

Biolaser

Biologische und biomedizinische Anwendungen intrazellulärer Laserpartikel

MARCEL SCHUBERT

HUMBOLDT CENTRE FÜR NANO- UND BIOPHOTONIK, UNIVERSITÄT ZU KÖLN

Microscopic laser particles have emerged as a new type of intracellular probes for various biological and biomedical applications. Utilizing some of the unique properties of laser light, laser particles are formidable barcoding devices, can sense chemical and physical changes inside cells, and recently demonstrated biomechanical force measurements with unprecedented temporal resolution. Further developments are targeting the direct application of laser particles along high throughput sequencing techniques, as well as deep tissue sensing.

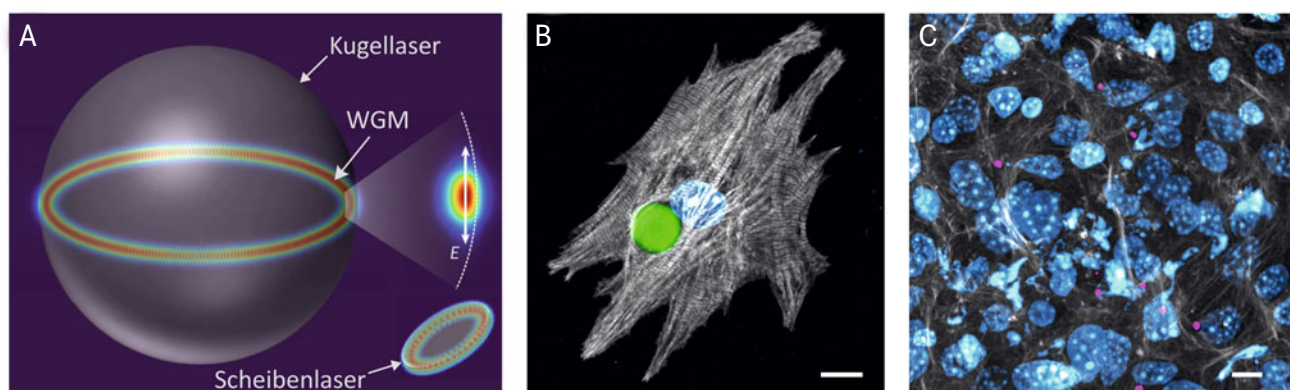
DOI: 10.1007/s12268-025-2463-3
© The Author(s) 2025

■ Können lebende Zellen Laserstrahlung erzeugen? Gibt es Laser, die so klein sind, dass sie in eine Zelle passen? Und können Laser selbst in Kleinstlebewesen integriert werden? Die Antwort auf diese – vielleicht nicht alltäglichen – Fragen kann mittlerweile jeweils mit „Ja, sie können!“ beantwortet werden, wie die neuesten Forschungsergebnisse im Bereich der Mikro- und Nanolaser belegen [1–4]. Zudem ergeben sich mit fortschreitender Spezialisierung und Verfeinerung der optischen Eigenschaften immer neue Anwendungsmöglichkeiten.

Intrazelluläre Mikro- und Nanolaser

Die Erfindung des Lasers ist eine der größten technischen Errungenschaften des 20. Jahrhunderts. Die durch den Laser erzeugte Laserstrahlung besitzt in vielerlei Hinsicht einzigartige Eigenschaften – vor allem, wenn man deren Intensität, Ausbreitungseigenschaften und spektrale Reinheit betrachtet. In der biologischen Bildgebung und Analytik und im medizinischen Alltag sind Laser daher oft essenziell und seit langem routinemäßig im Einsatz.

