab, um zu den gewünschten Eigenschaften zu gelangen. Dabei inspirierten uns die Arbeiten von Uno et al.^[26] und Gillanders et al.,^[27] die berichten, dass photochrome Diarylethen-Derivate in der geschlossenen Form fluoreszieren, wenn sie Sulfongruppen enthalten.

Hier stellen wir einen neuartigen photochromen Diarylethen-Photoschalter mit hoher Photostabilität und starker Fluoreszenz in seiner geschlossenen Form für die superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie vor. Wir untersuchen seine photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften in Lösung und in Polymeren. Seine herausragende Eignung für photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM) an Strukturen weicher Materie demonstrieren wir

[*] O. Nevskyi, A. Oppermann, Prof. Dr. D. Wöll

Institut für Physikalische Chemie, RWTH Aachen University
Landoltweg 2, 52074 Aachen (Deutschland)
E-Mail: woell@pc.rwth-aachen.deDr. D. Sysoiev, Dr. T. Huhn
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78464 Konstanz (Deutschland)
 Hintergrundinformationen und Identifikationsnummern (ORCID)
 der Autoren sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201606791> zu finden.

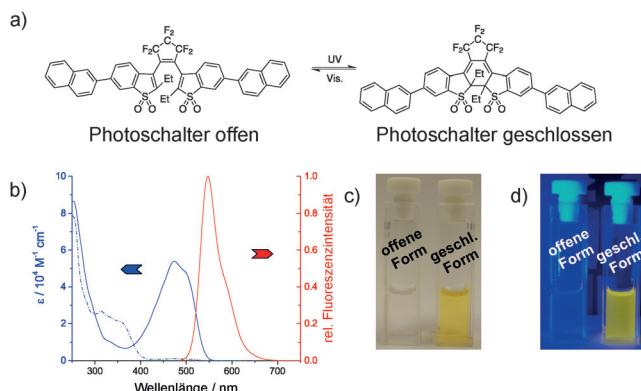


Abbildung 1. a) Chemische Struktur der offenen und geschlossenen Form des Photoschalters. b) Absorptionsspektren der offen (blaue gestrichelte Linie) und der geschlossenen Form (blaue durchgezogene Linie) sowie Fluoreszenzspektrum der geschlossenen Form (rot). c) Photos der offenen (links) und geschlossenen Form (rechts) des in 1,4-Dioxan gelösten Photoschalters. d) Photos der offenen (links) und geschlossenen Form (rechts) des in 1,4-Dioxan gelösten Photoschalters bei Belichtung mit 488 nm.

anhand der Bildgebung von selbstorganisierenden Blockkopolymeren. In dicht gepackter Umgebung kann das Schaltverhalten dazu benutzt werden, um freies Volumen auf molekularer Basis zu untersuchen.

Der Photoschalter (siehe Abbildung 1a) wurde über Suzuki-Miyaura-Kupplung mit dem 6,6'-Diiod-Derivat von 1,2-Bis(2-ethyl-1,1-dioxidobenzothiophen-3-yl)perfluorocyclopenten und Naphthalen-2-ylboronsäure entsprechend der in den Hintergrundinformationen beschriebenen Synthese hergestellt. Im Folgenden zeigen wir, dass der Photoschalter alle Anforderungen eines idealen Farbstoffs für superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie erfüllt:^[28,29] spektral getrennte An- und Aus-Zustände, hohe Absorptionskoeffizienten, hohe Fluoreszenzquantenausbeute der An-Zustände, hohe Photostabilität, niedrige Quantenausbeute für das Ausschalten und eine akzeptable Quantenausbeute für das Anschalten, mit der Möglichkeit, die Anschaltrate über die Intensität des Aktivierungslasers zu steuern. Wie weiter unten gezeigt, zeichnet sich das Naphthyl- gegenüber dem Phenyl-derivat^[26] insbesondere durch seine niedrigere Quantenausbeute des Ausschaltens für seine Anwendung in der superhochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie aus.

