

Pressekonferenz 25.April 2005:

Mit 4Pi in die Nanowelt der Zellen



Christoph Cremer

**Kirchhoff Institut für Physik/Netzwerk „BioMolekulare Maschinen“,
Universität Heidelberg**

**Institute for Molecular Biophysics /The Jackson Laboratory &
University of Maine**

Ziel: (Licht) Optische Analyse zellulärer Nanostrukturen („BioMolekulare Mikroskopie“)

Zelluläre Nanostrukturen: Komplexe Gebilde aus biologischen Makromolekülen („BioMolekulare Maschinen“).

Probleme:

- Zellen haben einen typischen Durchmesser von 15 – 20 Mikrometer (1 Mikrometer = 1/1000 Millimeter)**
- „BioMolekulare Maschinen“ sind viel kleiner (bis zu Bruchteilen von Mikrometer)**
- „Konventionelle“ Lichtmikroskope haben eine optische Best-Auflösung von etwa 0.2 Mikrometer in der Objektebene und von etwa 1 Mikrometer senkrecht dazu.**

Lichtoptische Auflösung:

Kleinste Struktureinheit, die noch unterschieden werden kann. Das bedeutet: Für die Analyse einer räumlichen Struktur wird eine Auflösung benötigt, die wesentlich besser ist.

Konsequenz:

Die Nanowelt der Zellen erfordert eine Erhöhung der lichtoptischen Auflösung!

Dilemma:

Aufgrund der Wellennatur des Lichtes scheint eine solche Verbesserung UNMÖGLICH zu sein (Ernst Abbe, 1873)

Lösung: Überwindung der klassischen Auflösungsgrenze durch

Konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie

Prinzip:

- **Das Objekt wird ‘Punkt-für-Punkt‘ durch einen scharf fokussierten Laser-Strahl („gescannt“) und so zur Aussendung von Licht (Fluoreszenz) angeregt;**
- **Das Fluoreszenzsignal wird „Punkt-für-Punkt“ mithilfe eines hochempfindlichen Sensors gemessen;**
- **Das Bild wird auf elektronischem Wege punktweise elektronisch rekonstruiert (ähnlich wie beim Fernseher)**

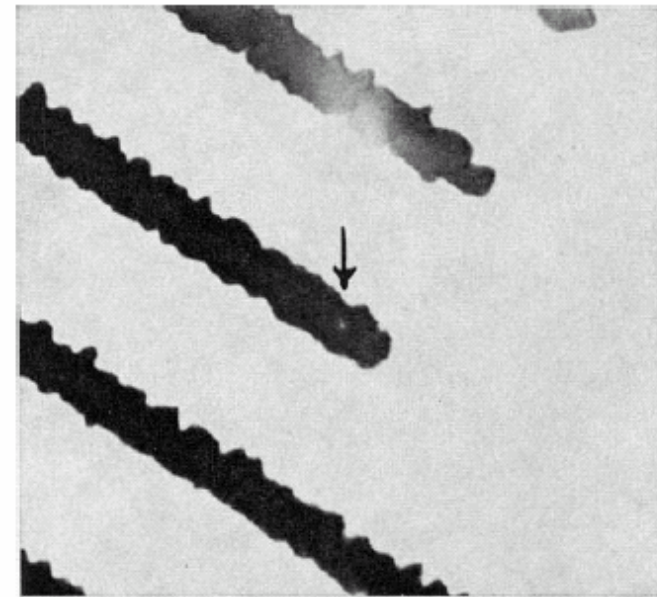
Erste Schritte zur Realisierung

Anregung einer Objektfluoreszenz in einer Region mit einem Durchmesser von ca. 0.4 Mikrometer, z.B. durch einen Laser-UV-Mikrostrahl

An ultraviolet Laser microbeam for 257 nm

335

Fig. 2: Production of a fluorescing spot in the object plane by Laser-uv-microirradiation. The objective is a Zeiss Ultrafluor 100/1.25 Glyc, and the specimen a Zeiss quartz object micrometer, on which the fluorescing spot is produced. The distance between two lines matches 10 μm .



