

Laser Mikroablation für die Genanalyse auf Einzelzellbasis

Laser Microablation for Single Cell Based Gene Analysis

Die optischen Mikromanipulationssysteme UV(ultraviolett)-Laser-Mikrostrahl und Laser-Pinzette haben sich mittlerweile in verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen als wertvolles Werkzeug für die berührungslose Mikromanipulation von Zellen, Gameten oder gar einzelnen Organellen bewährt. Nun finden diese Systeme auch Einzug in den Nanokosmos von Genen und Molekülen gefunden. So wurden zum Beispiel Kräfte gemessen, die bei der DNA Transkription eine Rolle spielen. Die gezielte Mikromanipulation von einzelnen Molekülen gibt Aufschluss über deren Wirkungsweise. Eine wichtige Voraussetzung für die genetische Untersuchung von Zellen mit den sensiblen Methoden der Molekularbiologie ist die selektive Präparation einzelner Zellen oder Chromosomenabschnitte ohne Verunreinigung durch benachbartes Zellmaterial. Der UV-Laser Mikrostrahl erlaubt die präzise Abtragung und vollständige Zerstörung von unerwünschtem biologischen Material, und ermöglicht somit die kontaminationsfreie Isolierung einzelner Zellen oder Chromosomenstückchen mit hoher Genauigkeit und Effizienz. Damit ist nun eine zell- bzw. chromosome-spezifische, molekulare Analyse von Genen oder genetischen Defekten möglich geworden, die als Ursache von Krebs und anderen Krankheiten gelten.

Dieser Artikel gibt einen Überblick über aktuelle Anwendungen der Laser-Mikroablation in biologischer und medizinischer Forschung sowie in der modernen, molekularen Gendiagnostik.

The optical micromanipulation systems UV(ultraviolet)-Laser Microbeam and Optical Tweezers trap, already proven to be powerful tools for "non-contact" micromanipulation of gametes, cells and organelles, have now made their way into the nanocosmos of genes and molecules. Force measurements on DNA transcription have been performed and selective DNA molecule micromanipulation gives insight into single molecule behavior. Retrieval of selected single cells without contamination is an important prerequisite for further processing with modern methods of molecular biology. Laser microdissection allows to precisely eliminate any unwanted material or to isolate pieces of chromosomes or single cells of interest with high accuracy and efficiency. This enables the cell or chromosome specific molecular analysis of genes and genetic defects underlying disease, such as cancer or infection.

This review article gives an overview of current topics of laser microbeam application in biological or medical research and advanced molecular gene diagnostics.

DIE AUTOREN

Dr. Karin Schütze
Städtisches Krankenhaus Harlaching
Applikatives Laserzentrum der
I. Medizinischen Abteilung
Sanatoriumsplatz 2
D-81545 München

Dr. Malte Böhm
Universitätsklinikum
Urologische Klinik und Poliklinik
Hufelandstraße 55
D-45122 Essen

Dr. Stefan Thalhammer
Dr. Robert Stark
Prof. Wolfgang M. Heckl
Institut für Kristallographie der
Ludwig Maximilians Universität
Theresienstraße 41
D-80333 München

Dr. Hans Pösl
Städtisches Krankenhaus Harlaching
Applikatives Laserzentrum der
I. Medizinischen Abteilung
Sanatoriumsplatz 2
D-81545 München

KEYWORDS

Laser-Mikrodissektion, Einzelzell-Präparation,
Mikroinjektion, Laser-Mikrostrahl, Optische
Pinzette

laser microdissection, single cell preparation,
microinjection, laser microbeam, optical tweezers

Einführung:

Laserstrahlen, die in ein Mikroskop eingekoppelt und zu einem Durchmesser von weniger als einem Mikrometer fokussiert werden, gewinnen als Werkzeug für die berührungslose, optische Mikromanipulation nun auch in der Molekularbiologie sowie in der medizinischen Forschung zuneh-

mend an Bedeutung. Es gibt zwei unterschiedliche Prinzipien der Lasermikromanipulation. Zum einen können Zellen oder subzelluläre Teilchen durch den starken Intensitätsgradienten im Fokus eines stark fokussierten, kontinuierlich arbeitenden Laserstrahls gefangen und bewegt werden. Dieses Prinzip wird als Optische Pinzette

