

Christoph Cremer



# Christoph Cremer

Christoph Cremer, 1944 in Freiburg geboren, studierte Physik an der LMU München, gefördert durch die Studienstiftung, wo er 1970 sein Diplom ablegte. Er promovierte 1976 in Freiburg in Genetik und Biophysik. 1980–1983 war er als Postdoc am Lawrence Livermore National Laboratory (University of California). Er habilitierte 1983 zum Dr. med. habil. in Allgemeiner Humangenetik und Experimenteller Cytogenetik an der Freiburger Medizinischen Fakultät. Im gleichen Jahr erhielt Cremer eine Professur für Angewandte Optik an der Universität Heidelberg, die 2004 in eine ordentliche Professur mündete und die er bis zu seiner Pensionierung im Jahr 2011 innehatte. Seitdem setzt er seine Forschung fort am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) und am Interdisziplinären Zentrum für wissenschaftliches Rechnen (IWR) der Universität Heidelberg, sowie – als Honorarprofessor der Universität Mainz – am dortigen Institut für Molekulare Biologie (IMB). Seit 2004 ist Christoph Cremer zudem Adjunct Professor am Physikdepartment der Universität Maine, USA, und (bis 2014) wissenschaftliches Mitglied des dortigen Jackson Laboratory.

Sein Hauptforschungsthema ist die Biophysik des Zellkerns. Mit diesem Ziel wurden vielbeachtete laseroptische Verfahren für die dreidimensionale Analyse von Nanostrukturen des Genoms entwickelt, die weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen. Sie machen es möglich, die "Topographie" einzelner Zellen und Zellkerne auf der Ebene einzelner Moleküle zu untersuchen. – 2009 wurde Cremer für seine Entwicklung des schnellsten Lichtmikroskops für die dreidimensionale Analyse von der Wirtschaftsinitiative Baden-Württemberg mit dem Preis für die "Beste Business Idee" ausgezeichnet. – 2006–2009 war Cremer Zweiter Sprecher des Senats der Universität Heidelberg. Er ist Herausgeber

*Christoph Cremer*

des 2008 erschienenen Buches "Vom Menschen zum Kristall –  
Konzepte der Lebenswissenschaften von 1800–2000".

*Christoph Cremer*

## **Mit Laserlicht ins Innerste des Zellkerns**

### **Zusammenfassung**

Lebende Organismen bilden einen Kosmos von extrem komplexen Nanostrukturen. Bis vor kurzem wurde jedoch die lichtmikroskopische Erforschung dieser Strukturen durch die konventionelle Auflösung von etwa 200 nm in der Objektebene und 600 nm entlang der optischen Achse ("Abbe/Rayleigh-Grenze") ganz wesentlich eingeschränkt. Eine darüber hinaus gehende substantielle Verbesserung der Auflösung schien aufgrund der fundamentalen Gesetze der Wellenoptik physikalisch ausgeschlossen. In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch diese Grenze durch verschiedene "superauflösende" Fluoreszenzmikroskopie (SRM) Methoden überwunden, wie z.B. die 4Pi-Mikroskopie; die Stimulierte Emissions Depletions (STED) Mikroskopie; die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM); oder die Verfahren der Lokalisationsmikroskopie. Zu diesen Entwicklungen und ihren biophysikalischen Anwendungen zur Analyse zellulärer Nanostrukturen haben zahlreiche Mitglieder/Associates des von mir von 1983–2009 geleiteten Forschungsbereiches "Angewandte Optik und Informationsverarbeitung" des Instituts für Angewandte Physik 1 (später Kirchhoff Institut für Physik) beigetragen. Gegenwärtig erlauben diese superaflösenden Verfahren uns eine optische Auflösung bis hinunter zu etwa 5 nm, oder ca. 1/100 der zur Fluoreszenzanregung verwendeten Wellenlänge; sie machen es möglich, die "Topographie" einzelner Zellen und Zellkerne auf der Ebene einzelner Moleküle zu untersuchen.

## Wissenschaftliche Fragestellungen

Damit komme ich zum Fokus meiner Forschungstätigkeit: Optische und chemische Methoden haben uns zur Einsicht gebracht, dass lebende Organismen einen Kosmos von extrem komplexen Nanostrukturen bilden. Eines der faszinierendsten Themen der heutigen Wissenschaft ist die Emergenz solch komplexer Systeme aus den fundamentalen Gesetzen der Natur. Jahrtausendlang schien dieses Problem dem menschlichen Geist völlig unzugänglich zu sein.

Dies änderte sich jedoch durch die mit der Mikroskopie möglich gewordenen Entdeckung der Zelle als der Elementareinheit alles Lebendigen. Bereits im 19. Jahrhundert war bekannt, dass die in den Mikroskopiebildern von Zellen sichtbare kleinere Einheit, der Zellkern, den Ort der Erbinformation darstellt. Im Jahre 1940 machte hierzu Erwin Schrödinger einen Vorschlag, der ganz wesentlich dazu beitrug, die bislang unüberwindbar scheinende Kluft zwischen Physik und Leben zu schließen. Die in seinem Buch "What is Life" vorgetragene These war, dass die Träger der Erbinformation, die Chromosomen, "aperiodische feste Körper" sind. Die Aufklärung der atomaren Struktur der DNA durch Watson und Crick bestätigte einige Jahre später diese kühne Hypothese: Die Erbinformation in den Chromosomen ist tatsächlich aperiodischen festen Körpern vergleichbar: Die chromosomale DNA ist eine lineare Kette mit fest verbundenem Phosphat-Zucker Rückgrat ("fester Körper") und einer mit diesem Rückgrat verbundenen aperiodischen Abfolge von Basen (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin und ihre Derivate).

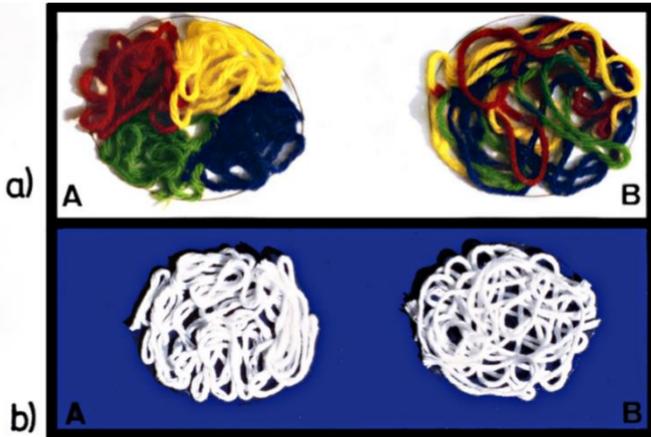
Auf der Grundlage der konventionellen Lichtmikroskopie sowie der Elektronenmikroskopie schien der Zellkern viele Jahrzehnte lang einfach ein Behälter für DNA und Proteine sein. Die Konsequenz aus der angenommenen fehlenden Struktur war der auch heute noch vielverbreitete Glaube, dass die immens komplexe Regelung der Aktivität der rund  $2 \times 20,000$  Proteinkodierenden Gene ausschließlich über biochemische Mechanismen erfolgt, wie sie in Barrierefreien wässrigen Lösungen ablaufen.

Diese Vorstellung des Zellkerns als "Reagenzglas" schien für zahlreiche Chemiker und Biochemiker recht einleuchtend zu sein: Sie waren es gewohnt, dass viele hoch komplexe Reaktionen tatsächlich in dieser Weise in flüssigen oder gasförmigen Phasen ablaufen können, ohne weitere räumliche Ordnungszustände zu benötigen. Forscher mit einer medizinischen Ausbildung taten sich da schwerer: In ihrer Erfahrung benötigten die im Körper ablaufenden molekularen Prozesse vielfältige anatomische, also strukturelle Randbedingungen, auch auf mikroskopischer Ebene. Zu diesen gehörte auch mein Bruder Thomas Cremer, der zur Zeit meiner Diplomarbeit (1968–1970) Medizin studierte (1995–2010 Inhaber des Lehrstuhls für Anthropologie und Humangenetik der Universität München). Beide waren wir begeistert von den uns grenzenlos erscheinenden Möglichkeiten der damals sich gerade entwickelnden Laseroptik und ihrer Anwendungen zur Erforschung von Strukturen des Lebendigen, allem voran des Zellkerns. Ein besonders hervorstechendes Problem schien uns: Wie sind die jeweils aus Milliarden von Atomen bestehenden Riesenmoleküle der Erbinformation im Kern der Zellen angeordnet? Schließlich ist die chromosomale DNA in jeder menschlichen Zelle insgesamt rund 2 Meter lang, während der typische Durchmesser des Zellkerns nur etwa 10  $\mu\text{m}$  beträgt. Als Ergebnis dieser Diskussionen formulierten wir in einem Forschungsantrag im Jahre 1969 einige hoch spekulative Fragen zu diesem Thema:

- Gibt es im (Säuger) Zellkern eine räumliche Ordnung der Chromosomen?
- Gibt es Möglichkeiten, eine solche Ordnung (falls existent) mit laseroptischen Verfahren zu erkennen?

Eine erste sich uns aufdrängende fundamentale Frage war: Ist das Erbmaterial im Zellkern in einzelnen, unterscheidbaren Chromosomenterritorien angeordnet (in Abb. 1aA oben links durch verschiedenfarbige Wollknäuel veranschaulicht); oder ist die Organisation der Chromosomen "nicht-territorial" und eher einem Haufen vermischter Spaghettis vergleichbar, wie in Abb. 1aB oben

rechts angedeutet? Könnte man die einzelnen Chromosomen spezifisch anfärben, so wäre dieses Problem leicht lösbar.



**Abb. 1.** Zwei grundsätzliche Möglichkeiten der Organisation des Zellkerns.

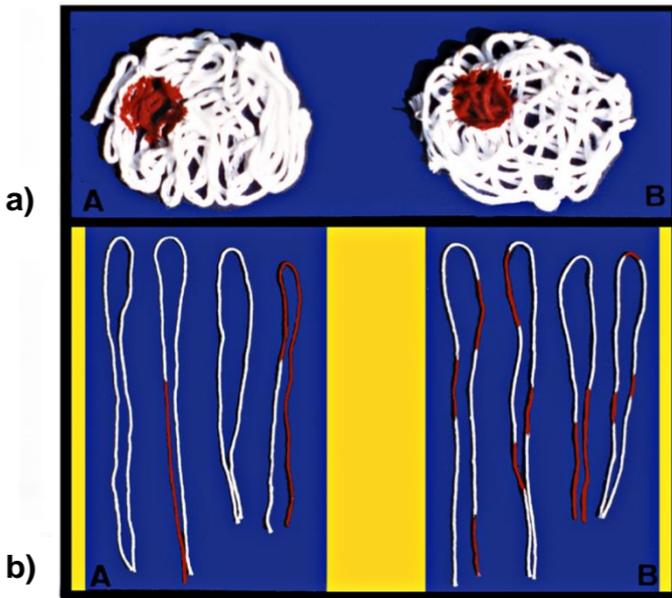
*aA) Die einzelnen Chromosomen einer Zelle bilden distinkte "Territorien", d.h. ihr einhüllendes Volumen  $V_C$  ist wesentlich kleiner als das Gesamtkernvolumen  $V_K$ ; die einhüllenden Volumina  $V_C$  überlappen sich nur geringfügig.*

*aB) Die Organisation der Chromosomen ist "nicht-territorial", d.h. die DNA-Protein Fäden der einzelnen Chromosomen durchziehen jeweils den ganzen oder einen großen Teil des Zellkerns und sind eher einem Haufen "vermischter Spaghettis" vergleichbar. Aus T. Cremer et al. 1982.-bA/B) Bei homogener Färbung der gesamten DNA des Zellkerns ist eine Unterscheidung zwischen territorialer und nicht-territorialer Organisation nicht möglich.*

Heute ist dies mithilfe neuartiger molekularzytogenetischer Methoden ("Chromosome Painting") tatsächlich möglich. Diese wurden jedoch erst gegen Ende der 1980iger Jahre entwickelt. Bis dahin gab es nur Färbemethoden, um die gesamte DNA des

Zellkerns einfarbig zu markieren (schematisch in Abb. 1bA,B) dargestellt, womit eine Entscheidung zwischen "territorialer" und "NICHT-territorialer" Organisation nicht möglich war.

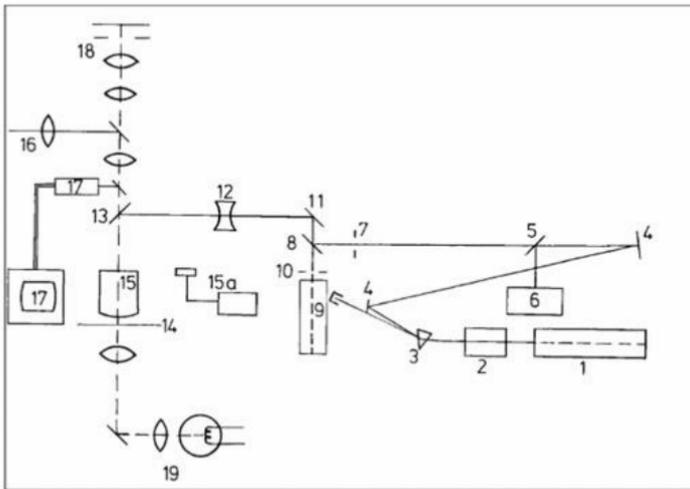
Unsere 1969 vorgebrachte Idee war es nun, einen kleinen Teil der Chromosomen im Kern lebender Zellen laseroptisch zu markieren (Abb. 2aA/B).



**Abb. 2.** Grundidee der laseroptischen Analyse der Zellkernstruktur. *aA/B:* Zellen mit Markierung eines kleinen Teils der Zellkern DNA durch Laser Mikrobestrahlung; (*aA*) Kern mit territorialer, (*aB*) mit nicht-territorialer Chromosomenstruktur.

*bA/B:* Verteilung der Markierung (rot) auf den Chromosomen in der folgenden Zell-Teilungsphase. *bA):* Im Falle einer territorialen Chromosomenstruktur sind nur wenige Mitosechromosomen markiert; *bB)* Im Falle einer nicht-territorialen Chromosomenstruktur sind viele Mitosechromosomen markiert. Aus T. Cremer et al. 1982.

