

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Technischen Fakultät der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

**Sortieren und Manipulieren von  
biologischen Objekten mit optischen  
Fallen und interferometrischem  
Tracking**

Benjamin Landenberger

Oktober 2014

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau  
Technische Fakultät  
Institut für Mikrosystemtechnik

**Dekan**

Prof. Dr. Yiannos Manoli

**Referenten**

Prof. Dr. Alexander Rohrbach

Prof. Dr. Roland Zengerle

15.10.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>Abstract</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1. Motivation	11
1.1.1. Bedeutung dreidimensionaler Strukturen in der Biologie	11
1.1.2. 3D-Zellkulturen und Mikroskopie	12
1.1.3. Optische Fallen und deren Anwendung in der Biologie	13
1.2. Der optische Manipulator	16
1.2.1. Anforderungen	16
1.2.2. Herausforderungen	17
1.3. Ziele der Arbeit und Umsetzung	18
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>21</b>
2.1. Optische Kräfte	21
2.1.1. Optische Fallen	22
2.1.2. Optische Kräfte auf biologisches Material	27
2.1.3. Abschätzung der optischen Gradientenkraft anhand eines Durchlichtbildes	28
2.2. Fourier-optische Grundlagen zur Hologrammberechnung	30
2.3. Erzeugung von optischen Fallen durch ein diffraktives optisches Element	34
<b>3. Versuchsaufbau und Methoden</b>	<b>39</b>
3.1. Grundlegende Überlegungen	39
3.2. Optische Komponenten	40
3.2.1. Lasereinheit	40
3.2.2. Abbildung des SLM in die Fokusebene	42
3.2.3. Mikroskop	49
3.2.4. Detektionseinheit	50
3.2.5. Optisches Subsystem für Zellsortierer	53

3.3.	Hologrammberechnung . . . . .	56
3.3.1.	Übersicht . . . . .	56
3.3.2.	OpenGL-Pipeline . . . . .	57
3.3.3.	Berechnung der Phasenwerte im Fragment-Shader . . . . .	59
3.3.4.	Beispielhologramm . . . . .	62
3.4.	Probenkammer . . . . .	62
3.5.	Kultivierung von Zellverbänden . . . . .	63
<b>4.</b>	<b>Sortierung von Suspensionszellen</b>	<b>67</b>
4.1.	Einführung . . . . .	67
4.2.	Funktionsprinzip . . . . .	70
4.3.	Mikrofluidik . . . . .	70
4.4.	Fallentrajektorien für beliebige Zelltypen . . . . .	74
4.5.	Versatzeffizienz für vier verschiedene Zelltypen . . . . .	76
4.6.	Sortieren von Hefezellen nach Größe und Fluoreszenzniveau . . . . .	80
4.7.	Diskussion . . . . .	83
<b>5.</b>	<b>Manipulation von Zellverbänden in 3D</b>	<b>85</b>
5.1.	Einführung . . . . .	85
5.2.	Charakterisierung der holographischen optischen Fallen . . . . .	88
5.2.1.	Intensitätsverteilung holographischer optischer Fallen . . . . .	88
5.2.2.	Optische Leistung in der Probenebene . . . . .	93
5.3.	Analyse der Kräfte auf Zellen . . . . .	95
5.4.	Manipulation mit Streukräften . . . . .	100
5.4.1.	Anheben eines großen Zellsphäroiden . . . . .	100
5.4.2.	Rotation eines Zellverbandes mit gerichteten Streukräften . . . . .	100
5.5.	Manipulation mit Gradientenkräften . . . . .	103
5.5.1.	Rotation einzelner Zellen . . . . .	103
5.5.2.	Rotation von Zellverbänden . . . . .	105
5.6.	Diskussion . . . . .	112
<b>6.</b>	<b>Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie</b>	<b>119</b>
6.1.	Einführung . . . . .	119
6.1.1.	Parallele Positionsbestimmung in 3D . . . . .	119
6.1.2.	Vergleichbare existierende Techniken . . . . .	119
6.1.3.	Konzept der konjugierten Fokalebene-Interferometrie . . . . .	120
6.2.	Herleitung der Detektionssignale . . . . .	121
6.2.1.	Interferenz von Fallen- und Streulicht . . . . .	121
6.2.2.	Intensitätsverteilung in einer Detektorebene . . . . .	125

6.2.3. Positionssignale . . . . .	128
6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1 $\mu$ m-Glasbeads . . . . .	129
6.4. Detektion von Zellmembranen . . . . .	140
6.4.1. Abtasten eines Zellverbandes jenseits der Fokusebene der Objektivlinse . . . . .	140
6.4.2. Abtasten eines Zellverbandes entlang im Raum gekippter Ebenen . . . . .	143
6.5. Diskussion . . . . .	145
<b>7. Abschließende Diskussion</b>	<b>149</b>
7.1. Zielerreichung . . . . .	149
7.2. Vorschlag für Manipulation mit Fallenkorrektur . . . . .	151
<b>A. Anhang</b>	<b>153</b>
A.1. Symbole . . . . .	153
A.2. Abkürzungen . . . . .	154
A.3. Optischen Komponenten und Geräte . . . . .	155
A.4. Justage des Strahlengangs . . . . .	155
A.5. OpenGL Shader Code . . . . .	158
A.6. Zellkultur nach der Methode der hängenden Tropfen . . . . .	160
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>161</b>



# Zusammenfassung

Die biologische Funktionsweise von Zellen lässt sich nur unzureichend erklären, wenn diese mit etablierten Verfahren in zweidimensionalen Zellkulturen (z. B. in einer Petrischale) untersucht werden. Die Einbettung von Zellen in eine dreidimensionale extrazelluläre Matrix und sowohl der mechanische Kontakt als auch der biochemische Austausch mit benachbarten Zellen haben einen entscheidenden Einfluss auf ihre Funktionsweise. Für die Untersuchung solcher Zellverbände werden neue technische Verfahren benötigt, die deren biologische Funktionsweise weitestgehend unbeeinträchtigt lassen.

In dieser Arbeit wird die Realisierung von optischen Manipulationsverfahren beschrieben, die es ermöglichen, biologische Objekte verschiedenster Größe zu sortieren und frei in drei Dimensionen zu bewegen. Dazu werden die Kräfte optischer Punktfallen eingesetzt, die mit Hilfe beweglicher Spiegel in 2D und eines spatialen Lichtmodulators in 3D platziert und bewegt werden können. Durch das geschickte Zusammenspiel mehrerer Fallen können auch große Objekte versetzt, rotiert und stimuliert werden. Geeignete Angriffspunkte werden, je nach Anwendungsszenario, entweder durch die Analyse von mikroskopischen Durchlichtbildern oder durch ein neues interferometrisches Detektionsverfahren ermittelt. Die Detektionssignale werden theoretisch hergeleitet und experimentell überprüft.

Es wird ein laborgerechter Versuchsaufbau vorgestellt, basierend auf einem invertierten Mikroskop und unterstützt von einem mikrofluidischen Analysechip. Dabei müssen konkurrierende Anforderungen, v. a. hochauflösende Mikroskopie und ein großer Aktionsradius der optischen Fallen, abgewogen werden. Die schnelle Berechnung von Computerhologrammen auf einer Grafikkarte erlaubt eine kontinuierliche Bewegung und eine Reaktion auf Messsignale.

Es wird detailliert gezeigt, wie Suspensionszellen unterschiedlicher Größe mit Hilfe einer einzelnen Falle aussortiert werden können. Zur Orientierung größerer Zellverbände werden verschiedene Manipulationsstrategien beschrieben und getestet, bei denen entweder Streu- oder Gradientenkräfte dominieren. Verschiedene biologische Objekte bis zu einem Durchmesser von  $150\ \mu\text{m}$  können in unterschiedliche Raumrichtungen gedreht und solche bis  $190\ \mu\text{m}$

## *Zusammenfassung*

Durchmesser angehoben und stabil gehalten werden.

# Abstract

Biological details on how cells operate cannot be explained sufficiently with established methods based on two-dimensional cell cultures (e.g. petri dishes). The embedding of cells into a three-dimensional extracellular matrix and both mechanical as well as biochemical interactions with neighboring cells have a significant influence on their behavior. New technologies are needed which allow to investigate such cell clusters but do not interfere with their normal behavior.

In this work, the realization of an all-optical manipulation technique is described which allows sorting, translation, and rotation of biological objects of different sizes in 3D. The necessary forces are exerted by optical point traps which are moved in 2D with mirrors and in 3D with a spatial light modulator. Depending on the application scenario, suitable trapping positions are determined either by analysis of microscopic bright field images or by a new interferometric detection method. The signals obtained by this method are derived theoretically and proven experimentally.

A bio lab-compliant experimental setup, based on a commercial inverted microscope and supported by an microfluidic analysis chip, is introduced. Competing requirements, such as high-resolution microscopy and a large operating range of the optical traps, must be balanced carefully. Rapid calculation of computer holograms on the graphic processing unit of a PC allow the continuous movement of traps and an immediate reaction on detection signals.

Optical sorting of different-sized suspension cells with a single point trap is shown, either inside a closed sample chamber or inside a microfluidic channel. Different manipulation strategies for rotating larger cell clusters are introduced and tested. These strategies differ in the domination of optical scattering forces over gradient forces or vice versa. Different objects up to a diameter of 150  $\mu\text{m}$  are shown to be rotated in different directions and objects up to 190  $\mu\text{m}$  can be lifted against gravity and hold stably.



# 1. Einleitung

## 1.1. Motivation

### 1.1.1. Bedeutung dreidimensionaler Strukturen in der Biologie

In zellbiologischen Untersuchungen werden heutzutage fast durchgängig Zellkulturen eingesetzt, in denen Zellen flach auf einem Substrat wachsen. In der Regel werden Petrischalen oder Mikroskop-Objektträger aus Glas oder Kunststoff eingesetzt, die die notwendigen optischen Eigenschaften für *hochauflösende Mikroskopie* mitbringen. Für diese *zweidimensionalen* Zellkulturen gibt es zahlreiche etablierte und bewährte Verfahren. Diese beinhalten beispielsweise die spezifische und unspezifische Färbung von Zellen oder auch das gezielte Einstellen und Ändern der Konzentration von Biomolekülen im Nährmedium. Ausgereifte Laborautomation erlaubt vollständig automatisierte Hochdurchsatz-Experimente – ein wichtiger Schritt, weg vom subjektiven Beurteilen eines Ergebnisses und hin zu einer objektiven, statistischen Auswertung eines Versuchs (Pepperkok und Ellenberg, 2006).

Diese 2D-Zellkulturen haben allerdings einen gravierenden Nachteil: Zellen können dort in sehr vielen Fällen nicht unter Bedingungen wachsen, die einen Vergleich mit einem vollständigen Organismus erlauben. Eine gute Übersicht über diese Problematik ist in (Tibbitt und Anseth, 2009) und (Pampaloni et al., 2007) gegeben. In einer Petrischale wachsen adhärente Zellen normalerweise in Monolagen. Ihre Form ist unnatürlich flach, und während sie auf der einen Seite Kontakt zur Petrischale haben, ist die andere Seite lediglich von Nährmedium umgeben. Dadurch können Nährstoffe und Biomoleküle nur von einer Seite an die Zelle gelangen. Signale zu benachbarten Zellen können lediglich über einen sehr schmalen Bereich an ihrer Peripherie ausgetauscht werden. Es ist einleuchtend, dass Vorgänge, die auf dem Zusammenspiel von verschiedenen Zellen basieren (z. B. Migration, Differenzierung, Kommunikation) mit diesen Mitteln nur schwer zu untersuchen sind.

In einem natürlichen Organismus sind die einzelnen Zellen in die *extrazelluläre Matrix* eingebunden, die ihm eine dreidimensionale Struktur

## 1. Einleitung

verleiht. Die extrazelluläre Matrix bestimmt die Nachbarschaft von Zellen und damit die biochemischen und biomechanischen Wechselwirkungen zwischen benachbarten Zellen. Zellen im dreidimensionalen Verband sind unterschiedlichen Konzentrationen von Nährstoffen und Signalmolekülen ausgesetzt, je nachdem ob sie sich am Rand oder im inneren eines Verbands befinden.

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Bedeutung von zwei- bzw. dreidimensionalen Zellkulturen lieferten [Petersen et al. \(1992\)](#). Sie berichten davon, dass sich Epithelzellen der menschlichen Brust in 2D-Zellkulturen zu Krebszellen entwickeln, jedoch zu einem normalen Verhalten zurückkehren, wenn sie in eine dreidimensionale Zellkultur überführt werden. In weiteren Arbeiten der Gruppe konnte gezeigt werden, dass verschiedene Wachstumsfaktoren von der dreidimensionalen Anordnung wichtiger Rezeptoren abhängen.

Ein vielversprechender Ansatz auf dem Weg zum Verständnis der Funktionsweise von komplexem Gewebe besteht darin, „die Lücke zu schließen“ ([Tibbitt und Anseth, 2009](#)): Untersuchungen werden weder an einzelnen Zellen noch an großen Organismen (wie Embryos) durchgeführt, sondern dazwischen – an mittelgroßen Zellverbänden, die in 3D-Zellkulturen wachsen. Dadurch gewonnene Erkenntnisse erlauben brauchbare Rückschlüsse auf die Funktionsweise vollständiger Organismen. Für diese mittelgroßen Zellverbände müssen die richtigen Werkzeuge bereitgestellt werden.

### 1.1.2. 3D-Zellkulturen und Mikroskopie

Eine Übersicht über den Stand der Technik für 3D-Zellkulturen ist ebenfalls in ([Tibbitt und Anseth, 2009](#)) gegeben. Meistens übernehmen Hydrogele die Aufgabe der extrazellulären Matrix und geben einem heranwachsenden Zellverband Form und Stabilität. Probleme gibt es jedoch oft mit einer mangelhaften Sauerstoffversorgung, einem durch Materialinhomogenität hervorgerufenen Nährstoffgradienten und unnatürlichem, mechanischem Druck. Die Rekultivierung eines Zellverbandes in reinem Nährmedium für Folgeuntersuchungen ist in der Regel nicht möglich. Vor allem aber hat sich herausgestellt, dass in Hydrogele eingebettete Zellverbände sich nur unter Einschränkungen mit den etablierten Mikroskopieverfahren untersuchen lassen. Hier werden in absehbarer Zeit wahrscheinlich vor allem *konfokale Mikroskopie* und *Lichtscheibenmikroskopie* die präferierten Techniken sein.

Die konfokale Mikroskopie ([Pawley, 2006](#)) hat mit anderen hochauflösenden Verfahren ein Problem gemein: Auf Grund der durch Lichtstreuung limitierten Eindringtiefe kann nur ein begrenzter Bereich, welcher der Beleuchtungsquelle

und der Beobachtungskamera zugewandt ist, untersucht werden. Für aufwändige Halterungen, die eine Drehung und damit eine Beobachtung von verschiedenen Bereichen ermöglichen würden, ist der Arbeitsabstand der Objektivlinsen zu klein. Oft „löst“ man dieses Problem, indem man das zu untersuchende Objekt in Scheiben schneidet und damit zerstört. Neue Techniken, die ein erneutes Zusammensetzen einzelner Schichten ermöglichen (Derda et al., 2009), müssen ihre Vergleichbarkeit mit natürlichen Organismen erst noch beweisen.

In der Lichtscheibenmikroskopie (*light sheet based microscopy – LSBM*) (Huiskens et al., 2004) und in anderen Verfahren, die Objektivlinsen mit niedriger NA verwenden (optische Kohärenztomographie (Huang et al., 1991), optische Projektionstomographie (Sharpe et al., 2002)), kann mit einem größeren Arbeitsabstand gearbeitet werden. Deshalb können *Gelzylinder* verwendet werden, in denen Zellen entweder direkt kultiviert werden oder in die sie kurz vor der Untersuchung eingebettet werden. Die Präparation ist aufwändig, sie erfordert Zeit und eine gewisse Übung. Mit ausgereiften Mikroskopen ist die Rotation des Objekts um eine Achse möglich (Greger et al., 2007; Fahrbach et al., 2010).

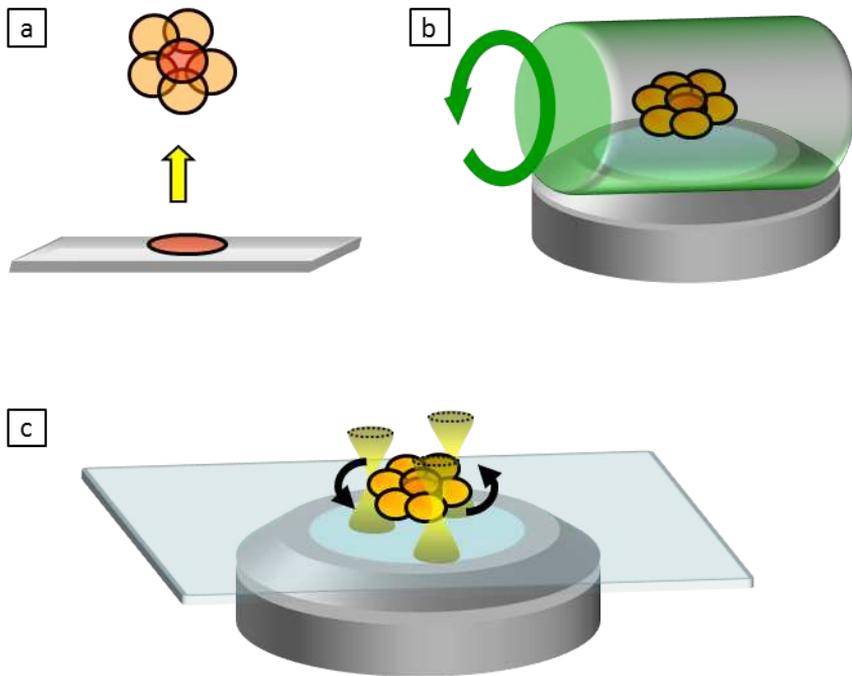
Eine technische Neuerung, welche die hochauflösende Mikroskopie von Zellverbänden erlaubt, indem sie die Möglichkeit bereitstellt, den Zellverband zu positionieren und zu rotieren, und den Einsatz von Hydrogelen überflüssig macht, wäre daher von großem Interesse. Im Folgenden soll nun erläutert werden, warum sich die Verwendung optischer Fallen für diese Aufgaben anbietet.

### 1.1.3. Optische Fallen und deren Anwendung in der Biologie

Erste Versuche an biologischen Objekten wurden bereits von den Erfindern der optischen Falle um Arthur Ashkin durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass sich Bakterien und Viren über Stunden hinweg dreidimensional stabil fangen lassen, ohne offensichtliche Beeinträchtigung ihrer Vitalität (Ashkin und Dziedzic, 1987). In weiteren Versuchen gelang auch das Fangen von Zellen und das Bewegen einzelner Zellorganellen innerhalb von Zellen (Ashkin et al., 1987).

Für die Verwendung optischer Fallen bei der Erforschung biologischer Vorgänge gibt es überzeugende Gründe. Die Kräfte, die ausgeübt werden können, liegen in einer vergleichbaren Größenordnung wie sie in vielen biologischen Prozessen wirken, z. B. beim Transport von Vesikeln innerhalb einer Zelle durch molekulare Motoren (~5 pN) oder der Kraft, die durch die Oberflächenspannung einer Zellmembran ausgeübt werden kann. Molloy und

## 1. Einleitung



**Abb. 1.1.1.: 3D-Zellkulturen und optische Fallen in der Biologie.**  
(a) Zellen verhalten sich anders, wenn sie – anstatt flach auf einem Glaträger wachsend – von anderen Zellen umgeben sind. (b) Das Einbetten in Gelzylinder beeinträchtigt Zellverbände in ihrem Wachstum und schränkt die Verwendung für mikroskopische Untersuchungen ein. (c) Mit optischen Fallen können biologische Objekte flexibel gehalten, bewegt und stimuliert werden.

Padgett (2002) nennen einige weitere Beispiele, z. B. eine DNS-Doppelhelix zu entwinden ( $\sim 50$  pN) oder Wechselwirkungen zwischen Proteinen ( $\sim 20$  pN). In der Größenordnung von Zellen oder Zellorganellen ist die Manipulation mit mechanischen Greifern oder Mikropipetten nahezu unmöglich, da bei Kontakt attraktive Oberflächenkräfte wirken, die das Loslassen eines Objektes verhindern. Optische Fallen können im Gegensatz dazu an jedem Ort beliebig ein- und abgeschaltet werden. Da bei biologischen Untersuchungen meist ohnehin ein optisches Mikroskop zur Verfügung steht, bietet sich die Integration einer optischen Falle und damit die Verwendung bestehender Infrastruktur an.

Leider birgt die Verwendung optischer Fallen auch Risiken für biologische Objekte. Durch lange und intensive Einwirkung des Fallenlasers auf eine Probe kann es zu Erhitzung und damit zur *Denaturierung* von Enzymen kommen. Noch schwieriger vorherzusagen ist das Auftreten von *Phototoxizität*, meist durch die Entstehung freier Radikale, die auch bei herkömmlichen lichtmikroskopischen Verfahren auftritt (Tinevez et al., 2012). Diese beiden Effekte müssen bei der Bewertung eines neu entwickelten Systems immer im Auge behalten werden.

Eine gute Übersicht über Techniken und Anwendungen optischer Fallen bieten Jonás und Zemánek (2008) sowie Dholakia und Čížmár (2011). Beide Veröffentlichungen enthalten auch einen Abschnitt über die Verwendung optischer Fallen im Rahmen biologischer Untersuchungen. Diesbezüglich sei auch auf eine Zusammenfassung etwas älterer Arbeiten verwiesen (Svoboda und Block, 1994).

An dieser Stelle sollen exemplarisch einige wenige Arbeiten genannt werden, die das Potential optischer Fallen für biologische Untersuchungen verdeutlichen. So nutzten beispielsweise Uhrig et al. (2009) holographisch erzeugte optische Fallen (*holographic optical tweezers* – HOT), um die mechanischen Spannungen zu messen, die auftreten, wenn sich ein Netzwerk aus *Aktin-Filamenten* zwischen sieben gefangenen Polystyrol-Kügelchen ausbildet. Ehrlicher et al. (2002) gelang es, das Wachstum von Nervenzellen mittels einer schwachen optischen Falle in eine definierte Richtung zu lenken, indem dem natürlichen, permanentem Umbau des *Aktin-Zellskeletts* eine Vorzugsrichtung aufgeprägt wurde. Kress et al. (2009) setzten einem sich entwickelnden Organismus (während der Embryogenese) einer räumlich und zeitlich unterschiedlichen *Konzentration von Signalmolekülen* aus, die von optisch gefangenen Beads abgegeben wurden. Auf diese Weise konnten Zellen polarisiert oder ihnen eine Migrationsrichtung vorgegeben werden. Einen großen Schritt bei der Weiterentwicklung von künstlichen *3D-Zellkulturen* stellt die Arbeit von Mirsaidov et al. (2008) dar. Dabei wurden verschiedene

## 1. Einleitung

Zelltypen mit Hilfe holographischer Fallen dreidimensional angeordnet und ihre Position zueinander anschließend durch ein photoaktivierbares Hydrogel dauerhaft fixiert. Zur Vereinfachung bei der *Fluoreszenz-Mikroskopie* nutzten Eriksson et al. (2009) optische Fallen, um viele nebeneinander liegende Zellen axial automatisch so zu positionieren, dass eine gute Abbildung der Zellkerne gewährleistet war. Außerdem bieten sich optische Fallen für das Aussortieren einzelner Zellen an, wobei hier sehr unterschiedliche Strategien Verwendung finden (Jonás und Zemánek, 2008).

## 1.2. Der optische Manipulator

### 1.2.1. Anforderungen

Die genannten Beispiele liefern eine Vorstellung davon, welche Eigenschaften und Fähigkeiten ein optischer Manipulator haben sollte, der für die Untersuchung komplexer biologischer Vorgänge ausgelegt ist.

**A)** Stabiles Halten von biologischen Objekten mit optischen Fallen für hochauflösende Lichtmikroskopie

Insbesondere in der Fluoreszenz-Mikroskopie muss oft mit sehr unterschiedlichen Belichtungszeiten und Wiederholungen gearbeitet werden. Es ist daher unerlässlich, dass ein Objekt auf einer Zeitskala von Sekunden bis hin zu wenigen Minuten seine Position nicht ändert.

**B)** Versetzen und Rotieren von Objekten

Große biologische Objekte lassen sich mit einer Objektivlinse nicht an allen Stellen gleich gut beobachten. Sie sollten gedreht werden können, um interessante Stellen der Objektivlinse zuzuwenden zu können und so die Beleuchtung und/oder die Abbildungsqualität zu verbessern.

**C)** Untersuchung einzelner Zellen, aber auch größerer Zellverbände oder kleiner Embryos

Für Objekte unterschiedlicher Größe werden in der Mikroskopie momentan unterschiedliche Objektträger eingesetzt (z. B. Petrischale oder Gelzylinder). Durch die Unterstützung von optischen Fallen kann ein simpler, universell einsetzbarer Objektträger ausreichen und Experimente spürbar vereinfachen.

**D)** Mechanische oder biochemische Stimulation von Objekten

Es lassen sich viele Erkenntnisse über biologische Zusammenhänge untersuchen, wenn ein biologischer Organismus gezielt stimuliert werden und seine Reaktion auf diesen Stimulus beobachtet werden kann. Diese Stimulation kann durch biochemisch aktive Signalmoleküle erfolgen, die beispielsweise von einem optisch gefangenen Bead lokal abgegeben werden und deshalb unterschiedlich stark entlang der Peripherie des Organismus konzentriert sind. Ebenso gut kann ein Organismus mechanisch stimuliert werden. Die Reaktion des Organismus kann meist über die Generierung von fluoreszierenden Proteinen sichtbar gemacht werden.

### E) Optisches Sortieren von Suspensionszellen

Reagiert eine Population von Zellen unterschiedlich auf eine wie auch immer geartete Stimulation, ist es oft notwendig, eine bestimmte Subpopulation zu isolieren. Es bietet sich an, diese Aufgabe ebenfalls mit Hilfe optischer Fallen zu erledigen.

### 1.2.2. Herausforderungen

Betrachtet man den aktuellen Stand der Technik, auf den in den einzelnen Kapiteln noch genauer eingegangen wird, lassen sich einige Punkte benennen, die die größten Herausforderungen bei der Entwicklung eines optischen Manipulators für biologische Objekte darstellen.

- Die Anforderung an das System, eine *hohe optische Auflösung* für die Abbildung von Objektdetails zu bieten, steht in Konkurrenz zu einem *großen Sichtfeld* und zu einem möglichst *großen Aktionsradius* der optischen Fallen. Das ist in erster Linie durch die Tatsache bedingt, dass die Strahlengänge für Bildgebung und optische Fallen durch eine einzige Objektivlinse verlaufen und deren numerische Apertur Auflösung und Sichtfeld maßgeblich beeinflusst.
- In vielen Anwendungen werden optische Fallen ausschließlich in der Fokalebene der Objektivlinse erzeugt, da lediglich kleine Objekte unter direkter Beobachtung manipuliert werden sollen. Das Platzieren einer optischen Falle weit jenseits dieser Ebene stellt bisher insofern ein Problem dar, als optische Aberrationen die Intensitätsverteilung einer Falle so verändern, dass das Fangen eines Partikels nicht möglich ist. Sinclair et al. (2004) berichten zum Beispiel, dass holographische optische Fallen maximal in einer Entfernung von 40  $\mu\text{m}$  von der Fokalebene der Objektivlinse platziert werden können. Für die Manipulation großer Objekte ist es jedoch hilfreich und unter

## 1. Einleitung

Umständen sogar notwendig, *größere Auslenkungen* in axialer Richtung bei hinreichender Fallkraft zu ermöglichen.

- Ein beugungsbegrenzter Laserfokus hat eine annähernd ellipsoide Intensitätsverteilung, was dazu führt, dass die optischen Fangkräfte auf ein Objekt entlang der optischen Achse in aller Regel kleiner sind als senkrecht dazu. Um ein großes Objekt entlang der optischen Achse zu versetzen oder es senkrecht zur Beobachtungsebene zu rotieren, muss daher sicher gestellt werden, dass diese Kraftkomponente ausreichend groß ist.
- Auch wenn das Sortieren von einzelnen Suspensionszellen und das Rotieren großer biologischer Objekte weitestgehend mit den gleichen optischen Komponenten bewältigt werden kann, gibt es dennoch unterschiedliche Anforderungen an Beleuchtung, Kamera und Probenhalterung. Das System muss so konzipiert sein, dass *verschiedene Konfigurationen* möglich sind und ohne aufwändige Umbauten oder gar erneute Justage auskommen.
- Von ihren optischen Eigenschaften her betrachtet sind Zellen sehr unregelmäßige Objekte. Die Kräfte, die eine optische Falle auf eine Zelle ausübt, können daher selbst in der unmittelbaren Umgebung sehr unterschiedlich sein. In Abhängigkeit der zu erledigenden Aufgabe ist die Bestimmung von geeigneten *Angriffspunkten* für optische Fallen von entscheidender Bedeutung. Im Anschluss daran müssen intelligente Pfade berechnet werden, entlang derer die optischen Fallen wandern, um Objekte sicher und/oder schnell zu bewegen. Hier sind zwei Kombinationen von besonderer Bedeutung:
  - Das schnelle Finden eines Angriffspunkts für mehrere, einzelne Zellen in einem 2D-Kamerabild und die anschließende, ebenfalls schnelle Berechnung eines Pfades in der gleichen Ebene.
  - Das Finden von mehreren Angriffspunkten an einem Objekt in einem großen, dreidimensionalen Volumen und anschließend die Berechnung von Pfaden für jede Falle, so dass diese kollaborativ arbeiten und sich in ihrer Wirkung nicht behindern.

### 1.3. Ziele der Arbeit und Umsetzung

In *Kap. 2* werden zunächst die zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen theoretischen Grundlagen erläutert. Es behandelt die Fragen, warum optische

Kräfte entstehen und wie sich deren Betrag und Richtung auf biologisches Material abschätzen lassen. Danach wird kurz auf einige Grundprinzipien und Formalitäten der Fourier-Optik eingegangen und daraus die Berechnung von Hologrammen für die Erzeugung optischer Fallen abgeleitet.

*Kap. 3* erläutert Planung und Umsetzung des experimentellen Aufbaus mit Schwerpunkt auf den optischen Komponenten. Ergänzend wird auf die softwaretechnische Realisierung der Hologrammberechnung, die Steuerungssoftware, Probenkammer und Zellpräparation eingegangen.

In *Kap. 4* wird beschrieben, wie der Versuchsaufbau verwendet werden kann, um Suspensionszellen beliebiger Größe zu sortieren. Nach der Präsentation existierender, vergleichbarer Techniken wird die Planung der Mikrofluidik und die Berechnung geeigneter Fallentrajektorien erläutert. Anschließend werden die Ergebnisse der Sortierversuche von vier verschiedenen Zelltypen dargestellt und diskutiert.

*Kap. 5* befasst sich mit der Manipulation von Zellverbänden. Nach einer Charakterisierung der holographisch erzeugten optischen Fallen und der Ermittlung der Fangkräfte auf Zellen werden die Vorgehensweise und die Resultate bei der Rotation von einzelnen Zellen und größeren Zellverbänden beschrieben und diskutiert.

In *Kap. 6* wird ein neues, interferometrisches Detektionsverfahren zur 3D-Positionsbestimmung mit optischen Fallen vorgestellt, das zur Bestimmung optimaler Angriffspunkte für optische Fallen an Zellverbänden dienen soll. Die Detektionssignale, die von gefangenen Beads oder Zellen abhängen, werden rechnerisch und experimentell ermittelt. Anschließend erfolgt eine Bewertung dieser Technik, v. a. mit Blick auf die Verwendbarkeit in einem optischen Manipulator.

In *Kap. 7* werden abschließend Zusammenhänge diskutiert, die über den Rahmen der einzelnen Kapitel hinausgehen. Des Weiteren erfolgen eine Bewertung, in wie weit die oben benannten Anforderungen erfüllt werden können, und eine Aussicht auf vielversprechende mögliche Weiterentwicklungen.



## 2. Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretische Grundlagen erläutert, die in den folgenden Kapiteln verwendet werden. Es deckt Sachverhalte ab, die in zitierten Publikationen veröffentlicht wurden oder bereits Inhalt von Lehrbüchern sind. Es wird dabei durchgehend eine einheitliche Notation verwendet. Die bekannten Grundlagen werden zum Teil noch durch eigene Überlegungen ergänzt und so auf die besonderen Anforderungen in dieser Arbeit erweitert.

In Abschnitt 2.1 wird erläutert, wie und wann optische Kräfte wirken. Dabei wird in Abschnitt 2.1.1 vor allem auf den Begriff der optischen Falle eingegangen. Der theoretische Ansatz folgt in großen Teilen jenem in Rohrbach und Stelzer (2001) und Friedrich (2011). In Abschnitt 2.1.2 und 2.1.3 wird basierend darauf eine erweiterte Theorie entwickelt, wie sich die Stärke einer optischen Falle aus dem Brechungsindex eines Objekts und dieser wiederum aus der Intensitätsverteilung eines mikroskopischen Durchlichtbildes abschätzen lassen.

Im Abschnitt 2.2 werden die Grundlagen der Fourier-Optik erläutert und anschließend im Abschnitt 2.3 für den konkreten Fall der Erzeugung von optischen Fallen in 3D durch einen spatialen Lichtmodulator verwendet. Hier wird eine kleine aber signifikante eigene Verbesserung gegenüber der Referenzliteratur vorgenommen.

Die theoretischen Überlegungen zur Positionsbestimmung eines Partikels mittels des neuen Ansatz der *konjugierten Fokalebene-Interferometrie* werden gesondert in Kap. 6 entwickelt.

### 2.1. Optische Kräfte

Photonen besitzen einen Impuls und sind generell in der Lage, diesen Impuls auf andere Objekte zu übertragen. Erfährt ein Photon durch Interaktion mit einem Objekt eine Änderung seines  $k$ -Vektors  $\Delta \mathbf{k}$ , bewirkt die Impulsänderung

$$\Delta \mathbf{p} = \hbar \cdot \Delta \mathbf{k} \quad (2.1)$$

## 2. Theoretische Grundlagen

eine Strahlungskraft

$$\mathbf{F}_{\text{rad}} = \frac{\Delta \mathbf{p}}{\Delta t} \quad (2.2)$$

auf das Objekt. Hier ist  $\hbar = 1.054 \cdot 10^{-34} \text{Js}$  das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum. Eine Änderung des Impulsvektors kann sowohl bedeuten, dass ein Photonenstrom vollständig absorbiert wird, als auch, dass er ohne jede Absorption abgelenkt wird. Bei der Arbeit mit biologischem Material wird es sich in aller Regel um eine Kombination aus Impulsumlenkung und Impulsabsorption handeln.

In den 1970er Jahren begründete Arthur Ashkin ein neues Forschungsfeld. Er konnte zunächst zeigen, dass mit einem Laserstrahl optische Kräfte auf mikroskopische Partikel übertragen lassen (Ashkin, 1970). Ein entscheidender Schritt war dabei die weitestgehende Vermeidung thermisch induzierter Partikelbewegungen, indem eine Laserwellenlänge gewählt wurde, die von Wasser und Partikel kaum absorbiert wird. Zunächst konnte mit einem Laser nur die Position eines Partikels lateral zur Ausbreitungsrichtung kontrolliert werden. Durch die starke Fokussierung des Fallenlasers mittels einer Objektivlinse mit hoher numerischer Apertur von  $NA = 1.25$  konnte einige Jahre später jedoch die erste optische Gradientenfalle realisiert werden, die das stabile Fangen von Partikeln mit einem einzelnen Strahl ermöglicht (Ashkin et al., 1986).

### 2.1.1. Optische Fallen

Das Ausüben einer optischen Kraft durch Übertragung von Photonenimpulsen ist sehr anschaulich. Auf Dipolebene kann eine analoge Betrachtung hilfreich sein. Das elektromagnetische Feld eines fokussierten Laserstrahls polarisiert einen dielektrischen Streuer und erzeugt dadurch ein Dipolmoment. Dieses wechselwirkt wiederum mit dem elektromagnetischen Feld in Form von optischen Kräften.

Ist kein Partikel vorhanden, handelt es sich streng genommen einfach nur um einen Laserfokus. Um diese Arbeit lesbarer zu halten, ist im Folgenden aber auch dann von einer *optischen Falle* die Rede, wenn gerade kein Partikel gefangen ist.

**Polarisierbarkeit** Ein kleines Volumenelement  $V_s$  kann als punktförmiger Streuer dargestellt werden, dessen Polarisierbarkeit  $\alpha_s = V_s \alpha_0$  durch die *Clausius-Mosotti-Gleichung* (Rohrbach et al., 2004)

$$\alpha_0 = 3 \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \quad (2.3)$$

gegeben ist.  $m = n_s/n_m$  sei das Verhältnis der Brechungsindizes des Streuers und des Mediums. Das lokale E-Feld  $\mathbf{E} = \mathbf{E}_i + \mathbf{E}_s$ , das auf den Streuer wirkt, setzt sich aus einer Komponente für das einfallende Feld  $\mathbf{E}_i$  und für das gestreute Feld  $\mathbf{E}_s$  zusammen. Es induziert ein Dipolmoment

$$\mathbf{p} = \epsilon_0 n_m^2 \alpha_s \mathbf{E}, \quad (2.4)$$

das von der Polarisierbarkeit des Streuers abhängt und die Vakuumpermittivität  $\epsilon_0$  beinhaltet.

**Lorentzkraft** Das elektromagnetische Feld übt auf den Dipol die Lorentzkraft

$$\mathbf{F}_s = (\mathbf{p} \nabla) \mathbf{E} + \left( \frac{\partial \mathbf{p}}{\partial t} \times \mathbf{B} \right) \quad (2.5)$$

aus, die sich aus der Wirkung des E-Feldes auf den statischen Dipol und jener des Magnetfeldes auf den bewegten Dipol zusammensetzt. Nach Einsetzen von Glg. 2.4 kann die Lorentzkraft mit Hilfe der Vektor-Identität  $(\mathbf{E} \nabla) \mathbf{E} = \frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2 - \mathbf{E} \times (\nabla \times \mathbf{E})$ , dem Induktionsgesetzes (Maxwell-Faraday-Gleichung)  $\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \mathbf{B}$  und der Produktregel  $\mathbf{E} \times \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{B} + \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{E} \times \mathbf{B} = \frac{\partial}{\partial t} (\mathbf{E} \times \mathbf{B})$  in der Form

$$\mathbf{F}_s = \epsilon_0 n_m^2 \alpha_s \left( \frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2 + \frac{\partial}{\partial t} (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) \right) \quad (2.6)$$

dargestellt werden.

Bis zu diesem Punkt sind E-Feld und B-Feld zeitabhängig. Da ein Dipol den Feldern bei optischen Frequenzen selbstverständlich nicht instantan folgen kann, kann die Zeitabhängigkeit durch Mittelung über eine Periode  $T$  eliminiert werden ( $\langle \frac{\partial}{\partial t} (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) \rangle_T = 0$ ). Handelt es sich nun nicht um einen einzelnen Dipol, sondern um eine räumliche Verteilung von Dipolen im Volumen  $V_s$ , kann eine Kraftdichte  $\mathbf{f}_s = \partial \mathbf{F}_s / \partial V_s$  über für dieses Volumen angegeben werden. Mit der Vereinfachung  $\langle \frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2 \rangle_T = \frac{1}{4} \text{Re} \left\{ \nabla |\mathbf{E}|^2 \right\}$  ergibt sich eine optische Kraft

$$\mathbf{F}_{\text{opt}} = \frac{\epsilon_0 n_m^2}{4} \text{Re} \left\{ \int_{V_s} \alpha_0 \nabla |\mathbf{E}|^2 dV \right\}, \quad (2.7)$$

indem über das Volumen integriert wird.

$$\text{Mit dem Betragsquadrat } |\mathbf{E}|^2 = |\mathbf{E}_i + \mathbf{E}_s|^2 = |\mathbf{E}_i|^2 + |\mathbf{E}_s|^2 +$$

## 2. Theoretische Grundlagen

$2 |\mathbf{E}_i| |\mathbf{E}_s| \cos(\Delta\phi_{i,s})$  lässt sich die optische Kraft

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{\text{opt}} &= \frac{\epsilon_0 n_m^2}{4} \operatorname{Re} \left\{ \int_{V_s} \alpha_0 \nabla |\mathbf{E}_i|^2 dV \right\} \\ &\quad + \frac{\epsilon_0 n_m^2}{4} \operatorname{Re} \left\{ \int_{V_s} \alpha_0 \nabla \left( |\mathbf{E}_s|^2 + 2 |\mathbf{E}_i| |\mathbf{E}_s| \cos(\Delta\phi_{i,s}) \right) dV \right\} \\ &=: \mathbf{F}_{\text{grad}} + \mathbf{F}_{\text{sca}} \end{aligned} \quad (2.8)$$

in zwei Teile zerlegen. Der erste Summand, die sog. *Gradientenkraft*  $\mathbf{F}_{\text{grad}}$ , hängt ausschließlich vom einfallenden Feld  $\mathbf{E}_i$  ab. Der zweite Summand, die *Streukraft*  $\mathbf{F}_{\text{sca}}$ , beinhaltet alle Komponenten mit gestreutem Feld  $\mathbf{E}_s$ .

**Gradientenkraft** An dieser Stelle soll auf die beiden optischen Kraftkomponenten genauer eingegangen werden. In der Regel ist das komplexe E-Feld experimentell nicht direkt messbar, die Intensität<sup>1</sup> einer elektromagnetischen Welle hingegen schon. Für das einfallende Feld ist die Intensität  $I_i = \frac{1}{2} c \epsilon_0 n_m |\mathbf{E}_i|^2$  über den zeitgemittelten Poynting-Vektor mit der Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c$  gegeben. Die Gradientenkraft

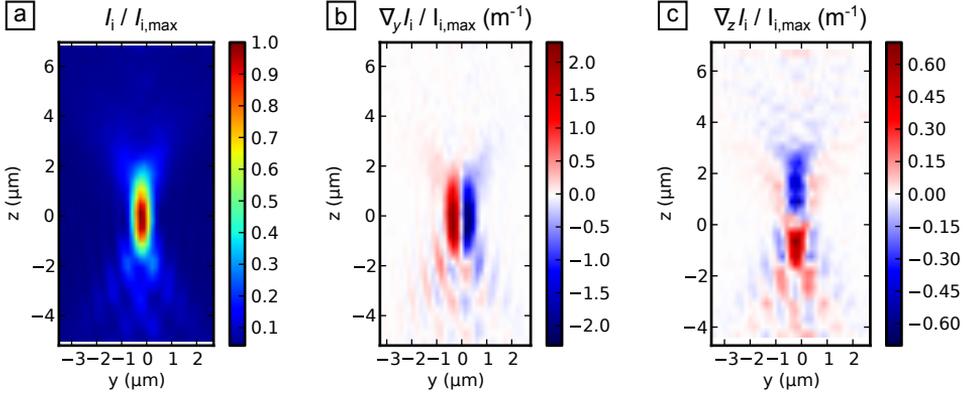
$$\mathbf{F}_{\text{grad}} = \frac{n_m}{2c} \operatorname{Re} \{ \alpha_0 \} \int_{V_s} \nabla I_i dV \quad (2.9)$$

hängt damit von der Polarisierbarkeit eines Partikels und dem *Intensitätsgradienten* eines Laserfokus ab. Für ein Partikel, das einen größeren Brechungsindex als das Medium hat ( $m > 1$ ), wirkt  $\mathbf{F}_{\text{grad}}$  immer in Richtung des Intensitätsgradienten, also in Richtung des Intensitätsmaximums. Sie ist umso größer, je stärker der Laser fokussiert ist und je größer die Gesamtintensität ist.

Eine typische Intensitätsverteilung ist in Abb. 2.1.1-a dargestellt, deren Messung in Abschnitt 5.2.1 beschrieben ist. Wie in der Mikroskopie üblich, ist der Fokus – abhängig von der numerischen Apertur der Objektivlinse – in axialer Richtung länger als in lateraler (Sheppard und Hegedus, 1988). Das wirkt sich auch auf die Intensitätsgradienten aus. In Abb. 2.1.1-b und -c sind die Gradienten in lateraler  $\nabla_y I_i(y, z)$  und in axialer Richtung  $\nabla_z I_i(y, z)$  abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass in axialer Richtung kleinere Gradienten und damit auch kleinere Kräfte vorherrschen. Die Gradientenkraft zeigt dabei für einen Punktstreuer immer zum Fallenzentrum.

Bei einer numerischen Apertur von  $\text{NA} = n_m \sin(\alpha) = 1.2$  und einer Wellenlänge von  $\lambda = 1064 \text{ nm}$  erhält man als theoretische Werte für die beugungsbegrenzte laterale bzw. axiale Fokusbreite in Wasser ( $n_m = 1.33$ )

<sup>1</sup>Für elektromagnetische Wellen ist auch die Bezeichnung Bestrahlungsstärke gebräuchlich.



**Abb. 2.1.1.:** Intensitätsverteilung (a) und Intensitätsgradienten in lateraler (b) und axialer (c) Richtung eines Laserfokus. Der Fokus ist typischerweise in axialer Richtung länger als in lateraler. Der Gradient in axialer Richtung ist kleiner und damit auch die **optische Gradientenkraft**.

$$\Delta x = \frac{1.22 \lambda}{n_m \sin(\alpha)} \approx 1.1 \mu\text{m} \text{ bzw.} \quad (2.10)$$

$$\Delta z = \frac{2 \lambda}{n_m (1 - \cos(\alpha))} \approx 2.8 \mu\text{m}.$$

**Lichtstreuung** Im Gegensatz zur Gradientenkraft hängt die Streukraft vom gestreuten Feld  $E_s$  ab (vgl. Glg. 2.8). Es ist daher notwendig, sich näher mit der kohärenten Lichtstreuung an dielektrischen Partikeln zu beschäftigen.

Wird ein Dipol von einem einfallenden Feld  $E_i$  angeregt, strahlt er eine Kugelwelle ab, dessen Feld in einem Abstand  $r$

$$\begin{pmatrix} E_{\parallel s}(\theta) \\ E_{\perp s}(\theta) \end{pmatrix} = \frac{e^{-\imath k r}}{\imath k r} \begin{pmatrix} S_2(\theta) & S_3(\theta) \\ S_4(\theta) & S_1(\theta) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_{\parallel i} \\ E_{\perp i} \end{pmatrix} \quad (2.11)$$

beträgt (Bohren und Huffman, 2004). Im Allgemeinen ist das gestreute Feld polarisationsabhängig ( $E_{\parallel}$  parallel,  $E_{\perp}$  senkrecht zur Einfallsebene) und wird durch die *Streu*funktionen  $S_j(\theta)$ ,  $j = 1..4$  bestimmt, die sich jeweils mit dem Winkel  $\theta$  ändern, der durch die Wellenvektoren  $k_i$  und  $k_s$  von einfallender und gestreuter Welle aufgespannt wird.

Die Streufunktionen  $S_j$  hängen von der Form eines Streuers, seiner Permittivität (und damit von seiner Polarisierbarkeit) und natürlich von der Wellenlänge des Lichts ab. Für sphärische Streuer, gilt  $S_3 = S_4 = 0$ , d. h. die

## 2. Theoretische Grundlagen

beiden Polarisationsrichtungen können unabhängig voneinander betrachtet werden. Mit der *Mie-Theorie* steht eine Möglichkeit zur Berechnung für  $S_1$  und  $S_2$  für die Streuung an Kugeln mit beliebigem Radius zur Verfügung.<sup>2</sup> In dieser Arbeit sollen jedoch keine exakten Felder berechnet werden. Deshalb werden Annahmen getroffen, die die Streufunktionen vereinfachen, aber das Problem dennoch ausreichend genau beschreiben.

Je kleiner ein Streuer ist, desto kleiner wird der Realteil seiner Streufunktion, und für sehr kleine *Rayleigh-Streuer* kann

$$S_1 = \frac{i k^3 \alpha_s}{4 \pi} \quad (2.12)$$

als rein imaginär betrachtet werden. Ein solcher Streuer strahlt also senkrecht polarisiertes Licht nahezu gleichmäßig in alle Raumrichtungen ab. Für parallel polarisiertes Licht bleibt hingegen mit  $S_2(\theta) = S_1 \cos(\theta)$  eine Richtungsabhängigkeit erhalten.

**Streukraft** Die Streukraft

$$\mathbf{F}_{\text{sca}} = \frac{\epsilon_0 n_m^2}{4} \operatorname{Re} \left\{ \int_{V_s} \alpha_0 \nabla \left( |\mathbf{E}_s|^2 + 2 |\mathbf{E}_i| |\mathbf{E}_s| \cos(\Delta\phi_{is}) \right) dV \right\} \quad (2.13)$$

hängt offensichtlich vom gestreuten Feld  $E_s$  ab (vgl. Glg. 2.8). Zunächst einmal kann angenommen werden, dass das gestreute Feld eines Rayleigh-Streuers relativ isotrop ist und damit  $\int_{V_s} \nabla |\mathbf{E}_s|^2 dV \approx 0$ . Der verbleibende,  $E_s$  enthaltende Term, beinhaltet ebenfalls den Faktor  $\cos(\Delta\phi_{is})$ . Er wird maximal, wenn ein Streuer die Phase des einfallenden Feldes um  $\pi$  verzögert.

Für eine anschaulichere Darstellung bedient man sich häufig des Anregungsquerschnitts  $C_{\text{ext}}$  und des Streuquerschnitts  $C_{\text{sca}}$  in Kombination mit den gemittelten Wellenvektoren des einfallenden Lichts  $\bar{\mathbf{k}}_i$  und des gestreuten Lichts  $\bar{\mathbf{k}}_s$  (Rohrbach, 2005).  $C_{\text{ext}}$  und  $C_{\text{sca}}$  hängen von der Polarisierbarkeit eines Streuers ab. Sie dienen als Maß dafür, welcher Anteil des Lichts mit dem Streuer wechselwirkt und somit zur Streukraft beiträgt. Nach dem *optischem Theorem* (Jackson, 2002) kann der Anregungsquerschnitt

$$C_{\text{ext}} = \frac{4 \pi}{k^2} \operatorname{Re} \{ S_1(\theta = 0) \} = \frac{k^4 |\alpha_s|^2}{6 \pi} \quad (2.14)$$

abgeschätzt werden, indem man nur die Streuamplitude entlang der optischen Achse berücksichtigt ( $S_2(\theta = 0) = S_1(\theta = 0)$ ). Handelt es sich zusätzlich um

<sup>2</sup>Die Streufunktionen werden mittels Taylorreihen entwickelt und durch die entsprechenden Koeffizienten definiert.

einen rein dielektrischen Streuer, wird keinerlei Strahlung absorbiert und der Anregungsquerschnitt entspricht dem Streuquerschnitt ( $C_{\text{ext}} = C_{\text{sca}}$ ).

$\overline{\mathbf{k}}_i$  und  $\overline{\mathbf{k}}_s$  ändern sich mit Form und Position eines Streuers. Ihre z-Komponenten werden für einen Streuer, dessen Brechungsindex größer als der des Mediums ist ( $m > 1$ ), aber immer positiv sein. Die Streukraft

$$\mathbf{F}_{\text{sca}} = \frac{n_m}{ck} I_i \left( C_{\text{ext}} \overline{\mathbf{k}}_i - C_{\text{sca}} \overline{\mathbf{k}}_s \right) \quad (2.15)$$

wirkt deshalb immer in Ausbreitungsrichtung des Fallenlichts und steigt mit der Intensität des Fallenlichts  $I_i$  an.

Um ein Partikel stabil fangen zu können, muss die Gradientenkraft größer als die Streukraft sein. Dies kann vor allem durch eine starke Fokussierung des Lasers erreicht werden, wodurch  $\nabla I_i$  groß im Vergleich zu  $I_i$  und damit das Verhältnis  $\mathbf{F}_{\text{grad}}/\mathbf{F}_{\text{sca}}$  ebenfalls groß wird. Deshalb ist es in der Regel sinnvoll, durch technische Maßnahmen, die Gradientenkraft zu maximieren und die Streukraft zu minimieren. Hier ist an erster Stelle die Verwendung einer Objektivlinse mit hoher numerischer Apertur für die Fokussierung des Fallenlichts zu nennen. Allerdings kann die Streukraft in manchen Fällen auch dienlich sein, z. B. um große Objekte in Richtung des Fallenlichts (und entgegen der Schwerkraft) anzuheben oder zu rotieren (vgl. Kap. 5).

### 2.1.2. Optische Kräfte auf biologisches Material

Während sich die optische Kraft auf sphärische Partikel (kleiner als die Wellenlänge) durch einige Näherungen analytisch berechnen lassen (Rohrbach und Stelzer, 2001), ist die Situation für unregelmäßiges, biologisches Material sehr viel komplexer. Man hat es in der Regel weder mit einem symmetrischen Streuvolumen  $V_s$  zu tun, noch ist der Brechungsindex  $n_s$  gleichmäßig verteilt.

Für quantitative Aussagen über optische Kräfte in solchen Situationen sind numerische Verfahren notwendig. Hier bieten sich vor allem die *diskrete Dipolapproximation* (*discrete dipole approximation, DDA*) (Draine und Flatau, 1994) und die *gekoppelte Multipol-Methode* (*coupled-multipole method, CMM*) (Lemaire, 1997) an. Diese Methoden setzen allerdings voraus, dass die Verteilung des Brechungsindex bekannt ist.

Allerdings lässt sich mit einigen Näherungen eine *qualitative* Aussage über die optischen Kräfte auf biologische Objekte machen. Hier ist vor allem die Vorhersage von Bedeutung, an welchen Koordinaten eines Objekts sich maximale Gradientenkräfte erzielen lassen, um dieses Objekt möglichst effizient bewegen zu können (Landenberger et al., 2012).

## 2. Theoretische Grundlagen

Zu diesem Zweck wird die Clausius-Mosotti-Glg. 2.3 erneut verwendet, um die Polarisation

$$\alpha_0 = 3 \frac{n^2 - (n + \Delta n)^2}{n^2 + 2(n + \Delta n)^2} \quad (2.16)$$

eines Volumens  $V_s$  zu beschreiben, dessen lokaler Brechungsindex  $n$  an der Position  $\mathbf{b}$  sich um den Betrag  $\Delta n$  von einem benachbarten Volumen unterscheidet. An dieser Stelle werden bewusst nicht die Bezeichnungen  $n_m$  und  $n_s$  verwendet, da es sich nicht zwingend um Medium und Streuer handeln muss, sondern die Polarisierbarkeit  $\alpha_0$  allgemein für eine Änderung des Brechungsindex gilt. Durch eine Taylor-Approximation erster Ordnung um das Zentrum  $\Delta n = 0$  erhält man  $\alpha_0 = 2 \Delta n / (3n)$ . Als Näherung für die ortsabhängige Gradientenkraft aus Glg. 2.9 erhält man

$$F_{\text{grad}}(\mathbf{b}) \approx \frac{\Delta n(\mathbf{b})}{c} \int_{V_s} \nabla I_i(\mathbf{b}) dV. \quad (2.17)$$

Beschränkt man sich bei der Auflösung von  $F_{\text{grad}}$  auf die Ausdehnung eines Laserfokus, also auf ca.  $1 \mu\text{m}$  in lateraler und  $2 \mu\text{m}$  in axialer Richtung (vgl. Abb. 2.1.1), so hat das Integral  $\int_{V_s} \nabla I_i(\mathbf{b}) dV$  eher die Bedeutung einer Fallunterscheidung: In der unmittelbaren Nähe des Fokus kann eine Gradientenkraft wirken, sonst nicht. In ebendieser Nähe gilt dann aber die Proportionalität

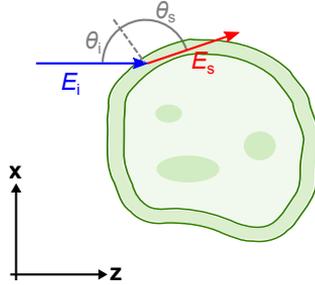
$$F_{\text{grad}}(\mathbf{b}) \propto \Delta n(\mathbf{b}), \quad (2.18)$$

also dass die Gradientenkraft umso größer ist, je größer die Änderung des Brechungsindex an einer Position ausfällt.

### 2.1.3. Abschätzung der optischen Gradientenkraft anhand eines Durchlichtbildes

Es stellt sich nun die Frage, wie Positionen mit einer starken Änderung des Brechungsindex gefunden werden können, um dort optische Gradientenkräfte auszuüben. Beschränkt man sich dabei auf eine Ebene senkrecht zur optischen Achse, die mit Hilfe eines Mikroskops auf eine Kamera abgebildet wird (vgl. Kap. 3.2.3), bietet sich die Möglichkeit, einen optimalen Angriffspunkt für das Ausüben von Kräften in eine bestimmte Richtung in sehr kurzer Zeit zu ermitteln.