Die chemische Struktur unseres Diarylethen-Photoschalters und das Absorptionsspektrum der offenen und geschlossenen Form sind in Abbildung 1 dargestellt. Die offene Form absorbiert nicht im sichtbaren Bereich und erscheint daher farblos. Im Gegensatz dazu absorbiert die geschlossene Form bis zu einer Wellenlänge von 550 nm und besitzt ihr Maximum bei 475 nm. In apolaren Medien fluoresziert die geschlossene Form stark mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 0.65 (bestimmt in 1,4-Dioxan) in einem Wellenlängenbereich zwischen 500 und 650 nm (siehe Abbildung 1b). In polareren Lösungsmitteln fällt die Quantenausbeute signifikant ab, und die Fluoreszenz der geschlossenen Form verschiebt sich bathochrom (siehe Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Der Wellenlängenbereich lässt sich über geeignete Substitution einstellen.

Die offene und geschlossene Form können durch Belichtung mit geeigneter Wellenlänge ineinander umgewandelt werden (siehe Abbildung 2). UV-Bestrahlung führt hauptsächlich zur Bildung der geschlossenen Form, wohingegen mit Wellenlängen zwischen 400 und 550 nm wieder die offene Form entsteht. Nach hinreichend langer Belichtung stellt sich ein photostationäres Gleichgewicht ein, das von den Absorptionskoeffizienten beider Spezies bei der entsprechenden Wellenlänge und ihren Quantenausbeuten für das Öffnen bzw. Schließen abhängt. Für die superhochauflösende Lokalisierungsmikroskopie sollte ein Photoschalter tausende von Photonen aussenden, bevor er in seinen dunklen Zustand zurückkehrt, um eine hinreichend große Zahl an detektierten Photonen für eine gute Lokalisierungsgenauigkeit zu ermöglichen.^[30] Daher sollte die Quantenausbeute für das Ausschalten deutlich kleiner als 0.0001 sein. Andererseits ist ein effizientes Anschalten des Dunkelzustands vorteilhaft, da in diesem Fall nur eine geringe UV-Aktivierungsintensität benötigt wird. Wie unten gezeigt, erfüllt unser neuartiger Photoschalter beide dieser Anforderungen exzellent.

Die Quantenausbeute $\phi_{\text{on}} - c$ des Ringschlusses in 1,4-Dioxan beträgt 0.045 (zur Berechnung siehe die Hintergrundinformationen). Daher kann die fluoreszierende (geschlossene) Form des Photoschalters leicht durch niederinten-

