



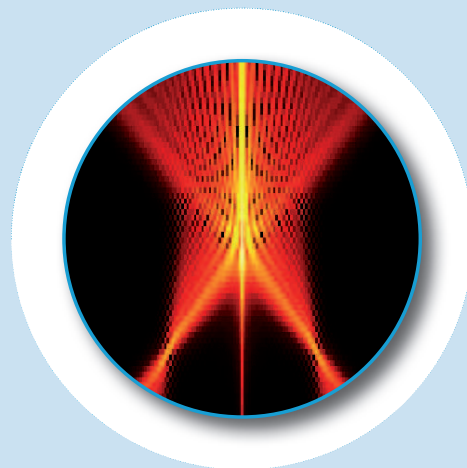
Berichte aus dem  
Institut für Technische Optik

Nr. 66

INSTITUT FÜR  
TECHNISCHE OPTIK  
UNIVERSITÄT STUTT GART

Susanne Zwick

Flexible Mikromanipulation  
durch räumliche Lichtmodulation  
in der Mikroskopie



November 2010



Universität Stuttgart



# Flexible Mikromanipulation durch räumliche Lichtmodulation in der Mikroskopie

Von der Fakultät für Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik  
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines  
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Dipl.-Ing (FH) Susanne Zwick**

geboren in Stuttgart

Hauptberichter:	Prof. Dr. W. Osten
Mitberichter:	Prof. Dr. H. Kück
Tag der Einreichung:	19.05.2010
Tag der mündlichen Prüfung:	26.08.2010

Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart

2010

ISBN 978-3-923560-65-3

D93      Stuttgart

# Vorwort des Herausgebers

Optische Prinzipien spielen in den modernen Lebenswissenschaften eine immer wichtigere Rolle. Neben leistungsfähigen bildgebenden Verfahren benötigt der Mediziner, Gentechniker und Biologe jedoch zunehmend effektive Werkzeuge, die es ihm ermöglichen, kleinste und sensible Objekte minimal-invasiv mit hoher Präzision zu fangen, zu bewegen, zu sortieren, zu separieren oder zu vereinigen. Mikromanipulationstechniken, die keiner mechanischen Hilfsmittel oder elektrischen Felder bedürfen und trotzdem eine sensible Handhabung von mikroskopischen Teilchen in den 3 Raumrichtungen ermöglichen, stehen daher auf der Wunschliste der o.g. Fachleute und gewinnen in anderen Schlüsseldisziplinen, wie der Mikrosystem- und Nanotechnik, kontinuierlich an Bedeutung. So ist es nicht verwunderlich, dass sog. optische Pinzetten (optical tweezer) und 3D-Teilchenverfolger (particle tracker) mehr und mehr auch als kommerzielle Produkte auf den Markt gelangen.

1971 veröffentlichte Ashkin erstmals ein Verfahren, das es gestattet Mikropartikel lediglich unter Zuhilfenahme von stark fokussierten Lichtfeldern zu bewegen. Diese als optische Pinzette bezeichnete Klasse von Mikromanipulatoren hat inzwischen einen Entwicklungsstand erreicht, der sie als zukunftssträchtiges Analysewerkzeug für zahlreiche Anwendungen in den o.g. Feldern prädestiniert. Entscheidenden Anteil an dieser Entwicklung haben wichtige technische Innovationen, bei deren Einführung das ITO maßgeblich beteiligt war. In einer vorangegangenen Dissertation konnte beispielsweise die flexible und schnelle Fallengenerierung mittels dynamischer Hologramme unter Verwendung hochauflösender räumlicher Lichtmodulatoren erfolgreich demonstriert werden.

Frau Zwick setzt diesen Weg konsequent fort, indem sie die holografische Komponente als Zusatz-Modul für die Nachrüstung vorhandener bzw. neu zu schaffender Mikroskope definiert und daraus die opto-mechanischen Designvorgaben und Justagevorschriften ableitet, implementiert und an praktischen Aufgabenstellungen verifiziert. Herauszustellen sind weitere wichtige Verbesserungen, die auf den Einfang größerer Objektensembles und die Generierung von an die jeweilige Aufgabenstellung angepassten Lichtfeldern zielen. Damit leistet Frau Zwick

---

einen wichtigen Beitrag zur Steigerung der Effizienz holografischer Pinzetten und erschließt diesem flexiblen optischen 3D-Mikromanipulator insbesondere durch die Umsetzung neuer Ideen zur Generierung von Doppelfallen und axial ausgedehnten Lichtfeldern weitere Anwendungsmöglichkeiten im Sinne der o.g. Zielstellungen.

Stuttgart im Oktober 2010

Prof. Dr. W. Osten  
Institut für Technische Optik  
Universität Stuttgart

# Inhaltsverzeichnis

Liste der Abkürzungen und Formelzeichen	8
Kurzzusammenfassung	11
Abstract	13
<b>1. Einführung</b>	<b>23</b>
<b>2. Stand der Technik</b>	<b>25</b>
<b>3. Grundlagen der optischen Mikromanipulation</b>	<b>29</b>
3.1. Dynamische Holografie zur optischen Mikromanipulation in der Mikroskopie .	29
3.2. Räumliche Lichtmodulatoren . . . . .	32
3.2.1. Flüssigkristall-Modulatoren . . . . .	32
3.2.2. Mikro-Elektro-Mechanische Systeme . . . . .	35
3.3. Holografie . . . . .	36
3.3.1. Grundprinzip . . . . .	36
3.3.2. Digitale Holografie . . . . .	38
3.3.3. Hologrammgeometrie . . . . .	41
3.3.4. Beurteilung von Hologrammen und Hologrammmedien . . . . .	42
3.3.5. Darstellung von Hologrammen mit pixelierten Lichtmodulatoren . . . .	44
3.4. Manipulation mit Licht . . . . .	47
3.4.1. Optischer Einfang . . . . .	47
3.4.2. Optisches Schneiden . . . . .	55
<b>4. Experimentelle Untersuchung eines neuartigen markerfreien Diagnoseverfahrens</b>	<b>60</b>
4.1. Holografisches Add-on Modul . . . . .	60
4.1.1. Anforderungen an das System . . . . .	62
4.1.2. Homogenität und Lichtverlust . . . . .	64
4.1.3. Optisches Design des Add-on Moduls . . . . .	68
4.1.4. Mechanische Umsetzung . . . . .	70

4.2.	Klassifikation von Zellen mit Hilfe der holografischen Pinzette . . . . .	72
4.2.1.	Kraftmessung mit der holografischen Pinzette . . . . .	72
4.2.2.	Messung der Fangkraft von Leukämiekrebszellen . . . . .	76
<b>5.</b>	<b>Untersuchung neuer Einfang- und Manipulationsverfahren</b>	<b>79</b>
5.1.	Einfang größerer Objektensembles zur Parallelisierung der optischen Manipulation	81
5.2.	Einfang mit angepassten Lichtfeldern . . . . .	83
5.2.1.	Objektmanipulation durch Mehrspottechniken . . . . .	83
5.2.2.	Lateral ausgedehnte Lichtfelder . . . . .	85
5.3.	Einfang mit axial ausgedehnten Lichtfeldern . . . . .	88
5.4.	Holografische Doppelfallen . . . . .	96
5.4.1.	Numerische Berechnung der Einfangkräfte von holografischen Doppelfallen	98
5.4.2.	Experimentelle Verifikation . . . . .	111
5.4.3.	Holografisches $4\pi$ -Mikroskop . . . . .	113
5.5.	Holografisch gesteuertes Mikro-Laser-Skalpell zur Zellsortierung . . . . .	123
5.5.1.	Design des kombinierten Setups . . . . .	124
5.5.2.	Aberrationskorrektur . . . . .	127
5.5.3.	Verschiedene Schneidexperimente . . . . .	129
5.6.	Untersuchungen der technischen Realisierbarkeit der Automatisierung . . . . .	133
5.6.1.	Laterale Positioniergenauigkeit . . . . .	133
5.6.2.	Kalibrierung Hologramm - Objektebene . . . . .	134
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>145</b>
<b>A.</b>	<b>Ergänzendes zum Add-on Modul</b>	<b>147</b>
A.1.	Eigenschaften eingesetzter Elemente . . . . .	147
A.1.1.	Modulationseigenschaften DMD . . . . .	147
A.1.2.	Modulationseigenschaften des Holoeye HEO 1080-P . . . . .	148
A.1.3.	Modulationseigenschaften des Holoeye LC-R 2500 . . . . .	149
A.1.4.	Technische Daten des Laser IRE-Polus . . . . .	150
A.2.	Technische Daten des Add-on Moduls . . . . .	151
A.2.1.	Toleranzen . . . . .	152
A.2.2.	Arbeits- und Objektfeld . . . . .	153
A.2.3.	Verschiebung des Mikroskopobjektivs . . . . .	155
A.2.4.	Justagevorschrift für das Add-on Modul . . . . .	156
A.3.	4f-Aufbau mit verschobener Abbildungsebene . . . . .	157
<b>B.</b>	<b>Zernike Polynome</b>	<b>159</b>



<b>C. Herleitungen</b>	<b>161</b>
C.1. Herleitung der Kalibrierungsfunktionen . . . . .	161
C.1.1. Laterale Kalibrierung . . . . .	161
C.1.2. Axiale Kalibrierung . . . . .	163
C.1.3. Brennweite des mittels SLM dargestellten Defokusterms . . . . .	165
C.2. Öffnungswinkel und maximaler Phasenshift eines Axikons . . . . .	167
C.3. Sinus- und Tangens-Bedingung sowie daraus bedingte Apodisation . . . . .	168
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>170</b>

# Liste der Abkürzungen und Formelzeichen

$a$	Arbeitsabstand
$A$	Absorption
$\alpha$	Kraftkonstante bzw. Fallensteifheit
$\alpha_P$	Polarisierbarkeit
$\beta'$	Abbildungsmaßstab EP/SLM
$B_x, B_y$	Ausdehnung im Frequenzraum
CCD	Charge Coupled Device
Cg	Programmiersprache C for Graphics
$c_0$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
CGH	Computer Generated Holograms
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CPU	Central Processing Unit
$d$	Abstand
$d_z$	Abstand der Foki bei holografischen Doppelfallen
$\Delta\Phi$	Realisierbarer maximaler Phasenhub des SLM
$\Delta W_{PV}$	Wellenfrontdeformation Peak-to-Valley
$D_{SLM}$	Durchmesser des eingekoppelten Teils des SLM
DMD	Digital Mircomirror Device
DNS	Desoxyribonukleinsäure, Erbgut von Zellen
$d_O$	Durchmesser Objekt
$E$	Rekonstruktionsqualität
$\eta$	Beugungseffizienz
EP	Eintrittspupille, Pupille des MO
$\nabla E^2$	Intensitätsgradient
$f$	Brennweite
$f_{MO}$	Brennweite des Mikroskopobjektivs
$f_{TL}$	Brennweite der Tubuslinse
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

$FF$	Füllfaktor
$F_{Grad}$	Gradientenkraft
$F_{Streu}$	Streukraft
$f_x, f_y$	Ortsfrequenz in x bzw. y-Richtung
g	Gitterperiode
GPU	Graphics Processing Unit
$h_a$	Axikonhöhe in $\lambda$
$H(x, y)$	Hologramm
$h(u, v)$	Rekonstruktion
$H_A$	Amplitudenhologramm
$H_P$	Phasenhologramm
$I$	Intensität
$I_0$	Startintensität
IFTA	Iterativer Fourier Transformations Algorithmus
k	Laufindex, Wellenzahl
$\kappa$	dynamische Viskosität
$k_x, k_y, k_z$	Hologrammparameter
$k_{zmax}$	Hologrammparameter zur Erzielung des maximalen Defokus
$\lambda$	Wellenlänge
$L_x, L_y$	Ausdehnung im Ortsraum
LCD	Liquid Crystal Display
LCoS	Liquid Crystal on Silicon
M	Orts-Bandbreite-Produkt
MEMS	Micro-Electro-Mechanical Systems
MMA	Micro Mirror Array
MO	Mikroskopobjektiv
NA	Numerische Apertur
$NA_{eff}$	effektive numerische Apertur
$n$	relative Brechzahl des Objekts $n = n_O/n_M$
$n_O$	Brechzahl des Objekts
$n_M$	Brechzahl des Mediums
NIR	Nahes Infrarot
o	Objektwelle
OASLM	Optically Addressed Spatial Light Modulator
P	Laserleistung
$p$	normierter Pupillenradius
$p_{lateral}/p_{axial}$	laterale bzw. axiale Auflösung

$pp$	Pixelpitch
$\Phi(x, y)$	Phasenschiebung des SLM und damit Phase der Lichtwelle
$Q_{esc}$	maximale Einfangeffizienz, proportional zur Kraft, die benötigt wird, um das Objekt aus der Falle zu entfernen
$Q_{ST}$	Einfangeffizienz einer Einzelfalle
$Q_{TT}$	Einfangeffizienz einer holografischen Doppelfalle
$r$	Referenzwelle
$r_{Airy}$	Radius des Airy-Scheibchens
$r_O$	Radius des Objekts
$R$	Reflektivität
$r_{EP}$	Pupillenradius des Mikroskopobjektivs
$r_{SLM}$	Innenkreisradius des SLM
$Q$	Einfangeffizienz
$\sigma$	halber Öffnungswinkel eines optischen Systems
SLM	Spatial Light Modulator
STED	Stimulated-Emission-Depletion
T	Transmission
$\tau$	Transmission
$\theta$	Einfallswinkel auf das Objekt
$\theta'$	Austrittswinkel aus dem Objekt
TL	Tubuslinse
$t_P$	Pulsdauer
UV	Ultraviolett
$\omega_{SLM}$	Strahldurchmesser bei Beleuchtung des SLM
$\Delta W_{PV}$	Peak-to-Valley Wellenfrontdeformation
$Z_{SA}$	Zernike Koeffizient für sphärische Aberration

# Kurzzusammenfassung

Seit ihrer Entwicklung durch Ashkin im Jahre 1986 fand die optische Pinzette Einsatz in zahlreichen Anwendungsfeldern von der Physik bis hin zur Zellbiologie. Die Fähigkeit, berührungslos Objekte im Bereich zwischen einigen zehn Nanometern und einigen Dutzend Mikrometern mit Hilfe von Licht zu fangen und zu bewegen, macht die optische Pinzette zu einem mächtigen Werkzeug.

Die Ende der 1990er Jahre am Institut für Technische Optik [129] und an der Universität Chicago [25] realisierte dynamisch-holografische Implementierung optischer Pinzetten erlaubte darauf aufbauend vielfältige Einsatzmöglichkeiten und neuartige Mikromanipulationstechniken.

In der vorliegenden Arbeit wird die holografische Pinzette zur Anwendung in einem neuartigen Diagnoseverfahren, basierend auf Kraftmessung weiter entwickelt und erprobt. Dabei können auf die üblichen zellbeeinflussenden Marker verzichtet und somit die Zellen in möglichst natürlichem Zustand analysiert werden. Insbesondere konnte demonstriert werden, dass die vorgeschlagene Diagnosemethode es ermöglicht, gesunde Zellen, Krebszellen und mit Medikamenten behandelte Krebszellen in einem früheren Stadium zu unterscheiden, als dies mit etablierten Methoden bisher möglich ist.

Um ein solches System effektiv einsetzen zu können, ist eine Parallelisierung und Automatisierung unabdingbar. Basis für die Automatisierung ist eine voll- oder zumindest teilautomatisierte Probenhandhabung, eine automatisierte Objekterkennung sowie der automatisierte Einfang und die automatisierte Kraftmessung.

Als ein erster Schritt in diese Richtung werden in dieser Arbeit die Aspekte der Automatisierung des optischen Einfangs beleuchtet. Hierbei konnten verschiedene Hindernisse identifiziert und Lösungsansätze entwickelt werden, die das Prinzip des holografischen Ansatzes der optischen Pinzette nutzen.

Es wurden verschiedene angepasste Lichtfelder untersucht, die es ermöglichen, die auf die biologischen Objekte wirkende Leistungsdichte und damit das Schädigungspotential zu reduzieren. Dies konnte zudem auch durch die Reduzierung der zum axialen Einfang benötigten numerischen Apertur mit Hilfe von holografisch generierten Doppelfallen erreicht werden, die

gleichzeitig einen hohen Arbeitsabstand und ein großes Arbeitsfeld erlauben. Mit Hilfe axial ausgedehnter Lichtquellen wurde der Einfangvorgang von axial verteilten Objekten optimiert, was insbesondere bei der Automatisierung eine starke Vereinfachung darstellt. Zudem konnte mit Hilfe eines Kalibrierverfahrens gezeigt werden, dass eine automatisierte Steuerung der Fallen auf einfache Weise mit der geforderten Genauigkeit möglich ist.

Desweiteren wurde ein holografisch gesteuertes System zur Mikrobearbeitung entwickelt, das neben einem automatisierten Einfang auch eine automatisierte Sortierung, basierend auf der Bereinigung von Zelllinien durch Zerstörung, realisieren kann. Neben der reinen Zerstörung von Zellen ist auch eine hochgenaue Bearbeitung von Zellen und Zellbestandteilen möglich.

Im Rahmen der Arbeit konnte demnach die holografische Pinzette erfolgreich zu einem markerfreien Diagnosewerkzeug in der Krebsdiagnostik weiterentwickelt werden. Herausforderungen bei der Umsetzung des automatisierten Einfangs wurden identifiziert und Lösungsvorschläge erarbeitet sowie implementiert. Somit bildet diese Arbeit den ersten Schritt in Richtung eines vollautomatisierten Werkzeugs, welches zur Diagnose und Medikamentenentwicklung eingesetzt werden kann.

# Abstract

Optical methods are very suitable for diagnostics in biomedicine due to the potentially high speed and resolution as well as the non-contact operation. Various mainly marker-based applications to investigate certain properties of biological objects are available. Unfortunately, markers may influence the intracellular processes or even the viability of cells and, therefore, may falsify the measurement results.

In this work, a novel marker-free diagnostics method based on the optical force acting on a cell has been analysed. According to first measurement results, it is possible to differentiate between healthy cells, leukemia cells, and treated leukemia cells even in an significantly earlier state compared to well-established methods like flow cytometry.

However, in order to apply such a system efficiently, automation and parallelization are essential. Therefore, it is necessary to automate cell handling, object recognition, trapping, and force measurement.

This contribution as a first step towards realizing such an automated diagnostic workstation concentrates on the automation of the trapping process. Thereby the work with living objects and the application of micro-fluidics can lead to several challenges concerning the trapping process. After identification of the challenges, several solutions that are taking advantage of the holographic control have been proposed and investigated.

## Experimental Investigation of a Novel Method of Marker-Free Diagnosis

To demonstrate the basic principle of the novel marker-free diagnostic workstation proposed in this work, an holographic optical tweezers add-on module for a standard research microscope (Zeiss Axiovert 200M) has been developed. A phase-only spatial light modulator (Holoeye HEO 1080P) is employed to implement Fourier phase holograms. The add-on module (Figure 1) is coupled to the microscope via one sideport.

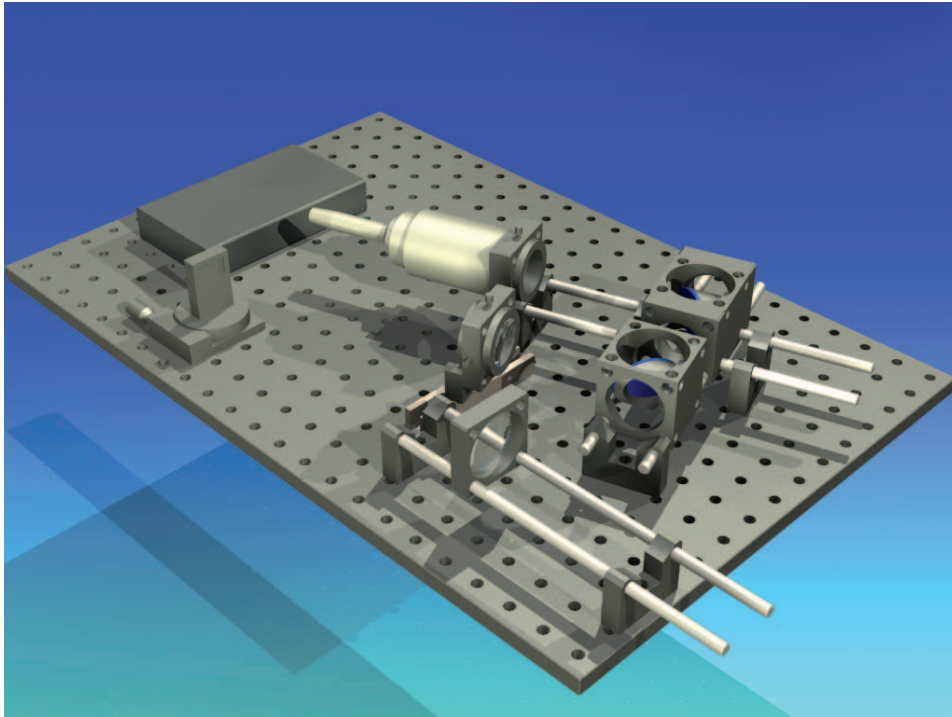


Figure 1.: Mechanical design of the add-on module

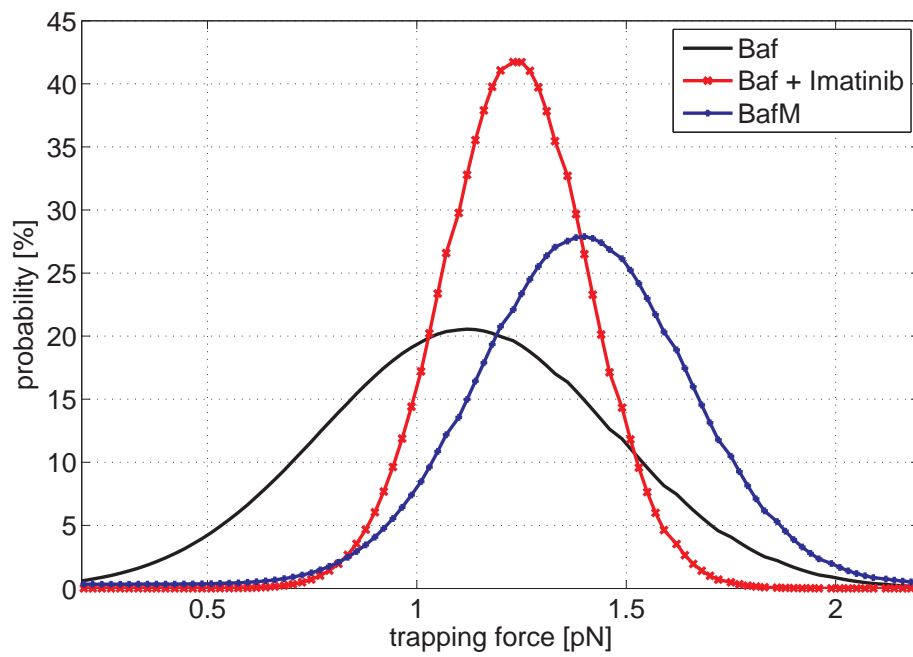


Figure 2.: Force distribution of the investigated cell classes (Baf, Baf +Imatinib 2h and BafM)



The principle of marker-free analysis is based upon the fact that cells in different states differ in their composition due to different metabolisms. This is why they can be distinguished by measuring the trapping force acting on them. This was done by investigating the escape forces using image processing [128]. It was discovered that the method is very well suited for the identification of cancer cells of the chronic myelonic leukemia (Baf). Figure 2 shows the Gaussian trapping force distribution of Baf-cells compared with cells 2 hours after drug treatment (Baf+Imatinib) and healthy cells (BafM). It is possible to classify those three groups of cells [146]. In addition it is possible to measure the influence of the drugs faster than with well-established methods like flow cytometrie, where the different types of cells only can be identified after 3 hours. This demonstrates the high sensitivity of our method.

## New Trapping and Manipulation Methods using Holographic Optical Tweezers

To improve the demonstrated diagnosis method, it is important to automate and parallelize the procedure, as such force measurements are very time consuming. Realizing automated trapping is straight forward when using holographic optical tweezers because the trapping fields are completely controlled by software.

However, using micro-fluidics (which is necessary for automated cell handling) and working with living cells can lead to several challenges. Particularly the high numerical aperture, which is required for stable three-dimensional trapping, induces a low working distance and a small axial trapping region. Objects being positioned above or below the actual trapping region are difficult to be trapped and the strong energy density can damage living cells. Additionally, as aberrations strongly depend on the numerical aperture, tight specifications on the micro-fluidics system apply.

Due to the high flexibility of the holographic setup it is possible to generate easily new trapping geometries and methods. Traps can be adapted to objects and complex manipulation tasks can be performed. Using UV-light, it is even possible to destroy unwanted cells in order to purify the investigated cell lines for further processing. Various methods of optical manipulation using the holographic approach are investigated in this work in order to improve automated trapping.

## Parallelization of Trapping

To demonstrate the possibility of parallelization, simultaneous trapping of several particles has been performed. 19 particles with a diameter of  $3\ \mu\text{m}$  were trapped using a laser power of 2.7 W (see Figure 3). However, in practice the maximum number of particles is not only limited by the space-bandwidth product of the SLM but also by the maximum incident power on the SLM.

