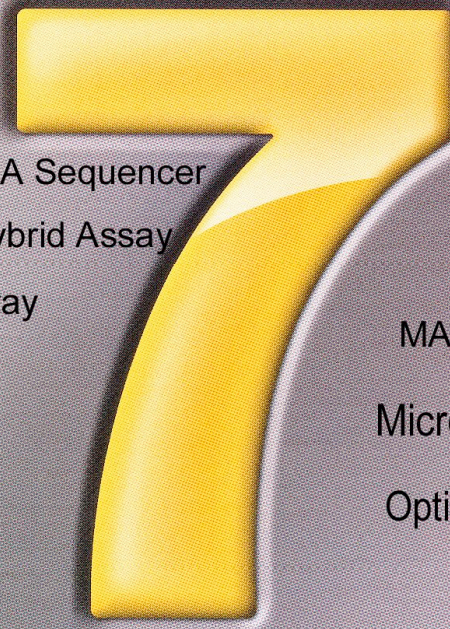


August 29, 2005

August 29, 2005 | Vol. 19 | No. 16 | www.the-scientist.com

The **Scientist**



Automated DNA Sequencer

Yeast Two-Hybrid Assay

DNA Microarray

BLAST

MALDI

Microfluidics

Optical Trap

TECHNOLOGIES

THAT ARE TRANSFORMING THE LIFE SCIENCES

Laser Mikrostrahl und optische Pinzette –

zum Bearbeiten und Bewegen von Mikroobjekten- von den physikalischen Grundlagen bis zur Anwendung der Altersforschung

Wie spricht man Schüler und eine breite Öffentlichkeit an ?



JUNI 2008 **PROG**

Dienstag, 24. Juni 2008 | 19 Uhr

**Laserkanonen und -beamer
Laboralltag für Zellbiologen**

Referent: Prof. Dr. Karl-O. Greulich
Die Verwendung von Lasern als Nanoskalpell oder als optische Pinzette in der Zellbiologie sind nur zwei von vielen Beispielen, wie schnell und präzise man mit Licht arbeiten kann, auch im Inneren lebender Zellen. Allgemein spricht man in diesem Zusammenhang auch von der Forschungsrichtung Biophotonik, die sich mit der Anwendung lichtbasierter Technologie auf Fragestellungen in Medizin und Lebenswissenschaften befasst. Ein Ziel der Biophotonik liegt darin, neue Strategien zur Bekämpfung von Krankheiten zu entwickeln. Zur Erreichung dieses Zieles müssen Mediziner, Naturwissenschaftler und Technologen eng miteinander zusammenarbeiten. Der Vortrag findet im Rahmen der Sommerschule der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät und des Beutenberg-Campus e. V. statt. Interessierte sind herzlich eingeladen.



Veranstalter:	Friedrich-Schiller-Universität
In Kooperation mit:	Beutenberg-Campus. e. V.
Ort:	Döbereiner Hörsaal
Eintritt:	kostenfrei
Internet:	www.450.uni-jena.de

Einladung zum Vortrag

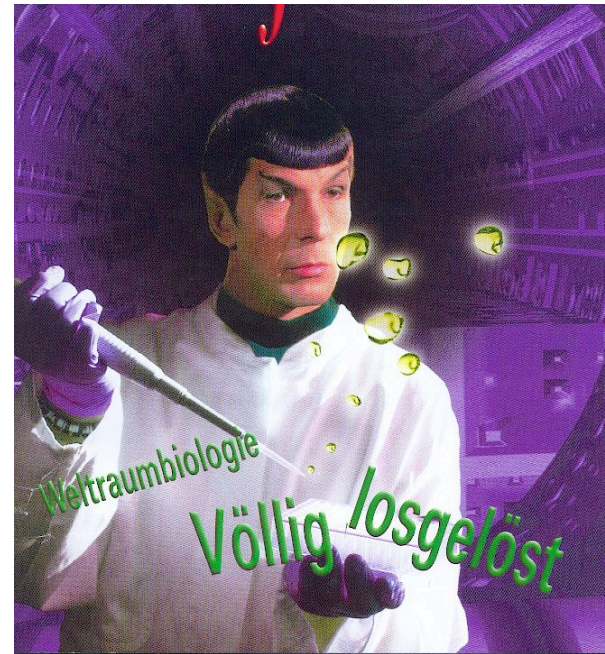
Laserkanonen und Beamen

Wie damals, an der
Jahrtausendwende alles
begann.....

Vortragender

Hans Werner **Spock**

Intergalaktische Flotte



Heidelberg 14.März 2309, 9 Uhr
Captain Kirk Bibliothek

Wie damals, an der Jahrtausendwende, alles begann.....

In der Frühzeit der Weltraumtechnologien konnte man noch nicht die enormen Energien speichern und handhaben, die heute in Laserkanonen eingesetzt werden und man hatte noch nicht die Techniken um Objekte zu dematerialisieren und dann zu transportieren

Man konnte aber in der Welt der Mikroskopie bereits alle Funktionen ausführen, die eine Laserkanone heute noch erfüllt, und man kannte eine Frühform des Beamens, den Transport von Objekten auf einem Lichtstrahl.

Erstaunlicherweise wurden diese Techniken nicht in der Weltraum – oder Militärforschung eingesetzt, sondern in der Biologie.

Zeitsprung

Zurück an die Jahrtausendwende

Laserkanonen und Beamen
Laboralltag für den Zellbiologen

Laser Mikrowerkzeuge

Laser werden in ein Mikroskop eingekoppelt

Optische Pinzette

(optische Einzelstrahl Falle)

Arthur Ashkin / Steven Chu 1986

Physik - Nobelpreis 1997 Seit Jan 2009 Energieminister der USA

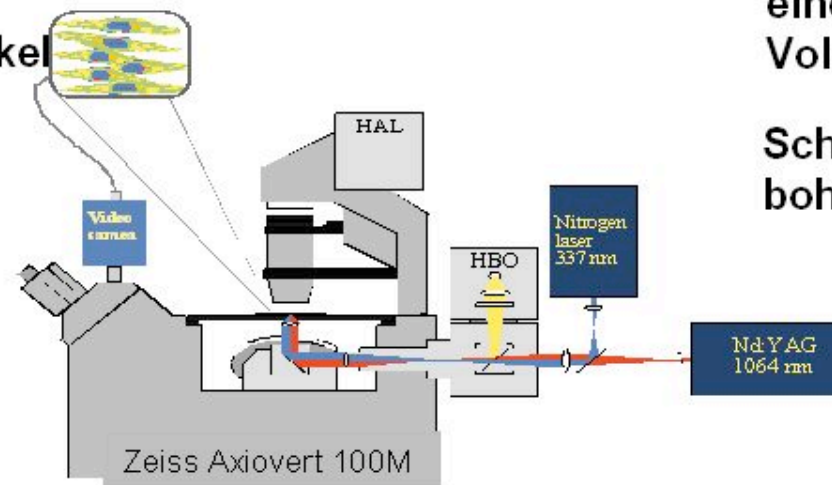
kontinuierlicher Infrarotlaser (Nd:YAG)

Lichtdruck, Gradientenkräfte

zieht mikroskopische Partikel in den Brennpunkt

Halten und Bewegen von Teilchen

Gerät (LSM)



Kombination

•1989 erstmals publiziert (Greulich et al, Labor 2000,)

Mikrostrahl (optisches Skalpell, optische Schere) Serge

Tschachotin 1912 (als Mitarbeiter von V. Czerny in Heidelberg) / Michael Berns 1965 Christoph u. Thomas Cremer 1972