Im Folgenden wird ein Ansatz beschrieben, der davon ausgeht, dass das kohärente Licht der Durchlichtbeleuchtung eines Mikroskops in Abhängigkeit des lokalen Brechungsindex eines Objekts gestreut wird. Das gestreute Licht interferiert mit dem ungestreuten Durchlicht und die daraus



**Abb. 2.1.2.: Streuung der Durchlichtbeleuchtung an einer Zelle.** Das unter einem Winkel  $\theta_i$  einfallende E-Feld  $E_i$  wird gestreut ( $E_s$ ) und in einem Winkel  $\theta_s$  abgelenkt.

resultierende Intensitätsverteilung liefert Informationen über die Verteilung des Brechungsindex.

In der Regel ist der Brechungsindex eines Materials abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts. Für eine qualitative Abschätzung kann bei den verwendeten Wellenlängen jedoch davon ausgegangen werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen infrarotem Fallenlicht und sichtbarem Beleuchtungslicht in Bezug auf den Brechungsindex gibt.

Die Intensitätsverteilung der Durchlichtbeleuchtung

$$\mathfrak{S}(\mathbf{b}) = \mathfrak{S}_i(\mathbf{b}) + \mathfrak{S}_s(\mathbf{b}) + 2\sqrt{\mathfrak{S}_i(\mathbf{b}) \mathfrak{S}_s(\mathbf{b})} \cos(\Delta\phi(\mathbf{b}, \theta_i)) \quad (2.19)$$

direkt hinter dem Volumenelement  $V_s$  eines streuenden Objekts ergibt sich aus der Interferenz des einfallenden Lichts mit Intensität  $\mathfrak{S}_i$  und des gestreuten Lichts mit Intensität  $\mathfrak{S}_s$  (Hecht, 2005b). Dabei ist  $\Delta\phi$  der Phasenunterschied zwischen einfallendem und gestreutem Licht.

Es ist eine komplexe Aufgabe, die Intensitätsverteilung in einem dicken, streuenden Objekt zu bestimmen. Aber an den Rändern des Objekts, z. B. an der Membran einer Zelle, kann von einer abrupten und starken Änderung des Brechungsindex ausgegangen werden. Dort betragen Ein- und Ausfallwinkel einer reflektierten ebenen Welle ungefähr  $\theta_i = \theta_r = 90^\circ$ , wodurch ein typischer Phasenschub  $\Delta\phi \approx \pi$  hervorgerufen wird (vgl. Abb. 2.1.2). Damit kann  $\cos(\Delta\phi) \approx -1$  genähert werden und man kann allgemein mit destruktiver Interferenz und damit mit einem Intensitätsminimum rechnen.

Die Amplitude von  $\mathfrak{S}(\mathbf{b})$  liefert zusätzliche Informationen, da sie vom lokalen Brechungsindex abhängt. Über den Reflexionskoeffizienten  $r_A$  wird die gestreute Intensität durch  $\mathfrak{S}_s = \mathfrak{S}_i r_A^2$  ausgedrückt und die Gesamtintensität demnach durch

$$\mathfrak{S}(\mathbf{b}) = \mathfrak{S}_i(\mathbf{b}) - r_A^2 \mathfrak{S}_i(\mathbf{b}). \quad (2.20)$$

## 2. Theoretische Grundlagen

Erneut lässt sich ein anschaulicher Zusammenhang zum Brechungsindex herstellen. Der Reflexionskoeffizient beträgt für große Einfallswinkel  $\theta_i$  an den Objekträndern  $r_A \approx \Delta n / (\Delta n + 2n)$  (Hecht, 2005a). Wird nun  $r_A^2$  in erster Ordnung um  $\Delta n = 0$  Taylor-entwickelt, erhält man  $r_A^2 \approx \Delta n / n$  und für die relative Änderung der Gesamtintensität

$$\Delta \mathfrak{S}(\mathbf{b}) = \frac{\mathfrak{S}_i(\mathbf{b}) - \mathfrak{S}(\mathbf{b})}{\mathfrak{S}_i(\mathbf{b})} = r_A^2 \approx \frac{\Delta n(\mathbf{b})}{n(\mathbf{b})}. \quad (2.21)$$

Das bedeutet also, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Änderung der Intensität des Durchlichtbildes eines Objekts, der Änderung seines Brechungsindex und damit auch der optischen Gradientenkraft besteht, die an einem bestimmten Ort ausgeübt werden kann. Dieser Zusammenhang

$$\Delta \mathfrak{S}(\mathbf{b}) \propto \Delta n(\mathbf{b}) \propto F_{\text{grad}}(\mathbf{b}) \quad (2.22)$$

ist in erster Näherung linear.

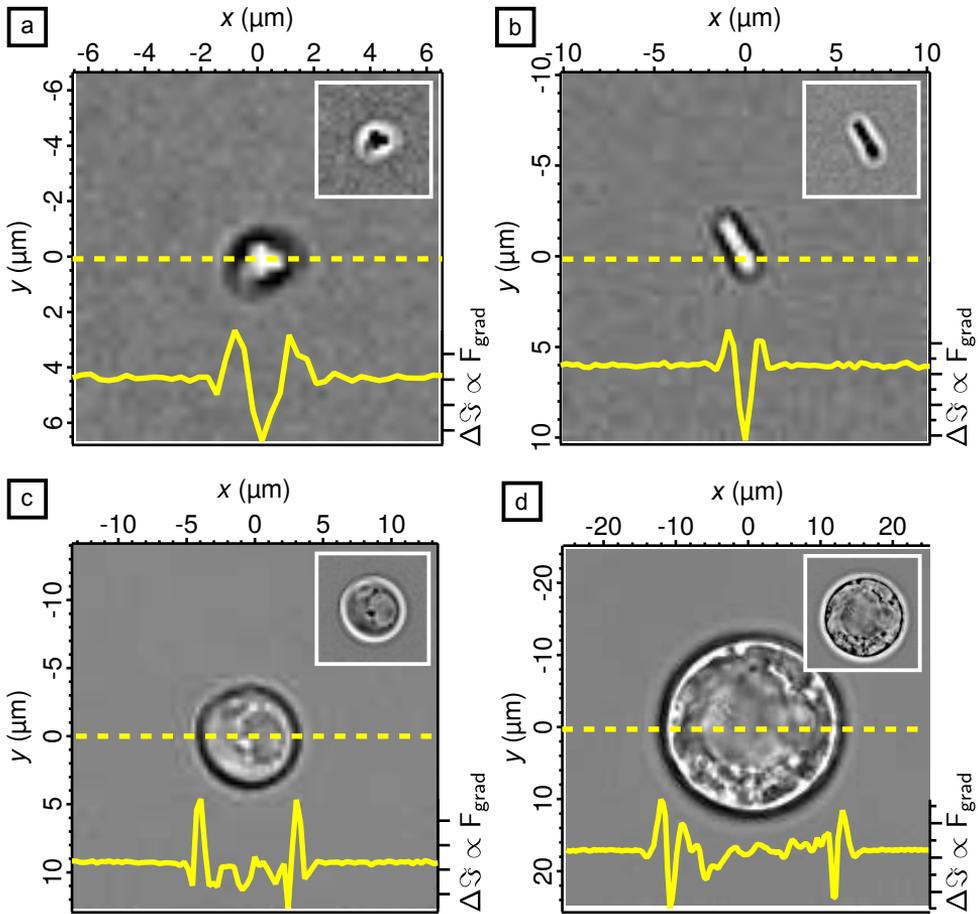
Die Veranschaulichung der Abschätzung in Glg. 2.22 ist in Abb. 2.1.3 dargestellt. Hier sind zunächst Durchlichtaufnahmen  $\mathfrak{S}(x, y)$  eines Mitochondriums (a), eines Bacillus (b), einer Hefezelle (c) und eines Protoplasten (d) abgebildet. Die Bildeinsätze zeigen die zweidimensionale Verteilung von  $\Delta \mathfrak{S}(x, y)$  und damit eine Abschätzung des Betrags der optischen Gradientenkraft.

Für ein mögliches Szenario, in dem eines der abgebildeten Objekte entlang der gestrichelten, gelben Linie bewegt werden soll, ist das entsprechende Linienprofil  $\Delta \mathfrak{S}(x, 0)$  als durchgezogene Linie aufgetragen. Man kann davon ausgehen, dass an jenen Stellen, an denen ein Maximum vorliegt, die größten Gradientenkräfte erreicht werden.

## 2.2. Fourier-optische Grundlagen zur Hologrammberechnung

In verschiedenen Abschnitten dieser Arbeit spielen Fourier-optische Betrachtungen eine entscheidende Rolle. Hier soll auf einige Grundlagen eingegangen werden, die zum Verständnis notwendig sind. Zur Vertiefung sei auf das Standardwerk von Goodman verwiesen (Goodman, 2005a). Die folgenden Gleichungen werden vor allem auch zur Berechnung von Hologrammen in Abschnitt 2.3 herangezogen.

Die Verteilung eines E-Feldes kann durch Fourier-Analyse in einzelne Komponenten, in sog. *ebene Wellen*, zerlegt werden. Die zweidimensionale Fourier-Transformation  $\mathcal{F}$ , wie sie in (Goodman, 2005b) definiert ist, stellt



**Abb. 2.1.3.: Abschätzung der Gradientenkraft anhand eines Durchlichtbildes.** Für ein Mitochondrium (a), ein Bacillus (b), eine Hefezelle (c) und einen Pflanzenprotoplasten (d) sind jeweils die Intensitätsverteilung  $\mathfrak{S}(x, y)$  im Durchlicht, die Verteilung von  $\Delta\mathfrak{S}(x, y)$  (als Bildeinsätze rechts oben) und ein Linienprofil  $\Delta\mathfrak{S}(x, 0)$  (in gelb) dargestellt. An jenen Positionen, an denen  $\Delta\mathfrak{S}$  maximal ist, können die größten Gradientenkräfte  $F_{\text{grad}}$  erzeugt werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

damit einen Zusammenhang zwischen Orts- und Richtungsinformation einer ebenen Welle her

$$\tilde{E}(k_x, k_y) = \mathcal{F}\{E(x, y)\} = \iint E(x, y) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy. \quad (2.23)$$

Dabei stehen  $x$  und  $y$  für Koordinaten des E-Feldes  $E$  im Ortsraum und  $k_x$  und  $k_y$  für die entsprechenden Wellenzahlen im reziproken Ortsraum (oder  $k$ -Raum). Je nach Art eines Problems ist die ein oder andere Darstellung zur Erklärung oder zu seiner Lösung hilfreich. In Fällen, in denen das E-Feld radial symmetrisch um die optische Achse verteilt ist, wird für eine kompaktere Darstellung häufig eine radiale Koordinate  $x_\perp = \sqrt{x^2 + y^2}$  verwendet. Eine vollständige Koordinate im Ortsraum ist im folgenden

$$\mathbf{r} = (x, y, z) = (x_\perp, z). \quad (2.24)$$

Ist das E-Feld an einem Ort  $\mathbf{r}_1$  bekannt, kann das entsprechende Feld

$$E(\mathbf{r}_2) = E(\mathbf{r}_1) * h(\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1) \quad (2.25)$$

an einem anderen Ort  $\mathbf{r}_2$  berechnet werden, indem es mit der Antwortfunktion bzw. Greenscher Funktion

$$h(\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1) = \frac{e^{-i k |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|}}{i k |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|} \quad (2.26)$$

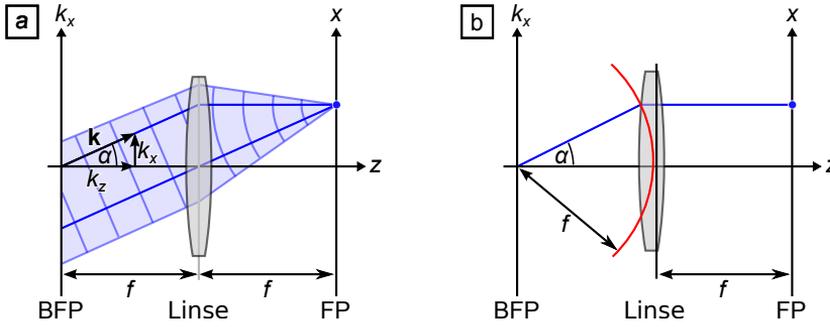
gefaltet wird. In der Regel ist es deutlich einfacher, diese Berechnung im  $k$ -Raum durchzuführen, wo die Faltungs-Operation zu einer Multiplikation wird. Das E-Feld am Ort  $\mathbf{r}_2$  kann durch

$$\tilde{E}(k_x, k_y, z_2) = \tilde{E}(k_x, k_y, z_1) \cdot H(k_x, k_y, \Delta z) \quad (2.27)$$

berechnet werden, wobei  $k_x$  und  $k_y$  die lateralen Wellenzahlen in  $x$ - und  $y$ -Richtung sind und  $H(k_x, k_y, \Delta z) = \mathcal{F}\{h(x, y, \Delta z)\}$  die Fourier-Transformierte der Greenschen Funktion. Auch hier lässt sich wieder eine radiale Wellenzahl  $k_\perp = \sqrt{k_x^2 + k_y^2}$  definieren.

$$H(k_x, k_y, \Delta z) = e^{-i \Delta z \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}} \quad (2.28)$$

wird auch der *Propagator* des freien Raumes genannt.  $k = |\mathbf{k}| = n_m \cdot k_0 = n_m \cdot 2\pi/\lambda_0$  ist dabei der Betrag des Wellenvektors  $\mathbf{k}$  in einem Medium mit Brechungsindex  $n_m$  und einer Vakuumwellenlänge  $\lambda_0$ .



**Abb. 2.2.1.:** (a) **Fourier-optische Darstellung einer ebenen Welle.** Der Winkel des  $k$ -Vektors zur optischen Achse  $\alpha$  bestimmt die Position des Mittelpunkts der entsprechenden Kugelwelle in der anderen Brennebene. (b) Vereinfachte Darstellung einer **Objektivlinse**, die die **Sinusbedingung** erfüllt. Die Entfernung zur Hauptebene (rot) ist für alle Winkel  $\alpha$  gleich  $f$ .

Interessanterweise wird eine E-Feld-Verteilung durch Ausbreitung im Raum in großer Entfernung in ihr Spektrum zerlegt. Durch Verwendung einer Linse mit Brennweite  $f$  kann das Spektrum wohldefiniert in die Brennebene der Linse abgebildet werden. Eine Linse führt also eine Fourier-Transformation zwischen den E-Feld-Verteilungen ihrer beiden Brennebenen durch.

Dieser Sachverhalt ist für das Beispiel einer einzelnen ebenen Welle in Abb. 2.2.1-a dargestellt. Eine ebene Welle in einer Brennebene entspricht einer Kugelwelle in der anderen. Der Ort des Kugelwellenzentrums  $x$  steht in festem Zusammenhang zur Ausbreitungsrichtung der ebenen Welle, die durch den Winkel mit der optischen Achse  $\alpha$  oder die laterale Komponente des  $k$ -Vektors  $k_x$  definiert ist.

Oft ist es notwendig, die örtliche E-Feld-Verteilung in der BFP einer Linse mit Brennweite  $f$  zu kennen. Zur besseren Unterscheidung werden dafür die zweidimensionalen Ortskoordinaten  $\rho = (u, v)$  verwendet. Die Skalierung erfolgt laut (Goodman, 2005c) über den Faktor  $\beta_f = k_0/f$  mit

$$E(u, v) = \frac{1}{i \lambda_0 f} \tilde{E}(k_x, k_y) \Big|_{k_x = \beta_f u, k_y = \beta_f v} \quad (2.29)$$

Der lineare Zusammenhang über  $\beta_f$  gilt sowohl in Fällen, in denen die *paraxiale Näherung* gültig ist, als auch für Linsen, die die *Sinusbedingung* erfüllen, was für Objektivlinsen in der Mikroskopie in aller Regel der Fall ist (Singer et al., 2005b). Zur Verdeutlichung ist in Abb. 2.2.1-b die vereinfachte Darstellung einer Objektivlinse mit einer sphärischen Hauptebene (rot) zu

## 2. Theoretische Grundlagen

sehen, die dafür sorgt, dass für alle Einfallswinkel  $\alpha$  die Auslenkung in der FP  $x = f n_m \sin(\alpha)$  beträgt.

### 2.3. Erzeugung von optischen Fallen durch ein diffraktives optisches Element

Soll eine einzelne Falle in der Brennebene (FP) einer Linse erzeugt werden, genügt es, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, in der reziproken Brennebene (BFP) eine ebene Welle mit dem entsprechenden k-Vektor zu erzeugen. Das ist technisch beispielsweise durch das Verkippen eines Spiegels leicht zu realisieren. Soll jedoch eine Falle jenseits der Brennebene ( $z \neq 0$ ) oder sollen gar mehrere Fallen gleichzeitig erzeugt werden, sind komplexere E-Feld-Verteilungen in der BFP notwendig.

Dafür eignen sich sog. *diffraktive optische Elemente* (DOE), die die Phase eines Lichtstrahls lokal verändern können. Das entstehende Interferenzmuster lässt sich so weitgehend steuern. Für das Positionieren von optischen Fallen in drei Dimensionen kann mit einem *spatialen Lichtmodulator* (SLM, vgl. Abschnitt 3.2.2) ein veränderliches DOE verwendet werden. Die Phase eines Lichtstrahls lässt sich hier durch eine zweidimensionale Matrix aus Flüssigkristallen verändern.

Im Folgenden soll hergeleitet werden, wie die Phasenverzögerung in der BFP einer Linse verteilt sein muss, um  $j$  optische Fallen an den Koordinaten  $\mathbf{r}_j = (x_j, y_j, z_j)$  in der FP zu erzeugen ( $j = 0 \dots N - 1$ ,  $N$  sei die Anzahl der Fallen). Die Situation für eine Falle ist in Abb. 2.3.1 dargestellt. Man erkennt, dass durch die Auslenkung der Falle vom Brennpunkt der Strahl in der BFP zum einen divergiert, zum anderen die Phasenfront zur optischen Achse verkippt ist und eine zusätzliche Krümmung aufweist.

Das komplexe E-Feld einer optische Falle mit Index  $j$  an der Position  $\mathbf{r}_j$  kann in der Ebene bei  $z = z_j$  idealisiert durch

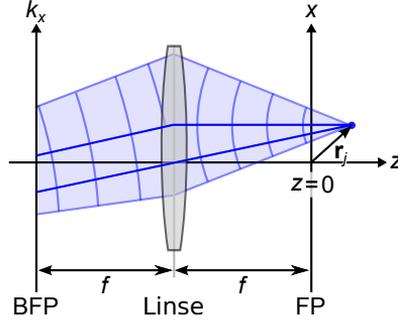
$$E(x, y, z_{\text{FP}} - z_j) = E_{0j} \delta(x - x_j, y - y_j) \quad (2.30)$$

als ein Dirac-Impuls ( $\delta(x - x_0) = \{1 \text{ falls } x = x_0, 0 \text{ sonst}\}$ ) mit Intensität  $I_{0j} = E_{0j}^2$  dargestellt werden. Um nun die Fourier-transformierenden Eigenschaften der Linse ausnutzen zu können, wird das E-Feld in die Brennebene FP der Linse propagiert. Diese Operation wird mittels Glg. 2.27 im k-Raum durchgeführt. Man erhält dann

$$\tilde{E}_j(k_x, k_y, z_{\text{FP}}) = \tilde{E}_j(k_x, k_y, z_{\text{FP}} - z_j) \cdot H(k_x, k_y, z_j) \quad (2.31)$$

$$= E_{0j} e^{i(k_x x_j + k_y y_j)} \cdot e^{i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z_j}. \quad (2.32)$$

### 2.3. Erzeugung von optischen Fallen durch ein diffraktives optisches Element



**Abb. 2.3.1.:** Erzeugung einer optischen Falle, die um  $\mathbf{r}_j$  vom Brennpunkt einer Linse ausgelenkt ist. Die Phasenfront in der BFP kann einer Welle von einem diffraktiven optischen Element eingepreßt werden. Die Linse sorgt mit einer Fourier-Transformation des E-Feldes für eine Fokussierung des Lichts in  $\mathbf{r}_j$ .

Um ein diffraktives optisches Element in der hinteren Brennebene einer Linse entwerfen zu können, muss das E-Feld in der BFP der Linse mit Brennweite  $f$  mit Hilfe von Glg. 2.29 in den Ortsraum transformiert werden.

$$E_j(u, v, z_{\text{BFP}}) = \frac{E_{0j}}{i \lambda_0 f} e^{i\left(\frac{k_0 u}{f} x_j + \frac{k_0 v}{f} y_j\right)} e^{i\sqrt{k^2 - \frac{u^2 + v^2}{f^2}}} \quad (2.33)$$

$$= \frac{E_{0j}}{i \lambda_0 f} e^{i\left(\frac{k_0}{f}(u x_j + v y_j) + k_0 n_m \sqrt{1 - \frac{u^2 + v^2}{f^2}}\right)} \quad (2.34)$$

liefert nun das E-Feld in Abhängigkeit der Fallenposition und der Koordinaten in der BFP  $u$  und  $v$ . Die Phasenverteilung bzw. das *Phasenhologramm*

$$\phi_j(u, v) = \underbrace{\frac{k_0}{f}(u x_j + v y_j)}_{\phi_j^{\text{lat}}} + \underbrace{k_0 n_m \sqrt{1 - \frac{u^2 + v^2}{f^2}}}_{\phi_j^{\text{ax}}} \quad (2.35)$$

kann in einen Summanden für die lateralen ( $\phi_j^{\text{lat}}$ ) und den axialen ( $\phi_j^{\text{ax}}$ ) Versatz einer Falle aufgeteilt werden.

Diese Aufteilung orientiert sich an der verbreiteten Methode der *Prismen und Linsen (prism and lenses)* (Liesener et al., 2000), bei der ganz anschaulich die Phasenverteilungen eines Prismas und einer Linse kombiniert werden. Diese Methode wird in den meisten Publikationen, in denen ein direktes Rechenverfahren angewandt wird, verwendet. Sie nutzt für den

## 2. Theoretische Grundlagen

axialen Versatz jedoch die Fresnel-Näherung  $\phi_j^{\text{ax}} \approx k_0 n_m \left( \frac{u^2 + v^2}{2f^2} \right)$ , die für große Auslenkungen in  $z$ -Richtung zu starken sphärischen Aberrationen und damit zu einer Reduzierung der Gradientenkraft führt (vgl. Abschnitt 5.2.1). Der Grund für die Verwendung der Fresnel-Näherung liegt wohl in dem erhöhten Rechenaufwand, den die Ausführung der Wurzelfunktion erfordert. Dennoch werden in aktuellen Veröffentlichungen, die von großen Fallenauslenkungen in  $z$ -Richtung berichten, entweder zusätzliche, aufwändige Optimierungsverfahren (Leach et al., 2006; Polin et al., 2005) verwendet, oder die Fallen werden durch gegenläufige Strahlen erzeugt (Pitzek et al., 2009; Bowman et al., 2011a; Zwick et al., 2010). Bei modernen Prozessoren stellt die Wurzelfunktion aber kein merkliches Problem mehr dar. In dieser Arbeit kann durch die Implementierung eines sehr effizienten Rechenverfahrens (vgl. Kap. 3.3) der Ausdruck in Glg. 2.35 verwendet und damit eine deutlich bessere Fallenqualität erreicht werden.

Im Gegensatz zur  $\phi_j^{\text{lat}}$  ist  $\phi_j^{\text{ax}}$  radial symmetrisch. Als Alternative zu Ortskoordinaten  $(u, v)$  oder Koordinaten im  $k$ -Raum kann zur Beschreibung von  $\phi_j^{\text{ax}}$  auch mit Pupillenkoordinaten (Singer et al., 2005a) gearbeitet werden, wie sie beispielsweise in (Botcherby et al., 2007) die Kompensation von Aberrationen in der konfokalen Mikroskopie beschreiben. Mit dem normierten Pupillendurchmesser

$$\rho' = \frac{\rho}{f} = \frac{k_{\perp}}{k_0 \text{NA}} \quad (2.36)$$

lässt sich axiale Phasenkomponente

$$\phi_j^{\text{ax}} = k_0 n_m \sqrt{1 - \rho'^2} \quad (2.37)$$

für Objektivlinsen, die die Sinusbedingung erfüllen, in einer kompakten Art darstellen. Sie wird in dieser Form auch in Abschnitt 3.3 verwendet.

Aus Glg. 2.34 ist ersichtlich, dass für die Erzeugung einer Falle lediglich die Phase des E-Feldes in der BFP eingestellt werden muss, die Amplitude ist über die gesamte Ebene gleich. Sollen jedoch mehrere Fallen (oder sogar noch komplexere Intensitätsverteilungen) erzeugt werden, muss auch die Amplitude  $E_{0j}(u, v)$  des E-Feldes in der BFP in Abhängigkeit der Koordinaten in der Pupillenebene gesetzt werden (Dufresne et al., 2001).

Diffraktive optische Elemente, die für die Erzeugung von veränderlichen optischen Fallen in Frage kommen, können – je nach Bauart – ausschließlich Phase oder Amplitude eines E-Feldes verändern.<sup>3</sup> In der Regel entscheidet

---

<sup>3</sup>Es besteht durchaus auch die Möglichkeit, Amplitude und Phase zu modulieren, indem man zwei SLM verwendet oder denselben SLM in zwei Bereiche teilt und nacheinander verwendet (Jesacher et al., 2008).

### 2.3. Erzeugung von optischen Fallen durch ein diffraktives optisches Element

man sich für die *Phasenmodulation*, um einen möglichst großen Anteil der Laserintensität zur Generierung von optischen Fallen verwenden zu können. Da  $E_{0j}$  aber unveränderlich ist, weicht die Intensitätsverteilung in der FP von der gewünschten, idealen Verteilung ab. Zur Ermittlung eines geeigneten reinen Phasen-Hologramms können entweder iterative Verfahren oder eines von mehreren direkten Berechnungsverfahren verwendet werden, die alle eine Näherung für eine optimale Phasenverteilung liefern. Die gängigsten Vertreter werden in (Di Leonardo et al., 2007) beschrieben und quantitativ verglichen. Dabei sind die entscheidenden Kriterien (i) die *Berechnungsdauer* eines Hologramms, (ii) die *Beugungseffizienz* und (iii) die *Uniformität* der generierten Fallen.

Das Verfahren, das eine gute Beugungseffizienz, bei ausreichender Fallenuniformität liefert und in sich hinreichend schnell berechnen lässt, nennt sich *randomisierte Superposition von Prismen und Linsen* (*random superposition of prism and lenses*) (Lesem et al., 1969). Das komplexe E-Feld

$$E(u, v, z_{\text{BFP}}) = \sum_{j=0}^{N-1} E_j(u, v, z_{\text{BFP}}) e^{i\phi_j^{\text{rand}}} \quad (2.38)$$

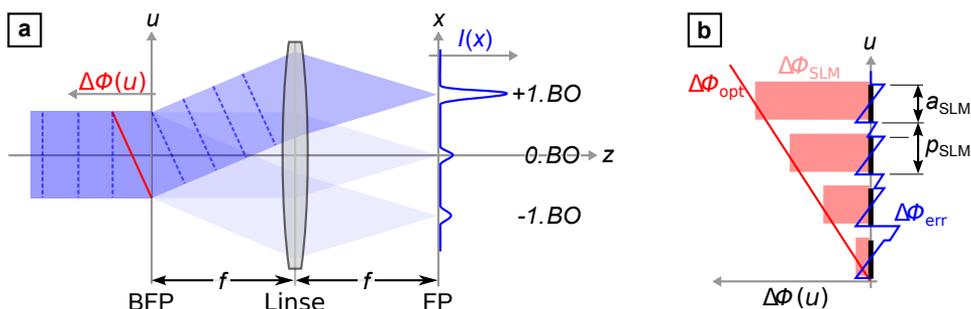
wird ermittelt, indem die Felder für jede einzelne Falle mit einem zufälligen Wert  $\phi_j^{\text{rand}}$  phasenverschoben und anschließend summiert werden. Dieser zusätzliche zufällige Phasenoffset ist für die starke Verbesserung der Beugungseffizienz verantwortlich. Für das reine Phasen-Hologramm muss dann das Argument des E-Feldes

$$\phi(u, v) = \arg \{E(u, v, z_{\text{BFP}})\} \quad (2.39)$$

am DOE eingestellt werden.

Die Beugungseffizienz eines Hologramms hängt nicht nur vom verwendeten Berechnungsverfahren ab. Wird ein spatialer Lichtmodulator als DOE verwendet, kann die Phase nur in diskreten Schritten verzögert werden, so wie es in Abb. 2.3.2 dargestellt ist. In diesem einfachen Beispiel wird eine Falle durch einen Phasenkeil  $\Delta\phi(u, v)$  lateral in der FP ausgelenkt. Der SLM besteht aus einer Matrix von quadratischen Flüssigkristallen, die eine Kantenlänge von  $a_{\text{SLM}}$  haben und auf einem Raster mit Gitterabstand  $p_{\text{SLM}}$  liegen. Die Phasenverzögerung, die tatsächlich auf die einfallende ebene Welle übertragen wird, ist in Abb. 2.3.2-b als  $\Delta\phi_{\text{SLM}}$  aufgetragen. Es entsteht also immer ein Phasenfehler  $\Delta\phi_{\text{err}}$ , der ganz offensichtlich von der Steigung von  $\Delta\phi(u, v)$  abhängt. Mathematisch betrachtet wird die Phasenfunktion in der BFP mit einer Rechteckfunktion und einem Impulskamm multipliziert. Das

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.3.2.: Phasendiskretisierung aufgrund der Pixelierung eines SLM.** (a) Für die Erzeugung einer einzelnen optischen Falle in der Fokalebene wird eine ebene Welle durch ein keilförmiges Phasenprofil  $\Delta\phi(u, v)$  verzögert. Der Großteil der Intensität wird in die 1. Beugungsordnung gelenkt und in der FP fokussiert. Durch die Diskretisierung des SLM wird aber auch ein gewisser Anteil gar nicht oder in höhere Ordnungen gebeugt. (b) Die Ursache für die Beugungseffizienz  $< 1$  liegt in der Abweichung  $\Delta\phi_{\text{err}}$  des technisch möglichen Phasenprofils  $\Delta\phi_{\text{SLM}}$  von  $\Delta\phi$ . Dieses wird umso größer, je steiler  $\Delta\phi$  verläuft.

führt zu einer Umverteilung der Intensität  $I(x, y)$  von der 1. in die 0., -1. und höhere Beugungsordnungen in der FP, wie es auch von einem optischen Gitter bekannt ist und in Abb. 2.3.2-a verdeutlicht wird.

## 3. Versuchsaufbau und Methoden

In diesem Kapitel soll der eigens entwickelte Versuchsaufbau, auf dem sämtliche Versuche durchgeführt wurden, und die wichtigsten Methoden, die zur Versuchsdurchführung notwendig sind, im Detail beschrieben werden. Zunächst werden die Kernanforderungen explizit aufgelistet. Der folgende Teil widmet sich den optischen Komponenten, gefolgt von Hologrammberechnung und Steuersoftware, die natürlich mit optischer und anderer Hardware eng verzahnt sind. Abschließend wird auf die mikrofluidische Probenhandhabung und die Vorbereitung der biologischen Proben eingegangen.

### 3.1. Grundlegende Überlegungen

Um den Herausforderungen wie in Abschnitt 1.2 beschrieben begegnen zu können, müssen folgende Anforderungen an den Versuchsaufbau erfüllt werden:

- Es soll *hochauflösende Mikroskopie* möglich sein.
- Viele optische Fallen sollen in *drei Dimensionen* positionierbar sein.
- Die Fallen sollen in einem möglichst *großen Aktionsbereich* platziert werden können.
- Die Fallen brauchen einen möglichst *große Fangkraft*, vor allem auch in axialer Richtung.
- Zum Sortieren sollen *schnelle, kontinuierliche Fallenbewegungen* möglich sein.
- Mit Blick auf Handhabung und Sterilität soll das System für biologische Anwendungen prinzipiell nutzbar sein.

Deshalb soll dem Versuchsaufbau ein kommerziell erhältliches invertiertes Mikroskop als Basis dienen. Darüber hinaus soll die Bedienung so weit wie möglich nur über Software erfolgen.

## 3.2. Optische Komponenten

Im Folgenden soll zunächst der komplette Strahlengang des Aufbaus vorgestellt werden. Es gilt zu beachten, dass auf demselben Aufbau noch zwei weitere Experimente durchgeführt wurden, weshalb das Arrangement der optischen Komponenten an einigen Stellen etwas komplizierter ausgefallen ist, als es auf den ersten Blick als notwendig erscheinen mag.

Abb. 3.2.1 zeigt eine schematische Darstellung des kompletten optischen Strahlengangs. Die optischen Komponenten werden der besseren Übersichtlichkeit zuliebe gegliedert und in den Funktionseinheiten *Lasereinheit*, *Strahlformung*, *Mikroskop* und *Detektionseinheit* beschrieben.

Wenn möglich wurden die Komponenten auf einem Schienensystem positioniert um ihre Positionierung zu vereinfachen. Eine ausführliche Liste der einzelnen Komponenten mit den entsprechenden Abkürzungen, der Angabe der Hersteller und der genauen Produktbezeichnungen findet sich in Anhang A.3. Die Justage des Systems erfordert etwas Erfahrung. Eine empfohlene Vorgehensweise ist deshalb ebenfalls detailliert in Anhang A.4 erläutert.

Auch in diesem Kapitel stehen  $x$ ,  $y$ ,  $z$  wieder für räumliche Koordinaten.  $x_{\perp} = \sqrt{x^2 + y^2}$  ist der Abstand von der optischen Achse. An manchen Stellen wird mit einem Index die Position entlang der optischen Achse verdeutlicht, so steht z. B.  $x_{P1}$  für eine laterale Koordinate in der Ebene P1.

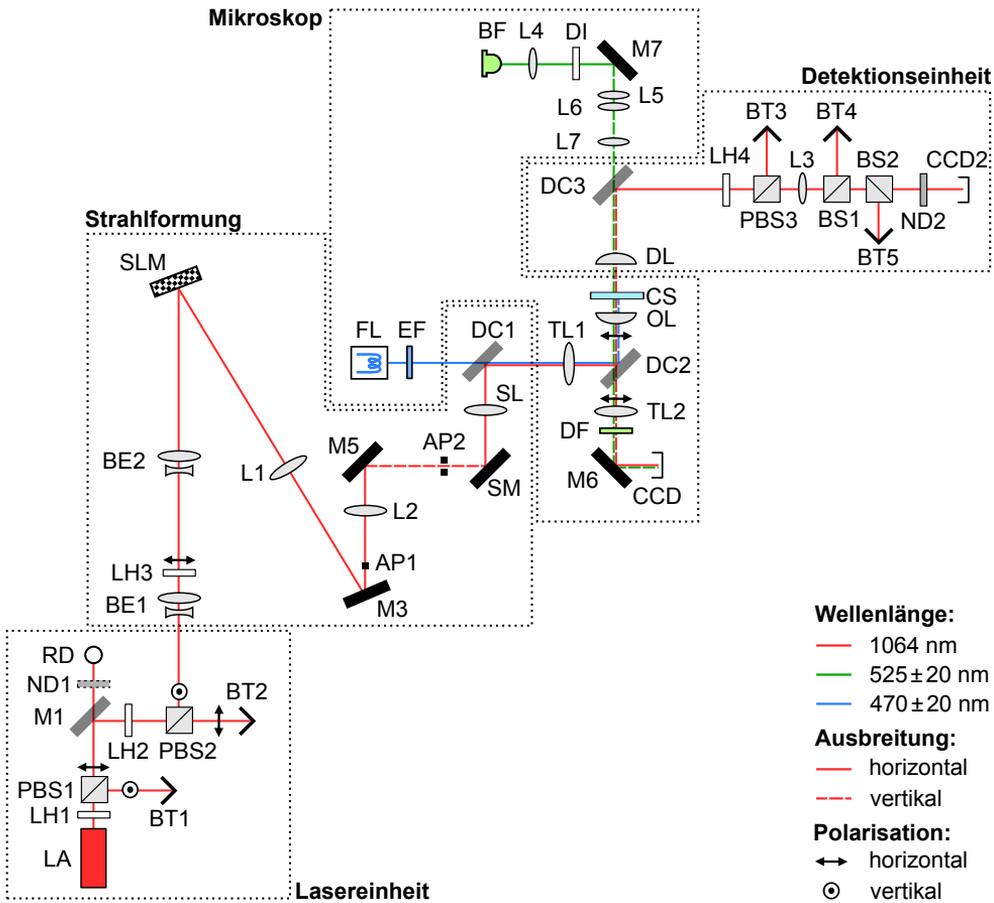
### 3.2.1. Lasereinheit

Die optischen Fallen werden von einem Infrarotlaser (LA) mit einer Wellenlänge von 1064 nm erzeugt. Sein Strahl ist in Abb. 3.2.1 wie auch im Rest dieser Arbeit in rot dargestellt. Der Absorptionsindex<sup>1</sup> beträgt bei dieser Wellenlänge  $\alpha' = 0.143 \text{ cm}^{-1}$  (Kou et al., 1993). Das entspricht ca. 1.42 % Intensitätsverlust über eine Strecke von 1 mm.

Der Laser erzeugt und verstärkt die Strahlung in zwei Stufen. Die erste Stufe besteht aus einem diodengepumpten Festkörperlaser (DPSS-Laser), der eine fest eingestellte optische Ausgangsleistung erzeugt. Die zweite Stufe verstärkt den Strahl nochmals um einen Faktor, der über ein Spannungssignal  $U_{LA}$  geregelt werden kann. Über eine polarisationserhaltende, einmodige optische Faser wird die Strahlung auf einen gedämpften optischen Tisch geleitet. Da die

---

<sup>1</sup>Bei einem komplexen Brechungsindex  $\hat{n} = n - i\alpha$  beschreibt der Imaginärteil  $\alpha$  die Absorption eines Materials. Der Absorptionskoeffizient nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann mittels  $\alpha' = 2k_0\alpha$  berechnet werden.



LA	Laser	LH	$\lambda/2$ -Platte	PBS	Polarisationsstrahlteiler
M	Spiegel	ND	Graufilter	RD	Referenzdiode
BT	Strahlfalle	BE	Strahlaufweiter	SLM	Spatialer Lichtmodulator
AP	Blende	SM	Scanspiegel	SL	Scanlinse
DC	Farbteiler	TL	Tube linse	OL	Objektivlinse
DL	Detektionslinse	CCD	CCD-Kamera	FL	Fluoreszenzlichtquelle
EF	Anregungsfilter	DF	Detektionsfilter		
BF	Durchlichtquelle	DI	Diffusor		

**Abb. 3.2.1.:** Schematische Darstellung des **kompletten Strahlengangs** unterteilt in vier Funktionseinheiten. Neben den einzelnen Komponenten, sind Wellenlänge, Ausbreitungsrichtung und Polarisation der Teilstrahlen angegeben. Hersteller und genaue Produktbezeichnungen sind in Anhang A.3 angegeben.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden

Länge dieser Faser begrenzt ist, sind der Platzierung des Laserkopfes Grenzen gesetzt.

Die  $\lambda/2$ -Platte LH1 und der polarisierende Strahlteilerwürfel PBS1 sorgen dafür, dass nur horizontal polarisiertes Licht im weiteren Strahlengang zur Verfügung steht. Die Anteile höherer Lasermoden werden in die Strahlfalle BT1 geleitet.<sup>2</sup> Der kleine Anteil der Laserleistung  $P_{LA}$  von 0.2%, der durch den dielektrischen Spiegel M1 transmittiert, wird von einem Neutraldichtefilter ND1 nochmals um den Faktor  $10^{-3}$  abgeschwächt und von der Referenzdiode (RD) und einer Eingangsverstärkerschaltung in eine Referenzspannung  $U_{RD}$  umgesetzt. Diese Referenzspannung wird verwendet, um über einen PID-Regler (PID) und einen Ausgangsverstärker ein Spannungssignal zu erzeugen, sodass die Laser-Verstärkereinheit auf eine konstante Ausgangsleistung geregelt wird. Dem PID-Regler kann über eine digitale Wandlerkarte (DIO1) ein Sollwert für  $P_{LA}$  in Form einer Spannung  $U_{LA}$  vorgegeben werden. Die Regelung der Leistung führt auch zu einer Stabilisierung der Temperatur des Verstärkerkristalls und damit zu einer Stabilisierung des Abstrahlwinkels.

Der Großteil der Laserleistung wird am Spiegel M1 reflektiert und kann durch Einstellung des Winkels  $\phi_{LH2}$  der  $\lambda/2$ -Platte LH2 in Zusammenspiel mit dem Polarisationsstrahlteilerwürfel PBS2 nochmals manuell abgeschwächt werden. Vertikal polarisiertes Licht wird reflektiert, horizontal polarisiertes Licht landet in Strahlfalle BT2. Diese Option ist vor allem für die Justage des Systems notwendig, aber auch für Tests, bei denen Objekte nur schwach oder gar nicht gefangen werden sollen. Im normalen Betrieb ermöglicht die Einstellung von  $\phi_{LH2} = 45^\circ$  eine maximale Laserleistung, wobei die schnelle Achse der Verzögerungsplatte bei  $0^\circ$  senkrecht steht.

Da durch die Zwei-Stufen-Verstärkung des Lasers dieser ausschließlich in einem Bereich  $P_{LA} = 450 \text{ mW} \dots 7.3 \text{ W}$  stabil arbeitet und dies mit einer Spannung  $U_{LA} = 0 \text{ V} \dots -5 \text{ V}$  erreicht wird, ergibt sich die optische Laserleistung hinter PBS2 aus

$$P_{\text{PBS2}} = \left( \frac{7.3 \text{ W} - 450 \text{ mW}}{-5 \text{ V}} U_{\text{LA}} + 450 \text{ mW} \right) \cos(2(\phi_{\text{LH2}} - 45^\circ)). \quad (3.1)$$

#### 3.2.2. Abbildung des SLM in die Fokusebene

Hinter PBS2 steht nun ein regelbarer, leistungs- und richtungsstabilisierter Strahl zur Verfügung, der im folgenden Abschnitt „geformt“ wird, um in der

---

<sup>2</sup>LH1 und PBS1 haben sich als notwendig erwiesen, da die sich herausgestellt hat, dass höhere Lasermoden zu einer signifikanten Schwankung der optischen Ausgangsleistung beigetragen haben.

Probenebene fallen mit den richtigen Eigenschaften zu erzeugen. Geformt bedeutet konkret, dass der Strahl sowohl aufgeweitet, ausgelenkt und teilweise ausgelöscht, als auch die Strahldivergenz geändert wird. Die beteiligten optischen Elemente sind in Abb. 3.2.1 mit *Strahlformung* gekennzeichnet.

Das entscheidende Element hierfür ist ein spatialer Lichtmodulator (SLM), also eine Matrix aus Flüssigkristallen, die abhängig von ihrer Ausrichtung die Wellenfront des Laserstrahls verzögern können. Der in dieser Arbeit verwendete SLM hat eine verspiegelte Rückseite, d.h. der Phasenschub entsteht durch die zweimalige Durchquerung der Flüssigkristalle. Die Polarisation des Lichts wird erhalten, die Phasenverzögerung wirkt sich aber nur auf jenen Anteil aus, der senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist. Deshalb wird der Strahl vor dem Auftreffen auf den SLM mit Hilfe der  $\lambda/2$ -Platte LH3 horizontal polarisiert. Licht mit einer Wellenlänge von 1064 nm kann in 256 Stufen (8 bit) um maximal eine Periode phasenverschoben werden. Die Ansteuerung der  $1920 \times 1080$  Pixel erfolgt, indem der SLM als Computermonitor betrieben wird und ein entsprechendes Graustufenbild angezeigt wird. Die gewünschte Intensitätsverteilung im Fernfeld ergibt sich durch die Interferenz der Kugelwellen, die von jedem Pixel ausgehen.

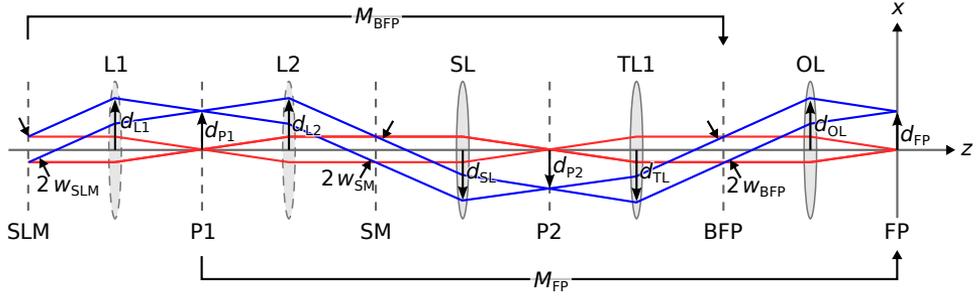
Der Strahl wird hinter PBS2 von den beiden variablen Strahlaufweitern BE1 und BE2 kollimiert und auf etwa 9 mm aufgeweitet<sup>3</sup>. Damit ist eine quadratische aktive Fläche mit einer Kantenlänge von 1080 px im Zentrum des SLM ausgeleuchtet.

Die folgenden achromatischen Linsendoubletten L1 und L2, sowie die Scanlinse (SL) und die Tubuslinse (TL1) bilden ein telezentrisches System, das die E-Feld-Verteilung kurz hinter dem SLM in die hintere Brennebene (BFP) der Objektivlinse (OL) abbildet. Diese Abbildung ist schematisch in Abb. 3.2.2 dargestellt, wobei dort der Übersichtlichkeit halber alle Linsen im gleichen Abstand gezeichnet sind und Spiegel und Filter dazwischen fehlen. Das E-Feld jeder Zwischenebene wird von der folgenden Linse in die nächste Zwischenebene Fourier-transformiert (vgl. Abschnitt 2.3). Eine punktförmige Falle in der Probenebene (FP) resultiert also aus einem kollimierten Strahl in den Ebenen SLM, SM und BFP; ein Versatz  $r$  in der FP wiederum entspricht einer Winkeländerung in den entsprechenden Fourier-Ebenen. Zur Dimensionierung der optischen Elemente können der Strahlradius  $w$  (*beam waist*), der durch den Intensitätsabfall auf  $1/e^2$  definiert sei, und die maximale laterale Auslenkung  $d$  herangezogen werden, die die Strahlbreite

---

<sup>3</sup>Die zweistufige Aufweitung des Strahls ist nur wegen anderer Versuche auf demselben Aufbau notwendig. Die Justage des Systems kann durch Verwendung nur eines Strahlaufweiters stark vereinfacht werden.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden



**Abb. 3.2.2.: Abbildung des SLM in die Probenebene (FP).** Sämtliche Linsen stehen im Abstand ihrer Brennweiten, sodass jede Linse das E-Feld in die nächste Zwischenebene Fourier-transformiert.

mit einschließt.

Das telezentrische System besteht aus den achromatischen Linsendoubletten L1 und L2, sowie aus der Scanlinse SL und der Tubuslinse TL1 (effektive Brennweiten:  $f_{L1} = 400$  mm,  $f_{L2} = 200$  mm,  $f_{SL} = 51.5$  mm,  $f_{TL1} = 138.4$  mm). Seine Vergrößerung beträgt

$$M_{\text{BFP}} = \frac{f_{L2}}{f_{L1}} \cdot \frac{f_{\text{TL1}}}{f_{\text{SL}}} = 1.32. \quad (3.2)$$

Da der Durchmesser der BFP  $2w_{\text{BFP}} = 9.9$  mm beträgt, wird nur ein kreisförmiger Ausschnitt des SLM mit Durchmesser  $2w_{\text{SLM}} = 2w_{\text{BFP}}/M_{\text{BFP}} = 7.5$  mm abgebildet. Die BFP der Objektivlinse wird also leicht überstrahlt.

Um die Rückseite der Objektivlinse zu schützen, wird in einer zur BFP konjugierten Ebene, kurz vor den Scanspiegeln (SM), eine kreisförmige Blende (AP2) mit einem Durchmesser von  $2w_{\text{SM}} = 2w_{\text{BFP}} \cdot \frac{f_{\text{SL}}}{f_{\text{TL1}}} = 3.75$  mm eingeführt.

In diesem Arrangement von Linsen spielt L1 eine einschränkende Rolle. Wie in Abb. 3.2.3-a dargestellt, führen sowohl laterale ( $x_{P1}$ ) als auch axiale ( $z_{P1}$ ) Auslenkungen eines Fokus vom Brennpunkt der Linse L1 zu einer Aufweitung des Strahls. Das ist natürlich auch bei den anderen Linsen in Abb. 3.2.2 der Fall, aber durch die lange Brennweite von  $f_{L1} = 400$  mm, tritt eine Beschneidung des Strahl zuerst an der Apertur von L1 auf. Die maximale laterale Auslenkung eines Strahls (einschließlich seiner  $1/e^2$ -Breite wird beschrieben durch

$$d_{L1} = w_{\text{SLM}} + x_{P1} + \frac{w_{\text{SLM}}}{f_{L1}} \cdot z_{P1}, \quad (3.3)$$

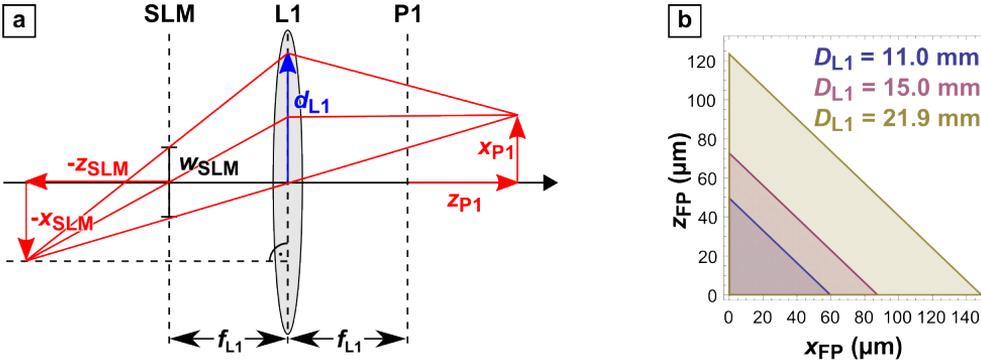


Abb. 3.2.3.: (a) Strahlengeometrische Betrachtung der **Auslenkung an Linse L1**. Laterale und axiale Auslenkung einer optischen Falle ( $x_{P1}$ ,  $z_{P1}$ ) führen zu einer Verbreiterung des Laserstrahls an Linse L1 ( $d_{L1}$ ). (b) Darstellung jener Bereiche, in denen eine Falle platziert werden kann, ohne dass ihre Symmetrieeigenschaften verschlechtert werden. Dieser Bereich ist für verschiedene Linsenaperturradien  $D_{L1}$  dargestellt.

wobei mittels  $x_{P1} = x_{FP}/M_{FP}$  und  $z_{P1} = z_{FP}/M_{FP}^2$  die Fallenposition aus der Probenebene in die Ebene P1 übertragen werden kann. Hierbei gilt für das telezentrische System aus Linse L2, Scanlinse, Tubuslinse TL1 und Objektivlinse ( $f_{OL} = 4.11 \text{ mm}$ )

$$M_{FP} = \frac{f_{SL}}{f_{L2}} \cdot \frac{f_{OL}}{f_{TL1}} = 7.6 \cdot 10^{-3}. \quad (3.4)$$

Aus Glg. 3.3 ist ersichtlich, dass lateraler und axialer Versatz einer Falle in der Probenebene ( $x_{FP}$ ,  $z_{FP}$ ) zu einer Auslenkung an L1 führen. Es ergibt sich damit ein doppelkegelförmiges Volumen um den Brennpunkt der Objektivlinse, in dem eine Falle platziert werden kann, ohne dass der Strahl an L1 abgeschnitten wird und damit eine symmetrische Intensitätsverteilung im Fokus erwartet werden kann. Dieser Bereich ist graphisch in Abb. 3.2.3-b dargestellt, jeweils für verschiedene Aperturradien der Linse  $D_{L1}$ . Für die in dieser Arbeit gezeigten Versuche wurde eine Linse mit  $D_{L1} = 15 \text{ mm}$  verwendet<sup>4</sup>. Es ist prinzipiell leicht möglich, den uneingeschränkten Fallenbereich weiter deutlich auszuweiten, z.B. mit einer kommerziell erhältlichen Linse mit einem Aperturradius von  $D_{L1} = 21.9 \text{ mm}$ . Darauf

<sup>4</sup> $D_{L1} = 11 \text{ mm}$  wurde lediglich in Abschnitt 5.2.2 verwendet.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden

wurde verzichtet, weil L1 dann nicht mehr auf einer Schiene gehalten werden kann.

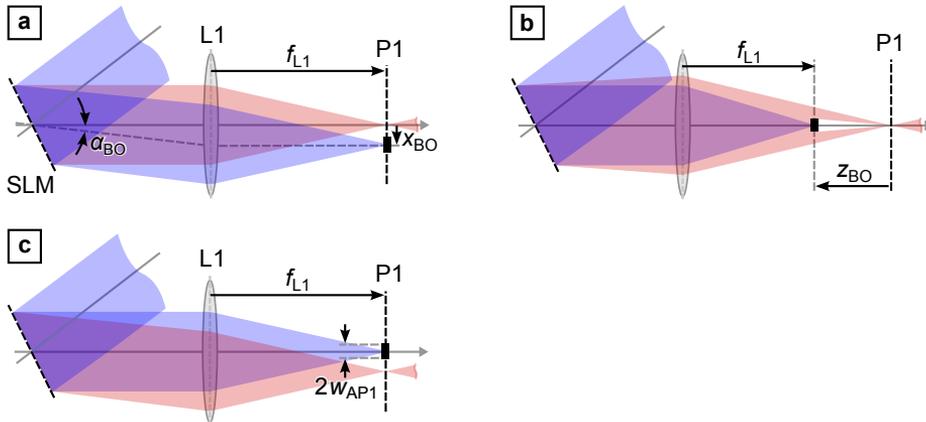
Die Auswirkungen der Fallenposition auf die Symmetrie und damit auf die Qualität der optischen Fallen werden in den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.2 deutlich.

Eine weitere Einschränkung des Fallenbereichs resultiert aus der Absorption des Fallenlasers durch die Blende AP1 (siehe Abb. 3.2.1), die in der Ebene P1 platziert ist und dazu dient, die 0. Beugungsordnung (BO) des SLM zu blockieren.

Wie bereits in Abschnitt 2.3 erläutert, erzeugt der SLM keine kontinuierliche, sondern eine diskretisierte Phasenfront. Außerdem füllt die Aktivmatrix nicht die gesamte Fläche des SLM aus. Dieser Füllfaktor  $< 1$  und die Phasendiskretisierung (vgl. Abb. 2.3.2) führen dazu, dass – je nach Hologramm – ein gewisser Anteil der Intensität in andere als die 1. BO gerichtet wird. Während höhere Beugungsordnungen sich mit optomechanischen Mitteln nicht ohne Einschränkung des Aktionsbereichs der Fallen unterdrücken lassen, gibt es für die Unterdrückung der 0. BO verschiedene Möglichkeiten (Zhang et al., 2009).

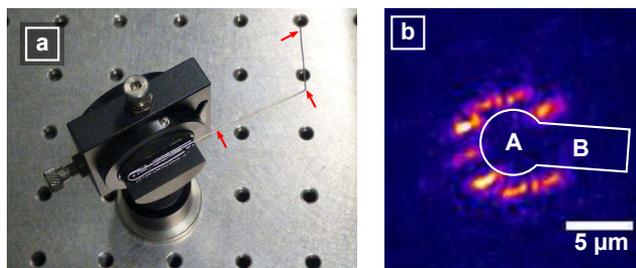
In Abb. 3.2.4 sind drei Möglichkeiten schematisch dargestellt, wobei der ungebeugte Strahl jeweils in blau gezeichnet ist. In Fall (a) ist der SLM unter einem Winkel  $\alpha_{\text{BO}}$  montiert, der den ungebeugten Strahl (z. B. in x-Richtung) von der optischen Achse abgelenkt und die 0. BO in einem Punkt jenseits der optischen Achse fokussiert, wo sie von einer Blende geblockt wird. Soll eine Falle erzeugt werden, muss einem entsprechenden Hologramm eine Phasenverteilung  $\phi_{\text{BO}}(x) = -k_x x = -k_x \alpha_{\text{BO}} f_{\text{L1}}$  in Form eines Prismas aufaddiert werden, die den Strahl (rot) wieder auf die optische Achse beugt. Auf diese Weise bleibt der zentrale Bereich um die optische Achse frei zugänglich. Soll dieser Bereich jedoch groß genug sein, um in der Probenebene große Objekte manipulieren zu können, muss  $x_{\text{BO}}$  dementsprechend groß sein, wodurch die Beugungseffizienz des SLM deutlich reduziert wird und damit auch die Intensität und optische Kraft jeder einzelnen Falle. Entscheidender noch ist die Abhängigkeit der Intensität eines Fokus von seiner lateralen Position, wodurch eine kontrollierte Kraftausübung auf ein Objekt erschwert wird.

