

# Verbesserte hochauflösende Mikroskopie mit Oxazinfarbstoffen in schwerem Wasser\*\*

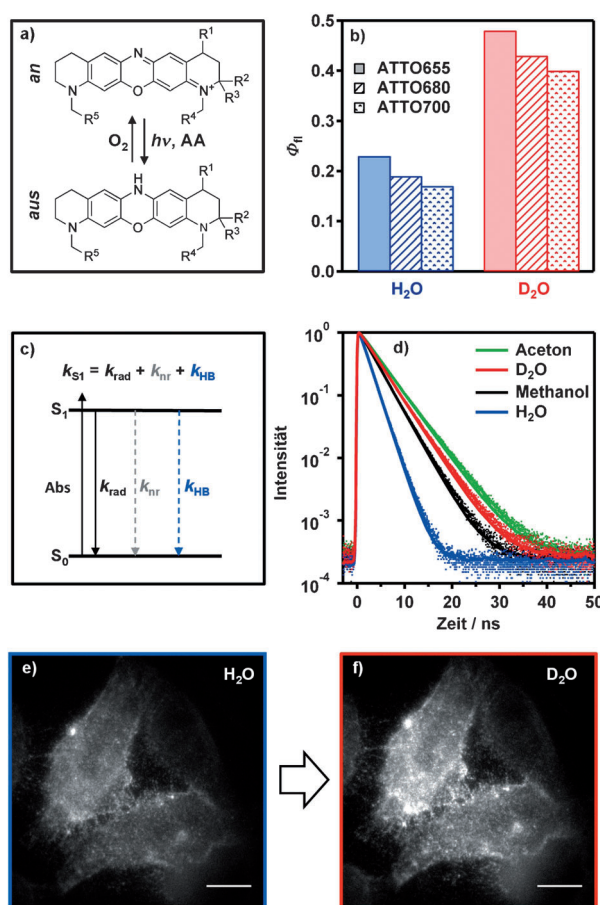
Steven F. Lee,\* Quentin Vérolet und Alexandre Fürstenberg\*

Fortgeschrittene Fluoreszenzmikroskopietechniken wie auch Einzelmolekül- und hochauflösende Mikroskopie benötigen helle und photostabile Farbstoffe, die gezielt an Biomoleküle gekuppelt werden können. Deshalb ist das Interesse an der Entwicklung von Farbstoffen mit verbesserten Eigenschaften für die Biologie groß, vor allem von solchen, die im nah-infraroten Wellenlängenbereich absorbieren und emittieren, in dem die zelluläre Autofluoreszenz und Phototoxizität geringer ist.<sup>[1]</sup> Außer der Photostabilität ist die Helligkeit einzelner Farbstoffe ein Schlüsselparame- ter in hochauflösenden Methoden wie (F)PALM, STORM, dSTORM, oder GSDIM,<sup>[2]</sup> die auf der Lokalisierung einzelner fluoreszieren- der Moleküle basieren, um Bilder zu rekonstruieren, in denen die Genauigkeit der Lokalisierung  $\sigma$  von der Zahl  $N$  der von jedem Farbstoffmolekül detektierten Photonen abhängt,<sup>[3]</sup> mit  $\sigma \propto N^{1/2}$ ; je heller der Farbstoff, desto genauer kann er lokalisiert werden und desto höher ist die Auflösung im Schlussbild. Trotzdem ist die Helligkeit der meisten kommerziellen Fluorophore, die bei 630 nm und höher angeregt werden können, mit wenigen Ausnahmen durch Fluoreszenzquantenausbeuten um 0.3 oder tiefer begrenzt (Tabelle S1 der Hintergrundinformationen (SI)).

Hier stellen wir einen einfachen, kostengünstigen, und biokompatiblen Ansatz vor, durch den die Quantenausbeute einer ganzen kommerziellen Familie von geläufigen Farbstoffen (Oxazinen) wie ATTO655, ATTO680 oder ATTO700, die im roten Bereich fluoreszieren, gesteigert wird. Wir zeigen, dass sich ihre Quantenausbeute in schwerem Wasser ( $D_2O$ , Deuteriumoxid) gegenüber der in Wasser ( $H_2O$ ) verdoppelt. Auch wenn erhöhte Quantenausbeuten in schwerem Wasser schon vor langer Zeit beschrieben wurden,<sup>[4]</sup> nutzen wir nun diesen Effekt in Einzelmolekülmikroskopie und weisen nach, dass dadurch doppelt so viele Photonen von

jedem Oxazinmolekül detektiert werden und dementsprechend die Genauigkeit der Lokalisierungen verbessert wird, was eine höhere Auflösung ermöglicht.