Die fortschreitende Miniaturisierung optischer Bauelemente erlaubt seit kurzem Laser zu erzeugen, die weniger als 10 µm groß sind. Diese Laserpartikel vereinen das zur Erzeugung des Laserlichts notwendige Verstärkermaterial sowie den ebenfalls benötigten Laserresonator. Letzterer verwendet den optischen Effekt der Totalreflektion und erlaubt, die mittels stimulierter Emission erzeugten Photonen innerhalb der Laserpartikel einzufangen. Für die Effizienz und letztendlich auch die Größe verantwortlich ist hierbei der Brechungsindex der Partikel. Dieser muss deutlich größer sein als der Brechungsindex von Wasser ($n = 1,33$), um Licht auch innerhalb wässriger Umgebungen wie biologischen Zellen effizient einzufangen. Organische Materialien, z. B. Polystyrol ($n = 1,59$) und anorganische Halbleiter ($n > 3$), haben sich hierbei als besonders geeignet etabliert [2–4]. Grundsätzlich gilt, dass je größer der Brechungsindex des Resonators, desto kleiner können die Laserpartikel werden. Laserpartikel mit einem Durchmesser von ungefähr 1 µm und einer Dicke von nur 200 nm lassen sich daher z. B. aus einer Legierung aus AlGaInP ($n = 3,5$) fabricieren und stellen damit die derzeit kleinsten Partikel dar [5, 6]. Einzig die Pumpquelle,



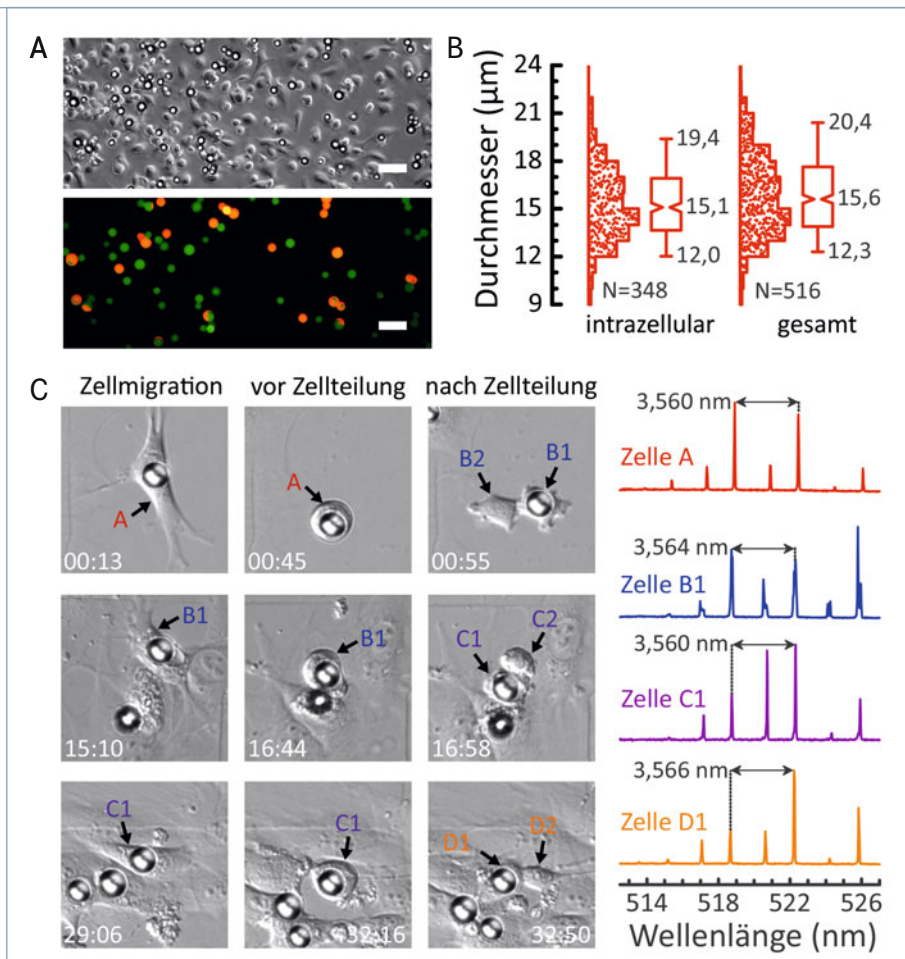
▲ **Abb. 1:** Funktionsweise mikroskopischer Laser-Partikel und deren intrazelluläre Anwendung. **A**, Optische Simulation des Laserlichts in einem polymeren Kugellaser und einem anorganischen Scheibenlaser. Ebenfalls dargestellt ist die vergrößerte Struktur der *Whispering Gallery Mode* (WGM), welche die Verteilung des elektrischen Feldes E innerhalb des Laserresonators repräsentiert. Der Pfeil kennzeichnet die Polarisationsrichtung des elektrischen Feldes relativ zur Oberfläche der Kugel (gestrichelte Linie). **B**, Konfokalmikroskopie-Aufnahme einer neonatalen Herzmuskelzelle mit einem intrazellulären Kugellaser (grün) und fluoreszenzmarkierten Myofibrillen (grau) und DNA (cyan). **C**, Konfokalmikroskopie-Aufnahme einer Kultur von Keratinozyten mit integrierten Scheibenlasern (magenta) und mit fluoreszenzmarkierten F-Actin (grau) und DNA (cyan). Maßstab in B und C: 10 µm.