Im Fall (b) wird die Linse L1 nicht in ihrem Brennweitenabstand  $f_{\text{L1}}$  zu P1 platziert, sondern weiter vorne im Strahlengang. Einem Hologramm, das eine Falle in der Probenebene kodiert, muss deshalb eine Phasenverteilung  $\phi_{\text{BO}}(x_{\perp}) = k_0 n_m \sqrt{1 - x_{\perp}^2 / f_{\text{L1}}^2} z_{\text{BO}}$  aufaddiert werden, die einer Linse entspricht. Auch diese Konfiguration hat den Nachteil, dass durch den



**Abb. 3.2.4.: Unterdrückung der 0. Beugungsordnung (BO).** Der un gebeugte Strahl ist in blau, die 1. BO in rot dargestellt. In (a) wird die 0. BO von der optischen Achse abgelenkt und der Fokus lateral versetzt. Im Fall (b) wird der Fokus axial versetzt. Um eine Falle in der Probenebene zu platzieren muss ein Hologramm jeweils mit einem entsprechenden Korrekturhologramm addiert werden. Im Fall (c) ist kein Korrekturhologramm notwendig, jedoch kann im Zentrum der Probenebene keine Falle platziert werden.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden



**Abb. 3.2.5.: Ausblendung der 0. Beugungsordnung durch die Apertur AP1.** (a) Technische Realisierung einer möglichst kleinen und wärmeleitfähigen Blende auf der optischen Achse. Als eigentliche Blende fungiert die Spitze des mit roten Pfeilen gekennzeichneten Drahtes. (b) Schatten von AP1 in der Probenebene. Im zentralen dunklen Bereich (weiße Linie) können Fallen nur dann platziert werden, wenn die Scanspiegel mit einem entgegengesetzten Versatz kompensieren.

erhöhten Phasengradienten die Beugungseffizienz sinkt. Je weiter ein Fokus hinter der Objektebene erzeugt wird, desto schwächer ist die Intensität in diesem Fokus.

Um ein möglichst großes Volumen mit optischen Fallen ansteuern zu können und eine möglichst isotrope Intensität im Fokus – unabhängig seiner Position – zu erhalten, wurde für die Versuche in dieser Arbeit die Anordnung gewählt, wie sie in Abb. 3.2.4-c dargestellt ist. Die 0. BO wird auf der optischen Achse in die Ebene P1 fokussiert und dort von der Blende AP1 geblockt. Damit ist keine korrigierende Phasenverteilung notwendig ( $\phi_{BO}(x_{\perp}) = 0$ ) und die Reduktion der Beugungseffizienz ist klein und punktsymmetrisch um den Brennpunkt.

Diese Lösung impliziert zwei technische Herausforderungen: (i) Die Blende muss die 0. BO zuverlässig blockieren, was auch bedeutet, einer Leistung von mehreren Watt über längere Zeit zu widerstehen, und (ii) nur einen sehr kleinen Bereich blockieren, um den Aktionsradius der generierten optischen Fallen nicht zu sehr einzuschränken. Die gewählte Lösung ist in Abb. 3.2.5-a abgebildet. Die Spitze eines Drahtes kann über eine Feinjustage exakt in den Schnittpunkt der optischen Achse mit Ebene P1 positioniert werden. Der Draht wird 2 cm entlang der optischen Achse und dann zur Seite geführt. Er ist mit einem Wärmeleitkleber an einem Aluminiumblock befestigt, wodurch ausreichend thermische Leistung abgeführt werden kann. Eine Verformung konnte über viele Wochen hin nicht festgestellt werden.

In Abb. 3.2.5-b ist eine Aufnahme der Probenebene zu sehen, die den durch AP1 abgeschatteten Bereich (A) zeigt, in dem keine Fallen platziert werden können. Er hat einen Durchmesser von ca.  $6\ \mu\text{m}$ . Im Bereich (B) kann es zu Aberrationen kommen, da der Strahl durch den Trägerdraht gestört werden kann.

Die Konfigurationen (b) und (c) könnten im Prinzip auch ohne Blende verwendet werden. Wie in Abschnitt 2.1 bereits erläutert wurde, kann eine Falle auf ein größeres Objekt nur dann stabilisierend wirken, wenn sie an polarisierbarer Materie angreifen kann. Ein nicht steuerbarer Fokus im Zentrum der Probenebene wird sich jedoch in der Regel destabilisierend auswirken.

Die Einkopplung in den Strahlengang des Mikroskops erfolgt über den Farbteiler DC1, der Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich transmittiert und das infrarote Laserlicht reflektiert. Auf die Halterung der Scanspiegel, der Scanlinse und von DC1 wird in Abschnitt 3.2.5 noch genauer eingegangen.

### 3.2.3. Mikroskop

Das zentrale Bedienelement des Aufbaus ist ein modifiziertes invertiertes Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M). Änderungen im Vergleich zum Auslieferungszustand umfassen die Position und Halterung einiger Filter und die Durchlichtbeleuchtung.

Die Einkopplung des IR-Lasers erfolgt mittels DC1 über die Rückseite (Rearport) des Mikroskopstativs, parallel zum Strahlengang der Fluoreszenzbeleuchtung. Deren Quelle, eine Quecksilberdampfampe mit steuerbarem Shutter, erzeugt ein breitbandiges Spektrum vom Ultravioletten bis in den Infrarotbereich. Die geeignete Anregungswellenlänge wird durch den Filter EF gewählt, der in einem Computer-gesteuerten Filterrad (FW) gehalten ist. Für die hier beschriebenen Versuche wurde immer eine Wellenlänge von  $470 \pm 20\ \text{nm}$  verwendet. Da dieser Filter infrarotes Licht reflektiert, wurde er von seiner normalen Position, dem Filterwürfel im Reflektorrevolver, vorverlegt.

Beim Farbteiler DC2 handelt es sich um eine Sonderanfertigung, die IR- und blaues Anregungslicht reflektiert und grünes Licht transmittiert. Der Filterwürfel wurde modifiziert, um Position und Neigung von DC2 justieren zu können. Der Emmissionsfilter (DF) ist ebenfalls nicht im Filterwürfel untergebracht, da er infrarotes Licht blockiert und damit entfernt werden kann, um den Reflex eines Fokus in der Probenebene analysieren zu können (vgl. Abschnitt 5.2.1). Auch hier sind verschiedene Filter möglich, alle Versuche wurden jedoch mit einer Bandlücke von  $525 \pm 20\ \text{nm}$  durchgeführt.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden

Im Beleuchtungsstrahlengang wurde die Halogenlampe durch eine LED (BF) ersetzt, um die Durchlichtbeleuchtung schnell an- und ausschalten zu können. Die damit einhergehende verringerte Wärmeentwicklung reduziert Temperaturgradienten in der Probenebene erheblich, wodurch die Diffusion kleiner Partikel weniger beeinflusst wird. Die Linsen L4 und L5, sowie der Diffusor (DI) und der Spiegel M7 sind fest in das Mikroskopstativ verbaut. Da wegen der Detektionseinheit weniger Platz für den Beleuchtungsstrahlengang zur Verfügung steht, verkürzt L6 gleich hinter L5 deren Brennweite. Über L7 und die Detektionsobjektivlinse (DL) wird die Probenebene gleichmäßig ausgeleuchtet.

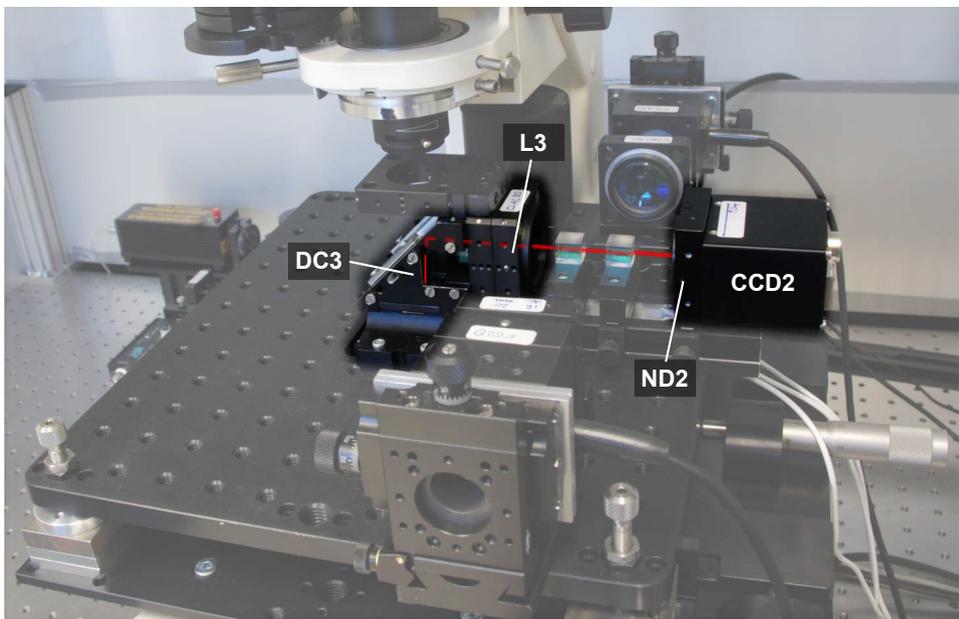
Die finale Fokussierung des IR-Lichts zur optischen Fallen erfolgt durch die Objektivlinse (OL). Zusammen mit der Tubuslinse TL2 ( $f_{TL2} = 154.5 \text{ mm}$ ) bildet sie die Probenebene in die Ebene der Kamera (CCD) mit einer Vergrößerung von  $M_{CCD} = 40$  ab. Bei der Objektivlinse handelt es sich um ein Deckglas-korrigiertes Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur  $NA_{OL} = 1.4$ . Konsequenterweise muss jede Probenkammer einen Boden aus  $140 - 180 \mu\text{m}$  dicken Glas oder aus einem Material mit dem gleichen Brechungsindex haben. Auch wenn Ölimmersionsobjektive in der Regel eine höhere NA haben, und damit auch höhere Gradientenkräfte erreicht werden können (vgl. Abschnitt. 2.1), ist eine Wasserimmersionsobjektiv bei diesem Aufbau unbedingt notwendig, damit der Fallenlaser auch weit über dem Deckglas (CS) und in unterschiedlichen Abständen von diesem Fokii ohne Aberrationen erzeugen kann. Auf die Problematik der Korrektur von Aberrationen mit Hilfe des SLM für frei in 3D platzierbare Fallen wird in Abschnitt 5.2.1 noch genauer eingegangen.

Die Probenkammer selbst ist auf einem Piezotisch (PI) mit einer Reichweite von  $300 \mu\text{m}$  in allen drei Raumrichtungen befestigt. Der Piezotisch selbst kann über Feingewindeschrauben um jeweils  $\pm 1 \text{ cm}$  manuell in x- und y-Richtung verschoben werden.

#### 3.2.4. Detektionseinheit

Die Aufgabe der Detektionseinheit besteht darin, das infrarote Fallenlicht von der Probenebene auf eine weitere Kamera (CCD2) abzubilden. Aus der Analyse der Intensitätsverteilung  $I_d(x, y)$  können Rückschlüsse auf die Position von streuenden Objekten relativ zu jeder einzelnen optischen Falle getroffen werden. Man spricht hier von einem parallelen *Tracking*-Verfahren, das im Detail in Abschnitt 6 erläutert wird.

Die Abbildung auf die CCD-Kamera erfolgt in einem 4f-System über die Detektionsobjektivlinse DL mit einer Brennweite von  $f_{DL} = 4.0 \text{ mm}$  und



**Abb. 3.2.6.:** Foto der Detektionseinheit. Die für das Detektionsprinzip maßgeblichen Einheiten sind nicht eingetrübt.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden

einer weiteren Linse L3 mit einer Brennweite von  $f_{L3} = 80.0$  mm. Die Detektionsoptik ist also ein telezentrisches System mit der Vergrößerung  $M_{\text{CCD2}} = f_{\text{DL}}/f_{L3} = 20$ . Sie ist so gewählt, dass ein möglichst großer Bereich der Probenebene auf den  $6.32 \times 4.76$  mm<sup>2</sup> ( $\frac{1}{2}$ " großen Chip abgebildet wird. Ein Pixelraster von  $p_{\text{CCD2}} = 4.65$  µm erlaubt gleichzeitig eine möglichst gute Abtastung der Intensitätsverteilung. Ein großer Dynamikbereich erleichtert die Analyse von Fallen mit unterschiedlichen z-Koordinaten. Je höher die Bildwiederholrate der Detektionskamera ist, desto genauer können Änderungen der Intensitätsverteilungen aufgelöst werden.

Bei der Detektionslinse handelt es sich um ein Wasserimmersionsobjektiv ohne Deckglaskorrektur mit einer numerischen Apertur von  $\text{NA}_{\text{DL}} = 1.0$ . Eine Probenkammer muss entweder nach oben hin offen sein oder mit einem Tropfen Wasser bedeckt werden. Hinter der Detektionslinse sorgt ein Farbteiler (DC3) für die Trennung von sichtbarem Beleuchtungslicht und infrarotem Fallenlicht.

Durch die kurzen Brennweiten der Detektionslinse und der Objektivlinse ist die exakte Positionierung der beiden zueinander von entscheidender Bedeutung für eine saubere Abbildung. Deshalb sind alle optischen Komponenten der Detektionseinheit auf einer Aluminiumplatte montiert, welche wiederum über eine kinematische Halterung auf dem Mikroskopstativ aufliegt. Über Mikrometerschrauben und Linearversteller erlaubt die Halterung eine unabhängige Einstellung aller drei translatorischen und aller drei rotatorischen Freiheitsgrade.

Das Mikroskopstativ und damit auch die Position der Objektivlinse unterliegt relativ starken thermischen Schwankungen, die in der Größenordnung von 1 µm/h liegen. Vor einer Verwendung der Detektionseinheit ist es deshalb notwendig, die axiale Position der OL und die laterale Position der DL einzustellen. Dafür werden einige Fokii bei  $z = 0$  erzeugt, deren Abbild auf der CCD-Kamera ebenfalls fokussiert sein und deren Position an den richtigen Stellen relativ zur Chipmitte liegen müssen.

Die Intensität des auf die CCD-Kamera fokussierten Lasers muss selbstverständlich noch stark abgeschwächt werden. Der Graufilter ND2 transmittiert bei einer Wellenlänge von 1064 nm einen Anteil  $T = 6.2 \cdot 10^{-4}$  der einfallenden Intensität. Die Maximalwerte hängen ebenfalls von der Anzahl der Fallen und ihrer z-Position ab, weshalb die Belichtungszeit durch die Software gesteuert werden muss, um den Dynamikbereich der Kamera voll ausnutzen zu können.

Mithilfe der  $\lambda/2$ -Platte LH4 und des polarisierenden Strahlteilerwürfels PBS3 kann der Strahl zum einen nochmals abgeschwächt werden, zum anderen kann die in der Probenebene einfallende Polarisation reduziert

werden, indem ein Anteil in die Strahlfalle BT3 gelenkt wird. Dadurch kann der Anteil des von einem Objekt gestreuten Lichts erhöht werden.

Die Strahlteilerwürfel BS1 und BS2 werden für andere Versuche benötigt und führen hier in Kombination mit den Strahlfallen BT3 und BT4 lediglich zu einer weiteren Abschwächung des Laserstrahls.

### 3.2.5. Optisches Subsystem für Zellsortierer

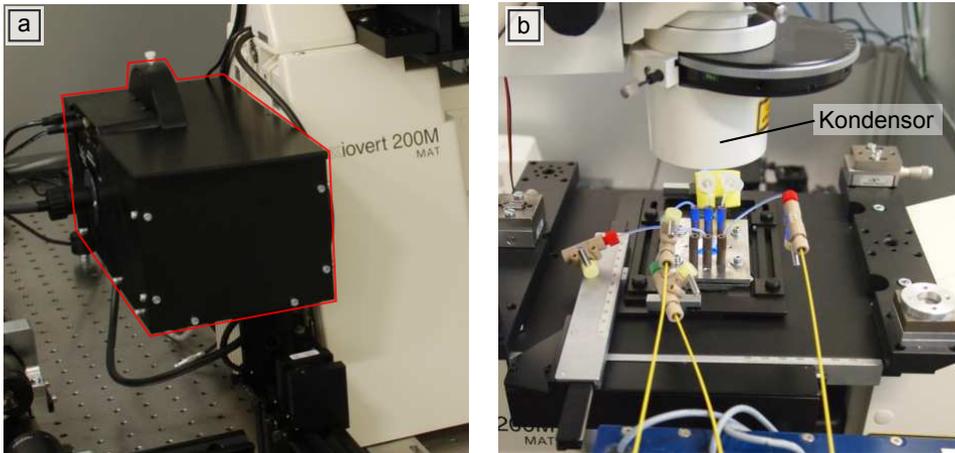
Soll der Aufbau zum Sortieren von Suspensionszellen verwendet werden, kann der Strahlengang durch eine Abkürzung im Abschnitt *Strahlformung* und durch das Entfernen der Detektionseinheit deutlich vereinfacht werden. Außerdem steht damit mehr Platz für eine größere Probenkammer zur Verfügung.

Es soll an dieser Stelle betont werden, dass das Sortieren von Suspensionszellen mit der Konfiguration, die in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben ist, ohne Probleme möglich ist. Es ist für zukünftige Forschung aber durchaus denkbar, sich ausschließlich auf das Sortieren von Zellen zu konzentrieren. Deshalb wurden im hier beschriebenen Aufbau nahezu alle notwendigen Komponenten in einer sog. *Rearportbox* zusammengefasst, die in Abb. 3.2.8-a grau hinterlegt dargestellt ist. Wie aus der Darstellung des modifizierten optischen Strahlengangs in Abb. 3.2.7 zu sehen ist, enthält die Rearportbox Scanspiegel (SM), Scanlinse (SL) und die Einkopplung der Fluoreszenzbeleuchtung.

Die Scanspiegel ermöglichen eine schnelle und kontinuierliche Winkeländerung, die von der Scanlinse in einen 2D-Fokusversatz umgewandelt wird. Die Reaktionszeit der Spiegel hängt von ihrer Masse und der zugehörigen Treiber-elektronik ab. Die beträgt bei diesem Modell, das für einen Strahldurchmesser bis 5 mm ausgelegt ist, ca. 200  $\mu\text{s}$ . Die zeitliche Auflösung beträgt 1  $\mu\text{s}$ . Bei der Scanlinse handelt es sich um eine sog. *F-Theta-Linse*. Sie ist speziell darauf optimiert, einen kollimierten Strahl über einen großen Winkelbereich in eine Ebene zu fokussieren.

Prinzipiell ließe sich der Fallenlaser direkt an der Rearportbox befestigen und somit optisch ein geschlossenes System erreichen. Um Umbauarbeiten zu vermeiden, wird die Lasereinheit aber unverändert gelassen und dafür ein Großteil des Bereichs *Strahlformung* durch das Einklappen der Klappspiegel M2 und M4 umgangen (vgl. Abb. 3.2.7). Der Strahl wird also durch BE1 aufgeweitet und durch SL und TL1 telezentrisch in die hintere Brennebene der Objektivlinse abgebildet, die die nicht ganz vollständig ausgefüllt wird, um möglichst große Gradientenkräfte zu erreichen (Mahamdeh et al., 2011). Die Blende AP2 erfüllt in dieser Konfiguration keine Aufgabe, stört aber





**Abb. 3.2.8.:** (a) Die **Rearportbox** enthält alle Komponenten (mit Ausnahme des Lasers), die für den Betrieb des Aufbaus als Zellsortierer notwendig sind. (b) Die **mikrofluidischen Komponenten** werden mit kommerziell erhältlichen Teilen gehalten (Mikroskoptisch, Halterahmen) und beleuchtet (Kondensor).

auch nicht. LH3 bleibt unverändert, um eine möglichst große Reflexion der polarisationsabhängigen Farbteiler DC1 und DC2 zu erhalten. Natürlich könnte bei einem reinen Sortier-System auch auf dieses Element verzichtet werden, wenn der Laserkopf um  $90^\circ$  gedreht wird.

In Abb.3.2.8-b ist deutlich zu sehen, dass durch Weglassen der nicht benötigten Detektionseinheit, der Verwendung einer kommerziell erhältlichen Kondensorenlinse (CL) mit  $NA = 0.3$  und eines Mikroskoptisches mit Universalhalterahmen ausreichend Platz für eine mikrofluidische Flusskammer vorhanden ist, die ausführlicher in Abschnitt 3.4 beschrieben ist. Diese Standardkomponenten vereinfachen nicht nur die Konstruktion der Flusskammer und ihren makroskopischen Anschluss durch das größere Platzangebot, sondern entsprechen auch dem üblichen Bedarf in einem Biolabor.

Als Bildsensor kann neben der bereits beschriebenen CCD-Kamera mit einer Vergrößerung von  $40\times$  auch eine Alternative verwendet werden. In Kombination mit einem zusätzlichen 4f-System (BE3), das das Bild um den Faktor 2 verkleinert, kann die CCD-Kamera der Detektionseinheit (CCD2) am Frontport des Mikroskops verwendet werden. Damit kann ein großer Bildbereich von  $320 \times 424 \mu\text{m}^2$  beobachtet werden. Bei Beschränkung auf einen

kleineren Bildbereich können hohe Bildwiederholraten erreicht werden.

## 3.3. Hologrammberechnung

### 3.3.1. Übersicht

Es wurde bereits beschrieben, dass die Positionierung der optischen Fallen in der Probenebene mit Hilfe der Scanspiegel (SM) und des spatialen Lichtmodulators (SLM) erfolgen kann. Während die Scanspiegel zum Erzeugen mehrerer Fallen schnell zwischen verschiedenen Positionen hin und her springen müssen, kann der SLM die Wellenfront des Fallenlasers so formen, dass die Fallen gleichzeitig erzeugt werden. Der entscheidende Vorteil besteht jedoch darin, Fallen auch vor oder hinter der Probenebene zu platzieren. Damit entsteht die Möglichkeit, ein Objekt orthogonal zur Beobachtungsebene zu bewegen oder zu rotieren.

Der aktive Bereich des hier verwendeten SLM umfasst eine quadratische Fläche mit  $1080 \times 1080 \text{ px}^2$ . Die Pixel liegen auf einem Raster mit Periode  $p_{\text{px}} = 8 \mu\text{m}$ , d.h. die aktive Fläche hat eine Kantenlänge von 8.64 mm. Die Berechnung eines Hologramms kann je nach Verfahren (Di Leonardo et al., 2007) sehr rechenintensiv sein. Das Verfahren, das in Abschnitt 2.3 beschrieben und für die Versuche in den folgenden Kapiteln verwendet wurde – *random superposition of prism and lenses (randomisierte Superposition von Prismen und Linsen)* – skaliert mit der Anzahl der Pixel und der Anzahl der optischen Fallen  $N$ . Die Berechnung eines Hologramms mit über einer Mio. Pixelwerten dauert auf einer modernen CPU (central processing unit) ungefähr 200 ms pro Falle. Für eine statische Anordnung von Fallen mag dies akzeptabel sein, aber für eine aktive Manipulation von biologischen Objekten muss die Berechnung der entsprechenden Hologramme deutlich schneller vonstatten gehen.

Eine elegante Lösung bietet sich in der Verwendung einer GPU (graphics processing unit) an, wie sie als Bestandteil der Grafikkarte eines Computers zu finden ist. Moderne GPUs haben viele Rechenkerne und eine lange Pipeline. Sie sind darauf optimiert, die immer gleiche Rechenvorschrift für viele verschiedene Eingangswerte immer wieder auszuführen. Sie eignen sich damit sehr gut für die massiv parallelisierbare Aufgabe der Hologrammberechnung.

Die erste Implementierung von Hologrammberechnungen auf einer GPU wurde von Masuda et al. (2006) veröffentlicht, allerdings handelt es sich hier um Hologramme, die für die Darstellungen von 3D-Displays benötigt werden. Reicherter et al. (2006) nutzten Berechnungen auf der GPU erstmals für holographische optische Fallen. Ein vergleichbarer Ansatz ist

bei Preece et al. (2009) zu finden, jedoch mit einem effizienzsteigernden Unterschied: Anstatt für jede Falle mit Index  $j$  ein Phasen-Hologramm  $\phi_j(r)$  zu berechnen und die entsprechenden Felder zu addieren, werden für jeden Pixel unabhängig die Phasenwerte der einzelnen Fallen in einen komplexen E-Feld-Wert umgerechnet und addiert. Damit müssen die großen Phasenarrays nicht zwischengespeichert werden, sondern können direkt im Bildspeicher (frame buffer) der Grafikkarte akkumuliert werden. Der rechnerische Aufwand reduziert sich dadurch erheblich.

Nach dem Vorbild von Preece et al. (2009) erfolgt die Berechnung der Hologramme über die Programmierschnittstelle *OpenGL* der GPU. Bei OpenGL handelt es sich um einen standardisierten Satz von Befehlen, mit denen alle gängigen GPUs umgehen können.<sup>5</sup> Die Programmierung der GPU erfolgt über die *OpenGL Shader Language* (GLSL), einer Programmiersprache die eng an C angelehnt ist. In dieser Arbeit wurde die Hologrammberechnung auf der GPU vollständig neu implementiert. Ein grundlegender Unterschied im Vergleich mit Preece et al. (2009) betrifft den Phasenanteil eines Hologramms, der durch einen Abstand einer Falle zur Fokalebene (FP) hinzukommt. Darauf wird später in diesem Kapitel noch genauer eingegangen.

An dieser Stelle sei noch auf die Möglichkeit der iterativen Berechnung von Hologrammen verwiesen, mit der eine höhere Beugungseffizienz und Fallenuniformität erreicht werden können (Bianchi und Di Leonardo, 2010). Mit ausreichend rechenstarken Grafikkarten kann auch der notwendige, größere Rechenaufwand in weniger als 1 ms pro Falle geleistet werden.

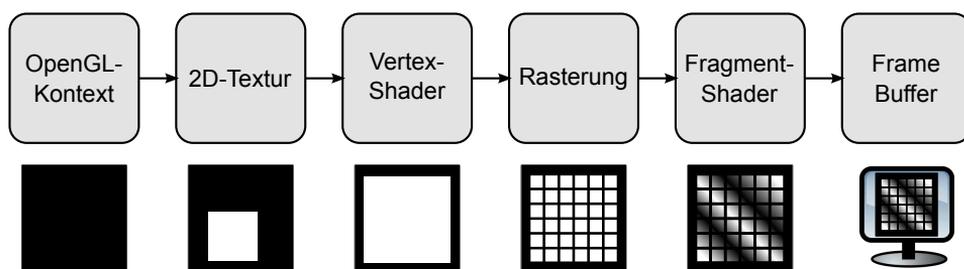
### 3.3.2. OpenGL-Pipeline

Um die Arbeitsweise der hier vorgestellten Lösung zu verstehen, ist es hilfreich, sich die Stufen der *OpenGL-Pipeline*<sup>6</sup> vor Augen zu führen, so wie sie in Abb. 3.3.1 dargestellt sind. Zunächst muss eine Anwendung einen *OpenGL-Kontext* erzeugen, hier in einem Fenster ohne Rahmen, da der SLM wie ein Bildschirm angesteuert wird und wirklich nur das Hologramm anzeigen soll. Die Anwendung erzeugt des Weiteren eine zweidimensionale *Textur* mit einem Seitenverhältnis, das auch am SLM verwendet werden soll, und in diesem Fall 1:1 ist.

<sup>5</sup>In dieser Arbeit wurde eine Kompatibilität mit OpenGL Version 2.1 sichergestellt, was eine Verwendung mit Graphikkarten ermöglichen sollte, die im Jahre 2007 und später gekauft wurden.

<sup>6</sup>Die Pipeline wird in dieser oder ähnlicher Form in allen Graphikanwendungen mit OpenGL verwendet. Die Berechnung von Hologrammen ist nur eine spezielle Anwendung.

### 3. Versuchsaufbau und Methoden

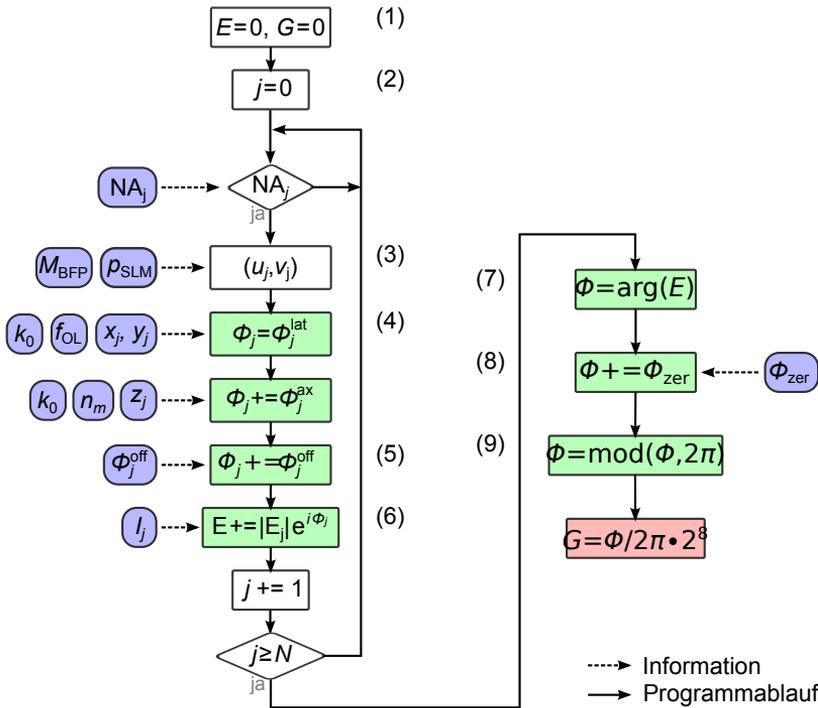


**Abb. 3.3.1.:** Schritte einer **OpenGL-Pipeline**, die notwendig sind, um ein Hologramm zu berechnen und anzuzeigen. Die Berechnung der einzelnen Phasenwerte erfolgt im Fragment-Shader.

In der nächsten Stufe wird diese Textur durch den *Vertex-Shader* geleitet. Der Vertex-Shader dient vor allem dazu, die Beobachtungsrichtung und die Vergrößerung festzulegen. Die quadratische Textur muss konsequenterweise zentral auf dem Bildschirm liegen und nicht verdreht sein. Mit der darauf folgenden und nicht zu beeinflussenden *Rasterung* steht exakt fest, welcher Teil der Textur auf welchem Bildschirmpixel ausgegeben wird. Automatisch ist bereits der dafür benötigte Speicher festgelegt.

Der entscheidende Schritt der Hologrammberechnung wird im *Fragment-Shader* durchgeführt, der allgemein der Einfärbung von Oberflächen dient und hier das Raster mit Grauwerten einfärbt, die den benötigten Phasenverzögerungen entsprechen. Ein Grauwert von  $2^8 = 255$  entspricht einer Phasenverzögerung von  $2\pi$ . Ebenso wie der Vertex-Shader kann der Fragment-Shader zur Laufzeit einer Anwendung mittels GLSL programmiert werden. GLSL ermöglicht es, die Einfärbung des Rasters in Abhängigkeit der Pixelposition und zusätzlicher Eingangsvariablen vorzunehmen, die *Uniforms* genannt werden und z. B. die Position der optischen Fallen enthalten können. Die Anwendung kann die Werte dieser Uniforms ändern, ohne dass der GLSL-Code neu in die GPU geladen werden muss. Wichtig ist, dass die Berechnungen des Fragment-Shaders direkt im *Frame Buffer* durchgeführt werden, also dem Speicher, auf den der SLM zugreift, wenn er ein neues Bild anzeigt. Die Daten müssen vor der Anzeige nicht noch ein zusätzliches Mal kopiert werden.

Der Frame Buffer ist doppelt vorhanden, d. h. während der SLM ein Hologramm noch anzeigt, kann bereits das nächste berechnet werden. Im letzten Schritt der OpenGL-Pipeline wird ein neues Hologramm angezeigt, indem die Frame Buffer getauscht werden.



**Abb. 3.3.2.: Flussdiagramm des Algorithmus im Fragment-Shader.**

Der Phasenwert  $\phi$  wird in mehreren Schritten berechnet, wobei sie von der Pixelposition  $(u, v)$  und mehreren anderen Eingangsparametern abhängt. Am Ende ergibt sich für jeden Pixel ein Grauwert  $G$ .

### 3.3.3. Berechnung der Phasenwerte im Fragment-Shader

Im Fragment-Shader wird die Berechnung der Phasenhologramme durchgeführt. Der vollständige GLSL-Code ist im Anhang A.5 zu finden. In Abb. 3.3.2 sind die wichtigsten Schritte in einem Flussdiagramm dargestellt. Die für die Berechnung notwendigen Eingangsparameter (Uniforms) sind in blau dargestellt und werden von der Anwendung aktualisiert, z. B. wenn eine neue Fallenposition angesteuert werden soll. Berechnungen, die den Wert für die Phase  $\phi$  eines Pixels betreffen, sind grün hinterlegt. Der Grauwert  $G$ , der letzten Endes auf dem „Bildschirm“ SLM dargestellt wird, ist rot hervorgehoben. Für jeden Pixel wird folgende Berechnung durchgeführt:

1. Das E-Feld  $E$  ist eine komplexe Zahl, die zu Beginn auf Null gesetzt wird. Real- und Imaginärteil werden einzeln deklariert. Der Grauwert  $G$

### 3. Versuchsaufbau und Methoden

wird standardmäßig auf Null gesetzt.

2. Für jede der  $N$  Fallen mit Index  $j = 0 \dots N - 1$  wird eine Schleife durchlaufen. Bei jedem Durchlauf wird zunächst entschieden, ob die Falle mit Index  $j$  überhaupt zum Hologramm beitragen soll. In der Regel wird die gesamte Fläche des SLM, die in die BFP abgebildet wird, zur Erzeugung der Fallen herangezogen ( $NA = 1.2$ ). Für jede Falle kann die effektive NA über den Eingangsparameter  $NA_j$  einzeln reduziert werden. Hier ist zu beachten, dass die anderen Fallen nun aus fokussiertem Licht gebildet werden, das einen höheren Anteil großer Raumwinkel enthält.
3. Bevor die Phase berechnet werden kann, muss festgestellt werden, an welcher Position der Pixel in die BFP der Objektivlinse abgebildet wird. Um die Ortskoordinaten auf dem SLM ( $u_{\text{SLM}}, v_{\text{SLM}}$ ) zu errechnen, müssen die Koordinaten der Textur, die dem Fragment-Shader bekannt sind, mit der Pixelperiode  $p_{\text{SLM}}$  multipliziert werden. Die kartesischen Koordinaten in der BFP sind dann mit Hilfe der Vergrößerung in die BFP  $M_{\text{BFP}}$  zu ermitteln (vgl. Glg. 3.2)

$$u_{\text{BFP}} = u_{\text{SLM}} \cdot M_{\text{BFP}}, \quad v_{\text{BFP}} = v_{\text{SLM}} \cdot M_{\text{BFP}}, \quad (3.5)$$

ebenso wie die radiale Koordinate

$$\rho_{\text{BFP}}^2 = u_{\text{SLM}}^2 \cdot M_{\text{BFP}}^2 + v_{\text{SLM}}^2 \cdot M_{\text{BFP}}^2. \quad (3.6)$$

4. Der Phasenwert  $\phi_j$  errechnet sich wie in Abschnitt 2.3 hergeleitet nach der Methode der „Prismen und Linsen“ durch

$$\phi_j = \underbrace{-\frac{k_0}{f_{\text{OL}}} (u_{\text{BFP}} \cdot x_j + v_{\text{SLM}} \cdot y_j)}_{\phi_j^{\text{lat}}} \underbrace{-k_0 n_m \sqrt{1 - \rho_{\text{BFP}}'^2} z_j}_{\phi_j^{\text{ax}}} \quad (3.7)$$

mit den konstanten Parametern  $k_0$ ,  $f_{\text{OL}}$  und  $n_m$ . Der erste Term, das Prisma, kodiert den lateralen Versatz und hängt von  $(x_j, y_j)$  ab. Der zweite Term, die Linse, steuert den Phasenanteil  $\phi_j^{\text{ax}}$  für den axialen Versatz  $z_j$  bei. Dabei ist  $\rho_{\text{BFP}}'^2 = (u_{\text{SLM}}^2 + v_{\text{SLM}}^2) / f_{\text{OL}}^2$  der auf die Größe der BFP normalisierte Pupillradius.

5. In Abschnitt 2.3 wurde bereits erläutert, dass die Beugungseffizienz stark verbessert wird, wenn für jede Falle ein zufälliger Phasenwert  $\phi_j^{\text{off}}$  aufaddiert wird. Da  $\phi_j^{\text{off}}$  für alle Pixel gleich sein muss und OpenGL

keine Funktion zur Erzeugung von Zufallszahlen bereitstellt, wird dem Fragment-Shader eine Liste mit  $j$  Offset-Phasenwerten zwischen 0 und  $2\pi$  von der Anwendung übergeben.

6. Im letzten Schritt der Schleife wird dem komplexen E-Feld der Anteil

$$E_j = |E_j| e^{i(\phi_j + \phi_j^{\text{off}})} \quad (3.8)$$

für die Falle  $j$  hinzu addiert, wobei die Intensität  $|I_j| = \sqrt{|E_j|}$  für jede Falle vorgegeben werden kann.

7. Nach  $j$  Iterationen sind die E-Feld-Werte

$$E = \sum_{j=0}^{N-1} E_j$$

aller Fallen akkumuliert. Aus dem Argument erhält man die Phasenverzögerung

$$\phi = \arg \{E\}, \quad (3.9)$$

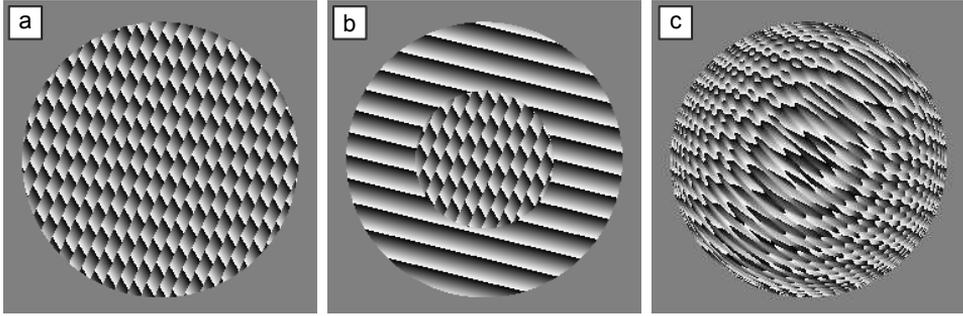
die der SLM für den jeweiligen Pixel erzeugen soll.

8. Zernike-Polynome sind eine Reihe von Polynomen, die orthogonal auf dem Einheitskreis sind. Sie lassen sich gut zur Korrektur optischer Aberrationen verwenden (Wulff et al., 2006). Der Einheitskreis, auf dem diese Polynome definiert sind, wird dafür auf die Größe der BFP skaliert. Die kompensierbaren Aberrationen mit den zugehörigen Zernike-Koeffizienten, die dem Fragment-Shader übergeben werden können, sind in (Singer et al., 2005c) dargestellt. Sie hängen normalerweise nicht von einer Fallenposition ab.

9. Abschließend wird der Grauwert

$$G = (\phi \bmod 2\pi) / 2\pi \cdot 2^8 \quad (3.10)$$

aus dem Phasenwert  $\phi$  berechnet, wobei durch die Modulo-Funktion immer Phasenwerte zwischen 0 und  $2\pi$  verwendet werden. Die Rundung von  $G$  auf einen natürlichen Wert erfolgt automatisch.



**Abb. 3.3.3.: Beispielhologramme.** (a) Hologramm für die Erzeugung von zwei Fallen in der FP ( $z_0 = z_1 = 0$ ). (b) Verkleinerung der effektiven NA für eine der beiden Fallen. (c) Hologramm für die Fallen in (a) und einer weiteren Falle, die bei  $z_2 = 10 \mu\text{m}$  platziert ist.

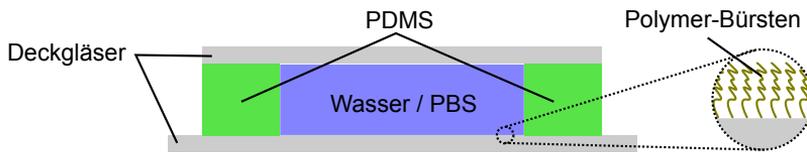
#### 3.3.4. Beispielhologramm

In Abb. 3.3.3-a ist ein Hologramm abgebildet, das zwei optische Fallen an den Positionen  $\mathbf{r}_0 = (2 \mu\text{m}, 5 \mu\text{m}, 0)$  und  $\mathbf{r}_1 = (10 \mu\text{m}, 0, 0)$  erzeugt. Man kann die Überlagerung zweier Phasenkeile mit unterschiedlicher Periode und Richtung erkennen. Die graue Fläche am Rand des Hologramms wird nicht in die BFP abgebildet und wird deshalb auch nicht zur Fallenerzeugung verwendet. In Abb. 3.3.3-b wurde die effektive NA für die zweiten Falle halbiert. Der äußere Teil des SLM erzeugt ausschließlich die erste Falle. Diese Verkleinerung der NA ist in Abb. 3.3.3-c wieder aufgehoben, dafür aber eine weitere Falle bei  $\mathbf{r}_2 = (0, 0, 10 \mu\text{m})$  hinzugekommen. Man erkennt die zusätzliche Überlagerung einer kugelförmigen Phasenverteilung.

Die Grafikkarte, die für die hier beschriebenen Versuche verwendet wurde, hat eine GPU mit 16 Kernen, 512MB Speicher und arbeitet mit einer Taktfrequenz von 589 MHz. Die Berechnung eines Hologramms mit  $1080 \times 1080$  Pixeln dauert ca. 20 ms. Die Anzahl  $N$  der erzeugten Fallen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Berechnungsdauer. Die CPU des Messrechners wird erheblich entlastet und steht für andere Aufgaben zur Verfügung.

### 3.4. Probenkammer

Optische Kräfte liegen – in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen – im Bereich von  $fN$  bis hin zu  $nN$ . Das Medium, das ein gefangenes Partikel umgibt, kann leicht hydrodynamische Reibungskräfte ausüben, die



**Abb. 3.4.1.: PDMS-Probenkammer.** Der mit Polymer-Bürsten überzogene Boden verhindert Zelladhäsion. Das Volumen ist geschlossen, damit es nicht zu Verdunstung und störenden Kräften durch Flüssigkeitskonvektion.

sich in dieser Größenordnung bewegen und damit die Bestimmung von optischen Kräften verfälschen oder das stabile Fangen von großen Objekten verhindern (vgl. Kap. 5). Durch Temperaturgradienten und Verdunstung entsteht Konvektion und damit ein signifikanter Krafteintrag.

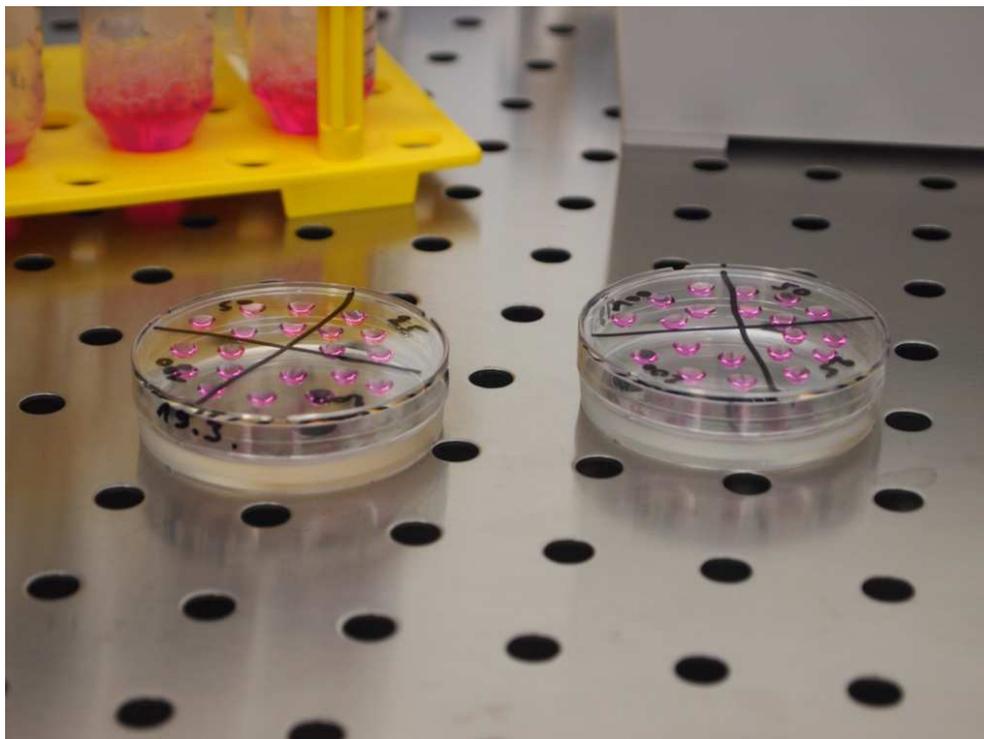
Aus diesem Grund werden Versuche, bei denen Beads oder Zellen mit optischen Fallen gehalten werden sollen, in einer abgeschlossenen Kammer aus Glas und PDMS durchgeführt, wie sie in Abb. 3.4.1 zu sehen ist. Der Boden besteht aus einem Mikroskopie-Deckglas mit einer wohldefinierten Dicke von 170  $\mu\text{m}$ . Wenn mit biologischen Proben gearbeitet werden soll, insbesondere mit adhärenenten Zellen, kann an die Oberfläche des Deckglases eine Schicht sog. Polymer-Bürsten (genauer: poly(dimethylacrylamide) oder PDMAA) gebunden werden. Die Prozedur ist detailliert in (Prucker et al., 1999) beschrieben. Ohne diese Polymer-Bürsten reicht bei adhärenenten Zellen ein kurzer Kontakt mit dem Deckglas, um Molekülbindungen herzustellen, die mit optischen Kräften nicht wieder gelöst werden können. Bei Versuchen mit Hefezellen kann ohne Auftreten von Zelladhäsion eine Kammer ohne Polymer-Bürsten verwendet werden.

## 3.5. Kultivierung von Zellverbänden

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Zellverbände mit einer funktionierenden dreidimensionalen Struktur zu erhalten (Pampaloni et al., 2007). Für die Versuche in dieser Arbeit war vor allem von Bedeutung, einen relativ stabilen Verband zu erhalten und möglichst unterschiedliche Größen zur Verfügung zu haben. Eine aus technischer Sicht relativ einfache Methode zur Herstellung solcher Zellverbände ist jene der *hängenden Tropfen* (hanging drop method) (Kelm et al., 2003). Eine detaillierte Anleitung ist in Anhang A.6 gegeben.

Bei dieser Methode wachsen einzelne Zellen unter fortlaufender Teilung zu einem Zellverband heran, während sie in einem Tropfen aus Nährmedium

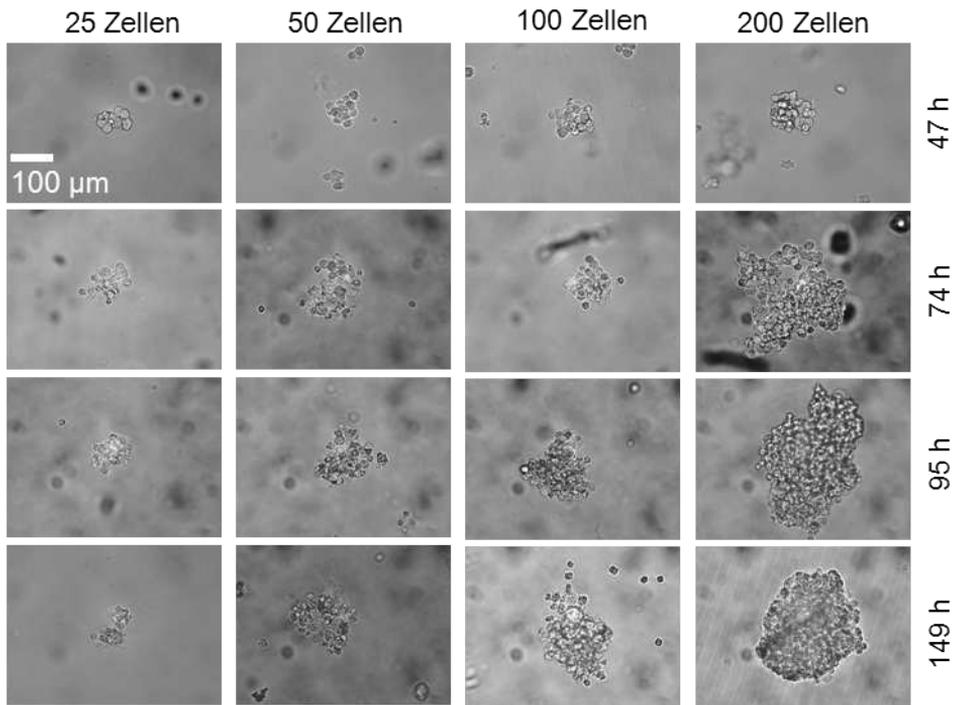
### 3. Versuchsaufbau und Methoden



**Abb. 3.5.1.: Zellkulturen zur Herstellung von Zellverbänden mit der Methode der hängenden Tropfen.** Die Tropfen aus Zellmedium hängen am Deckel einer Kulturschale, deren Boden zur Aufrechterhaltung einer konstanten Atmosphäre mit PBS gefüllt ist. Die Zellen wachsen an der Unterseite der Tropfen zusammen.

kultiviert werden. Weil der Tropfen am Deckel einer Kulturschale hängt (vgl. Abb. 3.5.1), gehen die adhären Zellen keine Verbindung mit einem Glassubstrat ein. Vielmehr hat die Grenzfläche Medium-Luft keine attraktive Wirkung, wodurch sich die extrazelluläre Matrix lediglich zwischen den Zellen ausbildet. Nach hinreichend langer Kultivierung bildet sich in jedem Tropfen ein Zellverband. Um Versuche mit einem Zellverband durchführen zu können, kann einfach ein Tropfen komplett in eine Probenkammer (vgl. Abschnitt 3.4) pipettiert werden.

Die Größe der Zellverbände hängt zum einen von der Dauer der Kultivierung ab. Zum anderen ist die Anzahl der vereinzelter Zellen von Bedeutung, die sich anfangs in einem Tropfen befinden. In Abb. 3.5.2 sind



**Abb. 3.5.2.: Zeitliche Entwicklung von Zellverbänden** mit der Methode der hängenden Tropfen. In jeden Tropfen mit einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  wurden zu Beginn eine andere Anzahl an vereinzelt Zellen gegeben.

typische Zellverbände abgebildet, wie sie sich mit einer unterschiedlichen Startzahl von Zellen entwickeln. Alle Tropfen haben ein Volumen von 20  $\mu\text{l}$ .



# 4. Sortierung von Suspensionszellen

## 4.1. Einführung

Dieses Kapitel handelt gewissermaßen von einem Spezialfall der optischen Manipulation von biologischen Objekten: dem Sortieren einzelner Suspensionszellen mit einer einzelnen optischen Falle innerhalb der Bildebene eines Mikroskops. Bei der Beschreibung des Versuchsaufbaus (Kap. 3) wurde bereits darauf eingegangen, dass die Komponenten, die zur Partikelsortierung notwendig sind, in der sog. *Rearportbox* an der Rückseite des Mikroskops untergebracht sind und auch separat verwendet werden können.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse basieren auf einer vorangegangenen Diplomarbeit (Landenberger, 2007). Alle hier beschriebenen Aspekte wurden neu entwickelt oder signifikant verändert. Sie sind in ähnlicher Form auch in (Landenberger et al., 2012) zu finden.

**Zellsortierung in der aktuellen Praxis** Seit vielen Jahren sind *FACS* (*fluorescence-activated cell sorter*, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierer) (Herzenberg et al., 1976) für die meisten biologischen Untersuchungen das erste Mittel der Wahl, wenn es um das Sortieren von Suspensionszellen geht (Shapiro, 2003). Sie werten das Licht, das von jeder Zelle gestreut und emittiert wird, zur Klassifizierung aus und sortieren die in Tropfen eingeschlossenen Zellen mittels elektrischer Ladungen und Felder. FACS bieten einen hohen *Durchsatz*, eine hohe *Sensitivität* und eine hohe *Ausbeute*. Um gute Resultate zu erhalten, ist jedoch viel Erfahrung in der Bedienung entsprechender Geräte notwendig. Für eine ausreichende *Kalibrierung* sind einige Zehntausend Zellen notwendig und die Zellen sind durch den Einschluss in kleine Tropfen erheblichen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Dadurch werden die potentiellen Einsatzmöglichkeiten ebenso begrenzt, wie durch die hohen Anschaffungskosten.

Von Seiten vieler Biologen besteht der Bedarf nach einer Möglichkeit, innerhalb einer Population derselben Art, Zellen mit unterschiedlicher Ausprägung (z. B. alle Mutationen einer Population oder alle potentiell pluripotenten Stammzellen) auszusortieren. Der Vorgang sollte am besten im Labor und ohne aufwändige Kalibrierung erfolgen, damit mit einer

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen

gewonnen Subpopulation direkt weitergearbeitet werden kann. Da die Klassifizierung im Alltag normalerweise durch einen Biologen auf Basis von Durchlicht- und Fluoreszenzbildern erfolgt, bieten sich diese auch als objektive Entscheidungsgrundlage für einen Zellsortierer an. Durch die enormen Fortschritte im Bereich der Hochdurchsatz-Mikroskopie stehen dafür ausgereifte Hilfsmittel zur Verfügung (Pepperkok und Ellenberg, 2006). Gerade im Vergleich zu FACS existiert eine technologische Nische für das Sortieren kleiner Populationen ( $10^2 \dots 10^5$ ) und seltener Ereignisse ( $< 10^{-2}$ ).

**Zellsortierung mittels  $\mu$ FACS** Lab-on-a-Chip-Systeme bieten die Möglichkeit, die beschriebenen Einschränkungen zu umgehen. Mit ihnen lassen sich zumindest theoretisch Systeme konstruieren, die tragbar sind, als Wegwerfprodukt verwendet werden können und nur kleine Volumina an Reagenzien benötigen. Als Zellsortierer entworfen, werden sie oft als  $\mu$ FACS bezeichnet, wobei zwischen ihnen große Unterschiede im Aktuierungsmechanismus bestehen. Eine umfangreiche Übersicht ist in (Lenshof und Laurell, 2010) gegeben.

Eine Möglichkeit besteht darin, den Flüssigkeitsstrom, in dem sich eine Zelle befindet, umzuleiten. Das kann sowohl durch Elektroosmose (Dittrich und Schwill, 2003) als auch durch das Schalten von Mikroventilen (Fu et al., 2002; Wolff et al., 2003; Abate et al., 2010) erfolgen. Alternativ können Kräfte auch direkt auf eine Zelle oder ein Partikel ausgeübt werden. Neben optischen Kräften, auf die gleich genauer eingegangen wird, bieten sich hier magnetische (Robert et al., 2011) oder dielektrophoretische Kräfte (Ohta, 2005; Kim et al., 2008; Park et al., 2011) an. Analog zum klassischen FACS können Zellen auch in Tropfen eingeschlossen sein, auf die dielektrophoretische Kräfte wirken (Ahn et al., 2006).

**Optische Sortierverfahren** Im Gegensatz zu diesen Verfahren hat die Verwendung optischer Kräfte entscheidende Vorteile: Erstens benötigt ein Analysechip keine aktiven Elemente wie die für Dielektrophorese notwendigen Elektroden. Und zweitens müssen Zellen nicht an magnetische oder dielektrische Beads gebunden oder in Tropfen eingeschlossen werden, um Kräfte ausüben zu können. Optische Sortierer lassen sich grob in aktive und passive Verfahren trennen, so wie auch von Jonás und Zemánek (2008) getan, die eine gute Übersicht über jene Verfahren liefern, die zu Beginn dieser Arbeit existierten.

*Passive optische Sortierer* verwenden eine statische Verteilung von optischen Fallen. In der Regel sind die Fallen auf einem festen Raster

angeordnet und wirken wie ein *optisches Sieb*. Mit ihnen lassen sich Objekte in Abhängigkeit ihrer Größe, ihrer Form oder ihres Brechungsindex unterschiedlich stark auslenken und damit in verschiedene Ausgänge eines Chips leiten (Korda et al., 2002; MacDonald et al., 2003; Milne et al., 2007). Passive Sortierer können auf viele ungeordnete Objekte parallel wirken und so hohe Durchsätze erreichen.

In den bisher publizierten Ausführungen verwenden *aktive optische Sortierer* schwach fokussierte, statische Laserstrahlen, die gezielt eingeschaltet werden, sobald ein Objekt detektiert wurde, das sortiert werden soll (Buican et al., 1987; Wang et al., 2005; Perroud et al., 2008; Lin et al., 2008). Als Kriterium dient wie bei klassischem FACS das Ansteigen eines Fluoreszenzsignals. Da die Auslenkung der Zellen über sehr kurze Distanzen erfolgt, sind hohe Laserintensitäten und eine Anpassung der Systeme für unterschiedliche Zelltypen notwendig. Ebenfalls hohe Laserintensitäten müssen bei der Verwendung einer Linienfalle aufgebracht werden (Applegate Jr et al., 2004). Hier können die optischen Kräfte zwar über eine längere Distanz wirken, aber gerade entlang der Laserlinie wirken nur relativ kleine Gradientenkräfte (vgl. Abschnitt 2.1.1).