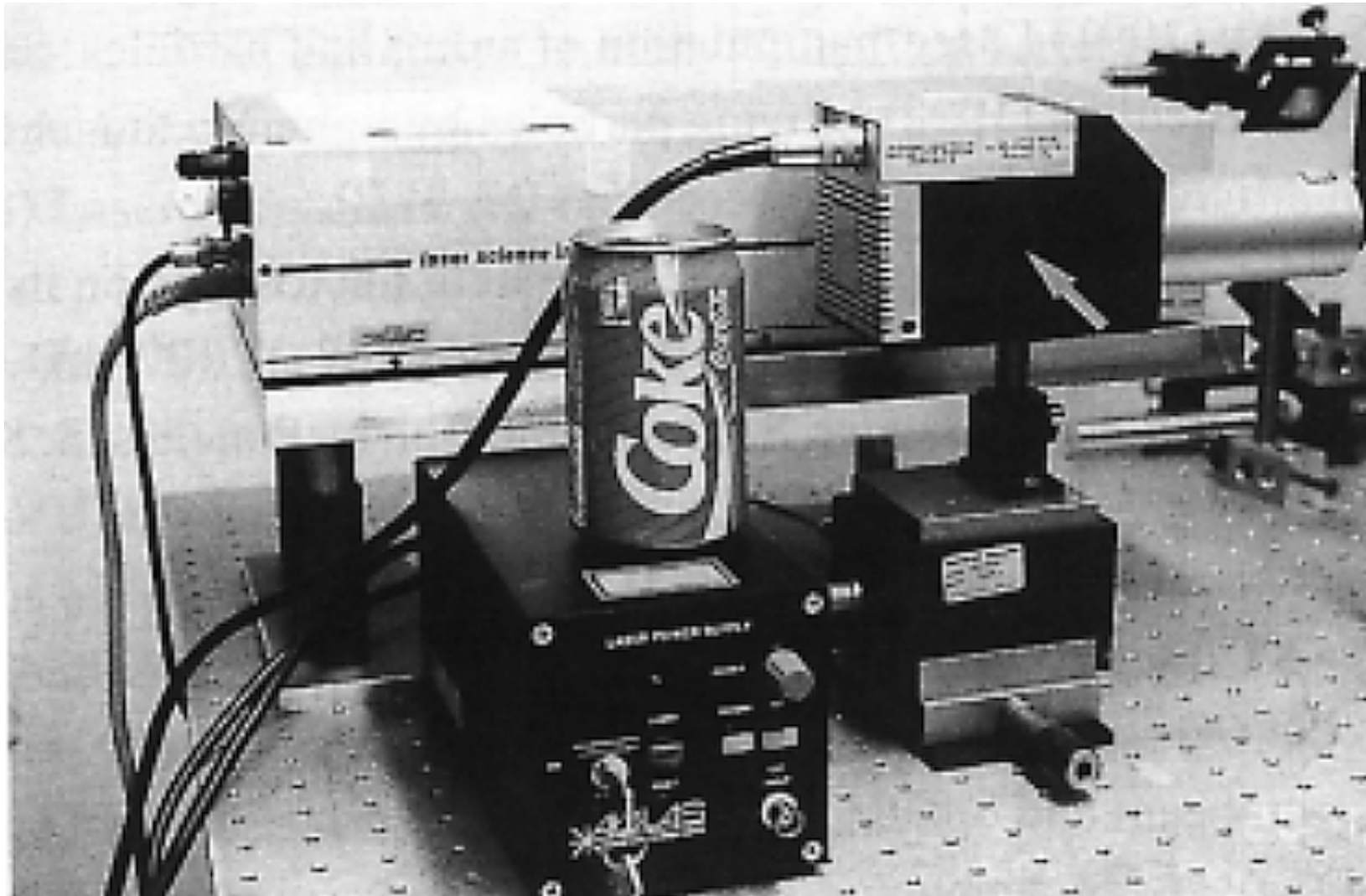
Gepulster UV Laser (Stickstoff Laser)

Höchste Intensitäten in einem sehr kleinen Volumen

Schneiden, schweißen, bohren



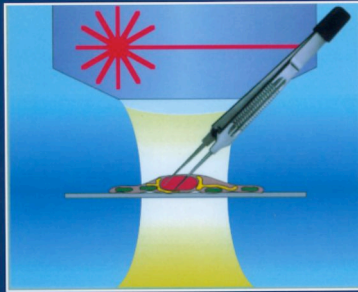
Die Laser für den Mikrostrahl (hinten) und die optische Pinzette (Pfeil) sind recht handlich
In der Bildmitte: ein international bekannter Größenstandard



Karl Otto Greulich

Micromanipulation by Light in Biology and Medicine

The Laser Microbeam and Optical Tweezers



Birkhäuser

Zwei Bücher zum Thema



Leibniz Institut für Altersforschung Jena

LASER MANIPULATION OF CELLS AND TISSUES



Edited by
Michael W. Berns
Beckman Laser Institute and Department of Biomedical Engineering, University of California, Irvine, and
Department of Bioengineering, University of California, San Diego, USA

Karl Otto Greulich
Leibniz Institute for Age Research, Jena, Germany

A variety of laser manipulation tools have made it possible for researchers to perform subtle, subcellular manipulation of cells and tissues, greatly advancing the areas of cell and developmental biology. This book describes the different kinds of research and practical/analytical applications for which laser manipulation is currently being used by research scientists and clinicians. It also provides the basic information needed to build a customized laser micromanipulation system, and discusses how combining imaging and molecular probe technology with laser micromanipulation can greatly extend the use of this technology in molecular biology, cell and developmental biology, pathology, and medicine. As a part of the *Methods in Cell Biology* series, *Laser Manipulation of Cells and Tissues* provides the methods and protocols invaluable to researchers in the fields of cell and developmental biology, cell physiology, cancer biology, pathology, and stem cell biology, to name a few.

Key Features:

- Includes chapters on laser catapulting and capture of DNA and other cellular material for biochemical analysis – a major use of this technology that has been adopted for molecular pathology both in clinical medicine and research
- Also presents information of interest to cell biologists and drug discovery researchers on optogenetics, uncaging of molecules, and the ability to collect and analyze nanomolar amounts of cell material by an array of biochemical/physical tools
- Presents the theory of laser tweezers (optical tweezers) and their application to novel problems in biology

Volume 82 of *METHODS IN CELL BIOLOGY*
Series Editors: Leslie Wilson and Paul Matsudaira



Methods in Cell Biology

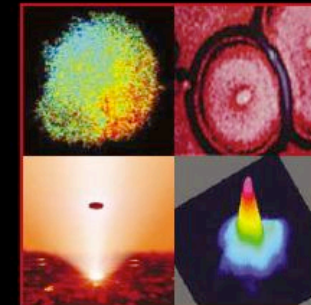
Laser Manipulation
of Cells and Tissues

82



Methods in Cell Biology • Volume 82

LASER MANIPULATION OF CELLS AND TISSUES



Edited by

Michael W. Berns • Karl Otto Greulich



Was haben wir bisher gelernt ?

Laserkanonen sind in der Welt der Mikroskopie bereits verwirklicht, durch einen gepulsten (geblitzten) UV Laser, der in ein Mikroskop eingekoppelt wird.

Beamen funktioniert in einer Art Frühform, ebenfalls im Mikroskop, durch eine geschickte Ausnutzung von Lichtdruck und Gradientenkräften. Beamen durch Zerlegen von Objekten und re - Materialisieren an einer anderen Stelle, funktioniert nicht.

Was kommt als Nächstes

Mit mittelgroßen Lasern können durch extreme Bündelung mit Hochapertur - Mikroskop - Objektiven Temperaturen wie im Sonneninneren erzeugt werden.

Wegen des Snellius Gesetzes wird Licht an der Oberfläche eines dielektrischen Objekts gebrochen. Die Richtungsänderung der Photonen entspricht einer Impulsänderung. Dadurch wird auch eine Kraft auf das brechende Objekt ausgeübt, die bei extrem starker Bündelung immer zum Brennpunkt zeigt. Dort kann dann ein solches Objekt festgehalten und durch Bewegen des Brennpunkts werden.