In der nächstfolgenden Teilungsphase (Mitose) sollten die einzelnen Chromosomen als lange Fäden sichtbar werden. Im Falle einer territorialen Organisation sollten nur wenige Chromosomen markiert sein (Abb. 2bA); im Falle einer nicht-territorialen sollten dagegen viele Chromosomen eine Markierung tragen (Abb. 2bB).



**Abb. 3.** Fokussierung eines Laserstrahls mit 257 nm Anregungswellenlänge

Kohärentes Licht der Wellenlänge 514.5 nm eines Dauerstrich Argon Lasers (1) wird mithilfe eines Ammonium Dihydrogenphosphatkristalls (2) frequenzverdoppelt, aufgeweitet (12) und über einen dichroitischen Teilerspiegel (13) durch ein Quarzobjektiv hoher numerischer Apertur (15) in die Objektebene (14) fokussiert. Aus Cremer et al., 1974.

Um diese Idee zu realisieren, bauten wir eine Laser-UV-Mikrobestrahlungsapparatur für kohärentes Licht der Wellenlänge 257 nm, also im Absorptionsmaximum der DNA (Abb. 3).

In diesem als Teil meiner biophysikalischen Doktorarbeit (1976) konstruierten Laser-UV-Mikrobestrahlungssystem wurde die frequenzverdoppelte 514 nm Linie eines Dauerstrich Argon Ionen

Lasers mithilfe eines Quarz-Objektivs hoher numerischer Apertur beugungsbegrenzt in der Objektebene fokussiert. Vor vier Jahrzehnten war dies eine völlig neuartige Angelegenheit, bei der eine Reihe technischer Schwierigkeiten zu überwinden waren. Zum Beispiel musste der gesamte Strahlengang des 257 nm Laserlichts mit entsprechend UV kompatiblen optischen Elementen durchgeführt werden. In Bezug auf Objektive und Linsen konnten diese bei Zeiss gefunden werden. Der dichroitische Teilerspiegel hingegen, der das UV Licht maximal reflektieren, die vom Laserstrahl angeregte Fluoreszenz dagegen für die Beobachtung maximal transmittieren sollte, war nirgends aufzutreiben. Schließlich wurde er uns von der Firma Balzers eigens berechnet, hergestellt und kostenlos zur Verfügung gestellt. Dieses Entgegenkommen verdanken wir den guten Beziehungen der Physikochemikerin Prof. Erika Cremer aus Innsbruck, die uns bei der Lösung dieses schwierigen Problems unterstützte.

Der so fokussierte UV-Laserstrahl erzeugte in der Objektebene einen kleinen fluoreszierenden "Spot" mit einem Durchmesser von etwa 390 nm. Dies war klein genug, um die DNA in einem sehr geringen Teil eines Zellkerns verändern zu können.

Mit diesem Laser-UV-Mikrobestrahlungssystem für 257 nm gingen wir nun ans Werk, unterstützt dabei insbesondere von einem weiteren "physikalischen Leidensgenossen", Christian Zorn (Promotion 1978). Eine wesentliche weitere Hilfe wurde uns bei der Vorbereitung der biologischen Experimente von unserem Veterinärmedizinischen Assistenten Jürgen Zimmer zuteil (später Mitglied des Personalrats der Universität Freiburg sowie des dortigen Universitätsrats). In vielen tausend Zellen wurde ein kleiner Teil des Kerns bestrahlt und so an diesen Stellen eine Modifikation der DNA erzielt (Induktion von Pyrimidin Dimeren); diese Änderungen wurde in der nächsten Zellteilung (Mitose) als Ergebnis von Reparaturvorgängen mithilfe radioaktiver (später nicht radioaktiver) Verfahren sichtbar gemacht. Die Ausbeute war allerdings extrem gering: Nur wenige Zellen überlebten diesen "Beschuss mit schwerer Artillerie". In einigen Fällen jedoch war das Verfahren

erfolgreich, und es gelang, die Chromosomen so bestrahlter Zellen in der nächsten Teilungsphase zu untersuchen (Zorn et al. 1976, 1979; C. Cremer et al. 1980; T. Cremer et al. 1982; T. Cremer & C. Cremer 2006a). Nur wenige Chromosomen zeigten UV-induzierte Markierungen. Dies bedeutete: Das Erbmaterial in lebenden Säugerzellen ist in "Chromosomenterritorien" organisiert. Die Struktur des Zellkerns ist also wesentlich komplexer als bislang angenommen. Das Erstaunen nicht nur vieler Biologen, sondern auch zahlreicher Polymerphysiker war (und ist heute noch) groß: Schließlich sollten flexible langkettige Polymere im thermischen Gleichgewicht sich weitgehend entsprechend dem "Spaghetti-Modell" (Abb. 1aB) verhalten. Die gegenteilige experimentelle Beobachtung zeigte, dass Chromosomen über reine Polymerketten hinausgehende thermodynamische Eigenschaften haben müssen. Heute weiß man, dass mit der DNA interagierende "Histon" Proteine nicht einfach eine Art "Verpackungsmaterial" darstellen, sondern vielfältige strukturbildende Wechselwirkungen verursachen, die für die außerordentlich verwickelte Regulation der Aktivität der vielen tausend Gene von größter Bedeutung sind (T. Cremer et al. 2015).

Die Organisation der Erbinformation im Kern von Säugerzellen in distinkten Chromosomenterritorien war eine wesentliche neue Erkenntnis und Ausgangspunkt einer neuen Forschungsrichtung, die heute in Hunderten von Arbeitsgruppen verfolgt wird.

Bevor ich das Thema der Zellkernstruktur fortsetze, hier ein kurzer Hinweis auf eine weitere Anwendung des Freiburger Laser-UV-Mikrobestrahlungssystems in der Embryonalentwicklung von Insekten. Diese Untersuchungen mit einer damals jungen Kollegin aus dem Freiburger Zoologischen Institut, Christiane Nüsslein-Volhard, waren Thema mehrerer gemeinsamer Publikationen (z.B. Nüsslein-Volhard et al. 1980), u.a. auch in der angesehenen Zeitschrift "Developmental Biology". Auf diese Publikation (Lohs-Schardin et al. 1979) wurde auch in der ein Jahr später erschienenen Arbeit von Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus in "Nature" hingewiesen, wo sie als erste zitiert wurde. Diese "Nature"

Arbeit von Nüsslein-Volhard und Wieschaus fand große Beachtung, und 15 Jahre später wurden die beiden dafür mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Nach dieser Seitenbemerkung über weitere Anwendungen von Laser-UV-Mikrobestrahlung möchte ich wieder zum Hauptthema zurückkehren, der laseroptischen Strukturanalyse des Zellkerns. Die genannten Mikrobestrahlungsexperimente hatten es erlaubt, die grundsätzliche Organisation des Erbmaterials im Zellkern von Säugerzellen in Chromosomenterritorien nachzuweisen; sie erlaubten aber nicht, weitere Einzelheiten der Struktur zu erkennen. Dies wurde möglich unter Einsatz von "chromosomenspezifischen DNA Bibliotheken". Die Etablierung solcher DNA Bibliotheken durch laseraktivierte Chromosomensortierung war ein Hauptthema meiner PostDoc Zeit am Lawrence Livermore National Laboratory gewesen (Cremer et al. 1984). Meinem Bruder Thomas gelang es einige Jahre später zusammen mit seinem damaligen "Juniorkollegen" Peter Lichter (seit 2000 Professor für Molekulare Humangenetik an der Universität Heidelberg, 2005–2011 Mitglied des Wissenschaftsrats, sowie 2003 Wissenschaftlicher Stiftungsvorstand des Deutschen Krebsforschungszentrums/DKFZ), während eines Gastaufenthaltes an der Yale University mit derartigen Bibliotheken spezifische Chromosomen und ihre Unterstrukturen direkt im Zellkern sichtbar zu machen (Lichter et al. 1988). Diese später "Chromosomen Painting" genannte Methode wird heute in tausenden von biomedizinischen Laboratorien eingesetzt, insbesondere für die Diagnostik von Chromosomenveränderungen in der Humangenetik, nach ionisierender Strahlung und in Krebszellen.

## **Ein Konzept für die lasergestützte dreidimensionale Fluoreszenzmikroskopie**

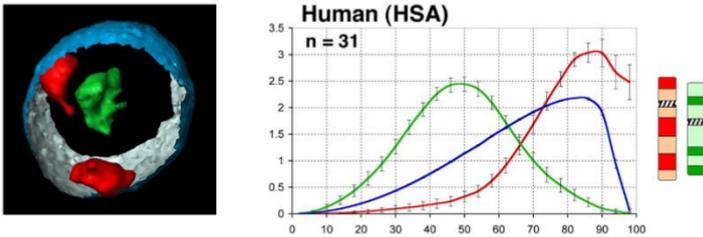
Für die Analyse der Zellkernstruktur gab es jedoch ein wesentliches Problem: Konventionelle Mikroskopaufnahmen sind zweidimensional, die Zelle aber ist dreidimensional. Um dieses Problem zu lösen, schlugen wir im Jahre 1978 die Entwicklung eines hochauflösenden dreidimensionalen (3D) Lichtmikroskops auf laseroptischer Grundlage vor (C. Cremer & T. Cremer 1978). Die Grundidee war es, mit Hilfe eines fokussierten Laser-Mikrostrahls das Objekt "punktweise" in drei Dimensionen abzuscannen und die "punktweise" induzierte Fluoreszenzemission jeweils mit einem empfindlichen Detektor (damals ein Photomultiplier) zu registrieren. Um Fluoreszenzlicht von Molekülen oberhalb und unterhalb der jeweiligen Objektebene zu eliminieren, war eine kleine Blende ("Pinhole") vor dem Detektor vorgesehen. Mittels geeigneter Elektronik sollten wie beim Fernsehen alle Bildpunkte zu einem 3D Bild zusammengesetzt werden. Ganz neu war die Grundidee nicht, fokussiertes Laserlicht in dieser Weise einzusetzen; aufgrund unserer Erfahrung mit dem Bau und der Anwendung eines beugungsbegrenzt fokussierenden Laser-UV-Mikrobestrahlungssystem mit kontinuierlicher kohärenter Strahlung enthielt unsere in einer mikroskopischen Fachzeitschrift publizierte Arbeit (Cremer & Cremer 1978) jedoch eine Reihe technischer Einzelheiten zu ihrer Realisierung.

Heute ist diese Methode unter dem Namen "Konfokale Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie" weltweit verbreitet und eine der wichtigsten Verfahren der optischen Analyse in der biomedizinischen Forschung geworden. Natürlich hat es mich sehr gefreut, dass unser Beitrag zu dieser Entwicklung vor drei Jahren anlässlich der Verleihung des Nobelpreises an Eric Betzig, Stefan Hell und William Moerner in hervorgehobener Weise gewürdigt worden ist (Ehrenberg 2014). Weiterentwicklungen der konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie erlauben es heute, auch ohne Stimulated Emission Depletion oder andere Methoden der

optischen Isolation (s.u.) eine Auflösung weit jenseits des "Abbe/Rayleigh" Limits zu realisieren.

Einen ganz wesentlichen Anteil an der praktischen Realisierung und kommerziellen Umsetzung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie hatten meine Kollegen Josef Bille und Siegfried Hunklinger (Institut für Angewandte Physik I/II, heute Kirchhoff-Institut für Physik): Die von ihnen 1984 gegründete Firma "Heidelberg Instruments" ist immer noch international tätig in der Entwicklung und Produktion von komplexen Laser-gestützten Lithographie Verfahren. Der Geschäftszweig Konfokalmikroskopie wurde 1989 ausgegliedert und ist heute unter dem Namen "Leica Microsystems" international auf diesem Gebiet der Hochleistungsoptik führend. Auf wissenschaftlichem Gebiet gab es damals eine enge Kooperation mit der Gruppe von Dr. Roel Wijnandts van Resandt am EMBL, einem der Mitgründer von Heidelberg Instruments. In Zusammenarbeit mit Ernst Stelzer in dieser Gruppe (Promotion 1987 bei Prof. Josef Bille, Institut für Angewandte Physik I; seit 2011 Inhaber des Lehrstuhls für Physikalische Biologie der Universität Frankfurt) konnten wir mit dem dort entwickelten konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop (Stelzer et al. 1989) erste Untersuchungen zur dreidimensionalen Verteilung von spezifisch Fluoreszenzmarkierten Chromosomenterritorien in menschlichen Zellen durchführen (Popp et al. 1990). Damit begann ein Jahrzehnt fruchtbarer laser-optischer und biophysikalischer Zusammenarbeit mit Ernst Stelzer (s.u.).

Als Beispiel zeigt Abb. 4 links ein dreidimensionales Bild eines menschlichen Zellkerns, aufgenommen mit einem aus den Aktivitäten von Heidelberg Instruments hervorgegangenen konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop (Leica NT). Zu sehen sind in Rot die beiden durch Chromosomen-Painting markierten Gen-armen Chromosomen #18 und in Grün die beiden Gen-reichen Chromosomen #19 (Cremer & Cremer 2001). Während die Gen-armen #18 (Rot) sich am Rand des Zellkerns befinden, liegen die beiden Gen-reichen # 19 (Grün) im Inneren des Kerns.