welche die angeregten Zustände erzeugt, muss weiterhin extern, typischerweise mittels eingestrahelter Pump Laser, zur Verfügung gestellt werden. Dies kann jedoch ohne großen Aufwand und Einschränkung der Anwendbarkeit realisiert werden und ist kompatibel mit allen modernen Fluoreszenzmikroskopie-Methoden. [7]

Der Nachweis, dass Laserpartikel auch direkt in lebende Zellen integriert werden können und dort über längere Zeit verweilen, erfolgte erstmals 2015 [2, 3]. Fast zeitgleich zeigten hierbei zwei Arbeitsgruppen in Schottland und den USA, dass verschiedenste primäre Zellen und Zelllinien Laserpartikel durch Phagozytose in das Zytosol aufnehmen können (**Abb. 1**). Das optische Pumpen der Laserpartikel und die kontinuierliche Messung des Spektrums hatten dabei keine messbaren Effekte auf die Zellen. Aufgrund der hohen optischen Effizienz der mikroskopischen Laser liegt die benötigte Pulsenergie, um ein messbares Laserspektrum zu erzeugen, im Bereich von 1 pJ bis 1 nJ. Sie ist damit so klein, dass selbst bei tausenden Pulsen pro Sekunde keinerlei thermische oder phototoxische Effekte auftreten, und kann damit grundsätzlich als biokompatibel eingestuft werden. Gleichwohl können Zellen eine weitaus komplexere Reaktion auf die Internalisierung solcher Partikel zeigen, welche im Detail weiter untersucht werden müssen. Erste Analysen der Genexpression von Zellen mit und ohne intrazelluläre Laserpartikel zeigten jedoch nur sehr geringe Effekte [8].

Barcoding von Zellen

Das emittierte Licht der Laserpartikel besitzt im Wesentlichen die Eigenschaften makroskopischer Laser, das heißt, es ist extrem hell, breitet sich sehr directional aus, und ist monochromatisch. Als Folge sind die Laserspektren um viele Größenordnungen schmäler als die konventioneller fluoreszenter Farbstoffe, wie sie z. B. für die Markierung von Zellen genutzt werden. Da die Wellenlänge jedoch primär durch die Größe des Resonators bestimmt wird, erzeugen selbst kleinste, in der Größenordnung von einigen Nanometern liegende Unterschiede im Durchmesser der Laserpartikel, Laserlicht mit einer unterschiedlichen Farbe. Als Folge besitzt jedes Laserpartikel sein eigenes, charakteristisches Spektrum. Sie erlauben daher viele tausende Zellen eindeutig anhand des Spektrums des intrazellulären Laserpartikels zu identifizieren (**Abb. 2**).