oder auch Laserfalle bezeichnet. Zum anderen lassen sich biologische Strukturen durch die extrem hohe Photonendichte im Fokus eines stark fokussierten, gepulsten Laserstrahls mikrochirurgisch bearbeiten. Dies ist unter dem Namen UV-Lasermikrostrahl oder Laserskalpell bekannt [1–4]. Ein riesiger Vorteil der berührungslosen Lasermikromanipulation ist die Möglichkeit der Objektbearbeitung in einer geschlossenen, völlig sterilen Umgebung ohne Gefahr von Verdunstung, Verunreinigung oder Ansteckung. Da die wirksame Energiedichten nur in dem schmalen Laserfokusbereich auftreten und zudem nahezu alle biologische Objekte für die verwendeten Laserwellenlängen durchlässig sind, ist sogar ein Arbeiten im Inneren einer Zelle möglich, ohne diese zu öffnen.

Optisches Fangen mit sichtbarem Laserlicht

Die ersten biologischen Anwendungen der Optischen Pinzette wurde von Ashkin und Dziedzic im Jahre 1987 beschrieben [1]. Der damals verwendete Argon-Laser war jedoch für lebende Objekte nicht geeignet, da die Wellenlänge von 514 nm von den Zellen wohl zu stark absorbiert wurde. Das optische Fangen im nahen Infrarotbereich mit einem Nd:YAG-Laser bei 1064 nm schien zunächst besser geeignet. Aber auch bei dieser Wellenlänge traten Probleme auf, wie z.B. bei der Chromosomenteilung oder der Weiterentwicklung der Zellen, was auf Mehrphotonenabsorption und/oder lokale Erhitzung durch Wasserabsorption zurückgeführt wurde. Daher wurde kürzlich eine Laserfalle entwickelt, die mit einem Diodenlaser von hoher Strahlqualität bei einer sichtbaren Wellenlänge von 680 nm arbeitet. Diese Wellenlänge liegt im Bereich des sogenannten therapeutischen Fensters zwischen 600 nm und 1200 nm, wo nur eine geringfügige Absorption von Biomolekülen stattfindet. Die Wasserabsorption beginnt erst bei circa 800 nm und steigt zum Infraroten hin steil an. Ersten Ergebnissen zufolge scheint das Fangen mit der sichtbaren Wellenlänge von 680 nm weniger schädlich für lebende Zellen und Organismen zu sein als bei Verwendung der oben erwähnten Wellenlängen. Interessanterweise fällt die VIS-Optische Pinzette nicht unter das Ashkin Patent, welches sich nur auf Fangsysteme im Infrarotbereich ab 800 nm bezieht [5].

Mit der optischen Pinzette lassen sich Zellen sortieren, bewegliche Spermien fangen oder einzelne Bakterien aus einer Mischung verschiedener Spezies für eine anschließende DNA Analyse herausuchen. Wissenschaftler konnten Kräfte bestimmen, die beim Cytoplasma-Transport

und bei der Cytoskelett-Bewegung eine Rolle spielen. Interessant für molekularbiologische Untersuchungen ist eine kürzlich vorgestellte Arbeit, bei der gemessen wurde, mit welcher Kraft ein Polymerasemolekül während der Transkription an einem DNA Molekül arbeitet [5].

Mikrodissektion mit dem UV-Laser Mikrostrahl

Die extrem hohe Photonendichte im Fokuspunkt eines gepulsten UV-Laser Mikrostrahls ermöglicht eine physikalische Zerstörung nahezu aller bekannter Materialien. So können z. B. einzelne Moleküle, cytoplasmatische Filamente, Flagellen oder sogar Spermenschwänze [4], (Abb. 1a) gezielt zerteilt werden. Bewegungsvorgänge im Cytoplasma oder bewegliche Organismen lassen sich reversibel stoppen. Kleine, selbstheilende Löcher werden mit dem Laser in die Cytoplasmamembran oder sogar in starre Zellwände gebohrt, ohne die Lebensfähigkeit der Organismen zu zerstören. Werden Löcher in die sich berührende Membranregion von benachbarten Zellen gebohrt, kann die Fusion dieser Zellen induziert werden. [1–4].