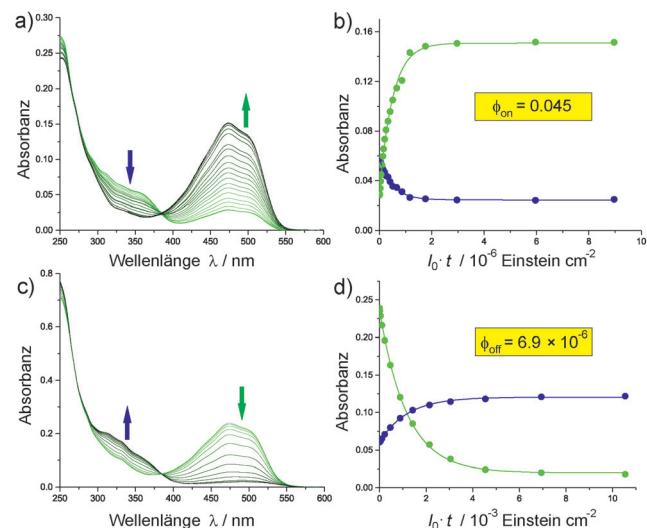


Abbildung 2. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsspektren (gemessen in einer 1-cm-Küvette) und der Kinetik des Photoschaltens in 1,4-Dioxan während des An- bzw. Ausschaltens: a) Anschalten der offenen zur geschlossenen Form unter UV-Belichtung (366 nm) bis zum Erreichen des photostationären Zustands (fast ausschließlich die geschlossene Form). b) Zeitlicher Verlauf der Absorbanz bei 475 nm (grüne Kreise) und bei 342 nm (blaue Kreise) bei Belichtung mit 366 nm. c) Ausschalten der geschlossenen zur offenen Form unter 488 nm-Belichtung bis zum Erreichen des photostationären Zustands (fast ausschließlich die offene Form). d) Zeitlicher Verlauf der Absorbanz bei 475 nm (grüne Kreise) und bei 342 nm (blaue Kreise) bei Belichtung mit 488 nm. Die Datenpunkte in (b) und (d) wurden mit einer monoexponentiellen Kinetik angepasst, worüber auch die angegebene Quantenausbeute des Schaltens berechnet wurde. Auf der Abszisse ist die Lichtdosis in Einstein (d. h. mol Photonen) pro cm^2 , angegeben. Die Berechnung der Quantenausbeuten ϕ_{on} und ϕ_{off} ist in den Hintergrundinformationen beschrieben.

tensive UV-Belichtung erzeugt werden. Entsprechend konnte die Quantenausbeute $\phi_{c \rightarrow o}$ von 6.9×10^{-6} für die Ringöffnung mittels einer High Power 488 nm LED bestimmt werden. Die äußerst niedrige Quantenausbeute für das Ausschalten ist von entscheidendem Vorteil für PALM, da hierdurch hinreichend viele Photonen für eine hochgenaue Bestimmung der Position einzelner Photoschalter emittiert werden können, bevor diese wieder dunkel schalten. Ähnliche Quantenausbeuten wurden auch auf Einzelmolekülniveau für in dünne Polymerfilme eingebettete Photoschalter erhalten (siehe unten). Über diese Messungen konnten wir außerdem belegen, dass das Verschwinden von Molekülen hauptsächlich durch Schalten und nicht durch irreversibles Photobleichen verursacht wurde, denn in den meisten Fällen ließ sich die Fluoreszenz der Moleküle mit UV-Licht reaktivieren. Im Falle des Photoschalters in PS konnten im Schnitt 1.96×10^3 Photonen pro Schaltzyklus detektiert werden (siehe Hintergrundinformationen). Damit kann laut Mortensen et al.^[30] eine Lokalisierungsgenauigkeit von 20 nm abgeschätzt werden. Weitere Details zur Bestimmung der Photokinetik sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.

Die Schaltkinetik des Photoschalters hängt von seiner Umgebung ab. Diese Abhängigkeit ist in dicht gepackten Medien mit relativ hoher Viskosität besonders ausgeprägt. Daher ist in solchen Umgebungen die Wahl geeigneter Bedingungen wie die zeitliche Abfolge und die Intensität der Belichtung wichtig für die Aufnahme guter superhochauflöster Bilder. Diese Abhängigkeit kann dazu genutzt werden, um neben der Struktur auch Informationen über die Umgebung zu erhalten. Wir untersuchten das Schaltverhalten der in drehschleuderbeschichtete Polymerfilme eingebetteten Photoschalter. Als Polymere verwendeten wir Poly(ethylacrylat) (PEA), Poly(n-butylmethacrylat) (PBMA), Polystyrol (PS) und Poly(methylmethacrylat) (PMMA). In Abbildung 3 ist solch ein typisches Schaltverhalten in einem PBMA-Film

gezeigt (das Schaltverhalten in anderen Polymeren ist in den Hintergrundinformationen beschrieben). Wir zählten die Anzahl an fluoreszierenden Molekülen innerhalb einer $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ Fläche eines Weitfeldmikroskopiebildes während 488 nm-Laseranregung (ca. 0.20 kW cm^{-2}) und schalteten dabei alle 5 s Moleküle mit einem 380 nm-Laser an (Belichtungsdauer 1 s, Intensität ca. 0.62 kW cm^{-2}). Das Schaltverhalten kann über die Auswertung der zeitlichen Entwicklung der Anzahl an angeschalteten Molekülen innerhalb eines Schaltzyklus ermittelt werden (siehe Abbildung 3). Die Anzahl an fluoreszierenden Molekülen nahm mit einer Kinetik erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstante von 1.02 s^{-1} ab, was einer Quantenausbeute $\phi_{c \rightarrow o}$ für das Ausschalten von 2.7×10^{-5} entspricht (für die anderen Polymere siehe Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Wir fanden, dass die Ausschaltrate von der Glasübergangstemperatur (T_g) des einbettenden Polymers abhängt und für Polymer mit niedrigem T_g größer ist. Die Quantenausbeute variiert von 5.3×10^{-6} in PS bis 2.7×10^{-5} in PEA. Zusätzlich zur unterschiedlichen Kinetik konnte ein signifikanter Anteil an Molekülen in Polymeren mit hohem T_g nicht ausgeschalten werden (siehe Hintergrundinformationen). Dies deutet auf eine heterogene Verteilung von freiem Volumen hin, wie es bereits über Messungen der Einzelmolekülrotation,^[31] und, für Polymere mit unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen, mittels photoinduziertem Elektronentransfer auf Einzelmolekülebene beobachtet wurde.^[32,33]