Oxazine wie Cresyl Violet oder Nile Blue sind wohlbe- kannte Laserfarbstoffe und histologische Marker, die für ihre gute Photostabilität und hohe Quantenausbeute in organi-



**Abbildung 1.** a) Photoschalten von ATTO655 (AA: Ascorbinsäure).<sup>[6b]</sup> b) Quantenausbeute von ATTO655, ATTO680 und ATTO700 in  $H_2O$  (blau) und in  $D_2O$  (rot). c) Jablonski-Diagramm von Oxazinen. In  $H_2O$  führen Wasserstoffbrücken ( $k_{HB}$ ) zur effizienten strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands, zusätzlich zu den anderen strahlungslosen ( $k_{nr}$ ) und strahlenden ( $k_{rad}$ ) Prozessen. In  $D_2O$  und anderen Lösungsmitteln mit schwächerer Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, verringert sich die Effizienz dieses strahlungslosen Prozesses stark. d) Fluoreszenzlebenszeit von ATTO655 in verschiedenen Lösungsmitteln. e, f) Fixierte CCR5 exprimierende CHO-Zellen, die mit ATTO655 durch einen Antikörper markiert wurden und unter identischen Bedingungen erst in  $H_2O$  (e) und dann in  $D_2O$  aufgenommen wurden (f). Beide Bilder werden bei gleichen Kontrasteinstellungen gezeigt. Maßstabsbalken: 5  $\mu m$ .

[\*] Dr. S. F. Lee  
Department of Chemistry, University of Cambridge  
Lensfield Road, Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)  
E-Mail: sl591@cam.ac.uk

Q. Vérolet, Dr. A. Fürstenberg  
Department of Human Protein Sciences, University of Geneva  
CMU, Rue Michel-Servet 1, 1211 Genève 4 (Schweiz)  
E-Mail: alexandre.fuerstenberg@unige.ch

[\*\*] Dieses Projekt wurde von dem Schweizerischen Nationalfonds durch das Ambizione Stipendium PZ00P3\_131935 und von Dornier Investment Service Ltd. finanziell unterstützt. Wir danken Oliver Hartley für Räumlichkeiten, Unterstützung und Zelllinien, Thomas Huber für hilfreiche Kommentare und Eric Vauthey für nützliche Diskussionen und für das Ausleihen von Apparaturen, inklusive des TCSPC-Detektionssystems.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302341> zu finden.