Wir haben die Verwendung von Lasermikrostrahlen für die berührungslose Mikro-manipulation an Gameten und Embryonen als Alternative zu den herkömmlichen Methoden der künstlichen Befruchtung mit Mikrokapillaren untersucht [4, 6]. Ein mit dem Laser in die Eihülle gebohrtes Loch (Abb. 1 b) erleichtert den Spermien das Eindringen in die Eizelle oder ermöglicht dem Embryo das Schlüpfen. Spermien können mit der Optischen Pinzette direkt durch das zuvor mit dem Laser gebohrte Loch in den perivitellinen Raum der Eizelle transportiert werden (Abb. 1 d). Wenn zum Öffnen der Eihülle ein Laser verwendet wird, dessen Wellenlänge genügend weit vom Absorptionsmaximum der DNA entfernt ist (wie z. B. ein Stickstofflaser bei 337 nm), wurden deutlich erhöhte Befruchtungsraten und ein vermehrtes Schlüpfen der Embryonen erzielt [4–6]. Das „Lochbohren“ alleine könnte bereits bei vielen Fällen von gestörter Fruchtbarkeit zum Erfolg verhelfen, und damit die zeit- und kostenaufwendige Nadelmethode der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) vermeiden. Mit der sogenannten „laserunterstützten Schlüpfhilfe – laser assisted hatching“ (Abb. 1c) wurden in Italien bereits viele gesunde Kinder geboren [7].

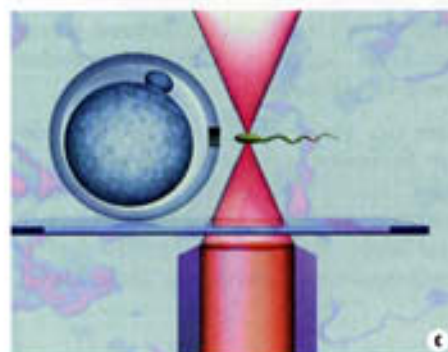
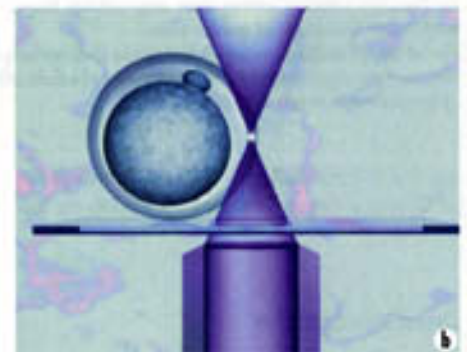


Abb. 1a: Die extrem hohe Energiedichte im Fokuspunkt des UV-Lasermikrostrahls ermöglicht das Stoppen einzelner Spermien sowie das gezielte Durchtrennen von Spermenschwänzen

Abb. 1b: Der UV-Laser wird durch ein Objektiv von hoher numerischer Apertur auf einen Durchmesser von weniger als einem 1µm fokussiert. In dieser Videoanimation wird gezeigt, wie die Eihülle einer Säugereizelle mit hoher Präzision geschnitten wird (4)

Abb. 1c: Die optischen Kräfte im Fokus der Laserpinzette sind genügend stark, um aktiv schwimmende Spermien zu fangen und zu transportieren. Es ist sogar möglich, die Spermien ohne mechanische Belastung direkt in den perivitellinen Raum der Eizelle einzuführen. (Videoanimation 4).

Abb. 1d: Ein menschlicher Embryo nach der Laserbehandlung. Ein Loch von circa 15 µm Durchmesser wurde in die Eihülle gebohrt, um dem Embryo das Schlüpfen zu erleichtern.

Schneiden von Chromosomen und DNA Filamenten

Das Schneiden von Metaphasechromosomen ist eines der fortschrittlichsten Methoden um DNA Sequenzen von spezifischen Chromosomenregionen zu isolieren. Mit der hohen Energiedichte des fokussierten Lasermikrostrahles können Chromosomen auf einem Metaphase- oder Prometaphasepräparat präzise geschnitten werden. Das Schneiden mit dem Laser ist schnell und einfach und kann teilweise automatisiert werden. Zudem erspart es das Aufwendige Ziehen der Glasnadeln und kann „berührungslos“ d.h. völlig steril und ohne Kontaminationsgefahr durchgeführt werden.