Neben der Kinetik des Photoschaltens bestimmt die Photostabilität der Sonden ihre Eignung für superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie. Wie in Abbildung 3 dargestellt, kann unser Photoschalter viele An-Aus-Zyklen durchlaufen bevor er durch Photobleichen zerstört wird. Für die Aufnahme unbeweglicher Strukturen ist dies von untergeordneter Bedeutung, da hier pro Fluorophor eine Lokalisierung vor dem Photobleichen ausreicht. Zur Bestimmung von Dynamik ist eine schnell abnehmende Zahl an aktivierbaren Schaltern jedoch nicht wünschenswert. Vielmehr sind Photoschalter mit vielen Zyklen hier von enormem Vorteil. Wir konnten die meisten unserer Photoschalter-Moleküle über 100-mal schalten bevor sie irreversibel bleichten.

Im Folgenden demonstrieren wir die Einsatzfähigkeit unseres Photoschalters für die Visualisierung apolarer Strukturen mit einer Auflösung weit unterhalb des Beugungslimits optischen Lichts. Selbstassemblierende Strukturen wurden mit amphiphilen Polystyrol-Polyethenoxid-Blockkopolymeren (PS-*b*-PEO, $M_{n,PS} = 38 \text{ kg mol}^{-1}$, $M_{n,PEO} = 11 \text{ kg mol}^{-1}$) hergestellt, wobei eine kleine Menge unseres Photoschalters zugegeben worden war. Unter geeigneten Bedingungen kann die Morphologie der hergestellten Nanostrukturen gut kontrolliert werden.^[34,35] Wie in den Hintergrundinformationen beschrieben, wählten wir die Bedingungen so, dass sich zylindrische Mizellen mit einem hydrophoben, mit unserem Diarylethen-Photoschalter markierten PS-Kern und einer hydrophilen, aus dem PEO-Block bestehenden Hülle bildeten. Nach dem Trocknen der so entstandenen Zylinderstrukturen wurden mit geeigneten Laserintensitäten, die für eine passende Kinetik des Blinkens einzelner Photoschalter sorgten, Fluoreszenzmikroskopie-Filme aufgenommen (Details sind in den Hintergrundinformationen ge-

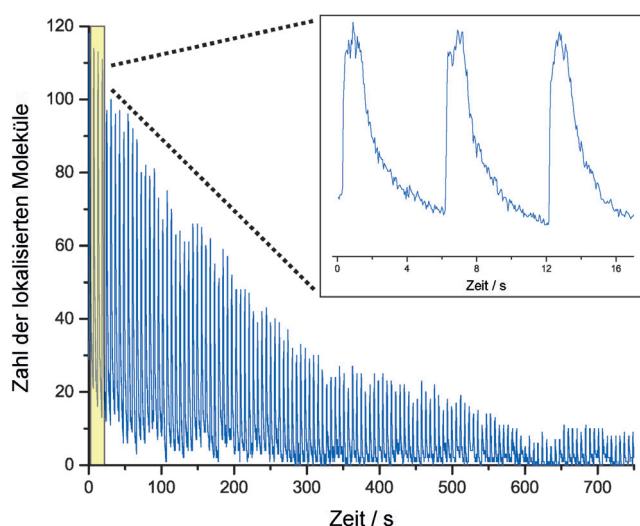


Abbildung 3. Schaltzyklen des in einem dünnen PBMA-Film eingebetteten Photoschalters bei Belichtung mit 488 nm (0.20 kW cm^{-2}) und UV-Aktivierung alle 5 s. Die Vergrößerung zeigt die ersten 17 s, in dieser Phase tritt das exponentielle Ausschalten charakteristisch zu Tage.