Technische Realisierung in einem „konventionellen“ Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskop

of the steps alone could be obtained, or the gradient of the steps could be displayed in a DIC-like image (Hamilton and Wilson, 1984). [For the basics of digital image processing, see Castleman (1979), Baxes (1984), Gonzales and Wintz (1987), Chapter 10 in Inoué (1986), and Chapters 13 and 14, *this volume*.]

The integrated circuit chip could also be displayed with contrast reflecting the nature of the local circuit elements, for example, with the variation in photon-induced current in the circuit under observation superimposed on the confocal image of the chip made with reflected light (Wilson and Sheppard, 1984).

In addition to the Oxford group, the brothers Cremer and Cremer (1978) of Heidelberg designed a specimen-scanning laser-illuminated confocal microscope. This epi-fluorescence system was equipped with (1) a circular exit pinhole, in front of the first PMT, whose diameter was equal to the principle maximum of the diffraction pattern; and (2) an annular aperture, in front of a second PMT, whose opening corresponded to the first subsidiary maximum of the diffraction pattern. The output of the two PMTs was used to provide displays of autofocus as well as surface contour and fluorescent intensity distribution measurements.

In the 1978 article, the Cremers also discussed the possibility of laser spot illumination using a “ 4π -point-hologram” that could, at least in principle, provide long working distance relative to the small spot size that could be produced.

Carlsson *et al.* (1985), Amos *et al.* (1987) and White *et al.* (1987). The publications were followed shortly by introduction of laser-