Um die Größe von laserinduzierten Chromosomenschnitten zu messen, wurde ein lasergeschnittenes Muntjak-Chromosom mit dem Scanningkraftmikroskop abgerastert. Auf dem Kraftmikroskopbild (Abb. 2) kann

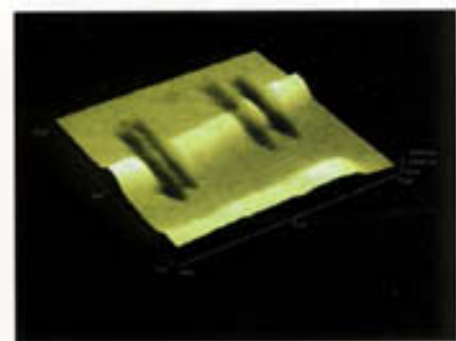


Abb. 2: Scanningkraftmikroskopbild eines laserdissertierten Muntjak Chromosomes. Die Schnitte sind V-förmig mit einer Schnittbreite von circa 700 nm, die Scheibchen dazwischen sind circa 700 nm und 1300 nm dick, was ungefähr 13×10^4 bzw. 7×10^4 Basenpaaren entspricht.

man erkennen, daß der Laser den Chromosomenarm bis zum darunterliegenden Glassubstrat durchtrennt hat. Die Schnitte sind V-förmig mit einer Schnittbreite von circa 700 nm [8]. Der durch Linsenfehler bedingte Verlust an Strahlqualität gemeinsam mit einer vorhandenen Photonenabsorption dürfte wohl der Grund sein, daß die theoretisch mögliche, beugungsbegrenzte Schnittbreite von circa 200 nm nicht erreicht werden kann.

Einzelzellpräparation

Seit langer Zeit sind die Wissenschaftler davon überzeugt, daß Krankheiten ihren Ursprung in der einzelnen Zelle haben. Daher suchen Molekularbiologen und Pathologen verstärkt nach mutierten Genen, die für diese Fehlfunktionen verantwortlich sein könnten. Sie versuchen, die interessanten DNA Sequenzen zu präparieren und zu vermehren, um die Ursache der genetischen

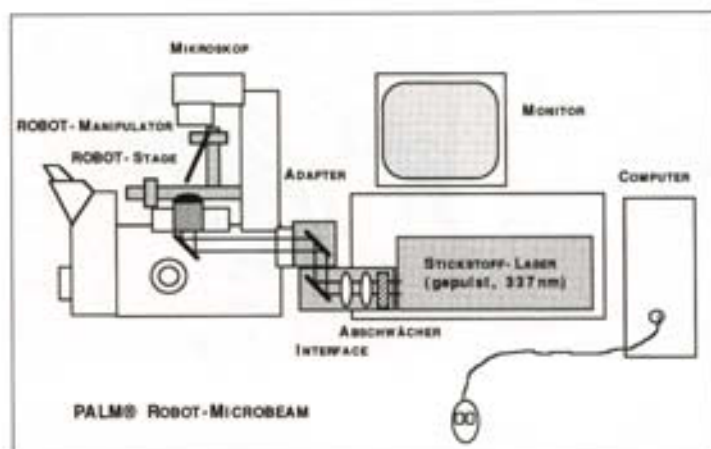


Abb. 3: PALM® ROBOT MICROBEAM, eine Schemazeichnung

Veränderungen besser erforschen zu können. Eine der vielversprechendsten molekularbiologischen Techniken, die während des letzten Jahrzehntes entwickelt wurde, ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die eine millionenfache Multiplikation von spezifischen DNA-Sequenzen erlaubt. Diese hochempfindliche Methode erfordert jedoch eine absolut saubere Probenpräparation.

Generell besteht ein Tumorgewebe aus Tumorzellen vermischt mit normalen, nicht-tumörösen Zellen. Diese Heterogenität des Gewebes ist eines der größten Probleme für die molekulare Untersuchung. Große Anstrengungen wurden unternommen, um homogene Gewebeproben zu gewinnen. Dazu wurden Mikronadeln, Mikrokapillare und UV-Bestrahlung eingesetzt. Erst kürzlich wurde eine Methode vorgestellt, die eine circa $6 \mu\text{m}$ dünne, gereckte Polyesterfolie als Träger für histologische Schnitte verwendet [9]. Mit einem Skalpell wurden die interessierenden Zellareale herausgeschnitten. Die sogenannte MO-MeNT-Technik (Microdissection-Of-Membrane-mounted-Native-Tissue) erlaubt jedoch nur ein geradliniges Ausschneiden. Im Jahre 1976 wurde zum erstenmal ein Laser für die Mikrodissektion von Gewebe eingesetzt. Kubo et al. präparierten 1995 mit dem Laser einzelne Nierentubuli [5, 10]. Erst kürzlich wurde eine Methode vorgestellt, bei der die interessierenden Zellverbände mit einem Infrarot-Laser bei circa 90°C auf eine thermoplastische Folie aufgeschmolzen werden [11]. Der Durchmesser der mit der sogenannten LCM (Laser-Capture-Microdissection)-Methode gewonnenen Zellareale beträgt zwischen $60 \mu\text{m}$ und $200 \mu\text{m}$.