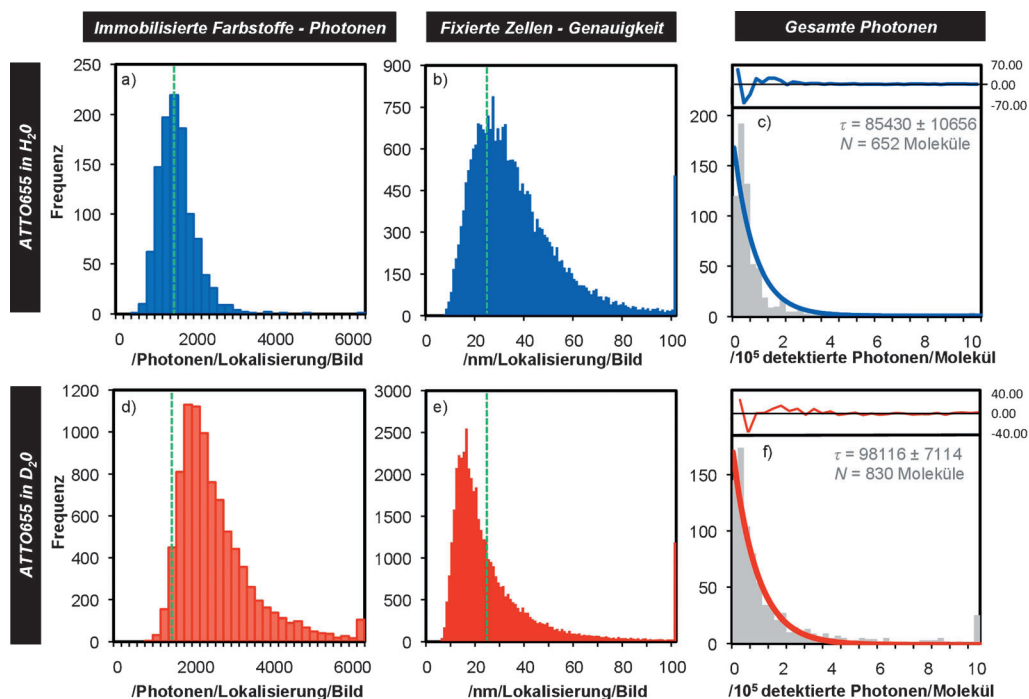
schen Lösungsmitteln eingesetzt werden.<sup>[4b]</sup> ATTO655, ATTO680 und ATTO700 gehören zu einer neuen Generation von Oxazinen, die dank ihrer erhöhten Wasserlöslichkeit und ihrer reaktiven chemischen Gruppen, die eine gezielte kovalente Kupplung ermöglichen, mit biologischer Bildgebung kompatibel sind. Das Absorptionsmaximum dieser Farbstoffe liegt bei 650–700 nm, ihre Quantenausbeute zwischen 0.17 und 0.23, und sie zeigen wenig Solvatochromie (Abbildungen S1–S3 (SI)). Sie werden oft für Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, insbesondere für dSTORM,<sup>[5]</sup> da sie in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Cysteamin oder Ascorbinsäure als effiziente Photoschalter fungieren können; das Reduktionsmittel setzt sie in einen reduzierten, nichtfluoreszierenden Zustand, und der im Lösungsmittel vorhandene Sauerstoff bringt sie in einen fluoreszierenden Zustand zurück (Abbildung 1a).<sup>[6]</sup>

Um besser zu begreifen, warum die Quantenausbeute dieser Farbstoffe weit unter 1.0 liegt, untersuchten wir ihre Photophysik in verschiedenen Lösungsmitteln. Wir fanden, dass die Quantenausbeute (Abbildung 1b) und die Fluoreszenzlebenszeit (Abbildung 1d, Abbildungen S4–S6 (SI)) von Oxazinen mit abnehmender Fähigkeit des Lösungsmittels, als Wasserstoffbrückendonator zu fungieren, anstiegen: Mit ATTO655 wechselte die Quantenausbeute von 0.23 in Wasser zu 0.39 in Methanol, 0.46 in Ethanol und erreichte sogar den Wert von 0.57 in Lösungsmitteln, die keine Wasserstoffbrückendonoren sind (Tabelle 1). Besonders zu bemerken ist der Wert der Quantenausbeute in D<sub>2</sub>O, 0.48 (Abbildung 1b), der 2.1-mal so hoch liegt wie in H<sub>2</sub>O und nahezu die maximal gemessenen Werte erreicht. Qualitativ ähnliche Tendenzen wurden mit ATTO680 und ATTO700 gemessen (Tabellen S2–S3, Abbildungen S5–S6 (SI)). Insgesamt zeigen unsere Daten, dass die Strahlungsrate dieser Farbstoffe in allen Lösungsmitteln unverändert bleibt, und dass ein zusätzlicher strahlungsloser Prozess ausschließlich zur Beeinträchtigung der Quantenausbeute in jenen Lösungsmitteln führt, die Wasserstoffbrücken bilden können (Abbildung 1c). Die Wasserstoffbrücken-vermittelte strahlungslose Desaktivierung von angeregten Zuständen wurde bereits als Fluoreszenzlöschungsmechanismus vieler Farbstoffe inklusive Oxazinen be-

**Tabelle 1:** Photophysikalische Eigenschaften von ATTO655 in verschiedenen Lösungsmitteln: Quantenausbeute ( $\Phi_f$ ), Fluoreszenzlebenszeit ( $\tau_{s1}$ ), Strahlungsrate ( $k_{rad}$ ) und Summe der strahlungslosen ( $k_{nr}$ ) und Wasserstoffbrücken-vermittelten strahlungslosen ( $k_{HB}$ ) Desaktivierungs-raten.