nannt). Wie bereits oben erwähnt, schalteten einige Farbstoffmoleküle in PS nicht. Diese wurden vor den Messungen mit dem 488 nm-Laser durch Photobleichen zerstört. Eine Analyse mit ThunderSTORM^[36] führte zu superhochauflösten PALM-Bildern, wie in Abbildung 4a gezeigt. Im rechts dargestellten superhochauflösten Bereich des Bildes sind strukturelle Details erkennbar, die im linken beugungslimitierten Bereich nicht aufgelöst werden können. In Abbildung 4b zeigen wir als Beispiel eine superhochauflöste Y-förmige Struktur, anhand derer wir veranschaulichen, inwiefern Strukturen jenseits des Beugungslimits aufgelöst werden können. Intensitätsprofile entlang verschiedener vertikaler Schnitte belegen, dass wir Zylinder mit einem Abstand von 84 nm leicht auflösen können. Dabei soll betont werden, dass die Auflösung hier jedoch nicht durch die Eigenschaften des Farbstoffs, sondern durch die Breite des markierten Zylinders beschränkt ist.

Dieser besitzt einen Kerndurchmesser von ca. 50 nm, der aus der über AFM bestimmten Breite der Zylinder von 62 nm abgeschätzt wurde (siehe Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Zylinder mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von ca. 70 nm abgebildet wurden, und dass diese Breite aus einer Faltung der wahren Größe des markierten Kerns mit der Lokalisierungsgenauigkeit einzelner Moleküle hervorgeht, schätzen wir die Auflösung auf ca. 50 nm bezogen auf die Halbwertsbreite oder 21 nm bezüglich der Standardabweichung. Damit ermöglicht unser Photoschalter PALM-Messungen mit einer 10-fach höheren Auflösung als das Beugungslimit.

Zusammenfassend benutzten wir erstmalig ein fluoreszierendes photochromes Diarylethen-Derivat für superhochauflösende photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie. Die Eignung für superhochauflösende Bildgebung kann auf seine Photoschaltkinetik zurückgeführt werden. Diese wiederum hängt von der Umgebung ab, was zusätzlich zur Bestimmung der lokalen Polymerdichte benutzt werden kann. Wir bildeten den apolaren Kern der Selbstanordnung von aus amphiphilen Blockkopolymeren aufgebauten Nanostrukturen mit einer Auflösung weit jenseits des Beugungslimits von Licht mittels PALM ab. Die Anwendbarkeit des Photoschalters ist jedoch nicht auf PALM-Messungen beschränkt, sondern kann auch für RESOLFT(reversible saturable optical fluorescence transitions)-Mikroskopie^[37] bzw. SOFI (super-resolution optical fluctuation imaging)^[38] benutzt werden. Die Synthese unseres leistungsfähigen Photoschalters ist unkompliziert, und eine Reihe von Substitutionen zum gezielten Einstellen der Eigenschaften für die Visualisierung verschiedener Systeme über C-C-Kupplungsstrategien wird im Moment von uns verfolgt. Über geeignete Substitutionen oder Einbettung des Chromophors in entsprechende Nanopartikel haben wir auch eine Erweiterung der Einsetzbarkeit der Sonden für die Bildgebung in polaren Medien im Blick. Zusammenfassend bilden unsere Ergebnisse die Grundlage für den Einsatz von Diarylethen-Derivaten für superhochauflösende Fluoreszenzmikroskopie an Systemen, die aufgrund fehlender Farbstoffe mit geeigneten Eigenschaften bisher nicht zugänglich waren.

