

Nanoskopische Bildgebung der Vernetzungsdichte in Polymernetzwerken mittels Diarylethen-Photoschaltern

Eric Siemes⁺, Oleksii Nevskiy⁺, Dmytro Sysoiev, Sarah K. Turnhoff, Alex Oppermann, Thomas Huhn, Walter Richtering und Dominik Wöll*

Abstract: Die nanoskopische In-situ-Bildgebung weicher Polymerstrukturen ist für das Verständnis der Zusammenhänge von Struktur, Eigenschaften und Funktionalität im nm-Bereich entscheidend. Die Vernetzung von Polymerketten legt die viskoelastischen Eigenschaften eines Gels fest, und die Korrelation zwischen mechanischen Eigenschaften und der Verteilung und Menge an Vernetzern ist für Anwendungen und ein elementares Verständnis von Polymeren auf der molekularen Ebene relevant. Hier wird eine auf supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie basierende Methodik zur Visualisierung und Quantifizierung von Vernetzungspunkten in Polymersystemen vorgestellt. Ein neuartiger Diarylethen-Photoschalter mit stark fluoreszierender geschlossener und nicht-fluoreszierender offener Form wird als photoschaltbarer Vernetzer in ein Polymernetzwerk eingebaut. Seine photophysikalischen Eigenschaften, sein Schaltverhalten und seine hohe Photostabilität machen ihn zu einem idealen Kandidaten für photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie. Als Anwendungsbeispiel wurden pNIPAM-Mikrogele untersucht, die bekanntlich hohe Variationen in ihrer internen Vernetzungsdichte aufweisen.

Superauflösende Fluoreszenzmikroskopiemethoden ermöglichen eine In-situ-Bildgebung und die Untersuchung verschiedenartiger biologischer Strukturen auf der Nanometerskala.^[1-7] Seit einigen Jahren kann jedoch auch eine zunehmende Zahl von Fragen im Bereich der weichen Materie und in den Materialwissenschaften generell damit beantwortet werden, indem die typischen in der Biologie angewendeten Verfahren an materialwissenschaftliche Systeme angepasst werden.^[8,9] Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht neue Einblicke, die komplementär zu denjenigen aus wohlbekannten und leistungsstarken Techniken wie der Kraftfeldmikroskopie^[10] und modernen Elektronenmikroskopiemethoden^[11] sind. Mit der Erstgenannten können im Nanometerbereich Weichheit und Oberflächeneigenschaften, z. B. Topologie, gemessen werden. Die Elektronenmikrosko-

pie kann dagegen selbst im Sub-Nanometerbereich Strukturinformationen liefern, sofern der Elektronendichtekontrast ausreichend ist.^[12,13] Allerdings gibt die Kraftfeldmikroskopie keine Einblicke ins Innere einer Probe, und Elektronenmikroskopie erfordert typischerweise hohes Vakuum und zusätzlich einen hohen Elektronenkontrast, den viele Polymersysteme nicht haben. Der Vorteil supraauflösender Fluoreszenzmikroskopieverfahren ist, dass sie die Probe nicht beeinträchtigen und eine Bildgebung von Strukturen in Echtzeit ermöglichen.^[14,15] Zur Adressierung vieler relevanter Fragen in den Materialwissenschaften sind jedoch weitere Entwicklungen erforderlich. Diese betreffen Probenvorbereitung, Aufnahmebedingungen und das Design schaltbarer Farbstoffe mit geeigneten photophysikalischen und chemischen Eigenschaften, und insbesondere die Möglichkeit einer spezifischen Markierung der Funktionalitäten und Kompartimente von Interesse. Eine direkte Bildgebung der Position einzelner Vernetzungspunkte und deren Verteilung in Polymernetzwerken ist ein Wunschziel von Polymerphysikern und Polymerchemikern. Bekanntermaßen weisen die Vernetzer in vielen Polymernetzwerken und Hydrogelen Heterogenitäten im Nanometerbereich auf,^[16] die über die Polymerisationsbedingungen eingeführt werden.^[17] Die hohe Komplexität dieser vernetzten Systeme weicher Materie verhindert ihre quantitative Strukturanalyse mit typischen Spektroskopietechniken.^[18]