▲ **Abb. 2:** Optisches Barcoding zur Identifizierung einzelner biologischer Zellen. **A**, Transmissionsmikroskopie- (oben) und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme (unten) zur quantitativen Analyse der Phagozytose der Kugellaserpartikel durch menschliche Makrophagen. Intrazelluläre Partikel erscheinen grün, Partikel außerhalb von Zellen erscheinen orange. Maßstab, 50 μm. **B**, Größenverteilung der intrazellulären Partikel im Vergleich zur Gesamtverteilung der Partikel. **C**, Zeitraffer-Aufnahmen eines intrazellulären Kugellasers, welcher von der Mutterzelle (Fibroblast) über mehrere Generationen in jeweils eine der Tochterzellen weitergegeben wird. Die Zellen sind während der Migrationsphase (links), kurz vor der Zellteilung (Mitte), und nach der Zellteilung (rechts) dargestellt. Ebenfalls dargestellt ist das Spektrum des Laserpartikels in den jeweiligen Zellen mit Angabe des Abstands zweier Lasermoden, welche zur Identifikation des Mikrolasers verwendet werden. Die Zeit ist in „Stunden:Minuten“ angegeben [9]. Größe des Bildausschnitts, 100 × 100 μm².

Diese als optisches Barcoding bezeichnete Technik ist eine der Hauptanwendungsmöglichkeiten der Laserpartikel. Es wurde z. B. verwendet, um Krebszellen während der Migration durch enge Membranen zu beobachten oder mehrere tausend Zellen in einem Tumor-Sphäroid mehrere Tage lang zu verfolgen [5, 6]. Besonders interessant sind diese Tracking-Anwendungen in Kombination mit modernen Durchflusszytometrie-Methoden und Einzelzell-Sequenzierung. Diese ermöglichen es, einzelne isolierte Zellen mehrmals zu messen und dabei sequenziell die Fluoreszenzmarker zur Identifikation von Proteinen oder Basenpaaren auszutauschen [8]. Die Anzahl der zu identifizierenden Marker ist somit nicht mehr durch die Bandbreite herkömmlicher Fluoreszenzfarbstoffe begrenzt und kann dadurch ein extrem hohes Maß an Multiplexing erreichen.

Sensoren in Herzzellen

Mikrolaser können auf vielfältige Weise als Sensoren verwendet werden. Hierbei werden in der Regel Wechselwirkungen des evaneszenten Feldes, also dem Teil des Laserlichts, der aus der Oberfläche in das angrenzende Volumen eindringt, mit seiner Umgebung ausgenutzt. So bewirken selbst kleinste Änderungen des Brechungsindex in der Umgebung eine Änderung der Resonanz innerhalb der Laserpartikel und führen zu einer messbaren spektralen Verschiebung des Laserlichts. Eine solche Änderung findet z. B. während der Kontraktion von Herzzellen statt. Wie unsere Gruppe vor einigen Jahren zeigen konnte, lässt sich das Kontraktionsprofil von Herzzellen durch intrazelluläre Laserpartikel hochauflöst und mit einer exzellenten Zeitauflösung messen (**Abb. 1B**, **Abb. 3A**, [4]). Der Effekt beruht