Mikrofeines **Sonnenfeuer im Labor**

Eine Kilokalorie erwärmt einen Liter Wasser um 1 Grad

Eine 40 Watt Glühbirne verbraucht etwa 1 Kilokalorie in 100 Sekunden
Kleine gepulste Laborlaser erzeugen 1 Mikrokalorie (nicht gerade viel)
in 10 Nanosekunden (immerhin schon Kilowatt)

Ein sehr gutes Mikroskopobjektiv (numerische Apertur > 1.2) bündelt dies in
 10^{-15} Liter

1 Mikrocal in 1 Liter: 1 Mikrograd ---- in 10^{-15} Liter: **10^9 Grad** (Mikroplasma)

**Schneiden, schweißen und bohren
mit Genauigkeiten von besser als 1 Mikrometer**

Auch im Inneren transparenter Objekte – z. B lebender Zellen

Lichtdruck: Die teuerste Art, festzustellen ob die Sonne scheint

Licht erzeugt Druck. Deswegen sind die Schweife von Kometen immer von der Sonne weggerichtet

Mit $E = mc^2$ und Kraft $F = d\text{Impuls} / dt$ kommt man mit wenigen Umrechnungsschritten zu

$$\mathbf{F = W / c}$$
 (Lichtdruckkraft = Lichtleistung / Lichtgeschwindigkeit)

Ein PKW (5 m² Fläche) ist in der Sonne (ca. 1.35 kW /m²) um

0,23 Millipond

schwerer als im Schatten

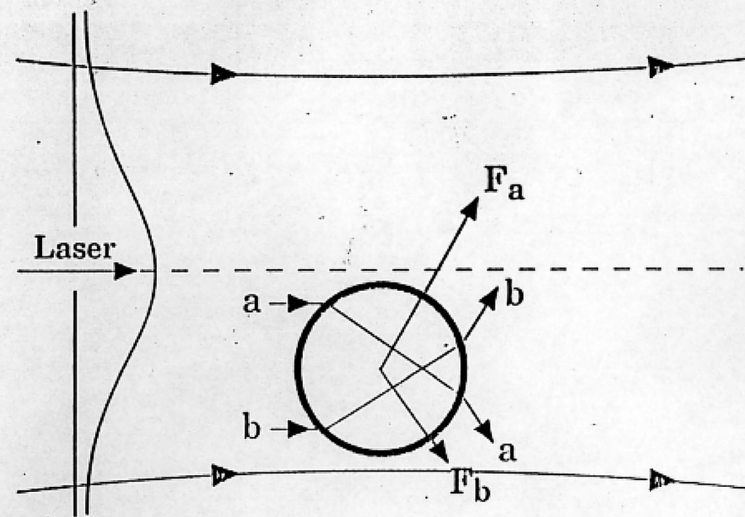
Funktionsweise der optischen Pinzette

- **Wie kommt es eigentlich dazu, dass in einem scharf gebündelten Laserstrahl ein Objekt gegen den Lichtdruck in den Brennpunkt gezogen wird.**
- **Das geht ganz ähnlich, wie ein Segelboot gegen den Wind „kreuzen“ kann**



Warum Lichtdruck Objekte zur Strahlmitte hin schiebt

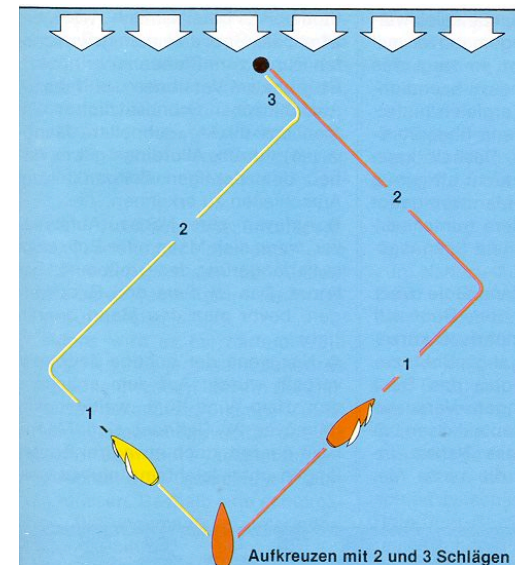
Figure 1: Working principle of the optical trap (or optical tweezers). Light is bent by a cell with higher refractive index than the solvent. The change in direction causes momentum transfer from light to cell. In beam a the light gains momentum directed outwards. Since total momentum of the system has to be conserved, the cell gains momentum directed toward the beam centre. In opposition, beam b causes an outward momentum of the cell. If the laser beam were homogeneous, all forces would be balanced. Since the light intensity in beam b is smaller than in beam a, a total momentum directed towards the centre of the laser beam results.





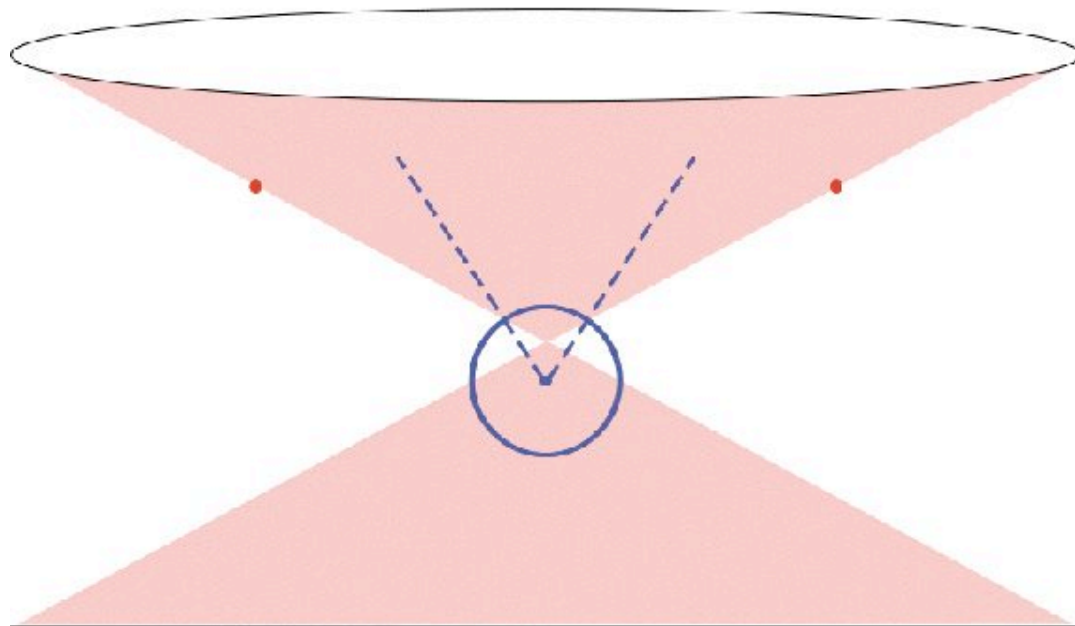
Warum Objekte sogar gegen den Lichtdruck zum Brennpunkt hingezogen werden können (funktioniert nur bei extrem stark fokussierten Lasern)

Bilder: Matthias Frei, Heidelberg



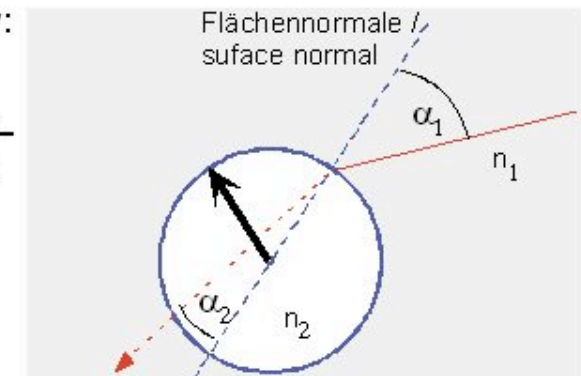
Optische Pinzette

1. Die Arme sind aus Licht statt aus Metall
2. Es wird ein Infrarotlaser verwendet, der außer dem Lichtdruck- Effekt möglichst wenig Wechselwirkungen macht
3. Man kann im Inneren geschlossener Objekte arbeiten
4. Ausgeübte Kraft sehr gut dosierbar (macht nichts kaputt)
5. Lichtdruck, Gradientenkräfte



Snellius Gesetz /
Snell's Law:

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{n_2}{n_1}$$



Was haben wir bisher gelernt ?

Laserkanonen sind in der Welt der Mikroskopie bereits verwirklicht, durch einen gepulsten (geblitzten) UV Laser, der in ein Mikroskop eingekoppelt wird.