Solvens	$\Phi_f$	$\tau_{s1}$ [ns]	$k_{rad}$ [ $\times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{nr} + k_{HB}$ [ $\times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ]
H <sub>2</sub> O	0.23	1.9	1.2	4.1
PBS in H <sub>2</sub> O	0.23	1.9	1.2	4.1
D <sub>2</sub> O	0.48	3.9	1.2	1.4
PBS in D <sub>2</sub> O	0.48	3.9	1.2	1.4
Methanol	0.39	3.3	1.2	1.8
Ethanol	0.46	3.6	1.3	1.5
2-Propanol	0.49	3.8	1.3	1.3
Aceton	0.55	4.5	1.2	1.0
Acetonitril	0.57	4.4	1.3	1.0
DMF	0.56	4.1	1.4	1.1
DMSO	0.56	3.9	1.4	1.1

schrieben, und sie verliert in deuterierten Lösungsmitteln wegen eines kinetischen Isotopeneffekts stark an Effizienz.<sup>[4,7]</sup> Andere Fluorophore wie ATTO520, ATTO647N, Alexa Fluor 647 und Rhodaminderivate, die alle oft in der Einzelmolekülspektroskopie verwendet werden, jedoch zu anderen Farbstoffklassen gehören, wurden auch in D<sub>2</sub>O heller; allerdings stieg die Quantenausbeute nur um 5–30 % an (Tabelle S4 (SI)), im Unterschied zu den mit ATTO655 gemessenen 110 %. Dieser Prozess kann bei Oxazinen durch



**Abbildung 2.** Einzelmolekülcharakterisierung von ATTO655 in H<sub>2</sub>O (obere Reihe) und D<sub>2</sub>O (untere Reihe). a, d) Zahl der detektierten Photonen von auf Glas immobilisierten einzelnen ATTO655-Molekülen in H<sub>2</sub>O (blau) und in D<sub>2</sub>O (rot). b, e) Verteilung der Genauigkeit der Lokalisierungen in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O in dSTORM Experimenten mit fixierten Zellen, die mit ATTO655 durch einen Antikörper markiert wurden. c, f) Gesamtzahl der detektierten Photonen vor Photobleichen einzelner immobilisierter ATTO655-Moleküle in H<sub>2</sub>O oder in D<sub>2</sub>O, mit einer Exponentialfunktion angeglichen (Residuum in den Einschüben). Wenn angebracht, zeigt eine grüne, gestrichelte Linie den Höchstpunkt der Verteilung in H<sub>2</sub>O an, um dem Auge zu helfen.

eine Neuverteilung der Ladungen nach Anregung erklärt werden. Rechnungen deuten an, dass die Elektronendichte im angeregten Zustand besonders am zentralen Stickstoffatom und auch etwas am zentralen Sauerstoffatom der Oxazineinheit zunimmt,<sup>[8]</sup> was zu einer Verstärkung der Wasserstoffbrücken führt. Die chemische Struktur dieser drei ATTO-Derivate hat eine gemeinsame zentrale Einheit, und eine zunehmende Zahl an konjugierten Doppelbindungen in den äußeren Ringen führt zur Verschiebung der Absorptions- und Emissionswellenlängen.<sup>[9]</sup> Eine Wasserstoffbrücken-vermittelte strahlungslose Desaktivierung scheint also generell bei Oxazinen und auch anderen Farbstoffklassen in wässrigen Lösungen stattzufinden, doch bei Oxazinen kann die Löschung der Fluoreszenz durch das Ersetzen von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O stark verhindert werden.