In addition, generating several traps using an analytic hologram computation leads to spurious diffraction orders, so-called ghost traps, which typically have to be reduced using hologram optimization (e.g. iterative Fourier transform algorithms).

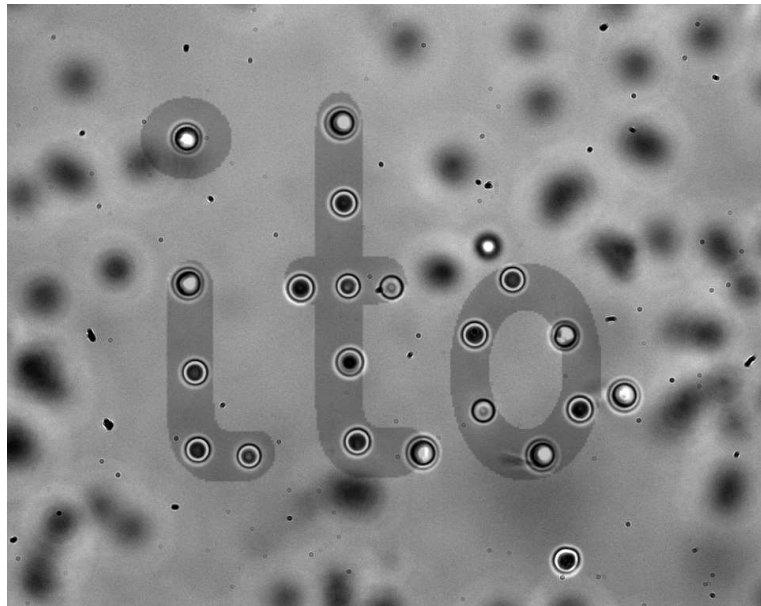


Figure 3.: Independent trapping of 19 polystyrene beads with a diameter of  $3\ \mu\text{m}$ .

## Trapping using Adapted Light Fields

Non-spherical and large objects are difficult to be trapped with a conventional single beam trap. In this case the laser power is normally increased in order to raise the trapping force. However, this method is potentially for biological objects. To prevent biological objects from damage and at the same time to obtain stable trapping, two different methods were investigated to adapt the light field to the object.

Holographic optical tweezers enable the generation of several spots to manipulate a single particle. In this way it is possible to split the required laser power to several traps and thus reduce the intensity concentration. At the same time, this technique enables to rotate and tilt objects. Figure 4(a) shows the rotation of a yeast cell by using two traps and rotating one trap around the other. Figure 4(b) shows the same procedure for tilting the object out-of-plane. Thus holographic optical tweezers enable the rotation and positioning of objects in three dimensions with high accuracy [70].

Another method is to employ an expanded trapping field (approximately the size of the particle) with homogeneous illumination. It was demonstrated that with extended light fields it is possible to generate the same trapping force with lower energy density [70].

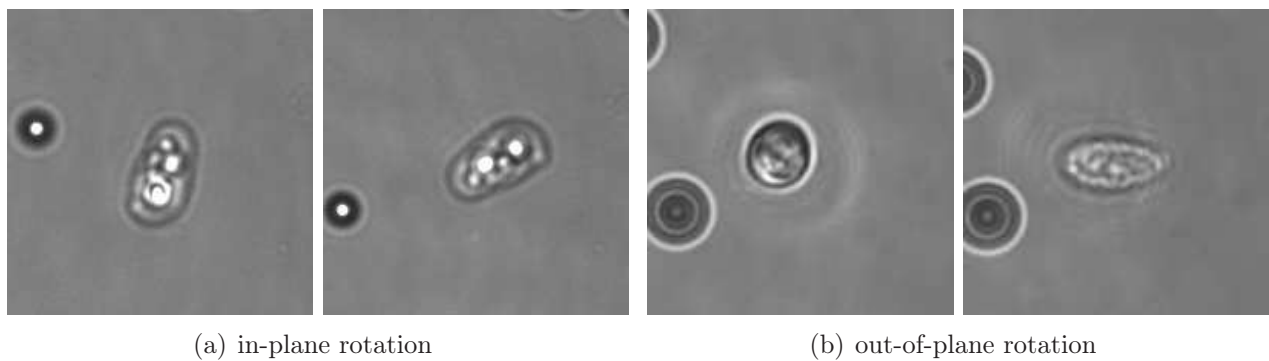


Figure 4.: Three-dimensional manipulation: In-plane and out-of-plane rotation of yeast cells by means of two traps.

## Trapping with Expanded Light Fields

In order to improve and simplify automated trapping, it is advantageous to trap axially displaced particles in the same plane. To this end a light field with an expanded axial intensity distribution is employed which uses the scattering force to push the particles towards the focal plane of the microscope objective.

This method is closely related to Bessel-Beam trapping where axial expanded intensity patterns are generated in the near field of an axicon. However in this approach, the axicon is introduced in the Fourier domain of the object. This results in an axially expanded trapping spot with a strong axial gradient to cancel the scattering force in the focal plane, which - in contrary to conventional Bessel beam trapping - enables axial stable trapping.

By this approach, optical guiding to the focus is achieved for a particle that is positioned between microscope lens and the trap. This has been demonstrated clearly for particles which are out of plane up to 20  $\mu\text{m}$  for a  $63\times/1.2\text{W}$  microscope objective despite the fact that the maximum intensity of the beam is reduced. In order to achieve the ideal trapping speed and reliability (see Figure 5), the maximum axicon phase shift  $h_a$  has to be adjusted to the trapping distance. These traps are well suited for automated trapping.

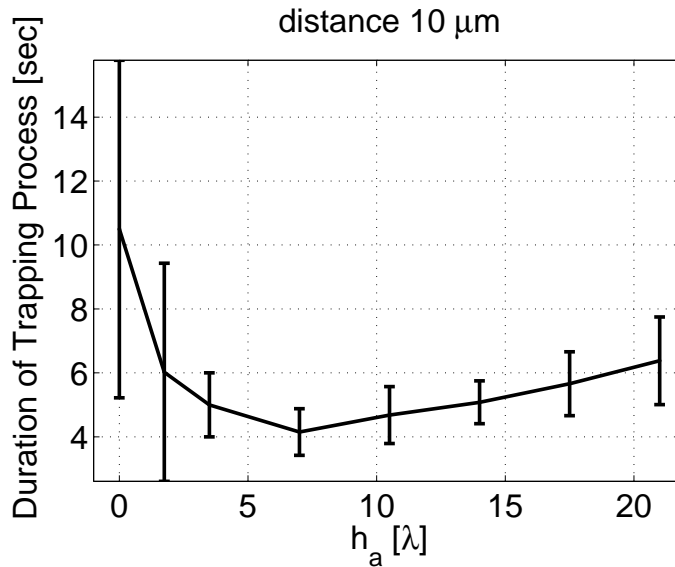


Figure 5.: Duration of the trapping process for a 3  $\mu\text{m}$  particle being positioned 10  $\mu\text{m}$  away from the stable trapping position. The duration and the repeatability (given by the error bars) of the trapping process can be improved by using an axially expanded trapping field. The optimal axicon height  $h_a$  depends on the distance.

## Holographic Twin Traps

Another novel trapping field allowing three-dimensional trapping when using a single low numerical aperture microscope lens based on two holographically generated counter propagating beams has been developed. Two traps with different axial positions are superimposed by reflecting one beam at the object slide (see Figure 6). This way, the scattering force is balanced and stable trapping is realized by the gradient force. Trap alignment as well as axial and lateral displacement of the particle can be performed by software.

First experiments are presented which show the functionality of twin traps. Trapping forces were computed to find the influence of focus separation and spherical aberration. Moderate amounts of spherical aberrations do not lead to a reduction of the trapping stiffness but to a strong decrease of the escape force. Therefore aberration correction, which is easy to implement with the holographic approach, can be very helpful to enable or improve trapping in the presence of aberrations.

Small focus separations ( $d_z = \pm 5 \mu\text{m}$  for  $10 \mu\text{m}$  particles) do not influence the axial trap stiffness of the twin trap, whereas the axial escape force strongly decreases. For spherical aberrated beams, a similar behaviour was found, but the optimum trapping conditions were found for a slight separation of the foci ( $d_z = 1.5$  for  $10 \mu\text{m}$  particles and  $SA = 0.1 \mu\text{m}$ ) [187].

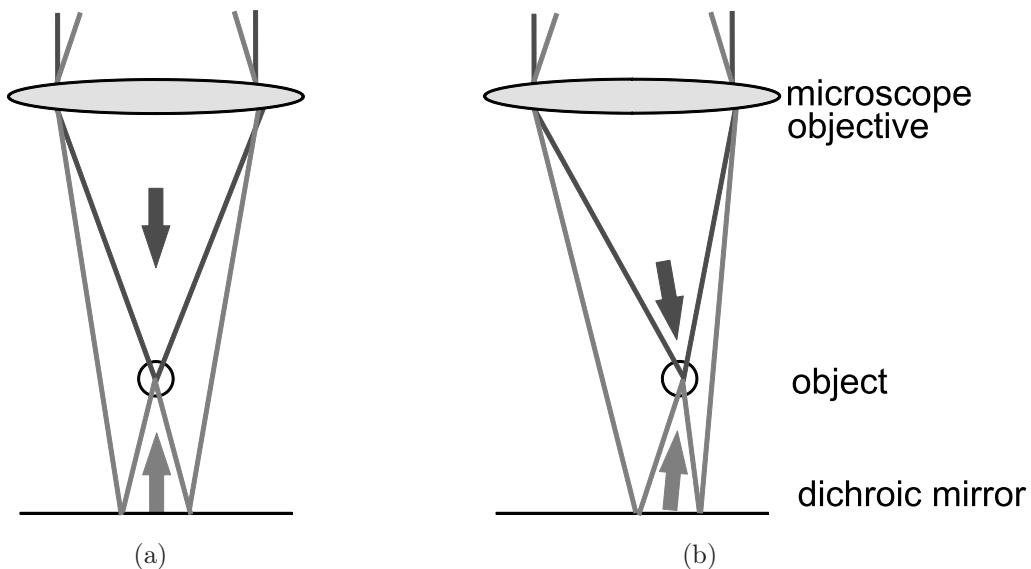


Figure 6.: Principle of holographic twin traps. Two holographically generated traps at different axial positions are superimposed to yield stable three-dimensional trapping at low numerical aperture.

## Holographic $4\pi$ Microscope

The operation of holographic twin traps is in principle analogue to  $4\pi$  microscopy. In a  $4\pi$  setup, which is used in combination with fluorescence confocal imaging, the focal regions of two counter propagating waves are coherently superimposed. The maximum of the thereby generated standing wave is used for the excitation of fluorescence. This results in a considerably reduced central spot volume of the 3D-point-spread function (PSF) and therefore an improved resolution in the axial direction. Unfortunately, until now implementation of the method as well as its practical application is very complicated and only one (expensive) commercial microscope is available [2, 16].

In this thesis, a novel method of  $4\pi$ -microscopy is proposed by using the holographic twin trap technique. We obtain a  $4\pi$  geometry with one single microscope objective and one single beam path. In this way, conventional research microscopes can be used for  $4\pi$ -microscopy.

As a first step towards the implementation of a holographic  $4\pi$ -microscope, it is demonstrated that it is possible to generate standing waves with a hologram. Figure 7 shows the vertical intensity gradient of the emitted light from a micro-sphere (diameter 175 nm) when shifting the phase of the hologram by adding a constant offset  $\Delta\phi$ . The intensity of the second peak is smaller than the first peak due to the bleaching of the micro-sphere. The phase difference between two peaks is  $2\pi$ . For a complete  $4\pi$  imaging system the method should be automated so that a three-dimensional scanning can be realized by adapting the hologram. Parallelization is possible by using more complex holograms generating multiple double foci at the same time [82].

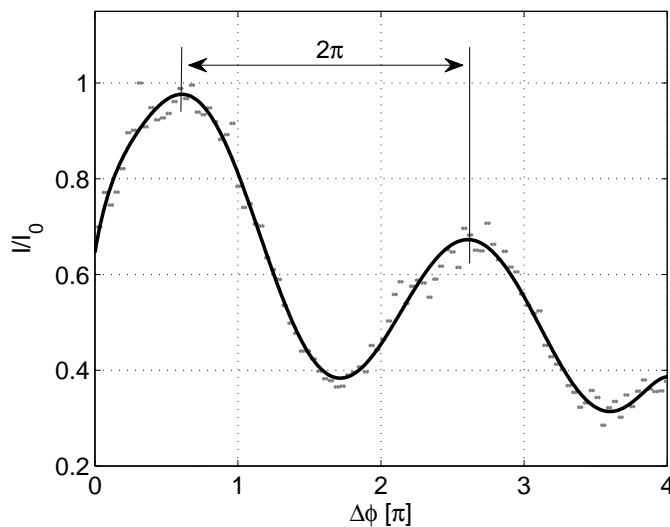


Figure 7.: Recorded intensity for the holographically generated standing wave for the  $4\pi$  experiments.

## Holographic Microbeam for Purification of Cell Lines

In combination with the classification of cells, it might be interesting to purify cell lines for further processing. This can be done by using high intensity light to destroy unwanted objects.

A combined tool of holographic optical tweezers and holographic microbeam has been realized. To cut biological materials by light, pulsed ultraviolet light is preferable. Therefore, the microbeam setup requires a SLM which is able to work in this wavelength region. A digital micro mirror device (DMD) especially designed for UV applications has been used. Aberrations introduced by the DMD are compensated to improve the cutting quality.

Beside destroying objects, the setup enables to move, cut and process micro-scaled objects like biological cells or tissue in three dimensions with high accuracy. Processing cells and other objects in solution ambitious as they are pushed away by each laser pulse due to the radiation pressure. Hence they have to be trapped by the holographic optical tweezers to enable processing. Figure 8 shows a human erythrocyte being moved using a holographic optical trap and then destroyed using a holographically generated microbeam [189].

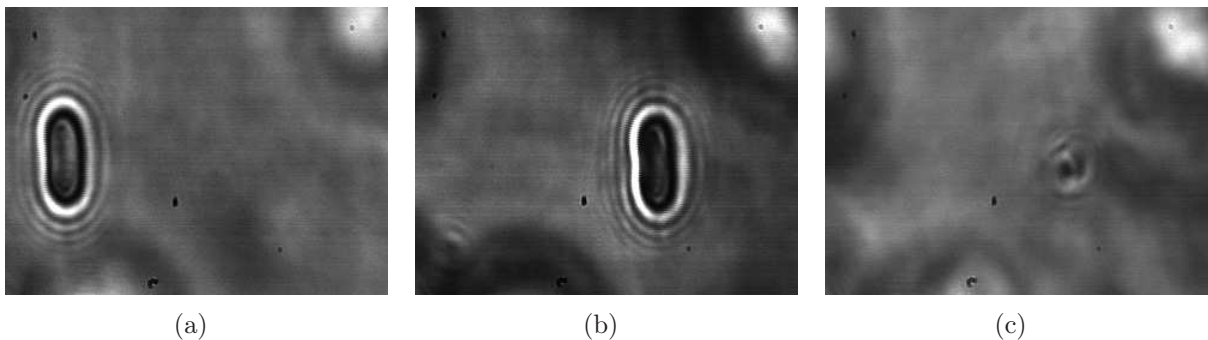


Figure 8.: Human erythrocyte being moved using a holographic optical trap (a,b) and being destroyed using a holographically generated microbeam (c).

## Technical Feasibility of the Automation

Holographic optical tweezers are very well suited for automation, because they are generated and controlled by software. The principal lateral positioning accuracy depends on the microscope objective and ranges from 2 nm for a  $63\times/1.2W$  objective up to 3.25 nm for a  $40\times/1.2W$  objective. However, for automated trapping, the positioning accuracy is mainly limited by the calibration of hologram parameters and spot position. Model-based calibration is usually not accurate enough (e.g. due to slight misalignment).

Therefore, a calibration method has been implemented and investigated. The calibration is done by scanning a spot over a mirror positioned in the object plane at different z-positions. The exact position is analysed by image processing and the relation between hologram parameters and spot position was approximated by a three-dimensional polynomial fit. With this approach, satisfying accuracy for lateral trapping was achieved. However, the axial calibration is limited by the poor repeatability of the positioning of the microscope objective.

In addition, when defocusing the spot using the hologram, aberrations strongly increase since the microscopic setup is not designed for defocused illumination. However it is possible to correct for them to a certain extend by superimposing a correction hologram.

Holographic optical tweezers are a very suitable tool for marker-free cell diagnosis. In this thesis, the principle of a new approach based on optical force has been proofed and most challenges concerning the automated trapping have been identified and solved. This work is therefore towards the developement of an automized workstation for cell diagnosis and drug development.



# 1. Einführung

Optische Methoden eignen sich aufgrund der potenziell hohen Geschwindigkeit und hohen Auflösung sowie der berührungslosen Arbeitsweise prinzipiell sehr gut für diagnostische Fragestellungen innerhalb der Biomedizin. Von besonderer Bedeutung sind (beim Stand der Technik) Methoden aus dem Bereich der diagnostischen Immunologie. In der Regel wird hier die Bindung von markierten Antikörpern an Antigene genutzt, um einen Vorgang innerhalb einer biologischen Probe sichtbar zu machen. Zur Detektion werden bildbasierte Analysemethoden (manuell oder automatisiert) sowie Durchflusszytometer (z.B. FACS) genutzt. Insbesondere fluoreszenz-basierte Anfärbungen werden oft und mit großem Erfolg implementiert [164, 94, 89, 96]. Gebräuchlich sind aber auch radioaktive Marker oder luminogene Moleküle. Die Einsatzbereiche sind ausgesprochen vielfältig und reichen von der Schwangerschaftsdiagnostik über Herzmarker bis zum Nachweis von Viren.

Der Einsatz von Markern ist allerdings (anwendungsabhängig) auch mit teilweise signifikanten Nachteilen verbunden. Zunächst müssen geeignete Marker für eine Klassifikation zur Verfügung stehen und zugelassen sein. Darüber hinaus erfordert der Einsatz oft aufwändige biochemische Vorbereitungsschritte und führt potenziell zu einer Zellbeeinflussung bzw. einer Änderung der Messergebnisse selbst, z.B. durch negative Beeinflussung der Zellviabilität.

In dieser Arbeit wird ein neuartiges Verfahren der markerfreien Zelldiagnostik basierend auf der optischen Kraftwirkung auf Zellen untersucht. In Kombination mit Bildverarbeitung (Positionsdetektion und Grundklassifikation der Zellen) können in dem vorgeschlagenen System Zellen, die rein bildbasiert nicht differenziert werden können, automatisiert unterschieden werden. Detektiert wird die Bewegung der Zellen in holografisch generierten Lichtfeldern. Die Einfangdynamik wird als wichtiges Differenzierungsmerkmal eingesetzt, da diese Dynamik empfindlich vom Zellzustand abhängig ist.

Bei ersten Voruntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte die grundsätzliche Funktionsweise der Methodik in Zusammenarbeit mit dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart für Leukämiezellen bereits verifiziert werden. Dabei konnte eine Differenzierung der Zellen in einem signifikant früheren Stadium als mit den bekannten fluoreszenzbasierten Markerverfahren erzielt werden.

Das vorgeschlagene System arbeitet mit Einzelzellen und ist damit bereits bei sehr geringen Probenmengen (Größenordnung: einige hundert Zielzellen) bis hin zu größeren Probenmengen (einige tausend bis zehntausend Zellen) einsetzbar.

Um ein solches System effektiv einsetzen zu können und Messungen mit Hilfe statistischer Methoden auswerten zu können, ist jedoch eine Parallelisierung und Automatisierung unabdingbar. Basis für die Automatisierung ist eine voll- oder zumindest teilautomatisierte Probenhandhabung, eine automatisierte Objekterkennung (z.B. bildverarbeitungs basiert) sowie der automatisierte Einfang und die automatisierte Kraftmessung.

Im Rahmen dieser Arbeit wird dieses neuartige markerfreie Diagnoseverfahren untersucht. Hierbei werden insbesondere die Aspekte der Parallelisierung und Automatisierung des optischen Einfangs beleuchtet. Insbesondere für die dabei identifizierten Hindernisse werden Lösungsvorschläge auf Basis der holografischen Manipulation entwickelt. Diese Arbeit bildet also den ersten Schritt in Richtung eines vollautomatisierten Werkzeugs, welches zur Diagnose und Medikamentenentwicklung eingesetzt werden kann.

## 2. Stand der Technik

Die markerfreie optische Diagnostik erfolgt beim Stand der Technik klinisch vor allem durch reine Streulichtmessungen, z.B. in Durchflusszytometern, Doppler Anemometern oder interferometrischen Anordnungen [85, 28, 182]. Eine Vielzahl anderer optischer Messmethodiken sind aber ebenfalls grundsätzlich geeignet, wichtige diagnostische Information zu liefern. Zu nennen sind hier u.a. die autofluoreszenzbasierten Techniken [166, 149, 95], spektroskopische Analysemethoden (z.B. Raman Spektroskopie [138] und Abwandlungen [142]) [101], quantitativer Phasenkontrast [91] und polarisationsbasierte Verfahren. Weiterhin von Bedeutung ist die Erweiterung hin zu einer Analyse der zeitlichen Dynamik von Messgrößen bzw. Prozessen (z.B. time-gated Fluoreszenz [149]). Verfahren, bei denen die Zellen zunächst auf einer Oberfläche immobilisiert werden, um dann z.B. durch optische Nahfeldmikroskopie oder Kraftmikroskopie analysiert zu werden, sind hinsichtlich einer Echtzeitanalyse, wie sie aufgrund des hohen geforderten Durchsatzes für statistische Auswertungen gefordert ist, als problematisch zu beurteilen.

Eine neue Klasse optischer Diagnosemethoden nutzt die Kraftwirkung von Licht auf Zellen bzw. Zellbestandteile oder andere mikroskopisch relevante Partikel (z.B. Viren). Als einer der Ersten arbeitete Arthur Ashkin auf dem Gebiet der optischen Kraftwirkung auf mikroskopische Objekte. Er entwickelte in den 1970er Jahren die ersten optischen Fallen, so genannte Doppelfallen [6]. Dabei stabilisieren zwei gegenläufige leicht defokussierte Gaußsche Strahlen mit geringer numerischer Apertur ein mikroskopisches Objekt [143]. Den Doppelfallen stehen die später entwickelten Einzelfallen gegenüber, die den stabilen Einfang mit einem einzigen Mikroskopobjektiv ermöglichen [10]. Diese Geometrie wird weitläufig als optische Pinzette bezeichnet.

Mit Hilfe optischer Kräfte wurden in den letzten Jahren interessante Grundlagenuntersuchungen im Bereich der Diagnostik durchgeführt. Zu nennen sind insbesondere Verfahren, die durch gezielte Deformation der Zellen Rückschlüsse auf die mechanischen Parameter der Zelle als Ganzes bzw. ihrer Membran zulassen. Unter anderem wurde gezeigt, dass sich das Verfahren zur Analyse von Erythrozyten [65, 64] eignet. Zudem wurde ein mikrofluidisches System für die optische Messung der mechanischen Eigenschaften von Einzelzellen von Martin et al. realisiert [114]. Eine weitere bekannte Klasse an Analysemethoden nutzt die Messung der Kraftkopp-

lung an spezifische Sekundärobjekte (z.B. andere Zellen, vor allem aber beschichtete oder unbeschichtete Microbeads) [155]. Diese Verfahren sind sehr gut für Grundlagenuntersuchungen geeignet. Eine Übertragung auf kosteneffiziente, automatisierte Diagnostiken scheint aber ausgesprochen schwierig.

Bekannt sind weiterhin verschiedene Zellsortierungsverfahren, bei denen Zellen passiv gemäß ihrer optischen Kraftwirkung sortiert werden [52, 104, 111]. In der jüngsten Vergangenheit wurden erste experimentelle Untersuchungen von verschiedenen Gruppen hinsichtlich einer Messung der Zelldynamik in Lichtfeldern zur hochgenauen Diagnostik durchgeführt. Diese Methodik, die auch Basis des hier vorgeschlagenen Systems ist, nutzt ebenfalls die Kraftwirkung von Licht auf einzelne unmarkierte Zellen. Darüber hinaus wurden von anderen Gruppen frühdiagnostische Erfolge für die Malariadetektion durch optisch-induzierte Rotation von Erythrozyten [26, 121] sowie die Detektion von viraler Infektion von HeLa Zellen [84], Viren [85] und die Klassifikation von Hefezellen [173] eindrucksvoll demonstriert.

Genau wie die Streuwirkung (siehe oben) hängt die optische Kraftwirkung allerdings in komplexer Weise von einer Vielzahl von Zelleigenschaften ab. Zu nennen sind hier insbesondere Zellgröße, Brechzahl, Zellform, Membraneigenschaften, innere Struktur, umgebendes Medium sowie Absorption. Ein diagnostischer Einsatz im Sinne einer Zellklassifikation ist beim Stand der Technik aber nur dann möglich, wenn eine hochreine Sortierung im Vorfeld bereits anderweitig (z.B. per FACS) erfolgt ist. Daher wurden bisher auch lediglich manuelle Untersuchungen durchgeführt. Eine automatisierte Analysemethodik basierend auf der Ablenkung durch optisch-induzierte Kraft ist nicht bekannt. Am nächsten kommt dem eine von Wang et al. realisierte Lösung, bei der zumindest das Objektfeld eines Weitfeld-Mikroskops teilweise analysiert werden kann [134].