**Vorteile optischer Punktfallen** Bei den im voranstehenden Abschnitt vorgestellten Verfahren, sowohl den passiven als auch den aktiven, werden die optischen Kraftfelder auf eine große Fläche verteilt und hängen von der Größe und dem Brechungsindex eines Partikels ab. Deshalb müssen diese Systeme immer neu angepasst werden, wenn sie einen anderen Partikeltyp sortieren sollen. Im Gegensatz dazu kann eine *optische Punktfalle* bei gleicher Laserleistung viel größere optische Kräfte erzeugen und diese sicher auf *unterschiedliche* Partikel übertragen. Da eine Punktfalle aber nur in einem lokal begrenzten Bereich wirkt, muss ein Partikel gezielt gegriffen und an eine andere Stelle gezogen werden.

**Neuer Ansatz mit dynamischen optischen Punktfallen** In diesem Kapitel wird erläutert, wie es durch die Verwendung optischer Punktfallen möglich ist, *beliebige* Zelltypen zu sortieren. Dafür wird in einem ersten Schritt für jede Zelle automatisch ein *geeigneter Angriffspunkt* bestimmt und in einem zweiten Schritt ein *passender Fallenpfad* berechnet. Auf diese Weise können unterschiedliche Zellen schnell und zuverlässig *ohne vorherige Kalibrierung* sortiert werden.

Der Nachweis erfolgt anhand von vier verschiedenen Zelltypen, die bereits in Abb. 2.1.3 zu sehen waren: an *Mitochondrien*, bei denen es sich, um genau

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen

zu sein, um Zellorganellen handelt, mit einer eigenen Membran und einem Durchmesser von ca.  $2\ \mu\text{m}$ ; an stäbchenförmigen *Bakterien* mit einer Zellwand und einem Querschnitt von ca.  $1\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$ ; an *Hefezellen* ebenfalls mit einer Zellwand und einem Durchmesser von  $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ ; und sehr empfindlichen *Pflanzenprotoplasten* mit einem Durchmesser von ungefähr  $40\ \mu\text{m}$ .

Zusätzlich wird beschrieben, wie eine Population von Hefezellen mit Hilfe eines Lab-on-a-Chip-Systems während desselben Durchlaufs nach Größe und Fluoreszenzsignal sortiert werden kann. Dafür wurden 50 % der Zellen mit einem Farbstoff angefärbt, der sich an ihre Mitochondrien heftet und grün emittiert.

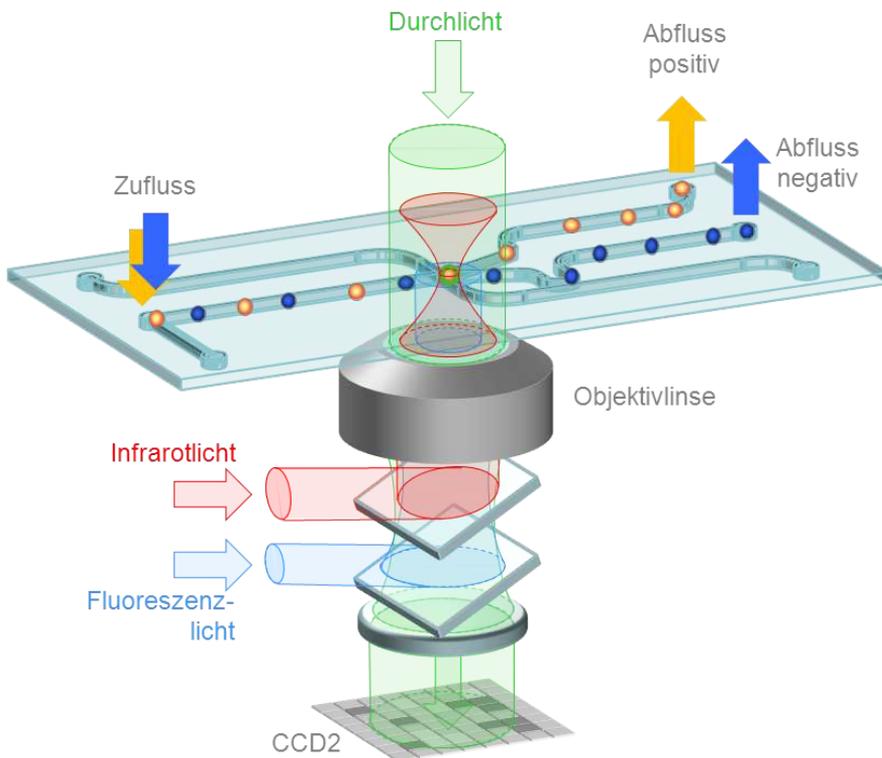
### 4.2. Funktionsprinzip

Das Funktionsprinzip eines Zellsortierers mit optischer Punktfalle ist in Abb. 4.2.1 dargestellt. Eine Suspension von Zellen mit unterschiedlicher Ausprägung wird durch einen gemeinsamen Zufluss in den Mikrokanal eines Analysechips eingeleitet. Im Zentrum des Chips wird der Kanal durch die Objektivlinse (OL) auf die Kamera (CCD2) abgebildet (vgl. Abschnitt 3.2.5). Die Entscheidung, ob eine Zelle positiv oder negativ klassifiziert wird, kann auf drei Arten erfolgen: (i) durch Analyse eines *Durchlichtbildes* nach morphologischen Kriterien wie Größe oder Form, (ii) nach der Intensität eines *Fluoreszenzsignals* oder (iii) durch Analyse von Durchlicht- und Fluoreszenzbild. Da das System nur eine Kamera zur Auswertung hat, müssen im letzteren Fall zwei Bilder nacheinander zur Auswertung herangezogen werden. Dieser Ablauf vom Typ iii ist schematisch in Abb. 4.2.2 dargestellt.

Nach Aufnahme eines Durchlichtbildes werden jene Zellen, die positiv klassifiziert wurden, exakt lokalisiert, die entsprechenden Fallenpfade berechnet und im Mikrokanal durch optische Kräfte versetzt. Diese Zellen, die in Abb. 4.2.1 rot dargestellt sind, verlassen den Mikrochip durch einen separaten Abfluss. Negativ klassifizierte Zellen werden von der optischen Falle nicht gegriffen und strömen in den Ausfluss „negativ“.

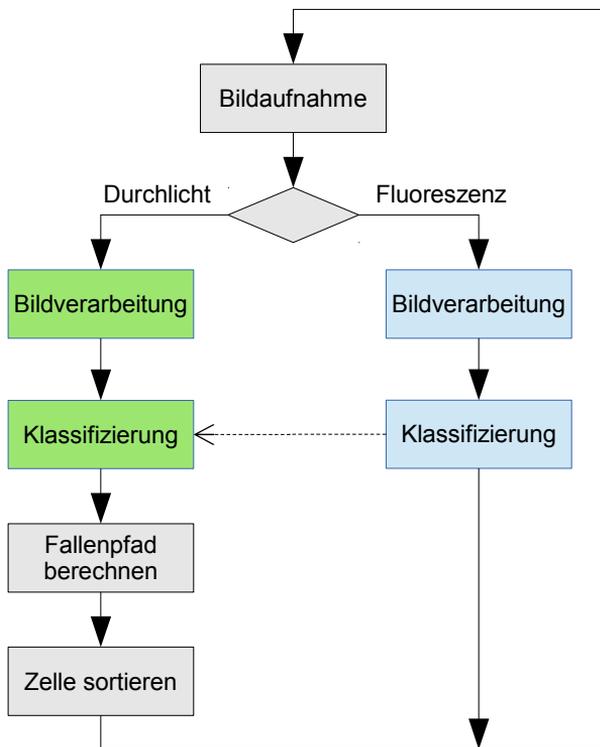
### 4.3. Mikrofluidik

Der Chip mit den Mikrokanälen ist so entworfen, dass er als Wegwerfprodukt günstig und in großer Menge mittels Heißprägen gefertigt werden kann (Steigert et al., 2007). Für die hier beschriebenen Versuche wurde ein Prototyp verwendet, der auch in Abb. 4.3.1-a zu sehen ist. Die Kanäle mit einer Breite von  $100\ \mu\text{m}$  und einer Höhe von  $80\ \mu\text{m}$  wurden in  $1.5\ \text{mm}$  dickes

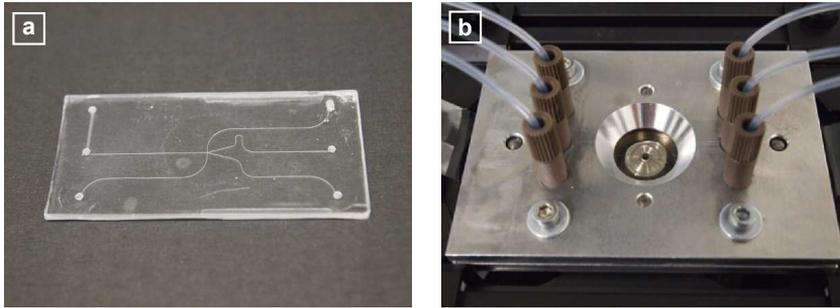


**Abb. 4.2.1.: Funktionsweise eines Zellsortierers mit dynamisch eingesetzter, optischer Punktfalle.** Eine Zellsuspension durchströmt den Mikrochip auf einer stabilen Strömungslinie. Im Zentrum des Chips wird jede Zelle mittels Bildverarbeitung klassifiziert und gegebenenfalls durch die optische Falle auf eine Strömungslinie gelenkt, die in einen anderen Abfluss mündet.

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen



**Abb. 4.2.2.:** Ablaufdiagramm zur Zellsortierung nach morphologischen Kriterien im Durchlichtbild und hinreichender Fluoreszenzintensität. Nur wenn die Klassifizierung des Fluoreszenzbildes und des Durchlichtbildes positiv ausfallen, wird ein Fallenpfadberechnen durchgeführt und die entsprechende Zelle sortiert.



**Abb. 4.3.1.:** (a) Prototyp des mikrofluidischen Chips zur Zellsortierung aus COC. (b) Aluminium-Halterahmen zur einfachen fluidischen Kontaktierung und Befestigung auf einem Universal-Mikroskopisch.

COC (Cyclic Olefin Copolymer 5013) gefräst. Alle Kanäle haben relativ zum Chipzentrum, wo sie zusammentreffen, die gleiche Länge und damit auch den gleichen hydrodynamischen Widerstand, wodurch die Einstellung der richtigen Flussraten erleichtert wird. Der kurze, breite Kanal am linken Chiprand dient zum schnellen und blasenfreien Befüllen mit der Zellsuspension. Die Kanalstruktur wurde mit einer  $140\ \mu\text{m}$  dicken Folie aus COC 8007 verschlossen, die als Boden dient und die gleichen optischen Eigenschaften wie ein Mikroskopie-Deckglas hat. Damit ist gewährleistet, dass man eine hervorragende mikroskopische Abbildung und einen guten Fallfokus erhält. Die in Abschnitt 3.4 beschriebenen Polymer-Bürsten kommen hier nicht zum Einsatz, da noch kein Protokoll für ihre Abscheidung in Mikrokanälen besteht. Stattdessen werden die Kanäle vor Verwendung mit Polyethylenglykol (PEG) gespült, wodurch Zelladhäsion zumindest für die Dauer eines Versuches verhindert wird.

Die makroskopische fluidische Kontaktierung erfolgte über Anschlüsse und Schläuche (Upchurch Scientific) und einen Halterahmen aus Aluminium (Abb. 4.3.1-b), der wiederum fest in einem Universal-Mikroskopisch (Zeiss) festgeklemmt war. Mit Hilfe von Spritzenpumpen (Cetoni, neMESYS) konnten die gewünschten Flussraten in den einzelnen Zuläufen eingestellt werden. Die Zellsuspensionen, die durch die Auslasskanäle strömen, werden von Eppendorf-Röhrchen aufgefangen.

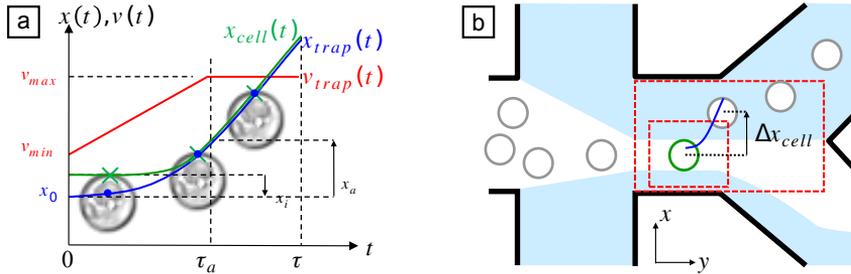
## 4.4. Fallentrajektorien für beliebige Zelltypen

In Abschnitt 2.1 wurde detailliert beschrieben, wie sich optische Kräfte auf ein biologisches Objekt anhand seines Durchlichtbildes abschätzen lassen. Es wurde klar, dass sich jene Stellen als Angriffspunkt eignen, die einen hohen Brechungsindex-Gradienten  $\Delta n$  aufweisen und im Durchlichtbild durch eine starke Intensitätsänderung  $\Delta \mathfrak{S}$  zu erkennen sind.

Am Beispiel einer Hefezelle, die in x-Richtung bewegt werden soll, ist solch ein Angriffspunkt in Abb. 4.4.1-a mit einem grünen Kreuz markiert und wird im Folgenden mit  $x_{\text{cell}}$  bezeichnet. Nun ist es in der Realität so, dass nicht alle Zellen immer exakt gleich groß sind und deshalb nicht alle in der exakt gleichen Höhe über dem Kanalboden entlang fließen. Es besteht somit die Gefahr, dass die Falle anfangs nicht präzise auf dem Angriffspunkt bei  $x_{\text{cell}}$  platziert werden kann. Aus diesem Grund greift die Falle an einer Position bei  $x_0$  an, die um eine Distanz  $x_i$  näher am Zellenzentrum gelegen ist. Für  $x_i$  wurde für alle gezeigten Versuche ein Erfahrungswert von 15 % des Abstandes von  $x_{\text{cell}}$  zur Zellenmitte gewählt.

Um eine Zelle auf eine andere Strömungslinie bewegen zu können, muss die hydrodynamische Reibungskraft  $F_\gamma$  überwunden werden, die auf die Zelle wirkt und die linear mit der Geschwindigkeit  $v_{\text{trap}}$  ansteigt, mit der die Zelle bewegt wird. Auf diese Reibungskraft wird in Abschnitt 5.3 noch genauer eingegangen. Nun ist davon auszugehen, dass die Falle anfangs noch nicht die maximale optische Kraft auf die Zelle ausüben kann, eben weil sie sich nicht exakt bei  $x_{\text{cell}}$  befindet. Deshalb bewegt sie sich zunächst ( $t = 0$ ) mit einer Geschwindigkeit  $v_{\text{min}}$  in x-Richtung, beschleunigt und erreicht nach einer Zeit  $\tau_a$  bei einer zurückgelegten Strecke  $x_a$  die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$ . Die grundlegende Idee hinter diesem Geschwindigkeitsprofil, das in Abb. 4.4.1-a als rote Linie dargestellt ist, besteht darin, dass während der Beschleunigungsphase optische Falle und Zelle ihre optimale Lage zueinander finden können, also  $x_{\text{trap}}$  und  $x_{\text{cell}}$  zur Deckung kommen. Spätestens ab dem Zeitpunkt  $t = \tau_a$  übt die optische Falle ihre maximale Kraft aus und die Zelle kann den Rest der Strecke mit Maximalgeschwindigkeit bewegt werden.

Wenn die Zelle nach der Gesamt-Versatzzeit  $\tau = (2x_a) / (v_{\text{max}} - v_{\text{min}}) + (d - x_a)$  wieder losgelassen wird, hat sie eine Distanz von  $x_{\text{cell}}(\tau) = \Delta x_{\text{cell}}$  zurückgelegt (siehe Abb. 4.4.1-b). Dabei steht  $d$  für die geplante und  $\Delta x_{\text{cell}}$  für die tatsächlich durchgeführte Versatz-Distanz.  $d$  kann unterschiedlich groß sein, da der Endpunkt des Fallenpfads per Definition ausreichend weit in der oberen Kanalhälfte liegen muss, liegt aber bei allen Versuchen im Bereich  $d \approx 40 \mu\text{m}$ . Damit sich Zellen während des Sortiervorgangs möglichst nicht gegenseitig behindern oder fälschlicherweise sortiert werden, wird die



**Abb. 4.4.1.:** (a) Zeitliches **Bewegungsprofil** von optischer Falle  $x_{trap}(t)$  und Zelle  $x_{cell}(t)$  für sicheres und schnelles Sortieren. Die optische Falle wird anfangs nahe der Zellmembran innerhalb des Zellkörpers an der Stelle  $x_0$  platziert. Die anfängliche Geschwindigkeit der Falle  $v_{min}$  wird innerhalb einer kurzen Strecke  $x_a$  konstant auf  $v_{max}$  erhöht. Während dieser Zeit  $\tau_a$  findet die Falle ihren optimalen Angriffspunkt und kann den Rest der Sortierdistanz mit maximaler Fallengeschwindigkeit  $v_{max}$  zurücklegen, bevor die Zelle losgelassen wird. (b) Schematische Darstellung des Versatzes einer Zelle aus dem hydrodynamisch fokussiertem Strom, der alle Zellen in den unteren Auslass transportiert, wenn die Falle nicht eingreift. Nach positiver Klassifizierung im Analysebereich (äußeres rotes Rechteck) wird die Zelle um  $\Delta x_{cell}$  auf eine Strömungslinie verschoben, die in den oberen Auslass führt.

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen

Zellsuspension durch seitlich einströmendes Medium fokussiert. So strömen im Idealfall die Zellen in einer dichten Kette in den Analysebereich (äußerer roter Rahmen) und können nacheinander sortiert werden. Damit Zellen, die bereits versetzt wurden, kein zweites Mal gegriffen werden, werden nur jene sortiert, deren Zentrum sich innerhalb des kleinen roten Rechtecks befindet.

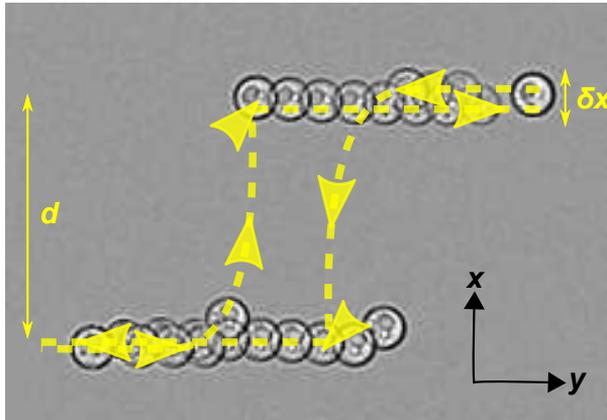
In  $y$ -Richtung bewegt sich die Falle während eines Sortiervorgangs möglichst konstant mit der strömenden Zelle mit, um nicht weitere Reibungskräfte überwinden zu müssen.

### 4.5. Versatzeffizienz für vier verschiedene Zelltypen

Um nachzuweisen, dass der Zellsortierer mit unterschiedliche Zelltypen arbeiten kann, und um sein Potential im Hinblick auf erreichbare *Sortierraten* abschätzen zu können, wurde eine besondere Versuchsanordnung gewählt. Mit ihr kann ermittelt werden, wie schnell und wie sicher – also wie effizient – verschiedene Zellen durch die optische Falle versetzt werden können, nachdem sie als positiv klassifiziert wurden. Um diese *Versatzeffizienz* voll automatisiert ermitteln zu können, wurde der Fluss im Mikrokanal durch Bewegungen des Piezotischs (PI) simuliert. Dadurch kann dieselbe Zelle immer wieder durch den Analysebereich bewegt werden, wo sie erkannt, klassifiziert, und versetzt wird, genau so wie dies auch in der Mikroflusskammer geschehen würde. Für die Experimente in diesem Abschnitt wurde eine Punktfalle mit einer optischen Leistung von 270 mW in der Objektebene verwendet.

Das Versatzexperiment ist in Abb. 4.5.1 anschaulich dargestellt. Eine Hefezelle wird durch den Piezotisch in  $y$ -Richtung bewegt. Sobald sie in den Sortierbereich eintritt (kleines rotes Rechteck in Abb. 4.4.1-b) wird sie klassifiziert. In diesem Fall muss nur das morphologische Kriterium der richtigen Größe erfüllt werden. Nach positiver Klassifizierung wird sie von der optischen Falle wie zuvor beschrieben versetzt und „fließt“ anschließend ungehindert weiter. Darauf folgt eine Umkehrung von Flussrichtung und Versatzrichtung, wodurch der Vorgang endlos wiederholt werden kann. Um den Versuch noch realistischer zu gestalten, wird die Zelle nach jedem Richtungswechsel mit Hilfe des Piezotischs um einen Zufallswert  $\delta x = -5 \mu\text{m} \dots + 5 \mu\text{m}$  verschoben.

Nach jeweils 10 Durchläufen werden  $v_{\min}$  und  $v_{\max}$  erhöht, was konsequenterweise zu einer kürzeren Versatzdauer  $\tau$  führt. Nach 20 verschiedenen Versatzgeschwindigkeiten wurde eine Zelle insgesamt 200 Mal versetzt (oder es wurde zumindest der Versuch unternommen). Die Position der Zelle wird direkt vor und nach jedem Versatz gespeichert, ebenso wie die



**Abb. 4.5.1.: Ablauf des Versatzexperiments am Beispiel einer Hefezelle.** Eine Zelle wird mit  $v_{\text{flow}}$  in  $y$ -Richtung bewegt. Sobald sie erkannt und klassifiziert wurde, wird sie durch die optische Falle um  $d$  versetzt. Danach werden Fluss- und Versatzrichtung automatisch umgekehrt. Bei jedem Richtungswechsel wird die Zelle um einen Zufallswert  $\delta x$  verschoben, um realistische Bedingungen zu simulieren. Zwei dieser Durchläufe sind mit gelb gestrichelten Linien gekennzeichnet.

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen

effektive Versatzdauer  $\tau$ . Die daraus errechnete Versatzdistanz  $\Delta x_{\text{cell}}$  liefert für jeden Durchgang die Versatzeffizienz  $\eta = \Delta x_{\text{cell}}/d$ . Ab einem bestimmten  $v_{\text{max}}$  muss damit gerechnet werden, dass die Versatzeffizienz

$$\eta(v_{\text{max}}) = \eta(\tau) = \begin{cases} 1 & \text{falls } \frac{F_{\text{grad}}(\tau)}{F_{\gamma}(\tau)} = 1 \\ 0 & \text{falls } \frac{F_{\text{grad}}(\tau)}{F_{\gamma}(\tau)} < 1 \end{cases} \quad (4.1)$$

abrupt absinkt, da die optische Gradientenkraft  $F_{\text{grad}}$  nicht mehr ausreicht um die mit  $v$  linear anwachsende Reibungskraft  $F_{\gamma}$  zu überwinden.

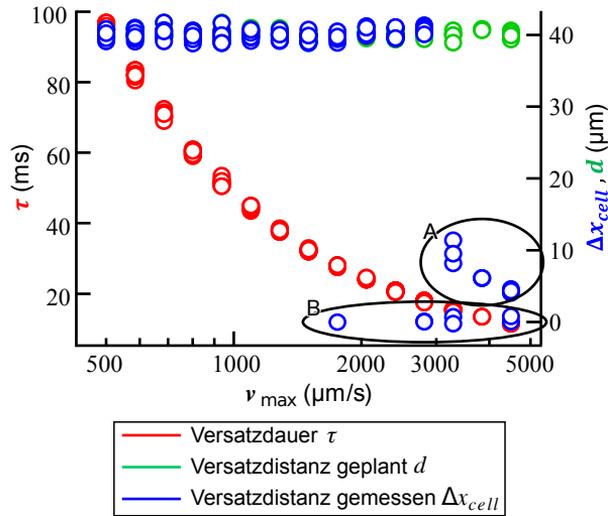
In Abb. 4.5.2 sind Messdaten für einen Versuch dargestellt, in dem die Versatzeffizienz für ein Bacillus-Bakterium ermittelt wurde. Erwartungsgemäß wurden für ansteigende Fallengeschwindigkeiten  $v_{\text{max}}$  immer kürzere Versatzzeiten  $\tau$  gemessen. Man kann zwei Gruppen von Messpunkten identifizieren, bei denen  $\Delta x_{\text{cell}} < d$  ist: Das abrupte Abfallen der Werte von  $\Delta x_{\text{cell}}$  in Gruppe A entspricht dem erwarteten Effekt, dass ab einem bestimmten Zeitpunkt, während die Falle auf  $v_{\text{max}}$  beschleunigte, die Reibungskraft zu groß wurde und die Zelle aus der Falle sprang. Bei den jeweiligen Durchläufen der Gruppe B hingegen haben Zelle und Falle keine ausreichend gute Position zueinander gefunden und daher wurde die Zelle überhaupt nicht versetzt ( $\Delta x_{\text{cell}} \approx 0$ ). Zwischen Bildaufnahme und Fallenaktion vergeht eine kurze Zeitspanne, die maßgeblich von der Bildverarbeitung abhängt und deren Dauer die Software aufgrund vorheriger Aktionen abschätzt. In dieser Zeit bewegt sich eine Zelle eine gewisse Distanz in y-Richtung weiter. Für sehr kleine Objekte wie dem Bacillus kann es dazu kommen, dass die Falle daneben greift. Eine mögliche Gegenmaßnahme wäre dafür zu sorgen, dass die Bildverarbeitung immer genau gleich lange dauert, die Software also mehr Echtzeit-Eigenschaften erhält.

In den Fällen, in denen eine Zelle in einem vorangegangenen Durchlauf aus der Falle gesprungen war und deshalb nicht mindestens  $d = 0.9 \times 40 \mu\text{m}$  Versatzdistanz zur Verfügung stand, wurde sie von der Falle nach oben bzw. unten transportiert und der Durchlauf nicht gewertet.

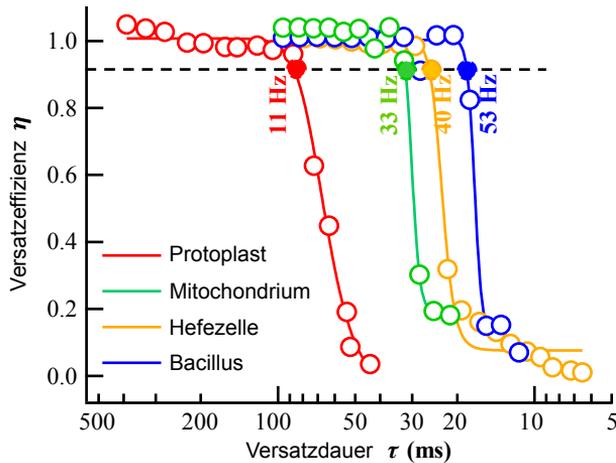
In Abb. 4.5.3 sind die ermittelten Versatzeffizienzen  $\eta = \Delta x_{\text{cell}}/d$  für alle vier Zelltypen abgebildet. Der Übersichtlichkeit halber werden jeweils die zehn Messungen mit den gleichen Geschwindigkeitsparametern gemittelt durch einen Punkt repräsentiert. Die durchgezogenen Linien stellen sigmoidale Regressionsfunktionen dar, durch die leichter zu erkennen ist, bei welcher Versatzzeit ein erfolgreiches Sortieren unwahrscheinlich wird und welche Sortierraten für den jeweiligen Zelltyp theoretisch möglich sind.

Am unteren Ende dieser Skala befinden sich erwartungsgemäß die Protoplasten, die den größten Durchmesser haben und beim Versatz den

#### 4.5. Versatzeffizienz für vier verschiedene Zelltypen



**Abb. 4.5.2.: Auswertung eines Versatzexperiments für einen Bacillus.** Für ansteigende Fallgeschwindigkeiten  $v_{\max}$  werden Versatzdauer  $\tau$ , geplante Versatzdistanz  $d$  und gemessene Versatzdistanz  $\Delta x_{\text{cell}}$  aufgetragen.



**Abb. 4.5.3.: Versatzeffizienz  $\eta$  für Protoplast, Mitochondrium, Hefezelle und Bacillus.**  $\eta$  fällt ab einer kritischen Versatzdauer  $\tau_{\text{crit}}$  schnell ab. Die jeweils theoretisch mögliche Sortiertrate, bei der  $\eta = 90\%$  beträgt, ist durch die ausgefüllten Punkte gegeben. Die durchgezogenen Linien stehen für sigmoidale Regressionsfunktionen, die die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Sortierung der Zelle hervorheben.

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen

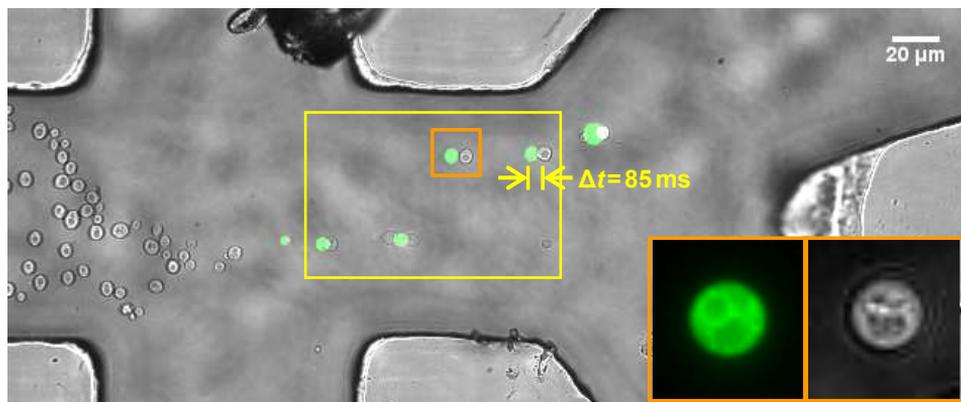
größten Reibungswiderstand bieten. Sie können bei der gegebenen optischen Fallenleistung von 270 mW sicher bewegt werden, solange dafür mindestens  $\tau_{\text{crit}} = 91 \text{ ms}$  zur Verfügung stehen. Das entspricht einer theoretisch möglichen Sortiertrate von 11 Hz. Bei dieser kritischen Versatzdauer sinkt die Versatzeffizienz auf  $\eta = 0.9$ . Am oberen Ende findet sich der Bacillus, der mit maximal 53 Hz sortiert werden könnte. Er richtet sich mit seiner stäbchenförmigen Form während der Phase mit niedriger Fallengeschwindigkeit längs des Fallenfokus aus, wodurch die Polarisierbarkeit insgesamt noch größer wird. Gleichzeitig erfährt er aufgrund des kleinen Querschnitts nur mäßige Reibungskräfte. Außerdem besitzt er eine dicke Zellwand mit großem Brechungsindex, auf die größere optische Kräfte wirken. Aus diesem Grund kann auch die Hefezelle trotz ihres größeren Durchmessers schneller bewegt werden als das Mitochondrium, da sie genau wie der Bacillus eine Zellwand besitzt.

### 4.6. Sortieren von Hefezellen nach Größe und Fluoreszenzniveau

Im vorherigen Abschnitt wurde festgestellt, dass beliebige Zellen ohne Rekonfiguration des Systems erkannt, gegriffen und versetzt werden können. Die Sortieraten, die für die verschiedenen Zelltypen ermittelt wurden, sind jedoch nur bei optimalen Strömungsbedingungen im Kanal zu erreichen. Im Folgenden soll beschrieben werden, wie sich Hefezellen unter realen Strömungsbedingungen im Mikrokanal sortieren lassen.

Dafür wird die anspruchsvollste der möglichen Klassifizierungsvarianten (iii: richtige Größe im Durchlichtbild und Überschreiten eines Intensitätsniveaus im Fluoreszenzbild) verwendet. Das bedeutet beispielsweise, dass eine Zelle mit normaler Größe und gefärbten Mitochondrien positiv klassifiziert wird, während eine ungefärbte Zelle oder fluoreszentes Material außerhalb einer Zelle negativ klassifiziert wird.

Bei dem Versuch, der in Abb. 4.6.1 mit einer Serie von Mikroskopaufnahmen illustriert wird, entsprechen Strömungsgeschwindigkeit und Versatzdistanz jenen aus dem Versatsexperiment zuvor, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Man kann deutlich erkennen, wie die dichte Zellsuspension von links kommend durch die fokussierenden Strömungen oben und unten zu einer Zellkette geformt wurde, die das Zentrum des Chips leicht unterhalb der Mitte passierte und durch den unteren Auslass verließ. Dabei wurde nur der zentrale Bereich des Kanals (nicht die stark streuenden Ränder) von der Fluoreszenz-Lichtquelle ausgeleuchtet, um die Hintergrundstrahlung



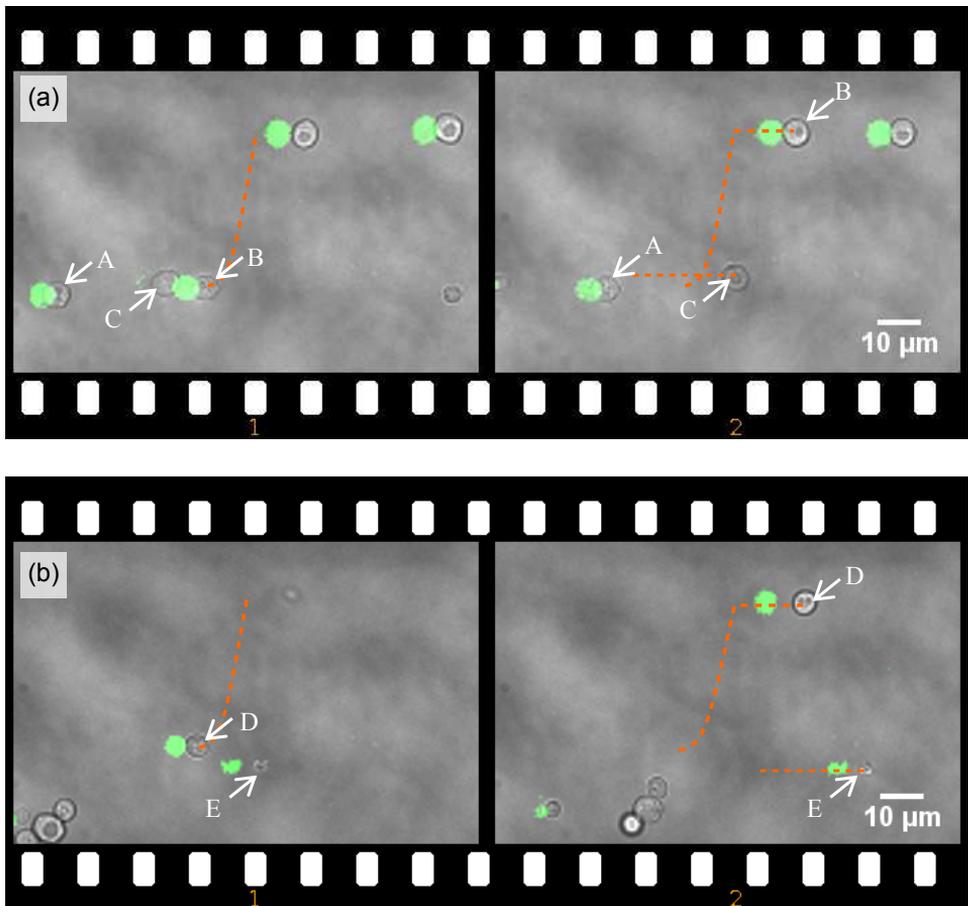
**Abb. 4.6.1.: Aussortieren von Hefezellen im Mikrokanal** anhand von Fluoreszenzintensität und Größe. Durchlicht- und Fluoreszenzbild werden abwechselnd mit einem zeitlichen Abstand von  $\Delta t = 85$  ms aufgenommen. Zellen, die als positiv klassifiziert wurden, landen im oberen Auslass. Die Bildeinsätze geben einen Eindruck von möglichen Klassifizierungsmerkmalen.

zu minimieren. Die dunkle Verfärbung am oberen Bildrand rührt von einem kleinen Schaden her, der durch die starke Benutzung verursacht wurde und den Versuch nicht weiter beeinflusste.

Die Zellen in Abb.4.6.1 durchflossen den zentralen Bereich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $v_{\text{flow}} = 76 \mu\text{m/s}$ . Nachdem sie als positiv klassifiziert wurden, wurden sie von der optischen Falle um  $40 \mu\text{m}$  versetzt und flossen weiter auf einer Strömungslinie, die in den oberen Auslass mündete. Die Durchlichtbilder wurden 85 ms nach den Fluoreszenzbildern aufgenommen, deshalb sind die beiden in der Überlagerung um einige Mikrometer zueinander versetzt. Die Bildeinsätze unten rechts erlauben eine Vorstellung davon, welche intrazellulären Merkmale zur Klassifizierung herangezogen werden können.

Die Bilderfolge Abb.4.6.2-a zeigt eine Situation, in der sich eine nicht fluoreszierende Zelle (C) nahe an zwei fluoreszierenden Zellen (A+B) befand. Die beiden oberen Zellen waren in dieser Situation bereits sortiert worden. Im zweiten Bild, 0.34 s später, wurden A und B erfolgreich aussortiert, während C sich wie erwünscht weiter auf seiner ursprünglichen Strömungslinie bewegte. In der Bilderfolge Abb. 4.6.1-b sind D und E beides fluoreszierende Objekte, aber D ist eine Hefezelle und E ein zu kleines Partikel. Konsequenterweise wurde E als negativ klassifiziert und nicht sortiert.

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen



**Abb. 4.6.2.: Sortiervorgang anhand von zwei Beispielen**, jeweils vor und nach Einsatz der optischen Falle ( $\Delta t = 0.34$  s). **(a)** Die Zellen A und B sind fluoreszent und sollen sortiert werden, Zelle C hingegen nicht. Obwohl sie sehr nahe an B durch den Kanal strömt, wird sie von der optischen Falle nicht gegriffen und strömt in den unteren Auslass. **(b)** D ist eine fluoreszente Zelle, E hingegen nur ein kleines fluoreszentes Partikel, das vom Sortierer korrekterweise nicht versetzt wird.

positiv	negativ	
253	32	oberer Auslass
13	360	unterer Auslass

**Tab. 4.1.: Auswertung von 658 sortierten Hefezellen.** Die Rückgewinnungsrate, also der Anteil aller Zellen mit positiven Kriterien, die im oberen Auslass landen, lag bei 95 %. Die Reinheit der aussortierten Subpopulation lag bei 89 %.

Zur quantitativen Beurteilung wurden alle Zellen manuell ausgewertet, die über einen Zeitraum von 7.8 min sortiert wurden. Mit insgesamt 658 Zellen hat der Sortierer einen Durchsatz von 1.4 Zellen/s. In Tab. 4.1 ist abzulesen, dass 93 % aller Zellen korrekt sortiert worden sind. 11 % wurden fälschlicherweise in den oberen Auslass sortiert (falsch positiv), 3 % wurden nicht versetzt, obwohl sie den Klassifizierungskriterien entsprechen (falsch negativ). Die Rückgewinnungsrate, also der Anteil aller Zellen mit positiven Kriterien, die im oberen Auslass landen, lag bei 95 %. Die Reinheit der aussortierten Subpopulation lag bei 89 %.

## 4.7. Diskussion

Das vorgestellte Sortierverfahren, dass Zellen mit Hilfe schnell steuerbarer optischer Punktfallen sortiert, kann in der hier gezeigten Form verwendet werden. Durch die Extraktion von geeigneten Angriffspunkten aus dem Durchlichtbild und dem dynamischen, für jede einzelne Zelle berechneten Fallenpfad ist es für sehr unterschiedliche Zellen oder Partikel geeignet. Eine Kalibrierung des Systems oder gar eine Anpassung der Hardware ist nicht notwendig. Das ist ein wesentlicher Vorteil im Vergleich mit allen anderen vorgestellten  $\mu$ FACS (Dittrich und Schwille, 2003; Fu et al., 2002; Wolff et al., 2003; Abate et al., 2010; Robert et al., 2011; Ohta, 2005; Kim et al., 2008; Park et al., 2011; Ahn et al., 2006).

Im derzeitigen Zustand ist der Durchsatz auf etwas mehr als 1 Hz beschränkt. Höhere Sortierraten sind durch die Verwendung einer schnelleren Kamera möglich. Der entscheidende Verbesserungspunkt betrifft aber die Mikrofluidik. Nur wenn die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit in einer dichten Kette in den Sortierbereich fließen, sind die theoretisch ermittelten Sortieraten von 10-50 Hz möglich. Die ermittelten kritischen Versatzzeiten (20 ms für Bacillus, 25 ms für Hefezellen, 30 ms für Mitochondrien, 90 ms für Protoplasten) bestätigen, dass die optischen Kräfte absolut ausreichend sind.

#### 4. Sortierung von Suspensionszellen

Die Ausbeute an korrekt sortierten Zellen dürfte ebenfalls weiter steigen, wenn die Zellsuspension so aufbereitet wird, dass weniger Zellen aneinander haften. Nahezu alle falsch sortierten Zellen wurden von eigentlich korrekt erkannten Zellen mitgezogen. In einigen Fällen wurden Zellen falsch sortiert, die zwar vereinzelt waren, aber nebeneinander in den Sortierbereich gelangten, wo sie sich auf dem Fallpfad befanden und mitgezogen wurden. Denkbar wäre auch, diese beiden Fälle bei der Klassifizierung als besondere, negative Fälle zu werten und so die Reinheit im „positiven“ Auslass zu erhöhen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die sortierten Zellen nur in sehr geringem Maße zusätzlichen Belastungen ausgesetzt werden. Vorangegangene Untersuchungen zeigen, dass das Risiko für Schäden durch das Fallenlicht nur sehr klein ist. Hefezellen beispielsweise können 180 mW Laserleistung über mehr als 50 s ohne Schaden aushalten (Grimbergen et al., 1993). Selbst mit sehr langsamen Fallengeschwindigkeiten wurde keine Zelle länger als 100 ms der Strahlung ausgesetzt. Um das Restrisiko auszuschließen, dass die Kombination aus Fallenlicht, Fluoreszenzanregung und Flusskammer einen schädlichen Einfluss hat, wurden zusätzliche Tests zur Lebensfähigkeit sortierter Hefezellen mit Trypan Blau durchgeführt. Sowohl die Gruppe sortierter Zellen als auch die Kontrollgruppe zeigten keine signifikant reduzierte Vitalität (98.8 % vs. 98.5 %). Es ist außerdem bemerkenswert, dass Protoplasten, wie gezeigt, ohne Schaden sortiert werden können. In normalen FACS platzen Protoplasten aufgrund zu hoher Scherkräfte.

Dem System können ohne Weiteres komplexere Klassifizierungs-Routinen hinzugefügt werden. Beispielsweise könnte überprüft werden, ob eine Zelle im Durchlichtbild in die Länge gezogen erscheint und ein oder zwei Zellkerne fluoreszieren. Damit könnte eine synchronisierte Subpopulation abgesondert werden, in der sich alle Zellen im gleichen Stadium des Zellteilungszyklus befinden.

# 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

## 5.1. Einführung

Dieses Kapitel behandelt die Manipulation von Zellen und Zellverbänden mit Hilfe optischer Fallen. Mit Manipulation ist zunächst einmal die *translatorische oder rotatorische Bewegung von biologischen Objekten in drei Dimensionen* gemeint. Im Vergleich zu den Bewegungen, die in Kap.4 beim Sortieren von Suspensionszellen ausgeführt wurden, kommen hier auch optische Fallen zum Einsatz, die in *axialer Richtung* ausgelenkt werden und Kräfte in axialer Richtung ausüben müssen. Während bisher lediglich eine Falle schnelle Bewegungen ausführen musste, kommen nun *mehrere Fallen gleichzeitig* zum Einsatz, die ihre Arbeit aber meist langsamer verrichten, da es sich zum Teil um große Objekte handelt, zu deren Manipulation aufgrund der größeren Reibung mehr Kraft erforderlich ist. Das entscheidende optische Element zur Positionierung der Fallen ist der *spatiale Lichtmodulator (SLM)*.

**Stand der Technik** Die Möglichkeit, optische Fallen mit Hilfe eines SLM zu positionieren, wurde erstmals von [Reicherter et al. \(1999\)](#) vorgestellt. In dieser Arbeit konnten Beads in der Bildebene zweidimensional versetzt werden. Die Ausweitung auf die dritte Dimension erfolgte durch dieselbe Gruppe kurze Zeit später ([Liesener et al., 2000](#)).

Diese Technik wurde von verschiedenen Gruppen verbessert und teilweise auch für die relativ einfache Manipulation von einzelnen Zellen oder Bakterien eingesetzt. Als Beispiel ist hier die axiale Positionierung vieler Zellen auf einem Raster zu nennen, die es ermöglicht, alle Zellkerne in die Fokusebene eines Mikroskops zu bringen und mit einer einzigen Aufnahme scharf abzubilden ([Eriksson et al., 2009](#)).

Einige interessante Arbeiten beschäftigen sich mit der *optischen Stimulation* von einzelnen Zellen. So konnten beispielsweise [Guck et al. \(2001\)](#) zeigen, dass sich Zellen mit optischen Kräften in Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften ihres Cytoskeletts dehnen lassen (der sog. *optische Strecker*). Quantifiziert man diese Dehnung mit Hilfe einer mikroskopischen Abbildung

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

und entsprechender Bildverarbeitung, können sogar Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die es sich um gesunde oder Krebszellen handelt (Guck et al., 2005). Durch die gezielte Stimulation von Nervenzellen konnten Ehrlicher et al. (2002) die Polymerisierung des Zellskeletts und damit das Wachstum der Zellen in eine gewünschte Richtung lenken. Kress et al. (2009) gelang der eindrucksvolle Nachweis, dass die biochemisch aktiven Moleküle, die von optische gefangenen Nano-Containern ausströmen, die Polarisierung und Migration von Zellen steuern können.

Des Weiteren wurden einige Arbeiten veröffentlicht, die sich mit der Translation oder Rotation von kleinen biologischen Objekten beschäftigten. So konnten beispielsweise Beads und Chromosomen (Paterson et al., 2001) oder stäbchenförmige Bakterien (Hörner et al., 2010) mit Hilfe zweier nah beieinander liegenden Fallen rotiert werden. Einen Schritt hin zu größeren Objekten gelangen Tanaka et al. (2008) mit der zweidimensionalen Rotation von ca. 20  $\mu\text{m}$  langen und 4  $\mu\text{m}$  breiten Kieselalgen.

Aus technischer Sicht sind Vorarbeiten zur schnellen Berechnung von Hologrammen und zur benutzerfreundlichen Steuerung der Fallen in 3D von großer Bedeutung. Preece et al. (2009) entwickelten ein Verfahren, mit dem die Hologramme für eine beliebige Fallenverteilung in 3D auf einer Grafikkarte berechnet werden können. Die Berechnung erfolgt schnell genug, um die normaler Bildwiederholrate eines SLM (60 Hz) ausnutzen zu können. Für die dreidimensionale Positionierung von optischen Fallen kann eine gut durchdachte Methode zur Steuerung von großen Nutzen sein. Hier sind als auffälligste Ansätze die Steuerung mittels eines Kamera-beobachteten Sensorhandschuhs (Whyte und Courtial, 2005) und die mittels eines Tablet-PCs (Bowman et al., 2011b) zu nennen.

**Begriffsklärung** Im Laufe dieses Kapitels wird viel von *Fallentrajektorien* die Rede sein. Damit ist der Weg im dreidimensionalen Raum gemeint, den eine Falle nacheinander beschreitet. Eine Trajektorie ist durch einen Satz an (x,y,z)-Koordinaten und durch eine Verweildauer  $\Delta t$  an jeder Position gegeben.<sup>1</sup> Soll ein Objekt rotiert werden, besteht aus technischer Sicht ein großer Unterschied zwischen verschiedenen Richtungen: Ist im Folgenden von einer Rotation *parallel* zur Bildebene die Rede, bedeutet das, dass sich ein Punkt des Objekts auf einer Bahn parallel zur Bildebene bewegt, die Rotationsachse also in Richtung der optischen Achse zeigt. Eine Rotation *senkrecht* zur Bildebene bedeutet hingegen, dass die Rotationsachse parallel

---

<sup>1</sup>Die Klasse *Trajectory* im Manipulator-Code enthält Informationen über den Positionsverlauf *mehrerer* Fallen.

zur x- oder y-Achse verläuft. Der Teil eines Objekts, der scharf auf die Kamera abgebildet wird, ändert sich dabei kontinuierlich. Da die Blende für die 0. Beugungsordnung (AP1) zu Aberrationen bei manchen Fallenpositionen führt, werden senkrechte Rotationen in diesem Kapitel in der Regel um die x-Achse durchgeführt.

**Manipulationsstrategien** Es gibt verschiedene Möglichkeiten, ein Objekt mit optischen Fallen zu bewegen. Sie haben unterschiedliche Vor- und Nachteile und werden daher kurz erläutert.

- **selektiver Falleneinsatz:** Diese Methode ist wahrscheinlich die intuitivere und auch die elegantere Variante. Jede Falle greift gezielt an einer bestimmten Stelle eines Objekts an und behält während der gesamten Bewegung den Kontakt zu diesem Punkt. Jede Falle trägt zu der gewünschten Bewegung bei und es werden nur so viele Fallen verwendet, wie notwendig sind, um dem Objekt eine ausreichende Stabilität zu geben.
- **nicht selektiver Falleneinsatz:** Diese Methode basiert auf der Überlegung, dass verschiedene Fallen zwar unter Umständen konkurrierende Kräfte ausüben können, aber durch eine ausreichend große Zahl an Fallen und durch deren aufeinander abgestimmte Trajektorien sich im Ganzen eine Nettokraft in die gewünschte Richtung ergibt. Der geringere Aufwand für die Bestimmung der Fallenpositionen muss in der Regel mit einer höher Laserleistung erkauft werden.

Unabhängig davon, ob die Fallen selektiv eingesetzt werden oder nicht, üben optische Fallen immer sowohl Gradienten- als auch Streukräfte auf ein Objekt aus, die beide genutzt werden können.

- **Gradientenkräfte:** Vor allem beim selektiven Einsatz der Fallen wird in der Regel die Wirkung einer Kraft hin zu einem Punkt angestrebt, wofür es sich in der Regel anbietet, eine Situation zu schaffen, in der Gradientenkräfte dominieren. Hierbei muss beachtet werden, dass ein guter Angriffspunkt – also eine Stelle mit hohem  $\Delta n$  – schnell zu einem instabilen Faktor werden kann, wenn er sich zu weit vom Fallenzentrum entfernt.
- **Streukräfte:** Kommt mehr als eine Falle zum Einsatz, kann eine Falle, bei der die Streukräfte dominieren, durchaus zu einer kontrollierten Bewegung beitragen. Streukräfte können vor allem bei der Rotation

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

eines großen Objekts hilfreich sein, indem durch unterschiedlich große oder gerichtete Streukräfte ein Drehmoment erzeugt wird.

**Bestimmung von initialen Angriffspunkten** Die Entscheidung, wo die beteiligten optischen Fallen platziert werden, ist selbstverständlich von zentraler Bedeutung. Für die Versuche in diesem Kapitel wurden die Fallen immer zunächst manuell gesetzt, was durchaus ein gewisses Maß an Erfahrung voraussetzt. Es ist aber ohne Probleme möglich, die Erkenntnisse aus Abschnitt 2.1.3 zu nutzen und Fallen nach Auswertung eines Durchlichtbildes automatisch an geeignete Angriffspunkte zu setzen. Die von dort ausgehenden Fallentrajektorien werden für einen bestimmten Verlauf im Vorhinein berechnet. Die automatische Ermittlung von Angriffspunkten wird erst durch die Technik in Kap. 6 möglich, die auch genutzt werden kann, um die Bewegung der Fallen immer wieder neu auf die aktuelle Lage eines Objekts anzupassen.

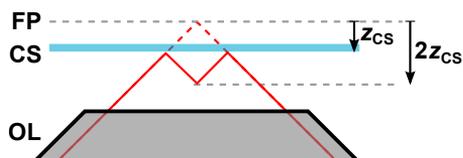
**Technische Möglichkeiten** Basierend auf der Methode zur Hologrammberechnung aus Abschnitt 3.3 bietet der Manipulator die Möglichkeit, optische Fallen beliebig in 3D zu positionieren und zu bewegen. Für einige, häufig verwendete Anordnungen gibt es bereits vorbereitete Methoden. Dazu gehören die gleichmäßige Anordnung von Fallen auf einer Linie, auf einer Kreisbahn, in einem festen Raster oder auf einer Kugeloberfläche. Trajektorien, die eine lineare Bewegung entlang eines Vektors oder eine Rotation um eine Achse ausführen, können schnell und einfach erstellt werden. Die meisten Funktionen sind über die graphische Benutzeroberfläche verfügbar, manche müssen durch kleine Python-Skripte vorbereitet werden. Für alle Versuche aus diesem Kapitel wurde die in Abschnitt 3.4 beschriebene Probenkammer verwendet.

## 5.2. Charakterisierung der holographischen optischen Fallen

### 5.2.1. Intensitätsverteilung holographischer optischer Fallen

In Abschnitt 2.1.1 wurde erläutert, welche Bedeutung die Ausdehnung eines Laserfokus für das Erzeugen optischer Kräfte hat. Dabei wurde klar, dass für große Gradientenkräfte große Intensitätsgradienten notwendig sind. Ein Fallenfokus sollte möglichst kompakt sein – vor allem in axialer Richtung. Für eine vollständige Charakterisierung des optischen Manipulators und um eine Vergleichbarkeit mit anderen Systemen zu ermöglichen, wurde die

## 5.2. Charakterisierung der holographischen optischen Fallen



**Abb. 5.2.1.:** Vorgehensweise zur Ermittlung der **Intensitätsverteilung von Laserfokussen mit Hilfe eines Deckglas-Scans**. Das Deckglas (CS) wird in diskreten Schritten durch den zu vermessenden Fokus (rot gestrichelt) bewegt. Der reflektierte Anteil (rot durchgezogen) wird auf die Kamera abgebildet. Hat das Deckglas einen Abstand von  $z_{CS}$  zur Fokalebene (FP), detektiert die Kamera also eine Ebene bei  $2z_{CS}$ .

Intensitätsverteilung von erzeugten Fallen vermessen, für deren Erzeugung der komplette Strahlengang von Bedeutung ist (vgl. Abb. 3.2.1) .

Die Intensitätsverteilung kann ermittelt werden, indem ein herkömmliches, sauberes Deckglas (CS) mit Hilfe des Piezotischs in diskreten Schritten in  $z$ -Richtung durch den Bereich des Fokus bewegt wird. Das Deckglas reflektiert einen kleinen Anteil des Fallenlichts und lenkt dieses über das 4f-System aus Objektivlinse und Tubuslinse auf die Kamera. Für jede Position des Deckglases  $z_{CS}$  wird ein Bild aufgenommen und zu einer dreidimensionalen Intensitätsverteilung zusammengesetzt. Da es sich hierbei um ein oft verwendetes und aussagekräftiges Verfahren handelt, sollen noch zwei Anmerkungen gemacht werden:

(i) Der Reflexionskoeffizient des Farberteilers DC2 für infrarotes Licht ist polarisationsabhängig. Im Normalbetrieb soll DC2 einen möglichst großen Anteil reflektieren. Für die hier beschriebene Messung muss die Polarisation des Laserlichts um  $90^\circ$  gedreht werden, damit ein möglichst großer Anteil durch DC2 transmittiert wird. Das Laserlicht ist dann als runder Fleck auf der Kamera zu sehen. Mit normaler Polarisation werden lediglich depolarisierte Anteile gemessen, die vor allem von der starken Fokussierung der Objektivlinse stammen und die die charakteristische Form eines Kleeblattes haben.

(ii) Es wird immer genau die Fokalebene (FP) der Objektivlinse auf die Kamera abgebildet. Ist das Deckglas, wie in Abb. 5.2.1 gezeigt, um  $z_{CS}$  von der Fokalebene entfernt, erscheint der Fokus auf der Kamera um  $2z_{CS}$  entfernt. Werden die einzelnen Kamerabilder also zu einem 3D-Datensatz zusammengefasst, entspricht die  $z$ -Koordinate eines Intensitätswerts dementsprechend auch  $2z_{CS}$ .

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

In Abb. 5.2.2 sind die Maximumprojektionen entlang der drei Raumachsen eines Deckglas-Scans für eine einzelne Falle mit den Translations-Koordinaten  $\mathbf{r} = (5 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}, 30 \mu\text{m})$  abgebildet. Die Voxelgröße des 3D-Datensatzes beträgt  $158 \text{ nm} \times 158 \text{ nm} \times 316 \text{ nm}$ . Die Intensität des Fallenlichts  $I_{is}$  ist farblich kodiert und auf den Maximalwert  $I_{is,max}$  normiert.