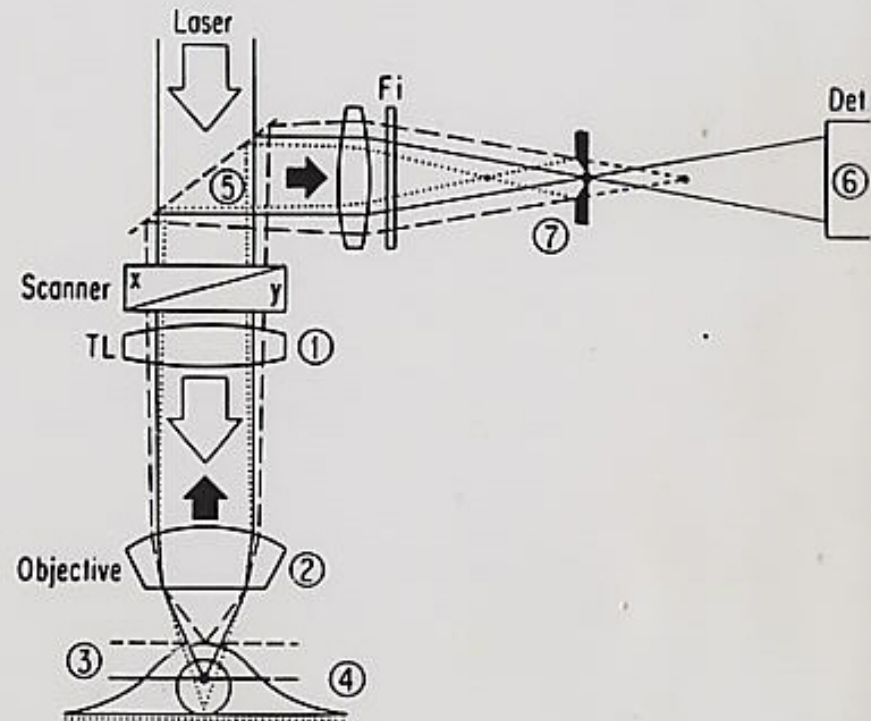
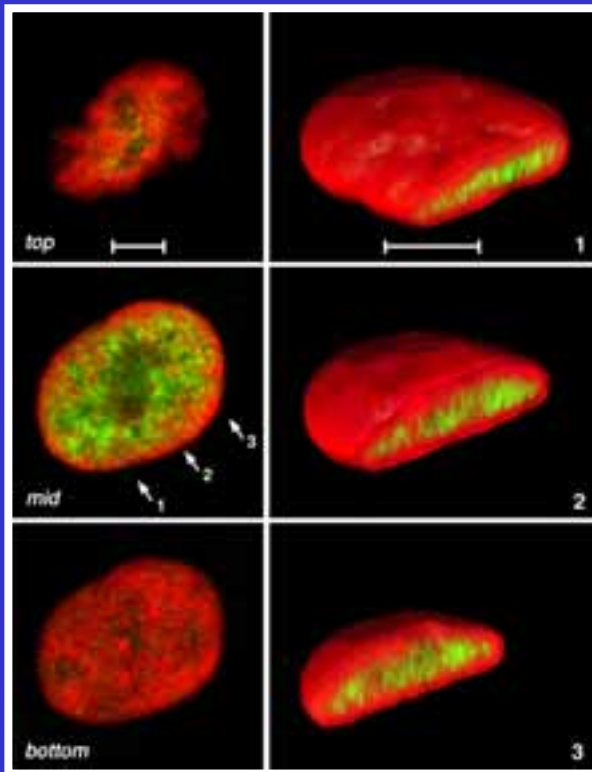
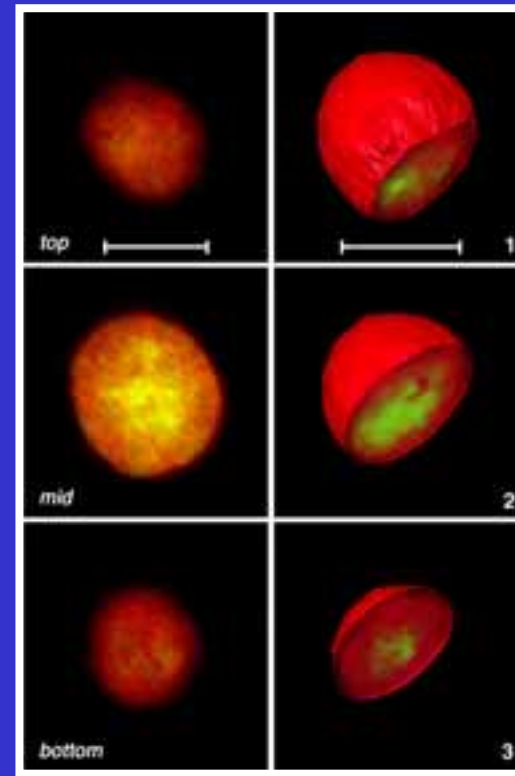


FIGURE 5. Depth discrimination in a laser-scanning confocal fluorescent microscope. Compare with Fig. 2. (Courtesy of Dr. H. Kapitza, Carl Zeiss, Oberkochen.)

Beispiel: Dreidimensionale konfokal mikroskopische Darstellung Gen-reicher (grün) und Gen-ärmer (rot) Regionen im menschlichen Zellkern



Normale Fibroblasten



Normale Lymphozyten

Wege zu einer weiteren Verbesserung der lichtoptischen Auflösung: Frühe Spekulationen zur 4Pi-Mikroskopie: Grundidee: Je kleiner der Durchmesser des fokussierten Laserstrahls, desto besser die erreichbare Auflösung

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND
DEUTSCHES PATENTAMT

11 05 h, 1/00
G 21 b, 1/00

Deutsche Kl.: 42 h, 38
21 g, 61/00
21 g, 21/21

1
48
6

Offenlegungsschrift 2116521

Altzeichen: P 21 16 521.9
Anmeldetag: 5. April 1971
Offenlegungstag: 12. Oktober 1972

Ausstellungspriorität: —
Unionspriorität: —
Datum: —
Land: —
Altzeichen: —

Bezeichnung: Verfahren zur Darstellung bzw. Modifikation von Objekt-Details, deren Abmessungen außerhalb der sichtbaren Wellenlängen liegen