Es zeigt sich also, dass die Einsatzmöglichkeiten optischer Manipulation sehr vielfältig sind. Bisher findet sie jedoch hauptsächlich in forschungsnahen Anwendungen Einsatz, wo die normalerweise umständlichen Handhabungen sowie der sehr geringe Durchsatz teilweise toleriert werden können. Diese Beschränkungen haben ihre Ursache in der Ansteuerung konventioneller Manipulationssysteme, die weitgehend durch mechanische Veränderung optischer Elemente wie Spiegel oder Linsen erzielt wird [167, 38, 183]. Zur Erzeugung mehrerer Fallen eignen sich akusto-optische Modulatoren, deren Einschränkung jedoch durch zeitliches Multiplexing gegeben ist.

Abhilfe schafft die bereits 1996 von Hayasaki vorgeschlagene holografische Realisierung optischer Pinzetten [72]. Diese wurde 1999 am Institut für Technische Optik (ITO) [129, 107] und an der Universität Chicago nahezu zeitgleich realisiert, in Chicago zunächst statisch und am ITO mit Hilfe von räumlichen Lichtmodulatoren [129, 107, 25].

---

Dynamische Lichtmodulatoren können auch in einer abbildenden Anordnung z.B. mittels generalisiertem Phasenkontrast zur Generierung der gewünschten Lichtfelder eingesetzt werden [120, 36]. Hier ist eine axiale Manipulation jedoch nur durch die Kombination mit Doppelfallen möglich<sup>1</sup> [135].

Der holografische Ansatz bietet den großen Vorteil, beliebige Lichtfelder generieren zu können, wodurch die Fallenanzahl und Fallenform frei wählbar sind. Die Fallen sind unabhängig voneinander – ohne Einsatz beweglicher Mechanik – in drei Dimensionen positionierbar. Gegenüber dem generalisierten Phasenkontrast bietet der holografische Ansatz neben der 3D-Positionierung zusätzlich den Vorteil einer höheren Lichteffizienz. So kann theoretisch das gesamte, auf den Lichtmodulator fallende Licht in die gewünschten Fallen gelenkt werden.

Am Markt sind inzwischen verschiedene Realisierungen der optischen Pinzette verfügbar. So bieten die Firmen JPK Instruments (Berlin) und Intracel (Herts, UK) konventionelle optische Pinzetten (Nanotracker bzw. Cell Robotics LaserTweezers) als Modul für verschiedene Standardforschungsmikroskope (Olympus, Nikon, Zeiss) an. Die Firma PALM Microlaser Technologies<sup>2</sup> (Bernried, Deutschland) bietet neben der optischen Pinzette (PALM MicroTweezers) auch verschiedene Geräte zum optischen Schneiden mit Hilfe eines UV-Lasers sowie ein kombiniertes Gerät an, das sowohl den Einfang und optisches Schneiden als auch Mikrodissektion<sup>3</sup> ermöglicht (PALM CombiSystem). Die Systeme der Firma PALM sind ebenfalls Ein-Fallen-Systeme. Lange Zeit wurde die einzige kommerziell verfügbare holografische optische Pinzette von der Firma Arryx Inc. (Chicago, USA), bei der es sich um eine Ausgründung aus der Universität Chicago handelt, angeboten. Seit dem Jahr 2007 wird auch eine holografische Arbeitsstation von der Universität Glasgow angeboten. Aufgrund der hohen Kosten und der bedingt automatisierbaren Anwendung liegen deren Zielgruppen momentan noch eher im Bereich der Forschung [51].

Eine andere Lösung verfolgt die Arbeitsgruppe um J. Glückstad, die ein System auf Basis von Doppelfallen mittels generalisiertem Phasenkontrast entwickelt hat [170]. Diese Arbeitsstation steht momentan nur ausgewählten biologischen Instituten zur Erprobung zur Verfügung.

Die holografisch optische Manipulation eröffnet die Möglichkeit der Automatisierung der optischen Manipulation ohne mechanische bewegte Teile, da die Steuerung der Fallen allein auf Software und der Ansteuerung des Lichtmodulators basiert. Auf diese Weise ist es möglich, mehrere Objekte parallel dreidimensional zu manipulieren, um somit den Durchsatz zu erhö-

---

<sup>1</sup>Axiale Bewegung konnte durch die Variation des Intensitätsverhältnisses zwischen den gegenläufigen Strahlen erreicht werden.

<sup>2</sup>inzwischen Teil der Carl Zeiss AG

<sup>3</sup>Mikrodissektion bezeichnet eine Technik, bei der mit Hilfe eines Lasers ein Segment aus einem Gewebe geschnitten wird. Durch Strahldruck wird dieses Segment in die Höhe katapultiert und in einem Probengefäß aufgefangen, so dass es unabhängig von umliegendem Gewebe untersucht werden kann.

hen. In Kombination mit dem Einsatz von Mikrofluidik-Systemen eröffnet sich die Möglichkeit der automatisierten, auf der Kraftwirkung basierenden Zelldiagnostik.

# 3. Grundlagen der optischen Mikromanipulation

Als allgemeine Grundlage für diese Arbeit diene ein dynamisch–holografischer Ansatz zur Generierung der zur Manipulation benötigten Lichtfelder, bei dem ein räumlicher Lichtmodulator als holografisches Element eingesetzt wird. In diesem Abschnitt wird vor der Einführung in die hierfür grundlegenden Verfahren (Holografie, Abschnitt 3.3 ) und Technologien (Funktionsweise verschiedener Lichtmodulatoren, Abschnitt 3.2) zunächst ein Überblick über diesen für die Arbeit grundlegenden Ansatz gegeben (Abschnitt 3.1). Die verschiedenen Prinzipien der Manipulation werden in Abschnitt 3.4 erläutert.

## 3.1. Dynamische Holografie zur optischen Mikromanipulation in der Mikroskopie

Optische Manipulationsverfahren ermöglichen den Einfang, die Bewegung und das Schneiden mikroskopischer Objekte, wie z.B. biologischer Zellen bzw. deren Bestandteile und mikromechanischer Komponenten. Grundlage solcher Manipulationen ist in der Regel die Einkopplung eines Lasers in ein Mikroskop. Durch die starke Fokussierung mit Hilfe des Mikroskopobjektivs wird in der Objektebene ein Spot erzeugt, mit dem mikroskopische Proben geschnitten, gefangen oder bewegt werden können (siehe Abschnitt 3.4). Es gibt verschiedene Verfahren, den Manipulationsspot zu bewegen. Eine der gebräuchlichsten Methoden ist der Einsatz eines mit hoher Genauigkeit verkippbaren Spiegels oder akusto-optischen Modulators, mit dem der Spot über die Probe gescannt werden kann. Auf die verschiedenen Methoden der mechanischen Steuerung soll hier nicht näher eingegangen werden. Verschiedene Möglichkeiten sind in Svoboda et al. dargestellt [167]. In der Regel werden solche Aufbauten äußerst komplex, sobald dreidimensionale Bewegungen oder räumliches Fangen mit mehreren Fallen erforderlich sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten flexiblen Manipulationsverfahren basieren auf einer holografischen Lichtmodulation. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des Manipulati-

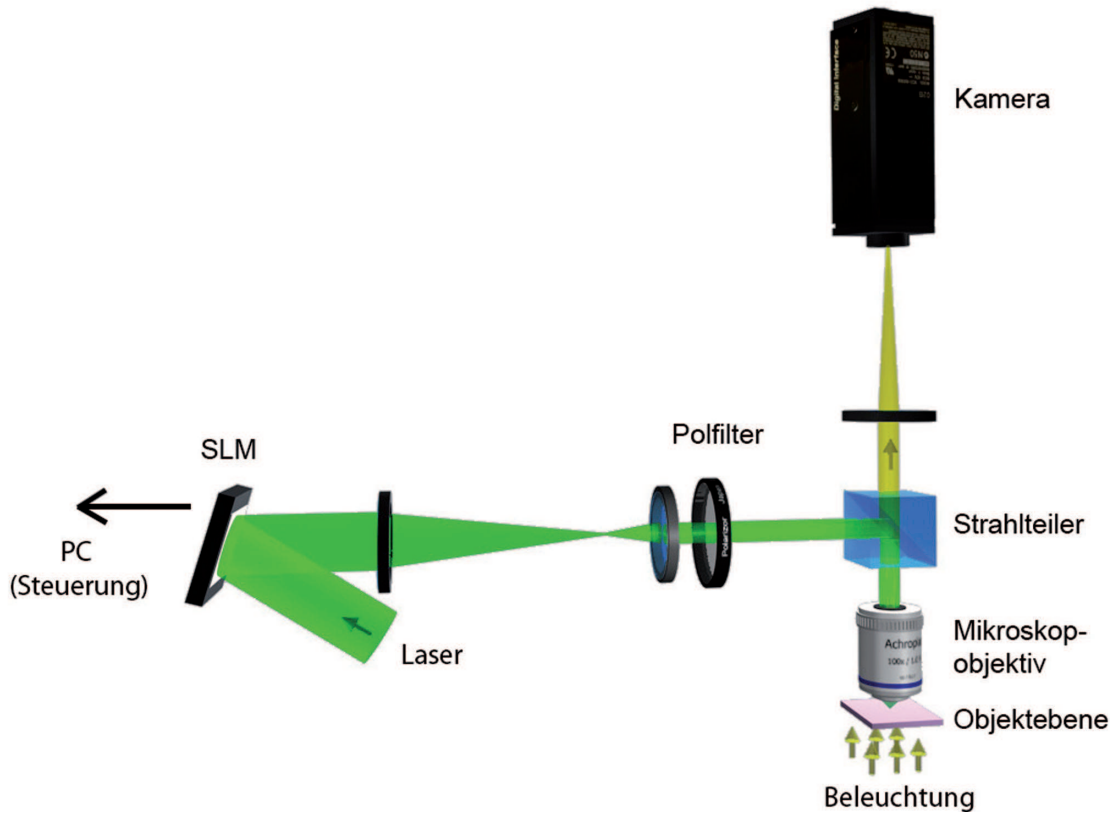


Abbildung 3.1.: Schematischer Aufbau der holografischen Mikromanipulation: Mit Hilfe eines Laserstrahls wird das in einen SLM eingeschriebene Hologramm ausgelesen und in ein Mikroskop eingekoppelt. Die Rekonstruktion des Hologramms erfolgt durch das Mikroskopobjektiv. Auf diese Weise kann eine nahezu beliebige Lichtverteilung in der Objektebene realisiert werden. Dieses Prinzip kann zur Steuerung der Mikromanipulation genutzt werden.

onsprinzips. Das zentrale Element zur Erzeugung der benötigten Lichtfelder ist ein räumlicher Lichtmodulator. Das in den Lichtmodulator eingeschriebene Hologramm wird mit einem kollimierten Laserstrahl ausgelesen. Der gebeugte Strahl wird in das Mikroskop eingekoppelt und durch das Mikroskopobjektiv in der Objektebene fokussiert. Üblicherweise wird der räumliche Lichtmodulator (engl. spatial light modulator, SLM) in der Fourierebene positioniert. Das eingeschriebene Hologramm entspricht – nach Multiplikation mit dem beleuchtenden Lichtfeld – somit der Fouriertransformierten des gewünschten Lichtfelds. Die Rekonstruktion (Fouriertransformation) wird durch das Mikroskopobjektiv realisiert [129] (siehe hierzu auch Abschnitt 3.3). Der Einsatz dynamischer diffraktiver optischer Elemente (DOEs) im Strahlengang des Mikroskops eröffnet einen hohen Grad der Flexibilität für die optische Mikromanipulation, da eine beliebige Anzahl von Manipulations-Spots unterschiedlicher Form unabhängig voneinander generiert und in allen drei Raumdimensionen einfach durch Änderung des Hologramms bewegt werden kann.



Zusammengefasst ergeben sich gegenüber konventionellen, nicht-holografischen Manipulationsmethoden eine Reihe von Vorteilen:

- Die Anzahl der Manipulations-Spots ist nahezu frei wählbar. Sie wird theoretisch nur durch das Orts-Bandbreite-Produkt des SLM (Abschnitt 3.3.4) und die zur Verfügung stehende Laserleistung beschränkt.
- Spotprofile können flexibel geändert werden. Dies eröffnet zum einen die Möglichkeit, system- oder probeninduzierte Aberrationen, die die Fallenqualität beeinflussen, zu korrigieren [131, 130], zum anderen können objektangepasste Lichtfelder generiert werden.
- Die Manipulations-Spots lassen sich unabhängig voneinander sowohl lateral als auch axial positionieren.
- Der Aufbau der optischen Manipulation ist im Gegensatz zu konventionellen Mehrspot-systemen äußerst kompakt und einfach, da die Manipulations-Spots vollständig durch den SLM gesteuert werden.
- Da die Position der Manipulations-Spots digital gesteuert wird, ist im Vergleich zu mechanisch gesteuerten Fallen eine sehr hohe Auflösung und Genauigkeit der Positionierung erreichbar.

Die bedeutendsten Nachteile des holografischen Ansatzes ergeben sich durch den Einsatz von (nicht-idealen) Lichtmodulatoren:

- In der Praxis sind die Positionierung der Fallen sowie die Aberrationskorrektur begrenzt durch das Orts-Bandbreite-Produkt (siehe Abschnitt 3.3.4), bzw. die Grauwertauflösung des Lichtmodulators.
- Durch die meist pixelierte Struktur der eingesetzten Lichtmodulatoren (Füllfaktor, Übertragungsfunktion der Pixel) sowie nicht-perfekte Modulationsbedingungen ist die Lichteffizienz der Elemente reduziert (siehe Abschnitt 3.3.4).

In den Jahren nach der Entwicklung des holografischen Ansatzes [72, 129] galt zudem die Berechnungsdauer der Hologramme als Hauptnachteil. Eine Steuerung der Spots in Echtzeit war damals nicht möglich. Durch die Implementierung der Berechnung auf der Grafikkarte [68] und der damit ermöglichten Manipulation in Videoechtzeit ist dieser Nachteil des Verfahrens inzwischen ausgeräumt (siehe Abschnitt 3.3.2).

## 3.2. Räumliche Lichtmodulatoren

Unter räumlichen Lichtmodulatoren (engl. spatial light modulator, SLM) werden an dieser Stelle Elemente verstanden, die es ermöglichen, gezielt die Intensität, Phase oder Polarisation einer Lichtwelle räumlich und zeitlich aufgelöst zu beeinflussen. Es sind sehr viele Prinzipien der räumlichen Lichtmodulation bekannt (siehe hierzu [31, 109] sowie [70] mit weiterführender Literatur).

Eine Klassifikation entsprechender Modulatoren kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen. Wesentliche Parameter sind hierbei Pixelierung, Füllfaktor, Ansteuerung (optisch oder elektronisch adressiert), Auflösung und die Modulationsart (Kennlinie der komplexen vektoriellen Modulation).

Für holografische Anwendungen sind insbesondere hochauflösende Modulatoren mit hohem Orts-Bandbreite-Produkt (siehe Abschnitt 3.3.4) von Interesse. Unter den Modulatoren, die ein hohes Orts-Bandbreite-Produkt aufweisen, sind pixelierte Flüssigkristall-Modulatoren (engl. liquid crystal displays, LCDs) und Mikro-Elektro-Mechanische Systeme (engl. micro-electro-mechanical systems, MEMS) die einzigen, die für einen Massenmarkt entwickelt wurden und aus diesem Grund zu einem verhältnismäßig geringen Preis verfügbar sind. Die Entwicklung dieser Modulatoren wurde vor allem durch Display- und Projektionsanwendungen vorangetrieben. Da beide Technologien in dieser Arbeit eingesetzt wurden, werden sie im Folgenden näher vorgestellt. Einen einführenden Überblick über weitere wichtige Modulatortechniken (z.B. akusto-optische Modulatoren, Membranspiegel, magneto-optische Modulatoren) gibt Goodman [55].

### 3.2.1. Flüssigkristall-Modulatoren

Der Einsatz von Flüssigkristallen in Displays ist weit verbreitet. Neben dem weithin bekannten Einsatz in Computermonitoren und Fernsehgeräten finden Flüssigkristall-Modulatoren zum Beispiel auch Anwendung in Projektoren. Bei diesen Anwendungen steht in erster Linie die Modulation der Amplitude im Vordergrund. Sie lassen sich jedoch ebenfalls zur Phasenmodulation einsetzen.

Flüssigkristall-Modulatoren machen sich die Doppelbrechungseigenschaften von Flüssigkristallen zu Nutze, d.h. je nach Ausrichtung der Kristalle wirkt ein anderer Brechungsindex auf das einfallende polarisierte Licht. Durch Anlegen einer externen Spannung an einen Pixel kann die Ausrichtung der Moleküle und damit der effektive Brechungsindex örtlich aufgelöst geregelt werden. Es gibt verschiedene Typen von Flüssigkristallen, die sich vor allem in ihrer

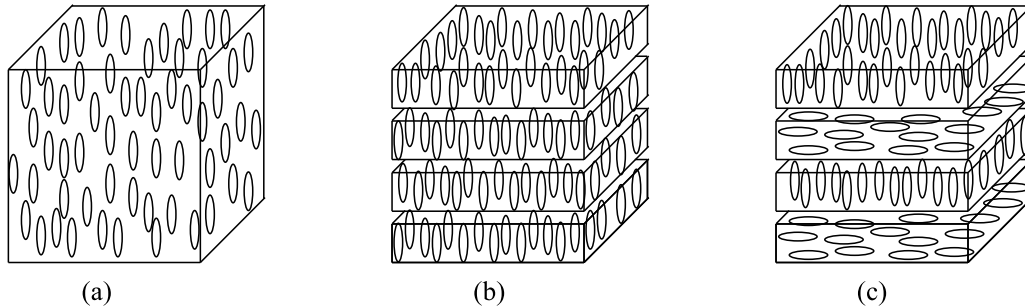


Abbildung 3.2.: Molekulare Anordnungen verschiedener Typen von Flüssigkristallen: nematische (a), smektische (b) und cholesterische (c) Flüssigkristalle (nach [55]). Der Übersichtlichkeit halber wurden die Ebenen separiert.

molekularen Anordnung unterscheiden. Es handelt sich dabei um nematische, smektische und cholesterische Flüssigkristalle (siehe Abb. 3.2).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Modulatoren basieren auf verdrillt- und planar-nematischen Flüssigkristallen (engl. twisted- bzw. planar-nematic liquid crystals). Diese Modulatoren unterscheiden sich in ihrer Bauweise durch verdrillt bzw. planar angeordnete Flüssigkristalle. Die Moleküle richten sich an der Polierichtung der sogenannten Alignmentlayer aus, die auf den umgebenden Glasplatten aufgebracht sind. Sind die Polierichtungen senkrecht zueinander, so ergibt sich ein verdrillt-nematisches System (siehe Abb. 3.3), sind sie parallel zueinander, ein planar-nematisches System.

Beim Anlegen einer Spannung verändert sich die Ausrichtung der Moleküle (Abbildung 3.3(b)) und damit auch die Phasenschiebung des Lichts. In konventionellen Anwendungen wird bei geeigneter Wahl der Eingangspolarisation zusätzlich die Polarisation beeinflusst. Dies wird in den üblichen LC-Anwendungen (Monitor, Fernsehgerät) genutzt, um mit Hilfe von Polarisationsfiltern eine Amplitudenmodulation zu erzielen. Auf diese Weise kann mit Hilfe von Flüssigkristalldisplays durch Anlegen einer Spannung orts aufgelöst eine Phasen- bzw. Amplitudenmodulation realisiert werden. Die Spannung kann entweder mittels elektrischer oder optischer Adressierung gesteuert werden. Dementsprechend wird zwischen elektrisch und optisch adressierbaren Lichtmodulatoren unterschieden. Auf die entsprechende technische Umsetzung soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden (Details siehe z.B. Efron [31]).

Im Gegensatz zu elektrisch adressierbaren Modulatoren kann bei optisch adressierbaren Modulatoren (OASLMs) ein Füllfaktor von 1 realisiert werden. Damit sind sie sehr effizient, benötigen jedoch auf der Gegenseite eine aufwändige Anordnung zur optischen Ansteuerung [107].

Die realisierte Phasenschiebung hängt jedoch nicht nur von der angelegten Spannung ab. Vor allem bei hohen Gitterperioden kann es durch hohe Spannungsunterschiede zwischen benach-

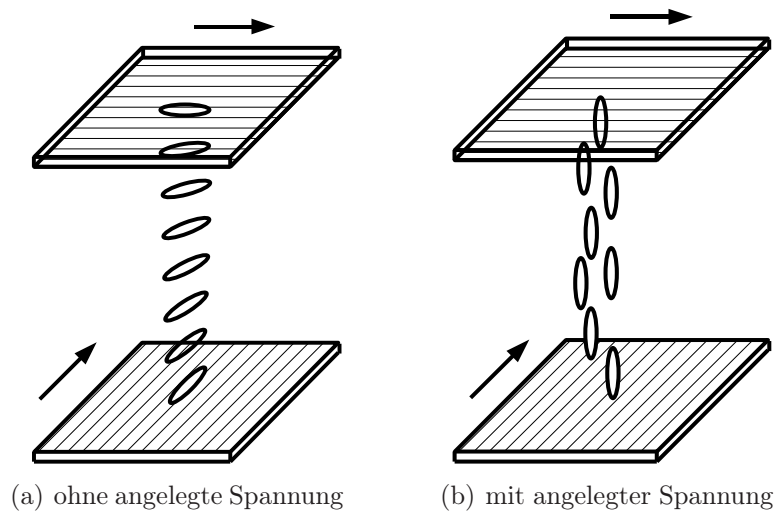


Abbildung 3.3.: Funktionsweise einer verdreht-nematischen Flüssigkristallkammer. Die Ausrichtung der Flüssigkristalle und damit der Einfluss auf Polarisation und Phase einer einfallenden Lichtwelle ändert sich bei Anlegen einer Spannung. Die Pfeile geben jeweils die Polierichtung der Alignmentlayer an.

barten Pixeln zu einem Streufeldefekt (dem so genannten Fringing-Field Effekt) kommen. Durch „Übersprechen“ zwischen benachbarten Pixeln können hohe Phasensprünge nicht mehr sauber realisiert werden. Als Folge verwischen Kanten und die maximale Phasendifferenz wird reduziert. Dies führt zu einer reduzierten Beugungseffizienz (siehe Abschnitt 3.3.4) und störenden Fehlordnungen. Das Ausmaß des Fringing-Field Effekts ist abhängig von den verwendeten Flüssigkristallen, der Pixelgröße sowie der Dicke der Flüssigkristallschicht [3, 32].

LCDs sind sowohl in Reflexion als auch Transmission erhältlich. Während transmittive Lichtmodulatoren meist einfacher in vorhandene Aufbauten integriert werden können, haben reflektive LCDs, die normalerweise auf einer Silizium Backplane (engl. liquid crystal on silicon, LCoS, siehe z.B. Lueder [109]) realisiert werden, den Vorteil, dass sich die Ansterelektronik hinter dem Pixel befindet und somit die aktive Fläche des Pixels (und damit der Füllfaktor) auch bei kleinen Pixelabständen (engl. pixel pitch) sehr groß sein kann (bis zu 95% [70]).

Der spektrale Arbeitsbereich von Flüssigkristall-Modulatoren liegt im Sichtbaren bis nahen Infrarot (NIR). Die Lichtmodulation ist im Allgemeinen wellenlängenabhängig. Ein Einsatz im ultravioletten Spektralbereich ist problematisch, da sich die in kommerziellen Elementen eingesetzten organischen Flüssigkristallmoleküle vergleichsweise leicht unter UV Bestrahlung zersetzen [103, 108].

In dieser Arbeit sollen zwei LC-basierte SLMs zum Einsatz kommen: das LC-R 2500 sowie das – für den NIR-Bereich besser geeignete – HEO 1080 P von Holoeye. Die technischen Details sowie deren Modulationseigenschaften finden sich in Anhang A.1.

### 3.2.2. Mikro-Elektro-Mechanische Systeme

Neben der Modulation auf Basis von Flüssigkristallen sind Mikro-Elektro-Mechanische Modulatoren die zweite große Gruppe kommerziell eingesetzter Lichtmodulatoren. Hierbei werden mechanisch bewegbare Spiegel lithographisch auf einem Chip aufgebracht. Jeder Spiegel repräsentiert einen Pixel, der mit Hilfe einer angelegten Spannung individuell angesteuert werden kann.

Die Technik Mikro-Elektro-Mechanischer Systeme erlaubt grundsätzlich die Realisierung sowohl von Phasen- als auch von binärer Amplitudenmodulation.