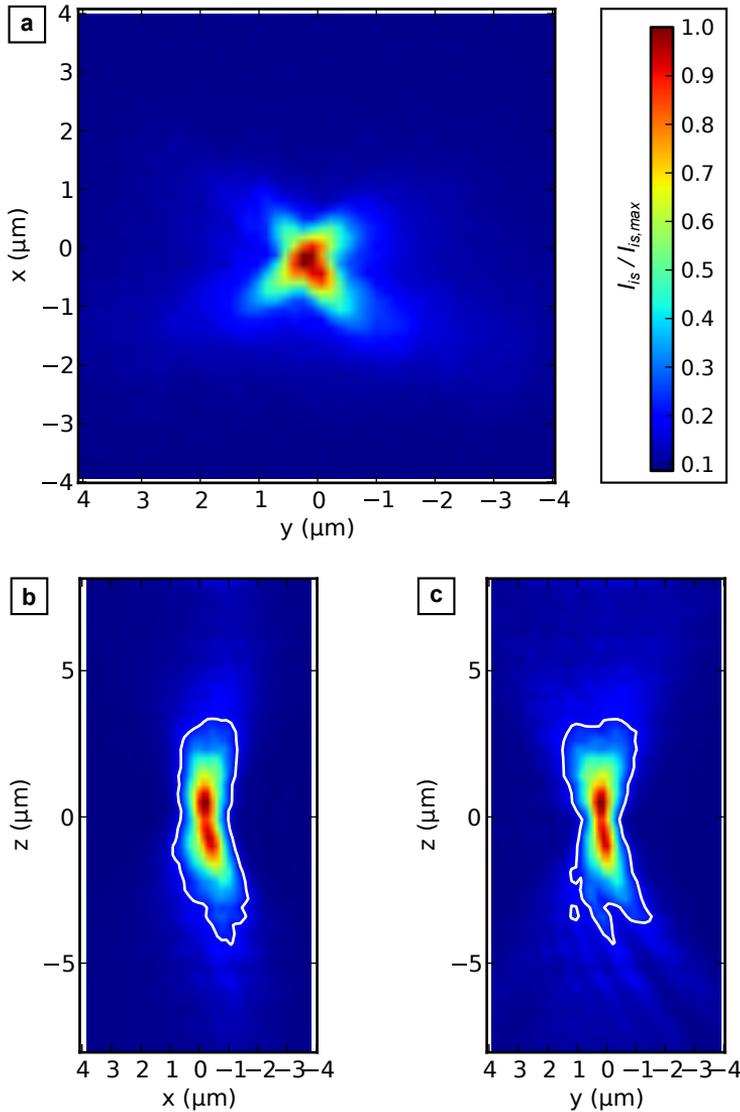
Im Vergleich mit Abb. 2.1.1-a war der Fokus bei dieser Messung leicht aberriert. Die Ursache dafür liegt sicherlich in der asymmetrischen Beschneidung des Laserstrahls an den Linsen L1, L2 und SL. Eine solche Fallenqualität reicht aber absolut zum stabilen Fangen vieler Objekte aus, beispielsweise von Zellen oder dielektrischen Beads mit Durchmesser  $> 200 \text{ nm}$ .

Im Folgenden wird die Vermessung einer Fallenordnung beschrieben, wie sie in einem realistischen Szenario zum Halten oder Drehen eines Zellsphäroiden verwendet werden kann. Wie in Abb. 5.2.3-a dargestellt, wurden sechs optische Fallen gleichmäßig auf der Oberfläche einer Kugel mit einem Radius von  $40 \mu\text{m}$  verteilt. Der anschließende Deckglas-Scan lieferte einen 3D-Datensatz mit einer Voxelgröße von  $316 \text{ nm} \times 316 \text{ nm} \times 632 \text{ nm}$ .

In den Abb. 5.2.3-c bis -d sind Maximumprojektionen dieses Datensatzes entlang der drei Raumachsen abgebildet. In dieser Darstellung werden kleine Unterschiede zwischen den Fallen deutlich. Je weiter eine Falle von der Fokalebene (FP) der Objektivlinse bei  $z = 0$  entfernt ist, desto stärker ist ihr Fokus aberriert. Außerdem sinkt die Intensität des Fallenlichts, vor allem bei Auslenkungen in positive  $z$ -Richtung. Die Ursache dafür liegt in der Beschneidung des Strahls durch die Linse L1 (vgl. Abschnitt 3.2.2). Vergleicht man die Teilabb. -c und -d miteinander, fällt eine unterschiedliche Verteilung der Intensität in  $x$ - und  $y$ -Richtung auf. Auch hier ist hauptsächlich die unterschiedliche Transmission des Farbteiler DC2 für senkrecht und parallel einfallende Polarisation verantwortlich.

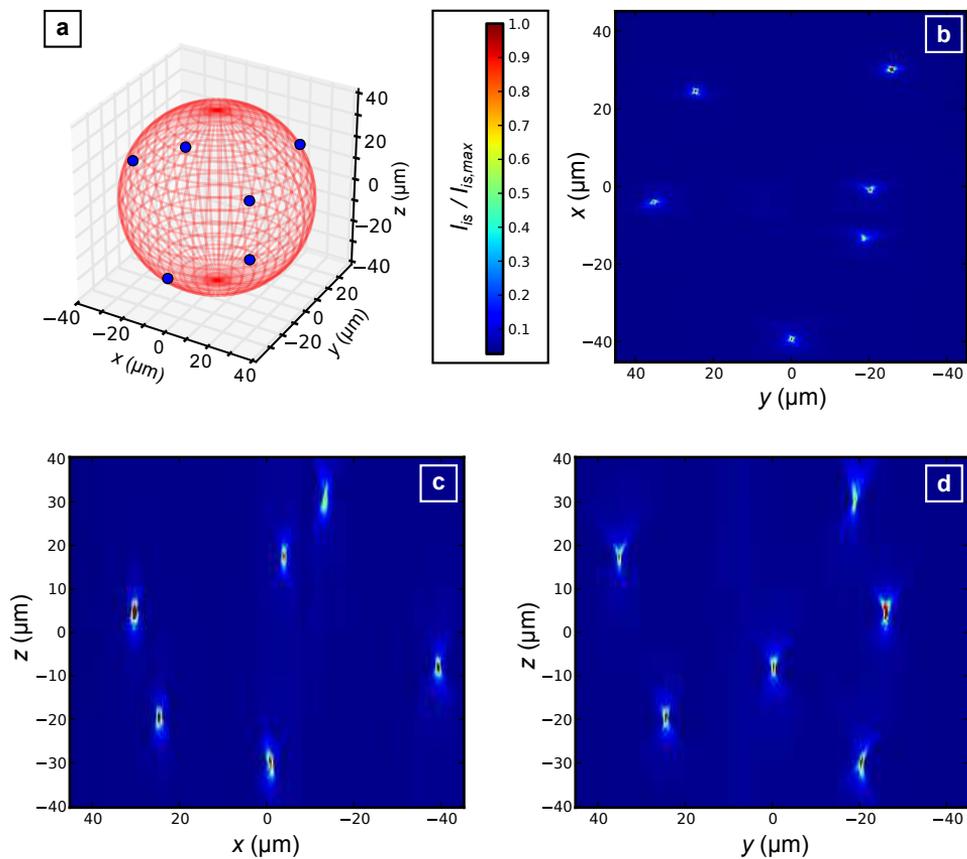
Wie in Abschnitt 3.3 erläutert, erlaubt der Versuchsaufbau, die Intensitätsverteilung und damit die Qualität einer Falle mit Hilfe eines Korrekturhologramms zu verbessern. Der Aufwand zur Ermittlung der notwendigen Zernike-Koeffizienten ist jedoch beträchtlich und liegt in der Größenordnung von Minuten. Um Unebenheiten des SLM oder eine mangelnde Justage des optischen Systems kompensieren zu können, ist nur ein einziges Korrekturhologramm notwendig. Bei sorgfältiger Justage lassen sich damit jedoch keine signifikanten Verbesserungen mehr erzielen. Anders verhält es sich mit Fallen wie z.B. jene bei  $z = 33.6 \mu\text{m}$ , die durch Linsenaperturen aberriert werden und sich mit einem entsprechenden Korrekturhologramm durchaus verbessern lassen. Leider besteht für diese Korrekturen eine Abhängigkeit von der Fallenposition. Das große Volumen,

## 5.2. Charakterisierung der holographischen optischen Fallen



**Abb. 5.2.2.:** Normierte Intensitätsverteilung  $I_{is}/I_{is,max}$  einer optischen Falle bei den Koordinaten  $\mathbf{r} = (5 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}, 30 \mu\text{m})$ . Es sind die Maximumprojektionen entlang der drei Raumachsen dargestellt. Die durchgezogene, gelbe Isolinie markiert den Wert  $1/e^2$ . Die asymmetrische Beschneidung des Laserstrahls im Verlauf des Strahlengangs führt zu leichten Aberrationen.

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D



**Abb. 5.2.3.:** Maximumprojektionen der **normierten Intensitätsverteilung**  $I_{is}/I_{is,max}$  von sechs optischen Fallen, die auf der Oberfläche einer Kugel mit Radius  $40\ \mu\text{m}$  gleichmäßig verteilt sind.

## 5.2. Charakterisierung der holographischen optischen Fallen

in dem die Fallen platziert werden können, und die damit einhergehende große Anzahl von zu ermittelnden Korrekturhologrammen, macht diese Vorgehensweise leider viel zu aufwändig.

### 5.2.2. Optische Leistung in der Probenebene

Die optische Leistung in der Probenebene  $P_{FP}$  bestimmt zum einen, welche Kraft die erzeugten optischen Fallen insgesamt ausüben können. Zum anderen ist sie ein entscheidendes Maß für die Erwärmung einer Probe und für eventuell auftretende Phototoxizität.  $P_{FP}$  hängt in erster Linie von den Einstellungen der Lasereinheit (vgl. Abschnitt 3.2.1) ab. Die dort spezifizierte Leistung  $P_{PBS2}$  wird entlang des Strahlengangs von verschiedenen optischen Elementen weiter abgeschwächt. Vor allem die Objektivlinse (OL) transmittiert lediglich  $T_{OL} = 60\%$  des Fallenlichts. Diese Abschwächungen sind jedoch alle konstant und werden von der Steuerungssoftware berücksichtigt.

Der SLM hingegen ist ein optisches Element, bei dem der Anteil der Laserleistung, die in den Strahlengang weitergeleitet wird, in Abhängigkeit der Beugungseffizienz variieren kann (siehe Abschnitt 2.3). Deshalb wurde untersucht, wie  $P_{FP}$  sowohl von der lateralen Position einer optischen Falle als auch von der Anzahl der Fallen abhängt. Dafür wurde die Leistung der Lasereinheit maximiert ( $U_{LA} = -5\text{ V}$ ,  $\phi_{LH2} = 45^\circ$ ) und die Leistung in der hinteren Brennebene (BFP) der Objektivlinse mit Hilfe eines Bolometers (BO) gemessen. Durch Multiplikation mit  $T_{OL}$  wurde anschließend  $P_{FP}$  ermittelt.

Die Abhängigkeit der optischen Leistung in der FP von der lateralen Fallenposition  $x$  ist in Abb. 5.2.4 dargestellt. Eine Falle bei  $x = 0$  wird genauso blockiert wie vom SLM ungebeugtes Licht. Es ist zu erkennen, dass die maximal erreichbare optische Leistung  $P_{FP, \max} = 0.65\text{ W}$  beträgt und bis  $x = 70\ \mu\text{m}$  auf ca.  $0.45\text{ W}$  abfällt, was einer Steigung von ungefähr  $-3\text{ mW}/\mu\text{m}$  entspricht. Man muss sich also darüber im Klaren sein, dass eine Falle mit jedem  $\mu\text{m}$  lateraler Auslenkung um ca.  $0.5\%$  schwächer wird.

Für größere Auslenkungen fällt die Leistung noch stärker ab und sinkt auf Null. Für diese Entwicklung ist die Beschneidung des Strahl durch die Linse L1 verantwortlich. Dieser Versuch wurde mit einem Linsenradius  $D_{L1} = 11\text{ mm}$  durchgeführt. Der Leistungsabfall stimmt mit den Vorhersagen überein, die in Abb. 3.2.3 zusammengefasst sind. Alle anderen Versuche in diesem Kapitel wurden mit einem Linsenradius  $D_{L1} = 15\text{ mm}$  durchgeführt. Für diese ist die Fitgerade in Abb. 5.2.4 bis zu einer Auslenkung von  $x = 90\ \mu\text{m}$  gültig.

Die Abhängigkeit der Laserleistung in der Probenebene von der Anzahl

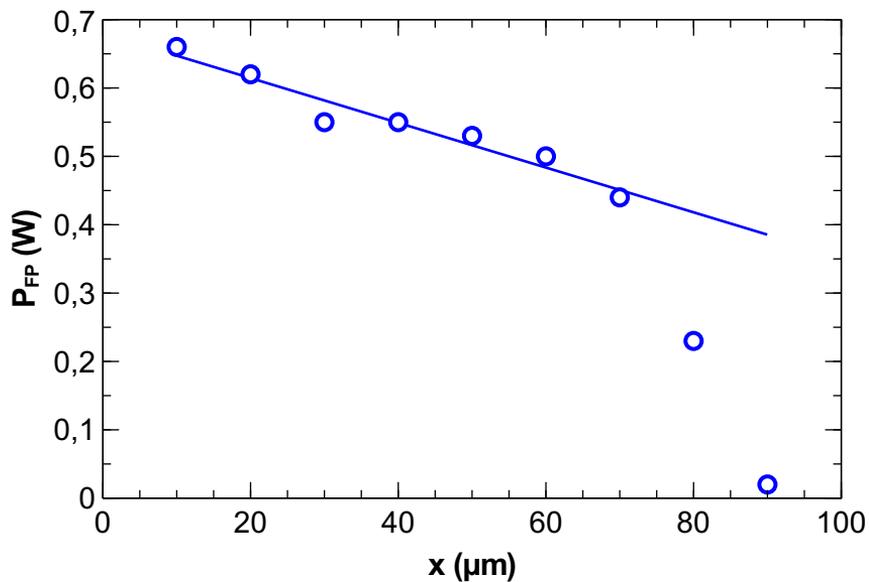


Abb. 5.2.4.: Abhängigkeit der Laserleistung in der Fokalebene der Objektivlinse  $P_{FP}$  von der lateralen Position einer Falle  $x$ .

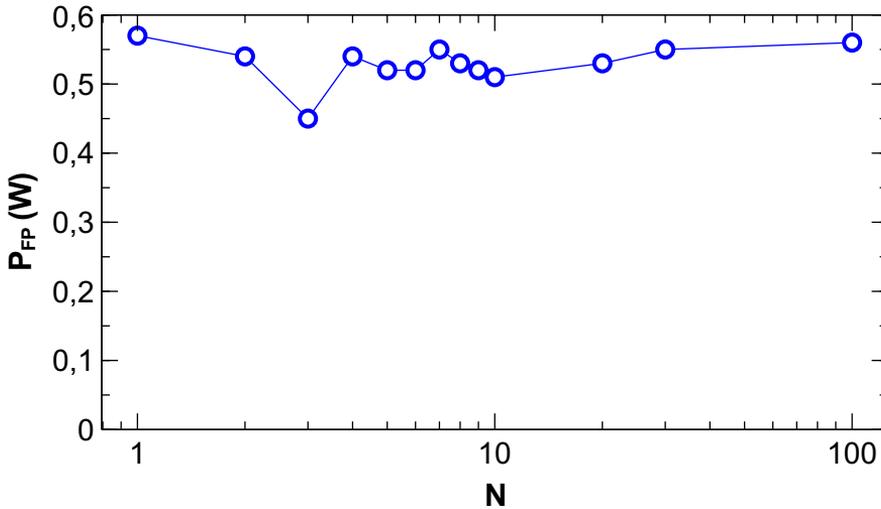


Abb. 5.2.5.: Abhängigkeit der Laserleistung in der Fokalebene  $P_{FP}$  von der Anzahl der erzeugten Fallen  $N$ .

der erzeugten Fallen  $N$  ist in Abb. 5.2.5 dargestellt. Mit Ausnahme einer Leistungsabnahme für  $N = 3$  Fallen, bewegt sich die verfügbare Laserleistung in einem Bereich von  $P_{FP} = 0.5 \dots 0.55$  W, unabhängig von der Anzahl der erzeugten Fallen.

### 5.3. Analyse der Kräfte auf Zellen

Auf Zellen oder Zellverbände wirken bei einer Untersuchung verschiedene Kräfte: Gravitationskraft bzw. Auf- oder Abtriebskraft, hydrodynamische Reibungskraft und natürlich optische Kräfte. Die *Gravitationskraft* ist in sehr vielen Fällen klein im Vergleich zu den anderen beiden Kräften. Bei großen Objekten kann zur Not die Dichte des Mediums angeglichen werden, um einen zu starken Abtrieb zu verhindern. In der Regel stellt sich die Situation so dar, dass *optische Kräfte* vor allem die *hydrodynamischen Reibungskräfte* überwinden müssen, um eine erfolgreiche Manipulation zu ermöglichen.

**Abschätzung der Reibungskräfte** Eigentlich hängt die Reibungskraft eines Objekts im Medium auch von seiner Form ab. Der Einfachheit halber werden an dieser Stelle nur kugelförmige Objekte betrachtet, also einzelne Suspensionszellen oder Zellsphäroide mit nahezu glatter Oberfläche.

Die translatorische Reibungskraft

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

$$\mathbf{F}_{\gamma\parallel} = -6\pi\eta a \mathbf{v} \quad (5.1)$$

hängt vom Objektradius  $a$  und der Geschwindigkeit der Translation  $\mathbf{v}$  ab (Dhont, 1996). Bei einer Rotation mit Winkelgeschwindigkeit  $\mathbf{v}_\perp/a$  ergibt sich ein Drehmoment von  $\mathbf{F}_\perp \cdot a = -8\pi\eta_0 a^3 \mathbf{v}_\perp/a$ , wobei  $\mathbf{v}_\perp$  die tangentielle Geschwindigkeit eines Punktes auf der Objektoberfläche repräsentiert. An diesem Punkt muss eine tangentielle Kraft

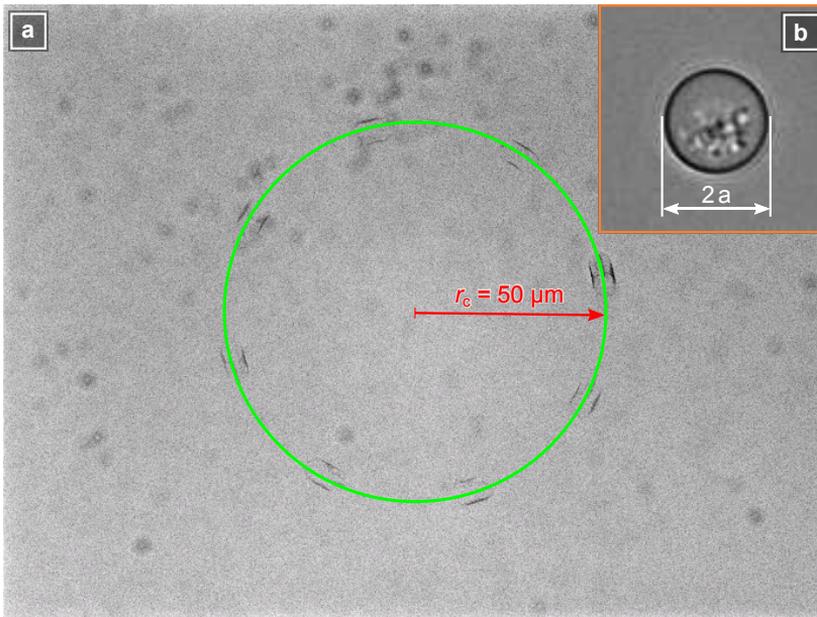
$$\mathbf{F}_{\gamma\perp} = -8\pi\eta_0 a \mathbf{v}_\perp \quad (5.2)$$

ausgeübt werden, um das Objekt in Rotation zu versetzen, wobei eine Falle mit  $v_\perp$  wandert.

**Optische Kraft versus Reibungskraft** In Abschnitt 2.1.2 wurde bereits erläutert, dass die optischen Kräfte auf ein biologisches Objekt nicht so einfach zu berechnen sind, wie beispielsweise für ein kugelförmiges, dielektrisches Partikel. Um einen Eindruck davon zu bekommen, wie groß die Gradientenkräfte sind, die auf eine Zelle ausgeübt werden können, wurde eine Versuchsreihe mit Hefezellen durchgeführt.

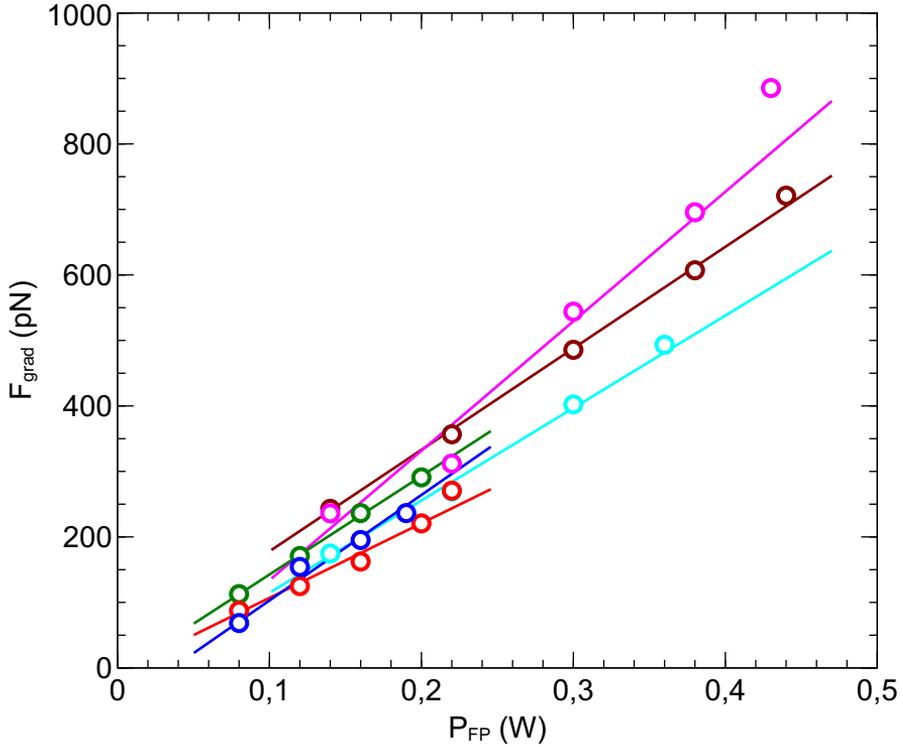
Dazu wurde eine Zelle gefangen und in  $30\ \mu\text{m}$  Höhe über dem Mikroskopie-Deckglas auf einer Kreisbahn mit Radius  $r_c = 50\ \mu\text{m}$  bewegt (siehe Abb. 5.3.1-a). Für eine bestimmte Umlauffrequenz  $\nu_c$  bewegt sich die Zelle mit einer Geschwindigkeit von  $v = 2\pi r_c \nu_c$  entlang der Kreisbahn. Das führt zu einer hydrodynamischen Reibungskraft von  $F_{\gamma\parallel}$ , die von der optischen Gradientenkraft  $F_{\text{grad}}$  übertroffen werden muss, damit die Zelle nicht aus der Falle springt. Dabei ist  $a$  der Radius der Zelle, der mit Hilfe des Durchlichtbildes (siehe Abb. 5.3.1-b) bestimmt wurde, und  $\eta_0 = 0.89\ \text{mPa}\cdot\text{s}$  die dynamische Viskosität von Wasser bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Bewegung der Falle entlang der Kreisbahn erfolgte mit Hilfe der Scanspiegeln (SM), um eine kontinuierliche Bewegung zu ermöglichen. Die Falle selbst wurde mit dem SLM an der Position  $\mathbf{r} = (10\ \mu\text{m}, 0, 0)$  erzeugt. Während des Versuchs wurde  $\nu_c$  sukzessive erhöht und sobald die Zelle aus der Falle sprang, konnte  $F_{\text{grad}}$  mit dem momentanen  $F_{\gamma\parallel}$  abgeschätzt werden. Da sich die Gradientenkraft laut Glg. 2.9 linear mit der Laserintensität verändern sollte, wurde die kritische Umlauffrequenz für jede Zelle nacheinander mit verschiedenen Laserleistungen in der Probenebene  $P_{\text{FP}}$  durchgeführt.

In Abb. 5.3.2 sind die Ergebnisse der Messreihen von insgesamt 6 Zellen abgebildet. Jeder Punkt stellt die maximale Gradientenkraft  $F_{\text{grad}}$  für eine bestimmte optische Leistung  $P_{\text{FP}}$  dar. Aus den Regressionsgeraden lässt sich der Quotient  $\frac{F_{\text{grad}}}{P_{\text{FP}}} = 1.5 \pm 0.2 \frac{\text{pN}}{\text{mW}}$  bestimmen, also die



**Abb. 5.3.1.: Ermittlung der optischen Fangkraft auf eine Hefezelle.**

Eine Zelle mit Radius  $a$  wird entlang einer Kreisbahn mit Radius  $r_c$  bewegt. Die Umlauffrequenz  $\nu_c$ , bei der die Zelle aus der Falle springt, liefert Informationen über die Reibungskraft  $F_{\gamma\parallel}$  und damit über die optische Gradientenkraft  $F_{\text{grad}}$ , die bei einer bestimmten Laserleistung erreicht werden kann.

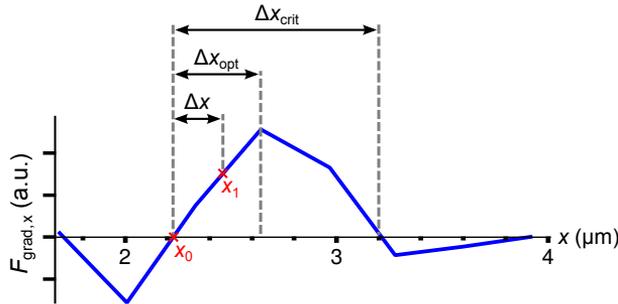


**Abb. 5.3.2.:** Optische Gradientenkraft  $F_{grad}$  auf sechs verschiedene Hefezellen bei unterschiedlichen Laserleistungen  $P_{FP}$ . Aus den Regressionsgeraden lässt sich eine Manipulationseffizienz von ca.  $1.5 \frac{pN}{mW}$  bestimmen.

Fangkraft pro Laserleistung in der Objektebene, was in gewisser Weise eine *Manipulationseffizienz* für diesen Zelltyp (Brechungsindex, Größe, Medium) in ausdrückt.

Da ein gezielter Stopp der Fallenbewegung auch einen sofortigen Stopp der Zelle nach sich zog, kann für diese Messung ausgeschlossen werden, dass die Bewegung einer Zelle eine Strömung verursachte (Trägheit des Mediums) und somit die Werte für  $F_{\gamma||}$  verfälschte.

Die Gradientenkraft auf eine Hefezelle liegt also in derselben Größenordnung, wie die Kraft auf eine Kugel aus Polystyrol oder Glas (Ashkin et al., 1986). Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass für eine Bewegung in der Probenebene vor allem die laterale Komponente der Gradientenkraft relevant ist. Die Manipulationseffizienz in axialer Richtung dürfte ungefähr um den Faktor 3 niedriger ausfallen (vgl. Abb. 2.1.1).



**Abb. 5.3.3.:** Veränderung der Gradientenkraft  $F_{\text{grad},x}$  beim diskreten Sprung  $\Delta x$  einer Falle von  $x_0$  nach  $x_1$ . Bei einer Schrittweite von  $\Delta x_{\text{opt}}$  kann die maximale Gradientenkraft ausgeübt werden. Ist die Schrittweite größer als  $\Delta x_{\text{crit}}$ , wirkt keine Kraft in die gewünschte Richtung mehr.

**Kraftausübung bei diskreten Fallenschritten** Soll eine Zelle mit dem SLM bewegt werden, erfolgt das Versetzen der Fallen gezwungenermaßen nicht kontinuierlich, sondern in diskreten Schritten. Hierbei ist es notwendig, eine Schrittweite zu wählen, die eine ausreichende Kraftausübung in die gewünschte Richtung erlaubt. Die Problematik ist in Abb. 5.3.3 dargestellt, wobei die blaue Kurve die Gradientenkraft in x-Richtung  $F_{\text{grad},x}$  beschreibt, wie sie aus dem Durchlichtbild in Abb. 2.1.3-c ermittelt wurde. Die Falle befinde sich vor besagtem Schritt  $\Delta x$  an einer Position  $x_0$ , an der sie effektiv keine Kraft in x-Richtung auf die Zelle ausübt. Nach einem Fallenschritt an die Position  $x_1$  wirkt sofort eine entsprechende Gradientenkraft in x-Richtung, solange bis sich die Zelle wieder in eine Gleichgewichtssituation bewegt hat. Die optimale Schrittweite  $\Delta x_{\text{opt}}$  führt zur Ausübung einer anfänglich maximalen Gradientenkraft. Für das abgebildete Beispiel einer Hefezelle beträgt  $\Delta x_{\text{opt}} \approx 0.25 \mu\text{m}$  und auch für die anderen Zelltypen, mit denen im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde, ist dieser Wert vergleichbar. Wird eine kritische Schrittweite  $\Delta x_{\text{crit}} \approx 1 \mu\text{m}$  überschritten, wirkt keine Kraft mehr in die gewünschte Richtung. Soll eine Zelle in mehreren Schritten bewegt werden, muss nach jedem Schritt eine ausreichende Zeit gewartet werden, damit die Zelle der Gradientenkraft auch folgen kann.

Sobald eine Falle an Position  $x_1$  bewegt wird, wirkt eine Kraft auf eine Zelle, und sofern die Zelle ihre Lage ändern kann, folgt sie dieser Kraft mit einer Geschwindigkeit, die von der bereits beschriebenen hydrodynamischen Reibung  $F_\gamma$  abhängt. Für eine möglichst effiziente Kraftausübung an einer Zelle (bei einer bestimmten verfügbaren Laserleistung) ist es offensichtlich am

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

besten, wenn eine Falle nahe  $\Delta x_{\text{opt}}$  bleibt, wobei sich  $x_0$  im Laufe der Zeit natürlich mitsamt der Zelle verschiebt. Das gelingt aus technischer Sicht umso besser, je schneller eine Falle immer wieder neu auf  $x_1$  gesetzt werden kann. Soll eine Bewegung jedoch möglichst sicher erfolgen, besteht eine sinnvolle Strategie darin, eine Falle um  $\Delta x_{\text{opt}}$  zu versetzen und vor dem nächsten Schritt ausreichend lange zu warten, bis sich ein neues Kräftegleichgewicht eingestellt hat.

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass Hefezellen eine Zellwand besitzen, die dicker als die Zellmembran ist und einen höheren Brechungsindex aufweist. Es ist anzunehmen, dass die Fangkräfte auf die anderen Zelltypen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, kleiner ausfallen.

### 5.4. Manipulation mit Streukräften

#### 5.4.1. Anheben eines großen Zellsphäroiden

Optische Streukräfte können als Mittel zur Manipulation von Objekten vor allem dann zum Einsatz kommen, wenn auf diese Objekte eine Abtriebskraft wirkt, die in derselben Größenordnung liegt. Das ist beispielsweise für einen großen Krebszellensphäroiden der Fall, wie er in Abb. 5.4.1 zu sehen ist. Bei diesem Versuch wurde als Medium normales PBS verwendet und durch die größere Dichte des Sphäroiden wirkte die Gravitation der Streukraft entgegen.

Mit den eingezeichneten 8 optischen Fallen lies sich dieser Sphäroid, der einen Durchmesser von ca.  $190\ \mu\text{m}$  hatte, mit  $P_{\text{FP}} = 415\ \text{mW}$  Laserleistung in der Probenebene stabil auf einer z-Position halten. Indem die Leistung des Fallenlasers um  $\pm 25\ \text{mW}$  erhöht bzw. verringert wurde, konnte der Sphäroid angehoben bzw. abgesenkt werden. Bei diesem Objekt handelt es sich um das größte, das mit diesem Versuchsaufbau gehalten und bewegt wurde.

#### 5.4.2. Rotation eines Zellverbandes mit gerichteten Streukräften

Es wurde bereits deutlich, dass optische Streukräfte ein Objekt lediglich entlang der Ausbreitungsrichtung eines Laserstrahls beschleunigen können. Bei einer optischen Falle besteht jedoch die Möglichkeit, die Intensität des Fallenlichts je nach Raumwinkel unterschiedlich zu verteilen. Dadurch können auf ein größeres Objekt unterschiedlich starke Kräfte in verschiedene Richtungen ausgeübt und somit ein Rotation des Objekts provoziert werden. Man kann in diesem Fall von *gerichteten Streukräften* sprechen. Die optischen Fallen wirken mit dieser Methode *nicht selektiv*.

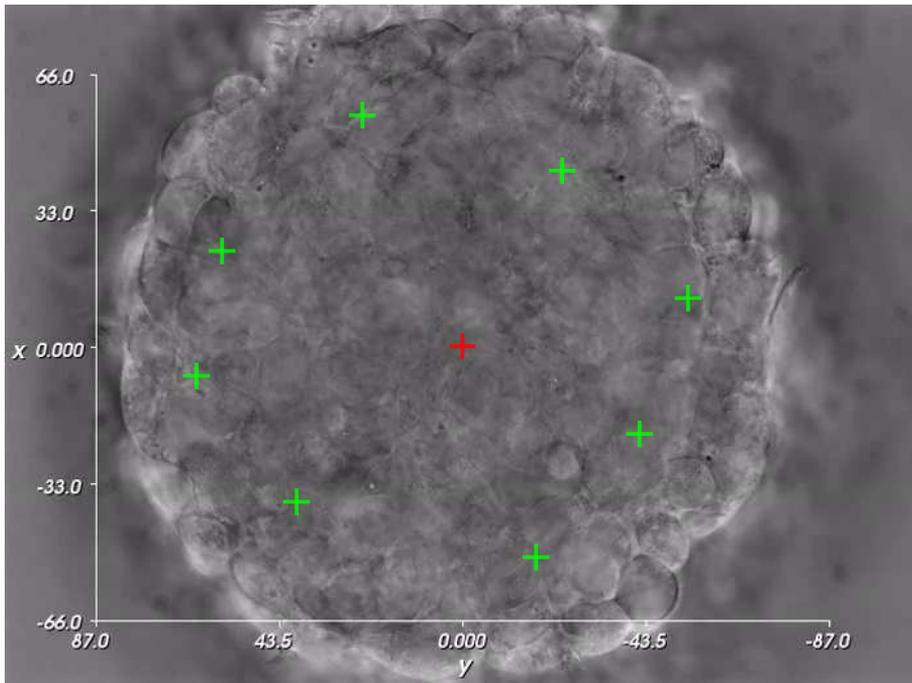
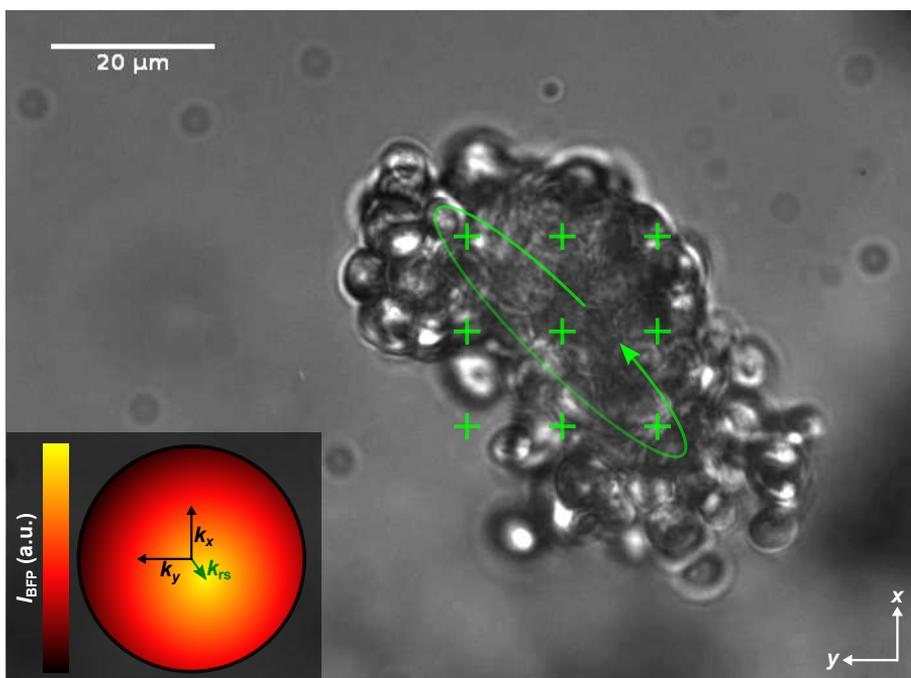


Abb. 5.4.1.: Mit Hilfe der Streukraft von 8 optischen Fallen (grüne Kreuze) angehobener Sphäroid aus Krebszellen.



**Abb. 5.4.2.: Rotation eines Zellverbandes mit Hilfe von gerichteten Streukräften.** Durch Unterschiede in der Laserintensität für verschiedene Raumwinkel jeder der neun optischen Fallen (grüne Kreuze) wirkt ein Drehmoment auf den Zellverband. Die Gradientenkräfte erzwingen die Beibehaltung der lateralen Position. Die Ausrichtung der Streukräfte erfolgt über eine **asymmetrische Ausleuchtung der BFP** der Objektivlinse (Teilabb. links unten).

Ein entsprechender Versuch mit einem Verband aus Hefezellen ist in Abb. 5.4.2 dargestellt. Der Zellverband hatte eine Größe von ca.  $35\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$ , die Probenkammer aus Abschnitt 3.4 war mit Reinstwasser gefüllt. Neun optische Fallen wurden auf einem Gitter mit Abstand  $15\ \mu\text{m}$  angeordnet und ihre Positionen während des gesamten Versuchs nicht geändert.

Die gerichteten Streukräfte wurden erzeugt, indem der Strahlverlauf des Fallenlasers so verändert wurde, dass die BFP der Objektivlinse nicht konzentrisch ausgeleuchtet wurde, sondern das Maximum der Intensität  $I_{\text{BFP}}$  um einen Vektor  $\mathbf{k}_{rs}$  zur optischen Achse verschoben war (siehe Teilabb. unten links). Dadurch wurden in Richtung der entsprechenden Raumwinkel höhere Streukräfte generiert und auf den Zellhaufen wirkte ein Drehmoment in der

Richtung, die in Abb. 5.4.2 durch den grünen Pfeil angedeutet wird.

Die Gradientenkräfte der einzelnen Fallen werden durch die asymmetrische Ausleuchtung der BFP zwar anisotrop, sie sind aber offensichtlich groß genug, um ein Objekt – translatorisch gesehen – auf einer Position zu halten. Im beschriebenen Versuch konnte der Zellverband während der Rotation mit Hilfe des Piezotischs vom Boden der Kammer angehoben, um mehr als Hundert Mikrometer zur Seite bewegt und wieder abgesetzt werden.

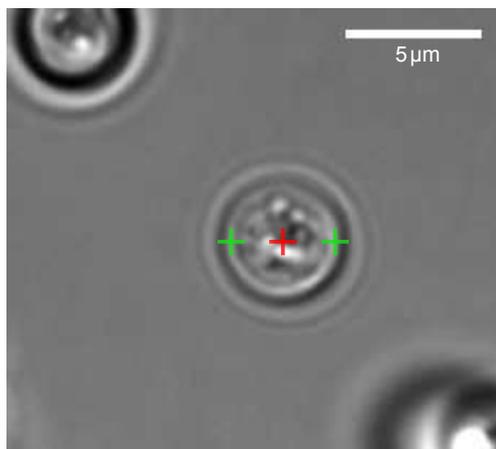
Die Verschiebung des Intensitätsmaximums in der BFP lässt sich ebenso mit Hilfe des SLM realisieren und kann somit als eine Methode des Manipulators implementiert werden. Gerichtete Streukräfte lassen sich gut verwenden, um ein Objekt schnell mit relativ wenig Laserleistung zu rotieren. Für die exakte Positionierung eines Objekts ist diese Methode aber zu unpräzise.

## 5.5. Manipulation mit Gradientenkräften

### 5.5.1. Rotation einzelner Zellen

**Rotation einer kugelförmigen Hefezelle** Die Rotation einer kugelförmigen Zelle ist aus Sicht ihrer Größe (Durchmesser 5–10  $\mu\text{m}$ ) keine besondere Herausforderung. So wurde bereits gezeigt, dass Kugeln aus Glas oder Latex mit Hilfe des Drehimpulses einer optischen Falle rotiert werden können, indem einem Laserstrahl mit Hilfe eines SLM eine helikale Wellenfront in der BFP aufgeprägt wurde (Paterson et al., 2001). Mit dieser Technik lässt sich aber lediglich eine Rotation parallel zur Bildebene ausführen.

Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Versuch durchgeführt, bei dem eine Hefezelle mit zwei optischen Fallen und den von ihnen verursachten Gradientenkräften senkrecht zur Bildebene rotiert wurde. Wie in Abb. 5.5.1 zu sehen ist, ist die Kraftübertragung am wirkungsvollsten, wenn die beiden optischen Fallen nicht genau auf der Zellmembran (bzw. Zellwand) platziert werden, sondern an der Innenseite der Zellmembran. Die Erklärung hierfür lässt sich mit Blick auf Abschnitt 2.1.2 nachvollziehen. Die Gradientenkraft wirkt nur in Richtung eines Brechungsindexunterschieds  $\Delta n$ . Da sich die Fallen exakt auf der Oberfläche einer Kugel bewegen, kann die Membran selbst nur wenig zur Entstehung einer Gradientenkraft beitragen. Vielmehr scheinen Bestandteile der Zelle wie das Zellskelett oder andere membrangebundene Strukturen die notwendige Variation des Brechungsindex aufzuweisen. Die hier abgebildete Zelle konnte bei einer Laserleistung von  $2 \times 50 \text{ mW}$  in der Probenebene mit einer Frequenz von 1.25 Hz rotiert werden, wobei eine volle Umdrehung mit lediglich vorberechneten 12 Fallenpositionen und einer Verweildauer von 0.07s an jeder Position ausreichte. Anhand



**Abb. 5.5.1.: Rotation einer kugelförmigen Hefezelle mit zwei optischen Fallen (grüne Kreuze) senkrecht zur Bildebene.** Da die Zellmembran selbst keine optimalen Angriffspunkte für eine Rotation bietet, wird hier an der Innenseite der Membran angegriffen.

der hydrodynamischen Reibungskraft aus Glg. 5.2 müssen die optischen Gradientenkräfte an jeder Stelle der Kreisbahn größer als  $F_{\gamma\perp} = 10.7 \text{ pN}$  gewesen sein.

Eine wichtige Erkenntnis besteht darin, dass die Fallen in dieser Situation nicht unbedingt immer an den gleichen Stellen angreifen. Bewegen sich die Fallen auf ihrer Kreisbahn schneller als die Zelle rotieren kann, wirkt dennoch eine effektive Kraft in Rotationsrichtung. Die Zelle kann also sowohl selektiv als auch nicht selektiv rotiert werden.

Das Verfahren ist dazu geeignet, eine Zelle schnell aus verschiedenen Richtungen mit hoher optischer Auflösung zu betrachten. Eine Kombination mit dem optischen Sortierverfahren aus Kap. 4 ist aus technischer Sicht möglich.

**Rotation einer sich teilenden B-Zelle** In Abb. 5.5.2 ist ein Versuch dargestellt, bei dem eine B-Zelle senkrecht zur Bildebene rotiert wurde, die sich gerade in einem späten Stadium der Zellteilung befand. Die Zelle hat in dieser Konfiguration eine eindeutige Längsachse, wodurch es möglich wird, sie mit zwei optischen Fallen direkt an ihrer Membran anzugreifen, da der Verlauf der Membran nicht mit den Fallentrajektorien deckungsgleich sind. Dadurch finden beide Fallen relativ stabile Angriffspunkte und eine sehr

sichere Drehung der Zelle – immer an denselben Angriffspunkten – wird möglich.

Die Bilderfolge zeigt eine Drehung um  $180^\circ$ , die während einer Zeitspanne von 2.2s durchgeführt wurde. Die Rotationsachse war um  $11.4^\circ$  gegenüber der optischen Achse verkippt. Die Lage der Zelle im Raum lässt sich nicht nur durch ihre Form, sondern auch durch die beiden mit Pfeilen markierten Zellorganellen nachvollziehen. Die grünen Kreuze markieren die Position der optischen Fallen, wobei sich eine Falle mit einem großen Kreuz näher an der Detektionslinse befindet als das Rotationszentrum (rotes Kreuz bei  $z = 0$ ) als die mit einem kleinen Kreuz.

### 5.5.2. Rotation von Zellverbänden

Aus dem Versuch im vorangegangenen Abschnitt wurde klar, dass es für das selektive Greifen mit optischen Fallen hilfreich ist, eine Stelle mit großem Brechungsindexgradienten zu greifen, so wie es typischerweise bei einer Zellmembran der Fall ist. Bei größeren Verbänden aus vielen Zellen mangelt es daher nicht an geeigneten Angriffspunkten. Da bei größeren Objekten aber auch größere Reibungskräfte überwunden werden müssen, ist das stabile Halten und das exakte Rotieren eines Zellverbandes keine selbstverständliche Aufgabe.

Es ist relativ offensichtlich, dass eine Bewegung parallel zur Bildebene aufgrund der größeren lateralen Gradientenkräfte einfacher zu bewerkstelligen ist als eine Bewegung senkrecht zur Bildebene.

**Rotation parallel zur Bildebene** Zunächst wurde in einem Versuch die Rotation eines größeren Objektes parallel zur Bildebene durchgeführt, so wie in Abb. 5.5.3 dargestellt. Als Testobjekt diente hier ein Verband aus RH-30-Zellen mit einem Durchmesser von ca.  $150\ \mu\text{m}$ , der nach der Methode der hängenden Tropfen aus Abschnitt 3.5 hergestellt wurde.

Die Rotation wurde mit Hilfe von vier optischen Fallen durchgeführt, die in der Bilderfolge durch grüne Kreuze repräsentiert werden. Sie bewegten sich entlang konzentrischer Kreisbahnen um ein gemeinsames Rotationszentrum. Während der abgebildeten 430s wurde der Zellverband exakt um  $180^\circ$  gedreht. Die Positionen der Fallen sind in jedem Bild markiert, wodurch deutlich zu erkennen ist, dass die Fallen selektiv – jede an einer festen Stelle – angreifen.

Der Zellverband konnte ohne Weiteres um beliebige Winkel (also deutlich mehr als  $180^\circ$ ) gedreht werden und auch bei einer Umkehrung der Rotationsrichtung änderten sich die Angriffspunkte der Fallen nicht. Eine

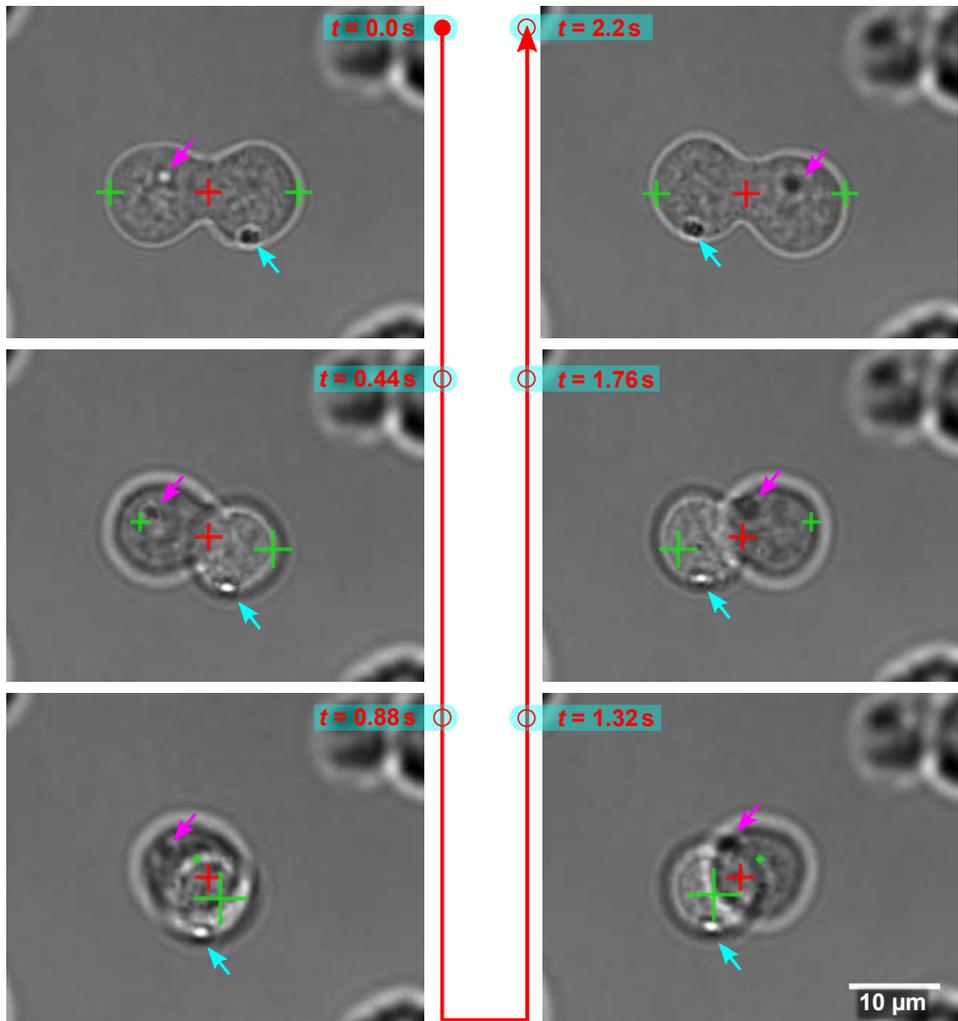


Abb. 5.5.2.: Rotation einer sich teilenden B-Zelle mit zwei optischen Fallen (grüne Kreuze) senkrecht zur Bildebene. Je kleiner die  $z$ -Koordinate einer Falle ist, d. h. je näher sie der Detektionslinse ist, desto größer ist ihr Kreuz. Das Rotationszentrum (rot) liegt bei  $z = 0$ . Zwei charakteristische Zellorganellen sind mit Pfeilen markiert.

## 5.5. Manipulation mit Gradientenkräften

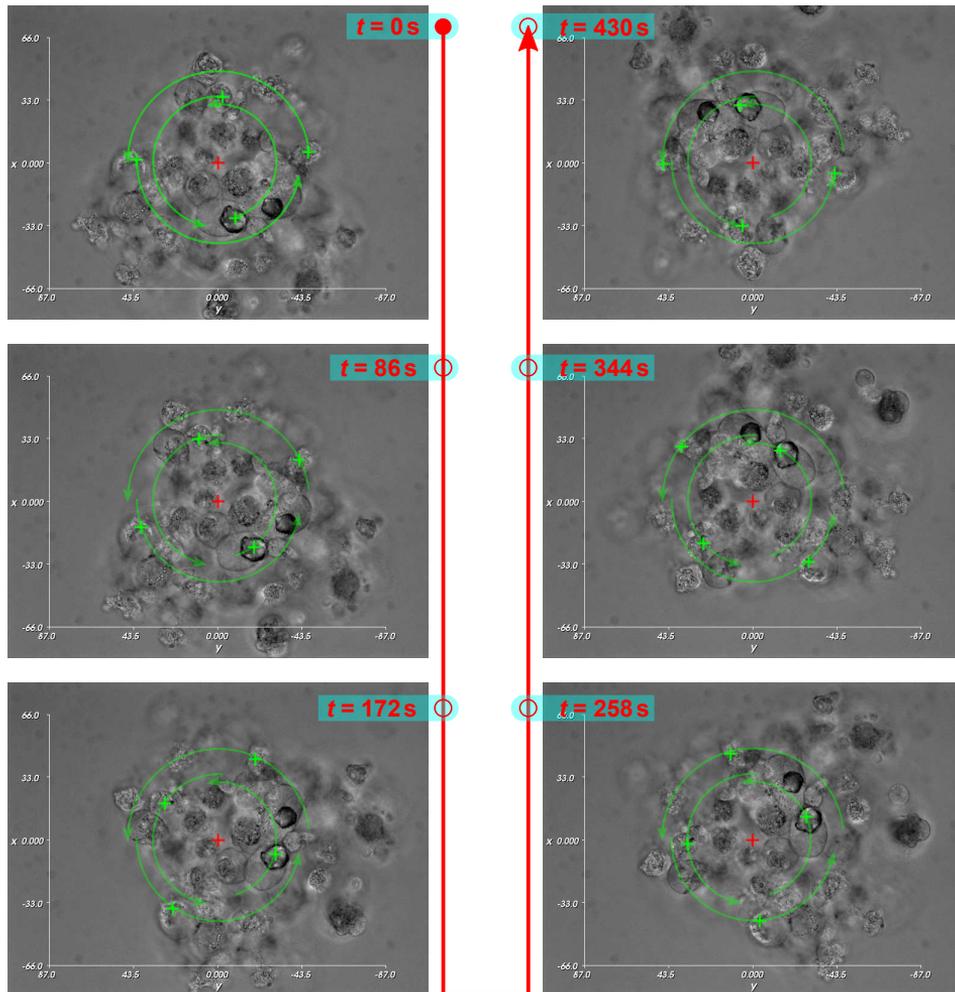


Abb. 5.5.3.: Rotation eines RH-30-Zellverbandes mit vier optischen Fallen um  $180^\circ$  parallel zur Bildebene. Die Fallen greifen immer an den gleichen Stellen des Zellverbandes an.

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

Rotation konnte ohne Probleme auch mit drei oder mehr als vier Fallen durchgeführt werden.

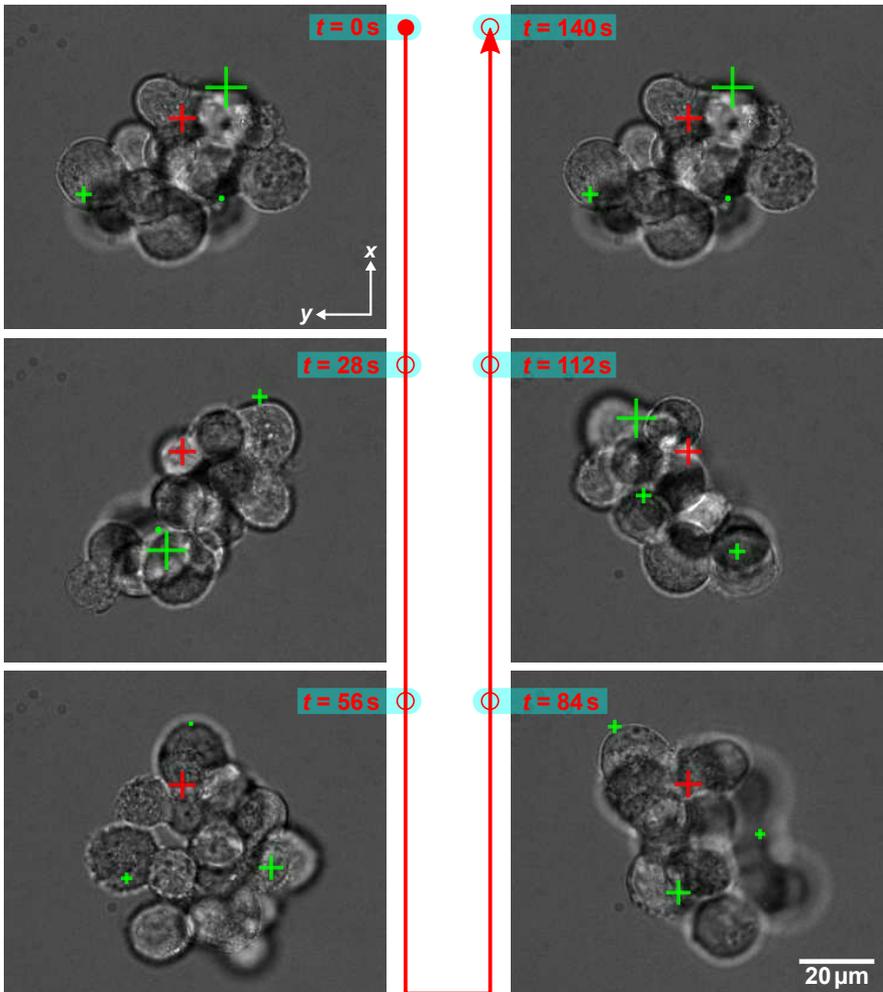
Da die extrazelluläre Matrix dieses Zellverbandes im Vergleich mit dem Krebszellensphäroid aus Abb. 5.4.1 nur schwach ausgebildet war, waren während des Versuchs leichte morphologische Veränderungen zu beobachten. Eine leichte Verschiebung der Positionen der einzelnen Zellen zueinander, erleichtert die Ausbildung eines Kräftegleichgewichts und damit auch eine stabile Lage des Zellverbandes.

An dieser Stelle sollte ein genereller Zusammenhang zwischen der Anzahl der optischen Fallen und der Lagestabilität eines mit selektiven Fallen gehaltenen Objekts verdeutlicht werden: Vergegenwärtigt man sich noch einmal das Kraftprofil *einer* Falle (z.B. wie in Abb. 5.3.3) wird klar, dass die Überlagerung *mehrerer* solcher Profile zur Ausbildung lokaler Kraftminima und -maxima kommt und es vermehrt Stellen gibt, an denen ein Kräftegleichgewicht entsteht. Das bedeutet, dass es beim Einsatz vieler Fallen durchaus wahrscheinlich ist, dass ein Zellverband eine stabile Lage einnimmt, für die nur eine kleine Positionsänderung im Raum nötig ist. Allerdings ist gleichzeitig davon auszugehen, dass eine Lage umso stabiler ist, je weniger Fallen beteiligt sind, da das Kraftprofil dann über eine größere Distanz monoton verläuft.

