

Laser-Mikroskopie in Histochemie und Zellbiologie

K.-J. Halbhuber, K. König

Die Laser-Mikroskopie in ihrer gesamten Breite bietet viele Möglichkeiten für die Biomedizin. In den letzten Jahren hat sie die Aussagekraft morphologischer und zellbiologischer Verfahren im Hinblick auf sensitive und präzise Lokalisation und Erfassung von natürlichen Zelleigenschaften in situ (Enzymaktivität, Antigenizität, Mobilität, Vitalität) revolutioniert. Auch die experimentelle Beeinflussung und das Handling vitaler Einzelzellen ist durch die Laser-Mikroskopie einfacher geworden. Ihr Einsatz als geeignetes Instrumentarium im Dienst medizinischer Diagnostik und Therapie wird in absehbarer Zeit möglich sein.

Histochemie

Lichtmikroskopisch-histochemische Methoden sind in der heutigen modernen Morphologie und Zellbiologie ebenso essentiell wie in der klinisch orientierten Biopat-Diagnostik. Der hohe Stellenwert ist begründet durch die besondere *Leistungsfähigkeit*: Es können damit Biomoleküle hochsensibel erfaßt und deren biologische Eigenschaften in ihrer natürlichen strukturellen Umgebung belegt werden. Der ortsgetreue Nachweis in Kryostat-, Paraffin- oder Kunststoff-schnitten gelingt in der Regel mit ausgefeilten immunhistochemischen Techniken, während durch die An-

wendung katalytisch-histochemischer Verfahren enzymatische Aktivitäten sichtbar gemacht werden können.

In beiden Fällen werden *hohe Anforderungen* an die Histochemie gestellt: hohe Sensibilität, geringe Artefaktanfälligkeit (Vermeidung von Affinitäts- und Diffusionsartefakten) und maximale Spezifität (Selektivität). Dies kann nur erreicht werden, wenn das *primäre Reaktionsprodukt* einerseits und die *Visualisationsreaktion* andererseits optimiert wurden. Im Falle einer immunhistochemischen Reaktion wird der terminale Antikörper entweder fluorophor- oder enzym-

phatase, Peroxidase). Beide Möglichkeiten sind nahezu gleichwertig.

Zur Detektion von *Enzymaktivitäten* hat sich neuerdings *Cerium III* als Fällungs-(Capture-)Agens bewährt [1]. Hierdurch kann beispielsweise eine wichtige Enzymklasse, die *Phosphohydrolasen*, licht- wie auch elektronenmikroskopisch besonders qualifiziert und zuverlässig in Schnitten und Einzelzellen abgebildet werden. Dazu wird das enzymatisch aus dem Substrat freigesetzte anorganische Phosphat durch freie Cerium-Kationen zu fein amorphem, weißlich getöntem Cerium-III-Phosphat besonders schnell gefällt (*primäres enzymatisches Reaktionsprodukt, PRP*).

Auch *H₂O₂-generierende Oxidasen* (D-Aminosäureoxidase, Uratoxidase, Monoaminoxidase u. a.) können zuverlässig mit diesem Capture-Agens histochemisch lokalisiert werden (Abb. 1). Das freigesetzte H₂O₂ reagiert schnell mit Cerium-III-Kationen zu dem schwerlöslichen, gelblich gefärbten PRP Cerium-III/IV-Perhydroxid. Peroxidase- und Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität lassen sich ortsgerecht besonders sensitiv über die Bildung von tiefbraunem Cerium- oder blau-schwarzen Nickel-DAB-Komplexen als PRP visualisieren [1, 2].

Konfokale Reflektanz-Laser- Scanning-Mikroskopie

Cerium-generierte PRP lassen sich an Vibratom- und Kryostatschnitten

Abb. 1: Uratoxidase, Leber, Ratte. Reflektanzmode, Ar⁺-Laser. Cerium-IV-PRP in den Peroxisomen der Hepatozyten zeigen eine deutliche Enzymreaktion. Balken: 25 µm.

