

Hochauflösende Bildgebung

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201909220



Nanographene: ultrastabile, schaltbare und helle Sonden für die hochauflösende Mikroskopie

Xiaomin Liu^{+,*}, Shih-Ya Chen⁺, Qiang Chen, Xuelin Yao, Márton Gelléri, Sandra Ritz, Sachin Kumar, Christoph Cremer, Katharina Landfester, Klaus Müllen, Sapun H. Parekh, Akimitsu Narita und Mischa Bonn*

Abstract: Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie hat viele wichtige Entdeckungen in der Biologie und den Materialwissenschaften ermöglicht. Die Implementierungen der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie, wie die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (SMLM) und die Minimaissionsfluss-Mikroskopie (MINFLUX) im Lokalisierungsmodus, nutzen Fluorophore, die blinken, d. h. stochastisch ein- und ausgeschaltet werden. Hier präsentieren wir Nanographene – große polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die auch als atomar präzise Graphenquantenpunkte betrachtet werden können – als eine neue Klasse von Fluorophoren für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie. Nanographene weisen hervorragende photophysikalische Eigenschaften auf: intrinsisches Blinken auch an Luft, ausgezeichnete Fluoreszenzrückgewinnung und Stabilität über mehrere Monate. Als Eignungsnachweis für hochauflösende Anwendungen verwenden wir Nanographene in SMLM, um hochaufgelöste 3D-Bilder von Siliciumdioxid-Nanorissen zu erzeugen. Unsere Ergebnisse öffnen die Tür für die breite Anwendung von Nanographen in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie.

Einleitung

Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, Strukturen mit einer Auflösung zu betrachten, die wesentlich

besser ist als die Auflösung der konventionellen Mikroskopie, die durch das Beugungslimit beschränkt ist.^[1,2] Einige wichtige Herangehensweisen zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie beruhen darauf, dass Fluorophore stochastisch zwischen hellen, emittierenden (Ein-) und dunklen (Aus-) Zuständen wechseln, wenn sie kontinuierlich durch Licht angeregt werden. Dieses Phänomen liegt der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (SMLM) zugrunde, z. B. der stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie (STORM),^[3] der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM)^[4] und der Minimaissionsfluss-Mikroskopie (MINFLUX) im Lokalisierungsmodus.^[5] Derzeit werden in solchen Anwendungen vier Klassen von photoschaltbaren Fluorophoren verwendet: niedermolekulare organische Farbstoffe,^[6,7] photoaktivierbare/-schaltbare fluoreszierende Proteine,^[8,9] anorganische Quantenpunkte (QDs)^[10–12] und Kohlenstoffpunkte (CDs).^[13–16] Jede Klasse von Fluorophoren hat ihre Vor- und Nachteile entweder aus photophysikalischer oder aus anwendungstechnischer Sicht.^[17] Organische Farbstoffe, wie Alexa 647, der Goldstandard in der SMLM, sind niedermolekulare Verbindungen mit hervorragenden Blinkeigenschaften wie hohen Photonenzahlen sowie kurzen Leuchtdauern. Ihre photophysikalischen Eigenschaften sind jedoch stark von der Umgebung (vom Puffer) abhängig, was ihre Verwendung für hochauflösende Bildgebung auf bestimmte Umgebungen beschränkt; außerdem hat der für die

[*] Dr. X. Liu^[+], Q. Chen, X. Yao, Dr. S. Kumar, Prof. Dr. K. Landfester, Prof. Dr. K. Müllen, Prof. Dr. S. H. Parekh, Prof. Dr. A. Narita, Prof. Dr. M. Bonn
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: liuxiaomin@mpip-mainz.mpg.de
bonn@mpip-mainz.mpg.de

S. Chen^[+], Dr. M. Gelléri, Dr. S. Ritz, Prof. Dr. C. Cremer
Institut für Molekularbiologie gGmbH (IMB)
Mainz (Deutschland)
Prof. Dr. C. Cremer
Physikalisches Institut, Universität Mainz (JGU)
Mainz (Deutschland)
und
Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB)
und Kirchhoff-Institut für Physik (KIP)
Universität Heidelberg
Heidelberg (Deutschland)
Prof. Dr. K. Müllen
Institut für Physikalische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Mainz (Deutschland)

Dr. S. Kumar, Prof. Dr. S. H. Parekh
Department of Biomedical Engineering
University of Texas at Austin
Austin, TX (USA)
Prof. Dr. A. Narita
Organic and Carbon Nanomaterials Unit
Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University
Okinawa (Japan)

[*] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[+] co-first authors

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)

 eines Autors sind unter:

<https://doi.org/10.1002/ange.201909220> zu finden.

 © 2019 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Bildgebung verwendete Puffer typischerweise eine begrenzte chemische Reaktionslebensdauer (wenige Stunden) nach der Probenvorbereitung. Photoaktivierbare/-schaltbare fluoreszierende Proteine haben eine hervorragende Zielmolekülspezifität, allerdings resultieren ihre niedrigen Photonenzahlen in einer geringeren Lokalisierungs Genauigkeit als bei organischen Farbstoffen.^[18] QDs sind sehr photostabil und hell, aber ihre große Größe (ca. 10 nm) und ihre lange Leuchtdauer^[10] schränken ihren Einsatz als zuverlässige minimal-invasive Sonden ein. Auch die Toxizität von QDs, die Schwermetallatome enthalten, schränkt ihre Anwendbarkeit in der Biomedizin ein.^[19] CDs haben umgebungsunabhängige Blinkereigenschaften und sind kleiner als QDs; allerdings resultieren die undefinierten/unterschiedlichen chemischen Strukturen nicht nur in breiteren Fluoreszenzabsorption und Emissionsspektren, sondern erschweren auch die zielgerichtete Bindung.