Zur Modulation der Phase wird die Höhe der einzelnen Mikrospiegel verstellt, wie dies beispielsweise im Phasen-Mikrospiegelement (engl. piston micro mirror array, Piston MMA) des Fraunhofer Instituts für Photonische Mikrosysteme (IPMS) verwirklicht wurde. Durch Anlegen einer Spannung können die Spiegel kontinuierlich senkrecht zur Oberfläche des Displays verschoben werden.

Einfacher zu realisieren (und für Massenanwendungen wichtiger) sind MEMS mit binärer Amplitudenmodulation. Diese wird durch Verkipfung der Mikrospiegel erreicht. Durch zeitliches Multiplexing lassen sich im Sinne einer zeitlichen Mittelung für visuelle Anwendungen trotz binärer Amplitudenmodulation auch Graustufen darstellen. Für die in dieser Arbeit realisierte Hologrammrekonstruktion ist dieses zeitliche Multiplexing nicht direkt einsetzbar<sup>1</sup>.

Lange Zeit waren hauptsächlich zwei entsprechende Systeme auf dem Markt erhältlich: der Digital Light Processing (DLP<sup>®</sup>) Chip der Firma Texas Instruments (TI), besser bekannt als Digital Micromirror Device (DMD) und das Amplituden-Mikrospiegeelement (engl. tilt micro mirror array, Tilt MMA) des IPMS der Fraunhofer Gesellschaft. Daneben beschäftigt sich eine Reihe von Forschungsinstituten mit der Herstellung von MEMS, die zum Großteil zu Forschungszwecken eingesetzt werden. Eine Ausnahme bildet hierbei das belgische Forschungsinstitut Interuniversity Microelectronics Centre (IMEC), das 2008 ein neues hochauflösendes MMA (11 Megapixel) für industrielle Anwendungen auf den Markt brachte.

Grundsätzlich eignet sich das Piston-MMA für holografische Anwendungen sehr gut, da Phasenhologramme deutlich effizienter als Amplitudenhologramme sind (siehe hierzu Abschnitt 3.3.1 und 3.3.4). Nachteilig ist jedoch die relativ geringe momentan verfügbare Auflösung (200×240 Pixel). Im Gegensatz dazu sind amplitudenmodulierende Mikrospiegelemente mit sehr hohen Auflösungen verhältnismäßig günstig erhältlich.

---

<sup>1</sup>Zeitliches Multiplexing lässt sich jedoch in holografischen Anwendungen zur Speckle-Reduktion bei der Rekonstruktion einsetzen

Grundsätzlich sind MEMS aufgrund des Prinzips (Modulation durch Reflexion) für einen sehr breiten Spektralbereich vom Ultraviolett (UV) bis ins Infrarot (IR) nutzbar. Das Piston MMA realisiert eine maximale Höhenverstellung von 300 nm. Da sich die Phasenschiebung aus der doppelten Höhenverstellung ergibt, arbeitet dieses Element jedoch nur für Wellenlängen bis zu etwa 600 nm effizient [106]. Beim DLP<sup>®</sup>-Chip hingegen konnten Schädigungen durch UV-Bestrahlung festgestellt werden (so genannte stuck mirrors, siehe [59]). Aus diesem Grund wurde gerade für diesen Bereich eine modifizierte Version entwickelt [30], die zudem eine verbesserte Transmission des Deckglases für UV-Licht aufweist.

## 3.3. Holografie

Holografie (griechisch: holos=vollständig und graphein=aufzeichnen) ist eine Technik zur dreidimensionalen Aufzeichnung von Objekten durch Speicherung der Phase. Sie wurde 1947 durch den ungarischen Physiker Denis Gabor entwickelt, der ursprünglich das Auflösungsvermögen in der Elektronenmikroskopie verbessern wollte [42]. Wirklich eingesetzt werden konnte diese Technik jedoch erst nach der Entwicklung des Lasers im Jahr 1960. Für seine Entwicklung erhielt Gabor 1971 den Nobelpreis.

In diesem Abschnitt wird auf verschiedene Arten von Hologrammen und deren Eigenschaften eingegangen, die eine wichtige Rolle für die in dieser Arbeit eingesetzten Techniken spielen.

### 3.3.1. Grundprinzip

Das Grundprinzip der Holografie basiert auf einem zweistufigen Verfahren. Im ersten Schritt wird das komplexe Lichtfeld der Objektwelle  $o$  durch kohärente Überlagerung mit einer bekannten Referenzwelle  $r$  gespeichert. Das entstehende Interferenzmuster wird mit einem hochauflösenden photosensitiven Detektor aufgezeichnet (vgl. Abb. 3.4(a)):

$$H = |o + r|^2 = |o|^2 + |r|^2 + o \cdot r^* + r \cdot o^* \quad (3.1)$$

Im zweiten Schritt wird die Phase durch Beleuchten mit einer Rekonstruktionswelle rekonstruiert. Entspricht die Rekonstruktionswelle der bei der Aufnahme verwendeten Referenzwelle, so gilt für die Rekonstruktion (vgl. Abb. 3.4(b)):

$$r \cdot H = r \cdot |o|^2 + r \cdot |r|^2 + o \cdot |r|^2 + r \cdot r \cdot o^* \quad (3.2)$$

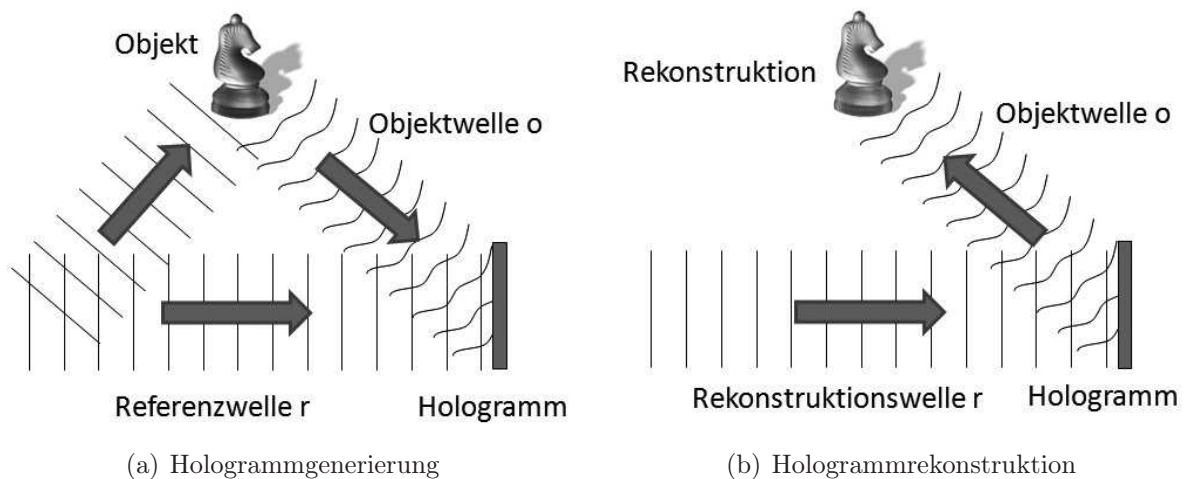


Abbildung 3.4.: Die klassische Holografie ist ein 2-Schritt-Verfahren: Im ersten Schritt wird das Hologramm durch komplexe Überlagerung von Objekt- und Referenzwelle aufgezeichnet. Nach Entwicklung des holografischen Films kann das Hologramm durch Beleuchtung mit einer Rekonstruktionswelle rekonstruiert werden.

Der Term  $o \cdot |r|^2$  repräsentiert dabei bis auf einen konstanten Faktor die komplexe Objektwelle einschließlich deren Phaseninformation und bildet das virtuelle, im Allgemeinen orthoskopische Bild an der Position ab, an der das Objekt zuvor stand. Der Term  $r \cdot r \cdot o^*$  stellt die konjugiert-komplexe Information des Objekts dar und bildet im Falle einer ebenen Referenz- bzw. Rekonstruktionswelle ( $r = r^*$ ) das reelle, pseudoskopische Bild. Die Terme  $r \cdot |o|^2$  und  $r \cdot |r|^2$  sind Gleichlichtterme, die keine Objektinformation enthalten. Im Fall von Inline- bzw. On-Axis-Hologrammen stören diese Terme durch Überlagerung das eigentliche Bild. Aus diesem Grund werden Hologramme oft durch Einführen eines Winkels zwischen Objekt- und Referenzwelle mit einer Trägerfrequenz überlagert, um eine räumliche Trennung von virtuellem und reellem Bild sowie der zusätzlichen störenden Terme zu erreichen [105].

Idealerweise sollen Hologramme die unabhängige Modulation von Amplitude und Phase realisieren. In der Praxis sind diese beiden Parameter jedoch miteinander gekoppelt, so dass keine gleichzeitig unabhängige Modulation möglich ist. Reale Hologrammmedien sind daher dahingehend ausgelegt, möglichst nur einen der Parameter gezielt zu beeinflussen (Amplituden- bzw. Phasenhologramme), in der Praxis werden jedoch immer beide Parameter zu einem gewissen Grad moduliert.

In der klassischen Holografie werden zunächst prinzipbedingt Amplitudenhologramme aufgezeichnet. Sie haben jedoch den entscheidenden Nachteil, das Lichtfeld durch feldabhängige Absorption zu modulieren, was eine sehr geringe Beugungseffizienz (ca. 6%) zur Folge hat. Das Phasenhologramm hingegen moduliert im Idealfall nur die Phase des Lichtfelds und kann aus diesem Grunde ohne Intensitätsverluste arbeiten. Ein binäres Hologramm weist als Pha-

senhologramm die vierfache Beugungseffizienz (siehe Abschnitt 3.3.4) des entsprechenden Amplitudenhologramms auf.

Amplitudenhologramme stellen reelle Funktionen dar, die in der Fourierebene zur 0. Ordnung symmetrische Signale liefern. Phasenhologramme liefern durch ihre komplexe Modulation eine größere Freiheit in der Fourierebene. So können beispielsweise so genannte Blaze-Hologramme<sup>2</sup> theoretisch 100% der einfallenden Intensität in die erste Beugungsordnung ablenken, womit störende nullte, höhere und negative Beugungsordnungen eliminiert werden.

Die Verwendung der Amplitudeninformation zur Erzeugung einer Phasenmodulation, wie dies beim klassischen Bleichen von Hologrammen erfolgt, führt zwangsläufig zu einem erhöhten Rekonstruktionsfehler. Bei computergenerierten Hologrammen kann dieses Problem durch geeignete Hologrammberechnung aber vermieden werden.

#### 3.3.2. Digitale Holografie

Der Begriff *digitale Holografie* bezeichnet nach allgemeiner Übereinkunft das Verfahren der digitalen Aufnahme eines Hologramms und dessen numerische Rekonstruktion. Generell gesprochen umfasst die digitale Holografie jedoch alle Verfahren, die es ermöglichen, die Wellenfront digital zu speichern.

Der Übersichtlichkeit halber lassen sich die digital-holografischen Verfahren in Generierungs- und Rekonstruktionsverfahren unterteilen:

Unter digital-holografischen *Generierungsverfahren* werden sowohl Aufzeichnungstechniken verstanden, bei denen das filmbasierte Aufzeichnungsmedium durch einen geeigneten photoelektrischen Sensor (z.B. CCD, CMOS) ersetzt wird, als auch die numerische Berechnung von Hologrammen (computergenerierten Hologramme, CGH oder auch synthetische Hologramme), bei der komplett auf einen physikalischen Aufbau verzichtet wird.

Digital-holografische *Rekonstruktionsverfahren* umfassen sowohl die numerische Rekonstruktion (z.B. durch mathematische Fouriertransformation bei Fourierhologrammen), bei der ebenfalls auf einen physikalischen Aufbau verzichtet wird, als auch analoge Rekonstruktionsverfahren, bei denen das Hologramm mit Hilfe eines digital ansteuerbaren Elements (räumlicher Lichtmodulator) oder einem statischen Element dargestellt wird.

Die digitale Holografie findet Anwendung in einer Vielzahl messtechnischer Verfahren, wie beispielsweise die holografische Mikroskopie [113] und die vergleichende digitale Holografie [153].

---

<sup>2</sup>Ein Blazegitter kann anschaulich mit einem Prisma verglichen werden. Aufgrund der Modulo  $2\pi$  Phase entsteht ein sägezahn-förmiges Beugungsgitter.



Das in dieser Arbeit eingesetzte digital-holografische Verfahren basiert auf der Berechnung computergenerierter Hologramme, welche mit Hilfe eines Lichtmodulators zur Rekonstruktion dargestellt werden.

CGHs eröffnen die Möglichkeit, nahezu beliebige Lichtverteilungen in der Rekonstruktionsebene zu erzeugen. Dabei können störende Terme und Rekonstruktionsfehler durch geeignete Hologrammberechnung eliminiert oder zumindest reduziert werden. Dies kann zum einen erreicht werden, indem nur der Nutzterm der Gleichung 3.1 dargestellt wird. Zum anderen können Hologramme<sup>3</sup> mit Hilfe von Hologrammoptimierungs-Algorithmen direkt berechnet werden.

Zur Realisierung der Manipulationsverfahren in dieser Arbeit werden Hologramme verwendet, die durch Rekonstruktion einzelne, unabhängig voneinander in drei Dimensionen bewegbare Spots erzeugen. Diese werden im Zusammenhang mit der optischen Pinzette als Fallen und in Bezug auf das optische Skalpell als Schneidspots bezeichnet. Der Einfachheit halber wird in den folgenden Ausführungen einheitlich von Fallen gesprochen.

Zur analytischen Berechnung der entsprechenden CGHs bildet die gewünschte Lichtverteilung in der Rekonstruktionsebene die Basis zur Berechnung. Durch eine inverse Fouriertransformation ergibt sich das Hologramm des gewünschten Lichtfeldes. Dies führt zu einer einfachen Beschreibung der komplexen Amplitude eines Fourierhologramms der Falle  $j$  [68]

$$H_j(x, y) = H_0 e^{i(k'_x x + k'_y y)} \cdot e^{ik'_z(x^2 + y^2)} \cdot e^{i\Phi(x, y)} \quad (3.3)$$

Hierbei ist die laterale Position des Spots durch  $e^{i(k'_x x + k'_y y)}$  (anschaulich: Phasenkeil) und die axiale Position durch  $e^{ik'_z(x^2 + y^2)}$  (anschaulich: Linsenterm) gegeben.  $e^{i\Phi(x, y)}$  bestimmt das Potential der Falle. Mit diesem Faktor können beispielsweise Aberrationen (durch Einschreiben der inversen Phasenverteilung) korrigiert oder spezielle Lichtverteilungen (wie z.B. Donuts) erzeugt werden.

Das Hologramm für  $N$  Fallen wird durch komplexe Superposition einzelner Fallen erreicht:

$$H_N = \sum_{j=1}^N H_j \quad (3.4)$$

Um den Modulationseigenschaften des darstellenden Mediums gerecht zu werden, muss aus diesem komplexen Feld die Phasen- bzw. Amplitudeninformation ermittelt werden. Ein Pha-

---

<sup>3</sup>insbesondere Phasenhologramme, deren analoge Aufzeichnung prinzipbedingt auf Amplitudeninformationen basiert

senhologramm ergibt sich nach

$$H_P(x, y) = \arctan \left( \frac{\Im(H_N)}{\Re(H_N)} \right) \quad (3.5)$$

und ein Amplitudenhologramm nach

$$H_A(x, y) = \Re(H_N). \quad (3.6)$$

Dies ist eine sehr einfache und schnelle Methode zur analytischen Berechnung von Hologrammen. Da jedoch Hologrammmedien (insbesondere SLMs) keine komplexen Hologramme darstellen können und hier eine fehlerbehaftete Methode zur Extraktion der Phasen- bzw. Amplitudenmodulation angewendet wird (Gleichung 3.5 bzw. 3.6), entstehen bei der Rekonstruktion mit zunehmender Anzahl von Spots störende Artefakte wie beispielsweise Störordnungen (höhere Ordnungen, nullte Ordnung). Diese Störungen können durch den Einsatz optimierender Algorithmen, wie iterative Fourier-Transformations-Algorithmen (IFTA, z.B. [48, 83, 161]) oder direkte Suchalgorithmen [156, 93, 161] stark reduziert werden. Diese Algorithmen sind im Vergleich zur analytischen Berechnung jedoch sehr rechen- und damit zeitintensiv.

Zur Realisierung einer Manipulation in Video-Echtzeit müssen die Hologramme in entsprechender Geschwindigkeit berechnet werden. Handelsübliche CPUs stoßen jedoch bei der gleichzeitigen Berechnung vieler Fallen mit hoher Pixelzahl mittels analytischer Algorithmen an ihre Grenzen (vor allem wenn zeitgleich noch eine Kamera angesteuert wird oder Bildverarbeitung erforderlich ist). Aus diesem Grunde wurde die Berechnung der Hologramme auf einer mittels Cg<sup>4</sup> programmierbaren Grafikkarte implementiert [68, 67, 132]. Da moderne Grafikkarten in hohem Maße parallel rechnen und das Ergebnis direkt auf dem Bildschirm ausgegeben wird, kann die Rechenzeit deutlich reduziert werden, wobei gleichzeitig die CPU für andere Aufgaben frei bleibt. Während zunächst nur die analytische Berechnung in Echtzeit möglich war, zeigt die rasante Entwicklung im Grafikkartenbereich inzwischen Wirkung, so dass mittlerweile auch iterative Fourier-Transformations-Algorithmen in Echtzeit berechnet werden können [83].

---

<sup>4</sup>Programmiersprache für Grafikprozessoren: „C for graphics“

### 3.3.3. Hologrammgeometrie

Hologramme werden häufig gemäß der Aufnahme- bzw. Rekonstruktionsgeometrien klassifiziert. Dabei ist der räumliche Zusammenhang zwischen Objekt und Hologrammebene der entscheidende Faktor. Die Haupteinteilung erfolgt in drei Klassen:

Bei einem **Bildebenenhologramm** kann die Beziehung zwischen Objekt und Hologramm durch eine Abbildung beschrieben werden. Diese Technik wird vorzugsweise bei Objekten angewandt, die keine allzu tiefe räumliche Ausdehnung besitzen. Die Rekonstruktion befindet sich direkt in der Hologrammebene.

Bei einem **Fresnelhologramm** hingegen liegt das Hologramm bei der Aufnahme im Bereich der Fresnelschen Beugung des Objektes. Die Struktur des Hologrammgitters ist dabei stark abhängig vom konkreten Abstand.

Die dritte Klasse stellen die so genannten **Fourierhologramme** dar. Mathematisch ist die Beziehung zwischen Hologramm  $H(x, y)$  und Objekt bzw. Rekonstruktion  $h(u, v)$  durch eine Fouriertransformation gegeben. Bei Beleuchtung des Hologramms mit einer ebenen Welle wird die Rekonstruktion in der hinteren Brennebene einer Linse mit der Brennweite  $f$  sichtbar, da diese zwischen vorderer und hinterer Brennebene eine optische Fouriertransformation durchführt:

$$h(u, v) = \int \int_{-\infty}^{\infty} H(x, y) \exp \left[ -i \frac{2\pi}{\lambda f} (ux + vy) \right] dx dy \quad (3.7)$$

Die Amplitude und Phase an der Position  $(u, v)$  in der Rekonstruktionsebene sind gegeben durch Amplitude und Phase der beiden Raumfrequenzen ( $f_x = u/\lambda f, f_y = v/\lambda f$ ) in der Hologrammebene. Wird das Hologramm aus der vorderen Brennebene verschoben und in einem Abstand  $d$  vor der Linse angebracht, so ergibt sich folgende Beziehung zwischen Hologramm und Rekonstruktion [55]:

$$h(u, v) = \frac{\exp \left[ i \frac{2\pi}{\lambda f} \left( 1 - \frac{d}{f} \right) (u^2 + v^2) \right]}{i\lambda f} \cdot \int \int_{-\infty}^{\infty} H(x, y) \exp \left[ -i \frac{2\pi}{\lambda f} (ux + vy) \right] dx dy \quad (3.8)$$

Dies entspricht nur bei Betrachtung der Intensität der Fourierbeziehung, da der Phase ein zusätzlicher Defokusterm überlagert ist. In den meisten Anwendungen ist jedoch die Intensität der Rekonstruktion von Interesse und die Phasenverteilung hat keinen Einfluss. Für  $d = f$  entfällt der Phasenterm und die Beziehung entspricht einer exakten Fouriertransformation (vgl. Gl. 3.7).

Bei der Rekonstruktion von Hologrammen mit Hilfe von Linsen muss zusätzlich der Einfluss der begrenzenden Apertur einbezogen werden. Dieser wurde in Gleichung 3.8 vernachlässigt, ist jedoch in Goodman [55] ausführlich erläutert.

Fourierhologramme haben gegenüber Bildebenen- und Fresnelhologrammen eine Reihe von Vorteilen und werden deshalb in dieser Arbeit eingesetzt. Neben der einfachen mathematischen Beschreibung kann die Größenskalierung des Objektes über die Wahl einer geeigneten Rekonstruktionslinse beeinflusst werden. Zudem haben lokale Defekte keinen starken Einfluss, da das gesamte Hologramm zur Rekonstruktion jedes einzelnen Punktes beisteuert. Weiterhin wird auch das (besonders in der digitalen Holografie oft kritische) Orts-Bandbreite-Produkt ideal ausgenutzt.

#### 3.3.4. Beurteilung von Hologrammen und Hologrammmedien

Bei der Bewertung der Qualität von Hologrammen sind im Wesentlichen zwei Parameter von Interesse: die Beugungseffizienz und die Rekonstruktionsqualität.

Diese Parameter werden jedoch in der Literatur von verschiedenen Autoren unterschiedlich definiert bzw. es werden verschiedene Verfahren bei der Ermittlung der Parameter eingesetzt. Daher ist bei einem Vergleich entsprechender Werte sorgfältig zu prüfen, welche Definition und welches Verfahren bei der Erfassung angewandt wurden. Zudem hängen sowohl Beugungseffizienz als auch Rekonstruktionsqualität stark vom gewählten Objekt ab.

Ein weiterer wichtiger Bewertungsparameter für das Hologrammmedium, der sich – besonders bei hohen Frequenzen – sowohl auf die Rekonstruktionsqualität als auch auf die Beugungseffizienz auswirkt, ist das Orts-Bandbreite-Produkt.

Im Folgenden werden diese drei Bewertungsparameter beschrieben:

**Rekonstruktionsqualität:** Die Rekonstruktionsqualität gibt die mittlere quadratische Abweichung der rekonstruierten Amplitude  $h_{ist}$  zur gewünschten Amplitude  $h_{soll}$  an [156]:

$$E = \sum_{u,v \in A} |h_{soll}(u,v) - \epsilon h_{ist}(u,v)|^2 \quad (3.9)$$

$A$  gibt das Gebiet der gewünschten Intensitätsverteilung an und  $\epsilon$  ist ein Skalierungsfaktor, der die von 1 unterschiedliche Beugungseffizienz berücksichtigt.

**Beugungseffizienz:** Die Beugungseffizienz eines Hologramms ist definiert über den Anteil der einfallenden Leistung  $I_0$ , der in die interessierende Beugungsordnung  $m$  (normalerweise die 1. Ordnung) abgelenkt wird [55]<sup>5</sup>:

$$\eta_m = \frac{I_m}{I_0} \quad (3.10)$$

Die Beugungseffizienz hängt stark von der Art des Hologramms ab. So haben beispielsweise Amplitudenhologramme im Vergleich zu Phasenhologrammen eine deutlich geringere Beugungseffizienz, da zur Modulation die Amplitude und damit die Intensität abgeschwächt wird (siehe hierzu Abschnitt 3.3.1). Eine Übersicht über typische theoretische Werte zeigt Tabelle 3.1 (nach [152]).

Diffraktive Struktur	theoretische Beugungseffizienz $\eta_1$
kontinuierliche Sinus-Amplitudengitter	6%
kontinuierliche Sinus-Phasengitter	34%
binäre Amplitudengitter	10%
binäre Phasengitter	41%
geblatztes Phasengitter	100%

Tabelle 3.1.: Übersicht über typische Werte der Beugungseffizienz der 1. Beugungsordnung ( $m = 1$ ) verschiedener diffraktiver Strukturen

**Orts-Bandbreite-Produkt:** In der Praxis sind die Positionierung der Fallen sowie die Aberrationskorrektur durch das Orts-Bandbreite-Produkt des Lichtmodulators begrenzt. Eine Überschreitung des Orts-Bandbreite-Produkts führt zu Aliasing. Bereits das Annähern an das Orts-Bandbreite-Produkt kann zu künstlicher Apodisation<sup>6</sup> führen.

Das Orts-Bandbreite-Produkt ist ein Maß für die Anzahl an Freiheitsgraden und ist definiert durch das Produkt der Ausdehnung des Signals im Ortsraum ( $L_x, L_y$ ) und der Bandbegrenzung im Frequenzraum ( $B_x, B_y$ ) [55]:

$$M = L_x B_x L_y B_y \quad (3.11)$$

Das Orts-Bandbreite-Produkt eines Lichtmodulators wird demgemäß über das Produkt seiner Ausdehnung und seinem Pixelpitch definiert. Somit entspricht es gerade der Anzahl der ansteuerbaren Pixel.