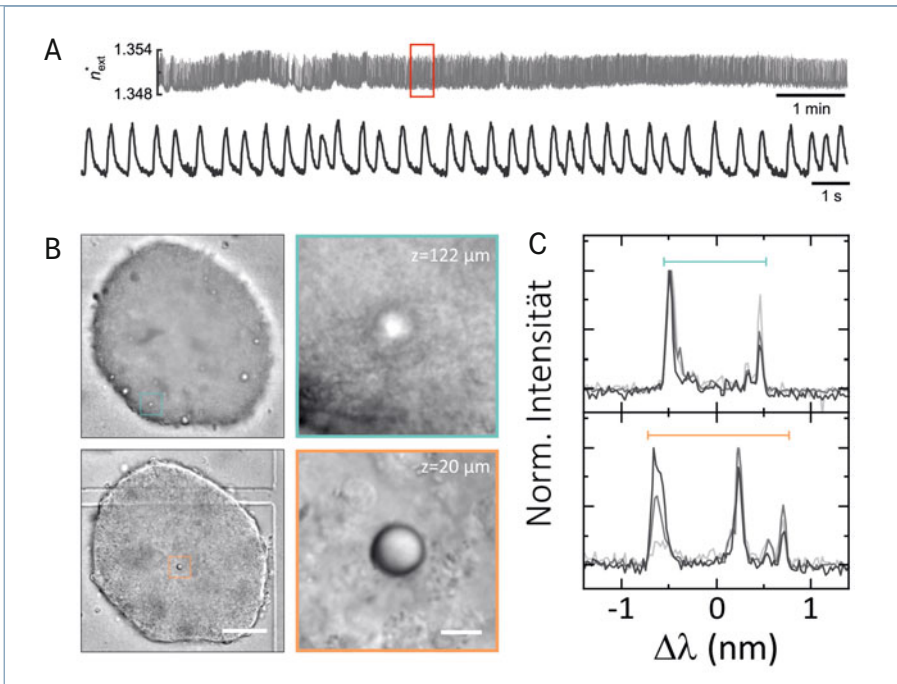


Abb. 3: Anwendung biointegrierter Laser-Partikel als Sensoren in Herzzellen und in Tumor-Sphäroiden. **A**, Kontinuierliche Messung der Kontraktilität einer Herzmuskelzelle mittels eines intrazellulären Kugellasers. Dargestellt ist die Änderung des Brechungsindex innerhalb der Zelle, welcher proportional zur Längenänderung der Myofibrillen ist [4]. **B**, Transmissionsmikroskopie-Aufnahme eines Tumor-Sphäroids mit integrierten verformbaren Kugellasern (Öltröpfen) bei einer Höhe von $z = 20 \mu\text{m}$ (unten) und $z = 122 \mu\text{m}$ (oben). Der farbige Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Laserpartikel. Die Spektren der Mikrolaser (rechts) zeigen breite Emissionsbanden, welche eine charakteristische Breite besitzen, wie anhand der Überlagerung drei verschiedener Lasermoden zu sehen ist [10]. Maßstab (Zoom), $100 \mu\text{m}$ ($10 \mu\text{m}$).

dabei wahrscheinlich auf einer noch genauer zu bestimmenden Dichteänderungen der Myofibrillen. Die Messung konnte bereits *in vivo* angewandt werden, indem die Kontraktilität des Herzens von Zebrafisch-Embryonen gemessen werden konnte. Aufgrund der sehr intensiven Strahlung kann das Laserlicht auch tief innerhalb des Gewebes detektiert werden. So konnte die Kontraktion einer einzelnen Zelle in lebenden Herzweschnitten selbst bei einer Gewebetiefe von $350 \mu\text{m}$ gemessen werden, deutlich tiefer als es momentan mit Einzel- oder Multiphotonen-Mikroskopie möglich ist [4].

Messung von Zellkräften

Aufgrund der enormen Bedeutung von Zellkräften in der Embryogenese und z. B. in der Ausbreitung von Tumoren gibt es bereits eine große Anzahl optischer Methoden zur Analyse biomechanischer Kräfte. Die wenigsten Methoden können jedoch innerhalb von Gewebe angewandt werden, speziell wenn dieses nicht optisch transparent ist. Um auch unter diesen schwierigen, aber biologisch hochrelevanten Bedingungen Zellkräfte zu messen, haben wir verformbare Mikrolaser entwickelt. Hierbei kommt es bei einer äußeren Krafteinwirkung zu einer Verformung