Stark mit Wasser gequollene Polymernetzwerke sind die Basis von Hydrogelen.^[19] Dies gilt sowohl auf makroskopischer Ebene als auch in ihrer Teilchengestalt als Mikrogele mit Größen vom Nanometer- bis zum Mikrometerbereich.^[20] Im gequollenen Zustand enthält ein solches Mikrogel in vielen Fällen unter 10 % Polymeranteil.^[21] Durch Wahl geeigneter Monomere wie *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) können Mikrogele auf Stimuli reagieren und zeigen somit ein enormes Potenzial für vielfältige Anwendungen – z. B. als „smarte“ Oberflächenbeschichtungen und Membranen,^[22,23] zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen oder Gastmolekülen,^[24,25] als Modellsysteme für die Kolloidchemie,^[26] als (Bio)katalysatoren,^[27,28] für optische Anwendungen^[29,30] und zur Stabilisierung von Emulsionen.^[31,32] Die physikalischen Eigenschaften von Mikrogele werden hauptsächlich durch den Anteil und die Verteilung an Vernetzern bestimmt.^[33] Streuexperimente zeigen für die innere Struktur solcher Mikrogele eine komplexe Morphologie, die oft durch ein so genanntes Fuzzy-Sphere-Modell,^[21] bei dem Ketten von der Oberfläche in die Lösung herausragen, beschrieben und von der Polymerisationskinetik bestimmt wird.^[34] Externe Stimuli wie Änderungen der Temperatur, der Ionenstärke, des pH-Wertes, von Druck, externen Magnetfeldern und elektrischen

[*] E. Siemes,^[†] O. Nevskiy,^[†] S. K. Turnhoff, A. Oppermann, Prof. Dr. W. Richtering, Prof. Dr. D. Wöll
Institut für Physikalische Chemie, RWTH Aachen
Landoltweg 2, 52074 Aachen (Deutschland)
E-Mail: woell@pc.rwth-aachen.de

Dr. D. Sysoiev, Dr. T. Huhn
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78464 Konstanz (Deutschland)

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

Feldern oder Licht ermöglichen einen reversiblen Wechsel der physikochemischen Eigenschaften. Auch dieses Verhalten wird jedoch zu einem großen Teil von der Netzwerkstruktur bestimmt. Daher ist eine direkte Visualisierung und Quantifizierung von Vernetzungspunkten entscheidend für die Charakterisierung komplexer Mikrogelarchitekturen und das Verständnis ihrer Eigenschaften.^[35] Es wurde bereits gezeigt, dass sich supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie sehr gut für die Untersuchung von Mikrogelen mit kovalent gebundenen^[36–38] oder frei diffundierenden, das Mikrogelnetzwerk durchdringenden Farbstoffmolekülen^[39] eignet. Allerdings waren in all diesen Untersuchungen Schaltpuffer erforderlich, um das für lokalisierungs-basierte Superauflösungsmethoden erforderliche Blinken der Fluorophore auszulösen. Solche Pufferzusätze können jedoch das Quellverhalten beeinträchtigen, besonders wenn die Mikrogele ionische oder pH-empfindliche Gruppen enthalten.

Hier führen wir einen photochromen Diarylethen-Photoschalter als Vernetzer in Mikrogele ein, der sich für supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie eignet. Diese Farbstoffklasse wurde noch nie in Polymernetzwerken und Gelen eingesetzt. Mit diesem können wir Vernetzungsdichten und Verteilungen von Vernetzern mit noch nie dagewesener Genauigkeit über photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM) als Nanoskopiemethode bestimmen. Wir demonstrieren das enorme Potenzial dieser Methode für die Bildgebung der heterogenen Verteilung von Vernetzern in pNIPAM-basierten Mikrogelen, die eines der bekanntesten Mikrogele und (allgemein) Polymernetzwerke darstellen.