Graphen-Quantenpunkte (GQDs) sind Nano-Graphenfragmente mit genau definierten, quantisierten Energieniveaus. Sie wurden kürzlich als umweltfreundliche Alternative zu CDs und QDs vorgeschlagen.^[20] GQDs sind für die Mikroskopie grundsätzlich hervorragend geeignet, da sie klein (typischerweise < 10 nm) und wenig toxisch sind. Die Syntheseverfahren von GQDs können im Allgemeinen als Top-down- oder Bottom-up-Ansatz klassifiziert werden. Das Top-down-Syntheseverfahren verwendet physikalische oder chemische Methoden zum „Spalten“ von Graphen^[20] oder anderen Kohlenstoff-Allotropen, wie C₆₀-Fulleren^[21] und doppelwandigen Kohlenstoff-Nanoröhren.^[22] Solche Verfahren erzeugen GQDs, die sich, ähnlich wie CDs, in Größe und chemischer Struktur unterscheiden, was zu heterogenen photophysikalischen Eigenschaften führt, wie sie auch bei CDs beobachtet werden. Bei den hier verwendeten Nanographenen handelt es sich um molekular definierte GQDs mit monodispersen Charakter, d.h. einer präzisen chemischen Struktur und atomarer Zusammensetzung, die genauer als (Nano-)Graphenmoleküle bezeichnet werden.^[23,24] Sie werden durch ein Bottom-up-Syntheseverfahren hergestellt, bei dem es sich um eine schrittweise Derivatisierung aus niedermolekularen organischen Verbindungen als Ausgangsmaterial handelt. Dieses Verfahren, das auf der organischen Synthesechemie beruht, ermöglicht nicht nur die Herstellung von Nanographenen mit genau definierten Absorptions- und Emissionsspektren, die durch die präzisen chemischen Strukturen definiert sind, sondern auch die Einführung verschiedener funktioneller Gruppen^[20,25] ähnlich wie bei organischen Farbstoffen, z. B. zur Bindung an bestimmte Liganden oder für Reaktionen mit bestimmten Zielmolekülen. Die spektralen (Absorptions- und Emissions-)Eigenschaften von Nanographenen können durch die Erweiterung der Formen und Kantenstrukturen mit Kohlenstoffatomen angepasst werden.^[26] Diese Vorteile ebnen den Weg für die Entwicklung von Nanographenen als neue Klasse von Fluorophoren für die optische Bildgebung. Bisher wurde lediglich stabile Fluoreszenz (d.h. nicht blinkende Emission) von Nanographenen nachgewiesen;^[27–30] da die nicht blinkende Fluoreszenz nicht für die Anwendung von Nanographenen in der SMLM genutzt werden kann, hat dies bisher den Einsatz von Nanographenen in diesem Anwendungsbereich verhindert.

Ergebnisse und Diskussion

Hier zeigen wir, dass Nanographene, entgegen früheren Berichten,^[27–30] ein hervorragendes Blinkverhalten zeigen, das viele herausragende photophysikalischen Eigenschaften bestehender Chromophore kombiniert; sie sind sehr klein und blinken unabhängig von der Umgebung (Puffer oder Luft), was sie ideal für die SMLM macht. Diese Entdeckung ist auf eine verbesserte Nanographensynthese und eine bessere Kontrolle des Aggregationsverhaltens von Nanographenen zurückzuführen. Wir zeigen, dass das breite Portfolio der Nanographene, für die die chemischen Strukturen und damit die Absorptions- und Emissionsspektren präzise abgestimmt werden können, nahezu ideale Eigenschaften als neue Klasse von Sonden für die hochauflösende Mikroskopie mit Multiplexing und 3D-SMLM bietet.

Hier charakterisieren wir die Eigenschaften von vier Arten von Graphenmolekülen (**GMs**), **DBOV-Mes**, **GM-C60**, **GM-C78** und **GM-C96**, als Blinksonden im Vergleich mit Alexa 647, einem weit verbreiteten organischen Fluorophor in der SMLM. Zu diesen Eigenschaften gehören 1) Größe, 2) Absorptions- und Emissionsspektren, 3) Leuchtdauern (Bruchteil der Zeit, in dem sich ein Molekül in seinem fluoreszierenden Zustand befindet) und 4) Photonenzahl (erfasste Photonen pro Schaltereignis). Abbildung 1 a,b zeigt die chemischen Strukturen und Spektren von **DBOV-Mes** (Dibenzo[hi,sr]ovalen (DBOV) mit zwei Mesityl(Mes)-Gruppen)^[31,32] und **GM-C60**^[33] mit Alkyl-Seitenketten. **DBOV-Mes (GM-C38)** und **GM-C60** bestehen aus 38 bzw. 60 sp²-hybridisierten Kohlenstoffatomen in ihren aromatischen Kernen, beide mit einer Größe von etwa 1–2 nm. Die chemischen Strukturen und Spektren von **GM-C78**, **GM-C96** und Alexa 647 sind in den Abbildungen S1 und S2 der Hintergrundinformationen dargestellt. Tabelle 1 zeigt allgemeine Fluoreszenzcharakterisierungen von Nanographenen in einem organischen Lösungsmittel und von Alexa 647 in wässriger Lösung. Alle gemessenen Nanographene weisen gut definierte Absorptions- und Emissionsspektren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen auf. **DBOV-Mes** hat sehr enge Absorptions- und Emissionsspektren, die mit denen gängiger organischer Farbstoffe wie Alexa 647 vergleichbar sind, was dieses Nanographen ideal für die mehrfarbige Bildgebung macht.

Wie bereits erwähnt, behalten Alexa 647 und andere organische Farbstoffe die richtigen Blinkereigenschaften in einem speziellen Blinkpuffer. Hier wurde ein Standardpuffer verwendet, der ein enzymatisches Sauerstoffabfangsystem mit Glucose-Oxidase und einem primären Thiol (Cysteamin, MEA)^[6] enthält. Meistens verschlechtern sich infolge von Oxidationsreaktionen oder Nebenreaktionen diese für die Bildgebung geeigneten Puffer im Laufe der Zeit, und die Blinkbedingungen werden nur für einige Stunden beibehalten.^[18] Wir haben die Blinkereigenschaften von Nanographenen in verschiedenen Umgebungen (d.h. ohne Blinkpuffer) gemessen und mit denen von Alexa 647 unter den optimierten Bedingungen verglichen (Tabelle 2 und Abbildungen S3–S10). Als einfache Messung zur Demonstration der Blinkleistung von Nanographenen in verschiedenen Umgebungen, basierend auf der Beobachtung von Blinkereignissen, quan-