**Rotation senkrecht zur Bildebene** Zur Demonstration der Rotation eines Zellverbandes senkrecht zur Bildebene wurde erneut ein Verband aus RH-30-Zellen verwendet, dieses Mal mit einem Durchmesser von ca. 80  $\mu\text{m}$  (siehe Abb. 5.5.4). Er wurde etwas länger in Kultur gehalten, seine extrazelluläre Matrix war daher besser ausgebildet und er wies während des Versuchs keine sichtbare Deformation auf.

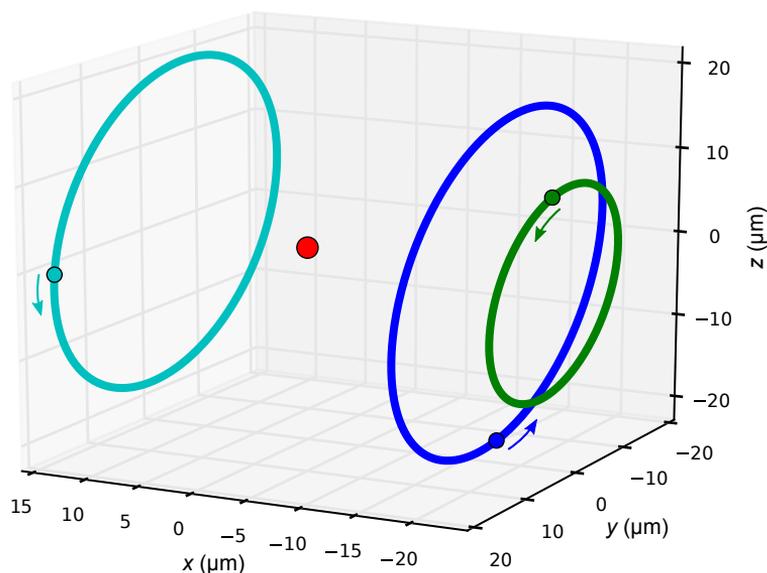
Die notwendigen optischen Gradientenkräfte wurden mittels drei Fallen ausgeübt (grüne Kreuze), um eine möglichst eindeutige und stabile Lage des Zellverbandes zu erzwingen. Die Fallen wurden nacheinander manuell in der Bildebene jeweils an eine (scharf sichtbare) Zellmembran am Rand des Verbandes gesetzt und anschließend um ca. 90° rotiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Fallen nicht alle in einer Ebene lagen und zumindest initial einen relativ guten Angriffspunkt hatten.

Die Fallentrajektorien, die sich aus den initialen Angriffspunkten ergaben, sind in Abb. 5.5.5 dreidimensional dargestellt. Die Anzahl der Schritte für eine komplette Umdrehung wurde so gewählt, dass kein Fallenschritt weiter als 200 nm reicht. Die Rotationsachse verlief durch den Koordinatenursprung (roter Punkt) und war um 5.7° zur x-Achse verkippt. Diese leichte Verkipfung



**Abb. 5.5.4.:** Rotation eines RH-30-Zellverbandes senkrecht zur Bildebene. Die optischen Fallen (grüne Kreuze) greifen während der gesamten Drehung um  $360^\circ$  immer an der gleichen Stelle an. Nach 140s befindet sich der Zellverband wieder in exakt der gleichen Lage wie bei  $t = 0$ . Die Rotationsachse verläuft durch den Ursprung des Koordinatensystems (rotes Kreuz) und ist um  $5.7^\circ$  zur x-Achse verkippt. Auch hier ist die z-Position einer Fallen durch die Größe ihres Kreuzes kodiert.

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D



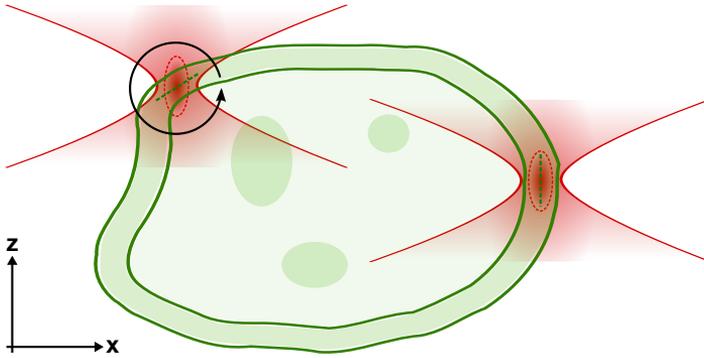
**Abb. 5.5.5.:** Dreidimensionale Darstellung der Fallentrajektorien (3 Fällen) für die Rotation des Zellverbandes in Abb. 5.5.4 senkrecht zur Bildebene. Die Startkoordinaten sind auf den Trajektorien durch Punkte gekennzeichnet, der Ursprung des Koordinatensystems (in diesem Fall der Fokuspunkt der Objektivlinse) durch einen roten Punkt.

hat sich in einigen Situationen, in denen zwei Fallen übereinander positioniert waren, als etwas stabiler herausgestellt.

Betrachtet man die Durchlichtbilder aus Abb. 5.5.4 im zeitlichen Verlauf, erkennt man, dass nach 140 s eine vollständige Rotation um  $360^\circ$  vollendet wurde. Sowohl die optischen Fallen als auch der Zellverband befanden sich dann in exakt der gleichen Position wie zum Zeitpunkt  $t = 0$ . *Eine präzise Kontrolle der Lage des Zellverbandes im Raum ist möglich.* Allerdings war bei dem dargestellten Versuch auch zu beobachten, dass die rotatorische Bewegung zwischendurch ruckartig stockte, dann aber immer wieder in die gewünschte Lage zurückkehrte und der Bewegung der Fallen weiter folgte.

Diese Instabilität für manche Fallenpositionen ist bei Rotationen senkrecht zur Bildebene viel stärker ausgeprägt, als bei Rotationen parallel zur Bildebene. Dafür sind vor allem zwei Ursachen zu nennen:

(i) Selbst wenn die Fallen immer am gleichen Angriffspunkt angreifen, ändert sich mit fortschreitender Rotation fortlaufend jener Teil des Zellverbandes, der vom Fallenlaser durchdrungen wird. Damit treten auch



**Abb. 5.5.6.:** Optisches Drehmoment verursacht durch die unterschiedliche Orientierung von Falle (rot) und Zellmembran (grün). Bei der rechten Falle füllt die Membran das längliche Fallenvolumen relativ gleichmäßig aus, was lediglich zu translatorischen optischen Kräften führt. Bei der linken Falle hingegen kommt es zu einem optischen Drehmoment, das leicht zu einer instabilen Situation führen kann.

immer unterschiedliche Streukräfte für jede einzelne Falle auf, wodurch ein Kräftegleichgewicht leicht leicht in ein -ungleichgewicht wechseln kann.

(ii) Wie bereits erwähnt, hat der Fallenfokus – und damit das Volumen, in dem eine Gradientenkraft erzeugt wird – eine zigarrenförmige Ausdehnung entlang der z-Achse. Das führt dazu, dass auf ein in z-Richtung ausgedehntes Objekt größere Kräfte wirken, als auf ein in lateraler Richtung ausgedehntes (vgl. Sortierung von *Bacillus subtilis*, Abschnitt 4.5). Die Implikationen für die Rotation eines Zellverbandes sind in Abb. 5.5.6 dargestellt. In dieser Schemazeichnung greifen beide Fallen an der Membran einer Zelle an. Bei der rechten Falle ist die Membran entlang der optischen Achse orientiert (gestichelte grüne Linie) und damit kollinear zum ellipsoiden Fallenvolumen (rote Ellipse). Das ist die energetisch günstigste Situation. Bei der linken Falle ist die Membran hingegen zur Falle verkippt. Zusätzlich zu den translatorischen Gradientenkräften, wirkt bei dieser Falle noch ein *optisches Drehmoment*, das eine weitere Last auf die anderen Angriffspunkte ausübt. Wirkt das Drehmoment wie im Beispiel durch den schwarzen Pfeil angedeutet, wirkt am Angriffspunkt der rechten Falle zusätzlich zur Streukraft eine weitere destabilisierende Komponente der Gradientenkraft entgegen.

Eine sichere und präzise Rotation, so wie in Abb. 5.5.4 gezeigt, war nur in einem Teil der unternommenen Versuche mit Verbänden aus RH-30- oder Hefezellen möglich. In den meisten Fällen führte ein „Abrutschen“ eines

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

Angriffspunktes aus der entsprechenden Falle dazu, dass ein Zellverband seine Lage stark und unvorhersehbar änderte, wobei die Falle unter Umständen auch völlig den Kontakt verlor und manuell neu gesetzt werden musste. Es ist ganz offensichtlich von großer Bedeutung, dass sich die jeweiligen Angriffspunkte auch unter schwankenden Bedingungen nicht zu weit von den Fallenzentren entfernen (vgl.  $\Delta x_{\text{crit}}$  aus Abschnitt 5.3).

### 5.6. Diskussion

**Effektivität der optischen Objekt-Rotation** Der optische Manipulator ist in der dargestellten Konfiguration in der Lage, biologische Objekte verschiedener Größen zu versetzen und zu rotieren. Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, reicht das Spektrum dabei von einzelnen, kugelrunden Zellen bis hin zu Zellsphäroiden mit einem Durchmesser von  $190\ \mu\text{m}$ . Die Rotation mit Gradientenkräften, die für eine präzise Orientierung (z. B. als Vorbereitung einer mikroskopischen Aufnahme) am besten geeignet sind, ist für Objekte bis zu einem Durchmesser von ca.  $100\ \mu\text{m}$  möglich.

Die Rotation von Objekten größer als  $100\ \mu\text{m}$  scheitert nicht unbedingt daran, dass die optischen Gradientenkräfte zu klein wären. Es ist vielmehr so, dass durch den begrenzten Aktionsbereich der Fallen größere Objekte nicht mehr am Rand sondern weiter in der Mitte angegriffen werden müssen. Dadurch verschlechtert sich das Verhältnis von Gradienten- zu Streukräften und damit auch die Fangkraft der einzelnen Fallen. Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, lässt sich durch den Einsatz größerer Linsen die maximale Auslenkung der Fallen vergrößern, wodurch die Rotation von Objekten bis  $200\ \mu\text{m}$  Durchmesser möglich werden sollte.

Das größte Problem bei der Rotation von Objekten (auch solchen bis  $100\ \mu\text{m}$  Durchmesser) sind die starken Schwankungen der optischen Kräfte, die auf das Objekt wirken. Im Gegensatz zur erfolgreichen und präzisen Rotation in Abb. 5.5.4 hat sich bei vielen Versuchen gezeigt, dass bereits ein kleiner relativer Abstand einer Falle zu einem Angriffspunkt zu einer großen Änderung der Kräfte und damit zur Dominanz einer Falle über eine andere führen kann. Das zusätzliche Auftreten von optischen Drehmomenten (vgl. Abb. 5.5.6) kommt erschwerend hinzu. In Abschnitt 7.2 wird eine mögliche Lösung dieses Problems präsentiert, bei der fortlaufend die Effektivität jeder einzelnen Falle überprüft wird und die Fallenpositionen dementsprechend korrigiert werden.

Die Versuche bezüglich der Rotation eines Zellverbandes senkrecht zur Bildebene (Abb. 5.5.4) zeigen, dass in Fällen, in denen eine möglichst präzise

Manipulation angestrebt wird, es günstiger ist, mit möglichst wenigen Fallen zu arbeiten – für eine stabile Raumlage also drei. Das Kraftprofil über das ganze Objekt hat so die ausgeprägtesten Extrema. Um für ein großes Objekt aber die notwendigen Gesamtkräfte aufzubringen, ist eine gewisse Mindestintensität der Laserleistung notwendig. Es stellt sich nun die Frage, wann die Laserstrahlung für einen Zellverband schädlich wird und ab welcher Intensität pro Falle es besser ist, eine weitere Falle hinzuzufügen.

**Schädigung durch Strahlung des Fallenlasers** Das entscheidende Kriterium hierfür ist, ab welcher Laserleistung  $P_{FP}$  pro Falle ein biologisches Objekt geschädigt wird. In der Fachliteratur gibt es hierzu Untersuchungen, die aber nicht unbedingt zum gleichen Ergebnis kommen. Eine wertvolle Analyse erfolgte durch [Neuman et al. \(1999\)](#), in der der Schaden, ausgelöst durch die infrarote Strahlung optischer Fallen, an Bakterien untersucht wurde. Das Ergebnis ist ein eindeutiger und linearer Zusammenhang zwischen Intensität und Vitalität der Bakterien, wobei das Vorhandensein von Sauerstoff eine notwendige Bedingung für diese Form der Phototoxizität ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen [Tinevez et al. \(2012\)](#) in einer jüngeren Studie, wobei hier unter Bedingungen von Weitfeld-Epifluoreszenz-Mikroskopie gearbeitet wurde. Als weitere Erkenntnis fällt die Tatsache an, dass bei gleicher Gesamtdosis der Strahlung hohe Spitzenintensitäten schädlicher sind, was auf einen nichtlinearen Effekt für Phototoxizität spricht. Dem widersprechen die Aussagen von [Schneckenburger et al. \(2012\)](#), die die Gesamtdosis der Strahlung, also das zeitliche Integral über die Intensität, als entscheidenden Faktor ausgemacht haben.

Ergänzend dazu gibt es Untersuchungen über den Schaden an biologischen Objekten, die allein durch die lokale Erwärmung verursacht werden. [Wetzel et al. \(2011\)](#) beschreiben für den bereits erwähnten, mit IR-Licht arbeitenden *optischen Strecker*, dass *E. coli* eine „thermischen Schock“ von 48 °C 5 s lang aushalten können. Dieselbe Gruppe hatte zuvor ein interessantes Verfahren vorgestellt, wie die lokale Erwärmung durch eine optische Falle ermittelt werden kann ([Ebert et al., 2007](#)). Unabhängig davon ob ein Organismus durch die optischen Fallen geschädigt wird, sollte auch immer bedacht werden, dass sich auch zellinterne Vorgänge durch Temperaturänderungen beschleunigt oder verlangsamt werden können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich die mechanischen Eigenschaften und die Geschwindigkeit des Umbaus des Cytoskeletts in Abhängigkeit der Temperatur ändern ([Kießling et al., 2013](#)).

Aufgrund der Diversität der aufgeführten Vorarbeiten erscheint es

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

notwendig, die Schädigung von biologischen Objekten, die über einen längeren Zeitraum von mehreren optischen Fallen gehalten werden, ausführlich zu untersuchen. Hierbei sollten zunächst Verfahren genutzt werden, die ohne potentiell schädliche Farbstoffe auskommen. Denn erstens sollte bei einer Bewertung des Manipulators der zukünftigen Entwicklung neuer, schonender Farbstoffe nicht vorgegriffen werden, und zweitens sind auch einige Szenarien denkbar, bei denen der Manipulator völlig ohne Farbstoffe zum Einsatz kommt.

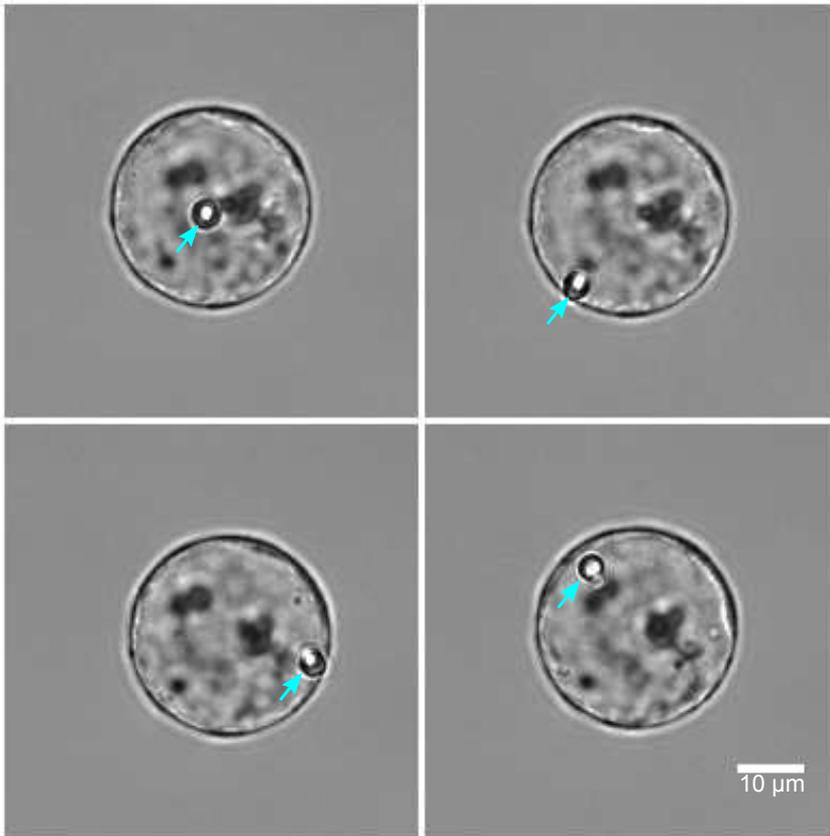
**Geeignete Untersuchungsobjekte** Mit Hilfe des vorgestellten optischen Manipulators sind Untersuchungen an zahlreichen biologischen Objekten vorstellbar. An dieser Stelle sollen einige genannt werden, die für den aktuellen Stand des Versuchsaufbaus im Besonderen geeignet scheinen.

Auf Grund des limitierenden Aktionsradius der Fallen bieten sich Objekte mit einem Durchmesser zwischen 40 und 100  $\mu\text{m}$  besonders an. Die Leistung des Lasers reicht definitiv aus, um alle beschriebenen Manipulationstechniken anzuwenden. Neben den bereits beschriebenen *Verbänden aus Krebszellen* bieten sich beispielsweise auch *Oozyten* (Eizellen) von Säugetieren oder *kleine Embryonen* an.

Ohne weiteren Umbau kann zur Beobachtung ein Filtersatz, beispielsweise zur Fluoreszenzmikroskopie von GFP, verwendet werden. Alternativ sind auch autofluoreszente Organismen reizvoll, z.B. pflanzliche Objekte, die Chloroplasten enthalten. Anhand von *Protoplasten* der Wurzeln von Tabak oder Arabidopsis konnten erste Test zur mechanischen Stimulation durchgeführt werden (siehe Abb. 5.6.1).

**Vergleich mit anderen Manipulationsverfahren** Obwohl in vielen Publikationen von optischer Manipulation die Rede ist, so handelt es sich doch in den meisten Fällen nicht um die Art von Manipulation, wie sie in diesem Kapitel definiert wurde – also um Translation und Rotation in drei Dimensionen. Stellvertretend soll kurz mit einigen gut zitierten Publikationen verglichen werden, die „optische Manipulation“ im Titel tragen.

Beispielsweise berichtete schon Ashkin von „innerzellulärer Manipulation“ (Ashkin und Dziedzic, 1989), in dieser Arbeit würde es eher zweidimensionale Translation oder Zell-Stimulation genannt werden. MacDonald et al. (2002) führten eher eine Assemblierung von Beads in 3D durch und Chiou et al. (2005) gruppierten Zellen auf einer zweidimensionalen Fläche. Zwischen dem hier vorgestellten Manipulator und dem bereits erwähnten von Tanaka et al. (2008) bestehen zumindest ansatzweise Gemeinsamkeiten, da bei letzterem



**Abb. 5.6.1.: Mechanische Stimulation eines Pflanzenprotoplasten.**  
Die markierte Zellorganelle wird mit einer optischen Falle ausgelenkt. Nachdem die Falle abgeschaltet wurde, wird die Organelle immer wieder in die Mitte der Zelle gezogen.

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

ca. 20  $\mu\text{m}$  große biologische Objekte rotiert wurden und Angriffspunkte automatisch durch Bildverarbeitung bestimmt wurden. Allerdings macht die Beschränkung auf Rotation parallel zur Bildebene deren Verfahren deutlich einfacher. Erwähnt werden sollte auch der Ansatz von [Rodrigo et al. \(2005\)](#). Dabei wird die Methode des generalisierten Phasenkontrasts (generalized phase contrast, GPC) verwendet, um einzelne Beads in drei Dimensionen zueinander zu positionieren. Sie erlaubt es, Fallen in einem großen Volumen zu platzieren. Allerdings können bei den notwendigen optischen Systemen hohe Raumfrequenzen nicht übertragen werden, wodurch die erzeugten optischen Fallen eine viel schlechtere Qualität aufweisen. Deshalb konnte bisher auch nur die Translation von einfachen Objekten wie Beads und einzelnen Zellen gezeigt werden.

In der jüngeren Vergangenheit wurden zwei Verfahren publiziert, die als Alternative betrachtet werden können. [Torres-Mapa et al. \(2011\)](#) zeigten, wie Blastomere der Spezies *Pomatoceros lamarckii* bestehend aus 4 Zellen und mit einem Durchmesser von ca. 60  $\mu\text{m}$  mit Hilfe einer optischen Falle gehalten werden können. Die Fallenerzeugung und die optische Abbildung erfolgten über ein 20x-Objektiv mit NA 0.5, was zwar einerseits große Fallenauslenkungen erleichtert, aber andererseits die Auflösung begrenzt. Es konnte zwar eine Rotation beobachtet werden, allerdings erfolgte diese zufällig und war durch Inhomogenitäten des Brechungsindex bedingt. Die Fähigkeiten mit Blick auf die 3D-Manipulation sind also begrenzt. Interessanter ist die Möglichkeit, externe Moleküle durch Optoinjektion ins Innere des Blastomers zu schleusen. Dafür wurde der Fallenlaser in einen gepulsten Modus umgeschaltet. Die Fähigkeit der Zellen zur Teilung blieb erhalten, auch wenn sie mit 175 mW Laserleistung in der Fokalebene für 10 min gefangen waren.

Das wahrscheinlich am weitesten entwickelte alternative Verfahren wurde von [Thalhammer et al. \(2011\)](#) vorgestellt. Deren Versuchsaufbau verwendet eine 10x-Objektivlinse mit niedriger NA von 0.25, um Fallen in einem großen Bereich von  $2 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$  platzieren zu können. Optische Gradientenkräfte kommen nur deshalb zustande, weil der Fallenlaser an der Oberseite der Probenkammer reflektiert wird und so eine Art Doppelstrahl Falle erzeugt wird. Zusätzlich kann die Probenkammer über ein seitlich angebrachtes verspiegeltes Prisma von der Seite beobachtet werden. Wenn gewünscht, kann ein Objekt vor die Öffnung einer Mikropipette bewegt und abgesaugt werden.

Mit diesem Aufbau gelang das Festhalten verschiedener Objekte mit bis zu 70  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Bei Doppelstrahlfallen wird die Intensität des Fallenlasers über ein größeres Volumen verteilt. Schäden, die durch nichtlineare Photoeffekte ausgelöst werden, dürften daher weniger wahrscheinlich sein.

Es konnten optische Kräfte von 400 pN bei 500 mW Laserleistung in der Fokalebene erzeugt werden. Das entspricht einer Manipulationseffizienz von  $0.9 \frac{\text{pN}}{\text{mW}}$ . Es wird jedoch deutlich, dass – wie in Abschnitt 5.2.2 gezeigt – eine Einstrahl Falle mit einer hohen NA erzeugt, viel Effizienter ist ( $1.5 \frac{\text{pN}}{\text{mW}}$ ). Trotz eindrucksvoller Ergebnisse wurde von [Thalhammer et al. \(2011\)](#) keine Rotation gezeigt. Vermutlich reichen die geringeren Gradientenkräfte dafür nicht aus. Außerdem sind wegen der niedrigen NA auch keine hochaufgelösten Mikroskopaufnahmen möglich. Die spezielle, an der Oberseite verspiegelte Probenkammer ist teurer und aufwändiger in der Handhabung als ein einfaches Sandwich aus Deckgläsern (wie in Abschnitt 3.4 beschrieben).

In einer späteren Arbeit konnte dieselbe Gruppe ihr System noch erweitern, indem sie der optischen Doppelstrahl Falle noch eine piezoelektrischen Wandler hinzufügte, der das Ausüben akustischer Kräfte (Druckunterschiede) ermöglichte. Objekte ließen sich so in periodischen Drucksinken sammeln und in der Probenkammer nach oben und unten bewegen. Außerdem konnten gezeigt werden, dass sich Objekte mit einer optischen Falle manuell in zwei akustische Potentialtöpfe einsortieren lassen.

Der Vorteil akustischer Fallen besteht im geringen Energieeintrag und der damit zu erwartenden geringeren Schädigung. Das kann sich vor allem bei Versuchen, in denen Objekte über einen sehr langen Zeitraum gehalten werden müssen, als wichtig erweisen. Allerdings sind akustische Potentiale im Vergleich zu optischen Fallen oder den zu untersuchenden biologischen Objekten sehr groß. Objekte können weder getrennt werden, noch ist eine Rotation oder zumindest die Unterstützung einer Rotation möglich. Eine ausreichende Anzahl effizient wirkender optischer Fallen, wie in Abschnitt 5.5.2 gezeigt, scheint aus Sicht der in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse vorteilhafter.

**Ausblick** Am experimentellen Aufbau und den Verfahren zur Fallenerzeugung können einige Verbesserungen vorgenommen werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer deutlichen Verbesserung des Systems führen.

Bei einem Umbau könnte auf die Scanspiegel (SM) und die beiden Linsen vor und hinter den Spiegeln verzichtet werden. Damit fällt zwar die Option weg, ein Objekt schnell parallel zur Bildebene zu drehen, aber die Abbildungsfehler, die die optischen Fallen verschlechtern, fielen geringer aus. Noch wichtiger ist die Verwendung von Linsen mit größerem Durchmesser im SLM-Strahlengang, wodurch der Strahl des Fallenlasers nicht mehr seitlich abgeschnitten würde, wenn Fallen weit jenseits der Fokalebene erzeugt werden.

## 5. Manipulation von Zellverbänden in 3D

In Abschnitt 5.5.2 wurde das unerwünschte optische Drehmoment als Hauptursache für die Destabilisierung gefangener Zellverbände ausgemacht. Da der SLM nicht nur das Positionieren von Fallen in 3D erlaubt, sondern jeder Falle auch noch ohne Weiteres eine andere Form geben kann (Preece et al., 2009), wäre es sinnvoll, einer Falle wie in Abb. 5.5.4 links eine Neigung entlang der Zellmembran zu geben und so das optische Drehmoment zu reduzieren. Andererseits ließen sich optische Drehmomente unter Umständen zur Unterstützung einer Rotation verwenden.

Bei der Verwendung von nicht selektiven Manipulationsstrategien kann die Verwendung von Laguerre-Gaußschen Lasermoden (Simpson et al., 1998), die durch die ringförmige Ausleuchtung der BFP erzeugt werden, die axiale Fangkräfte erhöhen und zu mehr stabilen Fangpositionen führen.

# 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie

## 6.1. Einführung

### 6.1.1. Parallele Positionsbestimmung in 3D

In Abschnitt 5.5.2 wurde bereits diskutiert, wie essentiell es ist, dass jede Falle so an einem Objekt angreift, dass jene optischen Kräfte überwiegen, die das Objekt in Position halten beziehungsweise in die gewünschte Richtung beschleunigen. Aufgrund der räumlichen Ausdehnung einer Falle von ca.  $1.1\ \mu\text{m} \times 2.8\ \mu\text{m}$  (vgl. Abschnitt 2.1.1) muss ein automatisch arbeitender Manipulator jede einzelne Falle auf 100-200 nm genau platzieren können. Die Positionsbestimmung muss gleichzeitig für mehrere Fallen möglich sein, die in einem dreidimensionalen Volumen verteilt sind. Es muss damit gerechnet werden, dass untersuchte Objekte sehr inhomogen bezüglich der Verteilung ihres Brechungsindex sind (vgl. Abb. 2.1.3).

In diesem Kapitel wird ein neu entwickeltes Verfahren beschrieben, das wir als *konjugierte Fokalebene-Interferometrie* bezeichnen. Es ermöglicht die relative 3D-Positionsbestimmung von streuenden Objekten in mehreren Fallen gleichzeitig.

Ein Spezialfall stellt die Positionsbestimmung von kleinen Kugeln aus Glas oder Latex dar. Sie dienen einerseits oft als Kraftübertrager oder als optisch aktive Sonden. Andererseits eignen sie sich durch ihre regelmäßige Form sehr gut als Referenz, um eine Technik mit einer anderen vergleichen zu können. Deshalb wird in diesem Kapitel auch explizit auf die Positionsbestimmung von Kugeln eingegangen.

### 6.1.2. Vergleichbare existierende Techniken

**Video-Tracking** Beim Video-Tracking wird ein Abbild der Probenebene auf einer Kamera ausgewertet, um die Position von Objekten zu ermitteln. Mit gewissen Einschränkungen ist das für mehrere Objekte gleichzeitig möglich.

## 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie

In seiner ausgereiftesten Form wird für die Auswertung eine Variante eines holographischen Mikroskopie-Verfahrens (*digital holographic microscopy* oder *inline holography*) herangezogen (Lee und Grier, 2007). Die zu untersuchende Probe wird mit einem *kohärenten, kollimierten Strahl* beleuchtet. Das gestreute Licht interferiert mit der Beleuchtung und wird von der Kamera aufgenommen. Da über die Beleuchtung als Referenz Informationen über Phase und Intensität auf dem Detektor vorliegen, kann rechnerisch auf das E-Feld in der Probenebene (oder auch einer anderen Ebene) geschlossen werden. Für eine exakte Positionsbestimmung in 3D ist es für die Rekonstruktion unbedingt notwendig, die genaue Form und den Brechungsindex eines Objekts zu kennen (Lee et al., 2007). Deshalb wird dieses Verfahren in der Regel nur für die Positionsbestimmung von Beads eingesetzt.

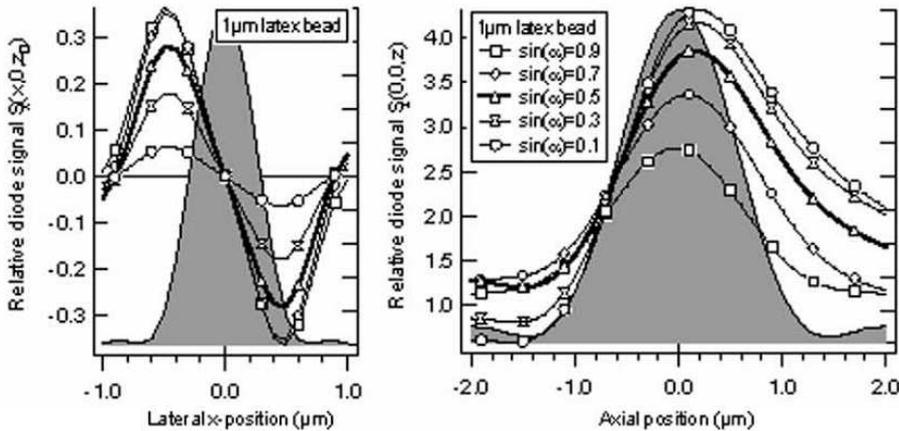
**BFP-Tracking** Das *back focal plane tracking* ist ein Verfahren, das für eine präzise, dreidimensionale Positionsbestimmung von Beads verwendet wird, die in einer optischen Falle gefangen sind (Rohrbach und Stelzer, 2002). Auch hier handelt es sich um ein interferometrisches Messverfahren, wobei der Strahl, der die optische Falle erzeugt, als Referenz dient. Das Interferenzmuster wird in der *hinteren Brennebene* (BFP) eines Detektionsobjektivs mit Hilfe einer Quadrantenphotodiode gemessen. Die Positionssignale, die auf diese Art gewonnen werden, sind in Abb. 6.1.1 dargestellt (Rohrbach und Stelzer, 2002). Die für diese Simulation verwendete Objektivlinse hat einen Öffnungswinkel  $\alpha$ , für den  $\sin(\alpha) = 0.9$  gilt. Mit moderner Detektorelektronik sind Abtastraten von 1 MHz und eine örtliche Auflösung im nm-Bereich möglich.

BFP-Tracking wurde bereits auch zur Positionsbestimmung einer Zellmembran angewandt (Gögler et al., 2007), jedoch muss das System dafür unter den genauen Versuchsbedingungen für eine Stelle der Zellmembran kalibriert werden.

### 6.1.3. Konzept der konjugierten Fokalebene-Interferometrie

Der Begriff *Fokalebene-Interferometrie* (FP-Interferometrie) legt zurecht eine Verwandtschaft mit dem zuvor erwähnten BFP-Tracking nahe. Es handelt sich ebenfalls um ein interferometrisches Verfahren, das denselben Strahl für Messung und Referenz verwendet (Einstrahl-Interferometer). Das ist möglich, weil ein signifikanter Anteil des Fallenlichts die Probe ungebrochen passieren kann.

Während beim BFP-Tracking das Licht jeder Falle in einer *reziproken* Ebene und damit über diese gesamte Ebene verteilt gemessen wird, steht der Detektor bei der FP-Interferometrie in einer *konjugierten* Ebene



**Abb. 6.1.1.:** Simulierte Positionssignale eines 1  $\mu\text{m}$ -Beads relativ zur Fokus-Intensität ermittelt durch **BFP-Tracking** für Objektivlinsen mit verschiedenen Öffnungswinkeln  $\alpha$ . Originalgraphik in (Rohrbach und Stelzer, 2002).

(s. Abb. 6.1.2). Die Intensitätsmuster der einzelnen Fallen sind dadurch weitestgehend unterscheidbar, wodurch eine Positionsbestimmung für jede Falle möglich wird.

Da die Fallen über ein telezentrisches System auf den Detektor abgebildet werden, ist die Intensitätsverteilung einer leeren Falle genau vorhersehbar. Dies gilt insbesondere für die laterale Position, die Breite und die Symmetrie der detektierten Lichtflecken. Befindet sich nun ein streuendes Objekt in einer optischen Falle, führt das zu einer Änderung der Intensitätsverteilung, über die auf die Position des Streuers relativ zum Zentrum der Falle geschlossen werden kann.

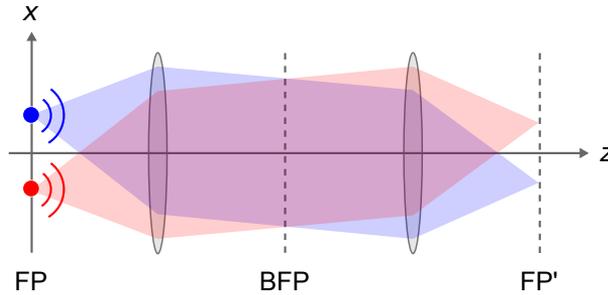
Bei der Herleitung der Detektionssignale wird häufig vom Abstand der Detektorebene zum Fallenfokus die Rede sein. In der Praxis wird die Detektorebene in Form einer CCD-Kamera physikalisch immer am selben Ort bleiben und die Fallen werden in einem gewissen Abstand platziert.

## 6.2. Herleitung der Detektionssignale

### 6.2.1. Interferenz von Fallen- und Streulicht

**E-Felder und Phasenfronten nahe eines Fallenfokus** Die Situation, die im folgenden beschrieben werden soll, ist in Abb. 6.2.1-a anschaulich dargestellt.

## 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie



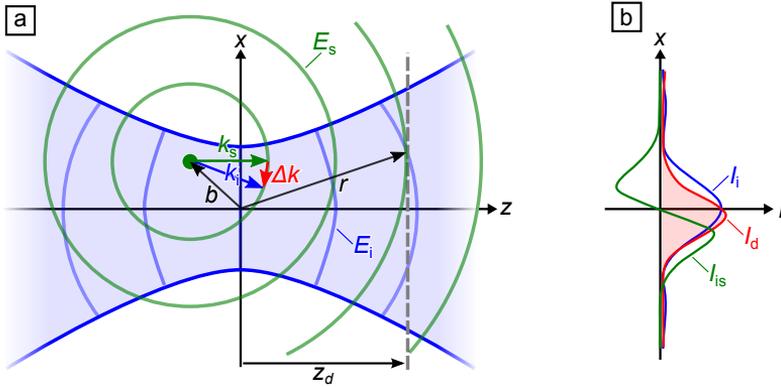
**Abb. 6.1.2.:** Konzeptioneller Vergleich des **BFP-Trackings** mit der **FP-Interferometrie**. Während beim BFP-Tracking das Licht jeder Falle auf die gesamt hintere Brennebene (BFP) der Detektionslinse verteilt wird, wird es bei der FP-Interferometrie in ein konjugierte Ebene (FP') abgebildet. Auf diese Weise lässt sich eine Änderung der Intensitätsverteilung für jede Falle getrennt detektieren.

Das E-Feld  $E_i$  eines fokussierten Fallstrahls (blau) mit Gaussförmigem Profil regt einen Streuer an, der wiederum ein E-Feld  $E_s$  (grün) aussendet, das näherungsweise einer Kugelwelle entspricht. Der Streuer befindet sich an einer Position  $\mathbf{b} = (b_x, b_y, b_z)$  relativ zum Fokus der Falle, der im Ursprung des Koordinatensystems liegt.  $E_i$  und  $E_s$  interferieren und erzeugen in einer Detektorebene, die in einem Abstand  $z_d$  zum Fokus liegt, eine charakteristische Intensitätsverteilung  $I_d(x, y)$ , über die auf die Position des Streuers zurück geschlossen werden soll (Abb. 6.2.1-b).

Mit Hilfe des Interferenzterms

$$\begin{aligned}
 I_d &= \frac{1}{2} c \epsilon_0 n_m |E_i + E_s|^2 \\
 &= \frac{1}{2} c \epsilon_0 n_m \left( |E_i|^2 + |E_s|^2 + 2 \operatorname{Re} \{ E_i E_s^* \} \right) \\
 &= I_i + I_s + I_{is}
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

kann die Intensität an jedem Punkt  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  in der Nähe des Fokus bestimmt werden. Die detektierbare Intensität  $I_d$  ergibt sich aus der Überlagerung von einfallendem Feld  $E_i$  und gestreutem Feld  $E_s$  (Hecht, 2005b).  $I_d$  lässt sich aufteilen in Intensitätskomponenten für das einfallende Licht  $I_i$ , für das gestreute Licht  $I_s$  und für den Interferenzterm  $I_{is}$ , der selbstverständlich nur in Kombination mit den anderen beiden auftritt und auch negativ sein kann.



**Abb. 6.2.1.:** (a) Schematische Darstellung eines **Gaußschen Laserfokus** (blau), der einen **Streuer** (grün) im Abstand  $b$  zum Fokus anregt. Der Streuer strahlt eine Kugelwelle ab, die mit dem einfallenden Licht **interferiert**. Die E-Felder  $E_i$  und  $E_s$  des einfallenden und des gestreuten Lichts können für jede Position  $\mathbf{r}$  nahe des Fokus berechnet werden. Es sind exemplarisch ein einfallender  $k_i$  und ein gestreuter  $k_s$  Wellenvektor eingezeichnet. Die durchgezogenen Linien stellen die Phasenfronten dar. Auf einem Detektor kann die 2D-Intensitätsverteilung in einem Abstand  $z_d$  zum Fokus gemessen werden. (b) In einer **Detektorebene** im Abstand  $z_d$  zum Fokus bildet sich eine **Intensitätsverteilung**  $I_d(x, y)$  aus, die im wesentlichen um einen Interferenzanteil  $I_{is}$  von jener des einfallenden Lichts  $I_i$  abweicht.

## 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie

**Gauss-Strahl** Für die Beschreibung des einfallenden Strahls, der den Fallenfokus erzeugt, wird das Modell des Gauß-Strahls verwendet (Saleh und Teich, 2007). Eigentlich gelten die Näherungen, die mit diesem Modell einhergehen, nur für paraxiale Strahlen und nicht für solche, die durch eine Objektivlinse stark fokussiert werden. Allerdings entspricht die Beschreibung der Phasenfronten, die für die interferometrische Detektion von zentraler Bedeutung sind, in hinreichendem Maße der Realität.

Das einfallende Feld an einem Ort  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  wird durch

$$E_i(\mathbf{r}) = E_0 \underbrace{\frac{w_0}{w(z)}}_{\text{Amplitude}} \underbrace{\exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{w^2(z)}\right]}_{\text{Strahlverbreiterung}} \underbrace{\exp\left[-ikz - ik\frac{x^2 + y^2}{2R(z)} + i\zeta(z)\right]}_{\text{Phase}} \quad (6.2)$$

beschrieben. An der Stelle  $z = 0$  hat der Strahl seine schmalste Stelle, an der die Strahlbreite  $2w_0$  beträgt. Diese charakteristische Größe lässt sich bei einem beugungsbegrenztem Strahl durch  $w_0 = \frac{\sqrt{2}\lambda_0}{\pi \text{NA}_{\text{OL}}}$  berechnen, wobei  $\text{NA}_{\text{OL}}$  die numerische Apertur der Objektivlinse beschreibt. Entlang der optischen Achse ändert sich die halbe Strahlbreite gemäß  $w(z) = w_0\sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2}$ . Hier kommt mit der Rayleigh-Länge  $z_0 = \frac{\pi w_0^2}{\lambda_0}$  eine weitere charakteristische Größe ins Spiel.

Der erste Faktor bestimmt die Amplitude des E-Feldes entlang der  $z$ -Achse. Der zweite Faktor ist eine rein reale Exponentialfunktion und berücksichtigt die Verbreiterung des Strahlprofils.

Der komplexe dritte Faktor beschreibt die Phase des E-Feldes und ist für die Interferenz von besonderer Bedeutung. Die Besonderheit eines Gauß-Strahls findet sich in der Berücksichtigung des Krümmungsradius der Phasenfront  $R(z) = z\left(1 + \left(\frac{z_0}{z}\right)^2\right)$  und des *Gouy-Phasenshifts*  $\zeta(z) = \arctan(z/z_0)$  wieder. Letzterer bewirkt im Vergleich mit einer ebenen oder Kugelwelle, dass die Felder bei  $z = 0$  zwar in Phase sind, für  $z \rightarrow \pm\infty$  aber einen Phasenschub von  $\pm\pi/2$  vorliegt. Es wird sich zeigen, dass der Gouy-Phasenshift für die axiale Positionsbestimmung von zentraler Bedeutung ist.

**Streuung** Das einfallende Feld regt den Streuer an, der sich an Position  $\mathbf{b}$  befindet (Abb. 6.2.1). In Abschnitt 2.1.1 wurde in Zusammenhang mit optischen Streukräften erläutert, dass das gestreute Feld  $E_s$  durch Streufunktionen bestimmt werden kann.

Auch an dieser Stelle wird wieder angenommen, dass es sich um einen kleinen, kohärent streuenden Rayleigh-Streuer handelt, dessen

Polarisierbarkeit  $\alpha_s = 3 V_s \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}$  ( $m = n_s/n_m$ ) beträgt. Für die Detektion ist nur das vorwärts gestreute Licht von Bedeutung (Streuwinkel  $\theta = 0$ ), wodurch eine einzige Streufunktion  $S_1 = \frac{-\imath k^3 \alpha_s}{4\pi}$  für beide Polarisierungen verwendet werden kann.

**Intensität des Interferenzterms** Das gestreute Feld an einer beliebigen Position  $\mathbf{r}$

$$\begin{aligned} E_s(\mathbf{r}, \mathbf{b}) &= (S_1 \cdot \delta(\mathbf{r} - \mathbf{b}) E_i(\mathbf{r})) \star h(\mathbf{r} - \mathbf{b}) \\ &= S_1 E_i(\mathbf{b}) \frac{e^{-\imath k |\mathbf{r} - \mathbf{b}|}}{\imath k |\mathbf{r} - \mathbf{b}|} \end{aligned} \quad (6.3)$$

kann nun berechnet werden, indem das einfallende Feld mit einem Diracschen Deltaimpuls multipliziert, mit der Streufunktion gewichtet und anschließend mit dem Propagator im Ortsraum (vgl. Glg. 2.26) gefaltet wird.

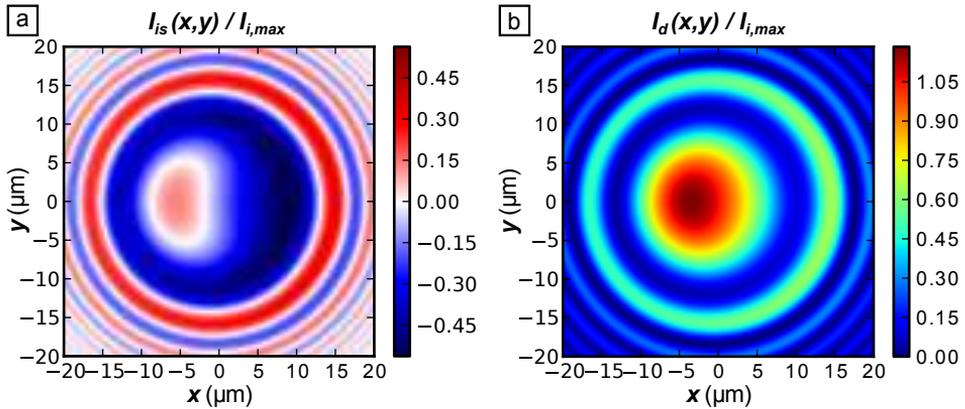
Auf Basis des exakten Ausdrucks für  $E_i E_s^*$

$$\begin{aligned} E_i(\mathbf{r}) \cdot E_s(\mathbf{r}, \mathbf{b})^* &= \\ &E_0 \frac{w_0}{w(z)} \exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{w^2(z)}\right] \exp\left[-\imath k z - \imath k \frac{x^2 + y^2}{2R(z)} + \imath \zeta(z)\right] \\ &\times \frac{\imath k^3 \alpha_s}{4\pi} E_0 \frac{w_0}{w(b_z)} \exp\left[-\frac{b_x^2 + b_y^2}{w^2(b_z)}\right] \exp\left[\imath k b_z + \imath k \frac{b_x^2 + b_y^2}{2R(b_z)} - \imath \zeta(b_z)\right] \\ &\times \frac{e^{\imath k |\mathbf{r} - \mathbf{b}|}}{-\imath k |\mathbf{r} - \mathbf{b}|} \end{aligned} \quad (6.4)$$

kann die Intensität des Interferenzterms  $I_{is} = 2 \operatorname{Re}\{E_i E_s^*\}$  ermittelt werden. Sie wird im Folgenden für die numerische Berechnung der Intensitätsverteilung in einer Detektorebene verwendet.

## 6.2.2. Intensitätsverteilung in einer Detektorebene

**Exakte Berechnung** In Abb. 6.2.2 sind beispielhaft die Verteilungen von  $I_{is}(x, y)$  und  $I_d(x, y)$  zu sehen, wie sie sich aus einer Berechnung mit Glg. 6.4 ergeben. Dabei wird von einem Streuer mit Brechungsindex  $n_s = 1.47$  und Volumen  $V_s = 4/3\pi (0.5 \mu\text{m})^3$  in Wasser ( $n_m = 1.33$ ) als umgebendem Medium ausgegangen, der an einer Position  $\mathbf{b} = (0.25 \mu\text{m}, 0, 0.1 \mu\text{m})$  platziert ist. Die Detektionsebene, in der die Intensitätsverteilung betrachtet wird, liegt bei  $z = z_d = 20 \mu\text{m}$ . Die numerische Apertur der Objektivlinse beträgt  $\text{NA}_{\text{OL}} = 1.2$  und die Wellenlänge  $\lambda_0 = 1.064 \mu\text{m}$ .



**Abb. 6.2.2.: Berechnung der Intensität in einer Detektorebene.** Interferenzanteil  $I_{is}$  (a) und Gesamtintensität  $I_d$  (b) für einen Streuer bei  $\mathbf{b} = (0.25 \mu\text{m}, 0, 0.1 \mu\text{m})$ .  $I_d$  wird entgegen der Richtung der lateralen Auslenkung des Streuers verschoben. Die Intensitätswerte sind in beiden Teilbildern mit dem Maximalwert des einfallenden Lichts  $I_{i,max}$  normiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Auslenkung des Streuers in positive x-Richtung eine Verschiebung der Gesamtintensität in negative x-Richtung führt, während die Verteilung in y-Richtung davon unberührt bleibt (vgl. Abb. 6.2.2-b). Noch deutlicher wird das Phänomen bei Betrachtung des Interferenzanteils (vgl. Abb. 6.2.2-a), der in positiver x-Richtung einen negativen Beitrag zu  $I_d$  leistet. Alle Werte sind mit dem Maximalwert des einfallenden Lichts  $I_{i,max}$  normiert, um die Größenordnung besser sichtbar zu machen.

**Näherung** Die Verteilung von  $I_{is}$  und damit auch von  $I_d$  kann analytisch besser verstanden werden, wenn man an Glg. 6.4 einige Näherungen vornimmt. Eine notwendige Annahme besteht darin, lediglich Orte mit einem Abstand von einigen Wellenlängen zum Fokus zu betrachten ( $|z| \gg \lambda$ ). Diese Einschränkung ist insofern legitim, als das Detektionsverfahren ohnehin nur angewendet wird, wenn Falle und Detektorebene einen gewissen Mindestabstand voneinander haben. Darauf wird später noch genauer eingegangen.

Unter dieser Annahme gilt für einen Gauß-Strahl, dass die halbe Strahlbreite  $w(z) \approx \frac{2z}{k w_0}$  sich linear mit  $z$  verändert und die Phase  $\zeta(z) \approx \frac{\pi}{2} \text{sgn}(z)$  der Phase eines Kugelstreuers um  $\pi/2$  vor- oder nachzieht, je nachdem ob sich der Detektor vor oder hinter dem Fallfokus befindet. Die Phase

des interferierenden Feldes wird durch den Einfluss des Streuers nur sehr wenig gekrümmt ( $\exp\left[\imath k \frac{b_x^2 + b_y^2}{2R(b_z)}\right] \approx 1$ ) und die Amplitude des E-Feldes hängt maßgeblich von  $z$  ab ( $|\mathbf{r} - \mathbf{b}| \approx z$ ).

Glg. 6.4 kann dann in einem ersten Schritt zu

$$\begin{aligned}
 E_i(\mathbf{r}) \cdot E_s(\mathbf{r}, \mathbf{b})^* \approx & \\
 & - E_0^2 \frac{k^3 \alpha_s}{4\pi} \frac{w_0^3}{z^2 w(b_z)} \exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{w^2(z)}\right] \exp\left[-\frac{b_x^2 + b_y^2}{w^2(b_z)}\right] \\
 & \times \exp\left[\imath \left(k \left(-z - \frac{x^2 + y^2}{2R(z)} + b_z + |\mathbf{r} - \mathbf{b}|\right) + \frac{\pi}{2} \operatorname{sgn}(z) - \zeta(b_z)\right)\right] \quad (6.5)
 \end{aligned}$$

vereinfacht werden. Nach Extraktion des Realteils kann mit Hilfe von etwas Trigonometrie ( $\sin(\varphi) = \cos(\pi/2 - \varphi)$ ,  $\sin(\varphi) = -\sin(-\varphi)$ ) und des Kosinussatzes  $|\mathbf{r} - \mathbf{b}|^2 = |\mathbf{r}|^2 + |\mathbf{b}|^2 - 2\mathbf{r} \cdot \mathbf{b}$  der Interferenzterm abschließend mit

$$\begin{aligned}
 I_{is} = 2 \operatorname{Re} \{E_i E_s^*\} \approx & \\
 & - E_0^2 \frac{k^3 \alpha_s}{4\pi} \frac{w_0^3}{z^2 w(b_z)} \exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{w^2(z)} - \frac{b_x^2 + b_y^2}{w^2(b_z)}\right] \operatorname{sgn}(z) \\
 & \times \sin\left[k \left(z + \frac{x^2 + y^2}{2R(z)} - b_z - \sqrt{r^2 + b^2 - 2\mathbf{r} \cdot \mathbf{b}}\right) + \zeta(b_z)\right] \quad (6.6)
 \end{aligned}$$

genähert werden.

Betrachtet man nun Glg. 6.6 kann die Intensitätsverteilung  $I_{is}(x, y)$  in einer Ebene bei  $z$  (siehe Abb. 6.2.2-a) gut nachvollzogen werden. Die Modulation der Intensität erfolgt vor allem durch den Sinus-Term. Das Vektorprodukt  $\mathbf{r} \cdot \mathbf{b} = x b_x + y b_y + z b_z$  erklärt, warum eine laterale Auslenkung des Streuers in x-Richtung zu einer Änderung der Intensität in der Detektorebene in derselben Richtung führt. Alle anderen Summanden im Argument der Sinus-Funktion sind rotationsymmetrisch um den Ursprung.

Zu einer Änderung der Intensität bei axialer Auslenkung des Streuers  $b_z$  tragen mehrere Summanden im Argument der Sinus-Funktion bei. Den größten Einfluss hat jedoch der Gouy-Phasenshift  $\zeta(b_z) = \arctan(b_z/z_0)$ , dessen Arctan-Funktion sich um  $b_z = 0$  stark verändert.

In den meisten Fällen trägt der reine Streuterm  $I_s$  nur einen sehr kleinen Teil zur Gesamtintensität  $I_d$  bei. Für diese kann in einem letzten

## 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie

Näherungsschritt

$$I_d \approx I_i + I_{is}$$

angenommen werden.

### 6.2.3. Positionssignale

Die Veränderung der zweidimensionalen Intensitätsverteilung auf dem Detektor in Abhängigkeit der Streuerposition  $\mathbf{b}$  und des Abstands der Falle vom Detektor  $z_d$  soll nun quantifiziert werden, um eine Signalgröße zu erhalten, die die Streuerposition möglichst eindeutig wiedergibt. Die Signale für laterale und axiale Auslenkungen werden dabei auf unterschiedliche Art ermittelt.

Wie bereits gezeigt wurde, führt eine *laterale Auslenkung* eines Streuers zu einer Verschiebung der Intensität auf dem Detektor. Diese kann durch die Bestimmung des *Intensitätsschwerpunkts* erfolgen. Das Signal, das die Auslenkung in x-Richtung wiedergibt, lautet dann

$$s_x(\mathbf{b}, z_d) = \iint_{\Omega} x \cdot I_d(x, y, z_d, \mathbf{b}) dx dy \Big/ \iint_{\Omega} I_d(x, y, z_d, \mathbf{b}) dx dy, \quad (6.7)$$

wobei hier die kreisförmige Fläche  $\Omega : x^2 + y^2 \leq R^2$  ausgewertet wird, die durch einen *Detektionsradius*  $R$  bestimmt wird.  $s_x$  hängt aber außer der Streuerposition noch vom Detektorabstand  $z_d$  ab und hat die Einheit m. Das y-Signal kann analog ermittelt werden.

Das Signal für eine *axiale Auslenkung* eines Streuers wird auf eine andere Art ermittelt. Würde ein Streuer nur entlang der optische Achse ausgelenkt werden, wäre der Wert von  $I_d(0, 0, z_d)$  bereits aussagekräftig genug. Jede laterale Auslenkung würde dieses Signal aber stark beeinflussen. Deshalb wird die Intensität ebenfalls über die Fläche  $\Omega$  integriert und als z-Signal

$$s_z(\mathbf{b}, z_d) = \iint_{\Omega} I_d(x, y, z_d, \mathbf{b}) dx dy \quad (6.8)$$

verwendet.  $s_z$  hat die Einheit einer Intensität<sup>1</sup>, also  $W/m^2$ .

Die in Glg. 6.7 und 6.8 eingeführten Signale für laterale und axiale Auslenkungen haben beide den Nachteil, dass sie vom Abstand  $z_d$  einer Falle vom Detektor abhängen. Dieser Abstand ist jedoch immer bekannt. Es liegt also nahe, Signalgrößen zu verwenden, die diesen Abstand bereits berücksichtigen.

---

<sup>1</sup>auch hier eigentlich Bestrahlungsstärke

### 6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1 $\mu\text{m}$ -Glasbeads

In Abschnitt 6.2.2 wurde bereits darauf hingewiesen, dass sich die Breite eines Gauß-Strahls ungefähr gemäß  $w(z) \approx \frac{2z}{k w_0}$  verändert. Die Position des Intensitätsschwerpunkts, den  $s_x(\mathbf{b}, z_d)$  ausdrückt, wird also ebenfalls mit  $w(z_d)$  skaliert. Es kann also ein *gewichtetes laterales Signal*

$$S_x(\mathbf{b}) = s_x(\mathbf{b}, z_d)/z_d \quad (6.9)$$

definiert werden, das unabhängig von  $z_d$  und dimensionslos ist.

Das axiale Signal  $s_z$  ist nicht nur abhängig von  $z_d$ , sondern auch von der Sensitivität des Detektors. Deshalb wird mit

$$S_z(\mathbf{b}) = (s_z(\mathbf{b}, z_d) - s_{z0})/s_{z0} \quad (6.10)$$

die relative Änderung von  $s_z$  herangezogen, um eine vergleichbare Größe für unterschiedlich platzierte Fallen und unterschiedliche Detektoreinstellungen zu erhalten.  $s_{z0} = s_z(\mathbf{b} = (0, 0, 0), z_d)$  entspricht dem axialen Signal eines kleinen Streuers, der exakt im Fallenzentrum positioniert ist. Das *gewichtete axiale Signal*  $S_z$  ist ebenfalls dimensionslos.