Diarylethene hielten – zusätzlich zu ihrem großen Potenzial in der Datenspeicherung und als chemische Sensoren^[40,41] sowie ihrer Fähigkeit, andere Chromophore zu schalten^[42] – vor kurzer Zeit auch Einzug als universelle Hilfsmittel für supraauflösende Mikroskopie.^[43–45] Sie haben hohe Absorptionskoeffizienten und sind relativ photostabil, ihre fluoreszierende Form ist spektral weit von der nicht-fluoreszierenden Form getrennt und weist eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute auf, die Quantenausbeute für das Ausschalten ist niedrig und diejenige für das Anschalten ausreichend hoch.

Photoschalter **1oc** und **2oc** (Abbildung 1; **o** = offen, **c** = geschlossen) wurden über eine Suzuki-Miyaura-Kupplung mit dem 6,6'-Diod-Derivat von 1,2-Bis(2-ethyl-1,1-dioxido-benzothiophen-3-yl)perfluorocyclopenten und der entsprechenden Boronsäure nach einer von Irie und Mitarbeitern beschriebenen Prozedur synthetisiert (mehr Details in den Hintergrundinformationen).^[46] Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der entsprechenden geschlossenen Formen **1c** und **2c** sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die Absorptionsbande der geschlossenen Form **2c** ist gegenüber derjenigen von **1c** infolge des vergrößerten π -Systems bathochrom verschoben. Photoschalter **2oc** trägt auf beiden Seiten zwei Styrolsubstituenten, durch die er bei radikalischen Polymerisationen als Vernetzer eingebaut werden kann. Der Diarylethen-Chromophor ist unter radikalischen Bedingungen äußerst stabil.^[47] Nach der Polymerisation verhält sich der Photoschalter **2oc** ähnlich wie das entsprechende Phenylderivat **1oc**, da die Alkylsubstituenten in *para*-Position nur einen minimalen Einfluss auf die Phenylgruppe haben.

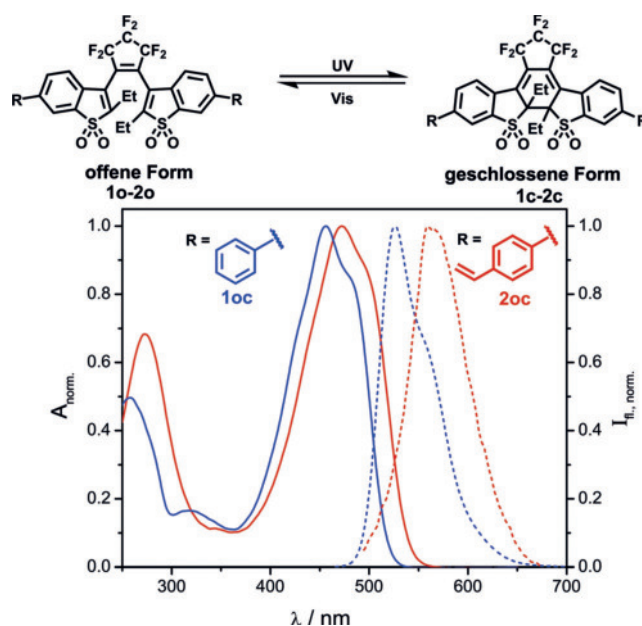


Abbildung 1. Chemische Strukturen der offenen und geschlossenen Form der Photoschalter **1oc** und **2oc**; Absorptionsspektren der geschlossenen Form **1c** (blaue durchgezogene Linie) und **2c** (rote durchgezogene Linie) sowie die entsprechenden Fluoreszenzspektren von **1c** (blaue gestrichelte Linie) und **2c** (rote gestrichelte Linie). Alle Spektren wurden in 1,4-Dioxan aufgenommen.