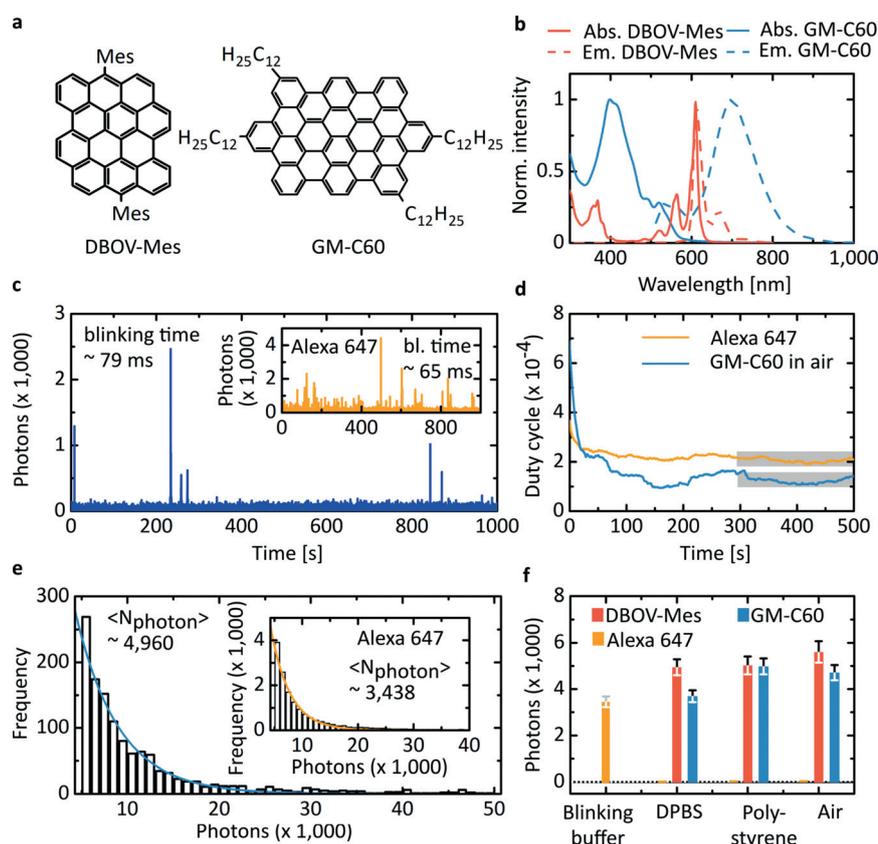


Abbildung 1. Fluoreszenz- und Blinkeigenschaften von Nanographenen. a) Chemische Strukturen von den ausgewählten Nanographenen **DBOV-Mes (GM-C38)** und **GM-C60**. b) Absorptions- (durchgezogene Linien) und Emissionsspektren (gestrichelte Linien) von **DBOV-Mes** (rot) und **GM-C60** (blau). c) Repräsentative, an Luft gemessene Einzelmolekül-Fluoreszenzzeitspur von **GM-C60** und Alexa 447 (Einschub) in einem Standard-Blinkpuffer mit Thiol (MEA, 10 mM) und einem Sauerstoffabfangsystem [(Glucose-Oxidase mit Katalase (GLOX)]. d) Leuchtdauer (Zeitdauer, in der sich ein Molekül in seinem fluoreszierenden Zustand befindet) von **GM-C60** (blau) und Alexa 447 (orange), berechnet aus Einzelmolekül-Fluoreszenzzeitspuren. Die Leuchtdauer wurde innerhalb des Zeitfensters 300–500 s (grauer Kasten) berechnet. e) Histogramm der detektierten Photonen pro Schaltereignis und einzelne exponentielle Anpassung von **GM-C60** und Alexa 447 (Einschub). Die mittleren Photonenzahlen wurden durch die exponentielle Anpassung bestimmt. f) Mittlere Anzahl Photonen, die pro Schaltereignis für Alexa 447 (orange) im Blinkpuffer, **DBOV-Mes** (rot) und **GM-C60** (blau) in DPBS, eingebettet im Polystyrol-Film oder an Luft, erkannt wurden. Bei Alexa 447 konnten keine Blinkereignisse ohne den Blinkpuffer visualisiert werden. Fehlerbalken entsprechen dem 95 % Konfidenzintervall der Anpassung. Detaillierte quantitative Analysen von Alexa 447 in Blinkpuffer, **DBOV-Mes** und **GM-C60** in verschiedenen Umgebungen sowie die anderen Arten von Nanographenen, die in einen PS-Film eingebettet sind, finden sich in Abschnitt 1 der Hintergrundinformationen.

tifizierten wir die Leuchtdauer und die durchschnittlichen Photonenzahlen pro Blinkereignis für Nanographenen an Luft, in Dulbeccos phosphatgepuffertem Kochsalzpuffer (DPBS) oder eingebettet in einem Polystyrol (PS)-Film. Wie aus dem repräsentativen Datensatz in Abbildung 1c hervorgeht, zeigt das Nanographen **GM-C60** ein intrinsisches Blinken an der Luft. Abbildung 1d,e zeigt die Leuchtdauer und die mittlere Photonenzahl pro Schaltereignis von **GM-C60** im Vergleich zu den Eigenschaften von Alexa 447. Abbildung 1f und Tabelle 2 zeigen, dass **DBOV-Mes** und **GM-C60** in jeder Umgebung durchschnittliche Photonenzahlen pro Blinkereignis aufweisen, die etwa das 1.3-Fache derjenigen von Alexa 447 im optimierten Blinkpuffer betragen, während vergleichbare Leuchtdauer und Blinkzeiten beibehalten werden. Dieser Befund demonstriert die Vielseitigkeit von Nanographenen-Fluorophoren im Vergleich zu niedermolekularen Farbstoffen; sie behalten die für die SMLM geforderten Eigenschaften: gutes Blinken unter Umgebungsbedingungen, und keine spezielle Chemie des Puffers ist erforderlich. Was den Blinkmechanismus von Nanographenen betrifft, so lässt ihr Blinken in verschiedenen Umgebungen auf einen anderen Mechanismus schließen als bei herkömmlichen organischen Farbstoffen,^[34] Halbleiter-Quantenpunkten^[35,36] und Kohlenstoff-Quantenpunkten.^[16,37] Die Aufklärung des Blinkmechanismus von Nanographenen ist Thema der laufenden Forschung.

Zusätzlich zu den hervorragenden Blinkeigenschaften haben wir auch die Photostabilität und chemische Stabilität der Nanographene **DBOV-Mes** und **GM-C60** untersucht, indem wir die Photonenzahl pro Schaltereignis quan-

Tabelle 1: Fluoreszenzeigenschaften von verschiedenen Nanographenen und Alexa 447 in Lösung.