Zusatz zu: —
Ausscheidung aus: —
Anmelder: Cremer, Christoph, Dipl.-Phys.; Cremer, Thomas; 7802 Merzhausen

Patentansprüche (1971):

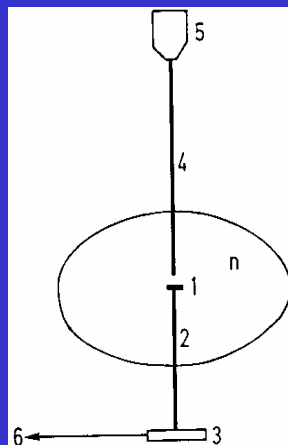
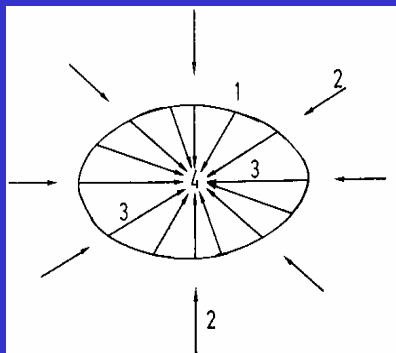
- 1.) Verfahren zur Darstellung bzw. Modifikation von Objekt-
- Details, deren Abmessungen ausserhalb der sichtbaren Well-
- Lenlängen liegen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
- n e t, daß
- a) eine kohärente elektromagnetische Strahlungsquelle
- auf eine Fläche abgebildet wird, deren Abmessungen
- kleiner sind als die Wellenlänge der kohärenten
- Strahlung,
- b) daß mittels der von dieser Fläche ausgehenden Strah-
- lung ein Punkthologramm mit einem grossen Raumwinkel
- hergestellt wird,
- c) und daß das Objektdetail mittels des *von diesem Holo-*
- *gramm. gelieferten Lichtes* punktweise abgetastet und
- *auf einer Bildfläche, beispielsweise auf den, Schirm*
- *einer Fernsehempfängsröhre, dargestellt wird.*
- 2.) Anordnung zur Ausübung des Verfahrens nach Anspruch 1,
- d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hologramme
- der auf diese Weise erzeugten Kugel- bzw. Zylinderwellen in
- einem möglichst grossen Raumwinkel um S aufgenommen werden
- (4π -Punkt Hologramme).

Konfokale Laser Scanning 4Pi-Microscopy: Grundidee

“Konventionell” konfokal
versus 4Pi:

a) Laserfokussierung nur
von einer Seite

b) Laserfokussierung von
allen Seiten
(Raumwinkel “4Pi”)



Erste Überlegungen zum
Prinzip der konfokalen
Laser Scanning
Fluorescence
Mikroskopie mit 4Pi-
Punkthologrammen