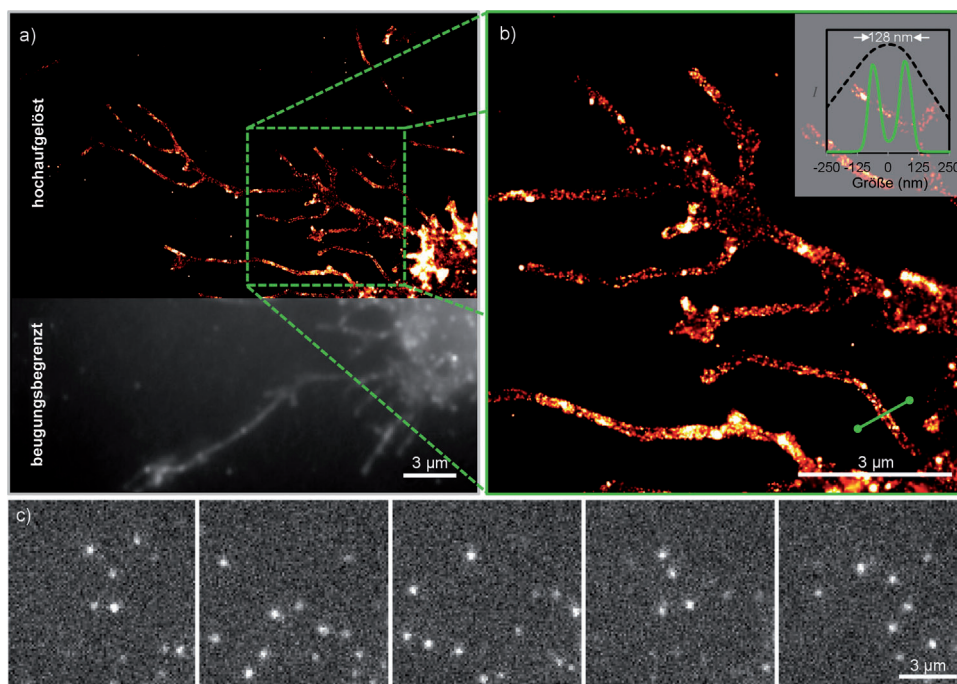
Die Nützlichkeit dieses Phänomens wurde an Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) demonstriert, die den C-C-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) stabil exprimieren,<sup>[10]</sup> ein zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörendes Membranprotein. CCR5 wurde mit einem an ATTO655 gekuppelten primären Antikörper markiert, und Fluoreszenzbilder wurden mithilfe von Weitfeldmikroskopie unter gleichen Bedingungen in H<sub>2</sub>O (Abbildung 1 e) und D<sub>2</sub>O (Abbildung 1 f) aufgenommen. Die Probe war bedeutend heller in D<sub>2</sub>O. Kleine Wassermengen hatten keine negative Auswirkung auf die Helligkeit (Abbildung S7 (SI)), denn diese nahm stark zu, indem das Lösungsmittel einfach entfernt und ersetzt wurde. Ebenso hatten Salze, wie jene die, in biologischen Puffern geläufig sind und <sup>1</sup>H-Atome enthalten, keinen Effekt auf die Quantenausbeute wegen des relativ kleinen Verhältnisses an <sup>1</sup>H-Atomen zu D im Lösungsmittel (Abbildung S8 (SI)).

Um zu bestimmen, ob durch die höhere Quantenausbeute einzelne ATTO655-Moleküle auch mehr Photonen emittieren, knüpften wir den Farbstoff kovalent an eine Glasoberfläche und bildeten einzelne Fluorophore unter dSTORM-Bedingungen ab (Abbildung S9 (SI)). Wie erwartet war die Zahl der detektierten Photonen (Abbildung 2 a,d) in D<sub>2</sub>O etwa zweimal höher als in H<sub>2</sub>O (wo die Zahl Literaturwerten entspricht<sup>[11]</sup>), und die Genauigkeit der Lokalisierungen verbesserte sich dementsprechend (Abbildung S10 (SI)). In fixierten Zellen erhielten wir ähnliche Ergebnisse (Abbildung 2 b,e), doch das komplexe zelluläre Umfeld führte zu einer breiteren Verteilung

der gemessenen Intensitäten. Trotzdem waren die Zahl der detektierten Photonen (Abbildung S11 (SI)) und die experimentell bestimmte Genauigkeit der Lokalisierungen in D<sub>2</sub>O höher (Abbildung 2 e). Eine Analyse der Fluoreszenzzyklen in beiden Lösungsmitteln zeigte keinen wesentlichen Unterschied bei für dSTORM typischen Kamerabelichtungszeiten (Abbildung S12 (SI)). Die Gesamtzahl der detektierten Photonen vor Photobleichen der Farbstoffmoleküle (ca. 10<sup>5</sup>) blieb in beiden Lösungsmitteln unverändert (Abbildung 2 c,f) und erreichte ähnliche Werte wie andere helle Fluorophore.<sup>[1a]</sup>

Zusammen mit den Quantenausbeute- und Fluoreszenzlebenszeitmessungen deutet die Tatsache, dass D<sub>2</sub>O keinen photoschützenden Effekt auf die Farbstoffe hat, darauf hin, dass die Geschwindigkeit (und nicht die Rate, siehe  $k_{\text{rad}}$  in Tabelle 1), mit der die Photonen emittiert werden, sich in D<sub>2</sub>O gegenüber der in H<sub>2</sub>O unter konstanten Abbildungsbedingungen verdoppelt.<sup>[12]</sup> In einfachen Worten bedeutet es, dass das Photonenbudget konstant bleibt und dass es doppelt so schnell in D<sub>2</sub>O ausgegeben wird.