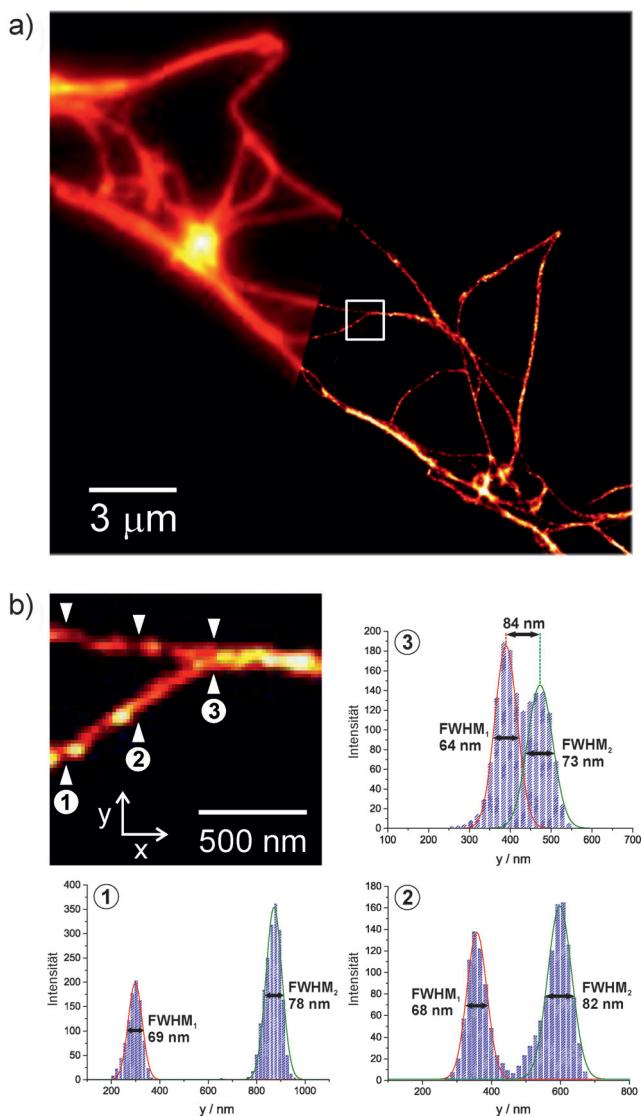


Abbildung 4. a) Konventionelle (linker Teil) und superhochauflöste (rechter Teil) Abbildung von Fadenstrukturen bildenden zylindrischen Blockkopolymer-Mizellen mittels PALM. b) Auflösung der Y-förmigen Strukturen in den PALM-Bildern: Intensitätsprofile entlang der vertikalen y-Achse sind an drei verschiedenen x-Positionen dargestellt.

Danksagung

Wir danken Patrick Wünnemann für die ergiebigen Diskussionen in Bezug auf die Kraftfeldmikroskopie-Messungen, Stefan Walta für seine Hilfe bei Fluoreszenzlebensdauer-messungen und Prof. Dr. Ulrich E. Steiner für das Korrekturlesen des Manuskripts. Des Weiteren danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für ihre Unterstützung im Rahmen des SFB 985 „Functional Microgels and Microgel Systems“ und dem Projekt Hu 1682/3-1. Unser Dank für finanzielle Unterstützung geht außerdem an das RWTH-Kompetenzzentrum FLAMENCO im Rahmen des Profilbereichs MSE. A.O. dankt dem Fonds der chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.

Stichwörter: Blockkopolymere · Fluoreszenzmikroskopie · Photochemie · Photoschalter · Superhochauflösung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12698–12702
Angew. Chem. **2016**, *128*, 12890–12894