In Abb. 6.2.3 sind die berechneten Positionssignale dargestellt, die für die Auslenkung einer Glaskugel ( $n_s = 1.47$ ) mit 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser in Wasser ( $n_m = 1.33$ ) aus dem Zentrum eines Fallenfokus ( $\text{NA}_{\text{OL}} = 1.2$ ,  $\lambda_0 = 1.064 \mu\text{m}$ ) entstehen. Der Abstand der Falle zum Detektor beträgt  $z_d = 20 \mu\text{m}$ . Es sind sowohl die Signale, die aus einer exakten Berechnung von  $I_d$  hervorgehen, als auch jene aus der genäherten Berechnung dargestellt.

Das laterale Signal  $S_x$  ist symmetrisch und bei den gegebenen Streueigenschaften in einem Bereich von  $b_x = -0.3 \mu\text{m} \dots 0.3 \mu\text{m}$  um den Fallenfokus herum eindeutig. Für Auslenkungen  $|b_x| > 1 \mu\text{m}$  ist kein Signal mehr detektierbar. Wird das Positionssignal mit der oben beschriebenen Näherung berechnet, ist die Amplitude etwas stärker ausgeprägt.

Das axiale Signal  $S_z$  ist in einem Bereich  $b_z = -0.4 \mu\text{m} \dots 0.6 \mu\text{m}$  eindeutig. Im Gegensatz zur Näherung ist das exakt berechnete Signal um  $b_z = 0.1 \mu\text{m}$  vom Ursprung verschoben. Der Unterschied hat seine Ursache vor allem in der Vernachlässigung des reinen Streuterms  $I_s$ .

### 6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1 $\mu\text{m}$ -Glasbeads

Nach der theoretischen Herleitung der Intensitätsverteilungen und Positionssignale in Abschnitt 6.2 wurde diese experimentell überprüft. Der verwendete experimentelle Aufbau ist en detail in Abschnitt 3.2 beschrieben. Es gilt vor

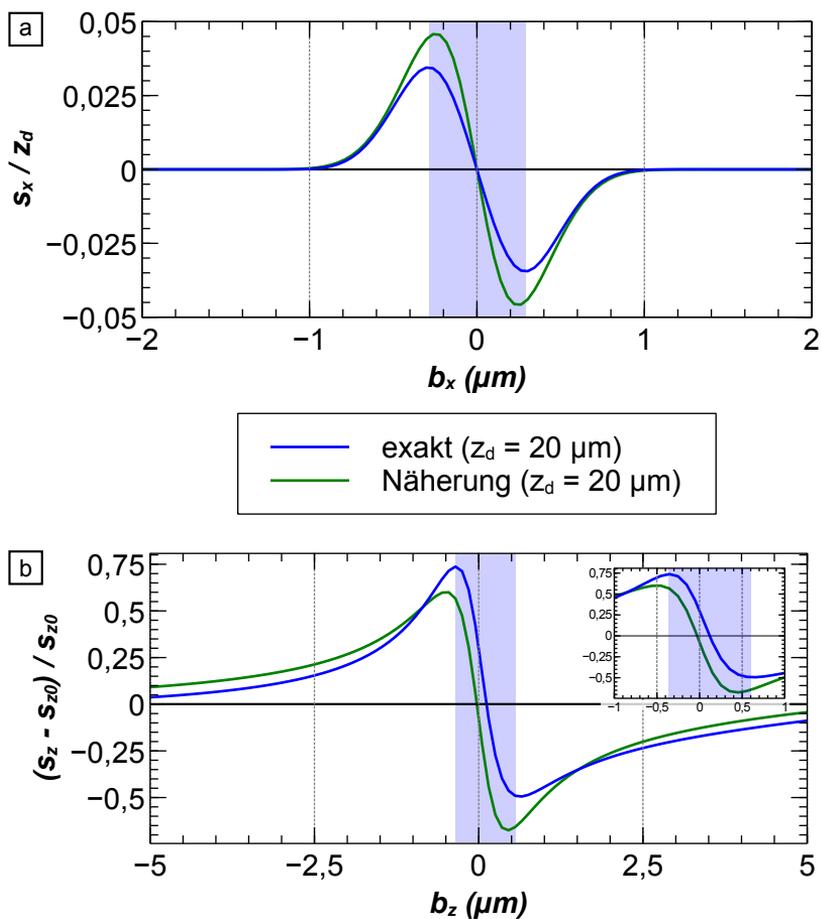
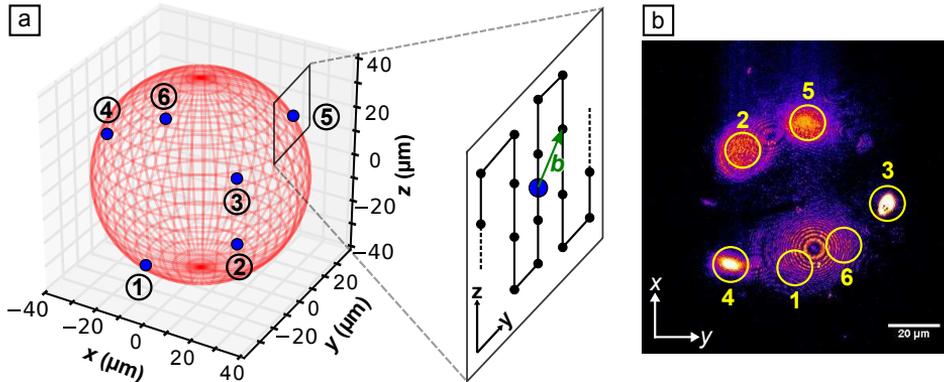


Abb. 6.2.3.: Berechnete gewichtete Detektionssignale  $S_x(b_x)$  (a) und  $S_z(b_z)$  (b) in Abhängigkeit der Position einer Glaskugel mit  $1\ \mu\text{m}$  Durchmesser. Die Bereiche, in denen sich ein Signalwert eindeutig einer Auslenkung zuweisen lässt, ist blau hinterlegt. Bewegt sich ein Streuer nur in eine Richtung, ist die Position lateral bis  $\pm 1\ \mu\text{m}$  feststellbar.

### 6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1 $\mu\text{m}$ -Glasbeads



**Abb. 6.3.1.:** (a) **Dreidimensionale Verteilung von sechs optischen Fallen** (nummerierte blaue Punkte). Ein 1  $\mu\text{m}$  Glasbead (schwarzer Punkt) wird auf einem mäanderförmigen Pfad in einer Ebene durch den Fallenfokus bewegt. (b) **Intensitätsverteilung des Fallenlichts auf der Detektorkamera**. Der Bereich (gelber Kreis), der zur Positionsbestimmung für jede Falle ausgewertet wird, wird durch die Position der Falle und den Detektionsradius  $R$  bestimmt. Es wird eine logarithmische Farbskala verwendet. Der eingezeichnete Maßstab gilt für die Probenebene, für die Detektorebene muss mit  $M_{\text{CCD}2} = 20$  multipliziert werden.

allein zu beachten, dass die gemeinsame Brennebene der Objektivlinse (OL) und der Detektionslinse (DL) - die Probenebene (FP) - mittels einer telezentrischen Abbildung auf die Detektorkamera (CCD2) abgebildet wird. Das bedeutet also, dass der Abstand  $z_d$  einer Falle zur Detektionsebene, so wie er im vorigen Abschnitt verwendet wurde, einfach dem Abstand zur Probenebene und damit der  $z$ -Koordinate einer Falle entspricht.

**Dreidimensionale Fallenverteilung** Die optischen Fallen wurden für diesen Versuch in einer Art und Weise platziert, wie es in einem Szenario zur Rotation eines Zellverbandes mit ca. 80  $\mu\text{m}$  Durchmesser notwendig wäre. Sechs optische Fallen waren gleichmäßig auf der Oberfläche einer Kugel (Radius 40  $\mu\text{m}$ ) verteilt, so wie es in Abb. 6.3.1-a dargestellt ist.

Eine Suspension von Glaskugeln mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  und einem Brechungsindex von  $n_m = 1.47$  in 0.1-molarer NaCl-Lösung wurde in eine Probenkammer (vgl. Abschnitt 3.4) injiziert. Nach kurzer Zeit adhärten viele Beads aufgrund der Oberflächenladungen am Boden der

Kammer. Brechungsindex und Dicke des Deckgläschens, das als Boden diente, wurden von der Objektivlinse korrigiert und hatten daher keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung des Fallenlichts.

Eines der adhärten Beads wurde mit Hilfe des Piezotischs (PI) auf einem mäanderförmigen Pfad durch einen der sechs Fallenfoki bewegt, so wie es für eine Falle in Abb. 6.3.1-a schematisch dargestellt ist. Für jede Beadposition  $\mathbf{b}$  wurde eine Intensitätsverteilung  $I_d$  auf der Detektorkamera (CCD2) gespeichert und gemäß den Gleichungen 6.9 und 6.10 ausgewertet. Da die Probenebene (FP) durch ein telezentrisches System in die Detektorebene abgebildet wird, können Koordinaten leicht mit Hilfe der Vergrößerung  $M_{\text{CCD2}} = 20$  umgerechnet werden.

Ein Beispiel für eine Intensitätsverteilung auf der Detektorkamera ist in Abb. 6.3.1-b zu sehen, wobei es sich um genau jene sechs Fallen handelt, die in Teilabb. 6.3.1-a eingezeichnet sind. Die Intensitätswerte sind mit einer logarithmischen Farbskala kodiert, um den gesamten Wertebereich gut sichtbar zu machen. Für jede Falle wurde der mit einem gelben Kreis (Radius  $R = 6.9 \mu\text{m}$ ) markierte Bereich ausgewertet. Das Zentrum jedes Kreises ist allein durch die Fallenpositionen eindeutig festgelegt. Es fällt auf, dass das Licht der Fallen 1 und 6 stark interferierte. Dennoch war die Extraktion von Positionssignalen möglich, wie im Laufe diesen Abschnitts zu sehen sein wird.

**2D-Intensitätsverteilung** In der oberen Hälfte der Abb. 6.3.2 ist  $I_d(x, y)$  für Falle 5 aus Abb. 6.3.1 zu sehen, welche einen Abstand von  $z_d = 20 \mu\text{m}$  von der Detektorebene hatte. Diese Intensitätsverteilung entstand bei den beiden Beadpositionen  $\mathbf{b} = (0, \pm 0.25 \mu\text{m}, 0)$ , also einer reinen lateralen Auslenkung in y-Richtung. In der unteren Hälfte sind die gemessenen Intensitätsverteilungen für eine leere Falle (was  $I_i(x, y)$  entspricht) subtrahiert worden. Man erhält dadurch den genäherten Interferenzanteil  $I_{is}(x, y)$  aus Absatz 6.2.2.

Mit Blick auf die rechnerischen Werte, wie sie in Abb. 6.2.2 zu sehen sind, ist bei den gemessenen Werten eine vergleichbare Verschiebung der Gesamtintensität  $I_d$  zu erkennen. Auch die Maximalwerte des Interferenzanteils  $I_{is}$  bewegen sich in der gleichen Größenordnung.

Die leichte Asymmetrie des abgebildeten Lichtflecks hat ihre Ursache darin, dass die Scanspiegel (SM) die Polarisationsrichtung des Fallenlichts um ein Stück drehen (Anzolin et al., 2010). Dadurch werden die x- und y-Komponenten der E-Felder von den im Strahlengang folgenden Farbteilern nicht mehr zu genau gleichen Anteilen reflektiert. Dieser Effekt könnte vermieden werden, indem das Fallenlicht hinter dem SLM mit Hilfe einer  $\lambda/4$ -Platte zirkular polarisiert wird.

### 6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1 $\mu\text{m}$ -Glasbeads

Falle ⑤

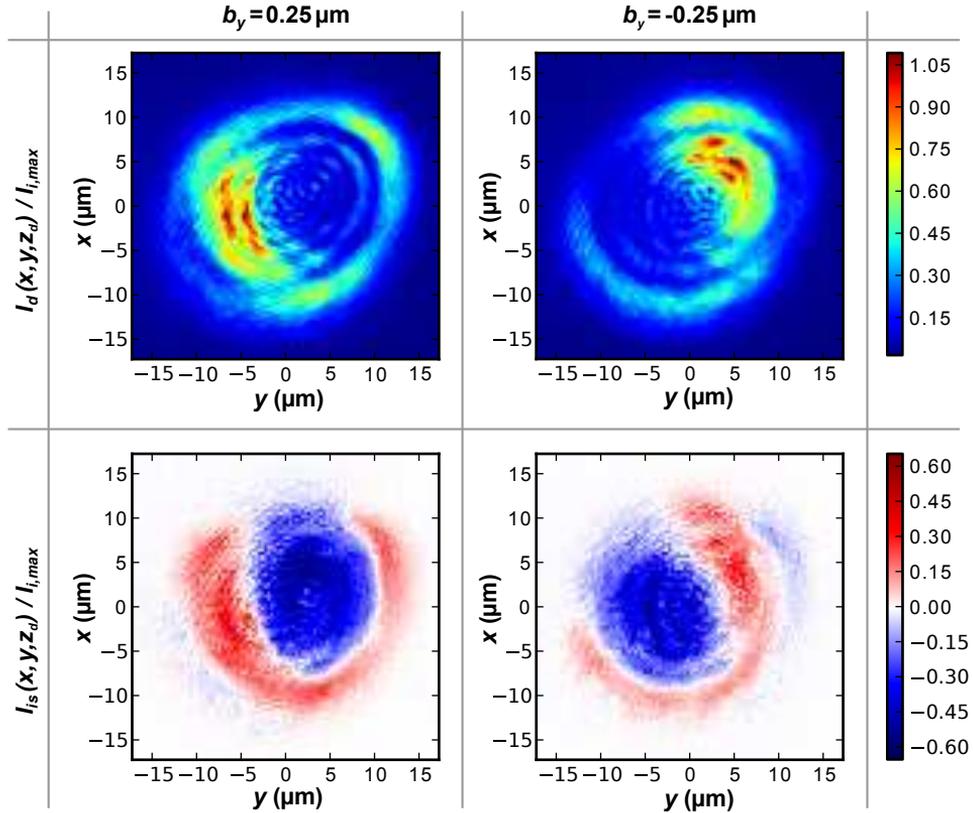


Abb. 6.3.2.: Gemessene **Detektor-Intensitätsverteilung**  $I_d(x, y)$  einer Falle bei  $z_d = 20 \mu\text{m}$  und einer Auslenkung eines  $1 \mu\text{m}$ -Glasbeads um  $b_y = \pm 0.25 \mu\text{m}$  auf der Kamera CCD2. Durch Subtraktion von  $I_i(x, y)$  kann die Verteilung  $I_{is}(x, y)$  ermittelt werden. Alle Intensitätswerte sind mit dem Maximalwert von  $I_i$  normiert. Die lateralen Koordinaten  $(x, y) = (x_{\text{CCD2}}, y_{\text{CCD2}}) / M_{\text{CCD2}}$  wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit den berechneten Werten in die Probenebene umgerechnet.

Falle Nr.	①	②	③	④	⑤	⑥
$z_d$ ( $\mu\text{m}$ )	-33.6	-20	-6.7	+6.7	+20	+33
$\text{SNR}_{S_y}$	12.4	57.8	44.8	15.8	32.4	33.4
$\text{SNR}_{S_z}$	8.3	33.3	5.1	5.8	6.9	14.0

**Tab. 6.1.:** **Signal-Rausch-Verhältnis** von  $S_y$  und  $S_z$  für die Positionsbestimmung eines Beads in einer Falle an verschiedenen Positionen mit Abständen  $z_d$  von der Fokalebene der Objektivlinse.

**2D-Positionssignale** Die lateralen und axialen Positionssignale für alle sechs Fallen sind in den Abbildungen 6.3.3 bis 6.3.5 dargestellt. Es sind immer die Signale für die beiden Fallen zusammengefasst, die während der Messung den gleichen Abstand zur Detektionsebene hatten.

Die lateralen Positionssignale  $S_y(b_y)$  zeigen eine ausgeprägte Symmetrie in y-Richtung. Eine Auslenkung in positive y-Richtung führt - wie erwartet - zu einem negativen Signal und eine Auslenkung in negative y-Richtung zu einem positiven Signal. Dieser Zusammenhang ist über einen ausgedehnten Bereich in z-Richtung gültig. Im Falle von  $|z_d| = 6.7 \mu\text{m}$  reicht dieser Bereich ungefähr von  $b_z = -2 \mu\text{m} \dots +2 \mu\text{m}$ , für größere  $|z_d|$  ist der verfügbare laterale Wertebereich noch größer.

Das axiale Positionssignal  $S_z(b_z)$  hat für die verschiedenen Fallenpositionen eine unterschiedliche Qualität. Während das Signal für die Falle bei  $z_d = 20 \mu\text{m}$  symmetrisch um  $b_z = 0$  ist und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) besitzt (siehe Tab.6.1), ist das Signal für die Falle bei  $z_d = 6.7 \mu\text{m}$  asymmetrisch (fast keine negativen Signalwerte) und geht fast im Hintergrundrauschen unter. Das Signal-Rausch-Verhältnis entspricht hier dem Verhältnis des Signalmaximums zur Standardabweichung des Hintergrundrauschens.

Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis für kleine  $|z_d|$  hat seine Ursache im begrenzten Dynamikbereich der Detektorkamera. Die für diesen Versuch verwendete Kamera hatte einen Wertebereich von  $0 \dots 2^{12}$ . Die Belichtungszeit wurde automatisch so gewählt, dass dieser Wertebereich zu 90% ausgenutzt wird, damit Intensitätsänderungen noch zuverlässig detektiert werden konnten. Je näher eine Falle an der Objektebene platziert wird, d. h. je kleiner  $|z_d|$ , desto mehr konzentriert sich die Gesamtintensität einer Falle auf einer kleinen Fläche der Kamera. Das hier beschriebene Detektionsverfahren wird deshalb schlechter, je näher eine Falle an der Probenebene platziert wird.

Bezüglich der Asymmetrie des axialen Signals muss mit Blick auf Glg.6.6

6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1  $\mu\text{m}$ -Glasbeads

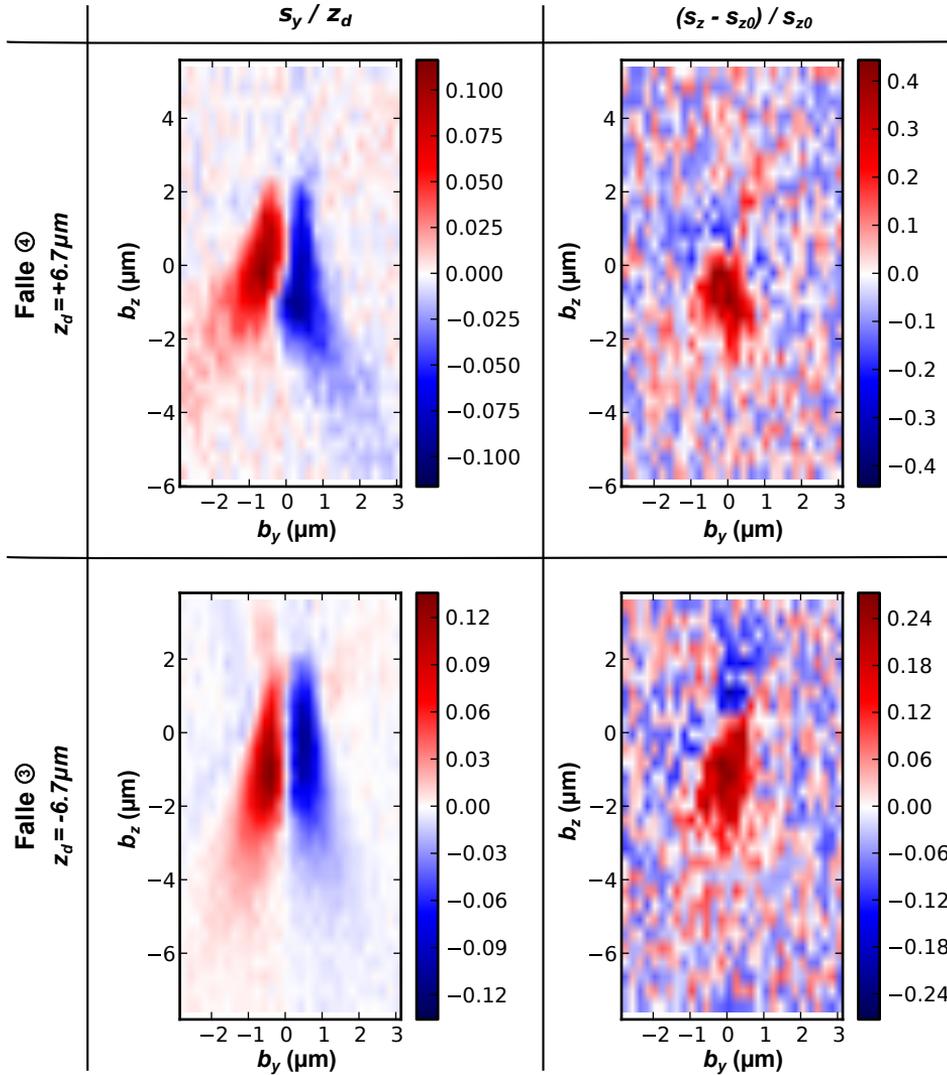


Abb. 6.3.3.: Laterale und axiale Positionssignale eines 1  $\mu\text{m}$ -Beads ermittelt durch 2D-Scans durch die Fallen bei  $z_d = -6.7 \mu\text{m}$  und  $z_d = +6.7 \mu\text{m}$ .

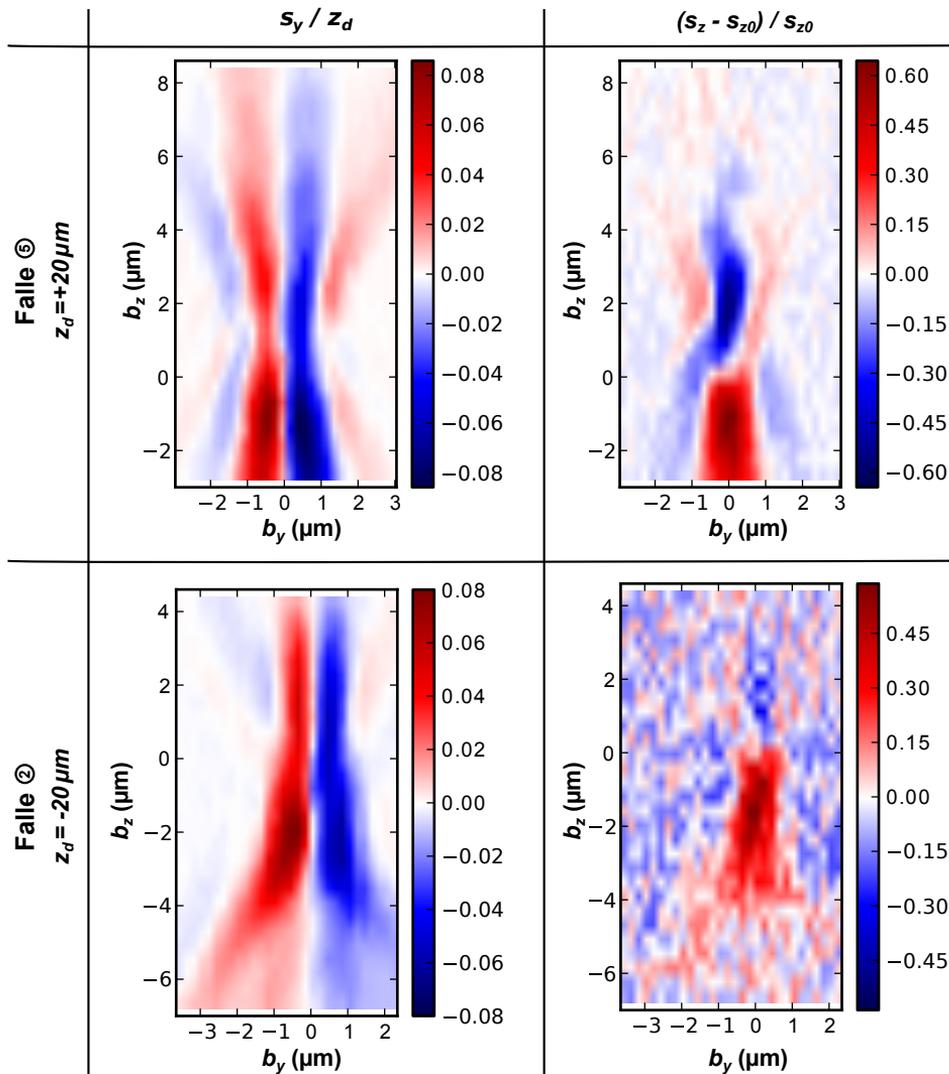


Abb. 6.3.4.: Laterale und axiale Positionssignale eines  $1 \mu\text{m}$ -Glasbeads ermittelt durch 2D-Scans durch die Fallen bei  $z_d = -20 \mu\text{m}$  und  $z_d = +20 \mu\text{m}$ .

6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1  $\mu\text{m}$ -Glasbeads

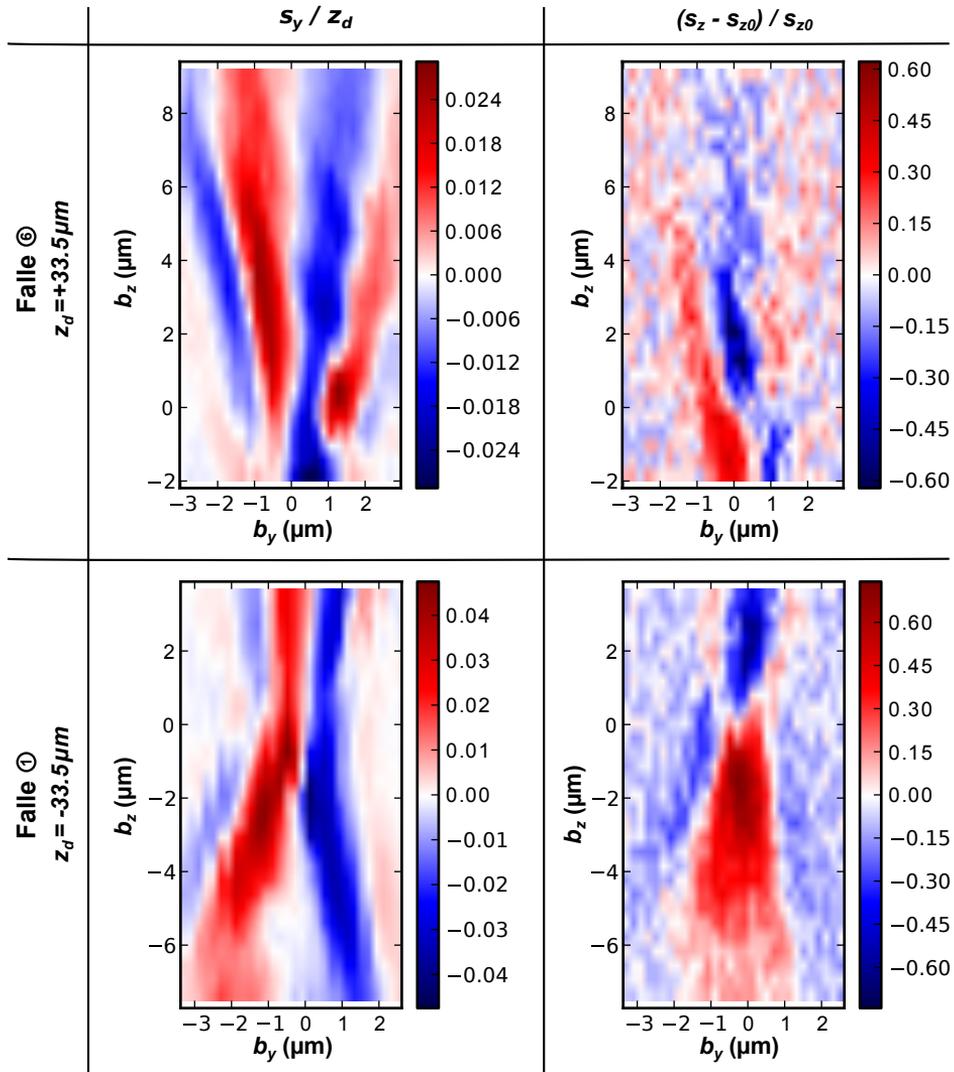


Abb. 6.3.5.: Laterale und axiale Positionssignale eines 1  $\mu\text{m}$ -Glasbeads ermittelt durch 2D-Scans durch die Fallen bei  $z_d = -33.5 \mu\text{m}$  und  $z_d = +33.5 \mu\text{m}$ .

## 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie

festgestellt werden, dass der Interferenzterm nicht nur von  $b_z$  sondern auch von  $z$  bzw.  $z_d$  abhängt. Es wäre möglich, dass sich die Sinus-Funktion für bestimmte, periodisch wiederkehrende  $z_d$  einem Extremum nähert und sich  $I_{is}$  nur in eine Richtung signifikant ändert.

**Linienprofil der Positionssignale** Aus den 2D-Positionssignalen der Abbildungen 6.3.3 bis 6.3.5 werden nun Linienprofile extrahiert, um die Signale für alle sechs Fallen besser vergleichen zu können. Dabei wird für  $S_y(b_y)$  der Bereich  $b_z = -1 \mu\text{m} \dots + 1 \mu\text{m}$  gemittelt, für  $S_z(b_z)$  der Bereich  $b_y = -1 \mu\text{m} \dots + 1 \mu\text{m}$ . Die daraus resultierenden Linienprofile sind in Abb. 6.3.6 dargestellt. Dabei wird der Verlauf der axialen Signale durch Regressionsfunktionen der Form  $S_z(x) = a - b(x - c) \exp(-(x - c)^2 / d)$  verdeutlicht ( $a, b, c, d \in \mathbb{R}$ ).

Es ist gut zu erkennen, dass das laterale Signal  $S_y = s_y/z_d$  eines Beads für alle Fallen sein Maximum bei  $b_y \approx -0.5 \mu\text{m}$  und sein Minimum bei  $b_y \approx 0.5 \mu\text{m}$  hat, unabhängig vom Abstand zur Probenebene  $z_d$ . Betrachtet man die Kurve der Falle bei  $z_d = 20 \mu\text{m}$  und vergleicht sie mit der rechnerisch ermittelten aus Abb. 6.2.3, lässt sich eine gute Übereinstimmung feststellen. Das betrifft sowohl die Signalamplitude als auch den eindeutigen Bereich zwischen Maximum und Minimum.

Allerdings ist auch ein Zusammenhang zwischen der Amplitude des lateralen Signals und  $z_d$  festzustellen, auf dessen Ursache bisher noch nicht eingegangen wurde. Obwohl der Lichtfleck auf der Detektorkamera mit wachsendem  $|z_d|$  immer größer wird, bleibt der Detektionsradius in der oben beschriebenen Auswertung konstant bei  $R = 6.9 \mu\text{m}$ . Der Grund für den fixen Radius ist technischer Natur und kann durchaus umgangen werden. Durch eine individuelle Wahl von  $R$  in Abhängigkeit von  $z_d$  sollten die Unterschiede in den Signalamplituden stark reduziert werden können.

Der Verlauf des axialen Signals  $S_z = (s_z - s_{z0})/s_{z0}$  weist für unterschiedliche  $z_d$  deutlich größere Unterschiede auf. Zum einen unterscheiden sich die Sensitivitäten um  $b_z = 0$  herum deutlich voneinander. Zum anderen ist der eindeutige Wertebereich unterschiedlich groß und teilweise nicht symmetrisch um  $b_z = 0$ . Die Signalamplitude ist im Vergleich mit dem berechneten Wert bei  $z_d = 20 \mu\text{m}$  nur etwa halb so groß.

6.3. Experimentelle Bestimmung der Positionssignale eines 1  $\mu\text{m}$ -Glasbeads

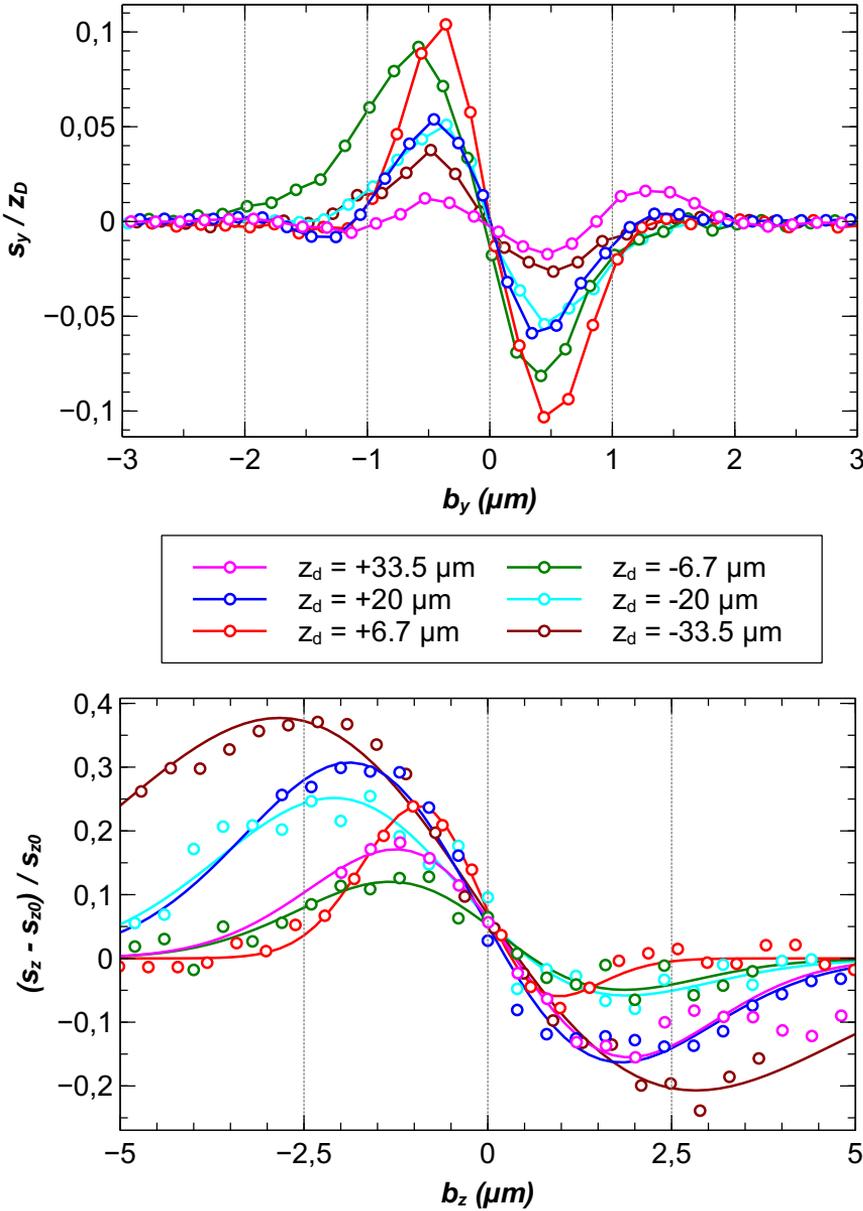


Abb. 6.3.6.: Gemittelte Linienprofile der lateralen (oben) und axialen (unten) Positionssignale für sechs verschiedene Fallen an unterschiedlichen z-Positionen.

## 6.4. Detektion von Zellmembranen

### 6.4.1. Abtasten eines Zellverbandes jenseits der Fokalebene der Objektivlinse

In Abschnitt 6.2 wurde hergeleitet, wie die Position eines einzelnen kleinen Streuers in einer optischen Falle zu einem lateralen und einem axialen Positionssignal führt. Untersucht man hingegen ein größeres, ausgedehntes Objekt mit einer beliebigen Brechungsindex-Verteilung wie z. B. eine Zelle, muss dieses Modell übertragen werden. Analog zu Abschnitt 2.1.2, in dem die optische Kraft auf biologisches Material erörtert wurde, kann das gesamte Volumen eines Fallenfokus auch als ein streuendes Volumen betrachtet werden, der - je nach Verteilung des Brechungsindex - um einen Vektor  $\mathbf{b}$  zum Fallenzentrum versetzt ist.

In Abb. 6.4.1-a ist das Durchlichtbild eines kleinen Zellverbandes aus drei RH-30-Zellen zu sehen. Die Querschnittebene dieser Zellen befindet sich  $20\ \mu\text{m}$  über der Fokalebene der Detektionslinse und wird daher nicht scharf abgebildet. In dieser Situation wäre es nicht möglich, Angriffspunkte allein aus dem Durchlichtbild zu bestimmen (wie in Abschnitt 2.1.3), an denen der Zellverband effizient mit optischen Kräften bewegt werden kann.

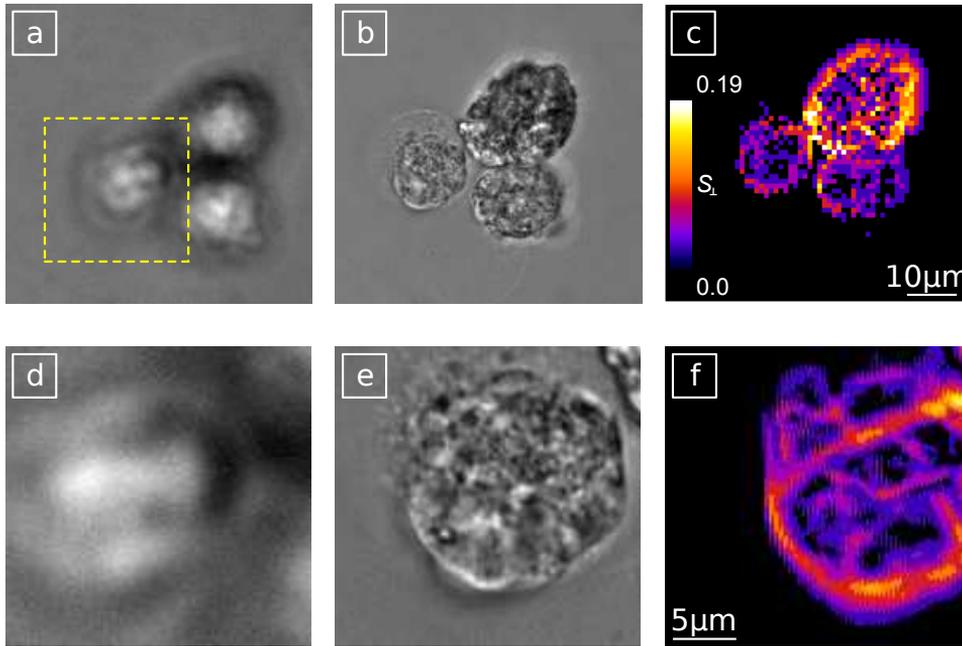
In einer solchen Situation kann dafür aber die Fokalebene-Interferometrie verwendet werden, indem ein Bereich der Probe mit einer optischen Falle abgetastet wird. Um das zu zeigen, wurde der Zellverbund mit Hilfe des Piezotischs in diskreten Schritten auf einem  $1\ \mu\text{m}$ -Raster durch eine optische Falle bewegt, die bei  $\mathbf{r} = (0, 0, 20\ \mu\text{m})$  platziert war. Ein Durchlichtbild dieser Ebene ist als Referenz in Abb. 6.4.1-b zu sehen. Für jeden Rasterpunkt wurden die Detektionssignale ermittelt und gespeichert.

Vor allem um eine bessere Visualisierung zu ermöglichen, soll mit

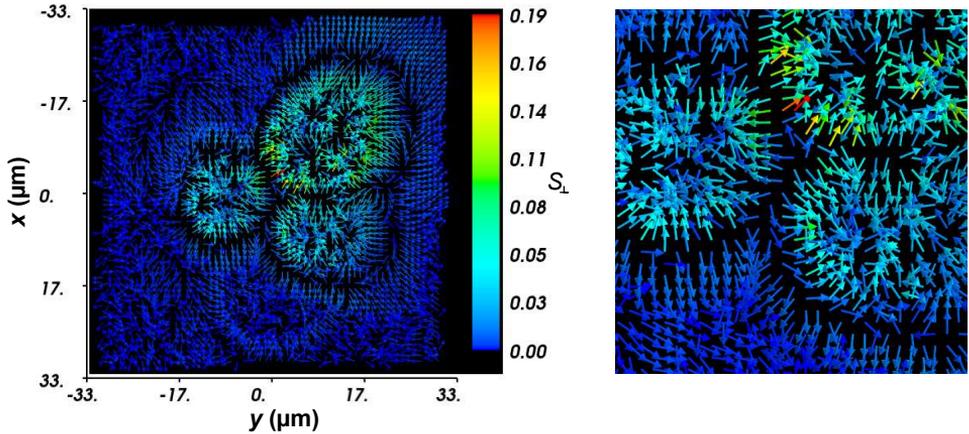
$$S_{\perp}(\mathbf{b}) = \sqrt{S_x^2(\mathbf{b}) + S_y^2(\mathbf{b})} \quad (6.11)$$

ein richtungsunabhängiges laterales Signal eingeführt werden. In Abb. 6.4.1-c ist  $S_{\perp}$  für die beschriebene Rasterung farblich kodiert aufgetragen.

In Abb. 6.4.1-f ist ein Teilbereich des Zellverbandes abgerastert worden, wobei die Rasterpunkte einen Abstand von nur noch  $0.5\ \mu\text{m}$  hatten. Die Bildteile -d und -e zeigen die entsprechenden Durchlichtbilder. Es ist deutlich zu sehen, dass sich mit diesem Verfahren auch kleine lokale Änderungen des Brechungsindex weit jenseits der Fokalebene des Detektionsobjektivs detektieren lassen. Strukturen innerhalb der Zellen und vor allem die Zellmembranen lassen sich eindeutig erkennen.



**Abb. 6.4.1.: Vergleich von Durchlichtbild und FP-interferometrischem Rasterbild.** (a) Durchlichtbild eines defokussierten Zellverbandes. (b) Durchlichtbild einer Ebene desselben Zellverbandes  $20\ \mu\text{m}$  über (a). Diese Ebene wird mit Hilfe der optischen Fallen abgetastet. (c) Laterale Signale  $S_{\perp}$  gewonnen aus einer Abtastung (Rasterschritte  $1\ \mu\text{m}$ ) des Zellverbandes in (a) mit einer Falle, die  $z_d = 20\ \mu\text{m}$  über der Durchlicht-Bildebene platziert ist. (d-f) Vergrößerung des in (a) markierten Bereichs. Die Abtastung folgt hier einem feineren Raster mit einer Schrittweite von  $0.5\ \mu\text{m}$ .



**Abb. 6.4.2.:** Vektorielle Darstellung der lateralen Signale  $\mathbf{S}_\perp$ . Das Detektionsverfahren erlaubt eine präzise Identifizierung von Zellmembranen und eine Prognose der x- und y-Komponenten einer optischen Gradientenkraft. Der rechte Bildteil zeigt einen Ausschnitt des abgerasterten Bereichs, in dem alle drei Zellen in Kontakt sind. Der Verlauf der Zellmembranen ist deutlich zu erkennen. Die Signalvektoren stehen senkrecht auf den Zellmembranen und ihr Betrag ist proportional zur ausübenden Gradientenkraft  $\mathbf{S}_\perp(\mathbf{b}) \propto \mathbf{F}_{\text{grad}}(\mathbf{b})$ .

Eine weiterer, signifikanter Mehrwert des Raster-Detektionsverfahrens besteht darin, dass für jeden abgetasteten Punkt eine Richtungsinformation gewonnen wird, die durch den lateralen Signalvektor

$$\mathbf{S}_\perp(\mathbf{b}) = \begin{pmatrix} S_x(\mathbf{b}) \\ S_y(\mathbf{b}) \end{pmatrix} \quad (6.12)$$

ausgedrückt wird. In Abb. 6.4.2 ist die Richtung der Vektorpfeile durch  $\mathbf{S}_\perp$  definiert, das Ende der Pfeile liegt auf dem Rastermesspunkt und ihre Farbe ist durch  $S_\perp = |\mathbf{S}_\perp|$  gegeben.

In dieser Darstellung wird offensichtlich, dass sich Strukturen wie Zellmembranen sehr gut identifizieren lassen, weil sich die Richtung der Signalvektoren stark ändert. Es können auch Membranen zwischen Zellen, die im Durchlichtbild nur schwer zu erkennen sind, ohne Probleme detektiert werden.  $\mathbf{S}_\perp$  steht in der Regel senkrecht auf der Zellmembran, da in dieser Richtung der Gradient des Brechungsindex groß ist, parallel zur Membran hingegen klein.

Der Reiz des Verfahrens liegt darin, dass in Bezug auf die Lichtstreuung für das Entstehen des Detektionssignals die gleichen Mechanismen wirken wie für das Entstehen einer optischen Gradientenkraft. Die Verwendung des Signals zum Aufspüren optimaler Angriffspunkte für optische Fallen drängt sich daher fast auf. Ist man an einer Prognose der optischen Gradientenkraft in eine bestimmte Richtung interessiert, kann die Richtung von  $\mathbf{S}_\perp$  als wichtiges Kriterium herangezogen werden. Analog zu Abschnitt 2.1.3 lässt sich die zu erwartende Gradientenkraft in einer Ebene parallel zur Bildebene

$$\mathbf{S}_\perp(\mathbf{b}) \propto \nabla \mathbf{n}(\mathbf{b}) \propto \mathbf{F}_{\text{grad}}(\mathbf{b}) \quad (6.13)$$

abschätzen.

### 6.4.2. Abtasten eines Zellverbandes entlang im Raum gekippter Ebenen

Bisher wurde ein zu untersuchendes Objekt immer in einer Ebene parallel zur Fokalebene der Objektivlinse abgerastert, um die Detektionssignale besser mit dem Durchlichtbild vergleichen zu können. Es ist jedoch ohne Weiteres möglich, beliebige Scantrajektorien in 3D abzutasten.

Ein typisches Szenario, das z. B. die Rotation eines Zellverbandes orthogonal zur Bildebene beinhalten kann, sieht folgendermaßen aus: Für mehrere optische Fallen sollen die optimalen Angriffspunkte, z. B. für eine Rotation um den Punkt  $\mathbf{r}_{\text{rot}} = (0, 0, 0)$  gefunden werden. Dafür soll jede Falle nacheinander eine Ebene abrastern, deren Normalenvektor in Rotationsrichtung zeigt, d. h. in Abhängigkeit der Fallenposition liegt diese Ebene im Allgemeinen schräg im Raum.

Für den Versuch in Abb. 6.4.3 wurden drei Fallen manuell im Abstand von  $z_d = 20 \mu\text{m}$  zur Bildebene am Rand eines Zellverbandes mit ca.  $80 \mu\text{m}$  Durchmesser platziert, dessen Durchlichtbild in Teilbild -a zu sehen ist. Von dort ausgehend tasteten sie eine quadratische Fläche mit einer Kantenlänge von  $27 \mu\text{m}$  (Rasterweite  $1.4 \mu\text{m}$ ) ab. Die Lage dieser Flächen im Raum ist ebenfalls in Teilbild -a zu sehen. Die Abtastung erfolgte im Unterschied zur Messung in Abschnitt 6.4.1 durch Platzierung der Fallen mit dem SLM.

In den Abb. 6.4.3-b bis -d sind die abgerasterten Flächen aus einer senkrechten Perspektive zu sehen. Die Farbkodierung entspricht den ermittelten Werten von  $S_\perp$ . In den Fällen (b) und (d) lässt sich sehr gut nachvollziehen, wo eine Zelle beginnt und wo umgebendes Medium ist. Im Fall (c) ist dieser Übergang nicht eindeutig, weil - wie im Durchlichtbild zu erkennen ist - im abgerasterten Bereich gar keine Zellmembran vorhanden ist.

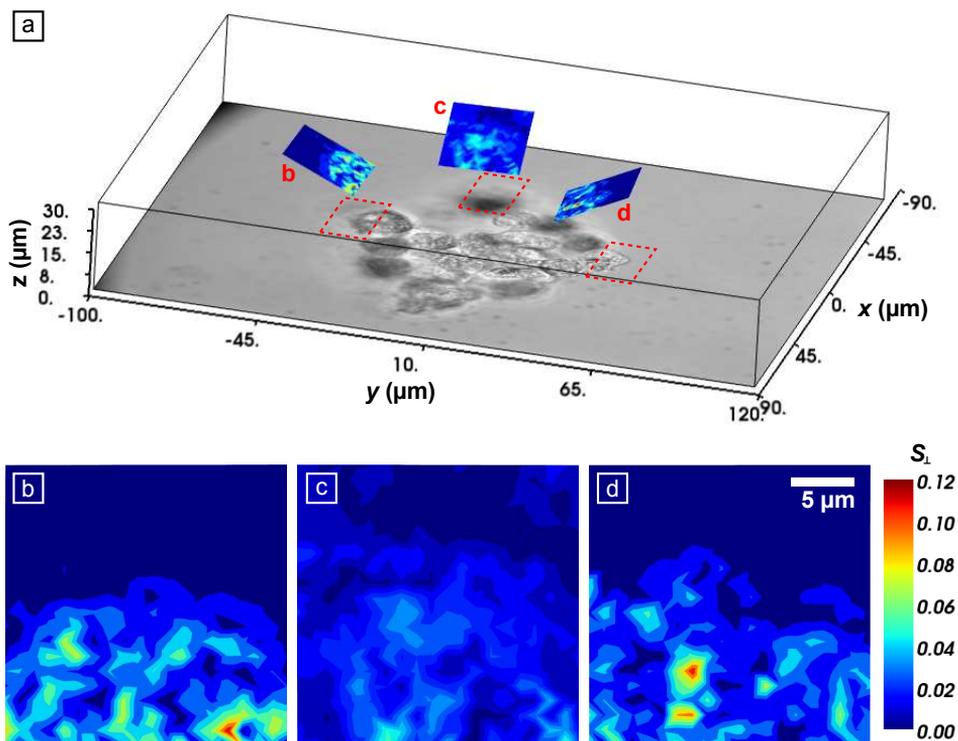


Abb. 6.4.3.: Abrastern eines Zellverbandes an drei Randbereichen, um optimale Angriffspunkte für eine Rotation des Zellverbandes zu finden. (a) Die Fallen überprüfen jeweils eine quadratische Fläche mit  $27\mu\text{m}$  Seitenlänge, deren Normalenvektoren in Rotationsrichtung zeigen. Das Durchlichtbild wurde bei  $z = 20\mu\text{m}$  aufgenommen, d. h. die abgebildete Ebene durchschneidet die abgerasterten Flächen mittig. Diese sind als rot gestrichelten Flächen auf das Durchlichtbild projiziert. (b-d) Projizierte Ansicht der abgerasterten Flächen. In den Fällen (b) und (d) schneiden die Flächen eine Zellmembran, im Fall (c) liegt eine Zelle unter der abgerasterten Fläche und liefert kein scharfes Abbild der Zellmembran.

Abtast-Trajektorien, die in ihren  $z$ -Koordinaten variieren, müssen selbstverständlich mit dem SLM angesteuert werden. Beschränkt man sich jedoch auf Ebenen parallel zur Fokalebene (FP) und tastet mit allen Fallen gleichzeitig ab, können auch die Scanspiegel (SM) oder der Piezotisch (PI) verwendet werden. Die Qualität der Signale ist mit allen drei Techniken nahezu identisch.

## 6.5. Diskussion

**Verwendbarkeit des Detektionsverfahrens** Das laterale FP-Interferometrie-Signal lässt sich ohne weiteres für die Positionsbestimmung von Beads in einer optischen Falle verwenden. Für kleine Auslenkungen in einer starken Falle kann  $S_y(\mathbf{b}_y)$  um  $b_y = 0$  herum durch eine Gerade beschrieben und damit linear genähert werden.

Das axiale Signal ist in der oben dargestellten Qualität eher für lokale Änderungen einer Streuerposition bzw. eines Brechungsindex zu verwenden. Für die absolute Positionsbestimmung eines Beads muss bei der Berechnung des Signals die  $z$ -Koordinate der Falle zusätzlich berücksichtigt werden. Möglicherweise führen kleine Änderungen  $\Delta b_z$  durch einen Phasenschub (sin-Funktion in Glg. 6.6) zu kleinen Änderungen in  $I_{is}$ , während große  $\Delta b_z$  durch eine Aufweitung des Lichtflecks (exp-Funktion in Glg. 6.6) zu großen Änderungen von  $I_{is}$  führen.

Besonders geeignet ist das Detektionsverfahren offensichtlich, um eine dreidimensionale Verteilung des Brechungsindex eines unregelmäßigen Objekts wie einer Zelle durchzuführen. Es ergänzt damit das Verfahren in Abschnitt 2.1.3, das die zweidimensionale Verteilung des Brechungsindex liefert. Durch die zusätzlich gewonnene Richtungsinformation ist nicht nur eine präzise, dreidimensionale Lokalisierung von Zellmembranen möglich, es ermöglicht auch eine Prognose der einzelnen optischen Kraftkomponenten.

Einschränkungen gibt es dahin gehend, dass sich die Lichtflecken zweier eng beieinander liegenden Fallen auf dem Detektor überschneiden. Das kann dazu führen, dass die Positionssignale einer Falle eine konstante Abweichung vom normalen Wert aufweisen. Für Fallen nahe bei  $z = 0$  wird das Signal-Rausch-Verhältnis schlecht. Des weiteren gibt es - bedingt durch die Blende AP1 - einen Bereich, in dem eine Falle überhaupt nicht platziert werden kann.

Das bedeutet für das oben beschriebene Szenario, bei dem das Detektionsverfahren dafür verwendet wird, einen optimalen Angriffspunkt für optische Fallen zu finden, dass ein feste Vorschrift für erlaubte Fallenpositionen von Nöten ist. Angesichts des zur Verfügung stehenden

## 6. Positionsbestimmung mittels konjugierter Fokalebene-Interferometrie

Volumens ist das jedoch nur eine Frage der Implementierung und sollte die Funktionsfähigkeit eines Manipulators nicht entscheidend einschränken. Es besteht immer die Möglichkeit, während der Detektionsphase mit Hilfe des SLM für einzelne Fälle abzublenden und damit den Durchmesser des entsprechenden Lichtflecks zu verringern. Beim Abblenden einer detektierenden Falle muss also eine verringerte Sensitivität in Kauf genommen werden. Beim Abblenden einer benachbarten Falle muss berücksichtigt werden, dass deren optische Fangkräfte reduziert werden.

**Vergleich mit Video-Tracking** Herkömmliches Video-Tracking mit kollimierter Beleuchtung hat sich zur Positionsbestimmung von vereinzelt Beads bewährt. Entscheidend ist, dass der Interferenzanteil des Feldes auf den Ursprung eines Kugelstreuers mit bekannten Eigenschaften (Größe, Brechungsindex) zurückgeführt werden kann. Das ist in der Regel aber nur möglich, wenn verschiedene Beads nicht zu nahe beieinander liegen und vor allem wenn sich keine anderen streuenden Objekte in der Nähe befinden.

Mit Blick auf diese Problematik zeigt sich die FP-Interferometrie deutlich robuster. Natürlich trägt der Fokus des Fallenlichts mit seinen hohen Intensitäten sehr viel mehr zum interferierenden Feld bei als die Bereiche davor oder danach entlang der optischen Achse. Streuer, die sich knapp neben dem Fokus befinden, tragen überhaupt nicht zu einer Änderung des Interferenzterms bei. Der Einfluss auf ein Positionssignal ist räumlich viel stärker begrenzt.

Insbesondere für das Ertasten von Zellmembranen oder anderen, unregelmäßigen Objekten ist ein weiterer Punkt von Bedeutung: Beim Video-Tracking ist die Geometrie des Beads als Referenz von zentraler Bedeutung (siehe z. B. Lee und Grier, 2007, Abb. 3). Bei der FP-Interferometrie ist es die Geometrie der Falle! Bewegt sich eine Zellmembran in den Fallenfokus hinein, so ändert sich das Abbild der Falle auf der Detektionskamera (ähnlich zu Abb. 6.3.2) und nicht das komplizierte Abbild der Membran. Dadurch ist die gleiche Art und Weise der Signalerzeugung für eine viel größere Spannbreite von Objekten zu verwenden.

**Vergleich mit BFP-Tracking** Mit Blick auf die beiden Abbildungen 6.1.1 und 6.3.6 fällt auf, dass die lateralen Positionssignale bei BFP-Tracking und FP-Interferometrie einen sehr ähnlichen Verlauf haben. In beiden Fällen werden die Signale aus der Verschiebung des Intensitätsschwerpunkts des interferierten Fallenlichts ermittelt, jedoch in zueinander reziproken Ebenen.

Die Positionsbestimmung eines Beads mit Hilfe des BFP-Trackings ist

in der Regel exakter, da die gestreute Intensität auf eine größere Fläche verteilt wird und mit einer höheren örtlichen und zeitlichen Auflösung (z. B. mit Hilfe einer InGaAs-Quadranten-Photodiode) gemessen werden kann. Die Positionsbestimmung mehrerer Beads in 2D ist durch ausgefeiltes zeitliches Multiplexen zwar möglich (Ruh et al., 2011), mit der FP-Interferometrie können jedoch eine Vielzahl optischer Fallen gleichzeitig ausgewertet werden.