Beamen funktioniert in einer Art Frühform, ebenfalls im Mikroskop, durch eine geschickte Ausnutzung von Lichtdruck und Gradientenkräften. Beamen durch Zerlegen von Objekten und re - Materialisieren an einer anderen Stelle, funktioniert nicht.

- Mit mittelgroßen Lasern können durch extreme Bündelung mit Hochapertur- Mikroskop - Objektiven Temperaturen wie im Sonneninneren erzeugt werden.
- Wegen des Snellius Gesetzes wird Licht an der Oberfläche eines dielektrischen Objekts gebrochen. Die Richtungsänderung der Photonen entspricht einer Impulsänderung. Dadurch wird auch eine Kraft auf das brechende Objekt ausgeübt, die bei extrem starker Bündelung immer zum Brennpunkt zeigt. Dort kann dann ein solches Objekt festgehalten und durch Bewegen des Brennpunkts werden.

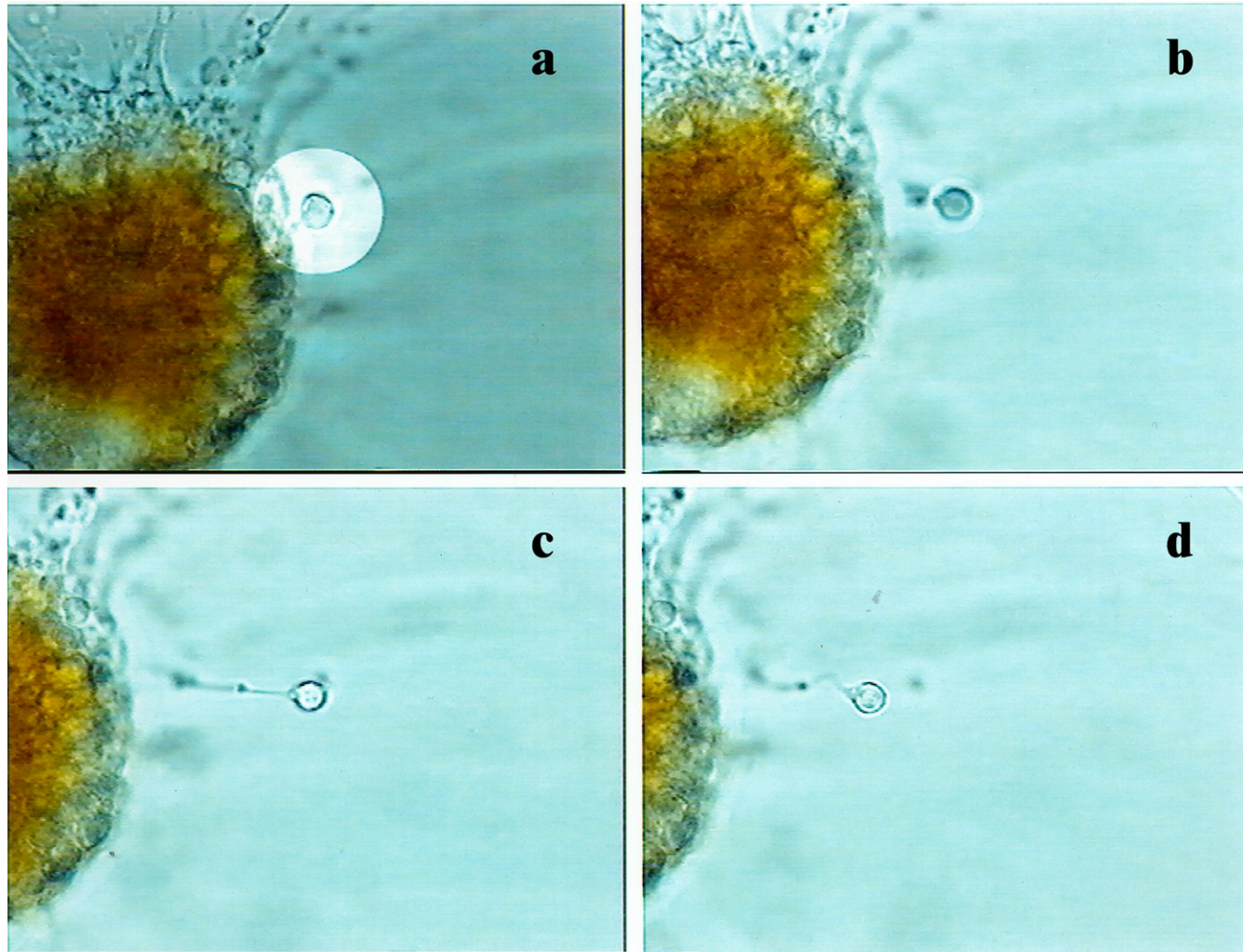
Was kommt als Nächstes

Anwendung der optischen Pinzette, um Experimente zur Ernährung von Astronauten bei interplanetaren Raumflügen vorzubereiten

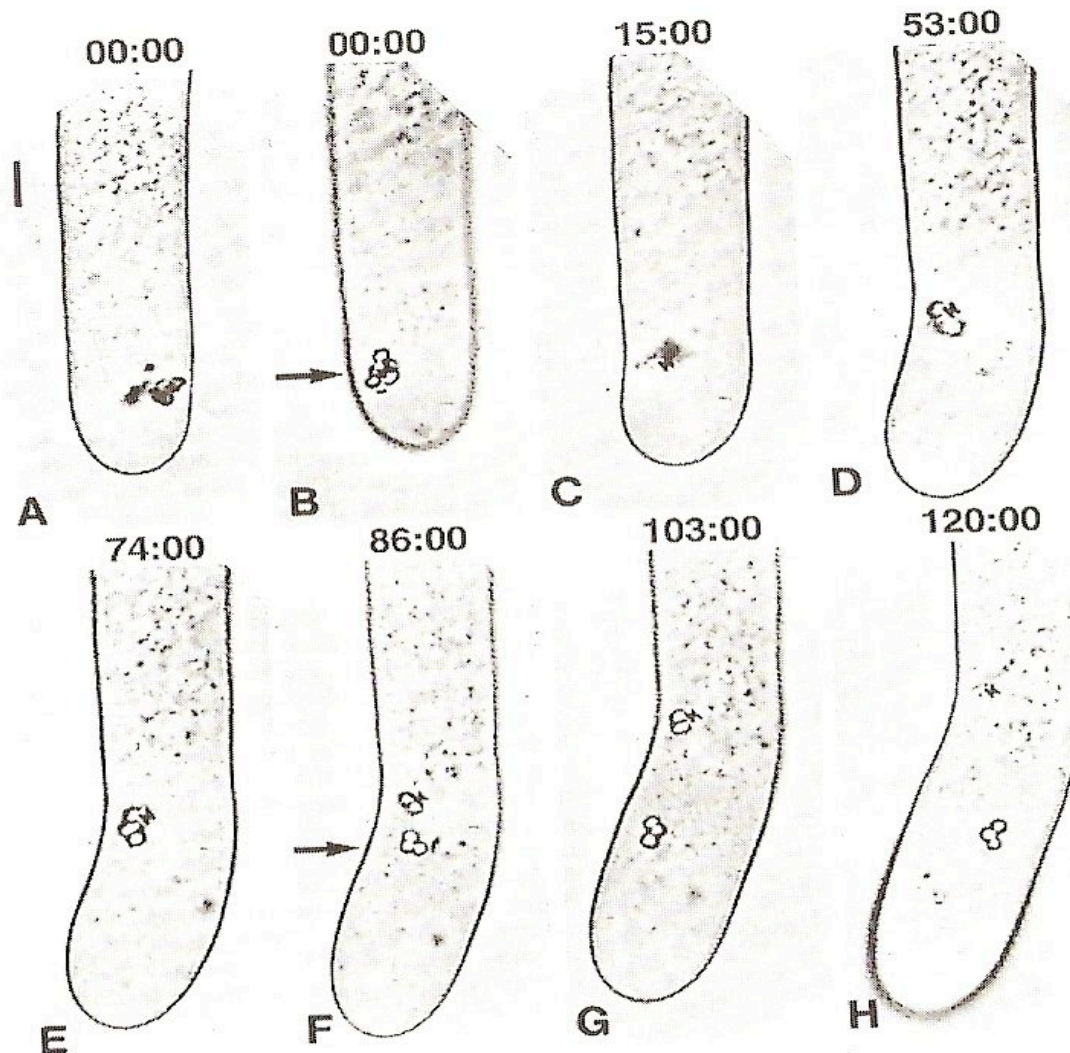
Wie man (mit dem Laser Mikrostrahl) Sex vermeidet (laserinduzierte Zellfusion)