Die photophysikalischen Eigenschaften von Photoschalter **1oc** sind in Tabelle S1 der Hintergrundinformationen aufgeführt. Die offene und geschlossene Form können mittels Bestrahlung bei geeigneter Wellenlänge ineinander überführt werden (mehr Details in Abbildung S1). Bestrahlung mit UV-Licht führt überwiegend zur Bildung der geschlossenen Form, während durch Bestrahlung mit Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich die offene Form zurückgehalten werden kann. Die niedrige Ausschalt-(Cycloreversions-)Quantenausbeute des auf Benzothiophen-1,1-dioxid basierenden Diarylethen-Photoschalters ist für die PALM-Bildgebung unverzichtbar. Sie ermöglicht die für eine genaue Lokalisierung einzelner Photoschalter erforderliche Detektion einer großen Zahl an Photonen,^[48] bevor der Photoschalter in den dunklen Zustand zurückreagiert. Wie von Irie und Mitarbeitern schon für **1oc** gezeigt,^[49] kann auch **2oc** mit nur einer Anregungswellenlänge geschaltet werden. Dies ist von großem praktischem Nutzen für diverse Anwendungen supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie.

Mit unserem neuen Diarylethen(DAE)-Derivat **2oc** visualisierten wir die Vernetzer in Mikrogelen, da diese stark gequollenen Polymernetzwerke laut Streuexperimenten eine heterogene Verteilung der Vernetzerdichte aufweisen.^[21] pNIPAM-basierte Mikrogele wurden mittels freier radikalischer Fällungspolymerisation mit *N,N*-Methylenbis(acrylamid) (BIS) und **2oc** als Vernetzer hergestellt (Abbildung 2). Die Menge an DAE-Vernetzer **2oc** relativ zur Menge an BIS betrug 4 mol%. Somit wurde sichergestellt, dass die Eigenschaften der Mikrogele nicht signifikant von den wohlbekanntesten, nur mit BIS vernetzten Mikrogelen abweichen. Nach der Synthese wurden die Mikrogele über Dialyse und

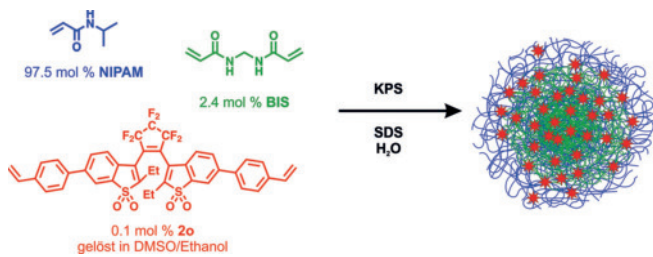


Abbildung 2. Synthese der untersuchten pNIPAM-basierten Mikrogele. KPS = Kaliumperoxodisulfat, SDS = Natriumlaurylsulfat.

Zentrifugation aufgereinigt, um den Gehalt an freien Farbstoffen auf eine nicht störende Menge zu minimieren. Details dazu können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

Superaufgelöste PALM-Aufnahmen der **2oc** als Vernetzer enthaltenden Mikrogele wurden an einem Weitfeldmikroskop erstellt (Details siehe Hintergrundinformationen). Eine dreidimensionale (3D-)Lokalisierung wurde über Astigmatismus erreicht.^[50] Hierzu wurde eine zylindrische Linse mit einer Fokusslänge von 1000 mm in eine geeignete Position des Emissionspfades gesetzt. Als Ergebnis davon wird die optische Transferfunktion in Abhängigkeit von der z -Position entlang zweier Achsen verschieden gestreckt. Anregt wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Lichtleistung von ca. 6.25 kW cm^{-2} . Diese Bedingungen führten zu angemessenem Blinkverhalten für PALM. Zu betonen ist hierbei, dass – im Unterschied zu typischen dSTORM-Messungen (dSTORM = direct stochastic optical reconstruction microscopy)^[51] – keinerlei Zusätze für das Blinken benötigt werden. Die blinkenden Moleküle wurden mit 10 ms Integrationszeit auf einer EMCCD-Kamera (iXon Ultra 897) aufgenommen und mittels ThunderSTORM-Software^[52] analysiert. Die Überlagerung einzelner 3D-Lokalisierungen führt, wie in Abbildung 3 gezeigt, zu einem supraaufgelösten Bild der Vernetzer in Mikrogele. Jeder Punkt in dieser Abbildung entspricht einer einzelnen Lokalisierung. Zusätzlich wurden zur Verdeutlichung der Vernetzerdichte die Punkte entsprechend der Anzahl der innerhalb eines Radius von 30 nm benachbarten Punkte eingefärbt. Die daraus resultierenden, konstruierten Bilder der Mikrogele zeigen ein dichtes, hochvernetztes Zentrum und eine weniger vernetzte Peripherie. Im Zentrum sind viele Positionen von 20 oder mehr Lokalisierungen innerhalb von 30 nm umgeben, wohingegen in der äußeren Peripherie nur einzelne Lokalisierungen gefunden werden können.