<sup>5</sup>Von einigen Autoren wird die Beugungseffizienz auch anders definiert. Meist wird dann als Bezugsgröße nicht die einfallende Intensität  $I_0$  sondern die Summe des gebeugten Lichts verwendet.

<sup>6</sup>lokal verringerte Beugungseffizienz aufgrund von Pixelstruktur sowie Quantisierungs- und Fringing-Field Effekten

Bei der Optimierung von Hologrammen sind die Beugungseffizienz und die Rekonstruktionsqualität bei gegebenem Orts-Bandbreite-Produkt in der Realität stark aneinander gekoppelt. So ist es möglich, die Rekonstruktionsqualität in einem begrenzten Bereich auf Kosten der Beugungseffizienz zu optimieren und umgekehrt.

### 3.3.5. Darstellung von Hologrammen mit pixelierten Lichtmodulatoren

Bei der Darstellung von Hologrammen mittels pixelierter Lichtmodulatoren treten in der Praxis Effekte auf, die die Beugungseffizienz und Rekonstruktionsqualität des Hologramms beeinflussen. Dies kann zu verschiedenen Artefakten wie stark ausgeprägten höheren Beugungsordnungen sowie Geisterfallen führen.

Dabei spielen unter anderem – je nach Modulator typ – der Füllfaktor der Pixelierung, eine nicht lineare Kennlinie oder bei LCDs der Fringing-Field Effekt eine Rolle. Phasenmodulatoren leiden oft unter zusätzlich auftretender Amplitudenmodulation oder nicht ausreichender maximaler Phasenschiebung (weniger als  $2\pi$ ). Falls neben der Phasen- bzw. Amplitudenmodulation eine Polarisationsmodulation auftritt, ergeben sich sekundäre Phaseneffekte aufgrund der nichttransitiven geometrischen Phase [147, 97].

Zusätzlich hat auch die Anzahl der Quantisierungsstufen  $N$  einen starken Einfluss auf die Beugungseffizienz. Aufgrund des limitierten Orts-Bandbreite-Produkts stehen jedoch meist für eine Gitterperiode nur eine limitierte Anzahl von Pixeln und damit darstellbare Graustufen zur Verfügung.

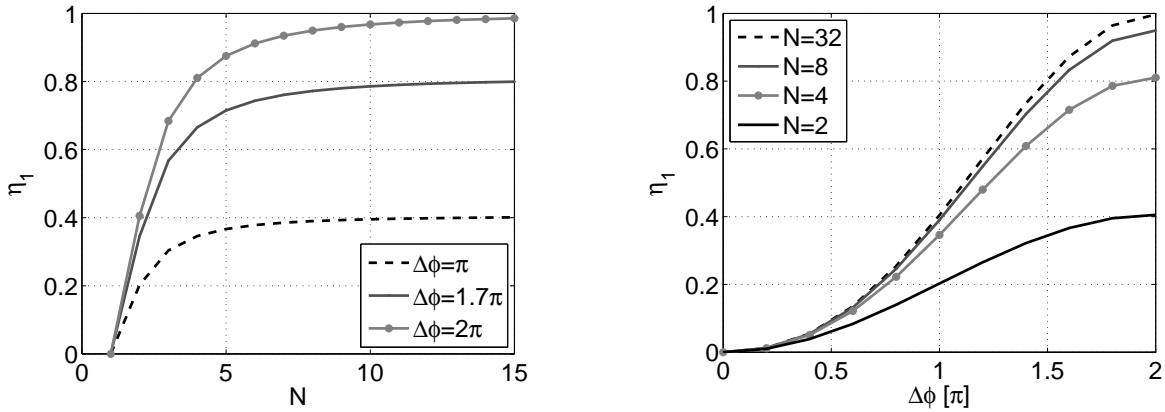
Die Beugungseffizienz der  $m$ -ten Beugungsordnung in Abhängigkeit der verwendeten Quantisierungsstufen  $N$  ergibt sich nach [55] zu:

$$\eta_m = \text{sinc}^2\left(\frac{m}{N}\right) \frac{\text{sinc}^2(m - \Delta\Phi/2\pi)}{\text{sinc}^2\left(\frac{m - \Delta\Phi/2\pi}{N}\right)} \quad (3.12)$$

Für maximale Phasenschiebungen  $\Delta\Phi = 2\pi$  ergibt sich für die 1. Beugungsordnung eine vereinfachte Darstellung [55]:

$$\eta_1 = \text{sinc}^2\left(\frac{1}{N}\right) \quad (3.13)$$

Abbildung 3.5(a) zeigt die Beugungseffizienz in Abhängigkeit der Quantisierungsstufen für verschiedene maximale Phasenschiebungen  $\Delta\Phi$  an. Es zeigt sich, dass bereits bei vier Quantisierungsstufen ca. 80% der maximalen Beugungseffizienz erreicht werden kann. Die Grenze



(a) Bei 4 Quantisierungsstufen wird bereits ca. 80% der maximalen Beugungseffizienz erreicht.

(b) Ab einer maximalen Phasenschiebung von ca.  $1,5\pi$  wird bereits ca. 80% der maximalen Beugungseffizienz erreicht.

Abbildung 3.5.: Beugungseffizienz von Hologrammen unter Einfluss verschiedener maximaler Phasenschiebung  $\Delta\phi$  und Quantisierungsstufen  $N$ .

von minimal vier Quantisierungsstufen bildet oft einen guten Kompromiss zwischen maximal erreichbarem Beugungswinkel ( $\sin \alpha = \lambda/g$ ) und Beugungseffizienz.

Die Beugungseffizienz eines mit einem SLM (mit absorbierender Interpixel-Struktur) dargestellten Hologramms ergibt sich nach [70]:

$$\eta_{SLM} = R \cdot (1 - A) \cdot FF^2 \cdot \eta_H \cdot \eta_{on}, \quad (3.14)$$

wobei die Reflektivität der Spiegelfläche des Elements durch  $R$  und die Absorptionseffekte (z.B. durch interne Reflexionen oder Amplitudenmodulation) durch  $A$  gegeben sind.  $FF$  ist der Füllfaktor des Elements (bezogen auf die Fläche).  $\eta_H$  ist die Effizienz des Hologramms, wobei die Quantisierung und Modulationseigenschaften (wie beispielsweise die Kennlinie) enthalten sind.  $\eta_{on}$  spielt eine Rolle bei Elementen, deren Modulationseigenschaften einer zeitlichen Abhängigkeit unterliegen.  $\eta_{on}$  gibt den „nutzbaren“ Zeitanteil an. Im Falle von MEMS kann dieser Anteil recht gering sein (weniger als 20% [70]).

Die Effizienz dynamisch veränderbarer Hologramme, die mit SLMs dargestellt werden, liegt typischerweise unter 50%. Einer der wichtigsten Parameter ist hierbei der Füllfaktor, da er quadratisch eingeht. Zum einen, weil  $(1 - FF)$  des Lichts an der Zwischenpixelstruktur absorbiert wird. Zum anderen, da aufgrund der pixelierten Struktur höhere Beugungsordnungen entstehen, die ebenfalls gemäß einem Faktor von  $(1 - FF)$  eingeht.

Um das Problem des Füllfaktors zu umgehen, wurden Kombinationen aus optisch und elektrisch adressierten LCDs verwendet [107]. Hierbei wurde ein pixelierter Modulator auf ein

OASLM abgebildet und durch einfache Tiefpassfilterung der Pixelierungseffekt unterdrückt. Dies ist jedoch mit einem entsprechend hohem apparativen Aufwand verbunden und wird deshalb tendenziell eher bei stark effizienzkritischen Anwendungen empfohlen.



## 3.4. Manipulation mit Licht

Im Makroskopischen ist der Impulsübertrag von Licht auf Materie so gering, dass im Normalfall keine spürbaren Auswirkungen beobachtet werden. Auf mikroskopische Objekte kann sich jedoch ein starker Einfluss bemerkbar machen. Unter entsprechenden Bedingungen lässt sich Licht einsetzen, um Mikropartikel nur mit Hilfe von Licht einzufangen und zu bewegen. Darüber hinaus können Objekte sogar geschnitten oder gezielt zerstört werden. Der Einfluss von Licht auf Materie ist dabei sehr stark von den Parametern des eingesetzten Lichts sowie dem zu manipulierenden Objekt und seiner Umgebung abhängig.

Beim optischen Einfang wird die Übertragung des Impulses ausgenutzt. Hierbei sind Absorptionseffekte unerwünscht, da sie das Objekt durch Erhitzen schädigen können, wohingegen die Absorption beim optischen Schneiden sogar genutzt wird.

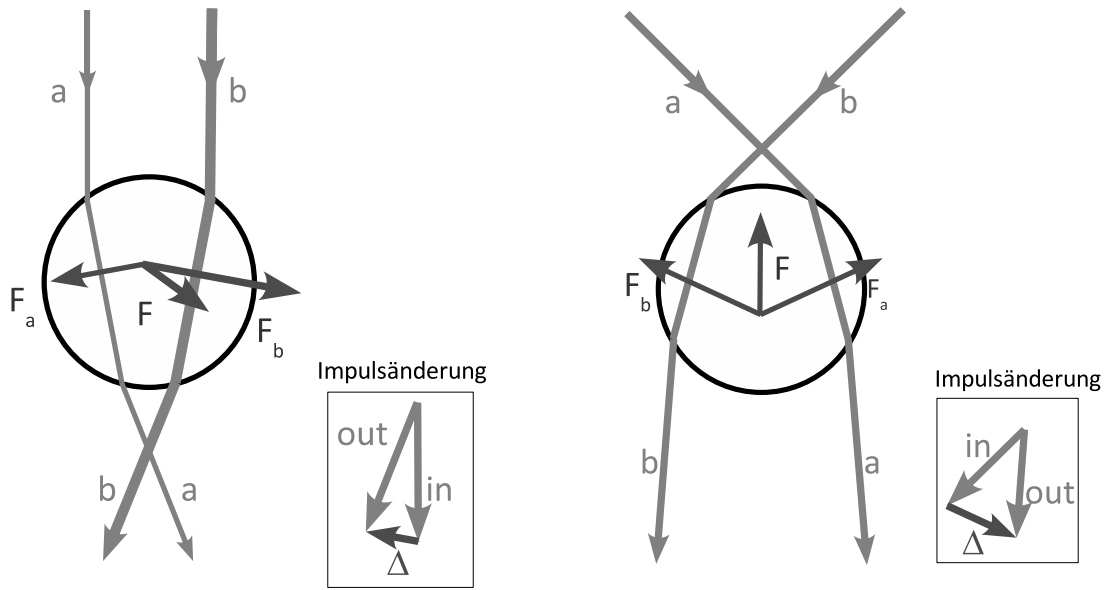
In dieser Arbeit wird sowohl die Manipulation durch optische Kräfte als auch Manipulation durch Absorption eingesetzt. Aus diesem Grund werden im Folgenden die Funktionsweisen des optischen Einfangs (Abschnitt 3.4.1) und Schneidens (Abschnitt 3.4.2) näher erläutert.

### 3.4.1. Optischer Einfang

Der optische Einfang basiert auf der Impulsübertragung von Licht auf Materie. Als einer der ersten Forscher auf diesem Gebiet konnte Arthur Ashkin in den 1970er Jahren zeigen, dass es möglich ist, Objekte von einigen Mikrometern Durchmesser im beugungsbegrenzten Fokus eines Laserstrahls einzufangen [6, 10].

Eine anschauliche Erklärung des optischen Einfangs von Partikeln liefert die Impulsbetrachtung (Abbildung 3.6): An den Grenzflächen zwischen zwei Medien wird Licht abgelenkt oder absorbiert und erfährt somit eine Impulsänderung, die auf das Objekt übertragen wird. Daraus resultieren zwei Kräfte: Die Streukraft wird durch Absorption und Reflexion des Lichts erzeugt und schiebt das Objekt in Strahlrichtung aus der Falle. Die Gradientenkraft entsteht durch Ablenkung des Lichts und wirkt (für Objekte mit größerer Brechzahl  $n_O$  als das umgebende Medium  $n_M$ ) in Richtung der höchsten Intensität des Lichtes. Für Objekte mit  $n_M > n_O$  wirkt die Kraft in entgegengesetzter Richtung und wird somit vom Ort höchster Intensität abgestoßen. Ein stabiler Einfang ist nur dann möglich, wenn die Gradientenkraft  $F_{Grad}$  größer als die Streukraft  $F_{Streu}$  ist [10]:

$$\frac{F_{Grad}}{F_{Streu}} \geq 1. \quad (3.15)$$



(a) lateraler Einfang: Die Summe aller Strahlen bewirkt eine Kraft in Richtung der höheren Intensität.

(b) axialer Einfang: durch Fokussierung des Eingangstrahls wird ein axialer Gradient erzeugt, der der Streukraft entgegenwirkt. Auch hier ergibt die Impulsbilanz eine Kraft in Richtung des Fokus.

Abbildung 3.6.: Strahlenoptische Darstellung der Gradientenkraft: ein nicht-homogener Laserstrahl durchläuft ein Objekt mit  $n_M < n_O$ . Strahlen höherer Intensität sind durch einen dickeren Strahl gekennzeichnet.

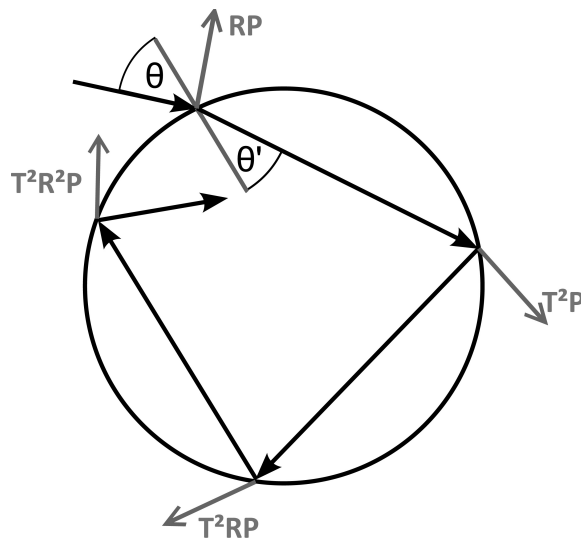


Abbildung 3.7.: Geometrie zur Berechnung der Kraft aufgrund der Streuung eines Strahles der Leistung  $P$  an einem sphärischen Objekt. Die Kraft wird beeinflusst durch den reflektierten Strahl mit der Leistung  $RP$  sowie eine unendliche Anzahl an gebrochenen Strahlen mit abnehmender Leistung  $T^2R^n P$ .

Es gibt verschiedene Ansätze, den optischen Einfang theoretisch zu beschreiben und Einfangkräfte zu berechnen. Die Theorien hängen stark von der Größe der Objekte ab, da für verschiedene Objektgrößen unterschiedliche Näherungen gelten. Grundsätzlich wird unterschieden zwischen Objekten, die deutlich kleiner und solchen, die deutlich größer als die Wellenlänge sind. Bei kleinen Objekten ( $r_O \leq 0,2\lambda$ ) wird ein elektromagnetisches Modell zur Beschreibung der Einfangkräfte eingesetzt. Große Objekte ( $r_O \geq 5\lambda$ ) werden normalerweise mit Hilfe der geometrischen Optik beschrieben [180]. Im Zwischenbereich existieren verschiedene Lösungsansätze, jedoch keine einheitlich anerkannte Theorie.

**Geometrisch-optisches Modell** Bei Objekten, die deutlich größer als die Wellenlänge sind, kann das von Ashkin [9] verwendete geometrisch-optische Modell mit guter Näherung zur Erklärung der Einfangkraft herangezogen werden.

Zunächst wird die Kraft eines einzelnen Strahls der Leistung  $P$  auf eine dielektrische Sphäre betrachtet: Ein unter dem Einfallswinkel  $\theta$  auf ein Objekt auftreffender Lichtstrahl wird entsprechend dem Brechungsgesetz [75]

$$n_M \sin \theta = n_O \sin \theta' \quad (3.16)$$

an den Grenzflächen teilweise gebrochen und teilweise reflektiert. Der gebrochene Anteil wird nun an jeder Grenzfläche wieder sowohl gebrochen als auch reflektiert, wobei jedoch intern reflektierte Strahlen keinen Einfluss auf die Einfangkraft haben.

Die auf das Objekt wirkende Kraft ergibt sich aus der Summe des reflektierten Anteils mit der Leistung  $RP$  sowie der (aufgrund interner Reflexion) unendlichen Anzahl gebrochener Strahlen mit abnehmender Leistung  $T^2P, T^2RP, \dots, T^2R^nP$ , wobei  $R$  und  $T$  die Fresnelschen Reflexions- und Transmissionskoeffizienten darstellen. Da die Fresnelkoeffizienten polarisationsabhängig sind, gilt dies auch für die Einfangkräfte.

Kraftkomponenten, die in Strahlrichtung wirken, werden als Streukraft  $F_{Streu}$ , jene senkrecht dazu als Gradientenkraft  $F_{Grad}$  bezeichnet. Ihre Beträge ergeben sich aus der Impulsdifferenz zwischen einfallendem und austretendem Strahl. Die Integration über die übertragenen Impulse aller Strahlen ergibt eine Gesamtkraft [9, 143, 180]:

$$F_{Streu} = \frac{n_M P}{c} \left( 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2(\cos 2(\theta - \theta') + R \cos 2\theta)}{1 + R^2 + 2R \cos 2\theta'} \right) \quad (3.17)$$

$$F_{Grad} = \frac{n_M P}{c} \left( R \sin 2\theta - \frac{T^2(\sin 2(\theta - \theta') + R \sin 2\theta)}{1 + R^2 + 2R \cos 2\theta'} \right) \quad (3.18)$$

**Wellenoptisches Modell** Ist das Objekt kleiner als die Wellenlänge, kann das Licht nicht mehr als Strahl, sondern muss als Welle betrachtet werden. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass das Licht im Objekt einen veränderlichen elektrischen Dipol induziert, der eine Kraft in Richtung des Feldgradienten erfährt. Die Gradientenkraft  $F_{Grad}$  in Richtung des Intensitätsgradienten  $\nabla E^2$  für ein Rayleigh-Partikel mit der Polarisierbarkeit  $\alpha_P$  ist proportional zum Radius  $r_O$  des Partikels und dem Gradienten [10]:

$$F_{Grad} = -\frac{n_M}{2} \alpha_P \nabla E^2 = -\frac{n_M^3 r_O^3}{2} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \nabla E^2, \quad (3.19)$$

mit der Brechzahl  $n_M$  des umgebenden Mediums und dem relativen Brechungsindex  $n = n_O/n_M$ . Folglich erfahren größere Partikel eine größere Kraft und werden dadurch leichter gefangen.

Das Objekt wird durch die Streukraft  $F_{Streu}$  [10] axial aus der Falle getrieben:

$$F_{Streu} = \frac{I_0}{c_0} \frac{128\pi^5 r_O^6}{3\lambda_M^4} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 n_M. \quad (3.20)$$

Dabei bezeichnet  $c_0$  die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum,  $\lambda_M$  die Wellenlänge im Medium und  $I_0$  die Intensität. Ein stabiler dreidimensionaler Einfang wird auch hier erzielt, wenn die Gradientenkraft die Streukraft übersteigt (siehe Gl. 3.15)

**Bereich zwischen Mie- und Rayleigh-Regime** Die Beschreibung der Einfangkräfte im Bereich, in dem der Objektdurchmesser im Größenbereich der Wellenlänge liegt, gestaltet sich deutlich schwieriger, da hier die getroffenen Näherungen nicht mehr zutreffen. Zwar lässt sich zeigen, dass der optische Einfang auch in diesem Bereich möglich ist [10], eine allgemein gültige Berechnungsmethode existiert jedoch nicht. Es wurden jedoch verschiedene Ansätze entwickelt, die sich dem Problem von den Seiten der beiden bestehenden Theorien annähern.

Die geometrische Optik ist gültig für große Objekte, wobei jedoch die eigentliche Größe des Objekts nicht in die Berechnung mit einfließt. Durch Modellierung der einfallenden Gaußschen Strahlen kann das Modell so erweitert werden, dass Objektdurchmesser berücksichtigt werden [66, 178]. Da Gaußsche Strahlen auf paraxialer Näherung basieren, liefert dieser Ansatz nur verlässliche Ergebnisse für schwach fokussierte Strahlen. Korrekturen höherer Ordnung der Gaußschen Strahlen können Abhilfe schaffen [11, 133, 179, 180]. Entsprechende Ansätze sind auch unter dem Begriff *generalized Lorenz-Mie theory* bekannt. Sie eignen sich gut zur Beschreibung des Einfangs von Objekten, deren Durchmesser kleiner oder gleich der Wellenlänge ist. Feldverteilungen, wie sie in der Realität durch eine begrenzte Apertur oder Aberrationen gegeben sind, können jedoch nicht berücksichtigt werden.

Nähert man sich dem Problem vom wellenoptischen Ansatz, so muss beachtet werden, dass das Objekt mit zunehmendem Durchmesser nicht mehr als isotroper Streuer betrachtet werden kann. Zwischen gestreutem und ungestreutem Licht wird ein zusätzlicher Phasenshift eingeführt, welcher mit dem so genannten Rayleigh-Debye Theorem<sup>7</sup> berücksichtigt werden kann. Durch Einbeziehung von Mehrfachstreuung<sup>8</sup> kann dieser Ansatz weiter verbessert werden. Da hier die Interaktion zwischen Objekt und Lichtfeld stärker einbezogen wird, können auch größere Objekte berücksichtigt werden. Zudem erlaubt diese Methode die Berechnung der Kraft beliebiger Lichtfelder mit Hilfe einer Fourierentwicklung sowie beliebiger Objektformen [139].

### Eigenschaften optischer Fallen

Optische Fallen fangen nicht starr, d.h. Objekte werden wie an einem Gummiband gefangen und können sich um das Fallenzentrum bewegen. Befindet sich das Objekt genau im Zentrum der Falle, so befinden sich alle Kräfte im Gleichgewicht. Wandert das Objekt aus der Falle heraus, so wirkt eine Kraft auf das Objekt, die es zurückzieht. Für kleine Distanzen wächst die Rückstellkraft linear mit der Auslenkung  $x$ :

$$F = -\alpha_x x, \quad (3.21)$$

wobei die laterale Kraftkonstante  $\alpha_x$  ein Maß für die laterale Steifheit ist. Bei einer steifen Falle (also für große  $\alpha$ ) muss eine größere Kraft aufgewendet werden, um das Objekt um eine Distanz  $x$  aus dem Fallenzentrum heraus zu bewegen als bei einer Falle mit kleiner Steifheit. Entsprechend kann die axiale Kraftkonstante  $\alpha_z$  definiert werden. In der Praxis wird die Fallensteifheit als Steigung des linearen Bereichs der Kraftkurve<sup>9</sup> um den Gleichgewichtspunkt ermittelt. Fallen, die durch einen Laser mit Gaußscher Intensitätsverteilung erzeugt werden, besitzen für kleine Auslenkungen des Objekts aus der Falle ein harmonisches Potential [162] (Integration von Gleichung 3.21):

$$E = E_0 + \frac{1}{2}\alpha x^2 \quad (3.22)$$

Gefangene Objekte befinden sich also im Potentialminimum.

Die Qualität einer Falle wird durch den dimensionslosen Wirkungsgrad bzw. die Einfangeffizienz  $Q$  charakterisiert. Die Einfangeffizienz ist unabhängig von der Laserleistung  $P$  und proportional zur Kraft  $F$  und kann über die Einfangkraft mittels folgender Beziehung definiert

<sup>7</sup>auch bekannt als Rayleigh-Gans Näherung oder erste Born-Näherung

<sup>8</sup>auch als Bornsche Näherungen höherer Ordnung aus der Quantenmechanik bekannt

<sup>9</sup>Bei dieser Kurve wird die auf das Objekt wirkende Kraft über die Objektposition aufgetragen. Für kleine Auslenkungen ist sie linear.

werden [167]:

$$F = F_{grad} + F_{streu} = \frac{n_M P}{c_0} Q \quad (3.23)$$

Für typische Werte von  $n_M$ ,  $P$  und  $Q$  liegt  $F$  im Bereich von Piconewton. Man kann die Abhängigkeit der Kraft von  $n_M$ ,  $P$  oder  $Q$  ausnutzen, um höhere Einfangkkräfte zu erzielen. In der Biologie ist das umgebende Medium oft eine Art Nährmedium, das nicht geändert werden kann, ohne das Objekt nachteilig zu beeinflussen. Die Steigerung der Laserleistung ist wegen einer drohenden Beschädigung der biologischen Objekte nur bedingt möglich. Deshalb ist  $Q$  der eigentlich beeinflussbare Faktor. Er berücksichtigt den Einfluss, den die numerische Apertur, Spotgröße, Wellenlänge, Polarisation und Strahlprofil auf die Einfangkraft haben. Zusätzlich enthält er auch die optischen Eigenschaften des Objekts wie z.B. Größe, Form und die relative Brechzahl  $n = n_0/n_M$  [180]. Für den Einfang wesentliche Parameter sind:

**Numerische Apertur:** Die numerische Apertur (NA) ist eine Kenngröße für die Bündelung von Lichtstrahlen in optischen Systemen und ist gegeben durch  $NA = n_M \sin \sigma$ , mit dem Brechungsindex  $n_M$  des Immersionsmediums und dem halben Öffnungswinkel  $\sigma$ . Zur Erzeugung von einer stabilen Falle spielt die numerische Apertur des verwendeten Mikroskopobjektivs eine bedeutende Rolle. Diese wird der Einfachheit halber im folgenden auch als die numerische Apertur der Falle bezeichnet. Je größer die numerische Apertur der Falle, desto höher auch der laterale sowie axiale Intensitätsgradient und somit auch die Einfangkraft [167]. Beim axialen Einfang wirkt die Streukraft der Gradientenkraft entgegen. Zur Realisierung des stabilen axialen Einfangs ist folglich eine hohe numerische Apertur von großer Bedeutung, damit die Gradientenkraft die Streukraft übersteigt. Dies wird normalerweise mit einer numerischen Apertur  $NA \geq 1$  erreicht. Besonders die Randstrahlen tragen deutlich zur axialen Gradientenkraft bei. Aus diesem Grund ist eine homogene Ausleuchtung der Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs einer gaußförmigen Ausleuchtung vorzuziehen [56] (siehe hierzu Abschnitt 4.1.2).