**Verbesserungen** Abhängig von der Anzahl und der Position der optischen Fallen kann die Intensität auf der Detektorkamera sehr unterschiedlich ausfallen. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde die Belichtungszeit vor einer Messung in mehreren Schritten automatisch angepasst, sodass das Abbild aller Fallen zu keiner Sättigung führt. Ein Detektionsvorgang würde deutlich schneller von statten gehen, wenn die optimale Belichtungszeit aus der Anzahl der Fallen und dem kleinsten  $|z_d|$  rechnerisch bestimmt würde. Optional kann die Belichtungszeit auch nur für eine Falle optimiert werden, falls nur deren Signale gerade von Bedeutung sind.

Um dem Abfall der Sensitivität für  $|z_d| \rightarrow 0$  zu begegnen und um das Problem der Überlagerung von Lichtflecken benachbarter Fallen zu reduzieren, könnte das Fallenlicht auch in zwei unterschiedlichen Ebenen auf die Detektionskamera abgebildet werden. Mit Hilfe eines 50/50-Strahlteilers könnten beispielsweise die Ebenen bei  $z = \pm 20 \mu\text{m}$  nebeneinander abgebildet werden. Damit stünde immer ein ausreichend großer Lichtfleck zur Auswertung zur Verfügung.

Für die Positionsbestimmung von Beads bekannter Größe und bekannten Brechungsindex kann die Präzision des Detektionsverfahrens vor allem in axialer Richtung verbessert werden, indem die Intensität auf der Detektorkamera nicht über einen Bereich integriert wird, sondern das Interferenzmuster an eine berechnete Verteilung gefittet wird, so wie es beim Video-Tracking üblich ist (Lee und Grier, 2007). Es ist allerdings damit zu rechnen, dass diese Prozedur zeitlich aufwändiger ist und für eine möglichst hohe zeitliche Auflösung nachträglich auf gespeicherten Kamerabildern ausgeführt werden muss.



# 7. Abschließende Diskussion

## 7.1. Zielerreichung

In Abschnitt 1.2.1 der Einleitung wurden fünf konkrete Ziele formuliert, die an den *optischen Manipulator* gestellt wurden, um als nützliches – vielleicht sogar mächtiges – Instrument zur Untersuchung komplexer biologischer Fragestellungen bezeichnet werden zu können. Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln auf die einzelnen Charakteristika detailliert eingegangen wurde, soll nun noch einmal kurz und prägnant überprüft werden, welche der Ziele als erreicht angesehen werden können.

**A) Stabiles Halten von biologischen Objekten mit optischen Fallen für hochauflösende Lichtmikroskopie** Es wurde an verschiedenen biologischen Objekten gezeigt, dass diese mit optischen Fallen angehoben und gehalten werden können. Dabei ist auch deutlich geworden, dass Stabilität an dieser Stelle kein Problem darstellt, solange der gehaltene Organismus seine räumliche Struktur nicht verändert. Vielmehr ist es typischerweise so, dass sich fast automatisch ein stabiles optisches Kraftgleichgewicht einstellt, indem sich das Objekt eine energetisch günstige Lage relativ zu den Fallen „sucht“. Die Situation kann nur dann wieder instabil werden, wenn sich die Positionen der Fallen ändern.

**B) Versetzen und Rotieren von Objekten** Eine zuverlässige und stabile Translation und Rotation parallel zur Bildebene konnte für Objekte bis zu einem Durchmesser von 150  $\mu\text{m}$  gezeigt werden. Als wirksamstes Verfahren hat sich dabei das gezielte Angreifen an Stellen mit hohem Brechungsindexgradienten (selektiver Falleneinsatz) unter Ausnutzung optischer Gradientenkräfte herausgestellt. Eine Rotation senkrecht zur Bildebene ist deutlich schwieriger, sie gelang für Objekte bis zu einem Durchmesser von 80  $\mu\text{m}$ . Hier stellten sich aufgrund ständig ändernder Streukräfte und optischer Drehmomente oft instabile Konstellationen zwischen Fallen und Objekt ein, sodass bei vielen Versuchen keine präzise Rotation um 360° durchgeführt werden konnte.

## 7. Abschließende Diskussion

Um dieses Problem zu überwinden, wurde ein Verfahren beschrieben, bei dem jede einzelne Falle fortlaufend mit Blick auf ihre Wirksamkeit bewertet und gegebenenfalls ihr Position und Intensität angepasst wird. Das Verfahren wurde teilweise implementiert.

Eine weniger präzise Rotation, bei der lediglich die Rotationsrichtung und -dauer bestimmt werden kann, jedoch keine exakte Winkel gewählt werden können, konnte unter Ausnutzung gerichteter Streukräfte für Objekte bis 70  $\mu\text{m}$  gezeigt werden. Es wurde für größere Objekte noch nicht angewendet, müsste aber gerade für diese besonders geeignet sein.

**C) Verwendbar für einzelne Zellen, aber auch für größere Zellverbände oder kleine Embryos** Das Fangen von kleinen Objekten (bis einige  $\mu\text{m}$ ) ist eine etablierte Technik und wurde bereits vielfach publiziert. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit einzelne Zellen manipuliert werden, angefangen von Hefezellen, über B-Zellen bis hin zu Pflanzenprotoplasten. Protoplasten können sehr unterschiedlich groß sein. Auf sie sind alle Fähigkeiten des Manipulators anwendbar, sie stellen daher ein sehr vielversprechendes Forschungsobjekt dar. Am oberen Ende der Skala konnten Zellhaufen bis 80  $\mu\text{m}$  Durchmesser manipuliert werden, mit Einschränkungen auch Objekte mit über 150  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Größere Objekte wurden allerdings noch nicht systematisch untersucht.

**D) Mechanische oder biochemische Stimulation von Objekten** Die mechanische oder biochemische Stimulation biologischer Organismen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr systematisch untersucht werden. Zwar wurden Zellorganellen von Protoplasten mechanisch stimuliert, es wurden aber keine biologischen Auswirkungen auf den Gesamtorganismus untersucht. Es wurden auch keine lokalen Stimulationen mit chemischen Substanzen vorgenommen. Es wurde jedoch auf die Möglichkeit hingewiesen, Beads mit biochemisch aktiven Molekülen zu beladen. Damit ist aus technischer Sicht eine chemische Stimulation einfach zu realisieren. Dafür muss lediglich eine weitere Falle gesteuert werden, die ein Objekt beispielsweise direkt mechanisch stimuliert oder ein Kügelchen mit einer biochemisch aktiven Substanz an das Objekt heranführt.

**E) Optisches Sortieren von Suspensionszellen** Das Sortieren von einzelnen Zellen mit Hilfe optischer Gradientenkräfte wurde auf dem gleichen Versuchsaufbau realisiert. Damit steht ein relativ günstiges Laborgerät zur Verfügung, das zum Sortieren kleiner Populationen bis  $10^5$  Zellen geeignet ist

## 7.2. Vorschlag für Manipulation mit Fallenkorrektur

und potentiell auch seltene Phänotypen aussortieren kann, da es nicht viele Ereignisse zur Kalibrierung benötigt. Zellen wurden anhand von Merkmalen im Durchlicht- und im Fluoreszenzbild klassifiziert.

### **Detektionsverfahren zur Positionsbestimmung und Kraftprognose in 3D**

Es wurde ein Detektionsverfahren entwickelt, das eine Positionsbestimmung von Zellstrukturen in 3D erlaubt und das bei mehreren Fallen gleichzeitig zum Einsatz kommen kann. Auch wenn der Zweck des Verfahrens hauptsächlich darin besteht, Informationen für eine sichere Manipulation von großen biologischen Objekten zu ermöglichen, ist es durchaus auch für weitere Anwendungen geeignet. So kann die Kraft, die eine optische Falle an einer bestimmten Stelle eines Objekts ausüben wird, prognostiziert werden. Eine Positionsbestimmung von Beads, wie sie von anderen Verfahren bekannt ist, ist ebenfalls möglich.

## **7.2. Vorschlag für Manipulation mit Fallenkorrektur**

In Kap. 5 wurde detailliert erläutert, dass für eine präzise Manipulation von großen Objekten der selektive Einsatz von optischen Gradientenkräften der beste Ansatz ist. Es wurde aber auch darauf hingewiesen, dass Streukräfte und optische Drehmomente dafür sorgen, dass während einer Rotation senkrecht zur Bildebene destabilisierende Kräfte wirken, die sich ständig verändern. Deshalb ist es besonders wichtig, dass bei jeder Falle die Gradientenkräfte dominieren und zu einem Punkt hinwirken, der das Objekt stabilisiert. Je mehr Fallen im Einsatz sind, desto schwieriger ist ihr Zusammenspiel. Dafür müsste während der Rotation eines Objekts die Wirkung jeder Falle fortlaufend bewertet und ihre Position dementsprechend angepasst werden. Dieser Vorgang sollte selbstverständlich automatisch geschehen – der Nutzer sollte lediglich eine gewünschte Raumlage angeben müssen. Als Ausblick soll im Folgenden ein Vorschlag unterbreitet werden, wie solch ein Verfahren umgesetzt werden kann.

Ein biologisches Objekt wird dabei zunächst mit mindestens drei Fallen gegriffen, die alle in der Bildebene platziert werden. Die Auswahl der Angriffspunkte erfolgt dabei automatisch durch Analyse des Durchlichtbildes wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Nachdem die Fallen um einige Grad rotiert wurden und sich dadurch von der Bildebene entfernt haben, muss mit einer Destabilisierung des Objekts gerechnet werden.

Ein einfaches Szenario besteht darin, nacheinander jene Fallen, die sich bereits weit von der Bildebene entfernt haben, auszuschalten und durch neue

## 7. Abschließende Diskussion

in der Bildebene zu ersetzen, deren Position wieder durch die Analyse des Durchlichtbildes erfolgt. Die Fallen befinden sich bei dieser Strategie also immer nur in einem gewissen Bereich über- und unterhalb der Bildebene und an den Rändern des Objekts. Dadurch wird wenig Fallenlicht gestreut, wodurch zum einen nur geringe Streukräfte wirken und zum anderen die Analyse des Streulichts einfacher ist.

Die komplexere, aber auch elegantere Variante besteht darin, einen einmal gewählten Angriffspunkt so lange wie möglich beizubehalten. Jede Falle wird aber regelmäßig überprüft (z. B. nach Wanderung um  $5^\circ$ ) und ihre Position korrigiert. Dabei kommt das Raster-Detektionsverfahren aus Abb. 6.4.3 zum Einsatz, das prognostiziert, an welcher Stelle hohe Gradientenkräfte wirken. Dadurch wird fortlaufend sichergestellt, dass die einzelnen Fallen nicht gegeneinander arbeiten, und eine fatale Situation, in der die Streukräfte bei einer Falle größer werden als die Gradientenkräfte, erst gar nicht entsteht.

Allerdings wurde bereits deutlich, dass die Prognose der optimalen Fallenposition schwierig wird, wenn das Licht einer Falle vom Objekt stark gestreut wird, was vor allem für Fallen von Belang ist, die oben oder unten an einem Objekt angreifen. Hier sind Weiterentwicklungen am Analysealgorithmus notwendig, beispielsweise indem die Streuung berücksichtigt und teilweise kompensiert wird. Alternativ können die Reduzierung der Kohärenzlänge des Fallenlichts oder andere technische Maßnahmen in Betracht gezogen werden.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz besteht darin, nicht nur die Position der einzelnen Fallen zu korrigieren, sondern auch deren Intensität. Da das Detektionssignal ein Maß für die potentielle Kraftausübung ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine Falle mit 10 % kleinerem Signal an einer Stelle mit 10 % kleinerer lokaler Polarisierbarkeit angreift ( $S_{\perp}(\mathbf{b}) \propto \nabla n(\mathbf{b})$ ). Indem die Intensität (und damit der Intensitätsgradient) dieser Falle um 10 % erhöht wird, kann sie die gleiche Kraft wie die anderen Fallen aufbringen, wodurch die Raumlage eines Objekts stabiler wird.

Das beschriebene Verfahren ist zum großen Teil bereits implementiert und eine Anpassung des Versuchsaufbaus ist nicht notwendig. Lediglich die Analyse der Raster-Detektionssignale für die Bestimmung neuer Angriffspunkte muss verbessert werden.

# A. Anhang

## A.1. Symbole

Symbol	Beschreibung	Einheit
$\alpha$	Öffnungswinkel einer Linse	rad
$\alpha_0, \alpha_s$	Polarisierbarkeit eines Streuers	$\text{m}^3$
$\alpha'$	Absorptionsindex	
$a$	Partikelradius	m
$\mathbf{b}$	Positionsvektor relativ zu Fokuszentrum	m
$\mathbf{B}$	magnetische Flussdichte	$\text{Vs}/\text{m}^2$
$c$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum	$\text{m}/\text{s}$
$C$	Streuquerschnitt	$\text{m}^2$
$d$	Strahlauslenkung, Versatzdistanz	m
$D$	Aperturradius	m
$\epsilon_0$	Vakuumpermittivität	$\frac{\text{As}}{\sqrt{\text{m}}}$
$E, \mathbf{E}$	Elektrische Feldstärke	$\text{V}/\text{m}$
$\tilde{E}$	E-Feld im k-Raum	$\text{V m}$
$\phi$	Phase einer elektromagnetischen Welle	rad
$f$	Brennweite	m
$F, \mathbf{F}$	Kraft	N
$\hbar$	Plancksches Wirkungsquantum	J s
$h$	Greensche Funktion	
$H$	Propagator im Frequenzraum	
$I$	Intensität	$\text{W}/\text{m}^2$
$\mathfrak{I}$	Intensität auf Kamera	$\text{W}/\text{m}^2$
$k$	Wellenzahl	$\text{m}^{-1}$
$\mathbf{k}$	Wellenvektor	$\text{m}^{-1}$
$\lambda$	Wellenlänge	m
$M$	Vergrößerung	
$\eta$	Versatzeffizienz	
$\eta_0$	dynamische Viskosität	$\text{Pa s}$
$n$	Brechungsindex	

## A. Anhang

$\Omega$	Flächenelement	$\text{m}^2$
$\mathbf{p}$	Dipolmoment	$\text{C m}$
$\Delta\mathbf{p}$	Impulsänderung	$\text{N s}$
$p_{\text{CCD}}, p_{\text{SLM}}$	Pixelraster	$\text{m}$
$P$	Leistung	$\text{W}$
$r_A$	Reflexionskoeffizient (Amplitude)	
$\mathbf{r}$	Ortsvektor	$\text{m}$
$\rho$	Ortsvektor in Pupillenebene	$\text{m}$
$s_x, s_y$	laterale Positionssignale	$\text{m}$
$s_z$	axiales Positionssignal	$\text{W}/\text{m}^2$
$S$	Streuungsfunktion	
$S_x, S_y, S_z$	gewichtete Positionssignale	
$\theta$	Einfallswinkel eines Lichtstrahls	$\text{rad}$
$\tau$	Versatzdauer	$\text{s}$
$t$	Zeit	$\text{s}$
$T$	Periodendauer	$\text{s}$
$u, v$	Ortskoordinaten in Pupillenebene	$\text{m}$
$U$	Spannung	$\text{V}$
$v$	Geschwindigkeit	$\text{m}/\text{s}$
$V$	Volumenelement	$\text{m}^3$
$w$	Strahlweite (halber Durchmesser)	$\text{m}$
$x, y, z$	räumliche Koordinaten	$\text{m}$

## A.2. Abkürzungen

Abk.	deutsche Bezeichnung	englische Bezeichnung
BF	Durchlicht	bright field
BFP	hintere Brennebene	back focal plane
BT	Strahlfalle	beam trap
DC	Farbteiler	dichroic mirror
FL	Fluoreszenz	fluorescence
NA	numerische Apertur	numerical aperture
OL	Objektivlinse	objective lens
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	phosphate buffered saline
PFM	photonisches Kraftmikroskop	photonic force microscope
PSF	Punktbildfunktion	point spread function

### A.3. Optischen Komponenten und Geräte

Abk.	Funktion	Hersteller	Modell
LA	Laser	Alphas	Monopower-1064-10W-SM
M	Spiegel	diverse	
BT	Strahlfalle	selbstgebaut	
AP	Blende	selbstgebaut	
DC	Farbteiler	Laser Components	
DL	Detektionslinse	Zeiss	
EF	Anregungsfilter	Zeiss	
BF	Durchlichtquelle	Lumileds	Luxeon I
LH	$\lambda/2$ -Platte	Thorlabs	
ND	Graufilter	Thorlabs	
BE	Strahlaufweiter	Linos	
SM	Scanspiegel	GSI	VM500+
TL	Tubuslinse	Zeiss	
CCD	CCD-Kamera	Zeiss	
DF	Detektionsfilter	Zeiss	
DI	Diffusor	Zeiss	
PBS	Polarisationsstrahlteiler		
RD	Referenzdiode	TEM	
SLM	Spatialer Lichtmodulator	Holoeye	Pluto
SL	Scanlinse	Zeiss	
OL	Objektivlinse	Zeiss	C-Apochromat 40x, NA 1.2
FL	Fluoreszenzlichtquelle	Zeiss	HXP120
PI	Piezotisch	MCL	Nanoview300
CCD2	CCD-Kamera	Prosilica	GC1350H
BO	Bolometer	Coherent	PowerMax PM10

### A.4. Justage des Strahlengangs

**Bemerkungen** Alle Schienen werden mit den Positionierwinkeln am Raster des optischen Tisches ausgerichtet.

Die Justage erfolgt am besten mit dem Beam Profiler (BP), vor allem vor den beiden BE. Dieser kann reproduzierbar auf Schiene aufgesetzt werden. Die Position der optischen Achse auf dem CMOS-Chip kann ermittelt werden, indem ein aufgeweiteter Strahl auf eine runde Detektorkarte mit Loch gerichtet wird. Der BP steht direkt dahinter. Mit langer Belichtungszeit sind

## A. Anhang

alle Pixelwerte maximal und der gemessene Intensitätsschwerpunkt entspricht der Position der optischen Achse.

Der Strahl muss durch  $\lambda/2-1$  und PBS1 abgeschwächt werden.

### Fallenerzeugung

1. Strahlhöhe an Position von M1 durch Unterlegen der Schiene 1 justieren (ohne M1).
2. M1 verschieben und verkippen, sodass der Laserspot direkt hinter M1 und an Pos3 auf der optischen Achse liegt (ohne PBS2).
3. PBS2 verschieben und verkippen, sodass der Laserspot direkt hinter PBS2 und Pos1 auf der optischen Achse liegt (ohne BE1, M2, BE2 und SLM).
4. BE1 einsetzen und Strahl auf 3.8 mm direkt hinter BE1 aufweiten.
5. Strahl mit Scherplatte (SP) hinter BE1 auf maximale Kollimation einstellen.
6. BE2 einsetzen und Strahl auf 8.6 mm aufweiten.
7. Strahl mit SP hinter BE2 auf maximale Kollimation einstellen.

Für die folgenden Punkte sollte der Laser im Feedback betrieben werden, um eine möglichst gute Richtungsstabilität zu gewährleisten.

8. Feinjustage von PBS2 durch Verkippen, sodass der Laserspot an Pos1 auf der optischen Achse liegt (ohne SLM).

Für die Justage nach dem SLM sollte ein Hologramm angezeigt werden, das einen dünnen Strahl erzeugt, der aber noch gut sichtbar ist. Ein Kreis mit 100 Pixel Radius ist passend. Wird das Strahlprofil in der BFP betrachtet, ist ein weiterer Ring hilfreich, der in der BFP einen etwas kleineren Radius als die BFP hat.

9. SLM so auf Schiene 4 verschieben, dass der Strahl mittig auf den SLM trifft. Dafür kann der BP mit 0.5 x-Teleobjektiv (M0.5) verwendet werden.
10. SLM durch Drehen und Unterlegen von Streifen aus Metallfolie verkippen, sodass der Laserspot am Ende von Schiene 4 auf der optischen Achse liegt (ohne L1).

11. M7 grob positionieren, sodass der Strahl möglichst entlang der optischen Achse von Schiene 5 verläuft. Dafür die Detektorkarte verwenden und temporär ein kurzes Schienenstück hinter M7 aufstellen.
12. L1 und L2 gemäß ihrer Brennweiten einsetzen.

Der Strahlengang zwischen SM und OL wird separat justiert:

13. DC2 wird grob justiert, indem die OL entfernt wird und ein Spot, der durch die Mikroskopbeleuchtung bei geschlossener Feldblende erzeugt wird, den Rearport auf der optischen Achse verlässt. Dafür kann temporär eine Schiene verwendet werden.
14. DC1 kann ebenso grob justiert werden.

Jetzt werden die beiden Teilstrahlengänge aufeinander abgestimmt. Das Strahlprofil in der BFP wird am besten beobachtet, indem ein Objektivdummy eingeschraubt wird und an diesem eine Aufnahmeplatte mit Reiter und Schiene durch mindestens drei Madenschrauben sicher befestigt wird. Auf diese Schiene kann der BP mit M0.5 gesetzt werden. Eine Blende mit Durchmesser 9.8 mm dient als Referenz für die Position des Strahls.

15. M4 wird grob justiert, sodass der Strahl auf der vorgesehenen Position durch den Boden der Rearportbox tritt.
16. Der SM bei 0 V Steuerspannung so positioniert, dass der kleinere der beiden Spiegel den Strahl symmetrisch um die BFP-Blende herum beschneidet. Das Intensitätsprofil wird erst danach angepasst!
17. Durch Verschieben von M4 und des SLM auf seiner Schiene und durch Verstellen von M7 kann das Intensitätsprofil mittig in die BFP verschoben werden.

An dieser Stelle kann der kurze Strahlengang ohne SLM bequem eingestellt werden:

18. Es ist hilfreich, M2 und M3 vorher auf eine Auslenkung in rechtem Winkel einzustellen, indem M3 entfernt wird und die Spotposition an Pos2 mit der Detektorkarte geprüft wird. M2 wird durch M3 ersetzt und dieser ebenfalls eingestellt. Anschließend werden beide eingesetzt und verschoben und verkippt bis das Strahlprofil in der BFP mittig ist.
19. Die Position der SL wird so korrigiert, dass der Strahl in der BFP kollimiert ist (mit SP prüfen).

## A. Anhang

Zurück zum SLM-Strahlengang:

20. Nun kann die Position von L2 korrigiert werden, damit der Strahl in der BFP ebenfalls kollimiert ist.
21. Die Position des Hologrammzentrums in MicPy kann jetzt ermittelt und gespeichert werden.
22. Die Blende vor den SM, die die Rückseite der OL schützt, kann jetzt eingesetzt und ausgerichtet werden.

Jetzt kann die OL eingeschraubt, die Piezostage (PI) aufgesetzt und ein Coverslip (CS) mit Wasser geladen werden.

23. Für die Positionierung der Kamera wird ein Bead mit einem Durchmesser von ca. 300 nm gefangen. Das Bead sollte auf der Kamera scharf abgebildet sein und dunkler als der Hintergrund erscheinen.

Nun kann M6 eingesetzt und justiert werden, indem viele Fallen um die 0. Beugungsordnung (BO) herum platziert werden und M6 eine möglichst kleine Fläche einschließlich der 0. BO verdeckt.

Abschließend können die Koordinatensysteme von MicPy kalibriert werden.

### **Detektionseinheit**

24. Zunächst die Mikrometerschrauben nach Augenmaß einstellen. Die Detektionseinheit sollte parallel zur Piezostage ausgerichtet werden.
25. Lichtleiter der Fluoreszenzbeleuchtung durch eine Taschenlampe ersetzen. Detektionseinheit mit Mikrometerschrauben lateral nachjustieren, sodass die Beleuchtung mittig durch die Detektionslinse (DL) geht.
26. L3 und auf dieser Schiene folgende Optiken werden entfernt und der Strahlverlauf mit dem BP auf Schiene 7 über die Mikrometerschrauben feinjustiert.
27. Abschließend können L3, BS1, BS2 und BS3 eingesetzt werden.

## **A.5. OpenGL Shader Code**

## A.5. OpenGL Shader Code

```

#version 120                                // backwards compatibility
const float pi = 3.141;
const vec4 white = vec4(1.0, 1.0, 1.0, 1.0);
const int maxn = 100;                       // spots maximum
uniform int n = 1;                          // number of spots
uniform vec3 spots[maxn];                  // (x, y, z) in meters
uniform vec2 props[maxn];                 // (aperture, intensity) in ratios of 1.0
uniform float offset[maxn];               // phase offset for spots
uniform float lambda = 1.064e-6;          // wavelength in meters
uniform float pixelsize = 8e-6 * 1.32;    // pixel size in back focal plane in meters
uniform float f = 4.11e-3;                // focal length of lens in meters
uniform vec2 size = vec2(1080, 1080);     // size of hologram in pixels
uniform vec2 center = vec2(540, 540);     // beam center position on hologram
uniform vec2 axisangle = vec2(0, 0);      // incident angle of beam on hologram
uniform float aperture = 540;             // aperture radius in pixels
uniform float zernikeCoeff[12];          // Zernike coefficients for aberration correction
uniform float na = 1.2;                   // numerical aperture of lens
uniform float nm = 1.33;                  // refractive index of medium

void main(void)
{
    // texture ranges from 0 to 1 in x and y (see SLMFrame.OnDraw())
    vec2 texture = gl_TexCoord[0].xy;

    // coordinates on SLM in pixels from center
    vec2 pix = (texture * size - center);

    // pixel count for intensity control
    float count = abs(pix.x) * size.x + abs(pix.y);

    // polar coordinates:
    // radius on SLM from center in meters, angle in radians
    vec2 rho = pix * pixelsize * cos(axisangle);
    float rho2 = dot(rho, rho);
    float angle = atan(rho.y, rho.x);

    // Zernike radius ranges from -1 to +1 within aperture
    float zer = length(pix) / aperture;
    float zer2 = zer * zer;

    // wave number
    float k0 = 2.0 * pi / lambda;

    // complex field
    vec2 field = vec2(0.0, 0.0);

    // only if within aperture
    if (length(pix) <= aperture) {
        // Some (older) graphic cards need a fixed boundary in for loops:
        // n -> maxn and break for-loop as soon as i == n
        for(int i=0; i<maxn; i++){
            if (i < n) {
                float intensity = props[i].y;
                if (mod(count, 1.0 / intensity) < 1) {
                    vec3 r = spots[i].xyz;
                    float aper = props[i].x;
                    if (length(pix) <= aper * aper) {
                        // prism (lateral)
                        float phi = k0 / f * dot(rho, r.xy);

                        // and lens (axial)
                        phi += nm * k0 * r.z * sqrt(1 - zer2);
                        // previous line can be replaced by following line
                        // for Fresnel approximation
                        //phi += nm * k0 * r.z * (1 - zer2/2);

                        // add phase offset
                        phi += offset[i];

                        // sum up electric field
                        field += vec2(cos(phi), sin(phi));
                    }
                }
            }
        }
    } else {
        continue;
    }
}

```

## A. Anhang

```
    }  
}  
float phase = 0.0;  
if (field.x != 0.0) {  
    phase = atan(field.y, field.x);  
  
    // correction of spherical aberrations  
    float zernike02 = 2 * zer2 - 1;  
    float zernike04 = 6 * zer2*zer2 - 6 * zer2 + 1;  
    float zernike06 = 20 * zer2*zer2*zer2 - 30 * zer2*zer2 + 12* zer2 - 1;  
    phi += zernikeCoeff[3] * zernike02;  
    phi += zernikeCoeff[8] * zernike04;  
    phi += zernikeCoeff[11] * zernike06;  
  
    // correction of astigmatism  
    float zernike22 = rho2;  
    phi += zernikeCoeff[4] * zernike22 * cos(2 * angle);  
    phi += zernikeCoeff[5] * zernike22 * sin(2 * angle);  
  
    // correction of coma  
    float zernike13 = 3 * zer2 * zer - 2 * zer;  
    phi += zernikeCoeff[6] * zernike13 * cos(angle);  
    phi += zernikeCoeff[7] * zernike13 * sin(angle);  
}  
phase = mod(phase + pi, 2*pi) - pi;  
gl_FragColor = white * (phase / 2.0 / pi + 0.5);  
}
```

## A.6. Zellkultur nach der Methode der hängenden Tropfen

### Zutaten:

- Zellen: RH-30 humanes Rhabdomyosarkom (DSMZ Braunschweig – ACC 489)
- Kulturmedium: RPMI 1640 mit 10% FCS (fötales Kälberserum) (Fa. Biochrom)
- Zellkulturplastikwaren: Fa. Greiner Bio-One

### Vorgehensweise:

- Die Zellen wachsen adhärent, d.h. zum Zählen und Passagieren werden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abtrypsiniert. Zellzählung in der Neubauer-Kammer.
- Ansatz von Zellverdünnungen verschiedener Konzentration in sterilen 50 ml-Röhrchen: Zellsuspension: 50 000 Zellen in 5 ml Medium entspricht 200 Zellen in 20 µl.
- Davon 3 Verdünnungen ansetzen:
  - 1:2 verdünnt – entspricht 100 Zellen in 20 µl
  - 1:4 verdünnt – entspricht 50 Zellen in 20 µl

## A.6. Zellkultur nach der Methode der hängenden Tropfen

– 1:8 verdünnt – entspricht 25 Zellen in 20  $\mu$ l

- Auf dem Deckel einer 6 cm-Kulturschale werden durch ein Kreuz 4 Bereiche markiert. Mehrere 20  $\mu$ l-Tröpfchen der verschiedenen Verdünnungen werden in den Deckel in den entsprechenden Konzentrationsbereich pipettiert. Der Deckel mit den Tröpfchen wird vorsichtig gewendet und auf das Schalenunterteil gesetzt. In die Schale werden noch 2,5 ml Phosphatpuffer (PBS) pipettiert um eine feuchte Atmosphäre zu gewährleisten und einer Mediaufkonzentrierung vorzubeugen.
- Die Zellen werden in einem Kulturschrank bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % so lange kultiviert bis die Zellverbände die gewünschte Größe erreicht haben.



# Literaturverzeichnis

- A. R. Abate, J. J. Agresti, und D. A. Weitz. Microfluidic sorting with high-speed single-layer membrane valves. *Applied Physics Letters*, 96(20):203509, 2010. doi:10.1063/1.3431281. 68, 83
- K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, und D. A. Weitz. Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices. *Applied Physics Letters*, 88(2):024104, 2006. doi:10.1063/1.2164911. 68, 83
- G. Anzolin, A. Gardelein, M. Jofre, G. Molina-Terriza, und M. W. Mitchell. Polarization change induced by a galvanometric optical scanner. *Journal of the Optical Society of America A*, 27(9):1946, Aug. 2010. doi:10.1364/JOSAA.27.001946. 132
- R. Applegate Jr, J. Squier, T. Vestad, J. Oakey, und D. Marr. Optical trapping, manipulation, and sorting of cells and colloids in microfluidic systems with diode laser bars. *Optics Express*, 12(19):4390–4398, Sept. 2004. 69
- A. Ashkin. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters*, 24(4):156–159, Jan. 1970. doi:10.1103/PhysRevLett.24.156. 22
- A. Ashkin und J. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795):1517–1520, Mar. 1987. doi:10.1126/science.3547653. 13
- A. Ashkin und J. M. Dziedzic. Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20):7914–8, Oct. 1989. 114
- A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, und S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5):288, May 1986. doi:10.1364/OL.11.000288. 22, 98
- A. Ashkin, J. M. Dziedzic, und T. Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769–71, 1987. doi:10.1038/330769a0. 13
- S. Bianchi und R. Di Leonardo. Real-time optical micro-manipulation using optimized holograms generated on the GPU. *Computer Physics Communications*, 181(8):1444–1448, Aug. 2010. doi:10.1016/j.cpc.2010.04.012. 57
- C. F. Bohren und D. R. Huffman. Absorption and Scattering by a Sphere - Cross Sections and Matrix Elements. In *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, chapter 4.4, pages 101–118. John Wiley & Sons, 2004. 25

- E. J. Botcherby, R. Juškaitis, M. J. Booth, und T. Wilson. Aberration-free optical refocusing in high numerical aperture microscopy. *Optics Letters*, 32(14):2007–2009, 2007. 36
- R. Bowman, A. Jesacher, G. Thalhammer, G. Gibson, M. Ritsch-marte, und M. Padgett. Position clamping in a holographic counterpropagating optical trap. *Optics Express*, 19(10):810–816, 2011a. 36
- R. W. Bowman, G. Gibson, D. Carberry, L. Picco, M. Miles, und M. J. Padgett. iTweezers: optical micromanipulation controlled by an Apple iPad. *Journal of Optics*, 13:44002, 2011b. 86
- T. N. Buican, M. J. Smyth, H. a. Crissman, G. C. Salzman, C. C. Stewart, und J. C. Martin. Automated single-cell manipulation and sorting by light trapping. *Applied Optics*, 26(24):5311, Dec. 1987. doi:10.1364/AO.26.005311. 69
- P. Y. Chiou, A. T. Ohta, und M. C. Wu. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature*, 436(7049):370–2, July 2005. doi:10.1038/nature03831. 114
- R. Derda, A. Laromaine, A. Mammoto, S. K. Y. Tang, T. Mammoto, D. E. Ingber, und G. M. Whitesides. Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44):18457–62, Nov. 2009. doi:10.1073/pnas.0910666106. 13
- K. Dholakia und T. Čižmár. Shaping the future of manipulation. *Nature Photonics*, 5(6):335–342, June 2011. doi:10.1038/nphoton.2011.80. 15
- J. K. G. Dhont. *Flow past a Sphere*. Studies in Interface Science. Elsevier Science, 1996. ISBN 9780444820099. 96
- R. Di Leonardo, F. Ianni, und G. Ruocco. Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays. *Optics express*, 15(4):1913–22, Feb. 2007. 37, 56
- P. S. Dittrich und P. Schwill. An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection, and sorting of fluorescent cells and particles. *Analytical chemistry*, 75(21):5767–74, Nov. 2003. doi:10.1021/ac034568c. 68, 83
- B. T. Draine und P. J. Flatau. Discrete-dipole approximation for scattering calculations. *Journal of the Optical Society of America A*, 11(4):1491, Apr. 1994. doi:10.1364/JOSAA.11.001491. 27
- E. R. Dufresne, G. C. Spalding, M. T. Dearing, S. A. Sheets, und D. G. Grier. Computer-generated holographic optical tweezer arrays. *Review of Scientific Instruments*, 72(3):1810, 2001. doi:10.1063/1.1344176. 36
- S. Ebert, K. Travis, B. Lincoln, und J. Guck. Fluorescence ratio thermometry in a microfluidic dual-beam laser trap. *Optics Express*, 15:15493–15499, 2007. 113

- A. Ehrlicher, T. Betz, B. Stuhmann, D. Koch, V. Milner, M. G. Raizen, and J. Kas. Guiding neuronal growth with light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25):16024–8, Dec. 2002. doi:10.1073/pnas.252631899. 15, 86
- E. Eriksson, D. Engström, J. Scrimgeour, and M. Goksör. Automated focusing of nuclei for time lapse experiments on single cells using holographic optical tweezers. *Optics express*, 17(7):5585–5594, 2009. 16, 85
- F. O. Fahrbach, P. Simon, and A. Rohrbach. Microscopy with self-reconstructing beams. *Nature Photonics*, 4(11):780–785, Sept. 2010. doi:10.1038/nphoton.2010.204. 13
- L. Friedrich. *Surface scanning using optically trapped probes*. Thesis, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2011. 21
- A. Y. Fu, H.-P. Chou, C. Spence, F. H. Arnold, and S. R. Quake. An integrated microfabricated cell sorter. *Analytical chemistry*, 74(11):2451–7, June 2002. 68, 83
- M. Gögler, T. Betz, and J. A. Käs. Simultaneous manipulation and detection of living cell membrane dynamics. *Optics letters*, 32(13):1893–5, July 2007. 120
- J. W. Goodman. *Introduction To Fourier Optics*. McGraw-Hill physical and quantum electronics series. McGraw Hill Higher Education, 2005a. ISBN 978-0071142571. 30
- J. W. Goodman. Fourier Analysis in Two Dimensions. In *Introduction to Fourier Optics*, chapter 2.1, pages 4–15. Roberts and Company Publishers, 2005b. 30
- J. W. Goodman. Fourier Transforming Properties of Lenses. In *Introduction to Fourier Optics*, chapter 5.2, pages 103–108. Roberts and Company Publishers, 2005c. 33
- K. Greger, J. Swoger, and E. H. K. Stelzer. Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. *Review of Scientific Instruments*, 78(2):023705, 2007. doi:10.1063/1.2428277. 13
- J. A. Grimbergen, K. Visscher, D. S. Gomes de Mesquita, and G. J. Brakenhoff. Isolation of single yeast cells by optical trapping. *Yeast*, 9(7):723–32, July 1993. doi:10.1002/yea.320090706. 84
- J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, and J. Käs. The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical journal*, 81(2):767–84, Aug. 2001. doi:10.1016/S0006-3495(01)75740-2. 85
- J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln, F. Wottawah, S. Ebert, M. Romeyke, D. Lenz, H. M. Erickson, R. Ananthakrishnan, D. Mitchell, J. Käs, S. Ulvick, and

- C. Bilby. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophysical Journal*, 88:3689–3698, 2005. doi:10.1529/biophysj.104.045476. 86
- E. Hecht. *Die Ausbreitung des Lichts - Der elektromagnetische Ansatz*. Oldenbourg, 2005a. ISBN 9783486273595. 30
- E. Hecht. Interferenz - Allgemeine Betrachtungen. In *Optik*, chapter 9.1, pages 563–569. Oldenbourg, 2005b. ISBN 9783486273595. 29, 122
- L. A. Herzenberg, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg. Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Scientific American*, 234(3):108–117, Mar. 1976. doi:10.1038/scientificamerican0376-108. 67
- F. Hörner, M. Woerdemann, S. Müller, B. Maier, and C. Denz. Full 3D translational and rotational optical control of multiple rod-shaped bacteria. *Journal of biophotonics*, 3(7):468–75, July 2010. doi:10.1002/jbio.201000033. 86
- D. Huang, E. Swanson, C. Lin, J. Schuman, W. Stinson, W. Chang, M. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. Puliafito, and A. Et. Optical coherence tomography. *Science*, 254(5035):1178–1181, Nov. 1991. doi:10.1126/science.1957169. 13
- J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5686):1007–9, Aug. 2004. doi:10.1126/science.1100035. 13
- J. D. Jackson. Optisches Theorem und Verwandtes. In *Klassische Elektrodynamik*, chapter 10.11, pages 579–585. Walter de Gruyter, 2002. 26
- A. Jesacher, C. Maurer, A. Schwaighofer, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte. Full phase and amplitude control of holographic optical tweezers with high efficiency. *Optics express*, 16(7):4479–86, Mar. 2008. 36
- A. Jonás und P. Zemánek. Light at work: the use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis. *Electrophoresis*, 29(24):4813–51, Dec. 2008. doi:10.1002/elps.200800484. 15, 16, 68
- J. M. Kelm, N. E. Timmins, C. J. Brown, M. Fussenegger, and L. K. Nielsen. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and bioengineering*, 83(2):173–80, July 2003. doi:10.1002/bit.10655. 63
- T. R. Kieß ling, R. Stange, J. a. Käs, und A. W. Fritsch. Thermorheology of living cells - impact of temperature variations on cell mechanics. *New Journal of Physics*, 15(4):045026, Apr. 2013. doi:10.1088/1367-2630/15/4/045026. 113

- U. Kim, J. Qian, S. A. Kenrick, P. S. Daugherty, und H. T. Soh. Multitarget dielectrophoresis activated cell sorter. *Analytical chemistry*, 80(22):8656–61, Nov. 2008. doi:10.1021/ac8015938. 68, 83
- P. T. Korda, M. B. Taylor, und D. G. Grier. Kinetically Locked-In Colloidal Transport in an Array of Optical Tweezers. *Physical Review Letters*, 89(12):128301, Sept. 2002. doi:10.1103/PhysRevLett.89.128301. 69
- L. Kou, D. Labrie, und P. Chylek. Refractive indices of water and ice in the 0.65- to 2.5-um spectral range. *Applied optics*, 32(19):3531–40, July 1993. 40
- H. Kress, J.-G. Park, C. O. Mejean, J. D. Forster, J. Park, S. S. Walse, Y. Zhang, D. Wu, O. D. Weiner, T. M. Fahmy, und E. R. Dufresne. Cell stimulation with optically manipulated microsources. *Nature methods*, 6(12):905–9, Dec. 2009. doi:10.1038/nmeth.1400. 15, 86
- B. Landenberger. *Cell Sorting by Optical Forces in a Microfluidic Chamber*. Thesis, 2007. 67
- B. Landenberger, H. Höfemann, S. Wadle, und A. Rohrbach. Microfluidic sorting of arbitrary cells with dynamic optical tweezers. *Lab on a chip*, pages 3177–3183, July 2012. doi:10.1039/c2lc21099a. 27, 67
- J. Leach, K. Wulff, G. Sinclair, P. Jordan, J. Courtial, L. Thomson, G. Gibson, K. Karunwi, J. Cooper, Z. J. Laczik, und M. Padgett. Interactive approach to optical tweezers control. *Applied optics*, 45(5):897–903, Feb. 2006. 36
- S.-H. Lee und D. G. Grier. Holographic microscopy of holographically trapped three-dimensional structures. *Optics express*, 15(4):1505–12, Feb. 2007. 120, 146, 147
- S.-h. Lee, Y. Roichman, G.-r. Yi, S.-h. Kim, S.-M. Yang, A. van Blaaderen, P. van Oostrum, und D. G. Grier. Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy. *Optics Express*, 15(26):18275, Dec. 2007. doi:10.1364/OE.15.018275. 120
- T. Lemaire. Coupled-multipole formulation for the treatment of electromagnetic scattering by a small dielectric particle of arbitrary shape. *Journal of the Optical Society of America A*, 14(2):470, Feb. 1997. doi:10.1364/JOSAA.14.000470. 27
- A. Lenshof und T. Laurell. Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society reviews*, 39(3):1203–17, Mar. 2010. doi:10.1039/b915999c. 68
- L. B. Lesem, P. M. Hirsch, und J. A. Jordan. The Kinoform: A New Wavefront Reconstruction Device, 1969. 37
- J. Liesener, M. Reicherter, T. Haist, und H. Tiziani. Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms. *Optics Communications*, 185(1-3):77–82, Nov. 2000. doi:10.1016/S0030-4018(00)00990-1. 35, 85

- C.-C. Lin, A. Chen, und C.-H. Lin. Microfluidic cell counter/sorter utilizing multiple particle tracing technique and optically switching approach. *Biomedical microdevices*, 10(1):55–63, Feb. 2008. doi:10.1007/s10544-007-9109-8. 69
- M. P. MacDonald, L. Paterson, K. Volke-Sepulveda, J. Arlt, W. Sibbett, und K. Dholakia. Creation and manipulation of three-dimensional optically trapped structures. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570):1101–3, May 2002. doi:10.1126/science.1069571. 114
- M. P. MacDonald, G. C. Spalding, und K. Dholakia. Microfluidic sorting in an optical lattice. *Nature*, 426(6965):421–4, Nov. 2003. doi:10.1038/nature02144. 69
- M. Mahamdeh, C. Pérez Campos, und E. Schäffer. Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers. *Optics Express*, 19(12):11759, June 2011. doi:10.1364/OE.19.011759. 53
- N. Masuda, T. Ito, T. Tanaka, A. Shiraki, und T. Sugie. Computer generated holography using a graphics processing unit. *Optics express*, 14(2):603–8, Jan. 2006. 56
- G. Milne, D. Rhodes, M. MacDonald, und K. Dholakia. Fractionation of polydisperse colloid with acousto-optically generated potential energy landscapes. *Optics letters*, 32(9):1144–6, May 2007. 69
- U. Mirsaidov, J. Scrimgeour, W. Timp, K. Beck, M. Mir, P. Matsudaira, und G. Timp. Live cell lithography: using optical tweezers to create synthetic tissue. *Lab on a chip*, 8(12):2174–81, Dec. 2008. doi:10.1039/b807987k. 15
- J. E. Molloy und M. J. Padgett. Lights, action: Optical tweezers. *Contemporary Physics*, 43(4):241–258, July 2002. doi:10.1080/00107510110116051. 13
- K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, und S. M. Block. Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps. *Biophysical Journal*, 77(November):2856–2863, 1999. 113
- A. Ohta. Continuous optical sorting of HeLa cells and microparticles using optoelectronic tweezers. In *IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMS and Their Applications Conference, 2005.*, pages 83–84. IEEE, 2005. ISBN 0-7803-9278-7. doi:10.1109/OMEMS.2005.1540088. 68, 83
- F. Pampaloni, E. G. Reynaud, und E. H. K. Stelzer. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10):839–45, Oct. 2007. doi:10.1038/nrm2236. 11, 63
- S. Park, Y. Zhang, T.-H. Wang, und S. Yang. Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity. *Lab on a chip*, pages 2893–2900, July 2011. doi:10.1039/c1lc20307j. 68, 83

- L. Paterson, M. P. MacDonald, J. Arlt, W. Sibbett, P. E. Bryant, und K. Dholakia. Controlled rotation of optically trapped microscopic particles. *Science (New York, N. Y.)*, 292(5518):912–4, May 2001. doi:10.1126/science.1058591. 86, 103
- J. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Number v. 236 in Handbook of biological confocal microscopy. Springer, 2006. ISBN 9780387259215. 12
- R. Pepperkok und J. Ellenberg. High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(9):690–6, Sept. 2006. doi:10.1038/nrm1979. 11, 68
- T. D. Perroud, J. N. Kaiser, J. C. Sy, T. W. Lane, C. S. Branda, A. K. Singh, und K. D. Patel. Microfluidic-based cell sorting of *Francisella tularensis* infected macrophages using optical forces. *Analytical chemistry*, 80(16):6365–72, Aug. 2008. doi:10.1021/ac8007779. 69
- O. W. Petersen, L. Rønnevig Jessen, a. R. Howlett, und M. J. Bissell. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19):9064–8, Oct. 1992. 12
- M. Pitzek, R. Steiger, G. Thalhammer, S. Bernet, und M. Ritsch-Marte. Optical mirror trap with a large field of view. *Optics express*, 17(22):19414–23, Oct. 2009. 36
- M. Polin, K. Ladavac, S.-H. Lee, Y. Roichman, und D. Grier. Optimized holographic optical traps. *Optics express*, 13(15):5831–45, July 2005. 36
- D. Preece, R. Bowman, A. Linnenberger, G. Gibson, S. Serati, und M. Padgett. Increasing trap stiffness with position clamping in holographic optical tweezers. *Optics express*, 17(25):22718–25, Dec. 2009. 57, 86, 118
- O. Prucker, C. A. Naumann, J. Rühle, W. Knoll, und C. W. Frank. Photochemical Attachment of Polymer Films to Solid Surfaces via Monolayers of Benzophenone Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 121(38):8766–8770, Sept. 1999. doi:10.1021/ja990962+. 63
- M. Reicherter, T. Haist, E. U. Wagemann, und H. J. Tiziani. Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display. *Optics letters*, 24(9):608–10, May 1999. 85
- M. Reicherter, S. Zwick, T. Haist, C. Kohler, H. Tiziani, und W. Osten. Fast digital hologram generation and adaptive force measurement in liquid-crystal-display-based holographic tweezers. *Applied optics*, 45(5):888–96, Feb. 2006. 56
- D. Robert, N. Pamme, H. Conjeaud, F. Gazeau, A. Iles, und C. Wilhelm. Cell sorting by endocytotic capacity in a microfluidic magnetophoresis device. *Lab on a chip*, 11(11):1902–10, June 2011. doi:10.1039/c0lc00656d. 68, 83

- P. J. Rodrigo, V. R. Daria, und J. Gluckstad. Four-dimensional optical manipulation of colloidal particles. *Applied Physics Letters*, 86(7):074103, 2005. doi:10.1063/1.1866646. 116
- A. Rohrbach. Stiffness of Optical Traps: Quantitative Agreement between Experiment and Electromagnetic Theory. *Physical Review Letters*, 95(16):168102, Oct. 2005. doi:10.1103/PhysRevLett.95.168102. 26
- A. Rohrbach und E. H. Stelzer. Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 18(4):839–53, Apr. 2001. 21, 27
- A. Rohrbach und E. H. K. Stelzer. Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles. *Journal of Applied Physics*, 91(8):5474, 2002. doi:10.1063/1.1459748. 120, 121
- A. Rohrbach, H. Kress, und E. H. K. Stelzer. Reply to Comment on "Trapping Force, Force Constant, and Potential Depths for Dielectric Spheres in the Presence of Spherical Aberrations". *Applied Optics*, 43(9):1827, 2004. doi:10.1364/AO.43.001827. 22
- D. Ruh, B. Tränkle, und A. Rohrbach. Fast parallel interferometric 3D tracking of numerous optically trapped particles and their hydrodynamic interaction. *Optics express*, 19(22):21627–42, Oct. 2011. 147
- B. E. A. Saleh und M. C. Teich. The Gaussian Beam. In *Fundamentals of Photonics*, chapter 3.1, pages 75–86. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-471-35832-9. 124
- H. Schneckenburger, P. Weber, M. Wagner, S. Schickinger, V. Richter, T. Bruns, W. S. L. Strauss, und R. Wittig. Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 245(3):311–8, Mar. 2012. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03576.x. 113
- H. M. Shapiro. *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, June 2003. ISBN 9780471722731. doi:10.1002/0471722731. 67
- J. Sharpe, U. Ahlgren, P. Perry, B. Hill, A. Ross, J. Hecksher-Sørensen, R. Baldock, und D. Davidson. Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5567):541–5, Apr. 2002. doi:10.1126/science.1068206. 13
- C. J. R. Sheppard und Z. S. Hegedus. Axial behavior of pupil-plane filters. *Journal of the Optical Society of America A*, 5(5):643, May 1988. doi:10.1364/JOSAA.5.000643. 24
- N. B. Simpson, D. McGloin, K. Dholakia, L. Allen, und M. J. Padgett. Optical tweezers with increased axial trapping efficiency. *Journal of Modern Optics*, 45(9):1943–1949, Sept. 1998. doi:10.1080/09500349808231712. 118

- G. Sinclair, P. Jordan, J. Leach, M. Padgett, and J. Cooper. Defining the trapping limits of holographical optical tweezers. *journal of modern optics*, 51(3):409–414, 2004. 17
- W. Singer, M. Totzeck, and H. Gross. Characteristic Functions. In H. Gross, editor, *Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation - Vol 2*, chapter 20.2, pages 189–200. Wiley-VCH, 2005a. ISBN 3-527-40378-7. 36
- W. Singer, M. Totzeck, and H. Gross. Phenomenological Description of Imaging. In H. Gross, editor, *Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation - Vol 2*, chapter 21.2, pages 244–262. Wiley-VCH, 2005b. ISBN 3-527-40378-7. 33
- W. Singer, M. Totzeck, and H. Gross. Aberrations of Optical Systems. In H. Gross, editor, *Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation - Vol 2*, chapter 20.4, pages 269–282. Wiley-VCH, 2005c. ISBN 3-527-40378-7. 61
- J. Steigert, S. Haeberle, T. Brenner, C. Müller, C. P. Steinert, P. Koltay, N. Gottschlich, H. Reinecke, J. Rühle, R. Zengerle, and J. Durr. Rapid prototyping of microfluidic chips in COC. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(2):333–341, Feb. 2007. doi:10.1088/0960-1317/17/2/020. 70
- K. Svoboda und S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23:247–85, Jan. 1994. doi:10.1146/annurev.bb.23.060194.001335. 15
- Y. Tanaka, H. Kawada, K. Hirano, M. Ishikawa, and H. Kitajima. Automated manipulation of non-spherical micro-objects using optical tweezers combined with image processing techniques. *Optics express*, 16(19):15115–22, Sept. 2008. 86, 114
- G. Thalhammer, R. Steiger, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte. Optical macro-tweezers: trapping of highly motile micro-organisms. *Journal of Optics*, 13(4):044024, Apr. 2011. doi:10.1088/2040-8978/13/4/044024. 116, 117
- M. W. Tibbitt und K. S. Anseth. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 103(4):655–63, July 2009. doi:10.1002/bit.22361. 11, 12
- J.-Y. Tinevez, J. Dragavon, L. Baba-Aissa, P. Roux, E. Perret, A. Canivet, V. Galy, und S. Shorte. *A quantitative method for measuring phototoxicity of a live cell imaging microscope.*, volume 506. Elsevier Inc., 1 edition, Jan. 2012. ISBN 9780123918567. doi:10.1016/B978-0-12-391856-7.00039-1. 15, 113
- M. L. Torres-Mapa, M. Antkowiak, H. Cizmarova, D. E. K. Ferrier, K. Dholakia, und F. J. Gunn-Moore. Integrated holographic system for all-optical manipulation of developing embryos. *Biomedical optics express*, 2(6):1564–75, June 2011. doi:10.1364/BOE.2.001564. 116

- K. Uhrig, R. Kurre, C. Schmitz, J. E. Curtis, T. Haraszti, A. E.-M. Clemen, und J. P. Spatz. Optical force sensor array in a microfluidic device based on holographic optical tweezers. *Lab on a chip*, 9(5):661–8, Mar. 2009. doi:10.1039/b817633g. 15
- M. M. Wang, E. Tu, D. E. Raymond, J. M. Yang, H. Zhang, N. Hagen, B. Dees, E. M. Mercer, A. H. Forster, I. Kariv, P. J. Marchand, und W. F. Butler. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nature biotechnology*, 23(1): 83–7, Jan. 2005. doi:10.1038/nbt1050. 69
- F. Wetzel, S. Rönicke, K. Müller, M. Gyger, D. Rose, M. Zink, und J. Käs. Single cell viability and impact of heating by laser absorption. *European biophysics journal : EBJ*, 40(9):1109–14, Sept. 2011. doi:10.1007/s00249-011-0723-2. 113
- G. Whyte und J. Courtial. Experimental demonstration of holographic three-dimensional light shaping using a Gerchberg-Saxton algorithm. *New Journal of Physics*, 7:117–117, May 2005. doi:10.1088/1367-2630/7/1/117. 86
- A. Wolff, I. R. Perch-Nielsen, U. D. Larsen, P. Friis, G. Goranovic, C. R. Poulsen, J. P. Kutter, und P. Telleman. Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescent-activated cell sorter. *Lab on a chip*, 3(1):22–7, Feb. 2003. doi:10.1039/b209333b. 68, 83
- K. D. Wulff, D. G. Cole, R. L. Clark, R. Dileonardo, J. Leach, J. Cooper, G. Gibson, und M. J. Padgett. Aberration correction in holographic optical tweezers. *Optics express*, 14(9):4170–5, May 2006. 61
- H. Zhang, J. Xie, J. Liu, und Y. Wang. Elimination of a zero-order beam induced by a pixelated spatial light modulator for holographic projection. *Applied optics*, 48(30):5834–41, Oct. 2009. 46
- S. Zwick, T. Haist, und M. Warber. Dynamic holography using pixelated light modulators. *Applied optics*, 49(25), 2010. 36

# Danksagung

Es hat mir viel Spaß gemacht, an einem vielseitigen Thema zu arbeiten, bei dem sich Aspekte der Optik, der Mikrofluidik, der Softwareentwicklung und der Biologie überschneiden und zu neuen Möglichkeiten führen. Diese interdisziplinäre Arbeit wäre ohne die Hilfe und den Rat von Freunden und Kollegen nicht möglich gewesen. Ich möchte ihnen an dieser Stelle ganz herzlich danken.

**Alexander Rohrbach** für die Möglichkeit, an diesem reizvollen Projekt zu arbeiten. Die Begeisterung, mit der er die Themen der Biophysik vorantreibt, hat mich sehr beeindruckt. Ich habe sehr viel von ihm gelernt und hoffe, dass er seine Prinzipien des wissenschaftlichen Arbeitens weiter verfolgt;

**Roland Zengerle** für die interessante Zeit als Hiwi an seinem Lehrstuhl und das beeindruckende Beispiel dafür, wie fruchtbare Forschungsbedingungen geschaffen werden können;

**Philipp von Olshausen** für intensive Diskussionen, die für fast jedes Problem zu einer Lösung geführt haben;

**Lars Friedrich** für viel grundlegendes Wissen und die gemeinsame Softwareentwicklung;

**Felix Kohler & Markus Griesshammer** für die gemeinsame Arbeit am Versuchsaufbau;

**Anne Rottler** für ihre organisatorische Unterstützung, Französischunterricht und Leckereien;

**Birgit Erhardt** für das Kultivieren von Zellverbänden;

**Henning Höfemann & Simon Wadle** für ihre engagierte Zusammenarbeit bei der Mikrofluidik;

**Natalia Schatz & Oswald Prucker** für die PDMAA-Beschichtung von Deckgläschen;

**Richard Bowman** für seine Hilfe bei der Entwicklung des GLSL-Algorithmus;

**Olaf Ronneberger** für die Einführung in die Grundlagen der Bildverarbeitung;

*Literaturverzeichnis*

**Alexander Dovzhenko** für die gemeinsamen Versuche mit Pflanzenprotoplasten;

**Aude Parnet, Felix Dempwolff & Rene Pflugradt** für die Bereitstellung von Zellen;

**Tobias Haist** für seine Anregungen zur Hologrammberechnung.