Schlussendlich zeigen wir, dass hochauflösende Mikroskopie in D<sub>2</sub>O genutzt werden kann, um unter der Beugungsgrenze liegende subzelluläre Strukturen aufzulösen. Wir nutzten primäre Antikörper, an die ATTO655 gekuppelt wurde, um CCR5 in der Membran von stabil transfizierten CHO-Zellen zu markieren, in denen die hohe Dichte des Rezeptors in den Filopodien sich bestens für strukturelle hochauflösende Mikroskopie eignete (Abbildung 3). Unter



**Abbildung 3.** Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie in D<sub>2</sub>O. a) dSTORM-Bild des Membranproteins CCR5 (oben) und konventionelle, beugungsbegrenzte Mikroskopie (unten). b) Vergrößerter Bereich mit Filopodien, in dem gut definierte Strukturen zu erkennen sind. Einschub: Das Filopodium hat eine an den Intensitätshöchstpunkten gemessene Breite von 128 nm, mit einer Lokalisierungs-genauigkeit von ca. 20 nm (grüne Linie). Diese kann nicht im beugungsbegrenzten Bild aufgelöst werden (schwarze gestrichelte Linie). c) Einzelne Bilder, die isolierte fluoreszierende Moleküle im gleichen Sichtfeld wie in (b) zeigen. Abgesehen von der höheren Quantenausbeute wurde die dSTORM-Bildgebung nicht durch D<sub>2</sub>O beeinflusst.



normalen dSTORM-Bedingungen<sup>[5a]</sup> wurden einzelne Fluorophore lokalisiert (Abbildung 3c), was die Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bildes ermöglichte (Abbildung 3b).<sup>[13]</sup> Durch die zufällige Anordnung der Rezeptoren und dadurch, dass die eigentlich dreidimensionale Struktur nur in zwei Dimensionen aufgenommen wurde, konnte in manchen Fällen die Distanz zwischen den zwei Rändern von Filopodien gemessen werden (Abbildung 3b), und Abstände zwischen den Höchstwerten der Intensität so klein wie 128 nm konnten mit ca. 20 nm Genauigkeit der Lokalisierungen eindeutig aufgelöst werden.

Wir haben gezeigt, wie die Helligkeit einer gesamten Klasse von rot emittierenden und in biologischer Bildgebung geläufigen Farbstoffen erhöht werden kann, indem H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O im Puffer ersetzt wird. Diese Zunahme an Helligkeit wird durch eine reduzierte Effizienz der durch Wasserstoffbrücken-vermittelte strahlungslose Desaktivierung im deuterierten Lösungsmittel verursacht. Dieser Effekt kann im Prinzip in jeder Art von Bildgebungsverfahren genutzt werden, das auf der Fluoreszenz von Oxazinen basiert, und wir zeigen, dass es in hochauflösender Mikroskopie angewendet werden kann, um die Genauigkeit, mit der einzelne Moleküle lokalisiert werden, zu verbessern. Unsere neue Methode ist sehr einfach und kosteneffizient, da D<sub>2</sub>O mit biologischen Puffern kompatibel ist und erst für die Aufnahme der Fluoreszenzbilder gebraucht wird. Experimente in schwerem Wasser würden für zeitempfindliche Messungen von Vorteil sein, da die Rate, mit der Photonen detektiert werden, zweimal höher ist, was kürzere Aufnahmezeiten ermöglicht. Zusätzlich ist unser Ansatz, im Unterschied zu anderen vor kurzem eingeführten Methoden,<sup>[14]</sup> kompatibel mit lebenden Zellen.<sup>[15]</sup> Unsere Befunde deuten an, dass unsere Strategie, die Photophysik von geläufigen Fluorophoren zu verstehen und anzupassen, lohnenswert ist, um hochauflösende Mikroskopietechniken bedeutend zu verbessern.