**Einfangfeld:** Die beim optischen Einfang typischerweise verwendeten Lichtfelder weisen eine Gaußsche Intensitätsverteilung auf. Der Einsatz modifizierter Lichtfelder kann jedoch Vorteile haben. So konnte Ashkin mit Hilfe donut-förmiger Lichtfelder<sup>10</sup> für hohe relative Brechungsindizes bessere Einfangeffizienzen erzielen, da hier verstärkt Strahlen unter hohem Winkel auftreffen. Zudem ermöglicht eine donut-förmige Falle den Einfang von Partikeln mit  $n_O \leq 1$  im Zentrum des Rings, da diese von Orten hoher Intensität abgestoßen werden [9]. Zusätzlich lässt sich mit Hilfe donut-förmiger Lichtfelder ein Drehimpuls auf Objekte übertragen und damit gezielt rotieren [74, 43, 160].

---

<sup>10</sup>Donut-förmige Lichtfelder werden durch eine Phasenspirale mit einer Phasendifferenz von  $2\pi$  in der Pupille erzeugt. Durch die Phasensingularität (nicht-definierte Phase) im Zentrum der Spirale wird nach Fouriertransformation ein Lichtspot mit Amplitude 0 im Zentrum erzeugt, der einem Donut ähnelt.

$n$	1,05	1,1	1,2	1,3	1,4	1,6	1,8	2,0
$Q$	61,9%	83,7%	100%	104,3%	102,2%	85,9%	61,9%	35,1

Tabelle 3.2.: Abhängigkeit der Einfangeffizienz vom Brechungsindexverhältnis  $n = n_O/n_M$  bei homogener Ausfüllung der Eintrittspupille. Es wurde auf den relativen Brechungsindex  $n = 1,2$  von Polystyrol in Wasser normiert [9].

**Aberrationen:** Nachteilig sind Aberrationen des Einfangfelds. Sie verringern normalerweise den Intensitätsgradienten und haben damit (insbesondere für kleine Objekte) negativen Einfluss auf die Einfangkraft [180].

**Polarisationsrichtung:** Entgegen dem axialen Einfang ist die laterale Einfangkraft abhängig von der Polarisation des Einfanglichtfelds. So ist sie parallel zur Polarisationsrichtung größer als senkrecht zu ihr [180].

**Brechzahlverhältnis:** Der Einfluss des Brechzahlverhältnisses  $n = n_O/n_M$  auf die Einfangeffizienz konnte durch Ashkin [9] belegt werden. Sehr gute Einfangeigenschaften liegen in einem Bereich von ca.  $n = 1,2 - 1,5$  vor (Tabelle 3.2), in welchem die meisten biologischen Objekte liegen. Die abnehmende Güte mit zunehmendem  $n$  erklärt sich durch ansteigende Streukraft aufgrund von verstärkten Reflexionen [9].

Objekte mit einem relativen Brechungsindex  $n \leq 1$  (Medium optisch dichter als Objekt) werden vom Ort höchster Intensität abgestoßen. Sie sind mit konventionellen Lichtfeldern nicht einfangbar, sondern müssen mit speziellen Feldern, wie einem „Donut“, eingefangen werden.

**Objektradius:** Für Objekte im geometrisch-optischen Bereich ist die Einfangkraft unabhängig vom Radius des Objekts. Für Objekte im Rayleigh-Regime dagegen weist die dominierende Gradientenkraft eine starke Abhängigkeit vom Radius auf ( $r_O^3$ -Abhängigkeit, siehe Formel 3.19). Berechnungen von Wright und Sonek [179] zufolge geht die  $r_O^3$ -Abhängigkeit im Rayleigh-Regime mit zunehmendem Partikelradius in eine  $r_O^0$ -Abhängigkeit im geometrisch-optischen Bereich über.

**Objektform:** Sphärische Partikel erfahren eine höhere Einfangkraft als Partikel mit unregelmäßiger Oberfläche. Dies ist anschaulich zu erwarten, da bei unregelmäßiger Oberfläche die Streuung zunimmt (und gleichzeitig die Gradientenkraft reduziert wird) und somit das Verhältnis zwischen Gradienten- und Streukraft reduziert wird.

Optische Kräfte werden in verschiedenen Geometrien zum Einfang mikroskopischer Objekte verwendet. Die zwei wichtigsten Geometrien sind so genannte Doppel- und Einzelfallen.

Doppelfallen werden durch zwei gegenläufige Lichtfelder erzeugt. Das Objekt wird lateral durch die Gradientenkraft gefangen und stabilisiert sich axial an einem Punkt, an dem sich die gegenläufigen Streukräfte ausbalancieren [6, 143, 175, 24, 159, 88]. Die axiale Position kann durch das Intensitätsverhältnis der gegenläufigen Strahlen beeinflusst werden [135]. Dynamisch bewegliche Doppelfallen können beispielsweise mit Hilfe akusto-optischer Modulatoren [172] und generalisiertem Phasenkontrast [135] realisiert werden.

Der Hauptnachteil von Doppelfallen ist die aufwändige Implementierung, die normalerweise durch zwei hochgenau justierte, niederaperturige Mikroskopobjektive [6] oder optische Fasern [24, 88] realisiert wird. Wang et al. entwickelten selbst-justierende Doppelfallen unter Anwendungen eines phasenkonjugierten Spiegels [174]. Diese elegante Lösung bringt jedoch ebenfalls einen hohen apparativen Aufwand mit sich und ist somit unrealistisch im praktischen Einsatz (vgl. auch Kapitel 5.4).

Einzelfallen (engl. single beam traps [7]) werden hingegen mit einem einzigen Strahl realisiert. Durch den Einsatz eines hochaperturigen Objektivs wird axial ein starker Gradient erzeugt. Somit übersteigt die Gradientenkraft die Streukraft. Dies ist normalerweise bei Objektiven mit einer numerischen Apertur größer 1 der Fall. Der Gleichgewichtspunkt, in dem axial stabiler Einfang möglich ist, befindet sich aufgrund der Streukraft leicht unterhalb des Fokus. Aufgrund der Realisierung mit einem einzigen Mikroskopobjektiv lassen sich Einzelfallen sehr einfach in Standardmikroskope implementieren. Sie sind auch unter dem Namen *optische Pinzette* bekannt.

Einzelfallen weisen jedoch gerade im biologischen Bereich einige Nachteile auf: Zur Erzeugung eines starken Intensitätsgradienten wird eine hohe numerische Apertur benötigt. Diese erzeugt zum einen eine hohe Konzentration der Intensität, was zur Schädigung biologischer Objekte führen kann. Zum anderen besitzen hochaperturige Objektive eine geringe Schärfentiefe und einen geringen Arbeitsabstand. Gerade beim Einsatz von Mikrofluidiken ist dies eine starke Einschränkung, da durch Ein- und Ausflüsse bzw. die Dicke der Deckelung ein entsprechender Arbeitsabstand gefordert ist.

Um die Schädigung von biologischen Zellen möglichst gering zu halten, werden bei optischen Pinzetten vorzugsweise Wellenlängen im nahen Infrarot (ca. 780 bis 1330 nm) eingesetzt. In diesem Bereich ist die Absorption relativ gering, während sie sowohl bei kürzeren Wellenlängen (durch biologische Materialien wie beispielsweise Chromophoren) als auch längeren Wellenlängen (durch Wasser) stark ansteigt [167].



Die Schädigung von Zellen durch die Einwirkung von Laserlicht ist noch nicht exakt erforscht. Neben Schädigung durch Wärmeeinwirkung (d.h. Absorption) können auch photochemische Vorgänge eine Rolle spielen. Studien belegen, dass Wellenlängen um 820 nm im Vergleich zu anderen Wellenlängen relativ geringe Schädigungen hervorrufen [171, 167], wodurch sich Diodenlaser in diesem Wellenlängenbereich als Einfanglaser anbieten. Häufig werden jedoch Einfanglaser mit einer Wellenlänge von 1064 nm eingesetzt, da diese mit hoher Strahlqualität und Leistung vergleichsweise günstig erhältlich sind.

### 3.4.2. Optisches Schneiden

Das Bearbeiten von Material mit Hilfe von fokussiertem Laserlicht ist eine gut entwickelte Technik, die in vielen verschiedenen Gebieten genutzt wird. Die Anwendungen reichen von laser-basierter Materialbearbeitung bis hin zu medizinischen Laserskalpellen oder Mikrosektion von Zellen [13, 33, 54]. Durch den Einsatz von stark fokussiertem, hochintensivem Laserlicht können Materialien – auf Makro- sowie auf Mikroebene – geschnitten, verschmolzen oder zerstört werden [14].

Dabei beruhen die zu Grunde liegenden Effekte auf physikalischen und chemischen Prozessen, die durch die Absorption einzelner oder mehrerer Photonen zeitgleich (Single- bzw. Multiphotonenprozesse) ausgelöst werden. Der Umfang der Beeinflussung des Materials ist nicht nur eine Funktion der Laserparameter wie Wellenlänge, Intensität, Belichtungszeit, Spotgröße und Wiederholungsrate. Es spielen auch die Materialeigenschaften wie Absorptions- und Streukoeffizienten, Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit eine große Rolle [14].

Vor allem Ultrakurzpuls-Laser haben sich in den letzten Jahren zu einem äußerst wichtigen Werkzeug für die Mikrostrukturierung und die Laser- und Nanochirurgie entwickelt. Durch die Verwendung gepulster Laser (Nano-, Piko- und Femtosekunden) kann ein extrem hoher Energieeintrag durch beugungsbegrenzte Fokussierung im Submikrometerbereich realisiert werden, selbst wenn die mittlere Leistung des Lasers (verglichen mit cw-Lasern) recht gering ist [56].

Laserskalpelle arbeiten typischerweise bei sehr kurzer Pulsdauer im Bereich von Nano- oder Pikosekunden vorrangig durch Lösen molekularer Bindungen oder Plasmabildung, während mit zunehmender Belichtungszeit thermische Effekte eine größere Rolle spielen. Die Interaktionsprozesse können grob in vier Kategorien unterteilt werden (siehe Abbildung 3.8) [14]:

**Photochemische Wechselwirkung:** Durch die Bestrahlung mit Licht geringer Leistungsdichte und langer Belichtungszeit können chemische Effekte innerhalb von Makromolekülen oder Geweben ausgelöst werden. Einer der bekanntesten photochemischen Effekte ist beispielsweise die Photosynthese. In der Lasertherapie bilden photochemische Wechsel-

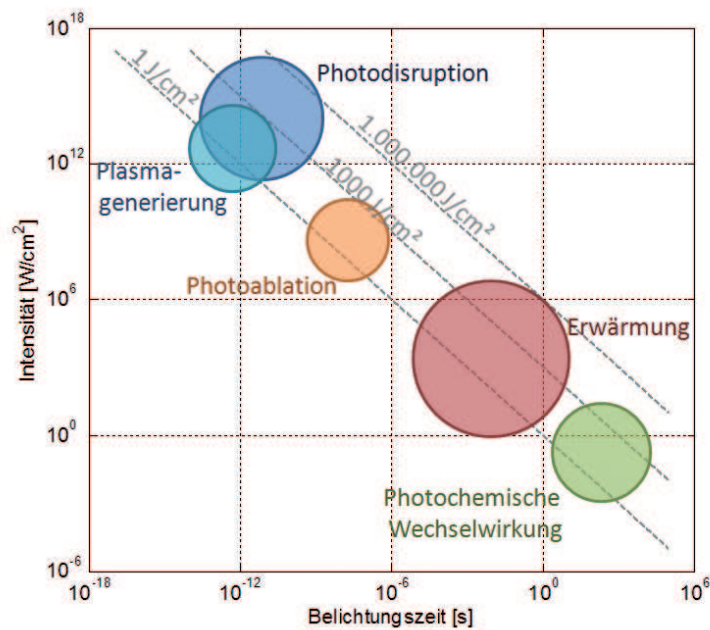


Abbildung 3.8.: Abhängigkeit der Interaktion von Laserstrahlung mit Gewebe von Belichtungszeit und Intensität (nach [14]).

wirkungen die Grundlage der photodynamischen Therapie. Dabei werden dem Patienten so genannte Photosensitizer injiziert, die sich selektiv in Tumorgewebe anreichern. Durch anschließende Bestrahlung des Tumorgewebes wird eine photochemische Reaktion hervorgerufen, die zur Abtötung des Tumorgewebes führt [12, 17].

**Thermische Wechselwirkung (oder auch thermische Ablation):** Die thermische Wechselwirkung beruht auf der Absorption mit nachfolgendem lokalen Anstieg der Temperatur. Es handelt sich dabei um einen zweistufigen Prozess, bei dem zunächst das Photon absorbiert und dabei das Atom/Molekül in einen angeregten Zustand versetzt wird. In einem zweiten Schritt wird das Atom/Molekül abgeregt, indem die Anregungsenergie in kinetische Energie umgewandelt wird. Es handelt sich hier also um einen Transfer der Photonenenergie in kinetische Energie und damit in Wärme.

Abhängig von der Bestrahlungsdauer und der Intensität des Lasers erwärmt sich das Objekt unterschiedlich [17, 124]: Bei weichen, biologischen Geweben, wie sie hier relevant sind, werden verschiedene Stufen der Erwärmung unterschieden: Bis ca.  $40^\circ\text{C}$  bleibt das Gewebe unbeschädigt. Ab ca.  $45^\circ\text{C}$  kann die Zellmembran so stark geschädigt werden, dass dies zum Zelltod führt (Hyperthermie). Ab etwa  $60^\circ\text{C}$  kommt es zu einer irreversiblen Strukturänderung der Proteine (Denaturierung) sowie zur Koagulation (Gerinnung) des Gewebes. Bei etwa  $100^\circ\text{C}$  beginnt die Verdampfung des Wasseranteils im Gewebe (Vaporisation). Durch die daraus folgende Drucksteigerung im Gewebe wird das Gewebe

(a) Bindungsenergie typischer organischer Bindungen

Bindungstyp	$E_{\text{Bindung}}$ (eV)
C=O	7,1
C=C	6,4
O-H	4,8
N-H	4,1
C-O	3,6
C-C	3,6
C-N	3,0
C-S	2,7

(b) Photonenenergie verschiedener Laser

Lasertyp	$\lambda$ (nm)	$E_{\text{Photon}}$ (eV)
ArF	193	6,4
Nd:YAG $\times 3$	266	4,7
XeCl	308	4,0
Nd:YAG $\times 3$	355	3,5
Nd:YAG $\times 2$	532	2,4
He-Ne	633	2,0
Nd:YAG	1064	1,2
CO <sub>2</sub>	10600	0,1

Tabelle 3.3.: Bindungsenergie verschiedener organischer Verbindungen sowie Photonenenergie verschiedener Laser. Aus [124].

durch Mikroexplosionen abgetragen. Bei Temperaturen über 100°C setzt die Verkohlung des Gewebes (Karbonisation) ein.

Für eine Abschätzung der Schädigung des umliegenden Gewebes ist die so genannte thermische Relaxationszeit maßgeblich. Diese gibt die Zeit an, in der sich der durch die Laserbestrahlung entstandene Temperaturgradient wieder abbaut [17]. Bei cw-Bestrahlung bzw. langen Pulsdauern wird das thermische Gleichgewicht durch deponierte Laserleistung und Wärmediffusion bestimmt. Dadurch kann es zu einer Schädigung von angrenzendem, nicht bestrahltem Gewebe kommen. Bei sehr kurzen Pulsdauern ist die Wärmediffusion dagegen vernachlässigbar, da die eingestrahlte Energie in mechanische Energie (explosionsartige Abtragung) umgewandelt wird, so dass umgebendes Gewebe unbeeinflusst bleibt.

**Direkte Photoablation:** Direkte Photoablation ist die direkte Zersetzung von Molekülen bei Bestrahlung mit hochintensiver Strahlung. Durch die Bestrahlung mit hochenergetischen Photonen kann ein Energiezustand erreicht werden, der die Bindungsenergie der Moleküle übersteigt, so dass das Molekül zerfällt. In der Biologie liegt der Schwellwert der Photoablation typischerweise bei etwa  $10^7 - 10^8 \text{ W/cm}^2$  bei Pulsen im Nanosekundenbereich. Zur Photoablation werden hier hauptsächlich Laser im UV-Bereich (typischerweise Excimer-Laser) gewählt, da die Photonenenergie die Bindungsenergie der meisten organischen Bindungen übersteigt (vergleiche Tabelle 3.3 sowie [124]).

Die Abtragtiefe ist dabei abhängig von der Pulsenergie, wird jedoch durch eine Sättigungsgrenze nach oben hin begrenzt. Die Hauptvorteile dieser Abtragtechnik liegen in der hohen Präzision, der hohen Vorhersagbarkeit des Abtragprozesses sowie der geringen thermischen Schädigung des umliegenden Gewebes [124].

Umstritten ist die kanzerogene bzw. mutagene Wirkung der UV-Strahlung. Die meisten biologischen Veränderungen werden durch eine photochemische Reaktion der Erbsubstanz hervorgerufen und korrelieren damit mit dem Absorptionsspektrum der DNS. Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass der Einfluss von Laserstrahlung bei 193 nm geringer ist als bei 248 nm, obwohl die DNS in diesem Bereich noch stärker absorbiert. Dies liegt unter anderem an der effektiveren Absorption durch Proteine in der Zelle, so dass weniger Strahlung den Zellkern erreicht [17].

**Plasma-induzierte Ablation/Photodisruption:** Übersteigt die induzierte Leistungsdichte in etwa  $10^{11} \text{W/cm}^2$ , so kommt es zum laser-induzierten *optischen Durchbruch*. Atome und Moleküle werden ionisiert und lösen dadurch die Bildung eines Plasmas (hochionisierter Zustand) aus. Die Ionisierung von Atomen bzw. Molekülen kann auf zwei Arten (abhängig von der Pulsdauer) geschehen: Werden Nanosekundenpulse eingesetzt, so erhitzt sich das Gewebe kurzzeitig auf über  $1000^\circ\text{C}$ , wodurch eine thermische Ionisierung möglich wird. Beim Einsatz von noch kürzeren Pulsdauern kommt es aufgrund des hohen Photonenflusses zu einer direkten Ionisierung durch Übertrag der Photonenenergie, der so genannten Photonenionisierung. Hierbei sind sowohl Single- als auch Multiphotonenprozesse möglich [124].

Die bei der Ionisierung frei werdenden Elektronen dienen als Auslöser für die Plasma-bildung. Sie werden durch das bestehende Strahlungsfeld beschleunigt (inverse Bremsstrahlung) und geben ihre Energie durch Stoßionisation an andere Atome ab. Auf diese Weise breitet sich das Plasma lawinenartig aus.

Nach Zünden des Plasmas kann sich dieses durch die weitere Energieeinstrahlung aufheizen und ausbreiten. Es kommt zu einer explosiven Ausdehnung und am Ort des Fokus entsteht eine Schockwelle, die sich anfangs mit Überschallgeschwindigkeit und nach wenigen Mikrometern mit Schallgeschwindigkeit ausbreitet. Die Expansion der Schockwelle führt zu mechanischen Kräften im Material, die es zerstören können [12].

In wässrigen Medien (als welches biologisches Gewebe angesehen werden kann) entsteht eine Kavitationsblase, welche nicht vollständig kollabiert, sondern eine gasgefüllte Blase hinterlässt. Durch Aneinanderreihen solcher Blasen lässt sich ein exaktes Schneiden von Gewebe realisieren. Durch den hochgenauen Energieeintrag und die sehr kurze Pulsdauer, kommt es zu nahezu keiner thermischen Schädigung des angrenzenden Gewebes [17].

Das Zünden des Plasmas (und damit die Induzierung des optischen Durchbruchs) ist sowohl durch die Pulsdauer  $t_P$  als auch durch den Schwellwert der Energiedichte  $E_{th}$  gemäß  $E_{th}/\sqrt{t_P} = \text{const.}$  gegeben. Die elektrischen Felder im Plasma liegen dabei in der

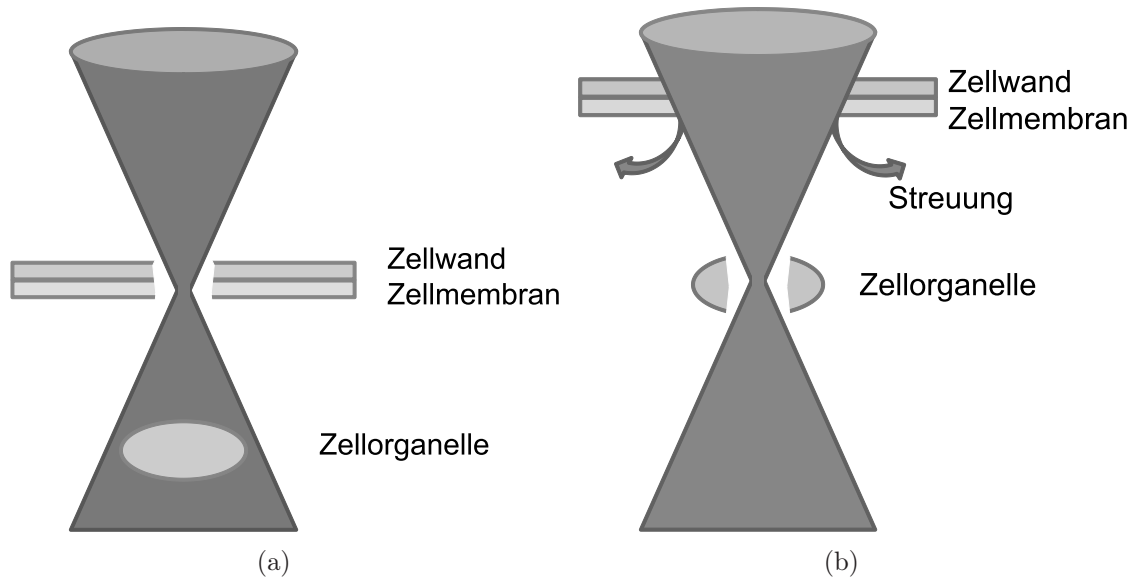


Abbildung 3.9.: Schneiden im Inneren eines lebenden Objektes

Größenordnung normaler intramolekularer Ladungsfelder. Der Ablationsprozess beruht also allein auf der ionisierenden Wirkung des Plasmas.

Aufgrund der erhöhten Absorption durch das Plasma können beim optischen Durchbruch selbst in gering absorbierenden Medien hohe Energien eingebracht werden, wodurch sich das Feld der Anwendungen auch auf transparente Materialien ausweitet. Grundsätzlich wird bei den plasma-induzierten Effekten zwischen zwei Prozessen unterschieden: Abtragprozesse, die auf der reinen Plasma-Erzeugung beruhen, werden als *plasma-induzierte Ablation* bezeichnet. Abtragprozesse, die durch plasma-induzierte Schockwellen oder Kavitationsblasen eine überwiegend mechanische Ursache für das Schneiden von Materialien haben, werden unter dem Begriff *Photodisruption* zusammengefasst.

Mikrolaserskalpelle bedienen sich vorzugsweise der plasma-induzierten Ablation sowie der Photodisruption. In der Praxis werden jedoch in der Regel Kombinationen der verschiedenen Laser-Gewebe-Interaktionen beobachtet [124].

Mit der Entwicklung von Mikrolaserskalpellen wurde es in Kombination mit dem Einsatz hochaperturiger Objektive erstmals möglich, innerhalb geschlossener Objekte zu arbeiten und somit beispielsweise genetische Modifikationen an lebenden Zellen vorzunehmen. Aufgrund der starken Fokussierung nimmt die Intensität mit zunehmendem Abstand zum Fokus quadratisch ab, so dass ein Kompromiss gefunden wird, bei dem zwar innerhalb der Zelle gearbeitet werden kann, diese aber nicht beschädigt wird [56].