Laser Mikrostrahl und optische Pinzette helfen kinderlosen Paaren

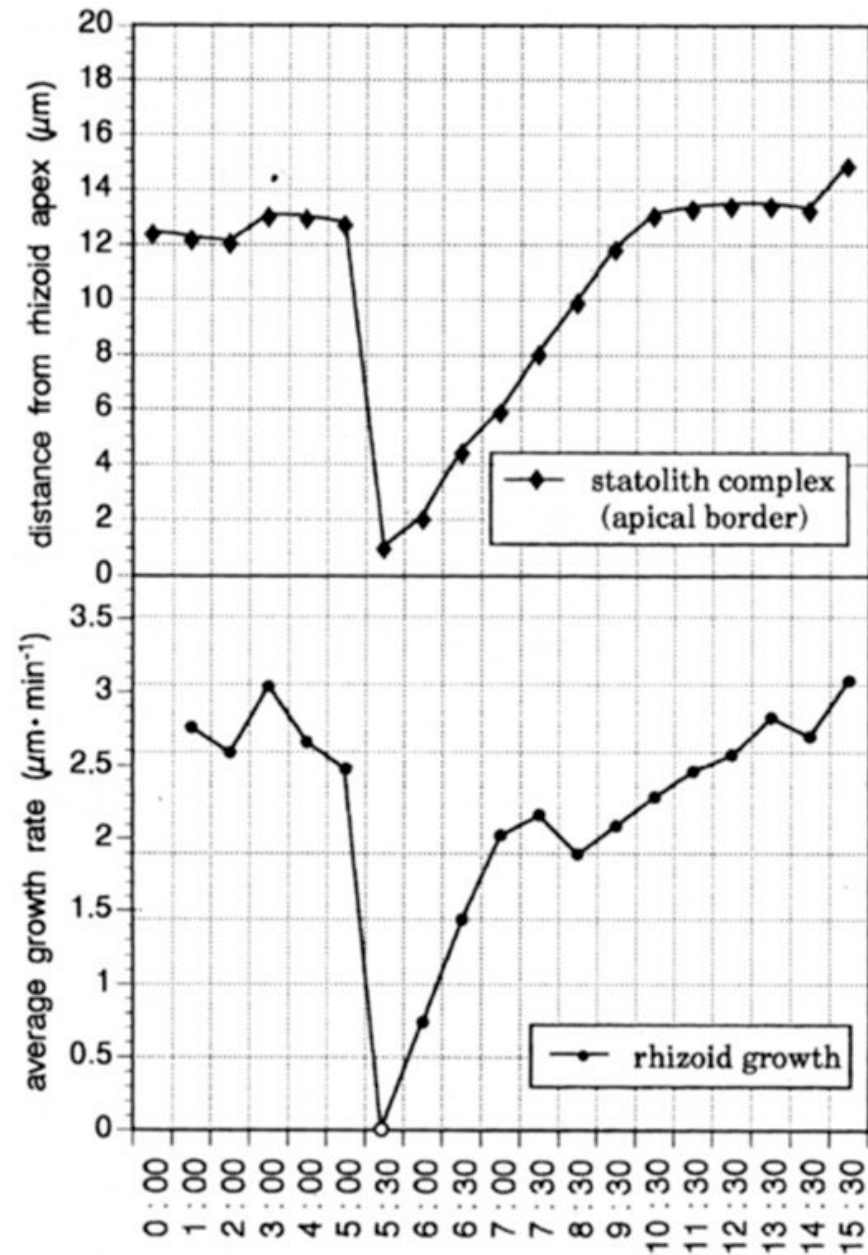
Mit der optischen Pinzette kann man im Inneren lebender Zellen arbeiten. Die Pinzette (helle Scheibe, nachträglich durch Bildverarbeitung hinzugefügt) lenkt ein Partikel aus seiner ursprünglichen Lage aus. Nach Abschalten der Pinzette bewegt es sich wieder zurück.



Bei interplanetaren Raumflügen muss verbrauchte Nahrung recycelt werden. Hierzu werden voraussichtlich Algenkulturen eingesetzt. Mit der optischen Pinzette kann man Schwerelosigkeit (hier mit der Alge Chara) simulieren und so einige Vorexperimente, die sonst teuer auf der Raumstation ISS gemacht werden müssten, preiswert am Boden machen.



**Böse
Überraschung.**
Die Alge wächst nur noch
ein Zehntel so schnell,
wenn ihr die Schwerkraft
genommen wird



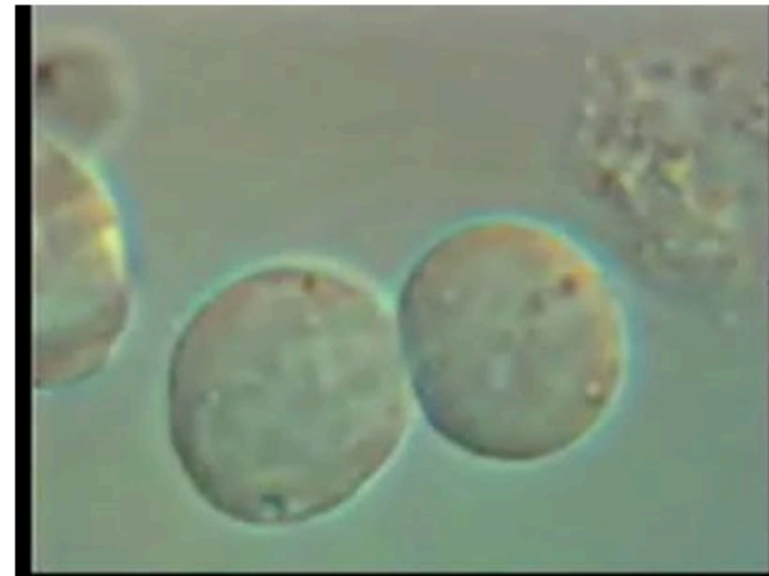
Wie man Sex vermeidet

Ob man's gerne hört oder nicht: Das biologische Haupt - Ziel von Sexualität ist es, eine Fusion zweier verschiedener Zellen (von der Mutter und vom Vater) herbeizuführen – sonst nichts.

In der Pflanzenzüchtung und in der Antikörpertechnologie ist der Einsatz eines Laser Mikrostrahls eine echte Alternative



Pflanzenzellen (Protoplasten).
beschleunigt Züchtung



Zellen aus dem Immunsystem
beschleunigt Antikörperproduktion

Lasermikrostrahl und optische Pinzette ... eine Chance für kinderlose Paare

- Es gibt Paare, deren **Kinderlosigkeit** einen überraschend einfachen Grund hat: jede menschliche **Eizelle hat einen zähen Mantel**, die *zona pellucida*. Aber bei diesen Paaren ist sie **zu zäh**, um von der Spermienzelle durchdrungen zu werden.
- Heute gibt es *in vitro* Befruchtungstechniken (SUZI, ICSI), bei denen ein künstlicher **Kanal** in diese Zone geschnitten werden.
- **Lasermikrostrahl und optische Pinzette sind besonders schonend** und helfen auch dann noch, wenn SUZI oder ICSI keinen Erfolg bringen