**Abb. 4.** Quantitative 3D Analyse der Chromosomenverteilung in Kernen menschlicher Zellen (Lymphozyten).

*Links: Eine mithilfe von konfokaler Laserscanning Fluoreszenzmikroskopie gewonnene Darstellung der dreidimensionalen Anordnung der Chromosomenterritorien des Gen-armen Chromosoms #18 (rot) und des Gen-reichen Chromosoms #19 (grün) in einer menschlichen Lymphozytenzelle (Bestandteil des Blutes).*

*Rechts: Quantitative Analyse der räumlichen (3D) Verteilung in insgesamt 31 Zellkernen. Hierfür wurde das Zellkernvolumen auf eine kugelförmige Gestalt normiert; anschließend wurde das Volumen in Schalen eingeteilt und die durch das rote (#18) bzw. grüne (#19) Fluoreszenzsignal gegebene relative DNA Menge von #18 bzw. #19 in dieser Schale bestimmt. Die Ordinate zeigt den normierten DNA Gehalt von #18 (rot) bzw. #19 (grün) als Funktion der Schalenposition (0 Zellkernmittelpunkt, 100 Schale am Zellkernrand). Blau: Gesamt DNA Gehalt in den einzelnen Schalen. Das Auswertungsprogramm wurde von Johann v. Hase (Diplom und Promotion Physik in der Arbeitsgruppe) entwickelt (M. Cremer et al. 2001) und war das erste, das detaillierte quantitative Messungen der räumlichen Chromosomenverteilung in 3D ermöglichte. Aus Cremer & Cremer 2001.*

Die quantitative Analyse der 3D Verteilung der DNA der beiden Chromosomenterritorien in einer Reihe von Zellkernen (Abb. 4 rechts) zeigte, dass diese unterschiedliche räumliche Verteilung ein spezifisches Merkmal dieser Kerne war. Weitere Untersuchungen mit derselben Methode (Tanabe et al. 2001) aber von Zellen von verschiedenen Primaten Spezies ergaben, dass diese unterschied-

liche Anordnung evolutiv mindestens 35 Millionen Jahre alt ist. Es stellte sich sogar heraus, dass die räumliche Verteilung der zu den Chromosomen #18/#19 gehörigen Gene sich in den hier relevanten Zelltypen sogar seit mehr als 300 Millionen Jahren nicht mehr wesentlich geändert hat, also schon bestanden hat, als der Himalaya noch nicht existierte. In späteren numerischen Simulationen konnten wir zeigen, dass solche Verteilungen der Chromosomenterritorien im Zellkern recht gut auf probabilistische Ordnungsprinzipien zurückgeführt werden können (Kreth et al. 2004a). Dies ermöglichte es uns, die chromosomenschädigende Wirkung ionisierender Strahlung in Abhängigkeit von der Dosis mit großer Genauigkeit vorauszusagen (Münkel et al. 1995; Kreth et al. 1998, 2004b, 2007). Mit kombinatorischen "Chromosome Painting" Methoden, konfokaler Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie und aufwändiger 3D Bildverarbeitung gelang es, alle Chromosomenterritorien in einer menschlichen Zelle darzustellen und ihre räumliche Verteilung quantitativ zu analysieren (Bolzer et al. 2005). Damit wurde ein Weg eröffnet, wichtige Fragen zur Bedeutung der Chromosomenterritorien für die funktionelle Organisation des Zellkerns, der Steuerzentrale aller Organismen, anzugehen (T. Cremer et al. 1993, 1995, 2000, 2010; 2012, 2014, 2015, 2016; T. Cremer & C. Cremer 2001, 2003, 2006b; Roquette et al. 2010).

### ***Mikroaxialtomographie***

Die bisher beschriebene Methode der konfokalen Laserscanning Fluoreszenzmikroskopie erlaubte eine laterale (Objektebene) Auflösung von ~ 200 nm; entlang der optischen Achse betrug sie jedoch nur ca. 500 nm. Eine erste sich anbietende einfache Möglichkeit, die 3D Auflösung der Konfokal- aber auch der Weitfeldmikroskopie erheblich zu verbessern, war die Idee der Mikroaxialtomographie. Dieses seit Beginn der 1990iger Jahre in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Verfahren (Bradl et al. 1992; Staier et al. 2011) beruhte auf der geeigneten Drehung des Objekts um eine Achse, wobei bei jeder Drehung ein Bildstapel aufge-

nommen wird; aus den erhaltenen Bilddatensätzen kann dann ein Bild mit einer effektiven, wesentlich verbesserten 3D Auflösung errechnet werden (Heintzmann et al. 2000). Das Verfahren lässt sich im Prinzip auf beliebige Mikroskopiearten übertragen, z.B. Konfokalmikroskopie, aber auch Weitfeldmikroskopie, oder auch zur weiteren Verbesserung der 3D Auflösung in Techniken der "Focused Nanoscopy" (s.u.) nutzen. Dieses aus der Elektronenmikroskopie bekannte Verfahren wurde von uns erstmals mit hochauflösenden Mikroskopiemethoden verbunden und erfolgreich auf die quantitative Analyse von Chromosomenstrukturen von Kernen menschlicher Zellen angewandt (Dietzel et al. 1995). Ein wichtiger Vorteil derartiger axialtomographischer Ansätze zur Superauflösung (im Sinne einer Verbesserung der 3D Auflösung) besteht darin, dass im Gegensatz zu vielen anderen Verfahren (s.u.) die zur verbesserten 3D Auflösung erforderlichen Beleuchtungsintensitäten sehr viel geringer sein können. Dies vereinfacht ganz erheblich multiple Aufnahmen von lebenden Zellen und Zellverbänden (Richter et al. 2017).

### **Ein erstes Konzept zur Überwindung der konventionellen Auflösungsgrenze durch "Focused Nanoscopy"**

In der Verbindung von quantitativer konfokaler Laser Scanning Mikroskopie und den molekularcytogenetischen Verfahren des "Chromosome Painting" gelang es, wichtige Einzelheiten der "Mesostruktur" des Kerns von menschlichen und anderen Zellen aufzuklären. Die sich nun ergebende große Herausforderung war es nun, die Struktur einzelner Gendomänen (organisatorische Untereinheiten von Chromosomenterritorien) zu analysieren. Dies sollte es ermöglichen, fundamentale neue Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen räumlicher Organisation und Genaktivität zu gewinnen. Wie zu erwarten, sind jedoch bei konventioneller Lichtmikroskopie selbst bei bestmöglicher Auflösung keine Einzelheiten solcher Nanostrukturen mehr erkennbar. Der Grund ist allen Physikern wohl bekannt: Die Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie von etwa einer halben Wellenlänge, ent-

sprechend ca. 200 nm bei Verwendung von Licht im blauen Spektralbereich.

In seiner berühmten Abhandlung von 1873 schrieb Ernst Abbe, "dass die Unterscheidungsgrenze [beim Mikroskop] doch niemals über [den Betrag] der halben Wellenlänge des blauen Lichts um ein Nennenswertes hinausgehen wird" (Abbe 1873). Fast die gleiche Grenze wie bei Abbe ergab sich auch in der Fluoreszenzmikroskopie (Rayleigh 1896). Hier kommt es bei Abständen unterhalb einer halben Wellenlänge zu einer nicht mehr auflösbaren Überlappung der einzelnen Beugungsbilder. Diese auf der Wellentheorie des Lichts beruhende Erkenntnis galt rund ein Jahrhundert lang als eine fundamentale Grenze der Naturwissenschaft. Durch Verwendung von Elektronen- und Synchrotronstrahlen mit sehr viel kürzerer Wellenlänge gelang es zwar, außerordentlich wichtige Grundprinzipien der Verpackung der DNA zu klären; aber aus methodischen Gründen mussten entscheidende strukturelle Fragen offen bleiben.

Fundamentale neue Entdeckungen in Physik, Optoelektronik, Informationsverarbeitung, Chemie und Molekularbiologie haben es heute möglich gemacht, die "Abbe'sche Grenze" der lichtoptischen Naturerkenntnis von ca. 200 nm radikal zu überwinden (Übersicht: Hell 2003, 2007, 2009; Cremer 2008, 2012, 2014; Cremer et al. 2010, 2017; Cremer & Masters 2013; Birk 2017).

Auf der Seite von Physik und Technik gehören hierzu insbesondere Laser, hochempfindliche Detektoren, Physik und Chemie der Moleküle, Digitale Bildverarbeitung und leistungsfähige Computer. Heute gibt es eine ganze Reihe von Möglichkeiten, die Auflösungsgrenze zu überwinden, wie z.B. die konfokale 4Pi Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie; die STED (Stimulated Emission Depletion) Mikroskopie; die Lokalisationsmikroskopie; sowie die Structured Illumination Mikroskopie und ihre Variationen. Bei allen diesen Entwicklungen sind Mitglieder/Associates des Forschungsbereiches "Angewandte Optik und Informationsverarbeitung" in der einen oder anderen Weise beteiligt gewesen.

Im Folgenden möchte ich auf einige dieser Entwicklungen kurz eingehen.

### **$4\pi$ (4Pi) Mikroskopie**

Die erste tatsächlich realisierte Methode der Superauflösung durch eine Laserscanningmethode beruhte auf dem Prinzip der  $4\pi$  (4Pi) Mikroskopie.

Die Grundidee der Bildgebung ist dieselbe wie bei der oben beschriebenen konfokalen Laserscanning Mikroskopie: Das Objekt wird punktweise von einem stark fokussierten Laserstrahl abgetastet, und das jeweils erhaltene ortsabhängige Signal wird zur elektronischen Rekonstruktion eines Bildes verwendet. Die Auflösungsverbesserung geschieht hier jedoch durch Abtasten des Objekts mit einem fokussierten Laserstrahl, dessen Fokusedurchmesser kleiner ist als "klassisch" (d.h. nur mit einer Linse) realisierbar, also kleiner als ca. eine halbe Wellenlänge.

Ende der 1960iger Jahre hatten Thomas Cremer und ich die Idee, es sollte möglich sein, einen solchen kleineren Fokusedurchmesser "jenseits des Abbe-Limits" zu erzeugen, indem das Laserlicht aus einem größeren Raumwinkel als bei einer einzelnen Linse fokussiert wird; dies sollte durch spezielle "Punkthologramme" geschehen. Da der größte denkbare Raumwinkel  $4\pi$  ist (das Laserlicht wird aus allen Raumrichtungen konstruktiv interferierend eingestrahlt), verwendeten wir die Bezeichnung " $4\pi$ " zur Charakterisierung. Erste Überlegungen hierzu meldeten wir im Jahre 1971 in einer Schrift " *$4\pi$ -Punkthologramme: Verfahren zur linsenfremen Erzeugung von Kugelwellen*" zum Patent an (C. Cremer & T. Cremer 1972) wobei uns ein Sohn von Arnold Sommerfeld als Anwalt half. Die in dieser Anmeldung enthaltenen Ideen waren gelinde gesagt sehr spekulativ, und einige auch nicht richtig. Dennoch enthielt diese optische "Jugendsünde" einige wesentliche konzeptuelle Ideen, die zur Entwicklung der supraauflösenden Mikroskopie beigetragen haben.

Zur Realisierung einer solchen "superauflösenden" Laser Scanning 4Pi-Mikroskopie stellten wir uns eine konstruktive Inter-

ferenz des durch eine polyedrische Anordnung von ebenen Punkthologrammen gebeugten Laserlichts vor. Dabei wurden wir von einem vieleckigen Polyeder aus Marmor inspiriert, den wir 1972 auf einer Toskana-Fahrt mit dem damaligen bayerischen Kultusminister Prof. Hans Maier fanden, zu dessen Münchner Studienstiftlergruppe ich gehörte. Wie es sich für eine Patentanmeldung gehört, wiesen wir nach der Beschreibung des  $4\pi$ -holographischen Verfahrens der "Superfokussierung von Licht" auf einige uns interessant erscheinende Anwendungen hin. Dazu gehörte die Idee, optische Speicher hoher Dichte zu konstruieren, wobei als Speicherelemente organische Moleküle verwendet werden sollten, die "bei geeigneter Wahl der Anordnung reversible oder irreversible schnelle Umwandlungen zulassen, die durch das elektromagnetische Wechselfeld induziert werden". Ferner sollte es möglich sein, "dass in einem Speicherelement sich mehrere molekulare Umwandlungssysteme befinden, deren Umwandlungen durch elektromagnetische Strahlung unterschiedlicher Frequenz induziert werden", und deren "Umwandlungszeit so gewählt ist, dass bei geeigneter Intensität und Frequenz des umwandelnden elektromagnetischen Feldes eine Umwandlung von einer Form in die andere erfolgt". Angesprochen wurde auch die Möglichkeit, dass auf jedem Objektelement mehrere dieser Umwandlungssysteme untergebracht sind, und dass dies auch ein "Lesen" ermöglicht.

Photoinduzierte reversible oder irreversible schnelle Umschaltungen von organischen Molekülen durch elektromagnetische Strahlung geeigneter Intensität und Frequenz sind heute die Grundlage der 'photoswitching' basierten Lokalisationsmikroskopie (s.u.). In Verbindung mit  $4\pi$  Mikroskopie erlaubt diese heute eine dreidimensionale Auflösung zellulärer Strukturen von 10–20 nm, also 1/60 bis 1/30 der verwendeten Wellenlänge (Huang et al. 2016). Allerdings fehlten in unseren damaligen Überlegungen (1978) noch wesentliche weitere Elemente des Konzepts der Lokalisationsmikroskopie.

In einem Appendix zu der bereits zitierten Publikation zum Design eines konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskops (C. Cremer & T. Cremer 1978) wurde die Idee des  $4\pi$  holographischen superauflösenden Mikroskops wieder aufgegriffen und durch das Konzept der konfokalen Detektion der durch den  $4\pi$ -fokussierten Laserstrahl induzierten Fluoreszenzemission ergänzt. Ein weiterer dort ausgesprochener Gesichtspunkt war die Möglichkeit, ein derartiges superauflösendes Konfokalsystem mit sehr viel größerem Arbeitsabstand zu realisieren als dies mithilfe von hochnumerischen Objektiven in der konventionellen Mikroskopie möglich wäre.

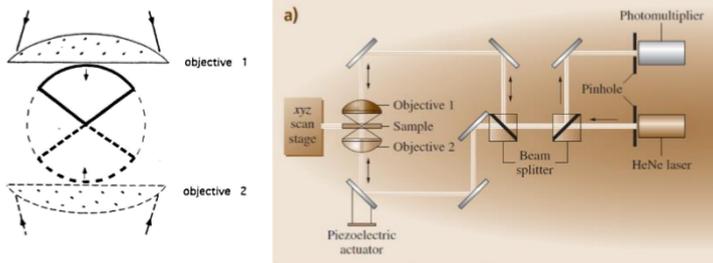
Viele Jahre später ausgeführte, ins einzelne gehende numerische Rechnungen auf der Basis von Skalar- und elektromagnetischer Wellentheorie zeigten, dass die 1978 vorgestellten Grundkonzepte einer erheblichen Auflösungsverbesserung durch fokussierte  $4\pi$  Beleuchtung und die Möglichkeit prinzipiell "beliebig großer" Arbeitsabstände tatsächlich richtig waren: Nach klassischer Theorie der optischen Auflösung (Abbe/Rayleigh) ist der umso schlechter, je größer der Arbeitsabstand ist. Die von uns (Birk et al. 2017a) für große Arbeitsabstände (im Zentimeterbereich) durchgeführten Rechnungen ergaben eine Verbesserung der dreidimensionalen Volumenauflösung um den Faktor  $10^4$  im Vergleich zur konventionellen Abbe/Rayleigh Auflösung bei demselben Arbeitsabstand. Diese Möglichkeit ist auch heute noch aktuell: Sie würde völlig neue Perspektiven für die lichtmikroskopische Analyse von großen Strukturen eröffnen, z.B. in der Hirnforschung. Experimentell realisiert wurden diese Ideen bislang allerdings noch nicht.