Farbstoff	Anregungsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	FWHM des Anregungsspektrums [nm]	FWHM des Emissionsspektrums [nm]	Extinktionskoeffizient [$M^{-1} cm^{-1}$]	Quantenausb.	Helligkeit [$M^{-1} cm^{-1}$]
Alexa 447	650 ^[a]	665 ^[a]	38 ^[b]	35 ^[b]	239 000 ^[a]	0.33 ^[a]	78 870
DBOV-Mes (GM-C38)	610	614	15	22	70 000	0.79	55 300
GM-C60	412	701	84	220	22 000	0.1	2200
GM-C78	— ^[c]	513	— ^[c]	80	54 000	0.02	1080
GM-C96	491	650	83	141	61 000	0.01	610

[a] Spektrale Maxima, Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute von Alexa 447 aus Lit. [9]. [b] Halbwertsbreite (FWHM) der Anregungs- und Emissionsspektren von Alexa 447 vom Farbenhersteller. [c] Spitzenwellenlänge des Signals und FWHM des **GM-C78**-Anregungsspektrums sind wegen der Wellenlängenbegrenzung des Spektrometers nicht verfügbar. Die Fluoreszenzeigenschaften von Nanographenen wurden in Toluollösung gemessen.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Blinkigenschaften von verschiedenen Nanographenen und Alexa 647.

	Alexa 647	DBOV-Mes (GM-C38)			GM-C60			GM-C78	GM-C96
Umgebung	Blinkpuffer ^[a]	DPBS-Puffer	Luft	Polystyrol	DPBS-Puffer	Luft	Polystyrol	Polystyrol	Polystyrol
erkannte Photonen pro Schaltereignis	3438	4918	5570	4902	3673	4960	4690	5740	5020
Leuchtdauer [$\times 10^{-4}$]	2.1	1.3	4.7	8	5.3	1.2	3.2	2.7	1.7
Blinkzeit [ms]	65	87	108	54	75	79	96	83	94

[a] Blinkigenschaften von Alexa 647, gemessen in Gegenwart eines enzymatischen Sauerstoffabfangsystems [Glucose-Oxidase mit Katalase (GLOX)] und eines primären Thiols (MEA, 10 mM). Zwei repräsentative Nanographene, **DBOV-Mes** und **GM-C60**, wurden in drei verschiedenen Umgebungen gemessen: Luft, DPBS und eingebettet in PS, während die beiden anderen Nanographene, **GM-C78** und **GM-C96**, nur in einem PS-Film gemessen wurden.

tifiziert haben. Abbildung 2a,b zeigt die gemessenen mittleren Photonen pro Blinkereignis von **DBOV-Mes** und **GM-C60** an Luft und im PS-Film für frisch vorbereitete sowie für über mehrere Monate aufbewahrte Proben. Die Blinkigenschaften von **DBOV-Mes** und **GM-C60** blieben über mehrere

Monate unverändert. Außerdem wurde die Langzeitstabilität von **DBOV-Mes** durch Messung des Absorptionsspektrums von in Toluol gelöstem **DBOV-Mes** über einen Zeitraum von sechs Monaten bestimmt. Wir fanden keine Veränderungen im Absorptionsspektrum der **DOBV-Mes**-Lösung, wie in Abbildung S11 gezeigt, was auf eine geringe Aggregationstendenz in organischen Lösungsmitteln und eine hohe Stabilität von **DBOV-Mes** schließen lässt.

Wie bereits zuvor gezeigt,^[6,18] kann die Fluoreszenzemission einiger organischer Farbstoffe, einschließlich Alexa 647, aus einem dunklen (Aus-)Zustand mit einem Puls von ultraviolettem oder blauem Licht in den Ein-Zustand zurückgewonnen werden. Wir führten ein ähnliches Wiederherstellungsexperiment an Nanographenen durch, indem wir zunächst eine kontinuierliche Anregungsstrahlung (532 nm) verwendeten, um die meisten Nanographene in einen dunklen Zustand zu versetzen, und danach den Anteil der Moleküle bestimmten, die sich nach schwacher Beleuchtung mit einem 405-nm-Laser erholten. Abbildung 2c zeigt drei Bilder mit Rohdaten von links nach rechts, die zu Beginn der Messung, nach 16 min kontinuierlicher Bestrahlung mit einem 532-nm-Laser und nach einer kurzen Beleuchtung mit 405 nm (ca. 1.5 s) aufgenommen wurden. Um die Fluoreszenzrückgewinnung durch den 405-nm-Laser zu quantifizieren, wurde die Anzahl der detektierten Blinkereignisse in einem Zeitraum von mehr als 30 min analysiert. Wie in Abbildung 2d dargestellt, hat die Anzahl der erfassten Blinkereignisse von Nanographenen mit einer Zeit von über 16 min (20000 Bilder) ab Beginn des Experiments abgenommen. In den folgenden 15 min wurde ein zusätzlicher Erholungslaserpuls (405 nm) für 1–2 s hinzugenommen und alle ca. 1000 Bilder eingeschaltet. Die Menge