Laserunterstützte in vitro Befruchtung

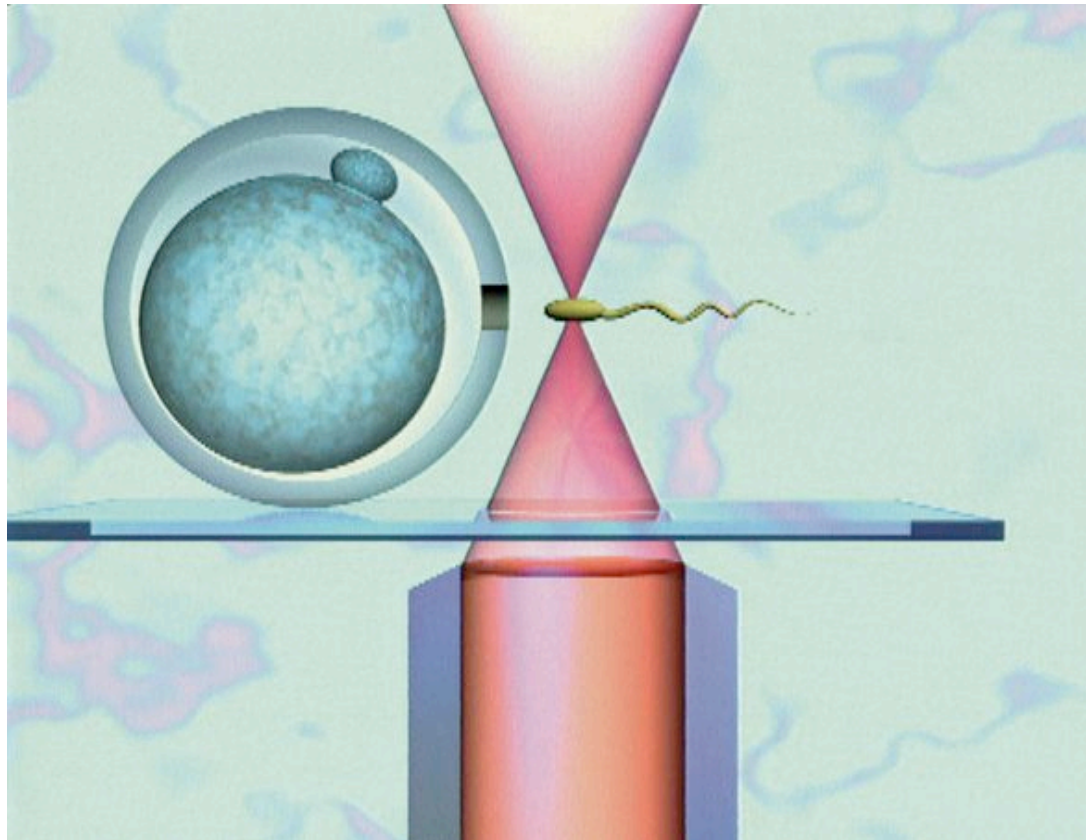
Ein Laser Mikrostrahl wird verwendet um einen Kanal in die zähe „*zona pellucida*“ der menschlichen Eizelle zu schneiden.

Dann wird die optische Pinzette genommen um eine Spermienzelle an diesen Kanal heranzuführen.

Alles Weitere geht dann von selbst

Abbildung von Karin Schütze

(nominiert für den Zukunftspreis des Bundespräsidenten 2006, „verlor“ dann aber gegen Stefan Hell, ehemaliger Diplomand der Physikfakultät Heidelberg),
P.A.L.M. AG, Bernried, jetzt Carl Zeiss Jena



Was haben wir bisher gelernt ?

Laserkanonen sind in der Welt der Mikroskopie bereits verwirklicht, durch einen gepulsten (geblitzten) UV Laser, der in ein Mikroskop eingekoppelt wird

Beamen funktioniert in einer Art Frühform, ebenfalls im Mikroskop, durch eine geschickte Ausnutzung von Lichtdruck. Beamen durch Zerlegen von Objekten und re - Materialisieren an einer anderen Stelle, funktioniert nicht.

Mit mittelgroßen Lasern können durch extreme Bündelung mit Hochapertur- Mikroskop - Objektiven Temperaturen wie im Sonneninneren erzeugt werden.

Wegen des Snellius Gesetzes wird Licht an der Oberfläche eines dielektrischen Objekts gebrochen. Die Richtungsänderung der Photonen entspricht einer Impulsänderung. Dadurch wird auch eine Kraft auf das brechende Objekt ausgeübt, die bei extrem starker Bündelung immer zum Brennpunkt zeigt. Dort kann dann ein solches Objekt festgehalten und durch Bewegen des Brennpunkts werden.

- Anwendung der optischen Pinzette, um Experimente zur Ernährung von Astronauten bei interplanetaren Raumflügen vorzubereiten
- Wie man (mit dem Laser Mikrostrahl) Sex vermeidet (laserinduzierte Zellfusion)
- Laser Mikrostrahl und optische Pinzette helfen kinderlosen Paaren

Was kommt als Nächstes

Der Lasermikrostrahl hilft bei der Suche nach Substanzen, die Narbenbildung nach Herzinfarkt reduzieren

Laser Mikrostrahl, Gesundes Altern und DNA Reparatur

Das Problem

Das Herz besteht aus Herzmuskelzellen, die prinzipiell unabhängig voneinander schlagen. Koordiniert wird das Schlagen des ganzen Herzens durch **Kalziumwellen**.

Nach einer **Verletzung** des Herzmuskels wird die **Wunde** nicht mit Herzmuskelzellen, sondern **mit Bindegewebszellen verschlossen**.

Solche **Bindegewebszell – Narben** brechen die Kalziumwellen. Dies führt zu oft tödlichen **Herzkammerflimmern**.

Lösungsansatz (Laser Mikrostrahl)

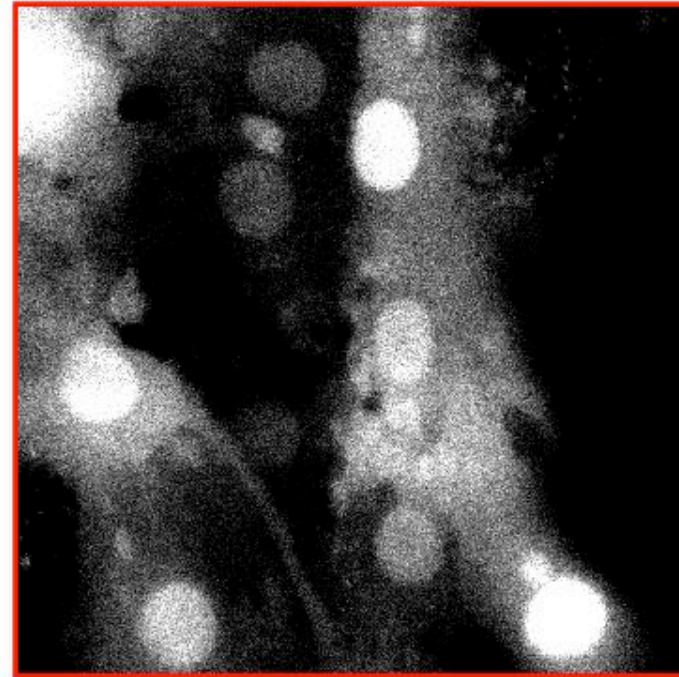
Suche **Substanzen**, die das Einwachsen von **Herzmuskelzellen statt der Bindegewebszellen** fördern