Außer der Visualisierung von Vernetzern und ihrem heterogenen Auftreten ist auch eine sorgfältige Analyse ihrer Verteilung von großer theoretischer als auch praktischer Bedeutung. Insbesondere für pNIPAM-Mikrogele wurde mithilfe von Streumethoden eine abnehmende Polymerdichte vom Zentrum zur Peripherie hin festgestellt.^[21] Auch die vor kurzer Zeit von Bergmann et al. publizierte, supraauflösende dSTORM-Aufnahmen mit frei diffundierenden Farbstoffen weisen darauf hin.^[39] Im Unterschied dazu konnten wir die Vernetzerpositionen jedoch direkt beobachten und mit der lokalen Mikrogedichte korrelieren. Diese wurde über statische Lichtstreuung (SLS) bestimmt. Wie im

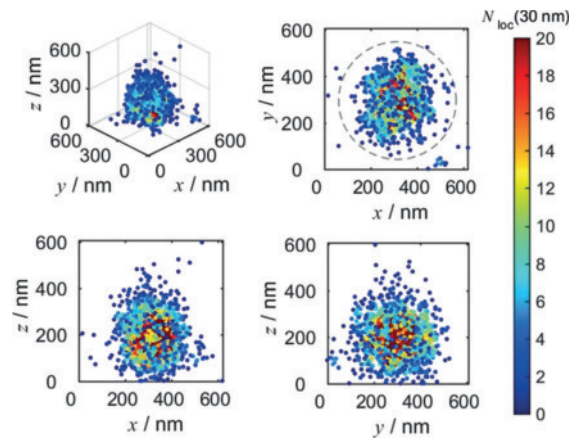


Abbildung 3. 3D-Verteilung von Vernetzungspunkten eines individuellen Mikrogele in seinem hydratisierten, gequollenen Zustand und die entsprechenden 2D-Projektionen auf drei verschiedene Ebenen. Jeder Punkt repräsentiert die Lokalisierung eines Diarylethen-Vernetzers. Die Farbskala verdeutlicht die Anzahl an Lokalisierungen innerhalb eines Radius von 30 nm, d.h. die Vernetzerdichte. Der grau gestrichelte Kreis zeigt den mittels dynamischer Lichtstreuung (siehe Abbildung S2) gemessenen hydrodynamischen Radius r_h . Eine 3D-Animation kann in den Hintergrundinformationen heruntergeladen werden.

oberen Teil von Abbildung 4 gezeigt, können die SLS-Daten mit dem Fuzzy-Sphere-Modell von Stieger et al.^[21] angepasst werden (Details zu den Parametern finden sich in den Hintergrundinformationen). Im unteren Teil von Abbildung 4 wird die so ermittelte Polymerdichte mit der aus der supraauflösenden Mikroskopie erhaltenen Vernetzerdichte vergli-