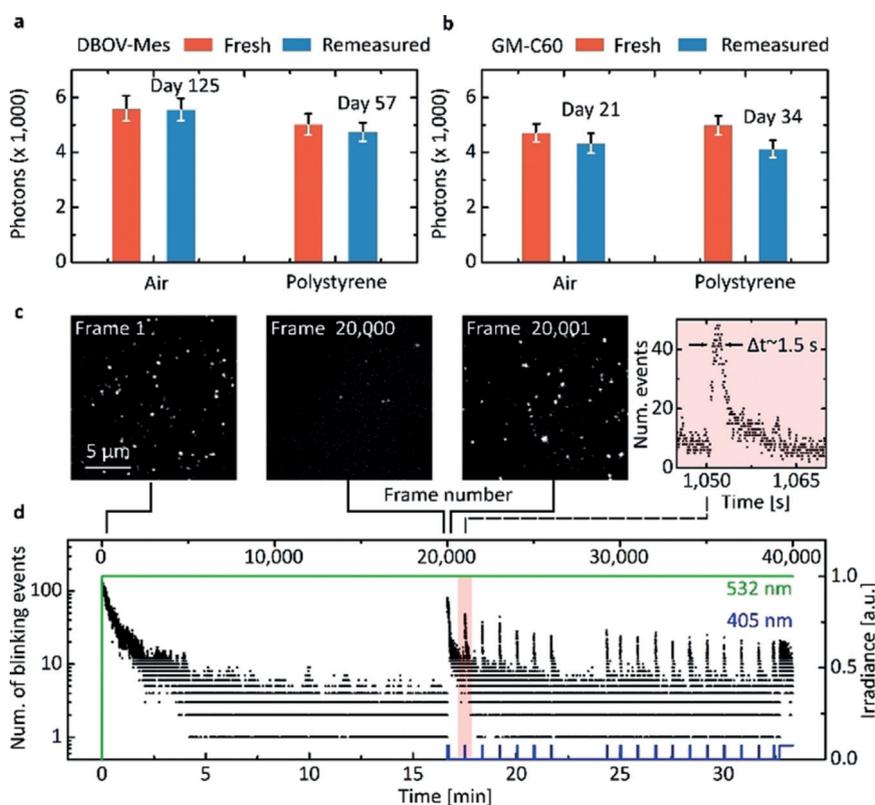


Abbildung 2. Umgebungsstabilität und Photorrückgewinnungs-Eigenschaften der Nanographene **DBOV-Mes** und **GM-C60**. a,b) Vergleich der pro Schaltereignis erfassten mittleren Photonenanzahl für **DBOV-Mes** und **GM-C60** an Luft und im PS-Film direkt nach der Probenvorbereitung sowie die Resultate einer erneuten Messung nach der in der Legende angegebenen Wartezeit. Hinweis: Die Probe von **GM-C60** an Luft wurde vor der Nachmessung unter Umgebungsbedingungen aufbewahrt und nicht vor Licht geschützt. Alle anderen Proben wurden in einer dunklen Umgebung bei Raumtemperatur aufbewahrt. c) Als repräsentative Fluoreszenzbilder werden drei ausgewählte Bilder gezeigt: 1, 20000 und 20001. d) Anzahl der erfassten Blinkereignisse pro Bild im Vergleich zur Bildnummer (Zeit). Das erste und zweite Bild in (c) wurden mehr als 16 min (20000 Bilder) voneinander entfernt unter kontinuierlicher 4-kWcm⁻²-Anregung mit 532 nm (grüne Linie) aufgenommen. Ausgehend von Frame 20001 wurde eine zusätzliche 405-nm-Anregung (blaue Linie) mit 0.30 kWcm⁻² für 1–1.65 s eingestrahlt, und dies wurde etwa alle 1000 Bilder wiederholt. Die Anzahl der im leuchtenden Zustand befindlichen Nanographene konnte durch die Probenregeneration mit der 405-nm-Bestrahlung wiederholt erhöht werden. Einschub (in Rosa): Beispiel für die Fluoreszenzrückgewinnung nach ca. 1.5 s Belichtungszeit mit dem 405-nm-Laser. Die in (c) und (d) gezeigte Messung der Nanographenenprobe von **DBOV-Mes** an Luft erfolgte 125 Tage nach der Probenherstellung.

der Blinkereignisse zeigt deutlich, dass eine beträchtliche Anzahl von Nanographenen nach jeder 405-nm-Bestrahlung wieder in den eingeschalteten Zustand versetzt wurde. Sowohl Alexa 647 als auch **DBOV-Mes** können in einen reversiblen Aus-Zustand versetzt und stochastisch aktiviert werden, jedoch bleibt die reversible Natur von Alexa 647 nur erhalten, wenn es sich um einen frisch zubereiteten Blinkpuffer handelt. Dagegen behält die Probe mit **DBOV-Mes** an Luft auch 125 Tage nach der Präparation ihr Blinkverhalten bei, wie in Abbildung 2d dargestellt. Aus praktischer Sicht erweitert eine solche reversible Aktivierung der Photorückgewinnungs-Eigenschaften von **DBOV-Mes**, auch an Luft, die Einsatzmöglichkeiten von Nanographenen in der hochauflösenden Mikroskopie in besonderem Maße.

Als konzeptionellen Beweis für den Einsatz von Nanographenen in der hochauflösenden Mikroskopie wurden Nanometer-große Risse in Glas produziert und mit 3D-SMLM untersucht. Die mittels 3DE-SMLM erhaltenen Bilder wurden mit Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Bildern verglichen. Abbildung 3a zeigt schematisch das für 3D-SMLM und AFM genutzte Vorgehen, mit dem Nanographene sowohl auf der Oberfläche eines Deckglases als auch in den Rissen abgelagert wurde. Das Deckglas wurde zunächst mit der konventionellen Hellfeldmikroskopie (Abbildung S12a) und der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung S12b) untersucht. Mittels SMLM wurde der Zeitverlauf einer 2D-Bilderserie aufgenommen, und die Rohdaten der Bilder wurden verwendet, um die Nanographene, in drei Dimensionen, innerhalb der Probe zu lokalisieren. Für diese 3D-Lokalisierung wurde das Mikroskopsystem erst kalibriert (Abbildungen S13 und S14), anschließend wurden die **DBOV-Mes**-Moleküle, mit einer Genauigkeit von 17.2 nm, über einen ± 300 nm großen Bereich entlang der z -Achse lokalisiert. Eine detaillierte Beschreibung der 3D-Lokalisierung sowie ein direkter Vergleich der Bilder eines konventionellen Mikroskops mit den Bildern 3D-SMLM-Methode werden in Abschnitt 2 der Hintergrundinformationen bereitgestellt. Die so bestimmten Molekülpositionen wurden in zwei Kategorien unterteilt, die auf der bimodalen Verteilung der Lokalisierungszahlen in Abhängigkeit von der Position auf der z -Achse beruhen (Abbildung S14). Eine Intensitätsprojektion der ersten Untergruppe für die z -Positionen von $+300$ bis -10 nm (Abbildung 3b) zeigt erwartungsgemäß eine relativ homogene Verteilung von Nanographenen auf der Glasoberfläche (und nicht tief in die Spalten hinein). Dagegen zeigt die Intensitätsprojektion aus der zweiten Un-