## 4. Experimentelle Untersuchung eines neuartigen markerfreien Diagnoseverfahrens

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine neue markerfreie Methode zur Zelldiagnostik entwickelt und untersucht werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Klassifizierung von Zellen mit Hilfe optischer Einfangkräfte. Durch den Einsatz holografischer Manipulation ist eine Automatisierung dieses Verfahrens realisierbar. Im Rahmen der Untersuchung soll dieses Diagnoseverfahren verifiziert und im Hinblick auf die Automatisierung des optischen Einfangs beleuchtet werden. Dabei werden Herausforderungen bezüglich der Automatisierung und der Arbeit mit lebenden Zellen identifiziert.

Hierfür wurde zunächst ein Experimentalaufbau einer holografischen Pinzette realisiert. Da Standardforschungsmikroskope für biologische Aufgaben entwickelt wurden und verhältnismäßig leicht erweiterbar sind, wurde die holografische Pinzette als Erweiterungsmodul (Add-on Modul) mit einem solchen Mikroskop kombiniert. Das entwickelte System wurde zur Erprobung des neuartigen Diagnoseverfahrens eingesetzt.

### 4.1. Design und Realisierung eines holografischen Add-on Moduls für ein Forschungsmikroskop

Zur Realisierung der holografischen Pinzette wurde ein Add-on Modul mit einem handelsüblichen Forschungsmikroskop kombiniert. Dabei wurden das Inversmikroskop Zeiss Axiovert 200 als Basisplattform gewählt. Inversmikroskope weisen einen invertierten Strahlengang auf. Dies bedeutet, dass der Objektträger oberhalb des Objektivs angebracht ist. Auf diese Weise lassen sich Objekte in flüssigen Medien, wie bspw. lebende Zellkulturen, bequem untersuchen, da sie von unten betrachtet werden können. Aus diesem Grund ist die Inversmikroskopie gerade im größten Zielbereich der holografischen Pinzette - der Biologie - besonders stark vertreten.

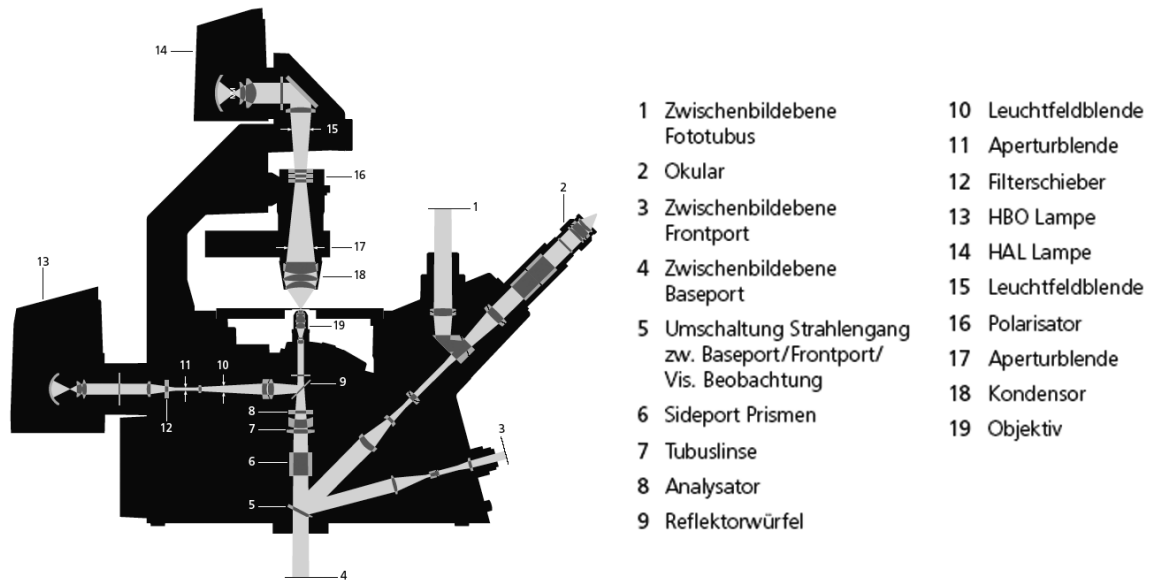


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung des Strahlengangs des Zeiss Axiovert 200 (mit freundlicher Genehmigung der Carl Zeiss AG aus [22]).

Zur Einkopplung der holografischen Pinzette kommen beim Axiovert 200 zunächst fünf Kameraports sowie die Fluoreszenzeinheit (Abb. 4.1, Punkt 13) in Frage. Prinzipiell stellt die Einkopplung in einen parallelen Strahlengang eine naheliegende Möglichkeit dar, da sich das optische Design dadurch stark vereinfacht. Um den parallelen Strahlengang über die Kameraports zu erreichen, müsste jedoch die Tubuslinse entfernt werden, was eine abbildende Nutzung des Mikroskops ohne Modifikation unmöglich macht.

Ein nahezu paralleler Strahlengang kann über die Fluoreszenzeinheit erreicht werden. Die Wellenlänge des verwendeten Einfanglasers kooperiert jedoch nicht mit Standard-Fluoreszenzfiltern. Ein Austausch dieser Filter wäre für den Benutzer sehr kostspielig<sup>1</sup>. Beim Axiovert 200 ist daher die Einkopplung in den parallelen Strahlengang nicht möglich, ohne entweder die grundsätzlichen Mikroskopfunktionen einzuschränken oder größere Modifikationen am Gerät vorzunehmen. Daher wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurde die Einkopplung der Pinzette über den nicht-parallelen Strahlengang der Kameraports vorgenommen. Mit Hilfe einer zusätzlichen Linse kann der Strahlengang kollimiert werden, so dass ohne großen Mehraufwand eine zuverlässige Einkopplung der Pinzette realisiert werden kann. Aus mechanischen und praktischen Gründen wurde hierbei einer der Seitenports gewählt - theoretisch ist aber eine Einkopplung über jeden Kameraport denkbar.

<sup>1</sup>Ein entsprechender Filter muss hierbei sowohl UV (Fluoreszenzbeleuchtung) als auch NIR (Pinzette) reflektieren, und gleichzeitig den sichtbaren Bereich transmittieren. Ein solcher Filter, der drei Wellenlängen mit hoher Güte voneinander trennen muss, ist schwer realisierbar und aus diesem Grunde voraussichtlich sehr kostspielig.

### 4.1.1. Anforderungen an das System

Das holografische Add-on Modul basiert auf dem in Abschnitt 3.1 dargestellten Prinzip der holografischen Manipulation. Das Hologramm wird mittels eines Lasers ausgelesen und in das Mikroskopobjektiv eingekoppelt, das eine Fouriertransformation durchführt. Die Eintrittspupille ist nicht frei zugänglich und daher muss der SLM in die EP abgebildet werden. Da keine genauen Angaben vom Hersteller (Zeiss) zur Verfügung gestellt werden, muss ein justierbarer Aufbau entworfen werden, der auf das Mikroskop angepasst werden kann.

Das System unterliegt verschiedenen Randbedingungen und Anforderungen, die eine sorgfältige Simulation des optischen Aufbaus erfordern. Prinzipiell kann das System in zwei Teile aufgespaltet werden, die separat behandelt werden können: zum einen die Beleuchtung des Lichtmodulators und zum anderen die Abbildung desselben in die Eintrittspupille des Objektivs. Diese beiden Teile sind jedoch über die Homogenität der Beleuchtung der Eintrittspupille gekoppelt.

Die Randbedingungen und Anforderungen an das System wurden in zwei Gruppen eingeteilt: die optischen Randbedingungen, die die Funktionalität des Systems gewährleisten sowie die Rahmenbedingungen, die sich durch die Wahl der Basiskomponenten ergeben.

#### Optische Rahmenbedingungen:

Die grundsätzliche Auslegung des Systems ist durch folgende Voraussetzungen gegeben:

- Der Lichtmodulator muss in die Eintrittspupille (EP) des Mikroskopobjektivs (MO) mit dem Radius  $r_{EP}$  abgebildet werden.
- Zwischen Tubuslinse und Eintrittspupille muss ein kollimierter Strahlengang vorliegen, da die Kombination aus Mikroskopobjektiv und Tubuslinse für diesen Fall optimiert ist.
- Gleichzeitig ist eine möglichst homogene Ausleuchtung der Eintrittspupille<sup>2</sup> (EP) gefordert, um die axiale Einfangkraft nicht zu reduzieren (siehe hierzu Abschnitt 4.1.2).
- Die Rekonstruktion der einzelnen Fallen soll über das gesamte Feld ein beugungsbegrenztes Verhalten aufweisen. Deshalb soll die Wellenfrontdeformation Peak to Valley (PV)  $\Delta W_{PV} \leq \lambda/10$  betragen.

---

<sup>2</sup>In der optischen Pinzette tritt der Fangstrahl durch diese Pupille in das Mikroskopobjektiv ein. Daher wird diese Pupille als Eintrittspupille bezeichnet. Diese Pupille entspricht der Austrittspupille der mikroskopischen Abbildung.



	Objektiv (Zeiss)	$f_{MO}$ [mm]	$r_{EP}$ [mm]	$\tau$ bei 1064 nm [%]	a [mm]
1	„A-Plan“ 20×/0,45	8,23	3,70	≈85%	0,51
2	„C-Apochromat“ 40×/1,2W	4,11	4,94	≈62%	0,28 <sup>3</sup>
3	„C-Apochromat“ 63×/1,2W	2,61	3,13	≈65%	0,28 <sup>4</sup>
4	EC „Epiplan“ 50×/0,7	3,29	2,30	≈62%	1,1

Tabelle 4.1.: Übersicht über die eingesetzten Objektive mit der Transmission  $\tau$  und dem Arbeitsabstand a.

- Der Abbildungsmaßstab  $\beta' = r_{EP}/r_{SLM}$  muss idealerweise dem Größenverhältnis von Pupille zu SLM entsprechen, wobei  $r_{SLM}$  den Radius des Innenkreises des SLM darstellt.
- Gleichzeitig soll sich der Aufbau für den Einsatz verschiedener Mikroskopobjektive eignen. Hierbei ist zu beachten, dass Brennweite, Eintrittspupille und NA unterschiedlich sind. Da sich der Durchmesser der Eintrittspupille auf den Abbildungsmaßstab auswirkt, ist hier ein Kompromiss zu finden, welcher in Abschnitt 4.1.2 untersucht wird.
- Aufgrund der Lichtverluste, die bereits durch den Einsatz des Lichtmodulators induziert werden sowie der hohen Kosten leistungsstarker Laser soll bei der Konstruktion des Aufbaus auf möglichst hohe Lichteffizienz geachtet werden.
- Zu Justagezwecken ist eine zugängliche Rekonstruktionsebene außerhalb des Mikroskops sinnvoll.

#### Rahmenbedingungen durch gewählte Basiskomponenten:

**Mikroskop:** Brennweite, Durchmesser und Lage der Tubuslinse (TL) sind durch das Mikroskop Zeiss Axiovert 200M bereits festgelegt und können nicht verändert werden. Die Brennweite ist mit  $f_{TL} = 164,5$  mm bekannt. Der Abstand der Tubuslinse zur Eintrittspupille der Mikroskopobjektive variiert von Objektiv zu Objektiv, und beträgt etwa  $d_{TL-EP} = 130 \pm 10$  mm. Der Mindestabstand zwischen Tubuslinse und Einkoppeloptik ist aufgrund mechanischer Beschränkung festgelegt (Portlänge  $d_{TL-P} = 170 \pm 10$  mm). Die Lage der Hauptebenen der Tubuslinse  $H_{TL}$  und  $H'_{TL}$  wird vom Hersteller nicht veröffentlicht. Eine schematische Darstellung des Mikroskops zeigt Abbildung 4.1.

**Mikroskopobjektive:** Die in dieser Arbeit eingesetzten Objektive sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Hier wurde die Auswahl bezüglich Vergrößerung und numerische Apertur so getroffen, dass ein großer praxisrelevanter Bereich abgedeckt werden kann.

**SLM:** Bei dem verwendeten Lichtmodulator handelt es sich um das planar-nematische phase-only LC-Display HEO-1080-P der Firma Holoeye. Die wichtigsten technischen Daten für die Auslegung des optischen Designs sind der Pixelpitch  $pp = 8 \mu\text{m}$  und die Chipgröße  $15,36 \times 8,64 \text{ mm}^2$ . Weitere technische Daten finden sich in Anhang A.1.2.

**Laser:** Als Einfanglaser kommt ein cw-Faserlaser der Firma IP Group (IRE-Polus PYL-20M) zum Einsatz. Der Laser besitzt eine integrierte Kollimationsoptik mit einem Austrittsradius von etwa  $w_L=7,0 \text{ mm}$  bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 1,064 \mu\text{m}$ . Eine Übersicht über die wichtigsten Parameter findet sich in Anhang A.1.4.

### 4.1.2. Homogenität und Lichtverlust

Um den Abbildungsmaßstab der Einkopplung festzulegen, müssen zunächst dessen Einfluss auf die Homogenität der Beleuchtung der Eintrittspupille sowie dessen Einfluss auf Intensitätsverluste untersucht werden. Einerseits wirkt sich eine starke Homogenität der Beleuchtung der Eintrittspupille positiv auf die Effizienz der Falle aus, da intensive Randstrahlen besonders stark zur Verbesserung der axialen Einfangkraft beitragen. Andererseits bewirkt sie einen starken Leistungsverlust, da sie in der Praxis meist (aufgrund der gaußförmigen Intensitätsverteilung) mit einer starken Aufweitung des verwendeten Lasers verbunden ist, wodurch ein Großteil der Intensität ausgeblendet wird<sup>5</sup>. Da leistungsstarke Laser mit guter Strahlqualität vergleichsweise teuer sind, sollten aufbaubedingte Intensitätsverluste möglichst gering sein. Es muss also ein Kompromiss zwischen Homogenität und Intensitätsverlust gefunden werden.

Die Homogenität in der EP wird durch das Zusammenspiel von Laseraufweitung zur Ausleuchtung des SLM und Abbildungsmaßstab  $\beta'$  des SLM in die EP erzeugt. Hierbei ist der Abbildungsmaßstab der kritische Parameter, da dieser die Qualität der Rekonstruktion stark beeinflusst. Die Ermittlung der idealen Aufweitungsverhältnisse erfolgt also in zwei Schritten: Da verschiedene Objektive mit unterschiedlichen Eintrittspupillen zum Einsatz kommen sollen und eine variable Aufweitung mit der erforderlichen Abbildungsqualität teuer und aufwändig wäre, muss ein Abbildungsmaßstab  $\beta'$  gefunden werden, der einen Kompromiss für die verschiedenen Objektive darstellt. Aus diesem Grund werden die Auswirkungen des Abbildungsmaßstabs auf die Homogenität, den Lichtverlust, die effektive numerische Apertur und das Orts-Bandbreite-Produkt untersucht, welches durch die Anzahl eingekoppelter Pixel gegeben ist. Danach kann die Ausleuchtung des SLM auf Basis des optimalen Verhältnisses zwischen Intensitätsverlust und Homogenität ermittelt werden.

---

<sup>5</sup>Eine Alternative wäre der Einsatz eines Gauß-to-Flattop Konverters.

### Ermittlung des optimalen Abbildungsmaßstabs:

Aufgrund des rechteckigen Formats des SLM (Seitenverhältnis 16:9) und der rotationssymmetrischen Optik wird - um Artefakte durch fehlende Randpixel bei der Rekonstruktion des Hologramms zu vermeiden - nur die innere Kreisfläche des SLM eingekoppelt. Es werden also die Pixel ausserhalb des Innenkreises ausgeblendet.

Tabelle 4.1 zeigt, dass die Eintrittspupillen der verschiedenen Objektive stark variieren. Da  $\beta'$  konstant gehalten wird, werden sie unterschiedlich ausgeleuchtet. Dadurch können - abhängig vom  $\beta'$  - grundsätzlich zwei Situationen entstehen (Abbildung 4.2): Die Unterausfüllung der EP, bei der zwar alle Pixel in das MO eingekoppelt werden, jedoch die effektive numerische Apertur  $NA_{eff}$  reduziert wird sowie die Überausfüllung der EP, bei der ein Teil der Pixel ausgeblendet wird.

Mit Hilfe von Simulationen konnte, als Kompromiss für die verschiedenen Objektive, ein Abbildungsmaßstab von  $\beta' = 1,1$  gefunden werden. Hier werden folgende Forderungen erfüllt:

1. **Orts-Bandbreite-Produkt:** Abbildung 4.3(a) zeigt den Durchmesser  $D_{SLM}$  in Pixeln des eingekoppelten SLM-Bereichs in Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabs  $\beta'$ .  $D_{SLM}$  stellt ein Maß für das effektive Orts-Bandbreite-Produkt dar. Zur sinnvollen Rekonstruktion des Hologramms wird ein Bereich mit einem Durchmesser von etwa 600 Pixeln benötigt. Diese Bedingung kann für das 50 $\times$ -Objektiv nicht ganz erfüllt werden. Da es sich hier jedoch nicht um eines der Haupteinfallobjektive handelt, wird dieser Nachteil toleriert.
2. **Intensitätsverlust:** Der Intensitätsverlust hängt stark mit dem Durchmesser des eingekoppelten SLM-Bereichs  $D_{SLM}$  zusammen. Wie in Abbildung 4.3(b) zu sehen ist, ist die Forderung des geringen Intensitätsverlustes für das 40 $\times$ -Objektiv für  $\beta' < 1,2$  unproblematisch. Beim Einsatz des 63 $\times$ -Objektivs tritt ein Intensitätsverlust von nahezu 50%, beim Einsatz des 50 $\times$ -Objektivs sogar etwa 70% auf. Da die Eintrittspupillen des 40 $\times$  und des 63 $\times$ -Objektivs über einen Faktor von 1,5 auseinander liegen, war dieses Ergebnis zu erwarten. Hier wurde die Priorität auf eine hohe effektive NA gesetzt, ohne die ein stabiler axialer Einfang nicht möglich wäre.
3. **Numerische Apertur:** Bei einem Abbildungsmaßstab von  $\beta' = 1,1$  wird für alle Objektive nahezu die maximale effektive NA erreicht (Abbildung 4.3(c)). Nur beim 40 $\times$ -Objektiv tritt eine leichte Reduzierung der effektiven NA auf, was zudem durch die Einkopplung der Randbereiche des SLM zu erhöhten Aberrationen führen kann. Trotzdem gewährleisten sowohl das 40 $\times$  als auch das 63 $\times$ -Objektiv einen stabilen axialen Einfang.

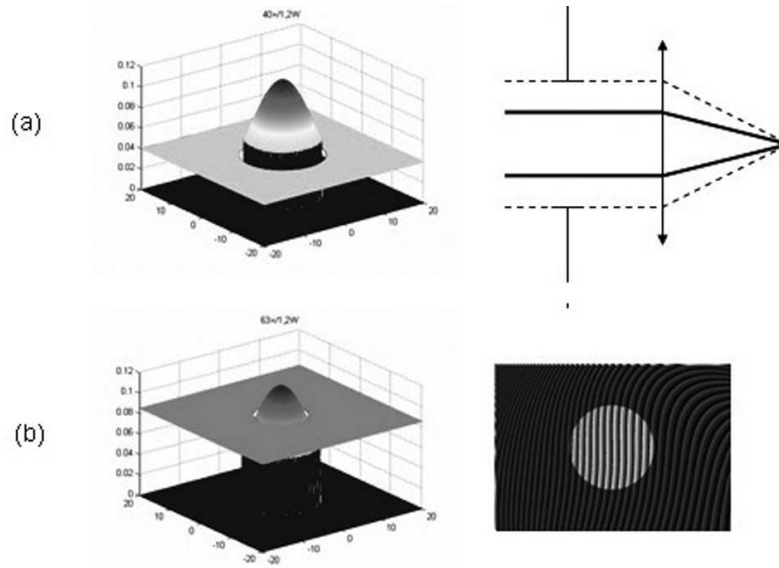


Abbildung 4.2.: (a) Unterausfüllung und (b) Überausfüllung der Eintrittspupille bei gleichbleibendem Strahldurchmesser und veränderter EP sowie die Auswirkungen auf die effektive numerische Apertur bzw. die Anzahl eingekoppelter Pixel.

### Ermittlung der optimalen SLM-Ausleuchtung:

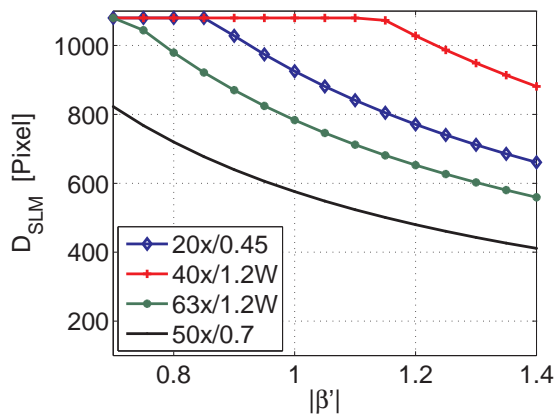
Nach Festlegung des Abbildungsmaßstabs kann die endgültige Homogenität und Intensität über die Aufweitung des Lasers zur Ausleuchtung des SLMs bestimmt werden.

Zur Realisierung des stabilen axialen Einfangs sind intensive Randstrahlen, die mit hohem Winkel auf das Objekt einfallen, von großer Bedeutung. Kim et al. [92] konnten zeigen, dass jedoch ab einer Homogenität  $w_0/r_{EP} > 1,5$  keine wesentliche Verbesserung der Einfangkraft erreicht werden kann. Bei diesen Untersuchungen gilt das Verhältnis  $w_0/r_{EP}$  als Maß für die Homogenität.  $w_0$  stellt dabei den Radius der Gaußschen Intensitätsverteilung in der Eintrittspupille des MO dar. Der Radius  $w_0$  ist an der Stelle definiert, an der die Intensität auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Der Radius des auf den SLM treffenden Gaußschen Strahls wird mit  $w_{SLM}$  bezeichnet ( $w_{SLM} \cdot \beta' = w_0$ ).

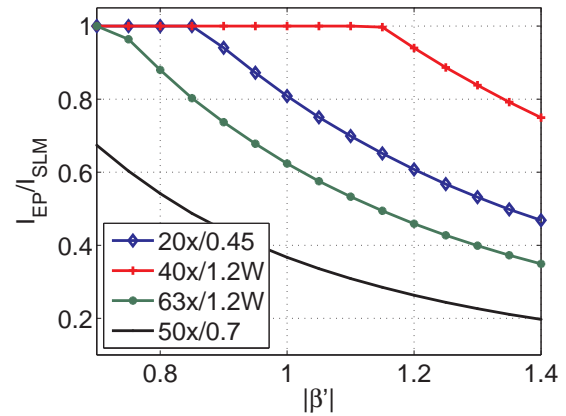
Da zur Einkopplung ein System mit einem konstanten Abbildungsmaßstab<sup>6</sup> verwendet wird, muss die Homogenität bereits für das Objektiv mit der größten Eintrittspupille ausreichend sein. Der verwendete Laser besitzt durch die Kollimationsoptik ohne weitere Aufweitung bei der Ausleuchtung des SLM einen Radius von  $w_{SLM} = 7,0 \text{ mm}$ <sup>7</sup>, bzw. bei der Einkopplung in das MO einen Radius von  $w_0 = 7,7 \text{ mm}$ .

<sup>6</sup>Alternativ kann ein Zoom-System verwendet werden, das den Abbildungsmaßstab entsprechend der EP des verwendeten MO ändert. Dabei werden der Aufbau und auch die Bedienung des Aufbaus jedoch deutlich komplexer.

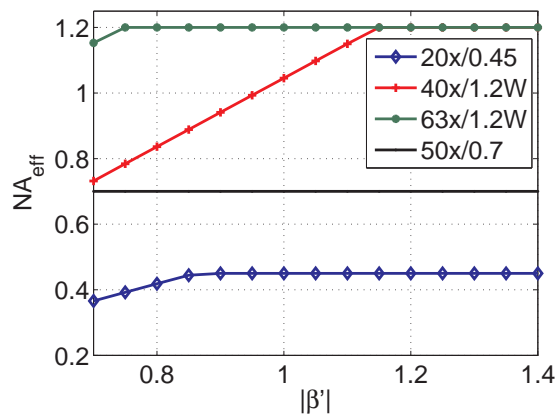
<sup>7</sup>Es wird beim Laser von einem idealen Gaußstrahl ausgegangen [144].



(a) Durchmesser des in das MO eingekoppelten Kreises in Abhängigkeit von  $\beta'$  (Maß für das Orts-Bandbreite-Produkt).



(b) Intensitätsverlust aufgrund der Abschattung durch die Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs in Abhängigkeit von  $\beta'$ . Der Intensitätsverlust aufgrund der Blende vor dem SLM wird nicht berücksichtigt (Normierung auf die auf den SLM fallende Intensität  $I_{SLM} = 0,61$  W).



(c) Numerische Apertur in Abhängigkeit von  $\beta'$ .

Abbildung 4.3.: Orts-Bandbreite-Produkt, Intensitätsverlust und effektive NA in Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabs  $\beta'$  des SLM in die EP.