Bei all den oben beschriebenen, riesigen Gewebeproben besteht allerdings ein hohes Kontaminationsrisiko durch unerwünschtes, nicht-tumöröses Material.

Wir haben eine Methode entwickelt, die es erlaubt, kontaminierendes Zellmaterial aus einem größeren Verband vollständig zu eli-

minieren oder ganz gezielt einzelne Zellen aus einem histologischen Präparat zu gewinnen. Der ROBOT-MICROBEAM (P.A.L.M. GmbH Wolfratshausen) besteht aus einem kleinen, robusten Stickstofflaser von hoher Strahlqualität, der durch den Auflichtfluoreszenzstrahlengang ins Mikroskop eingekoppelt wird (Abb. 3). Die hohe Photonendichte im Laserfokus photolytisiert alles Material, d.h. es handelt sich hierbei um eine „Kaltablation“ ohne Hitzeeffekte. Der UV-Laser Mikrostrahl ist kombiniert mit einem motorisierten, computer-gesteuerten Mikroskopisch und Mikromanipulator. Lasermikromanipulation mit Nanometer Präzision erfordert eine hochpräzise Objektpositionierung. Die Achsen von ROBOT-Stage und ROBOT-Manipulator können mit Geschwindigkeiten von wenigen hundert Nanometern bis zu mehreren Mikrometern pro Sekunde verfahren. Die hybriden Schrittmotoren erlauben einen Verfahrensweg bis zu 10 cm bei einer minimalen Schrittweite von 20 nm. Ein integrierter Framegrabber ermöglicht die simultane Beobachtung des Mikroskopbildes auf dem Bildschirm überlagert mit den Kontrollfunktionen von Mikroskopisch und Mikromanipulator. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Lasermikromanipulation ist die exakte Übereinstimmung der Laserfokusslage mit dem optischen Fokus des Mikroskops. Daher ist die individuellen Einstellmöglichkeit der Laserfokusslage eine wichtige Eigenschaft des ROBOT-MICROBEAMS, um einen möglichen Strahlversatz bedingt durch lichtbrechende Teilchen im Laserstrahlengang (chromatische Aberration) zu korrigieren.

Wenn diese Technik mit der oben erwähnten MO-MeNT-Methode kombiniert wird, kann ein größeres Gewebearreal ohne Schwierigkeiten und mit hoher Genauigkeit präpariert werden. Zuerst werden Zellen oder Zellmaterial, das die PCR-Amplifikation stören könnte, in die Schußlinie des Lasers gebracht und mit einem bzw. ein paar wenigen gezielten Schüssen vollständig zerstört. Der Laser schneidet die Mem-