Im Jahre 1992 gab es am damaligen Institut für Angewandte Physik einen jungen Wissenschaftler (Stefan Hell), der gerade bei Siegfried Hunklinger (mit Unterstützung durch Josef Bille) mit einer Arbeit zur konfokalen Laserscanningmikroskopie promoviert hatte; er hatte die entscheidende Idee für das erste experimentell realisierte superauflösende Lichtmikroskop auf der Grundlage der allgemeinen Idee einer starken Vergrößerung des Raumwinkels  $\Omega$ .

Allerdings wurden hier die für die "Superfokussierung" des Laserlichts erforderlichen hohen Werte von  $\Omega$  mithilfe konstruktiver Interferenz zweier Laserstrahlen durch zwei gegenüberliegende Objektive hoher numerischer Apertur (also bei einem sehr geringen Arbeitsabstand im 200  $\mu\text{m}$  Bereich) realisiert. Der Raumwinkel für die Fokussierung konnte hierdurch von  $1.3 \pi$  auf  $2.6 \pi$  verdoppelt werden. Dies reichte für eine ganz erhebliche Steigerung der Auflösung in Richtung der optischen Achse.

Stefan Hell verwirklichte seine 4Pi Mikroskopie Idee im EMBL Labor unseres Kooperationspartners Ernst Stelzer (s.o.), zunächst im Rahmen eines meinem Forschungsbereich assoziierten PostDoc Stipendiums der DFG. Diese Arbeiten wurden von meiner Seite aus insbesondere durch gemeinsame Diplomanden befördert. Anschließend ging Stefan Hell mit meiner Unterstützung für einige Jahre an die Universität Turku ans Institut von Prof. Erkki Soini und entwickelte dort seine bahnbrechenden Ideen zur fokussierten Nanoskopie mithilfe von Stimulated Emission Depletion. Er blieb dem Forschungsbereich "Angewandte Optik und Informationsverarbeitung" jedoch bis zu seiner Habilitation (1996) eng verbunden, und die Zusammenarbeit wurde auch darüber hinaus viele Jahre lang weiter fortgesetzt.

Abb. 5 zeigt den optischen Aufbau dieses ersten 4Pi Mikroskops: Der Strahl eines He-Ne Lasers wurde aufgeteilt und durch zwei einander gegenüber liegende hoch numerische Objektive konstruktiv fokussiert. In der Objektebene resultierte hierdurch eine Intensitätsverteilung mit einer axialen Halbwertsbreite des Hauptmaximums weit unterhalb 200 nm. Aufgrund der linearen Anregung traten aufgrund des fehlenden vollen Raumwinkels jedoch erhebliche Nebenmaxima auf, die die durch Dekonvolution erreichbare Auflösung erheblich behinderten. Dieses Problem konnte von Stefan Hell durch Zweiphotonenanregung der Fluoreszenz überwunden werden, wobei er Femtosekundenlaser zur Anregung verwendete (P. E. Hänninen, S. W. Hell, J. Salo, E. Soini, C. Cremer, 1995).



**Abb. 5.** Realisierung eines supraauflösenden 4Pi Mikroskops.

*Links: Schematische Darstellung. Die "4 $\pi$ " Beleuchtung (gestrichelt) wird hier angenähert durch zwei einander gegenüberliegende Objektive hoher numerischer Apertur (aus Hell et al. 1994).*

*Rechts: Optischer Strahlengang des ersten 4Pi-Mikroskop Systems (S. Hell, S. Lindek, C. Cremer, E. H. K. Stelzer 1994), aus Cremer (2012).*

Das Prinzip der konfokalen Zweiphotonen 4Pi Mikroskopie wurde in den folgenden Jahren von Leica Microsystems (s.o.) zu einem kommerziellen Gerät weiter entwickelt. Eines der ersten dieser Zweiphotonen 4Pi Mikroskope wurde mir von der DFG als einem der Beteiligten der ersten Stunde zur Verfügung gestellt. Mit rund 1,1 Millionen Euro Verkaufspreis war es im Jahre 2004 eines der teuersten Lichtmikroskopiesysteme, die bis dahin jemals verkauft worden waren. Mit einer axialen Auflösung von ca. 100 nm bei Femtosekundenanregung ( $\lambda_{exc} \sim 750$  nm) im Zweiphotonenmodus erreichte es eine "Volumenauflösung" (Hell & Stelzer 1992; Lindek et al. 1994, 1996), die um einen Faktor 5–7 besser war als mit konventioneller konfokaler Mikroskopie. Dank dieser erheblichen Steigerung der 3D Auflösung gelang es erstmals, die dreidimensionale Struktur einer wichtigen Untereinheit des Zellkerns lichtmikroskopisch aufzulösen (Lang et al. 2010). Ein weiteres Anwendungsbeispiel war die stark verbesserte Strukturanalyse von Reparaturkomplexen im Zellkern nach Induktion von Chromosomenschäden durch ionisierende Strahlung; dies wurde ermöglicht mit einem Leica 4Pi System, das durch meine

Veranlassung zur gleichen Zeit in einem neugegründeten "Institute of Molecular Biophysics" (University of Maine/Jackson Laboratory, Bar Harbor/ME) installiert und von Joerg Bewersdorf betrieben wurde, der auf diesem Gebiet bei Stefan Hell promoviert hatte. Der University of Maine und dem Jackson Laboratory war ich von 2004 bis 2014 als "Adjunct Senior Staff Scientist" bzw. Adjunct Professor of Physics verbunden gewesen (Gründungsdirektor Prof. Michael Grunze, Phys. Chem. Institut der Universität Heidelberg).

Die oben beschriebene 4Pi Mikroskopie mit zwei Objektivlinsen war der Ausgangspunkt für eine weitere Art der Hochleistungsmikroskopie, die Konfokale Theta-Fluoreszenzmikroskopie (S. Lindek, N. Salmon, C. Cremer, E. H. K. Stelzer, 1994; S. Lindek, C. Cremer, E. H. K. Stelzer, 1996). In dieser von Ernst Stelzer am EMBL mit anfänglicher Unterstützung unserer Arbeitsgruppe entwickelten Methode wird für die Detektion der durch ein erstes Objektiv angeregten Fluoreszenz ein zweites Objektiv eingesetzt, das senkrecht zum Beleuchtungsobjektiv aufgestellt wird. Ursprünglich diente dieses dazu, um die Lösung des Phasenproblems bei der 4Pi Mikroskopie zu erleichtern. In den folgenden Jahren verband Ernst Stelzer diesen Grundgedanken der orthogonalen Detektion mit der Möglichkeit, die laseroptische Anregung der Fluoreszenz mit einem durch eine Zylinderlinse erzeugten dünnen "Lichtblatt" (kleinster Durchmesser im Mikrometerbereich) vorzunehmen, und damit das Objekt abzutasten; diese optische Grundanordnung war ähnlich derjenigen, wie sie von Michael Hausmann (heute Leiter der Experimentellen Biophysik am Kirchhoff Institut) in meiner Arbeitsgruppe Ende der 1980iger Jahre in dem Heidelberger Slit Scan Flußzytometer System realisiert worden war (Cremer et al. 1989). Das von Ernst Stelzer auf der Grundlage von 4Pi- und Thetamikroskopie entwickelte System war die Geburtsstunde einer unter dem Namen "Light Sheet Microscopy" bekannt gewordenen, heute weltweit in der Entwicklungsbiologie angewandten Methode, die es erstmals ermöglichte, große Zellverbände und die Embryonalentwicklung *in vivo* mit großer Zeit- und Ortsauflösung zu verfolgen (Keller et al. 2008).

## **Anfänge der Auflösungsverbesserung durch STED-Mikroskopie**

Die mithilfe der 4Pi Mikroskopie erreichte (axiale) Auflösung betrug ca. 100 nm. Das war ein großer Fortschritt, aber vielfach bei weitem nicht ausreichend. Wie kann man die optische Auflösung darüber hinaus verbessern?

Hierzu hatte Stefan Hell im September 1993 eine geniale Idee: Die Nutzung induzierter Farbänderungen, um zwei nahe beieinander gelegene fluoreszierende Punktlichtquellen voneinander optisch isolieren und damit auflösen zu können. Grundlage für die Verwirklichung war wiederum die Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie mit ihrer punktwisen Abtastung des Objekts, diesmal aber erweitert durch einen zweiten geeignet fokussierten und positionierten Laserstrahl, der die Emission benachbarter Moleküle durch stimulierte Emission so veränderte, dass sie mit geeigneten Filtern von den im Zentrum des Anregungsstrahls befindlichen Molekülen unterschieden und damit "optisch isoliert" werden konnten.

Dieses Konzept publizierte er 1994, zusammen mit Jan Wichmann, einem Doktoranden von Prof. Jürgen Wolfrum am Heidelberger Institut für Physikalische Chemie (Hell & Wichmann 1994). Die experimentelle Realisierung des STED Mikroskopiekonzepts von Stefan Hell wurde von mir nach Kräften unterstützt (Schrader et al. 1995; Hell et al. 1999).

Wie allgemein bekannt, erhielt Stefan Hell für seine grundlegenden Beiträge zur Überwindung der Auflösungsgrenze durch "Focused Nanoscopy" im Jahre 2014 den Nobelpreis für Chemie. Damit ist er nach Theodor Hänsch (Nobelpreis für Physik 2005) das zweite ehemalige Mitglied des früheren Instituts für Angewandte Physik, das diese Auszeichnung im Bereich Optik erhielt.

## **"Super-Resolution" durch Lokalisationsmikroskopie** **Grundprinzip**

Im Folgenden möchte ich auf komplementäre Ansätze zur Superresolution eingehen, die in meinem Forschungsbereich seit Mitte

der 1990iger Jahre unabhängig von den Arbeiten von Stefan Hell erfolgten.

Der Ausgangspunkt war wiederum die durch die 4Pi Mikroskopie erreichte Verbesserung der Auflösung und Perspektiven einer weiteren Verbesserung.

Neben Stimulierter Emission gibt es noch weitere Möglichkeiten, zwei eng benachbarte fluoreszierende Punktobjekte getrennt voneinander detektieren und damit optisch isolieren, d.h. auflösen zu können. Bereits Rayleigh hatte 1895 darauf hingewiesen, dass das Maximum der Intensitätsverteilung eines Airy Disks die Position der Punktlichtquelle mit "beliebiger Genauigkeit" (d.h. wie in der Strahlengeometrie) wiedergibt. Diese allgemein bekannte Tatsache brachte mich zu folgender Überlegung, die in einer handschriftlichen Notiz vom 7. Dezember 1993, betitelt "Auflösungssteigerung durch Mehrfarbenmarkierung" niedergelegt wurde.

Die Idee war, zur optischen Isolation zweier benachbarter fluoreszierender Punktobjekte Unterschiede in den spektralen Eigenschaften zu nutzen. Als Beispiel ging ich von zwei mit verschiedenen Absorptions/Emissionsspektren fluoreszierenden Punktobjekten in einem Abstand  $< 80$  nm entlang der optischen Achse aus, also weit unterhalb des "Abbe-Limits" von ca. 200 nm sowie der mit Konfokalmikroskopie erreichbaren axialen Auflösungsgrenze von ca. 500 nm. Dann sollte es möglich sein, durch die verschiedenen "Farbzustände" die Positionen der Maxima der beiden Airy Disks getrennt voneinander mit Nanometergenauigkeit zu vermessen und damit optisch aufzulösen. Als Konsequenz wurde postuliert: "Also läßt sich die Distanz  $d$  auch auf  $\pm 10$  nm genau bestimmen." Das entspricht einer optischen Auflösung von ca.  $1/40$  Wellenlänge.

Während der nächsten Jahre wurde dieser Grundgedanke von mir zu einem allgemeinen Konzept der Auflösungsverbesserung in der Fernfeldfluoreszenzmikroskopie (Arbeitsabstände im Bereich mehrerer hundert Wellenlängen und mehr) im 300 Kelvinbereich weiter entwickelt und 1996 zum Patent angemeldet (Cremer et al.

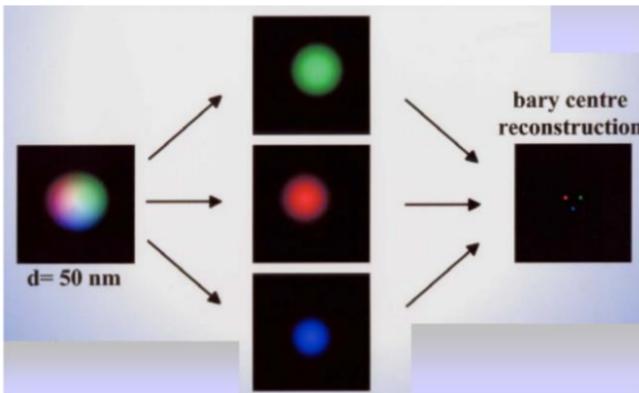
1996, 1998, 1999; Bornfleth et al. 1998). Darin beschrieben wir das Grundprinzip und wiesen darauf hin, dass es im Prinzip auf beliebige Fernfeldmikroskopische Verfahren anwendbar sein; insbesondere sollte es nicht nur in Laserscanningtechniken einsetzbar sein, sondern sogar bei homogener Beleuchtung des Gesichtsfeldes, wie es in der konventionellen, Weitfeldbasierten Fluoreszenzmikroskopie geschieht. Ein wesentlicher Punkt in dieser Anmeldung waren Verfahren zur präzisen Kalibration von chromatischen Aberrationen; ohne diese wäre die tatsächlich erreichbare optische Auflösung auch bei extrem gut korrigierten Objektiven auf Werte oberhalb ca. 30 nm limitiert gewesen. Peter Edelmann, damals wiss. Assistent der Arbeitsgruppe, realisierte Methoden zur Nanometergenauen Korrektur der chromatischen Aberration in 3D (Edelmann et al. 1999a,b).