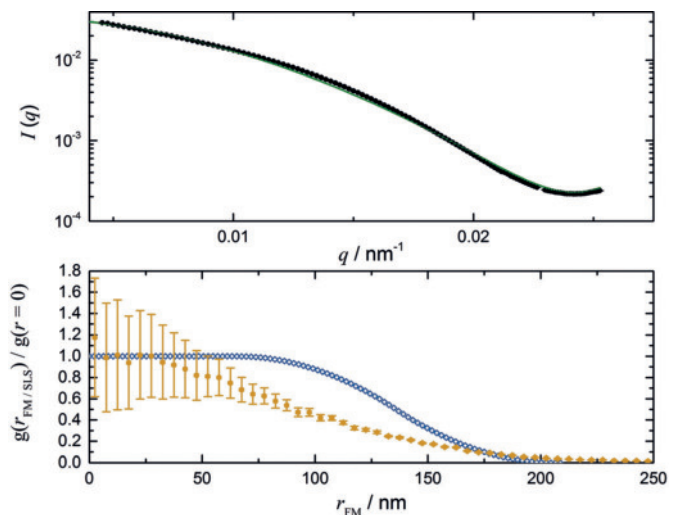


Abbildung 4. Oberer Graph: Daten aus der statischen Lichtstreuung an p(NIPAM-co-BIS-co-DAE)-Mikrogele (schwarze Kreise). Die Punkte wurde an das Modell einer Kugel mit unscharfer Oberfläche (Fuzzy Sphere) angepasst (grüne Linie, mehr Details in den Hintergrundinformationen). Unterer Graph: radiale Verteilung der aus der Anpassung der SLS-Daten erhaltenen Polymerdichte (offene, blaue Rauten) und über 20 Mikrogele gemittelte, radiale Verteilung der aus PALM-3D-Bildern erhaltenen DAE-Vernetzer (gefüllte, orange Kreise). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der aus einzelnen Mikrogele erhaltenen Dichte. Alle radialen Verteilungen wurden auf ihren Wert im Zentrum normiert.

chen. Die radialen Verteilungen der Polymerdichte und von Vernetzer **2** sind signifikant verschieden. Gegenüber der Polymerdichte, die, wie bereits oben beschrieben, einer Fuzzy Sphere entspricht, fällt die radiale Dichte des Vernetzers **2** schneller ab, und die Abnahme ist im Bereich von 30 bis 150 nm sogar fast linear. Sowohl die Dichte von Vernetzer **2** als auch die Polymerdichte sind im Zentrum am höchsten. Die Polymerdichte bleibt jedoch bis ca. 80 nm Entfernung vom Zentrum recht konstant, wohingegen die Dichte von Vernetzer **2** an diesem Punkt bereits auf ca. 50 % abgefallen ist. In den äußeren Mikrogelregionen, in denen taumelnde Ketten vorherrschen, sind sowohl die Polymer- als auch die Vernetzerdichte von **2** relativ gering. Ein solch detaillierter Vergleich zwischen Polymer- und Vernetzerdichte konnte bisher nicht durchgeführt werden, da im Unterschied zu unseren hier aufgezeigten Möglichkeiten zuvor keine getrennte Betrachtung beider Verteilungen möglich war. Allerdings soll in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass sich die Veränderung des Vernetzers auch signifikant auf die Polymerisationskinetik und somit auf die Verteilung des Vernetzers auswirken kann.^[53] Dies gilt sowohl für die Einführung eines fluoreszierenden Vernetzers als auch für die nachträgliche chemische Markierung eines Vernetzers. Allerdings ist mit typischen Vernetzern wie BIS eine supraauflösende Bildgebung weder mit Fluoreszenz- noch mit Elektronenmikroskopie möglich. Aus diesem Grund bietet der hier vorgestellte Ansatz die einzige Möglichkeit, einzelne Vernetzer zu visualisieren, und zukünftige Forschungen werden darauf abzielen, fluoreszierende mit klassischen Vernetzern zu kombinieren, um zu untersuchen, wie die Polymerisationsbedingungen und die Eigenschaften der Vernetzer deren Verteilung in den hergestellten Polymernetzwerken beeinflussen.

Wir haben Diarylethen-Photoschalter mit zwei Styrolgruppen, die als Vernetzer fungieren können, entwickelt. Dies ermöglicht die Visualisierung und die Analyse der Verteilung von Vernetzern mit lokalisierungsbasierter supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie bis zur Nanoskala und ohne irgendwelche Zusätze, die den pH-Wert oder die Ionenstärke beeinflussen könnten. Die dadurch neu gewonnenen Möglichkeiten wurden anhand von Mikrogelen gezeigt, die bekanntermaßen eine inhomogene Polymerdichte aufweisen, für die aber die Vernetzerdichte noch nie experimentell bestimmt werden konnte. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Polymer- als auch Vernetzerdichte vom Zentrum zur Peripherie eines Mikrogels abnehmen. Die radiale Abhängigkeit beider Größen unterscheidet sich überraschenderweise aber deutlich. Somit ergibt sich die Polymerdichte nicht automatisch aus der Dichte von Vernetzer **2**, und umgekehrt. Inwieweit die unterschiedlichen Polymerisationsraten der Vernetzer für dieses Verhalten verantwortlich sind, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die hier vorgestellte Methode bietet ein enormes Potenzial, neue Maßstäbe bei der Untersuchung von Polymernetzwerken und deren Heterogenitäten zu setzen.