C.Cremer & T.Cremer, Microsc. Acta Vol.81, Sept.1978

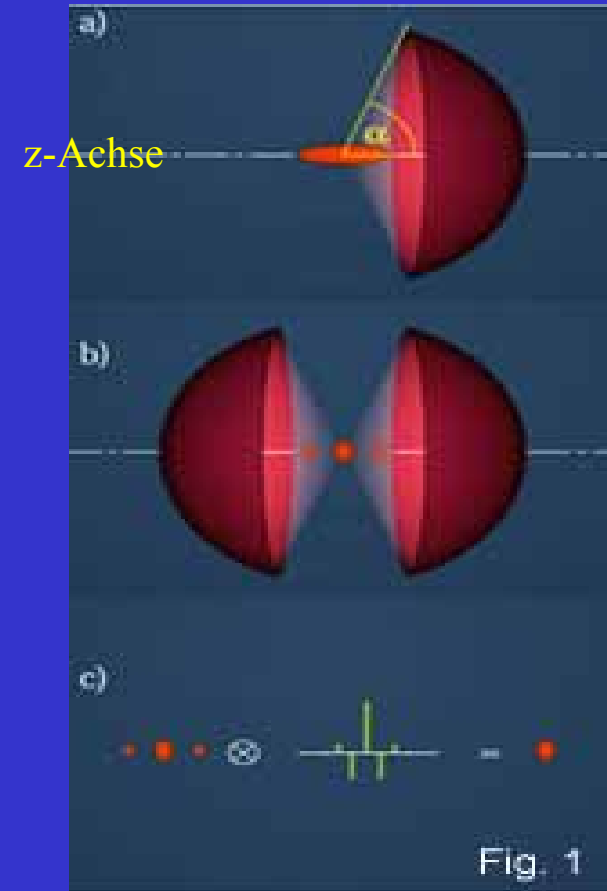
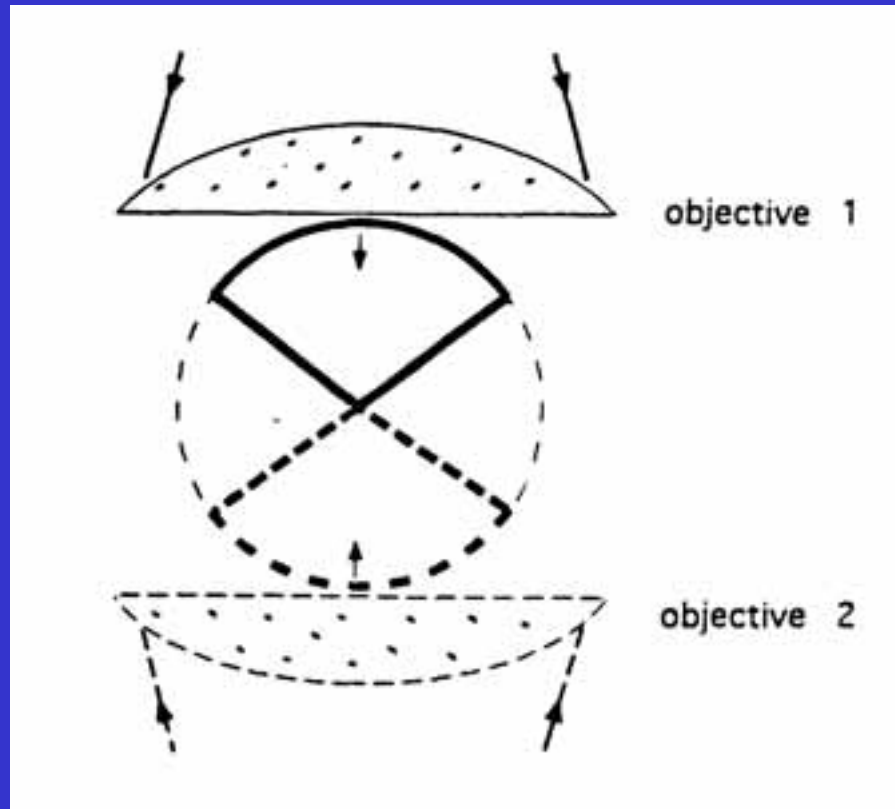


Fig. 1

Stefan Hell, MPI Göttingen (2003)

Erfindungsprinzip der 4Pi-Mikroskopie: Realisierung durch zwei einander gegenüberstehende Hochleistungsobjektive (Stefan Hell)*



Aus:
S. Hell, S.Lindek,
C.Cremer, E. Stelzer
Appl. Phys. Lett. 64:
1335-1337 (1994)