Wir erhielten sofort weltweite Patente für dieses Konzept: An eine so "triviale" Lösung des Abbe-Problems hatte anscheinend noch (fast) niemand ernsthaft gedacht.

Allerdings hatte Eric Betzig einige Monate zuvor (Betzig 1995) ein verwandtes Konzept der Lokalisationsmikroskopie beschrieben. Im Gegensatz zu unserer Idee bezog es sich aber auf die Verbindung von kryogener Fluoreszenzspektroskopie im 4 Kelvin Bereich und Nahfeld Scanning Mikroskopie (Arbeitsabstand Bruchteile einer Wellenlänge); eine Anwendung in der Fernfeldmikroskopie mit Objektiven hoher numerischer Apertur und im 300 K Bereich wurde als sehr schwierig angesehen und nicht näher diskutiert. Auch wurde nicht auf die Korrektur der chromatischen Aberrationen eingegangen, die bei Verwendung von Farbstoffen mit großem Stokesshift auch bei sehr gut korrigierten Objektiven von essentieller Bedeutung für die Anwendung des Prinzips der Lokalisationsmikroskopie wird.

Abb. 6 zeigt das Prinzip des von uns "Spektrale Präzisionsmikroskopie" (SPDM) genannten Konzepts der Fernfeld basierten Lokalisationsmikroskopie, wie es in einem Vortrag von mir im Jahre 2002 am Jackson Laboratory dargestellt wurde. In dieser numerischen (skalaren) Simulation (P. Edelmann) vom Ende der

1990iger Jahre wurden drei fluoreszierende Moleküle im Abstand von 50 nm angenommen. Bei Markierung mit derselben spektralen Signatur können die Positionen natürlich nicht einzeln detektiert (aufgelöst) werden. Bei Markierung mit unterschiedlichen Signaturen und jeweils optisch getrennter Detektion können die Mittelpunkte der Airy Disks unabhängig voneinander bestimmt werden. Die so mit Nanometergenauigkeit gefundenen Positionen werden dann in eine gemeinsame Lokalisationskarte eingetragen.



**Abb. 6.** Grundprinzip der Fernfeld basierten Lokalisationsmikroskopie.

*Links: Drei Moleküle (fluoreszierende Punktlichtquellen) werden mit jeweils verschiedenen "spektralen Signaturen" ("Grün"; "Rot"; "Blau") markiert (z.B. Unterschiede in Absorptions/Emissionsspektrum, Fluoreszenzlebensdauer, Lumineszenz); die Detektionsoptik "sortiert" die emittierten Photonen gemäß ihrer "Signatur" e.g. durch geeignete Emissionsfilter;*

*Mitte: bei der jeweils ausgewählten Signatur werden drei "optisch isolierte" Beugungsbilder (Airy Disks) registriert.*

*Rechts: Die mithilfe verschiedener Auswertungsalgorithmen erhaltenen Mittelpunkte der Airy Disks werden mit Nanometergenauigkeit (in Objektkoordinaten) bestimmt und in eine gemeinsame Lokalisationskarte eingetragen (Cremer et al. 1996, 1999; Bornfleth et al. 1998).*

### **Lokalisationsmikroskopie mit photostabilen "spektralen Signaturen"**

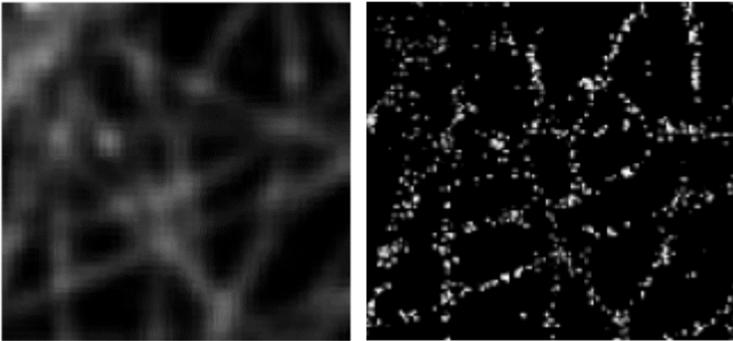
Für die experimentelle Realisierung ist es entscheidend, verschiedene Moleküle mit unterschiedlichen Signaturen versehen zu können. Eine erste Lösungsidee (Cremer et al. 1996) war es, permanente Signaturen zu verwenden, z.B. photostabile Unterschiede im Absorptions/Emissionsspektrum, Lebensdauer etc.

Die erste biophysikalische "Proof-of-Principle" Anwendung dieses lokalisationsmikroskopischen Ansatzes wurde in Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe am Tel Hashomer Hospital (Tel Aviv University/Israel) durchgeführt (Esa et al. 2000). Hier haben wir zum erstenmal in Zellkernen von Leukämie Patienten quantitative Messungen zur Nanostruktur der mit diesem Blutkrebs verbundenen Chromosomenveränderung durchgeführt. Dabei wurden drei Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Absorptions/Emissionscharakteristiken verwendet, die jeweils an bestimmte kurze DNA Abschnitte verschiedener Sequenz gebunden wurden; die in jedem Zellkern nach sorgfältiger chromatischer Korrektur erhaltenen "Positionsdreiecke" (s. Abb. 6) wurden mit numerischen Simulationen dieser Nanostrukturen auf der Basis eines Polymermodells verglichen und zeigten, dass diese chromosomale Nanostruktur im Zellkern eine nicht-stochastische Struktur hat. Die erreichte 3D optische Auflösung (entsprechend der Definition von Rayleigh als kleinste detektierbare Distanz zwischen zwei selbstleuchtenden Punktquellen) betrug ca. 40 nm, etwa 1/12–1/15 der verwendeten Wellenlängen. In einem gemeinsamen DFG Projekt mit Kollegen des Phys.Chem. Instituts der Universität Heidelberg wurden weitere "Proof-of-Principle" Experimente realisiert (Heilemann et al. 2002), in denen erstmalig gezeigt wurde, dass die Zeitdomäne – in diesem Falle Messungen der Fluoreszenzlebensdauer durch "Time Correlated Photon Counting" zu einer drastischen Verbesserung der optischen Auflösung von einzelnen Molekülen (ca. 20 nm, ~1/30 der verwendeten Anregungswellenlänge) herangezogen werden konnte.

Für viele Fragestellungen sind wenige "spektrale Signaturen" mit hoher optischer Auflösung ausreichend, wie das o.g. Beispiel zeigt. Für andere Probleme aber ist es wünschenswert, über die *optische* Auflösung hinaus auch die *strukturelle* Auflösung zu erhöhen, d.h. die *Dichte* der unterscheidbaren Positionen über das mit konventioneller Mikroskopie mögliche Maß zu steigern. Je mehr unterschiedliche "spektrale Signaturen" verwendet werden können, desto höher ist diese Dichte und damit die erreichbare strukturelle Auflösung. Ferner war es wünschenswert, das oben beschriebene Lokalisationsmikroskopieverfahren auch auf die verbesserte Auflösung von Molekülen *desselben* Typs anwenden zu können. In einer Patentanmeldung von 2002 (Cremer et al. 2002) haben wir erste Vorschläge hierzu gemacht, die auf einer stochastischen Bindung von Fluorophoren verschiedener spektraler Signatur beruhten.

Zu den Möglichkeiten dieser Methode gibt Abb. 7 ein numerisches Simulationsbeispiel mit 30 photostabilen Fluorophoren bei stochastischer Bindung an die Zielmoleküle (Birk et al. 2017b). Im Vergleich zur konventionellen Grenze ist eine erhebliche Verbesserung der Strukturauflösung erkennbar.

Die experimentelle Realisierung einer so hohen Zahl von photostabilen Signaturen wäre physikalisch möglich, jedoch sehr aufwändig. In den Jahren 2004–2006 war ich an einem Kooperationsprojekt mit dem Jackson Laboratory und der University of Maine beteiligt, wo wir versuchten, diese Art von Multiplex Lokalisationsmikroskopie mithilfe von Raman Signaturen zu realisieren. Unter anderem war daran Samuel Hess beteiligt (heute Professor of Physics an der University of Maine), dessen Mentor ich damals sein durfte, und der ganz wesentlich zur methodischen Weiterentwicklung der Lokalisationsmikroskopie beitrug (s.u.).



**Abb. 7.** Lokalisationsmikroskopie mit photostabilen Fluorophoren und erhöhter optischer und struktureller Auflösung.

*Annahmen: Stochastische Bindung von Fluorophoren mit 30 verschiedenen "spektralen Signaturen" an zelluläre Protein-Polymere (Mikrotubuli).*

*Rechts: Lokalisationsbild. Jeder einzelne kleine "Spot" repräsentiert ein einzelnes gebundenes Fluoreszenzmolekül nach "Blurring" mit der Lokalisationsgenauigkeit.*

*Links: dieselben Strukturen bei konventioneller Höchstauflösung. Aus Birk et al. (2017b).*

### ***Lokalisationsmikroskopie mit "blinkenden" Nanodots und Proteinen***

Eine alternative Lösung des o.g. Problems einer Lokalisationsmikroskopie mit erhöhter *struktureller* Auflösung, war es, *zeitlich nacheinander* pro Airy Disk immer nur ein einzelnes Molekül zu registrieren, und die anderen für den Detektor "im Dunkel" zu lassen, indem die Moleküle räumlich *und zeitlich* stochastisch verteilt zum 'Blinken' gebracht werden. Ich selbst wurde im Dezember 1999 zu einer solchen Idee angeregt von der Welt der blinkenden Weihnachtsbäume in San Francisco, fand damals aber keinen Weg, wie eine solche Idee unter Verwendung nur eines einzigen Fluorophortyps realisiert werden könnte.

Rainer Heintzmann, ein ehemaliger Doktorand (Physik) meines Heidelberger Forschungsbereichs (damals Group Leader am King's College London, derzeit Lehrstuhlinhaber an der Universität Jena) war der erste, der das oben skizzierte Grundkonzept der lokalisationsmikroskopischen Superauflösung mit laserinduziert blinkenden Halbleiter "Nanodots" experimentell in der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie realisierte und im September 2005 in einer optischen Fachzeitschrift publizierte (Lidke et al. 2005). Er machte auch detaillierte Vorschläge, wie diese Idee auf die Lokalisationsmikroskopie zellulärer Nanostrukturen mithilfe fluoreszierender Proteine angewandt werden könnte. Samuel Hess und seine Kollegen aus dem von mir erwähnten Lokalisationsmikroskopieprojekt an der University of Maine haben diese Idee der Arbeitsgruppe Heintzmann aufgegriffen und derartige Experimente zur 'Blinking' basierten Superauflösung mit photoschaltbaren Proteinen im Dezember 2006 publiziert (Hess et al. 2006), leider einige wenige Monate zu spät: Die Idee von Rainer Heintzmann (2005) zur Verwendung blinkender fluoreszierender Punktlichtquellen wurde unmittelbar nach seiner Veröffentlichung durch eine Kollaboration von Kollegen am Howard Hughes Institute Janelia Farm und am National Institute of Health/Bethesda in den USA aufgenommen und experimentell realisiert; am 10. August 2006 wurde sie in "Science" publiziert und fand sofort große Beachtung (Betzig et al. 2006). Eric Betzig, der Erstauteur dieser Arbeit und ein Pionier suprauflösender Lichtmikroskopiemethoden seit den 1980iger Jahren (s.o.), erhielt dafür 2014 zusammen mit Stefan Hell ebenfalls den Nobelpreis für Chemie. Als dritter Preisträger wurde William Moerner (Stanford) geehrt, der in den 1990iger Jahren die photophysikalischen Grundlagen der "photoswitching" basierten Lokalisationsmikroskopie gelegt hatte.

### ***Photoswitching* basierte Lokalisationsmikroskopie mit synthetischen Fluorophoren**

Ein Nachteil der "Betzig-Methode" in der biomedizinischen Forschung war die Notwendigkeit, sehr spezielle photoschaltbare Proteine verwenden zu müssen. Dies bedeutete zahlreiche Beschränkungen und schloss z.B. praktisch alle Anwendungen in der medizinischen Diagnostik aus, dem größten Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie.

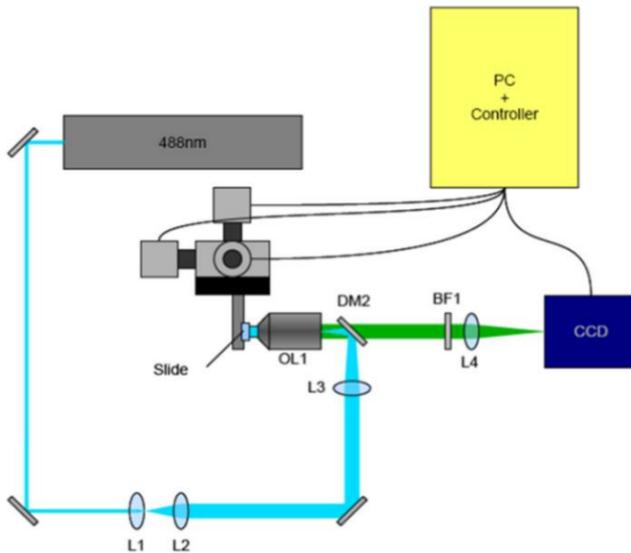
In meinem Labor gehörten wir im Herbst 2007 zu den allerersten, die Wege fanden, das Grundprinzip der "Blinking" basierten Superauflösung mit ganz normalen einzelnen Standard Fluorophoren in effektiver und methodisch einfacher Weise zu realisieren. Dies ermöglicht es heute, die Verteilung beliebiger Proteine, der DNA oder spezifischer DNA/RNA Sequenzen in der Zelle mit molekularer Auflösung quantitativ analysieren und bildlich sichtbar machen zu können.