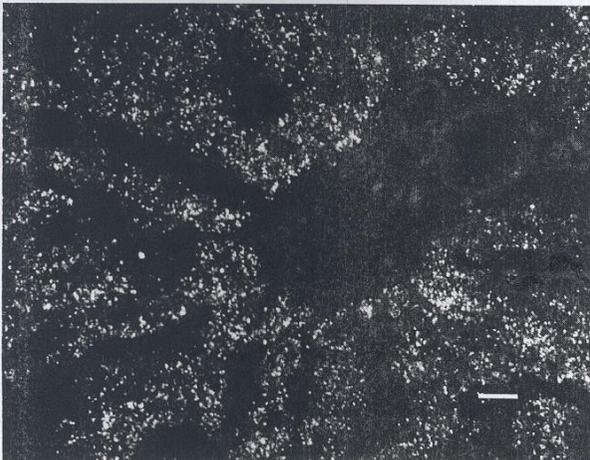
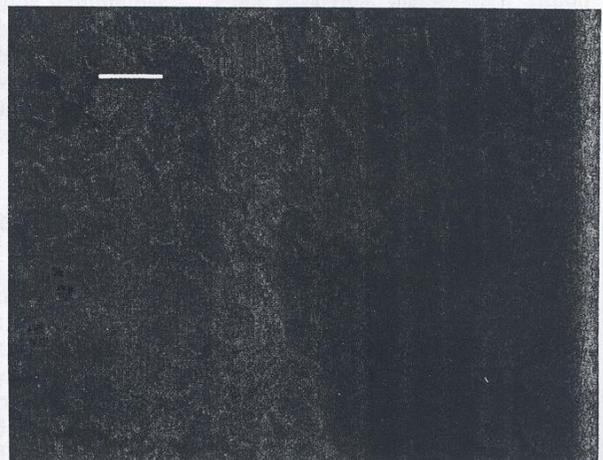


Abb. 2: 5'-Nucleotidase, Leber, Ratte. Reflektanzmode (rot) – Autofluoreszenz (grün), Falschfarben-Overlay, Ar⁺-Laser. Cerium-IV-PRP ist reichlich vorhanden im Bereich der Sinusendothelien und im Bindegewebe um eine Zentralvene. Balken: 25 µm.