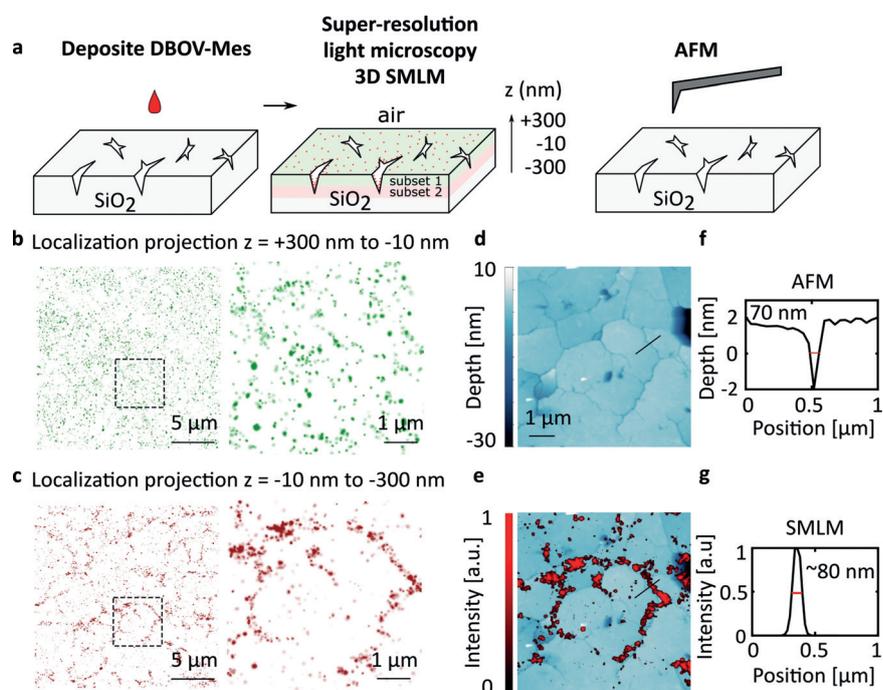


Abbildung 3. Hochauflösende 3D-Mikroskopieaufnahmen von nanometergroßen Rissen in einem Glassubstrat. a) Bildgebungsverfahren für die „geätzten“ Deckgläser, die Merkmale von Rissen und Untergruppen von Molekülen zeigen, die auf (grün schattiert) oder direkt unter (rot schattiert) der makroskopischen (flachen) Glasoberfläche positioniert sind. Nach der Abscheidung von Nanographenen (**DBOV-Mes**) auf den Deckgläsern (links) wurde die Struktur mit 3D-SMLM (Mitte) und AFM (rechts) abgebildet. Die resultierende blinkende Lokalisierung von 3D-SMLM wurde in zwei Untergruppen unterteilt, die die Verteilung der Nanographene in der Nähe (grün) und rechts unterhalb (rot) der Glas-Luft-Grenzfläche in den Spalten anzeigen. b) Für die Intensitätsprojektion entlang der z -Achse zwischen 300 und -10 nm (Untergruppe 1), oberhalb der „geätzten“ Struktur, wurde eine relativ zufällige räumliche Verteilung der Nanographene beobachtet. c) Für den Bereich zwischen -10 und -300 nm (Untergruppe 2) ist die räumliche Struktur der Risse erkennbar. d) AFM-Bilder zeigen die Oberflächenstruktur im Bereich von Interesse in (b) und (c). e) Die Überlagerung des SMLM-Bildes in (c) und des AFM-Bildes in (d) zeigt nach der Bildregistrierung starke Überlappungsmerkmale. f, g) Liniensprofile von AFM- (d) und SMLM-Aufnahmen (c) zeigen eine FWHM über ca. 70 bzw. 80 nm.

tergruppe von $z = -10$ bis -300 nm (Abbildung 3c) ein Muster von Nanographenen, das wesentlich heterogener ist, was darauf hinweist, dass sie sich innerhalb der geätzten Risse, unter der Oberfläche der Spalten befinden.

Als Vergleich wurde AFM verwendet, um die Unterstruktur der Spalten in den gleichen Bereichen wie in Abbildung 3b,c abzubilden. Das AFM-Bild zeigt eine ebene Oberfläche mit zahlreichen Spalten (Abbildung 3d). Ein größerer Bildausschnitt des topologischen AFM-Bilds im gleichen Bereich findet sich in Abschnitt 3, Abbildung S15, der Hintergrundinformationen. Nach der Bildregistrierung (Abbildung 3e) des AFM-Bildes und des SMLM-Bildes von $z = -10$ bis -300 nm zeigen die beiden hochauflösenden Bilder hochkorrelierte Merkmale an Positionen mit Spalten (Abbildung 3e), was zeigt, dass die Nanographenen-Positionen in der zweiten Untergruppe tatsächlich die Unterstruktur der Risse offenbaren. Wie in den angegebenen Liniensprofilen in Abbildung 3d,e dargestellt, weisen das Oberflächenprofil des AFM-Bildes (Abbildung 3f) und das auf SMLM basierende Intensitätsprofil (Abbildung 3g) eine ähnliche FWHM der „Spalte“ von 70 bzw. 80 nm auf.

Es wurden verschiedene Techniken zur Strukturaufklärung von Nanostrukturen entwickelt, z.B. Röntgenmikroskopie,^[38] AFM^[39] und Elektronenmikroskopie (EM),^[40] jedoch ist ihre Anwendbarkeit eingeschränkt. Die Kombination mit außergewöhnlich stabilen und intrinsisch blinkenden Nanographenen in der 3D-SMLM ermöglicht die Visualisierung von Nanostrukturen in größerer Tiefe als mit AFM, wo die geometrische Beschränkung der Spitze Probleme verursachen kann, oder mit Methoden wie der EM-Tomographie, die eine vollständige Probenzerstörung erfordert.

Zusammenfassung

Nanographene mit atomar definierten chemischen Strukturen zeigen dank ihres umgebungsunabhängigen Blinkverhaltens, der hohen Photonenzahlen, der guten Stabilität und der gut definierten Anregungs- und Emissionsspektren ideale Eigenschaften für verschiedene hochauflösende Mikroskopietechniken. Wir haben durch hochreine Herstellung und Probenvorbereitung diese Eigenschaften entdeckt, die im Gegensatz zur weitverbreiteten Meinung stehen, dass Nanographene konstante Fluoreszenzstrahler sind. Atomgenaue Nanographene blinken in verschiedenen Umgebungen und zeigen gegenüber Alexa 647, dem aktuellen niedermolekularen Goldstandard-Farbstoff, hohe Photonenzahlen pro Blinkereignis sowie eine geringe Leuchtdauer. Darüber hinaus weisen die Nanofarbstoffe eine extrem hohe Probenstabilität auf, die um mehr als das 1000-Fache höher ist als die von Alexa 647. Die nanometergenaue Strukturabbildung von geätzten Rissen in Glas zeigt das Potenzial von Nanographenen in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie für Anwendungen in der Materialwissenschaft. Die hervorragende chemische Kontrolle und die umgebungsunabhängigen Blinkeigenschaften von Nanographenen bieten zudem eine gute Möglichkeit, Blinkmechanismen zu untersuchen, was für organische Farbstoffe infolge der komplexen Pufferabhängigkeit und der relativ geringen Haltbarkeit von Pufferlösungen eine anspruchsvolle Aufgabe ist.^[6] Darüber hinaus können spezifische funktionelle Seitengruppen an den peripheren Positionen der Nanographene angebracht werden, z.B. hydrophile Gruppen, um die Wasserlöslichkeit und Bindungsfunktionalität für das Protein-Targeting zu verbessern, was Nanographene zu vielversprechenden Farbstoffen für das Bio-Imaging macht.