und damit zu einer Veränderung der Geometrie der ursprünglich sphärischen Mikrolaser. Als Folge dieser Verformung spalten die monochromatischen Laserlinien in breite Banden auf. Ein optomechanisches Modell kann dann sehr einfach die Breite der Laserbanden mit der einwirkenden Kraft korrelieren. Biologische Kräfte von unter einem Nanonewton können so genau gemessen werden [10]. Als erste Modelle wurden die Kräfte innerhalb von Tumor-Sphäroiden bestimmt, insbesondere auch in Bereichen, in denen aufgrund der Lichtstreuung kein Bild der Laserpartikel, sondern nur deren Spektren gemessen werden konnte (Abb. 3B). Des Weiteren wurden die Öltröpfen in *Drosophila*-Larven injiziert, um biomechanische Kräfte *in vivo* zu messen. Als nächstes sollen die verformbaren Laser auch in Kombination mit Herzzellen zur Anwendung kommen, um

neben der Kontraktilität auch die Kraft der Herzmuskelzellen zu messen.

Die weitere Verbesserung dieser Technik ist ein zentrales Forschungsthema unserer Arbeitsgruppe. Dazu müssen sowohl die Materialien als auch das Verständnis der optischen Eigenschaften und die biologischen Anwendungen weiterentwickelt werden, was eine spannende, interdisziplinäre Herausforderung darstellt.

Literatur

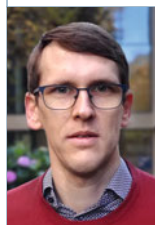
- [1] Gather MC, Yun SH (2011) Single-cell biological lasers. *Nat Photonics* 5: 406–410
- [2] Schubert M, Steude A, Liehm P et al. (2015) Lasing in Live Cells Containing Intracellular Optical Microresonators for Barcode-Type Cell Tagging and Tracking. *Nano Lett* 15: 5647–5652
- [3] Humar M, Yun SH (2015) Intracellular microlasers. *Nat Photonics* 9: 572–576
- [4] Schubert M, Woolfson L, Barnard RM et al. (2020) Monitoring contractility in cardiac tissue with cellular resolution using biointegrated microlasers. *Nat Photonics* 14: 452–458
- [5] Fikouras AH, Schubert M, Karl M et al. (2018) Non-obstructive intracellular nanolasers. *Nat Commun* 9: 4817
- [6] Martino N, Kwok SJJ, Liapis AC et al. (2019) Wavelength-encoded laser particles for massively multiplexed cell tagging. *Nat Photonics* 13: 720–727
- [7] Titze VM, Caixeiro S, Dinh VS et al. (2024) Hyperspectral confocal imaging for high-throughput readout and analysis of bio-integrated microlasers. *Nat Protoc* 19: 928–959
- [8] Kwok SJJ, Forward S, Fahlberg MD et al. (2024) High-dimensional multi-pass flow cytometry via spectrally encoded cellular barcoding. *Nat Biomed Eng* 8: 310–324
- [9] Schubert M, Volckaert K, Karl M et al. (2017) Lasing in Live Mitotic and Non-Phagocytic Cells by Efficient Delivery of Microresonators. *Sci Rep* 7: 40877
- [10] Dalaka E, Hill JS, Booth JHH et al. (2024) Deformable microlaser force sensing. *Light Sci Appl* 13: 1–14

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Jun.-Prof. Dr. Marcel Schubert
 Humboldt Centre for Nano and Biophotonics
 Institute for Light and Matter
 Department of Chemistry and Biochemistry
 University of Cologne
 Greinstraße 4-6
 D-50969 Köln
 marcel.schubert@uni-koeln.de
<https://schubert-lab.uni-koeln.de>

AUTOR



Marcel Schubert

Jahrgang 1983. Physikstudium an der Universität Potsdam. 2014 Promotion. 2014–2017 PostDoc an der University of St Andrews. 2018–2020 Royal Society Dorothy Hodgkin Fellow an der University of St Andrews, Schottland. Seit 2020 Juniorprofessor für Biointegrierte Photonik an der Universität zu Köln.