Danksagung

Wir danken der DFG für Unterstützung innerhalb der Projekte C5 und A3 des SFB 985 „Funktionale Mikrogele und Mikrogelsysteme“. Außerdem danken wir dem RWTH-Profilbereich MSE (Molecular Science and Engineering) für die Unterstützung des Kompetenzzentrums FLAMENCO (high resolution Fluorescence microscopy Applied in Molecular Science and Engineering COmpetence center).

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Mikrogele · Photoschalter · Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie · Vernetzer · Weiche Materie

- [1] S. W. Hell, S. J. Sahl, M. Bates, X. Zhuang, R. Heintzmann, M. J. Booth, J. Bewersdorf, G. Shtengel, H. Hess, P. Tinnefeld, A. Honigmann, S. Jakobs, I. Testa, L. Cognet, B. Lounis, H. Ewers, S. J. Davis, C. Eggeling, D. Klenerman, K. I. Willig, G. Vicidomini, M. Castello, A. Diaspro, T. Cordes, *J. Phys. D* **2015**, *48*, 443001.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266–6271.
- [5] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [6] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
- [7] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6903–6908; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7036–7041.
- [8] D. Wöll, C. Flors, *Small Methods* **2017**, *1*, 1700191.
- [9] A. Aloï, I. K. Voets, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *34*, 59–73.
- [10] E. T. Herruzo, A. P. Perrino, R. Garcia, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3126.
- [11] L. E. Franken, E. J. Boekema, M. C. A. Stuart, *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600476.
- [12] M. T. Proetto, A. M. Rush, M.-P. Chien, P. Abellan Baeza, J. P. Patterson, M. P. Thompson, N. H. Olson, C. E. Moore, A. L. Rheingold, C. Andolina, J. Millstone, S. B. Howell, N. D. Browning, J. E. Evans, N. C. Gianneschi, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1162–1165.
- [13] K. Geisel, L. Isa, W. Richtering, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4905–4909; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5005–5009.
- [14] S. Onogi, H. Shigemitsu, T. Yoshii, T. Tanida, M. Ikeda, R. Kubota, I. Hamachi, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 743–752.
- [15] H. Deschout, T. Lukes, A. Sharipov, D. Szlag, L. Feletti, W. Vandenberg, P. Dedecker, J. Hofkens, M. Leutenegger, T. Lasser, A. Radenovic, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13693.
- [16] F. Di Lorenzo, S. Seiffert, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5515–5528.