Die Grundidee hierzu war die Beobachtung, dass viele Moleküle nicht einen einzigen "Dunkel"zustand haben, sondern mehrere. Durch geeignete Induktion dieser Dunkelzustände durch spezifische Kombinationen von Laserfrequenz, Intensität und chemischer Umgebung fanden wir Wege, eine effektive optische Isolation und lokalisationsmikroskopische Superauflösung zu realisieren. Von größter Bedeutung war hier in vielen Fällen eine sehr viel höhere Beleuchtungsintensität, als sie typischerweise in der konventionellen Weitfeldmikroskopie genutzt wird und als sie in den lokalisationsmikroskopischen Experimenten von Betzig und Hess verwendet wurde. Während eines Ferienaufenthaltes im September 2007 stellte ich erste Überlegungen in dieser Richtung an, die wir nach meiner Rückkehr nach Heidelberg realisierten. Dazu fügten wir eine langbrennweitige Linse (zu Beginn eine einfache Leselupe) in den Strahlengang eines unter Federführung von Dr. Udo Birk in den Jahren 2003–2004 konstruierten Mikroskopsystems zur Auflösungsverbesserung mit Axial Strukturierter Beleuchtung (s.u.) ein. Die hierdurch erzielte Steigerung der Anregungsintensität von ca.  $0.5 \text{ kW/cm}^2$  auf etwa  $5\text{--}25 \text{ kW/cm}^2$

reichte aus, zusammen mit Standardeinbettungsmedien und unter Verwendung nur einer einzigen Laserwellenlänge die gewünschte effiziente stochastische optische Isolation in Raum und Zeit zu realisieren. Im Rückblick ist es erstaunlich, dass eine derartig einfache Realisierung einer Lichtmikroskopie mit molekularer Auflösung nicht sehr viel früher gefunden worden ist, weder von uns noch von anderen.

Bei dieser von uns erstmals so realisierten Lokalisationsmikroskopie war in vielen Fällen eine einzige Laserwellenlänge pro Molekültyp ausreichend. Die in vielen tausenden von Einzelbildern gemessenen "optisch isolierten" Einzelmolekülpositionen wurden in eine gemeinsame Lokalisationskarte eingetragen, entsprechend dem Grundprinzip der Fernfeld-basierten Lokalisationsmikroskopie (Abb. 6). Am Schluss ergab sich ein Gesamtbild mit ganz erheblich gesteigerter optischer und struktureller Auflösung. Wie bei anderen Methoden der Superauflösung galt auch hier, dass jedes aufgenommene Einzelbild dem Abbe/Rayleigh Limit genügt. Die Steigerung der Auflösung ergab sich erst aus der Kombination vieler solcher Einzelbilder. Alle beruhen sie auf der Kombination von vielen Fluoreszenzsignalen, wobei jedes Einzelsignal den wellentheoretischen Auflösungskriterien genügt; da sie aber tatsächlich in der Lage sind, z.B. die räumliche Verteilung einzelner Moleküle mit Abständen weit unterhalb des Abbe-Limits korrekt zu vermessen und als Bild darzustellen, hat sich der Ausdruck "Super-Resolution Microscopy" oder "Nanoscopy" durchgesetzt.

Die von uns im Herbst 2007 experimentell erstmals durchgeführte, und im Frühjahr 2008 erstmals publizierte Methode einer effizienten, einfachen, Einzelmolekülbasierten Lokalisationsmikroskopie insbesondere von Standardfluorochromen (Reymann et al. 2008; Lemmer et al. 2008, 2009; Kaufmann et al. 2009;) hat unter verschiedenen Namen jetzt allgemeine Anwendung gefunden (Übersicht: Cremer 2011; Cremer et al. 2010, 2011; Cremer & Masters 2013; Cremer et al. 2017).



**Abb. 8.** Ein minimales laseroptisches System für Lokalisationsmikroskopie mit 'blinkenden' Fluorophoren.

*OL1* Objektiv hoher numerischer Apertur, *CCD* Kamera, *L1–L4* Linsen, *DM2* Dichroitischer Teilerspiegel, *BF1* Emissionsfilter, *Slide*: Objekt-position (Reymann et al.,2008; Lemmer et al, 2008, 2009; Kaufmann et al., 2009).

Abb. 8 zeigt ein von uns im Herbst 2007 erstmals realisiertes minimales laseroptisches System für Super-Resolution mit Standardfarbstoffen. Wesentliche Elemente sind eine effiziente geeignete intensive Lichtquelle (in diesem Beispiel ein Argon Laser mit  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ), eine abbildende Optik und eine schnelle und sensitive Registrierung. Dieses System erlaubte uns im Weitfeldmodus (homogene Beleuchtung des Gesichtsfeldes) eine optische intrazelluläre Auflösung von Proteinkomplexen der Kernhülle von ca. 40 nm oder 1/15 der verwendeten Wellenlänge zu realisieren. Die dazu erforderlichen Computerprogramme für rasche Bildfolge der Mikroskopieaufnahmen (50 und mehr pro

Sekunde) und lokalisationsmikroskopische Datenverarbeitung sind heute allgemein verfügbare Routine; damals waren sie Neuland. Zu ihrer Entwicklung haben in der Arbeitsgruppe insbesondere Dr. David Baddeley (heute Assistant Professor an der Yale University), Dr. Udo Birk (heute Privatdozent für Experimentalphysik Universität Mainz und Dozent an der Hochschule für Technik und Wirtschaft in Chur/CH), Dr. Paul Lemmer und Dr. Rainer Kaufmann (später Oxford, seit 2017 Universität Hamburg) beigetragen.

Die hinter diesem Lokalisationsmikroskopieverfahren stehende Photophysik ist außerordentlich komplex und stark von den jeweils untersuchten Farbstoffen abhängig. Wesentliche Beiträge zur Aufklärung dieser Mechanismen haben dabei Michael Heilemann (heute Professor an der Universität Frankfurt) und Markus Sauer (heute Professor an der Universität Würzburg) geleistet, zwei Kollegen aus dem Phys. Chem. Institut der Universität Heidelberg, die an dem o.g. Kollaborationsprojekt zur Lokalisationsmikroskopie mit Molekülen verschiedener Lebensdauer (Heilemann et al. 2002) beteiligt gewesen waren.

Ein wesentlicher Vorteil des beschriebenen Verfahrens zur fernfeldmikroskopischen Superauflösung einzelner Moleküle war die Möglichkeit, auf einfache Weise sehr viele verschiedene Standardfluorochrome einsetzen zu können. Hierzu haben wir das in Abb. 8 gezeigte System um verschiedene Laserfrequenzen erweitert. Die mit dieser Methode von uns erreichte Bestauflösung beträgt derzeit ca. 5 nm, entsprechend 1/100 der Anregungswellenlänge. Durch Nutzung astigmatischer Aberrationen gelang es uns, die Einzelmolekülauflösung auch entlang der optischen Achse erheblich zu steigern, gegenwärtig auf ca. 50 nm, oder 1/10 der Anregungswellenlänge.

Die vorgehend beschriebenen supraauflösenden Mikroskopiemethoden erlaubten nunmehr die lichtmikroskopische Erforschung von Nanostrukturen des Genoms im Zellkern. Dies eröffnete vielfältige Anwendungsperspektiven, wie die Diagnostik von Genomschäden durch ionisierende Strahlung und chemische

Mutagene; die Biophysik der Genregulation; die Entwicklung von Arzneimitteln zur direkten Kontrolle einzelner Gene; die Analyse der zellulären Verteilung von Pharmaka mit molekularer Auflösung; oder die Nanostrukturanalyse von Viren und Bakterien (Cremer 2011; Cremer et al. 2010, 2011, 2014, 2017).

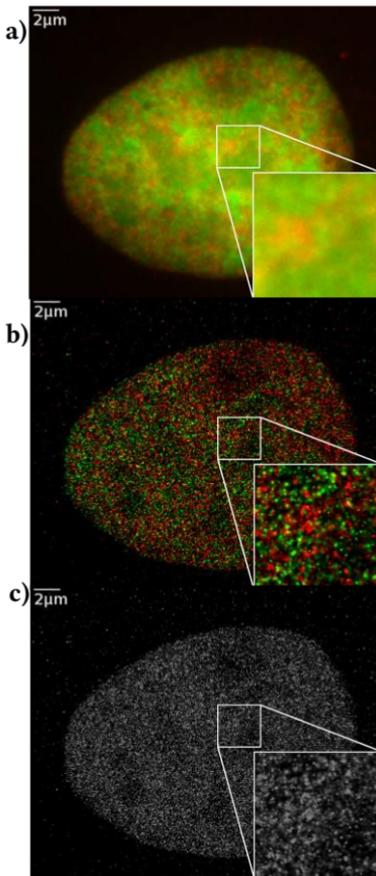
## **Lokalisationsmikroskopie von Nanostrukturen des Zellkerns**

### ***Zweifarbigen-Lokalisationsmikroskopie von Kern-Proteinen***

Im Folgenden sollen einige Beispiele der mit den oben skizzierten lokalisationsmikroskopischen Verfahren erzielten Bilder "vom Innersten des Zellkerns" vorgestellt werden.

Abb. 9a zeigt ein konventionelles Bild einer Knochenmarks-Krebszelle mit zwei Proteinsorten, die für Verpackung und Regulation des Genoms wichtig sind. Die zwei Molekülsorten sind in unterschiedlichen Farben dargestellt.

Die Abbe'sche Auflösungsgrenze ergibt ein verwaschenes Bild mit sehr geringer Strukturinformation. Das in Abb. 9b gezeigte Lokalisationsbild hingegen zeigt klar die Positionen der einzelnen Moleküle. Diese können nun in vielfältiger Weise quantitativ analysiert werden, wie in der Astrophysik die einzelnen Sternpositionen. Zum Beispiel kann man die aus den Einzelmolekülpositionen berechneten Distanzverteilungen und Clusterbildungen zur Charakterisierung von unterschiedlichen Zelltypen nutzen, sowie sie mit numerischen Modellen der Chromatinstruktur vergleichen (Münkel et al. 1995; Kreth et al. 2004a,b). Mit solchen Untersuchungen haben wir begonnen, u.a. in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dieter Heermann am Theoretisch Physikalischen Institut der Universität Heidelberg (Bohn et al. 2010). Hätte man wie bei der ursprünglich von Betzig publizierten "PALM" Methode (Betzig et al. 2006) nur eine einzige Farbe zur Verfügung (siehe Abb. 9c), so ergäbe sich zwar eine Superauflösung im optischen Sinne, aber keine Steigerung der biophysikalisch nutzbaren Bildinformation: "Blinking" und "Farbe" gehören also eng zusammen.



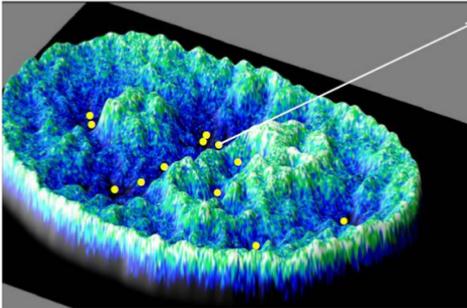
a) Konventionelle Mikroskopieaufnahme (hohe numerische Apertur)  
b) Derselbe Kern mit demselben Objektiv aber mit dem Verfahren der Lokalisationsmikroskopie (Abb. 8). Die kleinsten Punkte repräsentieren die Positionen von einzelnen Histon (rot) bzw. SnfH2 (grün) Molekülen. Um die durch die Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{loc}$  gegebenen Grenzen der Auflösung bildlich darzustellen, wurden die einzelnen Molekülpositionen mit einer  $\sigma_{loc}$  entsprechenden Gaussfunktion "verwaschen".  
c) Wie b) aber hier wurde die Farbinformation beseitigt, entsprechend dem ursprünglichen monochromatischen Verfahren von Betzig et al. (2006).  
Aus Gunkel et al. 2009, modifiziert.

**Abb. 9.** Lokalisationsmikroskopie der Verteilung individueller Proteine im Kern einer menschlichen Knochenmarks-Krebszelle. Rot: Histon H2 Moleküle (positiv geladene Verpackungsmoleküle der negativ geladenen DNA. Die Markierung erfolgte mithilfe der Kopplung der Histonmoleküle an ein "rot fluoreszierendes Protein" (mRFP) Grün: SnfH2 (Proteine, die die Verpackung der DNA beeinflussen). Die Markierung erfolgte mithilfe der Kopplung der SnfH2-Moleküle an ein "grün fluoreszierendes Protein" (GFP).

Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse waren die letzten, die noch vor meiner im August 2009 erfolgten Emeritierung erzielt wurden. Dank des Entgegenkommens meiner Kollegen vom Kirchhoff-Institut für Physik durfte ich aber noch bis Ende 2011 meine dortigen Untersuchungen zur Superauflösenden Lichtmikroskopie weiterführen. Dann siedelte die Arbeitsgruppe teilweise an das Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg über; vor allem aber ergab sich dank des Angebots (2010) von Prof. Christoph Niehrs die Möglichkeit, diese hoch spannenden Forschungsarbeiten an dem von ihm neugegründeten Institut für Molekulare Biologie (IMB) in Mainz fortzusetzen (Arbeitsgruppe "Super-Resolution Microscopy"). Das IMB wurde im Jahre 2011 aufgrund einer großzügigen Donation (100 Mio €) der Böhlinger Stiftung an die Universität Mainz gegründet und fand Platz in einem neuerrichteten Gebäude gegenüber dem dortigen Physik Department. Die folgenden Ergebnisse wurden teilweise bereits am IMB/IPMB erzielt, sollen aber der Vollständigkeit des Überblicks halber hier ebenfalls aufgenommen werden, zumal gemäß Landesgesetz und Grundordnung ja auch ein Heidelberger Emeritus weiterhin ein volles, zu Lehre und Forschung berechtigtes Mitglied seiner Universität bleibt.

Mit verbesserten Methoden gelang uns in den letzten Jahren eine erhebliche Steigerung der strukturellen Auflösung: Abb. 10 zeigt die 3D Verteilung der DNA im Kern einer anderen menschlichen Krebszelle.