Eingegangen am 19. März 2013,  
veränderte Fassung am 22. April 2013  
Online veröffentlicht am 3. Juli 2013

**Stichwörter:** Farbstoffe/Pigmente · Fluoreszenz ·  
Hochauflösende Mikroskopie · Oxazine

- [1] a) S. J. Lord, N. R. Conley, H.-L. D. Lee, S. Y. Nishimura, A. K. Pomerantz, K. A. Willets, Z. Lu, H. Wang, N. Liu, R. Samuel, R. Weber, A. Semyonov, M. He, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 55–65; b) G. Lukinavičius, K. Umegawa, N. Olivier, A. Honigsmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Corrêa, Jr., Z.-G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132–139; c) C. Wurm, K. Kolmakov, F. Gottfert, H. Ta, M. Bossi, H. Schill, S. Berning, S. Jakobs, G. Donnert, V. Belov, S. Hell, *Opt. Nanosc.* **2012**, *1*:7, 1–7; d) K. Kolmakov, V. N. Belov, J. Bierwagen, C. Ringemann, V. Mueller, C. Egge-

- ling, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 158–166; e) K. Kolmakov, V. N. Belov, C. A. Wurm, B. Harke, M. Leutenegger, C. Eggeling, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3593–3610.
- [2] a) S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272; b) 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; c) M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795; d) 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.
- [3] W. E. Moerner, *J. Microsc.* **2012**, *246*, 213–220.
- [4] a) L. Stryer, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5708–5712; b) R. Sens, K. H. Drexhage, *J. Lumin.* **1981**, *24–25*, 709–712; c) H. Inoue, M. Hida, N. Nakashima, K. Yoshihara, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3184–3188; d) A. Fürstenberg, E. Vauthey, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 260–267.
- [5] a) M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7036–7041; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6903–6908; b) W. C. Duim, B. Chen, J. Frydman, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2387–2390; c) J. Vogelsang, T. Cordes, C. Forthmann, C. Steinhauer, P. Tinnefeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8107–8112.
- [6] a) S. van de Linde, U. Endesfelder, A. Mukherjee, M. Schuettelpelz, G. Wiebusch, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 465–469; b) T. Kottke, S. van de Linde, M. Sauer, S. Kakorin, M. Heilemann, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3156–3159; c) T. Cordes, M. Strackham, S. W. Stahl, W. Summerer, C. Steinhauer, C. Forthmann, E. M. Puchner, J. Vogelsang, H. E. Gaub, P. Tinnefeld, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 645–651.
- [7] a) A. Grofcsik, M. Kubinyi, W. J. Jones, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *250*, 261–265; b) P. Fita, M. Fedoseeva, E. Vauthey, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 2465–2470.
- [8] S. Fleming, A. Mills, T. Tuttle, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 432–441.
- [9] J. Arden-Jacob, K.-H. Drexhage, M. Hammers-Schneider, N. U. Kemnitz, A. Zilles (ATTO-Tec GmbH), EP2374795A1, 2011.
- [10] O. Hartley, H. Gaertner, J. Wilken, D. Thompson, R. Fish, A. Ramos, C. Pastore, B. Dufour, F. Cerini, A. Melotti, N. Heveker, L. Picard, M. Alizon, D. Mosier, S. Kent, R. Offord, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16460–16465.
- [11] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027–1036.
- [12] a) T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **1976**, *15*, 3135–3139; b) C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C. A. M. Seidel in *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*, Springer, Berlin, **1999**, S. 193–240.
- [13] a) J. S. Biteen, M. A. Thompson, N. K. Tselentis, G. R. Bowman, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 947–949; b) J. L. Ptacin, S. F. Lee, E. C. Garner, E. Toro, M. Eckart, L. R. Comolli, W. E. Moerner, L. Shapiro, *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 791–798; c) S. F. Lee, M. A. Thompson, M. A. Schwartz, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Biophys. J.* **2011**, *100*, L31–L33.
- [14] a) J. C. Vaughan, S. Jia, X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1181–1184; b) J. C. Vaughan, G. T. Dempsey, E. Sun, X. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1197–1200.
- [15] D. M. Czajka, C. S. Fischer, A. J. Finkel, J. J. Katz, *Am. J. Physiol.* **1961**, *201*, 357–362.