Insulin like Growth Factor 1 ist eine solche Substanz

Spontan schlagende Herzmuskelzellen



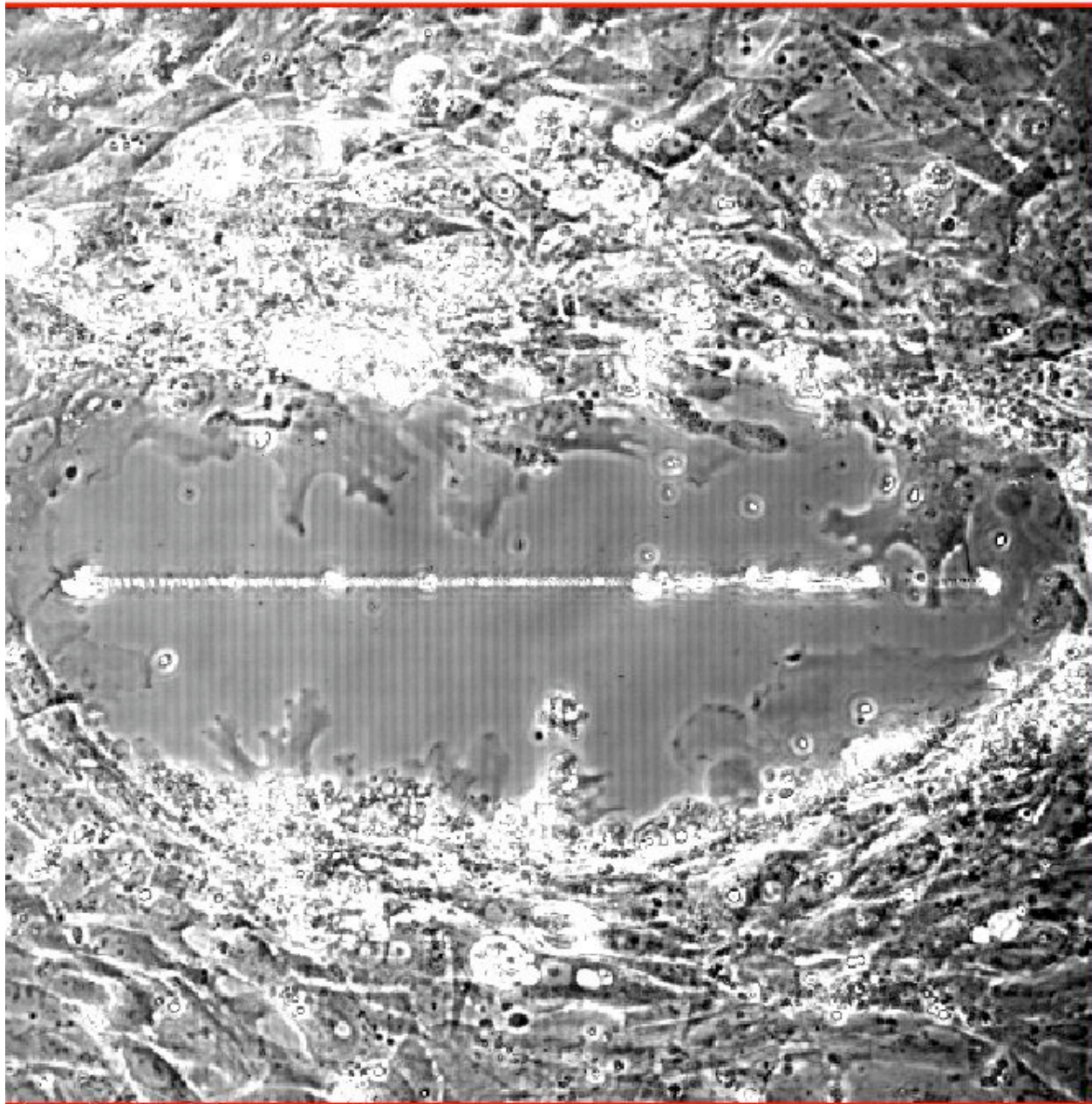
Durchlicht



10 μm

Kalziumwellen (Fluoreszenz)

Narben - Entstehung nach Verletzung von Herzgewebe



Eine Verletzung die mit dem Laser Mikrostrahl erzeugt wurde, wächst in 18 Stunden zu, allerdings nicht mit den hellen

Herzmuskelzellen, sondern mit den spindelförmigen dunklen Fibroblasten

Die gerade Linie wurde vom Lasermikrostrahl erzeugt und ist für das Experiment ohne Bedeutung