Es ergibt sich das Bild einer "Nanoschweiz", mit Bergen hoher DNA Dichte und tiefen Tälern sehr geringer DNA Dichte. Gemäß einem Modell der funktionellen Struktur des Zellkerns (T. Cremer et al. 2015) sind diese großen Dichteunterschiede (bis zu mehreren Größenordnungen) wesentlich für die Funktionen des Zellkerns: In den Tälern geringer DNA Dichte liegen die aktiven Gene und die dafür erforderlichen Proteine.



(•) Die Orte der Genablesung (Transkription), Genverdopplung (Replikation), DNA Reparatur sind in den "Tälern" lokalisiert (geringe DNA Dichte).

**Abb. 10.** Lokalisationsmikroskopie der Dichtverteilung der DNA in einem "optischen Schnitt" eines menschlichen Zellkerns.

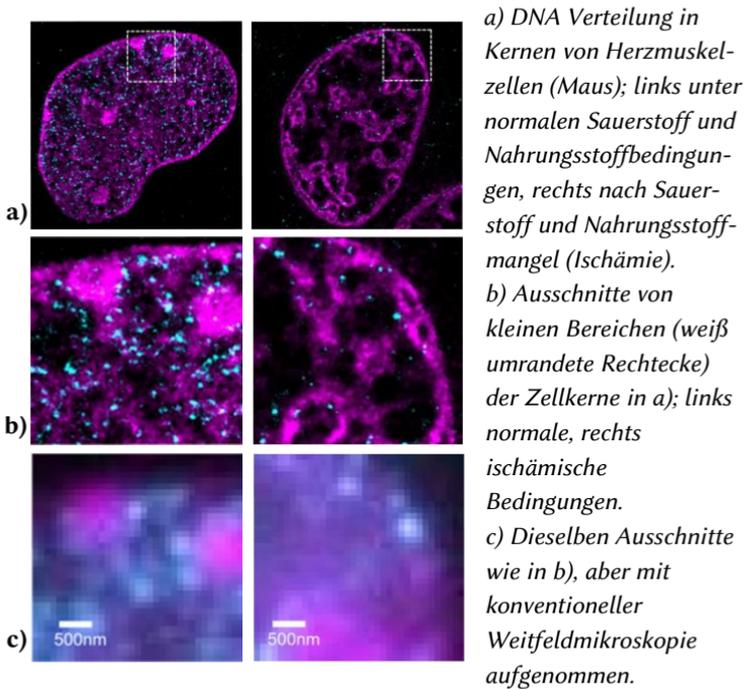
Die "Berge" zeigen hohe DNA Dichten an (bis  $\sim 3 \times 10^3$  Molekülpositionen/ $\mu\text{m}^2$ ), die "Täler" geringe DNA Dichten. (Szczurek et al. 2014).

### Lokalisationsmikroskopie des Zellkerns unter Infarktbedingungen

Herzinfarkt und Schlaganfall gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. In Deutschland sind dies etwa 160.000 Todesfälle pro Jahr. Ihre physiologische Ursache haben beide "Killer" in einer Unterversorgung von Herzmuskel- bzw. Gehirnzellen mit Sauerstoff/Nahrungsstoffen; solche Ischämiebedingungen lösen eine Kettenreaktion aus, die zum Untergang des Gewebes führt.

In einer Zusammenarbeit mit dem Biochemiker und Molekularbiologen Dr. George Reid (IMB; heute EMBL Heidelberg) haben wir erstmals erforscht, wie Sauerstoff und Nahrungsstoffmangel die Nanostruktur des Zellkerngenoms beeinflusst.

Abb. 11a zeigt ein supraaufgelöstes Lokalisationsbild des Kerns einer Herzmuskelzelle bei normaler Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen. In Purpur sind einzelne kompakte Bereiche der Kern DNA dargestellt; blau gefärbte Bereiche stellen einzelne aktive Gendomanen dar. Nach Sauerstoffmangel wie bei Infarkt oder Schlaganfall ändert sich die Nanostruktur des Zellkerngenoms ganz drastisch, wie Abb. 11a rechts zeigt. Wir sind die ersten gewesen, die dies beobachten konnten.



**Abb. 11.** Lokalisationsmikroskopie von Herzmuskelzellen unter Infarktbedingungen.

*Purpur: DNA hoher Dichte; Blau: Bereiche mit aktiven Genen in Bereichen niedriger DNA Dichte. Die Skala (500 nm) in c) gilt auch für b). Aus Kirmes et al. (2015), modifiziert.*

Die in b) gezeigten Ausschnitte lassen erkennen, dass die aktiven Gendomanen sich in Zonen niedriger DNA befinden, am Rande von Bereichen hoher DNA Dichte. Dies ist ein weiteres Beispiel für die auch durch elektronenmikroskopische Befunde unterstützte Hypothese, dass die Verteilung der aktiven und inaktiven Zonen auf der Nanostrukturebene im Zellkern von bestimmten Ordnungsprinzipien bestimmt ist. Diese Ordnungsprinzipien bleiben offenbar auch unter Infarktbedingungen (Abb. 11a,b rechts) erhalten. Auch hier befinden sich die wenigen noch aktiven

Gendomänen in Bereichen niedriger DNA Dichte am Rande der Zonen hoher DNA Dichte (Purpur). Schauen wir uns die kleinen Ausschnitte in Abb. 11b) aber mit konventioneller Auflösung an (Abb. 11c), so wird das Bild extrem verschwommen.

Bei Wiederherstellung des normalen Sauerstoffgehalts wurde die normale Nanostruktur ebenfalls wieder weitgehend hergestellt: Es handelt sich also um zumindest teilweise reversible Änderungen der Genom-Nanostruktur! Hieraus ergeben sich Perspektiven zur Entwicklung neuer Pharmaka durch Kontrolle der Zellkern-Nanostruktur für die Therapie von Infarkt und Schlaganfall. Da den in Abb. 11 gezeigten Bildern in Wirklichkeit pro Zelle die Ortskoordinaten von vielen hunderttausenden von Einzelmolekülpositionen zugrunde liegen (Szczurek et al. 2014, 2016, 2017; Zurek-Biesiada et al. 2015, 2016), können Veränderungen der Genom-nanostruktur jetzt bis in den Bereich weniger Nanometer analysiert werden (Perez et al. 2016; Hausmann et al. 2017). Mit Lokalisationsmikroskopie werden also nicht allein sehr viel besser aufgelöste Bilder von zellulären Nanostrukturen erhalten (Prakash et al. 2015), sondern kleinste Strukturveränderungen werden messbar. Wie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Hausmann am Kirchhoff Institut gezeigt werden konnte, genügen in vielen Fällen bereits wenige tausend Einzelmolekülpositionen pro Zellkern, um quantitative Veränderungen der Zellkernstruktur nachzuweisen, wie sie z.B. als Folge von Reparaturprozessen nach ionisierender Strahlung (Zhang et al. 2015), aber auch bei Vitaminmangel auftreten (Bach et al. 2017). Eine Abschätzung zeigt, dass die Lokalisationsmikroskopische in der Lage sein sollte, noch kleinste Molekülkonzentrationen nachweisen zu können, bis in den Bereich von subattomolaren Konzentrationen (Oleksiuk et al. 2015; Stuhlmüller et al. 2015). Damit erreicht die Lokalisationsmikroskopie Nachweisgrenzen, wie sie bislang nur mit radioaktiven Verfahren realisiert werden konnten.

Gegenwärtig (2017) haben wir die oben skizzierten Verfahren der Lokalisationsmikroskopie zur Analyse der Nanostruktur des Genoms im Kern menschlicher Zellen zu einem Verfahren weiter

entwickelt, das es uns möglich gemacht hat, in einem einzelnen Kern die dreidimensionalen Positionen von vielen Millionen einzelnen DNA gebundenen Farbstoffmolekülen mit einem 3D Fehler von wenigen 10 nm zu vermessen; lokal konnten bis zu 70,000 individuelle Moleküle/ $\mu\text{m}^2$  lokalisiert werden, also pro kleinstem Airy Disc (200 nm Durchmesser) mindestens tausend mal mehr als mit konventioneller Auflösung möglich. Dies eröffnet völlig neue Möglichkeiten nicht nur für empirische Korrelationen zwischen Kerngenomstruktur und Genregulation, sondern auch für die theoretische Biophysik dieser Informations- und Steuerzentrale aller höheren Organismen.

### **Superauflösende Lichtmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung ("optische Gitter")**

Die bisher dargestellten supraauflösenden Verfahren wie 4Pi, STED und Lokalisationsmikroskopie haben die Nanowelt sichtbar werden lassen. Sie haben aber auch verschiedene Probleme, wie z.B. relativ kleine Gesichtsfelder, kleiner Arbeitsabstand, oder hohe Bestrahlungsintensitäten. Diese Probleme können mit einem alternativen Supermikroskopie Verfahren überwunden werden, das zum Schluß noch kurz skizziert werden soll: Die strukturierte Beleuchtung. Diese Alternative zu STED und Lokalisationsmikroskopie wurde von uns seit Mitte der 1990iger Jahre entwickelt.

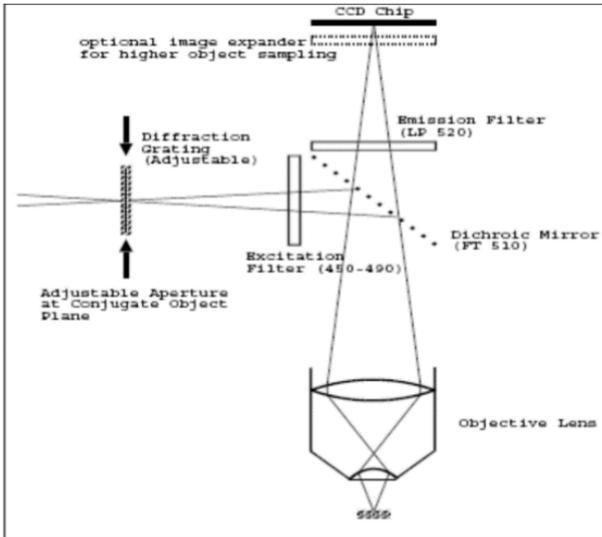
Die erste von uns realisierte Methode war die axial strukturierte Beleuchtung ("Spatially Modulated Illumination"/SMI). Bei dieser wurden wie bei der 4Pi Mikroskopie zwei gegenläufige Mikroskopobjektive hoher numerischer Apertur verwendet. Diesmal aber wurde durch Fokussierung des Laserlichts in die Detektorseitigen Fokalebene der Objektive im Objektraum zwischen den Objektiven ein stehendes Wellenfeld erzeugt (Hausmann et al. 1997; Schneider et al. 1999, 2000; Baddeley et al. 2007, 2010); Wird ein kleines fluoreszierendes Objekt in präzisen Schritten (z.B. 10 nm) entlang der optischen Achse durch dieses Wellenfeld bewegt und bei jedem Schritt mit einer empfindlichen

CCD Kamera ein Bild aufgenommen, so ergibt sich als Resultat ein Bildstapel, aus dem die Position des Objekts mit hoher Lokalisierungsgenauigkeit (Bestwert 0.7 nm) bestimmt werden konnte (Albrecht et al. 2001). Bei "optisch isolierten" Objekten war ferner eine Größenmessung bis hinunter zu ca. 30 nm (1/20 der Anregungswellenlänge) möglich (Failla et al. 2003; Cremer et al. 2017); mittlere Veränderungen der Größe sollten mit diesem Verfahren bis in den 1 nm Bereich durchführbar sein. Mit diesem Verfahren gelang es uns erstmals, die Größe verschiedener "biomolekularer Maschinen" (BMMs) und Gendomänen im Zellkern sehr viel genauer abzuschätzen, als dies bislang lichtmikroskopisch möglich gewesen war (Martin et al. 2004; Hildenbrand et al. 2005; Mathee et al. 2006; Baddeley et al. 2010). Im Gegensatz zur typischerweise auf wenige kleine Ausschnitte beschränkten Elektronenmikroskopie erlaubte das SMI Verfahren, in wenigen Stunden viele tausende von solchen BMMs in intakten Zellkernen zu vermessen.

Im Rahmen seiner Doktorarbeit in meinem Forschungsbereich hat Rainer Heintzmann Ende der 1990iger Jahre Möglichkeiten realisiert, das Prinzip der strukturierten Beleuchtung auf die laterale Auflösungsverbesserung von fluoreszenzmarkierten Strukturen in der Objektebene zu übertragen (Heintzmann & Cremer 1999). Abb. 12 zeigt die erste hierzu im Jahre 1998 realisierte Versuchsanordnung.

Aus den unter verschiedenen Phasen und Richtungen aufgenommenen Einzelbildern konnte dann durch ein außerordentlich komplexes Verfahren im Fourierraum ein Bild mit erhöhter lateraler Auflösung rekonstruiert werden. Die Theorie besagte, dass bei linearer Fluoreszenzanregung eine Auflösungsverbesserung um den Faktor 2 möglich sein sollte. Mit einem verbesserten Gerät, das auf einer interferometrischen Modulation von kohärentem Licht beruhte, haben wir diesen theoretischen Grenzwert fast erreichen können (Best et al. 2011; Best et al. 2013). Mit nichtlinearer Anregung der Fluoreszenz (Heintzmann et al. 2002) sollte es sogar möglich sein, eine Auflösung bis hinunter zu

wenigen zehn Nanometer zu erreichen, ähnlich derjenigen in der STED Mikroskopie realisierten.



**Abb. 12.** Auflösungsverbesserung durch laterale strukturierte Beleuchtung: Proof-of-Principle Anordnung (1998).

*Die durch Beleuchtung eines Gitters mit einer Hg-Lampe erzeugten Beugungsstrahlen 1. Ordnung erzeugten in der Objektebene eine periodische Intensitätsverteilung; die hierdurch angeregte Fluoreszenz-emission wurde von einer CCD Kamera registriert. Mithilfe eines Präzisionstisches wurde das Objekt relativ zum "optischen Gitter" in definierten Schritten bewegt. Aus Heintzmann & Cremer (1999).*

Das in Abb. 12 skizzierte Verfahren der Verbesserung der Auflösung durch laterale Modulation wurde von uns erstmals auf einer Optik-Tagung in San Jose im Dezember 1998 vorgestellt und im zugehörigen Tagungsband publiziert (Heintzmann & Cremer 1999). Dies war im Rückblick gesehen eine gute Entscheidung: Denn gleichzeitig mit uns wurde ein ähnliches Verfahren auch von

Mats Gustafsson in der Arbeitsgruppe von John Sedat in San Francisco verwirklicht (Gustafsson 1999, 2000). Wir haben uns sehr gefreut, dass unser Beitrag von 1999 (obwohl in einem technisch orientierten "Low Impact Journal" erschienen), in der Rechtfertigung des Nobelpreises für Chemie (2014) an Eric Betzig, Stefan Hell und William Moerner zusammen mit dem von Gustafsson als ein wesentlicher Beitrag zur Entwicklung der supraaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie erwähnt wurde (Ehrenberg 2014).