Experimentelles

Mikroskopie

3D-SMLM wurde mit einem SR GSD 3D (Leica) mit vier Lasern durchgeführt: 488 nm (300 mW), 532 nm (500 mW) und 642 nm (500 mW) für die Anregung und 405 nm (30 mW) für die Fluoreszenzreaktivierung. Ein „HCX PL APO 160×1.43 NA Oil CORR-TIRF“-Objektiv (Leica) und der „Total Internal Reflection“- (TIRF)-Modus wurden für Einzelmolekül-Blinkmessungen und für hochaufgelöste Bilder verwendet. Für alle Messungen von Nanographenen wurden ein 532-nm-Laser und ein Emissionsbandpassfilter (550–650 nm/449–451 nm) verwendet. Für die Messungen mit Alexa 647 wurden der 642-nm-Laser und ein Emissionsbandpassfilter (660–

760 nm) verwendet. Das Mikroskop war mit einer EMCCD-Kamera (iXonDU-897, Andor) ausgestattet. Die resultierenden Bilder haben eine Pixelgröße von 100 nm. Die detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus ist in den Hintergrundinformationen, Abschnitt 4.1, zu finden.

Die Rasterkraftmikroskopie (Dimension FastScan, Bruker) wurde im „Tapping mode“ an Luft durchgeführt. Ein standardmäßiger V-förmiger Siliciumnitrid-Cantilever mit einer Federkonstante von 26 N m^{-1} mit einer pyramidenförmigen Spitze von Bruker-AFM-Sonden (OTESPA-R3) wurde montiert. Die Spitze hat im Durchschnitt eine Höhe von $15 \mu\text{m}$ und einen Krümmungsradius von etwa 10 nm bei einem Scheitelwinkel von 35° und 18° . Weitere Informationen zum AFM sind in den Hintergrundinformationen, Abschnitt 4.2, zu finden. Die AFM-Bilder ($512 \text{ Pixel} \times 512 \text{ Pixel}$) wurden mit einer „line rate“ von 0.5 Hz aufgenommen.

Experimente zu Blinkeigenschaften von einzelnen Nanographenen und Alexa 647

Zur Beurteilung der Blinkeigenschaften einschließlich Photonen pro Schaltereignis und Leuchtdauer wurden Nanographenproben in verschiedenen Einbettmedien wie Luft, DPBS und Polystyrol hergestellt. Zum Vergleich wurden zusätzliche Proben mit Alexa 647 in einem Sauerstoffabfangsystem vorbereitet. Details sind in den Hintergrundinformationen, Abschnitt 5, zu finden.

Für jede Nanographenvariante wurden mehrere Serien von je 20000 Bildern aufgenommen. Nanographene wurden während der Bildgebung mit der entsprechenden Wellenlänge kontinuierlich angeregt. Die Bilder wurden mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer EM-Verstärkung von 100 aufgenommen.

Um Zeitspuren einzelner Moleküle zu extrahieren, wurde zunächst eine Maximalintensitätsprojektion der aufgezeichneten Zeitreihen erzeugt. Die Moleküle wurden danach im Projektionsbild maximaler Intensität lokalisiert und gaben die Positionen aller Moleküle an, die während der aufgezeichneten Zeitreihen sichtbar waren. Einzelmolekül-Zeitspuren wurden danach als Hintergrund-korrigierte Intensitäten an diesen Positionen über alle aufgenommenen Bilder extrahiert. Photonenzählungen und Blinkzeiten wurden durch die Lokalisierung einzelner Molekülpositionen in allen Frames und die Zusammenführung zu Blinkereignissen bestimmt. An die resultierenden Histogramme von Photonen pro Blinkereignis und Blinkdauer wurde eine einzige Exponentialfunktion angepasst. Die Mittelwerte und Fehler wurden aus den jeweiligen Anpassungen extrahiert. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in den Hintergrundinformationen, Abschnitt 6.

Um die Photowiederherstellungs-Eigenschaften von Nanographenen zu untersuchen, wurden 40000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer EM-Verstärkung von 100 aufgenommen. Bei den ersten 20000 Bildern wurden Bilder durch kontinuierliche Laserbestrahlung bei 532 nm mit einer Bestrahlungsstärke von 4 kW cm^{-2} aufgenommen. Während der Aufnahme der Bilder zwischen Bild 20000 bis Bild 40000 wurde zusätzlich der 405-nm-Laser mit einer Intensität von 0.30 kW cm^{-2} für 1–1.65 s angewendet, was etwa alle 1000 Bilder wiederholt wurde. Die Bilder wurden verarbeitet und die Positionen zur Analyse bestimmt.

Experimente zur Bildgebung von 3D-Rissstrukturen

Eine milde chemische Behandlung wurde verwendet, um nanometergroße „Risse“ in die Oberfläche eines Borosilikatdeckglases (ibidi, Gridded glass coverslips Grid-50) zu ätzen. Für die Fluoreszenzbildgebung wurden $5 \mu\text{L}$ (1 nm) Nanographen in Toluol auf dem Deckglas aufgebracht. Die detaillierte Probenvorbereitung ist in Abschnitt 7 der Hintergrundinformationen beschrieben. Für die hochaufgelöste Abbildung der 3D-Spalten auf den Deckgläsern wurde der TIRF-Modus verwendet, um die Proben mit einer Intensität von 10 kW cm^{-2} bei einer Laserwellenlänge von 532 nm anzuregen. 40000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer EM-Verstärkung von 100 wurden aufgenommen und verarbeitet, um die 3D-Positionen zu bestimmen. AFM-Bilder derselben Region wurden aufgenommen, und das resultierende Bild ist in Abbil-

ung S15a dargestellt. Die komplette Bildüberlagerung von AFM und SMLM nach der Bildregistrierung ist in Abbildung S15b zum Vergleich gezeigt.

Danksagung

Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und dem Human Frontiers in Science Program (RGP0045/2018) für die finanzielle Unterstützung sowie der Microscopy Core Facility am IMB für den Einsatz des hochauflösenden Mikroskops Leica GSD. S.-Y. Chen dankt dem internationalen Doktorandenprogramm zu Genregulation, Epigenetik und Genomstabilität (Mainz). X. Yao dankt für das Stipendium des China Council Scholarship (CSC). Wir danken M. Müller und M. Kappl für die Herstellung von Nanostrukturen, L. Driessen für die Goldfilmbeschichtung auf Glas, G. Hermann für die Goldätzung und X. Ling für die Glasreinigung. Wir danken P. Han, F. Geyer, Y. Yao und R. Berger für die aufschlussreichen Gespräche.