- [1] K. Matyjaszewski, *Science* **2011**, *333*, 1104–1105.
- [2] P. J. M. Stals, Y. Li, J. Burdyńska, R. Nicolaï, A. Nese, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11421–11424.
- [3] E. T. Herruzo, A. P. Perrino, R. Garcia, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3126.
- [4] K. Geisel, L. Isa, W. Richtering, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4905–4909; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5005–5009.
- [5] C. Stoffelen, J. Voskuhl, P. Jonkheijm, J. Huskens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3400–3404; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3468–3472.
- [6] H. Cui, Z. Chen, S. Zhong, K. L. Wooley, D. J. Pochan, *Science* **2007**, *317*, 647–650.
- [7] R. Fenyves, M. Schmutz, I. J. Horner, F. V. Bright, J. Rzayev, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7762–7770.
- [8] C. V. Synatschke, T. Nomoto, H. Cabral, M. Förtsch, K. Toh, Y. Matsumoto, K. Miyazaki, A. Hanisch, F. H. Schacher, A. Kis-himura, N. Nishiyama, A. H. E. Müller, K. Kataoka, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1161–1172.
- [9] 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.
- [10] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttelpehl, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266–6271.
- [11] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
- [12] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [13] J. B. Grimm, T. Klein, B. G. Kopek, G. Shtengel, H. F. Hess, M. Sauer, L. D. Lavis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1723–1727; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 1755–1759.
- [14] W. R. Legant, L. Shao, J. B. Grimm, T. A. Brown, D. E. Milkie, B. B. Avants, L. D. Lavis, E. Betzig, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 359–365.
- [15] M. W. Gramlich, J. Bae, R. C. Hayward, J. L. Ross, *Opt. Express* **2014**, *22*, 8438–8450.
- [16] Z. Tian, A. D. Q. Li, D. Hu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1258–1260.
- [17] C. K. Ullal, S. Primpke, R. Schmidt, U. Böhm, A. Egner, P. Vana, S. W. Hell, *Macromolecules* **2011**, *44*, 7508–7510.
- [18] A. Alois, A. Vargas Jentzsch, N. Vilanova, L. Albertazzi, E. W. Meijer, I. K. Voets, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2953–2956.
- [19] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027–1036.
- [20] M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 12174–12277.
- [21] S. Fredrich, R. Göstl, M. Herder, L. Grubert, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1208–1212; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 1226–1230.
- [22] D. Kim, J. E. Kwon, S. Y. Park, *Adv. Opt. Mater.* **2016**, *4*, 790–797.
- [23] C. Li, H. Yan, L.-X. Zhao, G.-F. Zhang, Z. Hu, Z.-L. Huang, M.-Q. Zhu, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5709.
- [24] T. Fukaminato, T. Doi, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4984–4990.
- [25] C. Li, Z. Hu, M. P. Aldred, L. X. Zhao, H. Yan, G. F. Zhang, Z. L. Huang, A. D. Q. Li, M. Q. Zhu, *Macromolecules* **2014**, *47*, 8594–8601.
- [26] K. Uno, H. Niikura, M. Morimoto, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13558–13564.
- [27] F. Gillanders, L. Giordano, S. A. Diaz, T. M. Jovin, E. A. Jares-Erijman, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 603–612.
- [28] A. Fürstenberg, M. Heilemann, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14919–14930.
- [29] M. Heilemann, P. Dedecker, J. Hofkens, M. Sauer, *Laser Photonics Rev.* **2009**, *3*, 180–202.
- [30] K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, H. Flyvbjerg, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 377–381.
- [31] A. Deres, G. A. Floudas, K. Müllen, M. Van der Auweraer, F. De Schryver, J. Enderlein, H. Uji-i, J. Hofkens, *Macromolecules* **2011**, *44*, 9703–9709.
- [32] J. R. Siekierzycka, C. Hippius, F. Würthner, R. M. Williams, A. M. Brouwer, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1240–1242.
- [33] J. R. Siekierzycka, C. Hippius, F. Würthner, R. M. Williams, A. M. Brouwer, *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, *12*, 937–952.
- [34] Y. Mai, A. Eisenberg, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5969–5985.
- [35] J. Zhu, R. C. Hayward, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7496–7502.
- [36] M. Ovesný, P. Krížek, J. Borkovec, Z. Švindrych, G. M. Hagen, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2389–2390.
- [37] M. L. Bossi, J. Fölling, M. Dyba, V. Westphal, S. W. Hell, *New J. Phys.* **2006**, *8*, 275.
- [38] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, J. Enderlein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 22287–22292.

Eingegangen am 13. Juli 2016

Online veröffentlicht am 13. September 2016