Gibt es Substanzen, die den Anteil der hellen Herzmuskelzellen

erhöhen

Birds live longer than mammals of similar size

Vögel leben länger als Säugetiere ähnlicher Größe

Mouse / Maus 4 years



Budgie / Sittich 20 years



Rabbit / Kaninchen 5 years

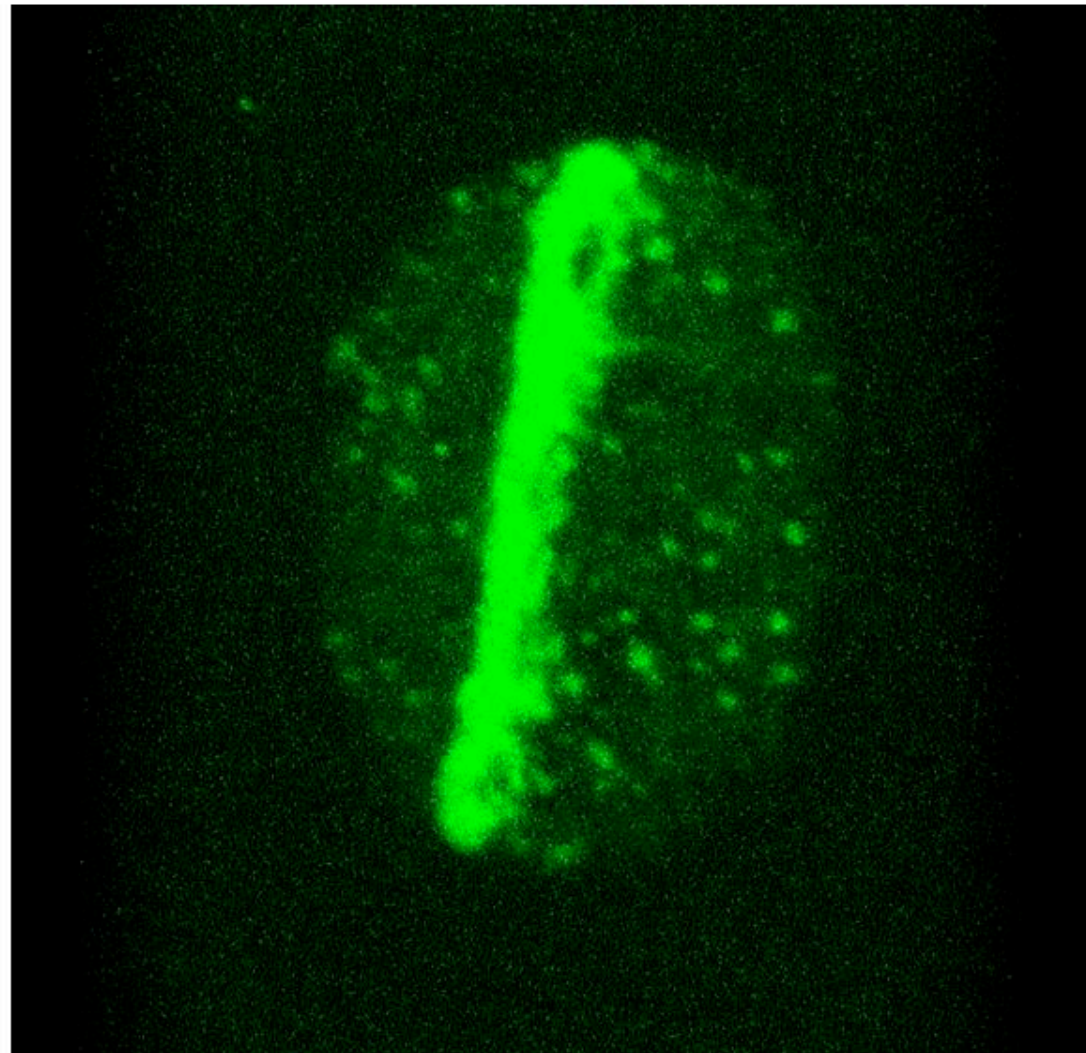


Parrot / Papagei 60 years

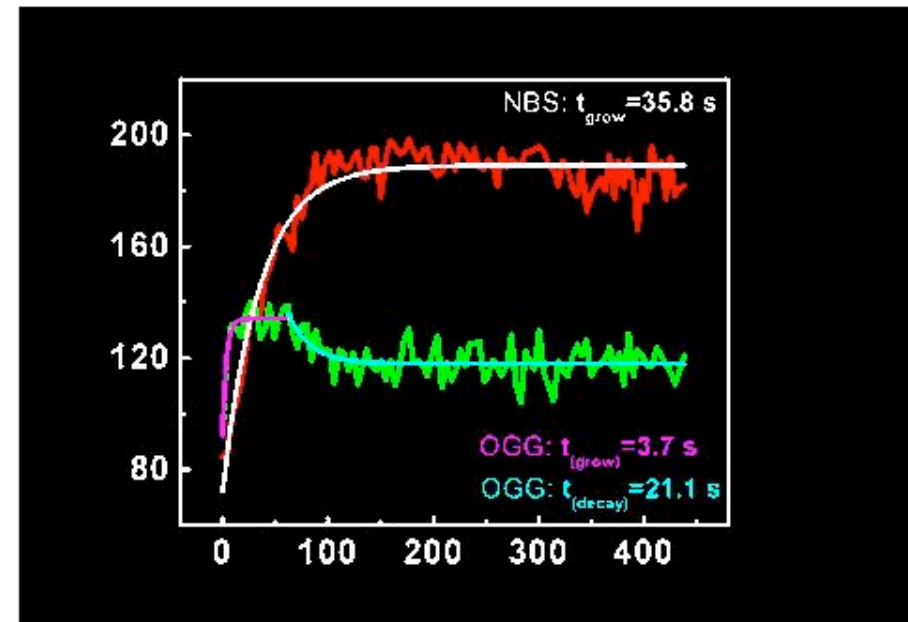
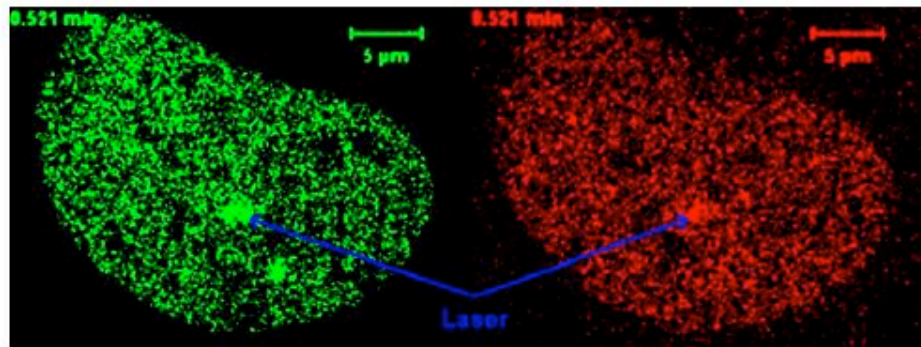


Vögel (als Nachfolger der Dinosaurier in der Evolution sehr reif) werden **älter als vergleichbar große Säugetiere** (jung, unfertig) (Maus 4 Jahre / Wellensittich 20 Jahre --- Kaninchen 5 Jahre / Papagei 60 Jahre). **Ein Grund dafür könnte sein, dass Vögel die fehlerfreie HRR DNA Reparatur verwenden, während Säuger (einschließlich Mensch), die fehlerbehaftete NHEJ Reparatur vorziehen**

Die Gründe hierfür können mit dem Lasermikrostrahl studiert werden, der räumlich und zeitlich sehr genau DNA Schäden erzeugt, die man dann mit fluoreszierenden Reparaturmolekülen wieder repariert werden



DNA Reparaturproteine lagern sich unterschiedlich schnell an der Stelle an, an der mit dem Laser Mikrostrahl Schäden erzeugt wurden
Grün ist ein schnelles Protein, rot ist fast 10 mal so langsam



Hiermit wurde gefunden, dass ein DNA Reparaturmolekül der ungenauen NHEJ Reparatur sehr früh kommt. Kann man das medikamentell verzögern einen größeren Anteil an der genauen HRR Reparatur zu bekommen ?

Und noch was zum Mitnehmen

Das „weiche“ **UV A**, das für Sonnenbräune verantwortlich ist, verursacht DNA **Schäden**. Bei gesunden Menschen werden diese nach 1 - 2 Stunden wieder repariert (allerdings wegen NHEJ mit Fehlern)

Bestrahlt man allerdings **mit rotem Licht vor**, liegt die DNA **Schädigung nur bei 1/3**. Im natürlichen **Sonnenlicht** wird **rot** „kostenlos“ **mitgeliefert**. In Sonnenbänken ist dies nicht der Fall !
(und kein Hersteller nimmt dieses Ergebnis ernst).

**Künstliche Sonnenbräune
riskanter als natürliche**

Was haben wir bisher gelernt ?

Laserkanonen sind in der Welt der Mikroskopie bereits verwirklicht, durch einen gepulsten (geblitzten) UV Laser, der in ein Mikroskop eingekoppelt wird

Beamern funktioniert, ebenfalls im Mikroskop, durch eine geschickte Ausnutzung von Lichtdruck, in einer Art Frühform.

Beamern durch Zerlegen von Objekten und re - Materialisieren an einer anderen Stelle, funktioniert nicht.

Mit mittelgroßen Lasern können durch extreme Bündelung mit Hochapertur- Mikroskop - Objektiven Temperaturen wie im Sonneninneren erzeugt werden.

Wegen des Snellius Gesetzes wird Licht an der Oberfläche eines dielektrischen Objekts gebrochen. Die Richtungsänderung der Photonen entspricht einer Impulsänderung. Dadurch wird auch eine Kraft auf das brechende Objekt ausgeübt, die bei extrem starker Bündelung immer zum Brennpunkt zeigt. Dort kann dann ein solches Objekt festgehalten und durch Bewegen des Brennpunkts werden.

Anwendung der optischen Pinzette, um Experimente zur Ernährung von Astronauten bei interplanetaren Raumflügen vorzubereiten

Wie man (mit dem Laser Mikrostrahl) Sex vermeidet (laserinduzierte Zellfusion)

Laser Mikrostrahl und optische Pinzette helfen kinderlosen Paaren

Der Laser Mikrostrahl hilft bei der Suche nach Substanzen, die Narbenbildung nach Herzinfarkt reduzieren

Laser Mikrostrahl, Gesundes Altern und DNA Reparatur

Was kommt als Nächstes

Die optische Pinzette nimmt ein einzelnes DNA Molekül „in die Hand“ und erlaubt es zu typisieren (Lösen von Kriminalfällen ????)



Laser Mikrostrahl und optische Pinzette –

zum Bearbeiten und Bewegen von Mikroobjekten- von den physikalischen Grundlagen bis zur Anwendung in der Altersforschung

Wie spricht man Schüler und eine breite Öffentlichkeit an? Heidelberg 14.3.2009

1. Laserkanonen sind in der Welt der Mikroskopie bereits verwirklicht, durch einen gepulsten (geblitzten) UV Laser, der in ein Mikroskop eingekoppelt wird
2. Beamen funktioniert in einer Art Frühform, ebenfalls im Mikroskop, durch eine geschickte Ausnutzung von Lichtdruck. Beamen durch Zerlegen von Objekten und re - Materialisieren an einer anderen Stelle funktioniert noch nicht.
3. Mit mittelgroßen Lasern können durch extreme Bündelung mit Hochapertur-Mikroskop - Objektiven Temperaturen wie im Sonneninneren erzeugt werden.
4. Wegen des Snellius Gesetzes wird Licht an der Oberfläche eines dielektrischen Objekts gebrochen. Die Richtungsänderung der Photonen entspricht einer Impulsänderung. Dadurch wird auch eine Kraft auf das brechende Objekt ausgeübt, die bei extrem starker Bündelung immer zum Brennpunkt zeigt. Dort kann dann ein solches Objekt festgehalten und durch Bewegen des Brennpunkts bewegt werden.
5. Anwendung der optischen Pinzette, um Experimente zur Ernährung von Astronauten bei interplanetaren Raumflügen vorzubereiten
6. Wie man (mit dem Laser Mikrostrahl) Sex vermeidet (laserinduzierte Zellfusion)
7. Laser Mikrostrahl und optische Pinzette helfen kinderlosen Paaren
8. Der Laser Mikrostrahl hilft bei der Suche nach Substanzen, die Narbenbildung nach Herzinfarkt reduzieren
9. Laser Mikrostrahl, Gesundes Altern und DNA Reparatur
10. Die optische Pinzette nimmt ein einzelnes DNA Molekül „in die Hand“ und erlaubt es zu typisieren (Lösen von Kriminalfällen ????)