*S. Hell & E. Stelzer 1992

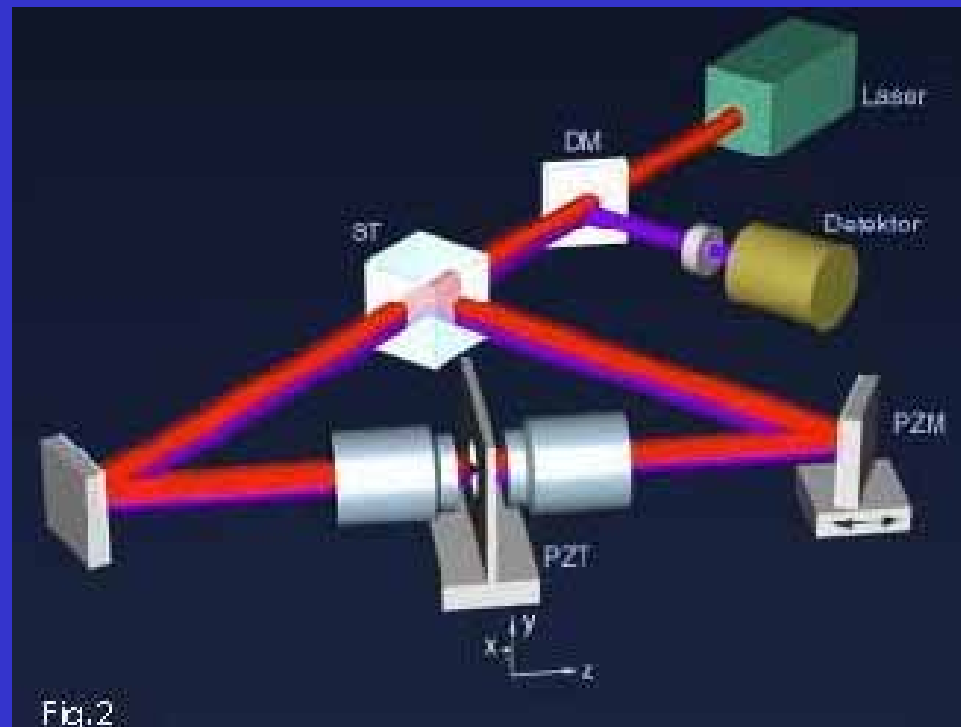
Technische Realisierung eines (konfokalen) 4Pi-Mikroskops I: Laboraufbau

(Prof. S. Hell, MPI Göttingen)

Lichtwege:

Anregung (rot)

Emission (blau)



Entwicklung und Fertigung: Leica Microsystems (Mannheim), seit Ende 2004 lieferbar

Das Leica 4Pi-Mikroskop@KIP

(Lieferung & Installation April 2005)



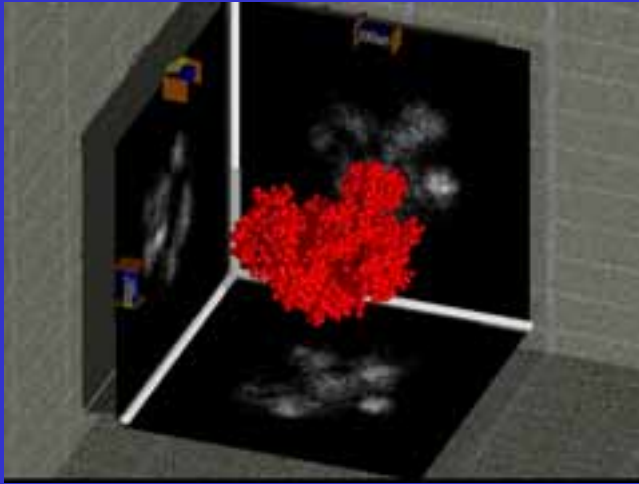
- **Eigenschaften:** Sehr kompakt; Möglichkeit zur Vielfarbenanregung;
- genau abgestimmte Paare von Hochpräzisionsobjektiven; Möglichkeit zur Objektrasterung; elektronisch auswählbare Anregungswellenlängen;
- Bildauswertungsprogramme; Möglichkeiten für den Anschluß verschiedener Zusatzgeräte, z.B. für Mobilitätsmessungen

Mit dem 4Pi-Mikroskop sind vielfältige Anwendungen geplant. Beispiele sind zelluläre Nanostrukturen in der