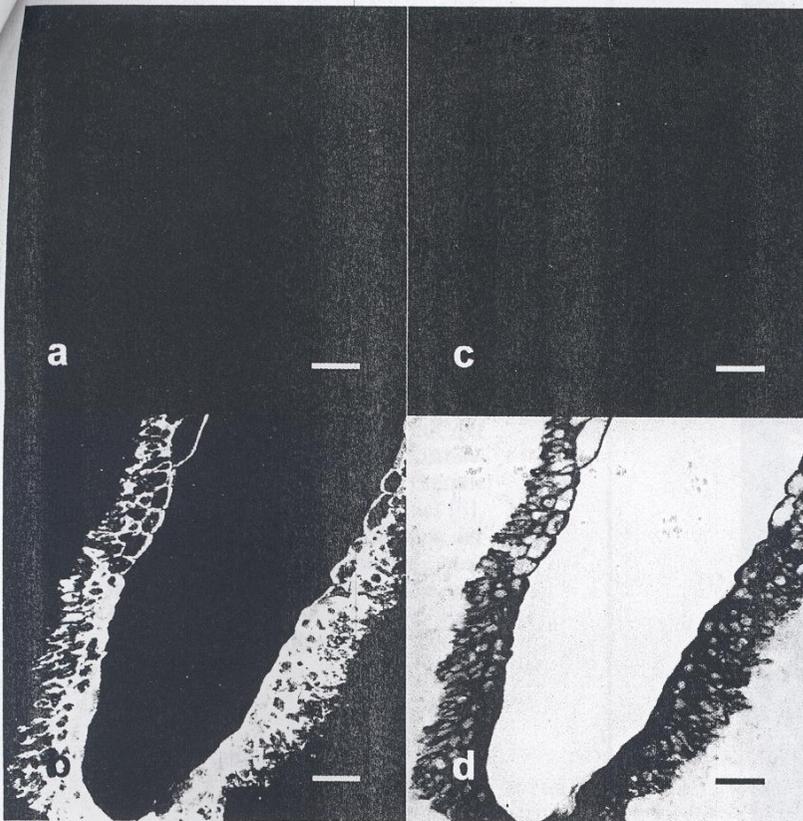


Abb. 3: Immunhistochemische Darstellung von Cytokeratin (monoklonaler Pancytokeratin-Antikörper KL1) in Epithelzellen des Übergangsepithels, menschlicher Ureter. APAAP-Technik. Cerium-IV-PRP. Balken: 25 μ m.
 a: Reflektanz, Falschfarben – Autofluoreszenz-Overlay,
 b: selektive Reflektanz,
 c: Transmission, Falschfarben – Autofluoreszenz-Overlay,
 d: selektive Transmission.

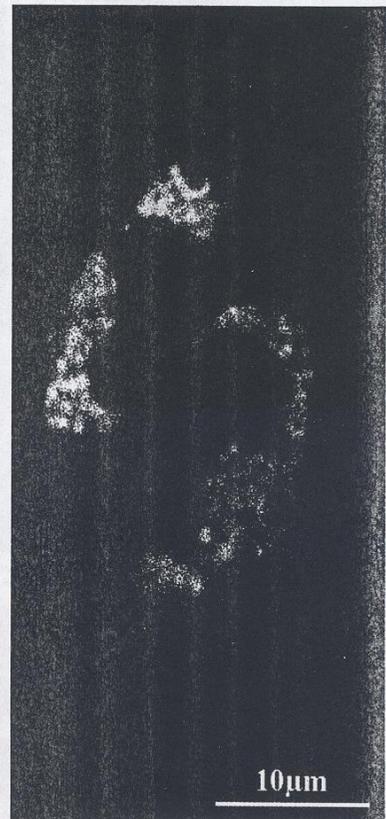


Abb. 4: Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz des Mitochondrienmarkers Rhodamin 123 in vitalen Chinesischen-Hamster-Ovarienzellen mittels Femtosekunden-NIR-Mikroskop (Anregungswellenlänge: 777 nm).

besonders eindrucksvoll mit der Laser-Scanning-Mikroskopie erfassen. Unter Ausnutzung des *konfokalen Abbildungsprinzips* können sehr geringe Mengen PRP in 30–60 μ m dicken Vibratomschnitten, in 3–10 μ m dicken Kryostatschnitten oder in Paraffinschnitten im *Reflektanzverfahren* – also unter Ausnutzung der vom Präzipitat reflektierten/rückgestreuten Laser-Photonen (Argon-Ionen-Laser [Ar⁺-Laser], 488 nm) – mit hoher räumlicher Auflösung erfaßt und abgebildet werden.

Gegenüber konventioneller Lichtmikroskopie ergeben sich daraus folgende *Vorteile*:

1. Screening des PRP-Verteilungsmusters in Schnitten und Einzelzellen mit der Option einer 3D-Analyse („optical sectioning“),
2. größere Auflösung und damit feinere Lokalisation,
3. gesteigerte Empfindlichkeit und damit Erfassung geringerer PRP-

Mengen und PRP-Konzentrationen.

Umfangreiche Untersuchungen ergaben, daß Cerium-IV-haltige PRP eine höhere Reflektanzintensität aufweisen als ihre Cerium-III-Derivate. Es empfiehlt sich daher, die inkubierten Schnitte einer *Oxidation* unmittelbar vor der Laser-Mikroskopie zu unterziehen [2]. Durch Falschfarben-Overlay kann deutlich zwischen Cerium-IV-PRP in der Reflektanzmethode und Autofluoreszenz unterschieden werden (Abb. 2).