In den letzten Jahren haben wir auf der Grundlage des Structured Illumination Microscopy (SIM) Konzepts von 1999 ein stark verbessertes Mikroskop mit lateraler strukturierter Beleuchtung entwickelt und auf die Analyse von Geweben angewandt (Best et al. 2011); eine Modifikation dieses Systems erlaubte die direkte Verbindung von SIM und Lokalisationsmikroskopie (Rossberger et al. 2013). Erstmals wurde das Prinzip der Auflösungsverbesserung durch laterale Modulation der Fluoreszenzbeleuchtung auch zur Entwicklung eines Structured Illumination Ophthalmoskops genutzt, das supraaufgelöste Bilder der Retina noch aus einem Arbeitsabstand von mehreren cm zulässt (G. Best 2014). Damit ist es möglich geworden, die Retina in Patienten schonend mit bislang nicht erreichter Auflösung zu untersuchen. Diese noch im Gang befindlichen Untersuchungen wurden in enger Zusammenarbeit und mit großzügiger Unterstützung von Prof. Stefan Dithmar (Universitätsklinikum Heidelberg; Augenklinikum Wiesbaden) realisiert.

### **Super-Resolution bei "beliebigem Arbeitsabstand":**

#### **Ein Ausblick**

Zum Schluss möchte ich noch einmal auf die ursprüngliche  $4\pi$ -Mikroskopie Idee zurückkommen: Damals (Cremer & Cremer 1978) haben wir spekuliert, sie sollte eine "Superauflösung" auch bei sehr großen Arbeitsabständen zulassen.

In den letzten Jahren haben wir diese Idee wieder aufgegriffen und umfangreiche numerische Rechnungen hierzu angestellt (Birk et al. 2017). Im Unterschied zu dem Konzept von 1978 haben wir

hier aber in Position und Phase frei variierbare kollimierte Laserstrahlen angenommen, die konstruktiv im Fokus zur Interferenz gebracht werden. Die Rechnungen zeigen, dass mit diesem "Distributed Aperture Verfahren" ein isotroper Fokusbereich von ca. 140 nm möglich ist, und zwar bei grundsätzlich beliebigen Arbeitsabständen (minimaler Abstand Objekt – optische Elemente des Anregungs/Detektionssystems). Bei einem Arbeitsabstand von z.B. 5 cm ergäbe sich im Laserscanningverfahren daraus eine etwa 10,000mal bessere Volumenauflösung als mit der herkömmlichen Konfokalmikroskopie. Auch der STED Modus kann implementiert werden; hierdurch könnte bei "beliebig großen" Arbeitsabständen eine 3D Auflösung von wenigen 10 nm realisiert werden. Dies würde ganz neue Anwendungen ermöglichen, zum Beispiel in der Hirnforschung, oder in den Materialwissenschaften.

Im September 2009 wurde ich emeritiert. Über Forschung und Lehre hinaus habe ich mich in verschiedenen Gremien der Selbstverwaltung engagiert, insbesondere seit 1999 im Senat der Universität, von 2006–2009 als dessen Zweiter Sprecher. Auch nach meiner Emeritierung bin ich der aktiven Forschung eng verbunden geblieben.

### **Schlussbemerkungen**

Kulturgeschichtlich haben Auflösungssteigernde Systeme eine Jahrtausende lange Geschichte und erreichten einen scheinbar nicht mehr zu überbietenden Höhepunkt in den Zeiten von Abbe und Rayleigh. In den letzten Jahrzehnten konnte die für unverrückbar geglaubte Grenze jedoch durch verschiedene Verfahren überwunden werden; gegenwärtig wird der 1 Nanometer Bereich der Auflösung angesteuert, entsprechend 1/500 der Anregungswellenlänge; die Weiterentwicklung ist immer noch in vollem Gange (Birk & Cremer 2016).

Superauflösende Lichtmikroskopiemethoden wurden mit den Worten gewürdigt, diese seien geeignet, Biologie und Medizin zu revolutionieren (Ehrenberg 2014). Den Grund hierfür sprach ein großer Naturdenker und Optik-Pionier bereits vor 200 Jahren aus,

als er auf die enge Verbindung zwischen Nanostrukturen und Leben hinwies. Er schrieb: "Wäre die Natur in ihren leblosen Anfängen nicht so gründlich stereometrisch, wie wollte sie zuletzt zum unberechenbaren und unermesslichen Leben gelangen?" (J.W. Goethe "Aus Makariens Archiv").

### **Danksagung**

Dem Stile von "Erinnerungen" entsprechend, habe ich mich hier auf wissenschaftliche Beiträge aus meiner Arbeitsgruppe fokussiert. Für allgemeine Übersichten des Forschungsgebietes verweise ich auf einige Reviews (siehe "Literaturhinweise").

Zunächst einmal danke ich ganz herzlich den Kolleginnen und Kollegen der Fakultät für Physik und Astronomie, die meine Arbeiten unterstützt haben; mein großer Dank gilt insbesondere den etwa 240 Alumni und Associates aus den Jahren 1983–1999/2011, die zum Forschungsbereich "Angewandte Optik und Informationsverarbeitung" am Institut für Angewandte Physik/Kirchhoff-Institut mit insgesamt rund 300 gemeinsamen Publikationen und rund 50 gemeinsamen Patenten beigetragen haben. Ihre Namen sind zu finden unter

[http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG\\_Cremer/de/content/mitarbeiter](http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer/de/content/mitarbeiter) und

[http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG\\_Cremer/de/content/ehemalige-diplomanden-doktoranden-und-wissenschaftliche-mitarbeiter](http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer/de/content/ehemalige-diplomanden-doktoranden-und-wissenschaftliche-mitarbeiter)

Viele von ihnen haben später eine brillante akademische Karriere gemacht. Für die effektive Organisation der Arbeitsgruppe bin ich vor allem Michael Hausmann, Gregor Kreth und Margund Bach zu großem Dank verpflichtet.

Hinzu kommen noch ca. 50 weitere Mitwirkende aus den Jahren 1970–1979 an der Universität Freiburg; 1980–1982 am Lawrence Livermore National Laboratory (hier sei insbesondere Prof. Mort Mendelsohn, Dr. Marvin van Dilla und Prof. Joe Gray gedankt); 2011–2017 am Institut für Molekulare Biologie (IMB) Mainz bzw. am Institut für Pharmazie und Molekulare

Biotechnologie (IPMB) Univ. Heidelberg. Leider war es unmöglich, ihre Beiträge im Einzelnen hier aufzuführen. Als Beispiele mögen hier zwei "Erinnerungsphotos" genügen (Abb. 13). Zur Würdigung ihrer Leistungen soll aber im Anhang eine Zusammenstellung der gemeinsamen Publikationen dienen. Diese Liste enthält Hinweise auch auf weitere Forschungsaktivitäten, die hier nicht beschrieben werden konnten.



**Abb. 13.** Die Arbeitsgruppe "Angewandte Optik und Informationsverarbeitung" im Jahre 2004.

*Vordere Reihe: Udo Birk-Spöri, David Baddeley, Jutta Finsterle, Christian Wagner, Helmut Schneider, Jürgen Reymann, Gregor Kreth, Susanne Fenz; Hintere Reihe: Heinz Eipel, Claudia Batram, Johann v. Hase, Hans Mathee, Constance Grossmann, Christian Carl, Margund Bach, Stefan Stein, Senthilkumar Pazahanisamy, Andreas Schweitzer, Werner Stadter, Nick Kepper (von links).*

Ebenfalls möchte ich den Mitgliedern/Associates meiner Arbeitsgruppe am IMB/IPMB (2010–2017) herzlich für ihre großartige Arbeit danken: Es sind dies Priv. Doz. Dr. Udo Birk, Sven Beichmanis, Shih-Ya Chen, Maxim Gachkivsky, Amine Gourram, Irma Gryniuk, Fabian Jung, Hyun-Keun Lee, Dongyu Ma, Jan Neumann, Paulina Nowak, Alexander Al Saroori, Dr. Wladimir Schaufler, Florian Schock, Abhijit Marar, Dr. Ramon Lopez Perez,

Dimka Pieper-Kastreva, Dr. Franziska Polanski, Dr. Kirti Prakash, Mariia Rybak, Dr. Aleksander Szczurek, Dr. Johann von Hase, Dominik Waibel, Yangyi Wang, Ada Wawrzyniak, Julita Wesolowska, Jun Xing, Mei Yu, Aneliya Yoveva, Sebastian Zeis, und Dominika Zurek-Biesiada, siehe auch Abb. 14.



**Abb. 14.** Die Arbeitsgruppe "Super-Resolution Microscopy" im Jahre 2016.

*Von links: Jan Neumann, Amin Gourram, Udo Birk, Shiy-Ya Chen, Aleksander Szczurek, Florian Schock, Yangyi Wang, Christoph Cremer, Maxim Gachkivsky, Wladimir Schaufler; nicht im Bild: Johann v. Hase, Paulina Nowak, Ada Wawrzyniak.*

Sehr herzlich danken möchte ich den vielen Förderern meiner akademischen Laufbahn, allen voran meinem Vater Prof. Hubert Cremer (RWTH Aachen), sowie Prof. Werner Heisenberg (MPI für Plasmaphysik München) und Prof. Carl-Friedrich v. Weizsäcker (München). Ihnen verdanke ich es, dass ich nach einigem Schwanken der Faszination der Physik erlegen bin. Vielfältige weitere Unterstützung erfuhr ich auch von Prof. Helmut Baitsch (DFG/Univ. Ulm); Prof. Herbert Fischer (MPI Immunbiologie Freiburg); Prof. Siegfried Flügge (Univ. Freiburg); Prof. Wolfgang Grassmann (MPI Biochemie München); Prof. Joe Gray (U California); Prof. Michael Grunze (Univ. Heidelberg); Prof. Barbara Knowles (Jackson Laboratory/ME); Prof. Winfried Krone (Univ. Ulm); Prof. Hans Maier (Univ. München); Prof. Mort Mendelsohn (Univ. California/Livermore); Dr. Lili Schoeller (Freiburg);

Prof. Christian Streffer (Univ. Freiburg/Essen); Prof. Ted Young (Univ. Delft); Prof. Udo Wolf (Univ. Freiburg). Danken möchte ich auch den Förderinstitutionen (insbesondere BMBF, DFG, EU, Keck Foundation, Land Baden-Württemberg, National Institutes of Health/USA, National Science Foundation/USA, Carl Zeiss), die meine wissenschaftliche Arbeit über die Jahre mit insgesamt vielen Millionen DM bzw. Euro großzügig unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Bruder Prof. Dr. med. Thomas Cremer (1995–2010 Lehrstuhl für Anthropologie und Humangenetik LMU München), meinem lebenslangen Hauptforschungspartner. Ihm verdanke ich ganz wesentliche, heute noch fortdauernde Anregungen zu meiner wissenschaftlichen Arbeit, mit rund hundert gemeinsamen Publikationen. Als weitere Hauptkooperationspartner möchte ich nennen: Marion Cremer, U München (LMU); Stefan Dithmar, U Heidelberg; Jurek Dobrucki, U Cracow; Joe Gall, Carnegie (USA); Joe W. Gray, Livermore/San Francisco; Michael Hausmann, U Heidelberg; Rainer Heintzmann, U Jena; Stefan Hell, MPI Göttingen/U Heidelberg; Peter Huber/DKFZ, Christiane Nüsslein-Volhard (Tübingen); Rainer Kaufmann, Oxford/U Hamburg; George Reid, IMB/EMBL; Karsten Rippe (DKFZ); Markus Sauer (U Würzburg); Ernst Stelzer (EMBL/U Frankfurt); L. Trakhtenbrot (Tel Hashomer/Israel).

Vortrag gehalten an der Fakultät für Physik und Astronomie der Universität Heidelberg am 29. Juni 2017.

### **Literaturhinweise**

- C. Cremer (2008), Vorstoß in den Nanokosmos: Neue Mikroskope überschreiten für bislang unüberwindlich gehaltene Grenzen. *Ruperto Carola* (Forschungsmagazin Universität Heidelberg) 3/2008: 4–12.
- C. Cremer (2011), Lokalisationsmikroskopie – Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits. *Physik in unserer Zeit* 42: 21–29.

- C. Cremer (2011), Mikroskope und Mikroben. In: Karlheinz Sonntag (Hg.) Viren und andere Mikroben: Heil oder Plage? Zum 100. Todestag von Robert Koch, 99–135. Universitätsverlag Winter, Heidelberg.
- C. Cremer, R. Kaufmann, M. Gunkel, S. Pres, Y. Weiland, P. Müller, T. Ruckelshausen, P. Lemmer, F. Geiger, S. Degenhard, C. Wege, N. A. W. Lemmermann, R. Holtappels, H. Strickfaden, M. Hausmann (2011), Superresolution imaging of biological nanostructures by spectral precision distance microscopy, *Biotechnology* 6: 1037–1051.
- C. Cremer, B. R. Masters (2013), Resolution enhancement techniques in microscopy. *Eur. Phys. J. H* 38: 281–344.
- C. Cremer, A. Szczurek, F. Schock, A. Gourram, U. Birk (2017), Superresolution microscopy approaches to nuclear nanostructure imaging. *Methods* 123: 11–32.
- T. Cremer, M. Cremer, C. Cremer (2016) Chromosomenterritorien und Chromatindomänen. *Biologie in unserer Zeit* 5: 290–299.

Für eine vollständige Liste der in dem Beitrag genannten Veröffentlichungen und weitere Informationen siehe

<http://www.imb-mainz.de/en/research-at-imb/cremer/research/>  
sowie [www.optics.imb-mainz.de](http://www.optics.imb-mainz.de)