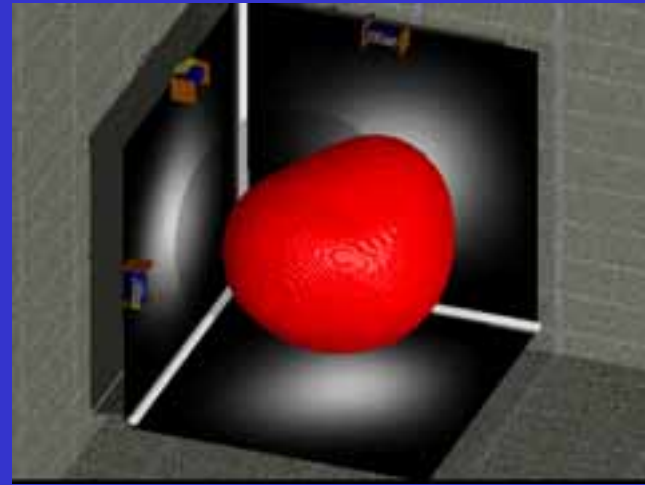
- Zellbiologie (hierzu Näheres von Prof.Holstein);
- Genomstrukturforschung (z.B. zur Frage der strukturgesteuerten Feinregulation der 2 x30,000 Gene im menschlichen Zellkern);
- Pathologie des Zellkerns in der Krebsforschung (z.B. zur Diagnostik von tumorrelevanten Genominstabilitäten);
- Augenheilkunde;
- Kardiologie (Proteinkomplexe des Zellkerns).

Anwendungspotential der 4Pi-Mikroskopie in der Erforschung der Nanostruktur des Genoms*