Laser-Transmissions-Mikroskopie

Cerium-IV-PRP sind in der Regel gelblich-braun getönt und absorbieren daher 488 nm-Photonen der Ar⁺-Laser-Strahlung, wodurch eine sensitive Transmissions-Mikroskopie möglich wird (Abb. 3). Da der Transmissionsmode die Eigenschaft der

Konfokalität entbehrt, sollten *möglichst dünne Schnitte*, z. B. 0,5–1 μ m dicke Kunststoffschnitte (z. B. Epon), untersucht werden. Bei hinreichend dünnen Schnitten sind Abbildungen mit hohem Kontrast und hoher Schärfe möglich. Der Kontrast der PRP kann zusätzlich elektronisch erhöht werden (digitale Kontrasterhöhung). Besonders bewährt hat sich das Verfahren auch zur Darstellung *fragmentierter DNA* in Kernen von Zellen, die sich im Stadium der Apoptose (programmierter Zelltod) befinden [3].

Laser-Skalpell

Neben der beschriebenen Anwendung von Laser-Mikrostrahlen als analytisches Werkzeug werden fokussierte Laser-Strahlen auch als *destruktives bzw. mikrochirurgisches Werkzeug* („intrazelluläres Laser-Skalpell“) eingesetzt.

Tschachotin beschrieb bereits 1912 eine Methode zur Fokussierung konventioneller UV-Quellen, die er für eine selektive Zellzerstörung einsetzte [4]. Mit der Entwicklung des Lasers, insbesondere *gepulster Laser-Quellen*, wurde die selektive und effiziente Destruktion im Submikrometer-Bereich möglich. Zwei Jahre nach dem Bau des ersten Lasers bestrahlte Bessis Zellen mit fokussierter Strahlung eines Rubin-Lasers [5]. In den Jahren 1965 und 1969 wurde in „Science“ bzw. „Nature“ über die Laser-induzierte Zerstörung einzelner Mitochondrien bzw. Chromosomen berichtet [6, 7].

Neue Applikationen wurden mit der Verwendung von Laser-Mikrostrahlen zur *Mikroinjektion* von Fremd-DNA und zur Zellfusion eröffnet [8]. Die beschriebenen Applikationen der Laser-Mikroskopie beruhten ausnahmslos auf der Verwendung von Laser-Strahlung im *UV- und VIS-Spektralbereich* (Reviews z. B. [9, 10]).

Laser-Pinzette

Bereits 1619 vertrat Kepler die Hypothese, daß die Ablenkung des Kometenschweifs durch den *Druck der Sonnenstrahlung* verursacht wird. 1901 erfolgte durch Lebedev der erstmalige experimentelle Nachweis des Lichtdruckes. Der Sonnenstrahl-Druck, eine der wesentlichen Mechanismen der interstellaren Partikeldynamik, beträgt auf der Erdoberfläche jedoch nur geringe Werte im ng/cm^2 -Bereich. Erst durch den Druck der Laser-Strahlung konnten optische Kräfte generiert werden, die für die optische Mikromanipulation von Atomen bis zu Teilchen im Mikrometerbereich genutzt werden konnten.