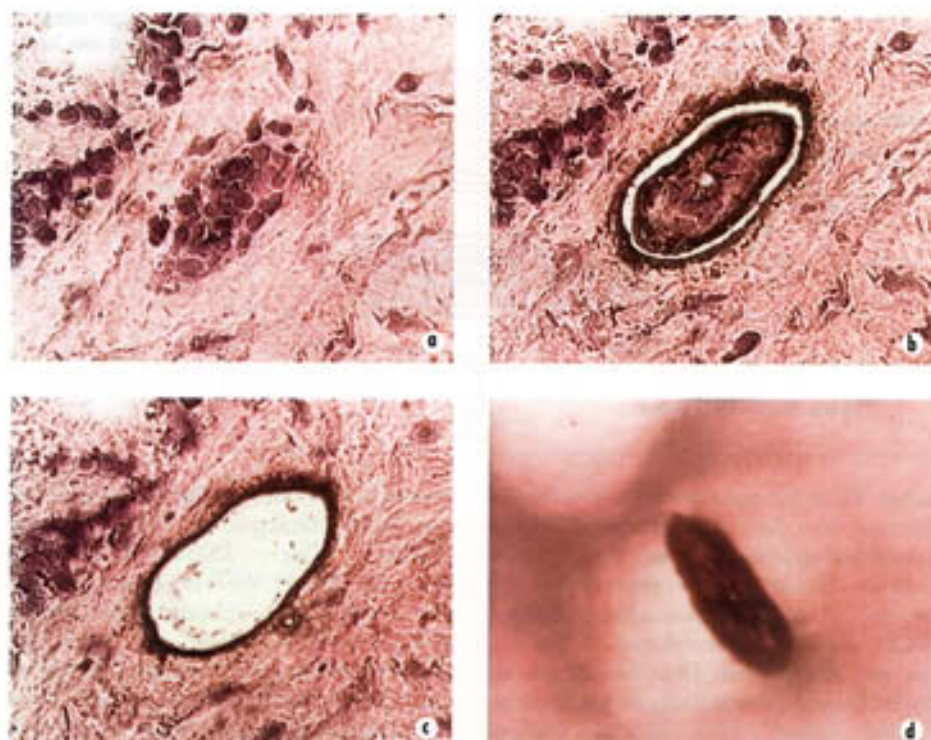


Abb. 4a: MICROBEAM-MOMENT Technik: Der Gewebeschnitt ist auf die Trägermembran, einer gereckten Polyesterfolie, aufgebracht.
 Abb. 4b: Nach dem Ausschneiden des Zellareals wird mit einem gezielten Laserschuss eine unerwünschte Zelle entfernt (siehe Loch in der Mitte des ausgeschnittenen Arealis)
 Abb. 4c: Der laser dissektierte Membran-Gewebe-Stapel wird mit der Laserstrahlendruckkraft auf eine selbstklebende Folie katapultiert (Größe des ausgeschnittenen Arealis circa 50 x 80 µm).
 Abb. 4d: Das ausgeschnittene Gewebeareal klebt auf der Folie und kann somit leicht in ein Sammelgefäß überführt werden.