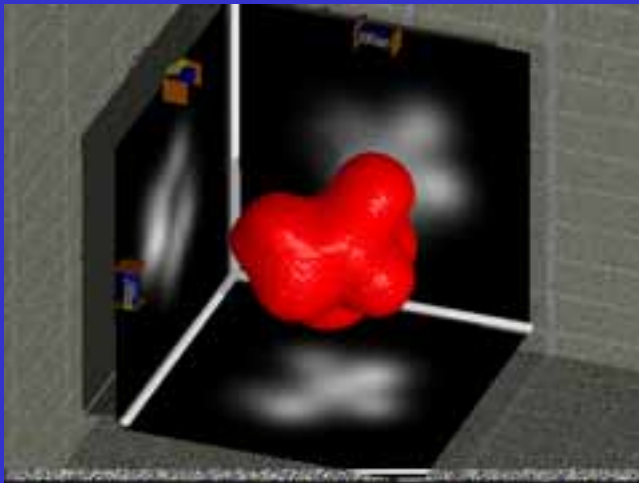
Original Struktur



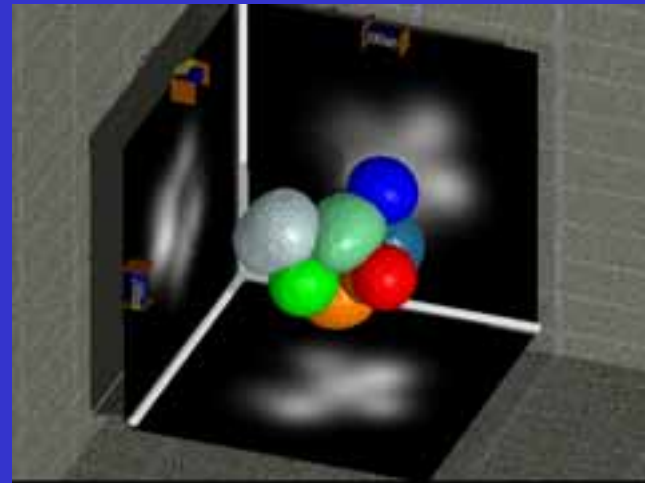
Beste „konventionelle“ Auflösung



4Pi-Monospektral



4Pi-Multispektral



*Virtuelle 4Pi-Mikroskopie

Michael Hausmann

Senthilkumar Pazahanisamy

Constance Grossmann

Johann von Hase

Christian Carl

Andreas Schweitzer

Claudia Batram

Hans Mathée

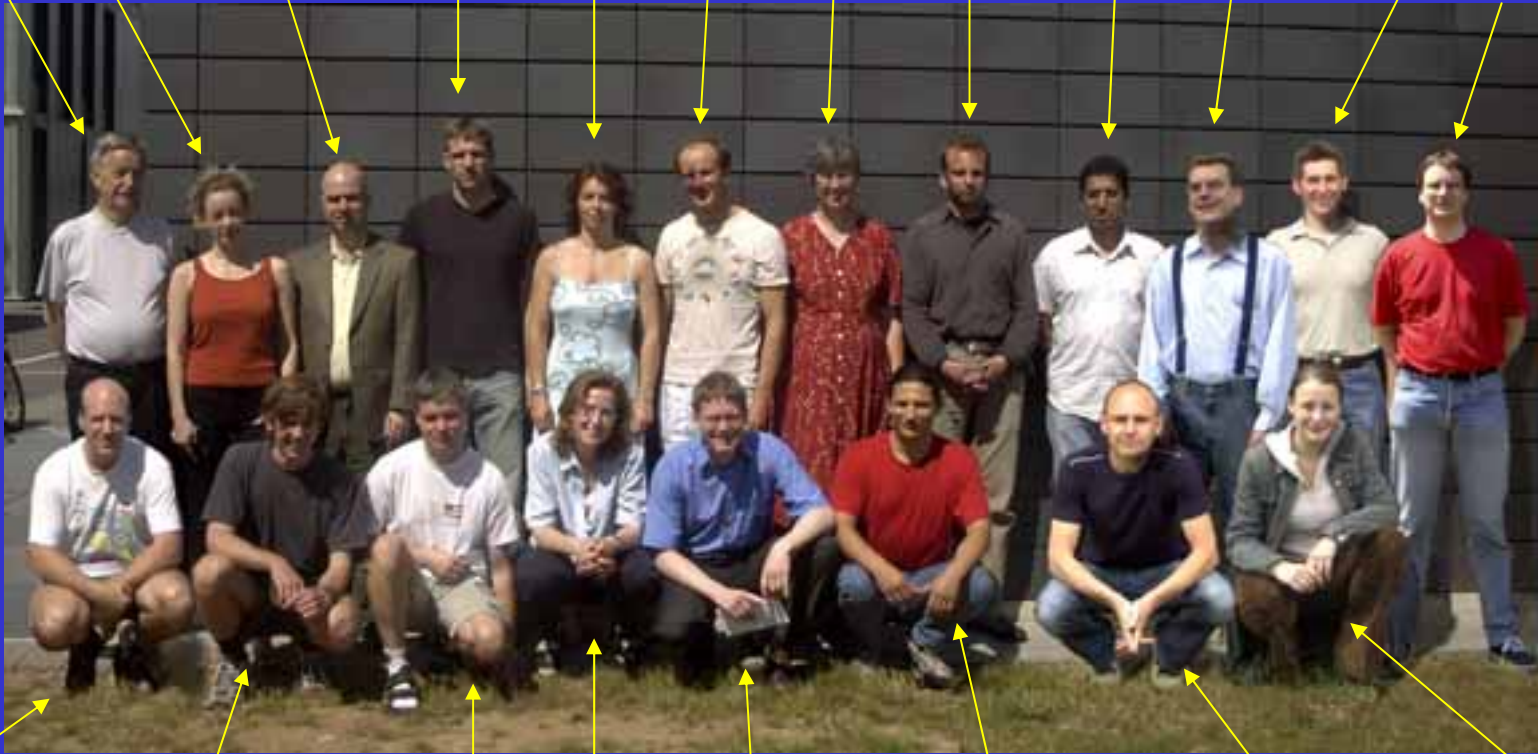
Margund Bach

Werner Stadter

Heinz Eipel

Stefan Stein

Nick Kepper



Udo Spöri

Gregor Kreth

Helmut Schneider

Susanne Fenz

David Baddeley

Jutta Finsterle

Jürgen Reymann

Christian Wagner

C.Cremer Lab, KIP Universität Heidelberg (Juli 2004)

Roman Amberger
Florian Staier