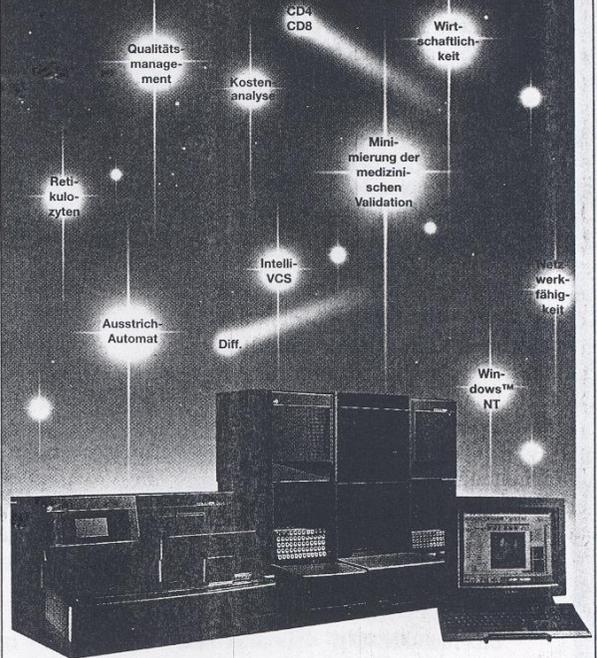
Von ersten Applikationen des Laser-Lichtdruckes wurde 1970 durch Ashkin berichtet [11]. Ihm gelang die Beobachtung, daß mikrometergroße dielektrische Kügelchen durch den Druck eines schwach fokussierten Ar^+ -Lasers (488 nm, 19 mW) in den Laser-Strahl gezogen und in Strahlrichtung *beschleunigt* werden konnten. Durch zwei entgegengesetzt gerichtete Strahlen wurde die Sphäre an einem Ort „fixiert“. 1986 konnte durch die Einführung der *Gradientenfalle* unter Verwendung eines einzelnen Ar^+ -Mikrostrahls eine stabile Lichtfalle (optische Falle) konstruiert werden [12].

Wenn aus Anspruch und Illusion Wirklichkeit wird

Lernen Sie das hämatologische System der Zukunft kennen -

das auf einzigartige Weise alle Proben- sowie Differentialblutbildergebnisse, Retikulozyten und CD4/CD8-Analysen vollautomatisch durchführt.

Kostenneutrale Integration in bestehende Laborstrukturen ist selbstverständlich



Lassen Sie sich in das Labor 2000 entführen

Veranstaltungen	Datum	Ort
	06.11.1996	DVTA-Fortbildung Hämatologie, Homburg
	20.-23.11.1996	MEDICA '96, Düsseldorf

Wir freuen uns über Ihren Besuch anlässlich der **MEDICA '96** in Halle 2, Stand 2 B 28

Lernen Sie den neuen **COULTER® AC•T8** kennen: extrem kleiner Anspruch für extrem große Leistung, 8 Parameter mit nur 12 µl Venen- bzw. Kapillarblut.

Ein guter Grund, das Blutbild selbst in die Hand zu nehmen

COULTER
aus Tradition besser

COULTER ELECTRONICS GMBH

Europark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld, Telefon: 02151/333-5, Telefax: 02151/333-633

Erste Applikationen dieser *Lichtfalle* bezüglich der Mikromanipulation biologischer Objekte erfolgten zunächst mit dem ungeeigneten 488-nm-Mikrostrahl [13]. Der „Durchbruch“ für biologische Applikationen der Lichtfalle wurde im gleichen Jahr mit der Verwendung eines Mikrostrahls im *Nahen Infrarot* (NIR, 700–1200 nm) erzielt [14]. Durch den Einsatz von NIR-Mikrostrahlung im „Optischen Fenster“ von biologischen Zellen wurde erstmals eine *kontaktfreie, sterile, minimal-invasive Mikromanipulation von Zellen* und auch von Zellbestandteilen im Innern der ungeöffneten Zelle möglich [15].

Typischerweise liegen die durch die Optische Falle induzierten *Kräfte im Pico-Newton-(pN-)Bereich*. Durch geeignete Fokussierung eines einzelnen NIR-Strahles ist die Erzeugung von Kräften in Gegenstrahlrichtung und die Konstruktion einer räumlich stabilen Gradientenfalle möglich. Dadurch können Zellen eingefangen und *stabil positioniert* werden. Erstmals wird damit eine Vielzahl von Untersuchungen an mobilen Einzelzellen möglich. Durch Strahlverschiebung wird zudem eine *gesteuerte 3D-Positionierung der Zelle/Zellorganelle* gewährleistet. Dies wird beispielsweise in der Laser-gestützten In-vitro-Fertilisation genutzt, bei der im Fall männlicher Infertilität einzelne Spermzellen geringer intrinsischer Bewegungskraft kontrolliert der Eizelle zugeführt werden.