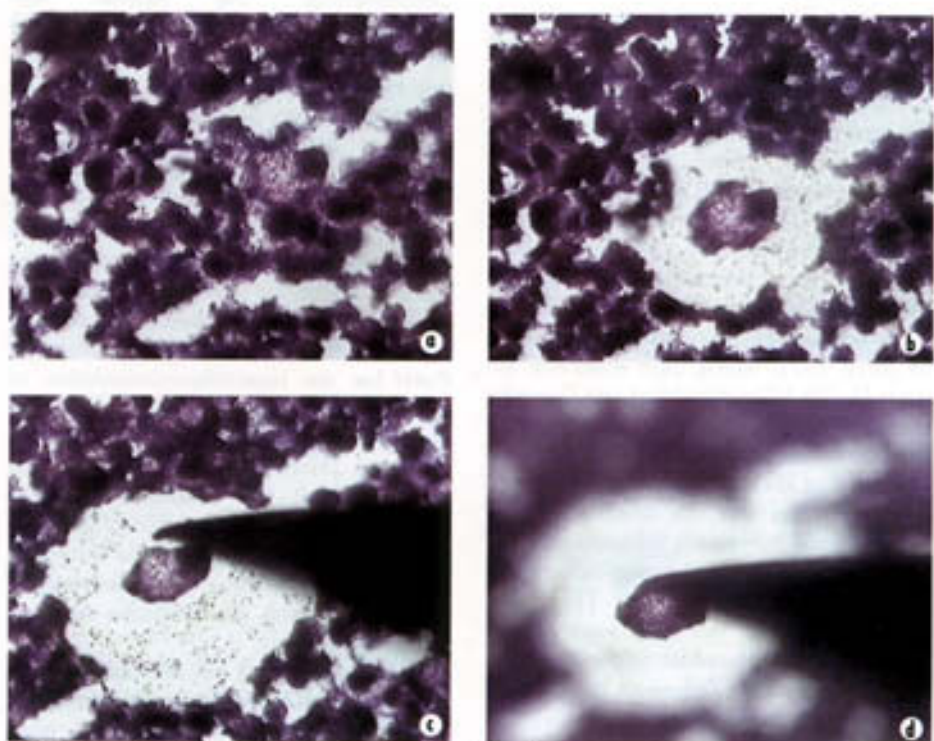


Abb. 5a: ROBOT-MICROBEAM Technik: Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete heterogene Gewebeprobe, bestehend aus Tumorzellen vermischt mit nicht-tumörösen Zellen.
 Abb. 5b: Einzelzellisolierung: Das zelluläre Material in der unmittelbaren Umgebung der interessierenden Zielzelle wird durch die extrem hohe Photonendichte im Fokus des UV-Laser Mikrostrahls vollständig zerstört.
 Abb. 5c: Eine konventionelle Spritzennadel, die an einem motorisierten, computergesteuerten Mikromanipulator befestigt ist, streicht vorsichtig über die Zielzelle.
 Abb. 5d: Sobald die Zelle berührt wird, bleibt sie fest an der Nadel kleben und kann somit für weitere molekularebiologische Untersuchungen leicht in ein Sammelgefäß überführt werden.

bran mit dem daraufliegenden, Gewebe exakt entlang der Kante des ausgesuchten, „lasergereinigten“ Bereichs (Abb. 4). Somit ist es möglich, der individuellen Form des Tumorareals genau zu entsprechen. Der Membran-Gewebe-Stapel wird dann entweder mit einer konventionellen Spritzennadel entnommen oder kann mittels der Kraft des Laserstrahlendruckes in ein Auffanggefäß oder auf eine klebende Folie katapultiert werden. Dieser Vorgang kann sogar teilweise durch mehrere computergesteuerte Schritte automatisiert werden.

Der ROBOT-MICROBEAM läßt sich auf einen Durchmesser von weniger als einem Mikrometer fokussieren. Dies ermöglicht die Präparation einer einzelnen Zelle, oder gar die Isolierung eines kernfreien Cytoplasmas. Das gesamte benachbarte Zellmaterial wird durch Laserablation entfernt, so daß eine „materialfreie“ Zone rund um die Zielzelle entsteht (Abb. 5). Um die Zelle vom Objektträger herunterzunehmen, wird eine konventionelle Einwegspritzennadel am ROBOT-Manipulator angebracht. Sobald die Nadel beim sachten Darüberstreichen die Zelle berührt, bleibt diese fest daran kleben und kann mühelos in einen geeigneten Behälter zur weiteren Verarbeitung transportiert werden. Für eine berührungslose, schnelle und mühelose Einzelzellgewinnung kann auch das obenbeschriebene Laserstrahlendruck-Katapultieren eingesetzt werden.

Die Laserbestrahlung schadet der genetischen Information der präparierten Zellen nicht, wie am Beispiel des diffus wachsenden Magenkarzinom gezeigt werden konnte [12]. In der freiparaparierten, einzelnen Tumorzelle wurde eine Mutation in dem für das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin codierenden Gen gefunden, während in einer benachbarten, gesunden Epithelzelle nur die Wildtyp-Sequenz vorhanden war.

Die auf der Lasermikrostrahlmethode basierende, absolut hygienische Präparation weniger, homogener Zellen oder einer einzelnen Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation ist ein wichtiger Schritt in Richtung hochpräziser molekularer Analyse von genetischen Defekten, die als Ursache von Krebs, Infektionen oder Krankheiten gelten. Die Möglichkeit, auch mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Proben für die genetische Einzelzellanalyse verwenden zu können, öffnet den Weg, um das in den Pathologischen Instituten seit Jahrzehnten archivierte Biopsiematerial untersuchen zu können. Viele Patienten mit gewöhnlichen und ungewöhnlichen Krankheiten von bekanntem klinischen Verlauf, können rückblickend untersucht werden,

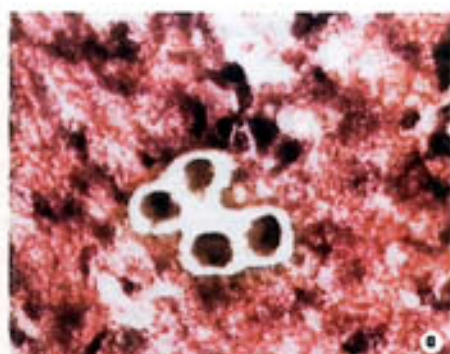


Abb. 6a, 6b:

Techniken, die bald eine Schlüsselposition in der modernen Molekularpathologie erhalten können:

6a: Einzelzellkatapultieren: Die einzelne Zelle wird mit einem dünnen Laserschnitt vom umgebenden Gewebe abgetrennt. 6b: Die isolierten Zellen werden mit Hilfe der Laserdruckkraft berührungslos und somit kontaminationsfrei auf eine adhäsive Membran oder direkt in ein Mikrozentrifugenröhrchen katapultiert.