- [17] D. Wöll, H. Uji-i, T. Schnitzler, J. I. Hotta, P. Dedecker, A. Herrmann, F. C. De Schryver, K. Müllen, J. Hofkens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 783–787; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 795–799.
- [18] D. Estupiñán, C. Barner-Kowollik, L. Barner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5925–5929; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 6028–6033.
- [19] X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 13165–13307.
- [20] L. A. Lyon, A. Fernandez-Nieves, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 25–43.
- [21] M. Stieger, W. Richtering, J. S. Pedersen, P. Lindner, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 6197–6206.
- [22] M. Kather, M. Skischus, P. Kandt, A. Pich, G. Conrads, S. Neuss, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2497–2502; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 2537–2543.
- [23] D. Menne, F. Pitsch, J. E. Wong, A. Pich, M. Wessling, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5706–5710; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5814–5818.
- [24] R. A. Meurer, S. Kemper, S. Knopp, T. Eichert, F. Jakob, H. E. Goldbach, U. Schwaneberg, A. Pich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7380–7386; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 7486–7492.
- [25] L. Nuhn, M. Hirsch, B. Krieg, K. Koynov, K. Fischer, M. Schmidt, M. Helm, R. Zentel, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2198–2214.
- [26] K. Han, D. Go, T. Tigges, K. Rahimi, A. J. C. Kuehne, A. Walther, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2176–2182; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 2208–2214.
- [27] S. Wiese, A. C. Spiess, W. Richtering, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 576–579; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 604–607.
- [28] S. Wu, J. Dzubiella, J. Kaiser, M. Drechsler, X. Guo, M. Ballauff, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2229–2233; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2272–2276.
- [29] J. D. Debord, S. Eustis, S. Byul Debord, M. T. Lofye, L. A. Lyon, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 658–662.
- [30] M. Chen, L. Zhou, Y. Guan, Y. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9961–9965; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10145–10149.
- [31] H. Monteillet, M. Workamp, X. Li, B. Schuur, J. M. Kleijn, F. A. M. Leermakers, J. Sprakel, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12197–12200.
- [32] W. Richtering, *Langmuir* **2012**, *28*, 17218–17229; M. Faulde, E. Siemes, D. Wöll, A. Jupke, *Polymers* **2018**, *10*, 809.
- [33] F. A. Plamper, W. Richtering, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 131–140.
- [34] B. R. Saunders, *Langmuir* **2004**, *20*, 3925–3932.
- [35] W. Richtering, B. R. Saunders, *Soft Matter* **2014**, *10*, 3695–3702.
- [36] A. P. H. Gelissen, A. Oppermann, T. Caumanns, P. Hebbeker, S. K. Turnhoff, R. Tiwari, S. Eisold, U. Simon, Y. Lu, J. Mayer, W. Richtering, A. Walther, D. Wöll, *Nano Lett.* **2016**, *16*, 7295–7301.
- [37] G. M. Conley, P. Aebischer, S. Nöjd, P. Schurtenberger, F. Scheffold, *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1700969.
- [38] G. M. Conley, S. Nöjd, M. Braibanti, P. Schurtenberger, F. Scheffold, *Colloids Surf. A* **2016**, *499*, 18–23.
- [39] S. Bergmann, O. Wrede, T. Huser, T. Hellweg, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 5074–5083.
- [40] M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 12174–12277.
- [41] J. Zhang, H. Tian, *Adv. Opt. Mater.* **2018**, *6*, 1701278.
- [42] J. Maier, M. Pärss, T. Weller, M. Thelakkat, J. Köhler, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41739.
- [43] O. Nevskiy, D. Sysoiev, J. Dreier, S. C. Stein, A. Oppermann, F. Lemken, T. Janke, J. Enderlein, I. Testa, T. Huhn, D. Wöll, *Small* **2018**, *14*, 1703333.
- [44] Y. Arai, S. Ito, H. Fujita, Y. Yoneda, T. Kaji, S. Takei, R. Kashihara, M. Morimoto, M. Irie, H. Miyasaka, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 4066–4069.
- [45] O. Nevskiy, D. Sysoiev, A. Oppermann, T. Huhn, D. Wöll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12698–12702; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 12890–12894.
- [46] K. Uno, H. Niikura, M. Morimoto, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13558–13564.
- [47] S.-J. Lim, C.-J. Carling, C. C. Warford, D. Hsiao, B. D. Gates, N. R. Branda, *Dyes Pigm.* **2011**, *89*, 230–235.
- [48] K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, H. Flyvbjerg, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 377–381.
- [49] R. Kashihara, M. Morimoto, S. Ito, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16498–16501.
- [50] a) L. Holtzer, T. Meckel, T. Schmidt, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 053902; b) B. Huang, W. Q. Wang, M. Bates, X. W. Zhuang, *Science* **2008**, *319*, 810–813.
- [51] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027–1036.
- [52] M. Ovesný, P. Křížek, J. Borkovec, Z. Švindrých, G. M. Hagen, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2389–2390.
- [53] X. Wu, R. H. Pelton, A. E. Hamielec, D. R. Woods, W. McPhee, *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272*, 467–477.