Die direkte Proportionalität von Trapping-Kraft und In-situ-Laser-Leistung ermöglicht den Einsatz der Lichtfalle als *Optischen Kraftmesser*. Die in Gradientenfallen generierten

Glossar

Laser

Lichtverstärker (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). 1960 gelang es, die Emission von Lichtstrahlen gezielt zu induzieren. Neben Festkörper-Lasern (Rubin, Neodymglas) werden Gas-Laser (Helium-Neon, Argon), Halbleiter-Laser sowie Farbstoff-Laser eingesetzt. Laser-Licht zeichnet sich durch Monochromasie, Kohärenz, geringe Divergenz, extreme Leistungsdichte und hohe Fokussierbarkeit aus. Dies ermöglicht eine Konzentration von Energie auf kleinste Flächen.

Scanning

Bei der Laser-Scanning-Mikroskopie wird das zu untersuchende Objekt punktweise mit einem fokussierten Laser-Strahl abgetastet und das sekundäre Licht über Photomultiplier gemessen. Bei Reflektanz werden die vom Objekt rückgestreuten, bei Transmission die vom Objekt reflektierten/durchgelassenen Laser-Photonen gemessen. Zudem kann die induzierte Fluoreszenzstrahlung erfaßt und quantifiziert werden. Aus den Daten kann ein digitales Bild rekonstruiert werden.

konfokal

Durch entsprechende Blendenanordnung ist es möglich, Fluoreszenzlicht und reflektiertes/rückgestreutes Licht aus nur einer Fokusebene zu detektieren; es entsteht ein sog. optischer Schnitt. Mehrere solcher Schnitte in verschiedenen Tiefen können die Information für ein dreidimensionales Bild liefern.

pN-Trapping-Kräfte liegen im Bereich zellulärer Kräfte, wie z. B. die der „Motorproteine“ Myosin, Dynein und Kinesin. Die Trapping-Kräfte ermöglichen das *Stretching* (Dehnen) von *Makromolekülen* wie DNA oder RNA und den kontrollierten *intrazellulären Transport* von Zellorganellen [16].

NIR-Gradientenfallen wurden zur Charakterisierung verschiedener Zellfunktionen genutzt: den Rotationsmotor in begeißelten Bakterien [17], die Kräfte für den Organellen-Transport [18], das Bewegungsprotein Kinesin [19] sowie die Elastizitätseigenschaften der DNA [20, 21, 22]. König et al. bestimmten mit 800-nm-Laser-Fallen die lineare Bewegungskraft humaner Spermzellen zu ~40 pN [23].

Zwei-Photonen-Mikroskopie

Photonenflußdichten von mehr als 10^{24} Photonen $\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ermöglichen eine sog. Zwei-Photonen-Anregung, die auf der simultanen Absorption zweier NIR-Photonen basiert. So erlaubt beispielsweise die Zwei-Photonen-Absorption von NIR-Photonen im Spektralbereich 700–800 nm die Anregung von *endogenen und exogenen Chromophoren*, die im Fall geringer Photonenflußdichten nur Strahlung im UVA-Bereich (320–400 nm) absorbieren. NIR-Mikrostrahlung hoher Photonenflußdichte kann somit z. B. durch Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz neuartige zelldiagnostische Methoden ermöglichen.

Die Möglichkeit der Multiphotonen-Anregung elektronischer Zustände wurde 1931 durch Frau Maria Göppert-Meyer vorausgesagt [24], mit der Bereitstellung von Lasern 1961 realisiert [25] und für die *Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie* erstmals 1990 genutzt [26]. König et al. demonstrierten Zwei-Photonen-angeregte Fluoreszenz mittels Lichtfallen geringer Leistung [27].