7a: Der Laser schneidet entlang eines vorgewählten Weges, wobei die unregelmäßige Form des ausgewählten Gewebereals exakt berücksichtigt werden kann.

7b: Für die nachfolgende molekularbiologische Untersuchung kann der laser dissektierte Membran-Gewebe-Stapel mit einer normalen Spritzennadel entnommen, oder ebenfalls mittels Laserdruckkraft wegkatapultiert werden (Größe des ausgeschnittenen Areals circa 80 x 200 µm).

um mehr Informationen über die molekulare Ursache der genetischen Defekte zu gewinnen.

Zukunftsperspektiven

Eine interessante Anwendung des UV-Laser Mikrostrahles ist die optische Materialinjektion in lebende Zelle ohne Störung der Zellvitalität. Ein präzise fokussierter Laserstrahl kann winzige Löcher in die Zellmembran von adherent wachsenden oder suspendierten Zellen schießen. Das Loch bleibt nur für den Bruchteil einer Sekunde geöffnet, bevor es von der Zelle wieder repariert wird. Dies ist jedoch lange genug, um das im Medium gelöste, genetische Mate-

rial aus der unmittelbaren Umgebung einsaugen zu können. Wird das Loch direkt in den Zellkernbereich geschossen, steigert sich die Erfolgsrate der DNA Transfektion ebenso wie die Effizienz der Zellveränderung um mehrere Größenordnungen [5]. Die Selektivität und gesteigerte Effizienz der laserinduzierten Materialinjektion ohne Chemikalien oder virale Vektoren könnte ein erster Schritt in Richtung „optischer Gentherapie“ sein.

Eine der Hauptvorteile der berührungslosen Lasermikromanipulation für die genetische Untersuchung einzelner Zellen oder einzelner Moleküle ist die hohe Präzision und Selektivität, sowie die Reinheit der Probenpräparation. Wenn man diese Metho-

de mit der Laserscanning-, Scanningkraft- oder der Nahfeldmikroskopie kombiniert, können sogar noch weitergehende Details der DNA Veränderungen untersucht werden.

Zusammenfassend betrachtet sind wir der Meinung, daß sich die berührungslose, optische Lasermikromanipulation zu einer unentbehrlichen Methodik in der modernen Gen- und Biotechnologie entwickeln wird.

Danksagung

Wir möchten uns herzlich bei Dr. Art Ashkin und Prof. Karl-Otto Greulich für die Einweisung in die faszinierende Technik der Lasermikromanipulation bedanken. Herrn Raimund Schütze, P.A.L.M. GmbH, danken wir für die apparative und technische Unterstützung, Frau Ziehr für die Hilfe bei der Übersetzung, Herrn Armin Heinze und Dr. Christoph Köppen für anregende Diskussionen und hilfreiche Kommentare.

Literatur

- [1] SCHÜTZE, K., A. CLEMENT-SENGEWALD: *Nature* **368**, 667-670 (1994)
- [2] GREULICH, K.O., G. LEITZ: *Exp. Techn. Phys.* **40**, 1-14 (1994)
- [3] GREULICH K.O. et al.: Institut f. Wiss. Film, Göttingen Video C-1897 (1995)
- [4] SCHÜTZE et al.: Institut f. Wiss. Film, Göttingen Video C-1921 (1996)
- [5] SCHÜTZE et al.: *Gen. Anal. BME* Februar (1997) in press
- [6] CLEMENT-SENGEWALD, A. et al.: *J. Ass. Rep. Gen.* **13**, 259-265 (1996)
- [7] ANTINORI, S. et al.: *Hum. Reprod.*, **11**, 2488-2492 (1996)
- [8] THALHAMMER, S. et al.: *Biomed. Opt.* January (1997) in press
- [9] BÖHM, M. et al.: *Int. J. Oncol.* **10**, (1997) in press
- [10] KUBO, Y. et al.: *Cancer Res.* **55**, 989-990 (1995)
- [11] EMMERTBUCK et al.: *Science* **274**, 998-1001, (1996)
- [12] BECKER, I. et al.: *Lab. Invest.* Dezember (1996) in press