Interessenkonflikt

X. Liu, A. Narita, S. Parekh, Q. Chen, C. Cremer, K. Landfester, K. Müllen und M. Bonn sind als Erfinder in einer Patentanmeldung (Anmeldung Nr. 18199451.8 – EPA) und A. Narita, Q. Chen, K. Müllen, X. Liu, S. Parekh und M. Bonn sind als Erfinder in einer Patentanmeldung (Anmeldung Nr. 18199447.6 – EPA) im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Arbeiten aufgeführt. Alle anderen Autoren haben nichts offenzulegen.

Stichwörter: Blinken · Chromophore · Fluoreszenz · Hochauflösende Bildgebung · Nanographene

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 496–502
Angew. Chem. **2020**, *132*, 504–510

- [1] L. Schermelleh, A. Ferrand, T. Huser, C. Eggeling, M. Sauer, O. Biehlmaier, G. P. C. Drummen, *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 72–84.
- [2] S. Pujals, N. Feiner-Gracia, P. Delcanale, I. Voets, L. Albertazzi, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 68–84.
- [3] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
- [4] 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.
- [5] F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf, S. W. Hell, *Science* **2017**, *355*, 606–612.
- [6] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027–1036.
- [7] L. Nahidiazar, A. V. Agronskaia, J. Broertjes, B. van den Broek, K. Jalink, *PLoS One* **2016**, *11*, e0158884.
- [8] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [9] J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 555–565.
- [10] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 3117–3120.
- [11] K. A. Lidke, B. Rieger, T. M. Jovin, R. Heintzmann, *Opt. Express* **2005**, *13*, 7052.
- [12] P. Hoyer, T. Staudt, J. Engelhardt, S. W. Hell, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 245–250.
- [13] N. C. Verma, S. Khan, C. K. Nandi, *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4*, 044006.
- [14] B. Zhi, Y. Cui, S. Wang, B. P. Frank, D. N. Williams, R. P. Brown, E. S. Melby, R. J. Hamers, Z. Rosenzweig, D. H. Fairbrother, et al., *ACS Nano* **2018**, *12*, 5741–5752.
- [15] H. He, X. Liu, S. Li, X. Wang, Q. Wang, J. Li, J. Wang, H. Ren, B. Ge, S. Wang, et al., *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11831–11838.
- [16] A. M. Chizhik, S. Stein, M. O. Dekaliuk, C. Battle, W. Li, A. Huss, M. Platen, I. A. T. Schaap, I. Gregor, A. P. Demchenko, et al., *Nano Lett.* **2016**, *16*, 237–242.
- [17] D. Jin, P. Xi, B. Wang, L. Zhang, J. Enderlein, A. M. van Oijen, *Nat. Methods* **2018**, *15*, 415–423.
- [18] S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidebreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 991–1009.
- [19] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
- [20] L. Li, G. Wu, G. Yang, J. Peng, J. Zhao, J.-J. Zhu, *Nanoscale* **2013**, *5*, 4015.
- [21] G. Chen, Z. Zhuo, K. Ni, N. Y. Kim, Y. Zhao, Z. Chen, B. Xiang, L. Yang, Q. Zhang, Z. Lee, et al., *Small* **2015**, *11*, 5296–5304.
- [22] F. Li, L. Kou, W. Chen, C. Wu, T. Guo, *NPG Asia Mater.* **2013**, *5*, e60–e60.
- [23] X.-Y. Wang, A. Narita, K. Müllen, *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *2*, 0100.
- [24] A. Narita, X.-Y. Wang, X. Feng, K. Müllen, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6616–6643.
- [25] Q. Chen, D. Wang, M. Baumgarten, D. Schollmeyer, K. Müllen, A. Narita, *Chem. Asian J.* **2019**, *14*, 1703–1707.
- [26] Z. Ji, E. Dervishi, S. K. Doorn, M. Sykora, *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 953–959.
- [27] M. Thakur, A. Mewada, S. Pandey, M. Bhoori, K. Singh, M. Sharon, M. Sharon, *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *67*, 468–477.
- [28] X. T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K. Q. Luo, P. Chen, *Small* **2015**, *11*, 1620–1636.
- [29] H. Sun, L. Wu, W. Wei, X. Qu, *Mater. Today* **2013**, *16*, 433–442.
- [30] S. Zhao, J. Lavie, L. Rondin, L. Orcin-Chaix, C. Diederichs, P. Roussignol, Y. Chassagneux, C. Voisin, K. Müllen, A. Narita, et al., *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3470.
- [31] G. M. Paternò, Q. Chen, X.-Y. Wang, J. Liu, S. G. Motti, A. Petrozza, X. Feng, G. Lanzani, K. Müllen, A. Narita, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6753–6757; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 6857–6861.
- [32] D. M. Coles, Q. Chen, L. C. Flatten, J. M. Smith, K. Müllen, A. Narita, D. G. Lidzey, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 5521–5525.
- [33] V. S. Iyer, K. Yoshimura, V. Enkelmann, R. Epsch, J. P. Rabe, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2696–2699; *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2843–2846.
- [34] J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I. H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, P. Tinnefeld, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2475–2490.
- [35] M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, *Nature* **1996**, *383*, 802–804.
- [36] C. Galland, Y. Ghosh, A. Steinbrück, M. Sykora, J. A. Hollingsworth, V. I. Klimov, H. Htoon, *Nature* **2011**, *479*, 203–207.
- [37] S. Khan, W. Li, N. Karedla, J. Thiart, I. Gregor, A. M. Chizhik, J. Enderlein, C. K. Nandi, A. I. Chizhik, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 5751–5757.
- [38] A. Sakdinawat, D. Attwood, *Nat. Photonics* **2010**, *4*, 840–848.
- [39] F. J. Giessibl, *Rev. Mod. Phys.* **2003**, *75*, 949–983.
- [40] D. B. Williams, C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*, Springer US, Boston, **1996**, S. 3–17.

Manuskript erhalten: 24. Juli 2019

Veränderte Fassung erhalten: 16. Oktober 2019

Akzeptierte Fassung online: 28. Oktober 2019

Endgültige Fassung online: 26. November 2019