Die Zwei-Photonen-NIR-Mikroskopie erweist sich als zukunftssträchtige neuartige Methode in der Diagnostik von Vitalzellen und stellt möglicherweise eine wesentliche Verbesserung gegenüber konventioneller UVA-Mikroskopie dar. Insbesondere wird die *Gesamtstrahlungsbelastung gering* gehalten, da eine Absorption der NIR-Photonen außerhalb des Fokusbereiches vermieden wird und eine



**Instrumentation
Laboratory**

Blutgas
Gerinnung
Klinische Chemie

Klausnerring 4
85551 Kirchheim
Tel.: 089 - 90907 - 0
Fax.: 089 - 90907 - 116

Quantex ASO
CRP
RF

biokit

Fluorophor-Anregung nur in einem geringen Anregungsvolumen hoher Photonenflußdichte von ca. 0,1 Femtoliter erfolgt. Durch die Abwesenheit von „out-of-focus“-Fluoreszenz wird Untergrundfluoreszenz vermieden (Abb. 4).

Mittels Laser-Scanning unter Ausnutzung von Femtosekunden-Pulsen hoher Repetitionsrate (ca. 100 MHz) wird eine effiziente 3D-Darstellung ohne Einführung von Lochblenden möglich und damit eine vollkommen neuartige Alternative zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie geschaffen [28]. Zudem kann durch die Verwendung ultrakurzer Pulse die ortsabhängige Fluoreszenzabklingzeit prinzipiell erfaßt und somit die Möglichkeiten konventioneller Fluoreszenzmikroskopie wesentlich erweitert werden [29]. Durch die Bereitstellung kommerziell erhältlicher modensynchronisierter Ti:Sa-Laser mit Pulsbreiten im Femtosekunden-Bereich stehen effiziente Anregungsquellen für Zwei-Photonen-Mikroskope zur Verfügung. Diese Anregungsquellen werden durch die gegenwärtige Entwicklung kompakter Festkörper-Femtosekunden-Laser demnächst wesentlich an Attraktivität gewinnen. ■

Literatur

1. Halbhuber, K. J., Hulstaert, C. E., Feuerstein, H., Zimmermann, N.: Cerium as capturing agent in phosphatase and oxidase histochemistry. *Progress in Histochem. Cytochem.*, Vol. 28/1, 120 pages, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York (1994).
2. Halbhuber, K. J., Scheven, Ch., Jirikowski, G., Feuerstein, H., Ott, U.: Reflectance enzyme histochemistry (REH): visualization of cerium-based and DAB primary reaction products of phosphatases and oxidases in cryostat sections by confocal laser scanning microscopy. *Histochem. Cell. Biol.* 105: 239–249 (1996).
3. Aschoff, A. P., Jantz, M., Jirikowski, G. F.: In situ and labeling with bromodesoxyuridine, an advanced technique for visualization of apoptotic cells in histological specimen. *Hormone Metabol. Res.* 1996 (in press).
4. Tschachotin, S.: Die Mikroskopische Strahlenstrichmethode, eine Zelloperationsmethode. *Biol. Centralblatt* 32: 623–626 (1912).
5. Bessis, M., Gires, F., Mayer, G., Normarski, G.: Irradiation des organites cellulaires a l'aide d'un laser a rubis. *C. R. Acad. Sci.* 255, 1010–1012 (1962).
6. Amy, R. L., Storb, R.: Selective mitochondrial damage by a ruby laser microbeam: An electron microscope study. *Science* 150: 756–757 (1965).
7. Berns, M. W., Olson, R. S., Rounds, D. E.: In vitro production of chromosomal lesions using an argon ion laser microbeam. *Nature* 221: 74–75 (1969).
8. Schierenberg, E.: Altered cell-division rates after laser-induced cell fusion in nematode embryos. *Dev. Biol.* 101: 240–245 (1984).

9. Berns, M. W.: Biological microirradiation. *Classical and laser sources.* Prentice-Hall Intern., Enlewood Cliffs, New Jersey (1974).
10. Kasuya, T., Tsukakoshi, M.: Laser microirradiation of cells. *Harwood Academic Publ., Chur.* (1989).
11. Ashkin, A.: Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* 24: 156–159 (1970).
12. Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., Chu, S.: Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* 11: 288–290 (1986).
13. Ashkin, A., Dziedzic, J. M.: Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235: 1517–1520 (1987a).
14. Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Yamane, T.: Optical trapping and manipulation of single cells using red laser beams. *Nature* 330: 769–771 (1987b).
15. Ashkin, A., Dziedzic, J. M.: Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 86: 7914–7918 (1989).
16. Svoboda, K., Block, S. M.: Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 247–285 (1994).
17. Block, S. M., Blair, D. F., Berg, H. C.: Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature* 338: 514–518 (1989).
18. Ashkin, A., Schultze, K., Dziedzic, J. M., Euteneuer, U., Schliwa, M.: Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature* 348: 346–348 (1990).
19. Kuo, S. C., Scheetz, M. P.: Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science* 260: 232–234 (1993).
20. Chu, S.: Laser manipulation of atoms and particles. *Science* 253: 861–866 (1991).
21. Perkins, T. T., Smith, D. E., Chu, S.: Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain. *Science* 264: 819–822 (1994a).
22. Perkins, T. T., Quake, S. R., Smith, D. E., Chu, S.: Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science* 264: 822–826 (1994b).
23. König, K., Svaasand, L., Liu, Y. et al.: Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap. *Cell. Mol. Biol.* 42 (4): 501–509 (1996a).
24. Göppert-Meyer, M.: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Göttinger Dissertation. Ann. Phys.* 9: 273–294 (1931).
25. Kaiser, W., Garrett, C. G. B.: Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.* 7(6): 229–231 (1961).
26. Denk, W., Strickler, J. H., Webb, W. W.: Two-photon laser scanning fluorescence microscope. *Science* 248: 73–76 (1990).
27. König, K., Liang, H., Berns, M. W., Tromberg, B.: Cell damage by near-IR microbeams. *Nature* 377 (7): 20–21 (1995).
28. Denk, W., Piston, D. W., Webb, W. W.: Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy. In: J.B. Pawley: *Handbook of biological confocal microscopy.* Second edition. Plenum Press, New York, London: 445–458 (1995).
29. König, K., So, P. T. C., Mantulin, W. W., Tromberg, B. J., Gratton, E.: Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J. Microsc.* 183(3): 205–214 (1996b).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. med. habil.

Karl-Jürgen Halbhuber

Dr. rer. nat. Karsten König

Klinikum der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Institut für Anatomie/Anatomie II

Teichgraben 7

D-07743 Jena

Fakten & Thesen

- Die Laser-Mikroskopie ermöglicht eine sensitive und präzise Lokalisation und Erfassung von natürlichen Zelleigenschaften in situ (Enzymaktivität, Antigenizität, Mobilität, Vitalität).
- Laser-Skalpell und Laser-Pinzette haben die experimentelle Beeinflussung und auch das Handling vitaler Einzelzellen in vitro revolutioniert.
- Die Anwendung der Laser-Mikroskopie als geeignetes Instrumentarium im Dienst medizinischer Diagnostik und Therapie wird in absehbarer Zeit möglich sein.
- Die Zwei-Photonen-Absorption von NIR-Photonen erlaubt im Spektralbereich von 700–800 nm die Anregung von endogenen und exogenen Chromophoren, die im Fall geringer Photonenflußdichten nur Strahlung im UVA-Bereich (320–400 nm) absorbieren.
- Die neuartigen Zwei-Photonen-Femtosekunden-Mikroskope erlauben eine 3D-Darstellung von Zellen und Zellbestandteilen ohne Einführung von Lochblenden.