	Objektiv	$r_{EP}$ [mm]	$w_0/r_{EP}$	$I_{EP}/I_0$	$I_{max}/I_{min}$	$D_{SLM}$ [Pixel]	$NA_{eff}$
1	20×/0,45	3,70	2,08	0,42	0,63	841	0,45
2	40×/1,2 W	4,93	1,63	0,61	0,47	1080	1,15
3	63×/1,2 W	3,13	2,46	0,32	0,71	712	1,20
4	50×/0,7	2,30	3,35	0,19	0,83	523	0,70

Tabelle 4.2.: Übersicht über die Abhängigkeit der verschiedenen Parameter vom eingesetzten Mikroskopobjektiv bei einem auf den SLM fallenden Strahlradius von  $w_{SLM} = 7,0$  mm  $\beta' = 1,1$  ( $\rightarrow w_0 = 7,7$  mm). Hierbei stellt  $I_{EP}/I_0$  die Intensität direkt nach der Eintrittspupille dar.  $I_0$  ist die Intensität des Lasers vor Beleuchtung des SLM. Im Gegensatz zu Abbildung 4.3(b) ist hier bereits der Verlust durch eine Blende vor dem SLM mit einem Durchmesser von  $R = 4,3$  mm einbezogen. Gleiches gilt für die Homogenität  $I_{max}/I_{min}$ .  $D_{Px}$  stellt den Durchmesser des eingekoppelten SLM-Bereichs dar.

Eine Ausleuchtung ohne Aufweitung entspricht beim Objektiv mit der größten Eintrittspupille (40×-Objektiv) einer Homogenität von  $w_0/r_{EP} = 1,63$ . Die Homogenität für die anderen Objektive für diese Ausleuchtung ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Sie sind alle im Bezug auf die geforderte Homogenität völlig unproblematisch. Daher kann der Laser ohne weitere Aufweitung in das System integriert werden. Dies hat den Vorteil eines deutlich reduzierten Justageaufwands sowie eines verkürzten und damit stabilen Aufbaus.

### 4.1.3. Optisches Design des Add-on Moduls

Das geforderte System ist grundsätzlich mit einem afokalen Abbildungssystem realisierbar, wobei die Tubuslinse die zweite Linse des afokalen Systems darstellt. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Lage der Eintrittspupille für verschiedene Mikroskopobjektive sowie die Position der Tubuslinse abhängig vom Modell des Zeiss Axiovert variieren kann (siehe Abschnitt 4.1.1). Zudem liegt die Tubuslinse ungünstig für einen einfachen Teleskopaufbau, da der Abstand zwischen Tubuslinse und Eintrittspupille nicht der Brennweite der Tubuslinse entspricht.

Das optische Design wurde zunächst paraxial entworfen und im zweiten Schritt mit realen, handelsüblichen Linsen optimiert. Da die Designdaten der Mikroskopobjektive und der Tubuslinse nicht bekannt waren, wurden diese als ideale, also Paraxiallinsen, simuliert und somit als sehr gut korrigiert angenommen. Lediglich die Fehler der Zusatzoptik werden daher berücksichtigt.

Abbildung 4.4 zeigt das entwickelte System, das einem afokalen System aus einer Linse (Linse 1,  $f_1=150$  mm) außerhalb des Mikroskops und der Tubuslinse entspricht. Die detaillierten Designdaten finden sich in Anhang A.2. Da der Abstand zwischen der Hauptebene der Tubuslinse und der EP des MO nicht der Brennweite der Tubuslinse entspricht sondern um  $\Delta z'$

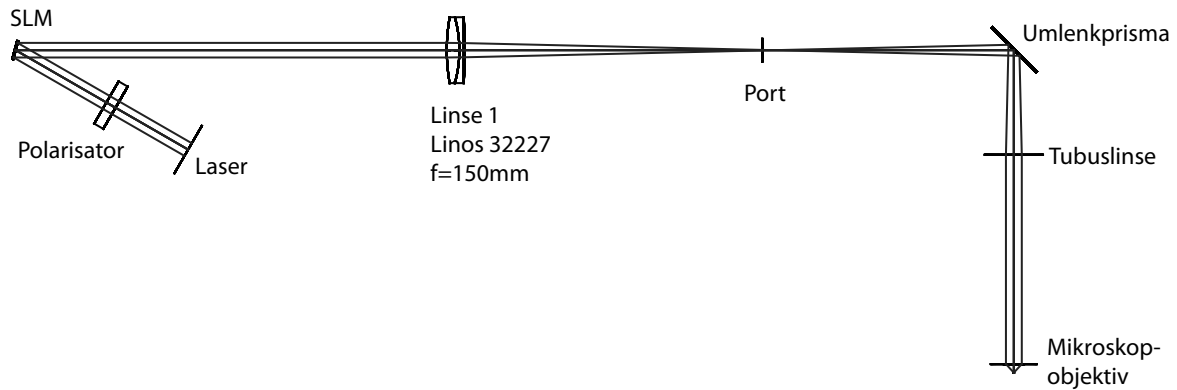


Abbildung 4.4.: Strahlengang der entwickelten Lösungen.

verschoben ist, muss auch der SLM aus der vorderen Brennebene entsprechend um  $\Delta z$  verschoben werden. Dabei bleiben Abbildungsmaßstab und phasenrichtige Abbildung erhalten. Der Zusammenhang entspricht hierbei in erster Näherung  $\Delta z' = \beta'^2 \Delta z$ , wobei  $\beta' = f_{TL}/f_1$  der Abbildungsmaßstab des afokalen Systems ist (siehe hierzu Anhang A.3).

Da die Position der Eintrittspupille von Objektiv zu Objektiv variiert und zudem bei der Fokussierung das Objektiv und damit auch die EP verschoben wird, ist die Abbildung nicht immer perfekt, sondern das Hologramm wird von einem zusätzlichen Defokusterm überlagert. Dieser kann durch eine entsprechende Änderung des Hologramms ausgeglichen werden. Da hierbei jedoch kein paralleler Strahlengang zwischen TL und MO gegeben ist, werden zusätzliche Aberrationen eingeführt [20].

## Toleranzuntersuchung

Reale Systeme unterscheiden sich aufgrund von Justage- und Fertigungstoleranzen zum Teil deutlich von den berechneten Systemen. Für das entwickelte System wurden die Auswirkungen von Fertigungstoleranzen untersucht, um im mechanischen Aufbau auf besonders empfindliche Komponenten reagieren zu können. In Zemax sind zwei Methoden zur Untersuchung des Einflusses von Fertigungstoleranzen gegeben [1]. Zum einen kann der Einfluss von zuvor definierten Maximaltoleranzen untersucht werden, um besonders einflussreiche Elemente zu identifizieren. Zum anderen kann mit Hilfe der Monte Carlo Methode aus einer zufälligen Kombination von Toleranzen, die innerhalb eines vorgegebenen Rahmens liegen, ein realistischer Bereich der zu erwartende Abweichung des realen Systems vom Idealsystem ermittelt werden.

Es wurden - soweit verfügbar - die Herstellerangaben zu Fertigungstoleranzen zur Berechnung verwendet. Detaillierte Angaben zur Wahl der Fertigungstoleranzen finden sich in Anhang A.2.1.

Das System reagiert relativ unempfindlich auf die geringen Verkippungs- und Dezentrierungstoleranzen der Linse 1. Durch die geringe Anzahl optischer Elemente ist auch die Anzahl der Fehlerquellen limitiert. Problematischer sind dagegen die Toleranzen von Brechungsindex und Dicken der Linsen. Da diese Faktoren die Brennweiten der Linsen verändern, lassen sich die Abweichungen jedoch relativ einfach bei der Justage durch axiale Verschiebung der Linse korrigieren. Zudem zeigte die Toleranzierung, dass eine sorgfältige Justage der optischen Achse unverzichtbar ist. Insgesamt ist das System jedoch sehr unempfindlich. Abbildung 4.5(b) zeigt den RMS-Wellenfrontfehler aufgetragen über den Feldwinkel für das schlechteste in der Monte Carlo Analyse ermittelte System. Die Wellenfront ist über das gesamte Feld von  $0^\circ$  bis  $1,9^\circ$  beugungsbegrenzt<sup>8</sup>. Die dazugehörigen Spotbilder sind in Abb. 4.5(a) dargestellt. Der PV-Wellenfrontfehler liegt hier bei etwa  $\Delta W_{PV} = 0,02 \lambda$  auf der optischen Achse bis zu  $\Delta W_{PV} = 0,12 \lambda$  bei der Maximalauslenkung von  $1,9^\circ$  (entspricht einer Gitterperiode von 4 Pixeln). Durch Defokussierung der Linse 1 kann über das gesamte Feld eine Verbesserung auf etwa  $\Delta W_{PV} = 0,02 \lambda$  erzielt werden. Es konnte also ein robustes, einfaches und kompaktes System entworfen werden.

#### 4.1.4. Mechanische Umsetzung

Das Design des Add-On-Moduls konnte mechanisch äußerst kompakt verwirklicht werden. Der gesamte Aufbau (siehe Abb. 4.6) konnte auf einer Montageplatte mit den Maßen  $460 \times 300 \text{ mm}^2$  untergebracht werden. Es wurden hierbei vor allem mechanische Komponenten des Mikrobanksystems der Firma Linos verwendet. Der SLM wurde auf einem Drehtisch aufgebracht. Da in den verwendeten Laser bereits eine Kollimationsoptik mit passendem Ausgangsstrahldurchmesser integriert ist, konnte hier deutlich an Baulänge eingespart werden. Ein zweistufiges Spiegelsystem ermöglicht die genaue Justage der optischen Achse, um den Ergebnissen der Toleranzierung gerecht zu werden. Aufgrund des unpolarisierten Lasers wurde zusätzlich zur Einstellung der richtigen Polarisation ein Polarisator vor dem SLM eingefügt. Zur Bildaufnahme wurde eine Zeiss AxioCam Mrm mit einer Auflösung von  $1388 \times 1040$  Pixeln und einem Pixelpitch von  $6,45 \mu\text{m}$  verwendet. Um eine Abbildung des Einfanglasers auf die Kamera zu verhindern, wurde ein Infrarotfilter zwischen Objekt- und Kameraebene eingebracht. Eine Erläuterung des Vorgehens bei der Justage findet sich in Anhang A.2.4.

Das hier vorgestellte Add-on Modul wurde auf Basis einer kommerziellen Mikroskopplattform realisiert. Diese ist nicht für die verwendete Wellenlänge  $\lambda = 1,064 \mu\text{m}$  ausgelegt. Aus diesem Grund kann es innerhalb des Mikroskops zu unerwünschten Reflexen und daraus resultierenden Interferenzen kommen, was zu Intensitätsschwankungen des Einfangspots führen kann.

---

<sup>8</sup>Es wird hierbei davon ausgegangen, dass aus Effizienzgründen (siehe Abbildung 3.5) Hologramme mit minimal 4 Graustufen verwendet werden.



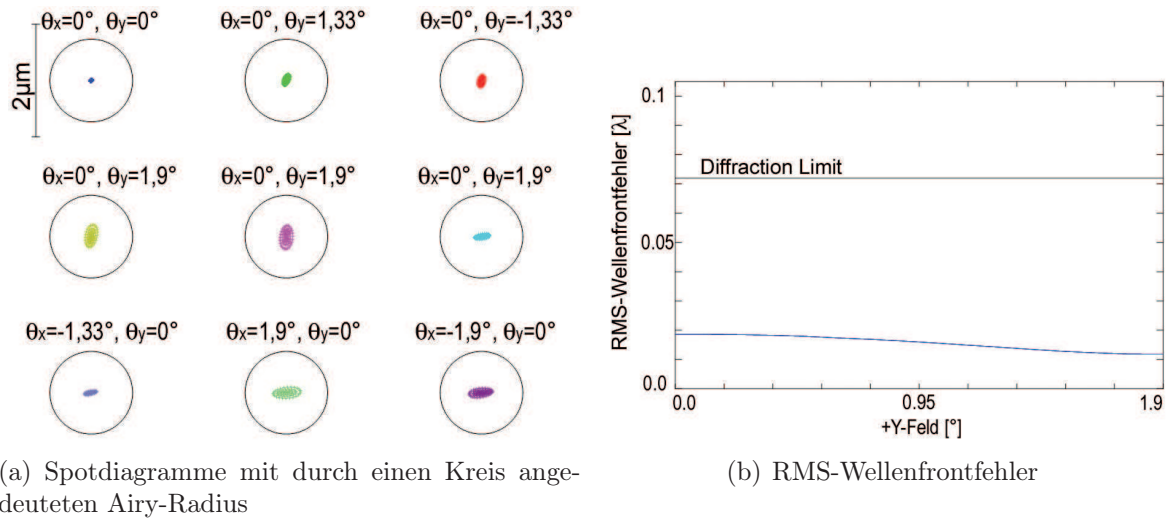
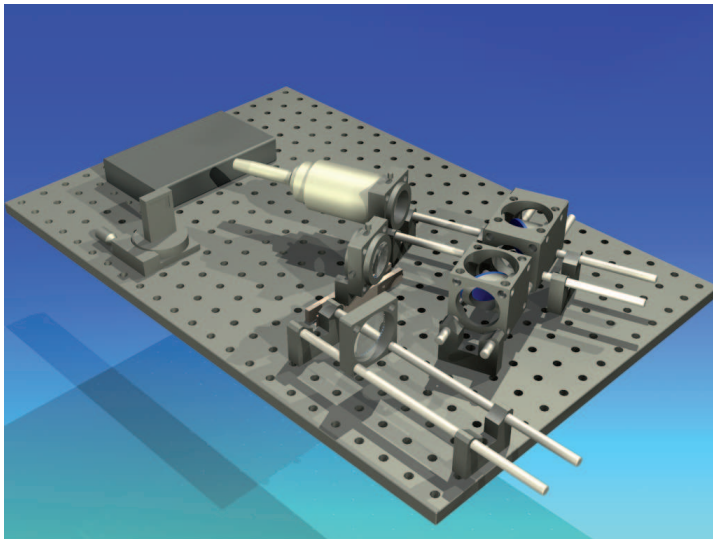
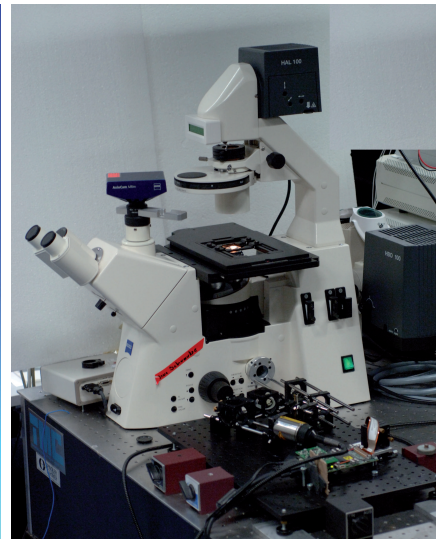


Abbildung 4.5.: Toleranzierung des 1-Linsen-Systems. Spotdiagramm und RMS-Wellenfrontfehler für das schlechteste in der Monte Carlo-Analyse ermittelte System. Bei diesem System führt in erster Linie die Dezentrierung der Linse 1 zu einer Verschlechterung der optischen Qualität. Trotzdem wird immer noch eine beugungsbegrenzte Falle erzeugt.



(a) Mechanisches Design des Add-on Moduls



(b) Foto des Komplettsystems

Abbildung 4.6.: Mechanische Realisierung des Add-on Moduls.

## 4.2. Klassifikation von Zellen mit Hilfe der holografischen Pinzette

Die Bestimmung von Zelleigenschaften, z.B. bei der Identifikation von Erkrankungen und dem Nachweis von Zellveränderungen, spielt in der klinischen Diagnose und der mikrobiologischen Forschung eine große Rolle. Da Zellen in verschiedenen Zuständen (wie z.B. gesunde Zellen, Krebszellen und Zellen unter Einwirkung von Medikamenten) aufgrund ihres Stoffwechsels eine unterschiedliche Zusammensetzung besitzen, wirken auf diese Zellen unterschiedliche Einfangkkräfte. Dies soll genutzt werden, um Zellen unterschiedlicher Zustände voneinander zu unterscheiden und um auf diesem Weg die Diagnose verschiedener Krankheiten zu unterstützen.

Die Kraftmessung mit der holografischen Pinzette kann so möglicherweise zur Bestimmung von Krebszellen eingesetzt werden. Dabei werden nicht spezifische Zelleigenschaften gemessen, sondern die Reaktion der Zelle als Gesamtsystem. Einerseits erschwert dies die Interpretation der Ergebnisse, erhöht aber andererseits die Empfindlichkeit des Messsystems im Vergleich zu Systemen, die nur einen Parameter messen, da auf einfache Art und Weise viele Parameter gleichzeitig erfasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu eine erste Studie durchgeführt, um die Machbarkeit der Methode zu überprüfen. Als Versuchsobjekte wurden Blutkrebszellen, gesunde Zellen und medikamentös behandelte Krebszellen gewählt, da für diese bereits entsprechende Verfahren existieren, mit denen die Messergebnisse des neuen Verfahrens verifiziert werden können. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart durchgeführt.

### 4.2.1. Kraftmessung mit der holografischen Pinzette

Es existieren verschiedene Prinzipien der Kraftmessung mit optischen, bzw. holografischen Pinzetten [128], die hauptsächlich auf zwei physikalischen Gesetzen beruhen [56, 167]: der Brownschen Bewegung und dem Viskositätswiderstand. Methoden, die auf Brownscher Bewegung beruhen, nutzen aus, dass mikroskopische Partikel leichten Positionsschwankungen unterworfen sind. Beim Einfang dieser Partikel werden die Positionsschwankungen entsprechend der Fallenstärke reduziert. Durch Messung der Positionsschwankungen kann mit Hilfe eines Grenzfrequenzverfahrens [177] oder der Boltzmann Statistik [40] Rückschluss auf die Einfangkraft gezogen werden. Bei Verfahren, die den Viskositätswiderstand nutzen, werden die Objekte durch das flüssige Medium, in dem sie sich befinden, bewegt. Der Widerstand,

den das Objekt erfährt, beruht auf der Viskosität der Flüssigkeit. Auch hier kann auf verschiedenen Wegen, z.B. mittels Fluchtmethode [50] oder Fallensteifheitsmethode [177, 162], auf die Einfangkraft geschlossen werden.

Die Verfahren, die auf Brownscher Bewegung beruhen, setzen eine Beobachtung der Zelle über einen gewissen Zeitraum voraus, um eine statistische Auswertung der Objektpositionen durchführen zu können. Die Messung der Kraft auf einzelne Zellen dauert mit steigender Objektgröße aus diesem Grund vergleichsweise lang. Da aus statistischen Gründen auch eine hohe Anzahl von Einzelzellen untersucht werden muss, eignen sich die Methoden, die auf Brownscher Bewegung basieren, in diesem Fall nicht zu Diagnosezwecken.

Die Fallensteifheitsmethode beruht darauf, das Objekt mit Hilfe zweier externer Fallen zum Schwingen anzuregen. Auch hier wird eine verhältnismäßig lange Messdauer benötigt. Deshalb wurde die Fluchtmethode im Rahmen der folgenden Untersuchungen zur Kraftmessung eingesetzt, die sich durch kurze Messdauer und hohe Zuverlässigkeit auszeichnet.

Die Fluchtmethode misst jene Kraft, die aufgewendet werden muss, damit das gefangene Objekt aus der Falle entfliehen kann. Hierzu wird das Objekt mit zunehmender Geschwindigkeit bewegt, bis das Objekt aufgrund des wirkenden Strömungswiderstands aus der optischen Falle herausfällt. Die maximale Kraft lässt sich also aus der Maximalgeschwindigkeit des Objekts errechnen.

Die auf ein bewegtes Objekt wirkende Reibungskraft  $F_R$  lässt sich mit Hilfe des Stokeschen Gesetzes beschreiben [49]:

$$F_R = 6\pi\kappa r_O v \tag{4.1}$$

Die Reibungskraft ist somit proportional zum Radius des Objekts  $r_O$ , der dynamischen Viskosität  $\kappa$  des Mediums und der Geschwindigkeit  $v$  des Objekts. Das Stokes-Gesetz gilt nur für den laminaren Strömungsfall, der aber in mikroskopischen Experimenten vorausgesetzt werden kann. In den Versuchen wurde jene Geschwindigkeit linear erhöht und die Geschwindigkeit gemessen, bei der das Objekt aus der Falle flieht.

Die Bewegung der Zelle wird mittels einer Kamera mit fester Bildfrequenz aufgezeichnet. Mit Hilfe von Bildverarbeitung wird die Position der Zelle ermittelt. Hierzu wird zunächst eine Kantendetektion mittels des Canny-Algorithmus [21] durchgeführt. Um genaue Positionsdaten und die Querschnittsfläche der Zellen zu erhalten, wird das Bild zusätzlich so weiterverarbeitet, dass offene Kanten geschlossen, die entstehenden Bereiche aufgefüllt und kleinere Bereiche gelöscht werden [146]. Diese Kombination der Bildverarbeitungsalgorithmen weist gegenüber der Kreuzkorrelation, die sehr häufig zur Positionsdetektion verwendet wird, gewisse Vorteile

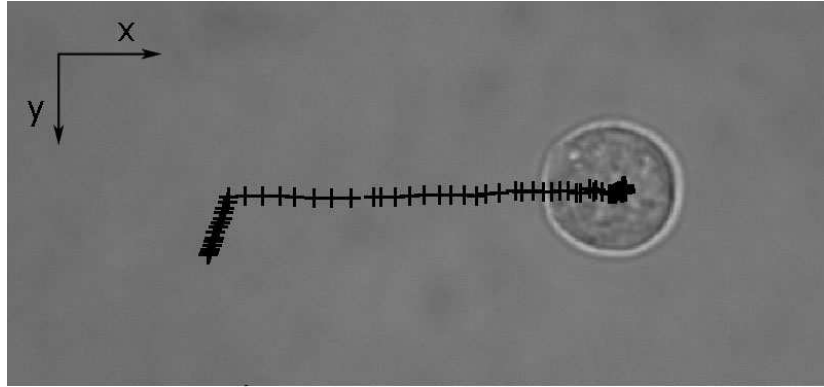


Abbildung 4.7.: Messung der Position der Zelle

auf. Die Kreuzkorrelation zeigt sich problematisch bei Veränderungen der Zelle gegenüber dem Vergleichsmuster, wie sie beispielsweise durch Verdrehung und Verschiebung von Zellbestandteilen (z.B. Zellkern) durch die optische Falle oder Reflexionen des Lasers an der Zelloberfläche auftreten können.

Schwingungen der Umgebung stören die Bewegung der Zellen. Um das Ausmaß dieser Störungen zu ermitteln, wurden direkt vor dem Start der eigentlichen Kraftmessung 40 Kamerabilder bei fixer Objektposition aufgenommen. Zeigen sich schon während der Ruhephase der Zelle starke seitliche Auslenkungen, z.B. durch Schwingungen des Tisches, so wird die Messung verworfen. Neben dem Einfluss der Schwingungen unterliegen die Kraftmessungen zusätzlich dem Einfluss von Strömungskräften, die u.a. durch Verdunstung entstehen. Aus diesem Grund wurden geschlossene Probenhalterungen verwendet, die aus zwei durch einen O-Ring (Höhe 1 mm) getrennte Deckgläser (Dicke 0,17 mm) bestehen.

Um den verbleibenden Einfluss von Strömungskräften auf die Messung zu ermitteln, wird die Geschwindigkeit der Zelle nach dem Verlassen der Falle betrachtet und die Messung um die entsprechende Komponente der Messrichtung korrigiert. Aufgrund der geringen Masse der Zellen sowie der kleinen Reynolds-Zahl ist die Trägheit der Zelle vernachlässigbar.

Abbildung 4.7 zeigt die ermittelte Position einer Zelle bis zur Flucht aus der Falle. Aus diesen Positionsdaten lässt sich die Geschwindigkeit errechnen. Die maximale Geschwindigkeit wird durch den Maximalwert des Betrags der Geschwindigkeitsdaten bestimmt. Mit Hilfe von Gleichung 4.1, dem Durchmesser der Zelle (ermittelt durch Bildverarbeitung) und der dynamischen Viskosität des Mediums<sup>9</sup> von näherungsweise  $8,4 \cdot 10^{-4} \text{Ns/m}^2$  ergeben sich Kräfte im Bereich von Pikonewton. Durch wiederholte Messung der Kraft auf ein Objekt konnte eine Wiederholgenauigkeit der Kraftmessung von etwa 10% ermittelt werden.

---

<sup>9</sup>Als Medium wurde die Nährlösung RPMI (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute) mit verschiedenen Zusätzen verwendet. Die dynamische Viskosität lässt sich durch Verwendung der dynamischen Viskosität für das Medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) annähern.

## Auswahl geeigneter Versuchsobjekte

Das Verfahren der Kraftmessung setzt voraus, dass die zu untersuchenden Zellen über einen gewissen Zeitraum einfach zu handhaben sind und vereinzelt vorliegen. Aus diesem Grund eignen sich hier im Besonderen semiadhärente oder nicht-adhärente Zellen<sup>10</sup>.

Bei dieser Untersuchung wurden Zellen der Zelllinie Baf3-M (oder auch BafM) verwendet, die aus gesunden Vorläuferzellen der B-Lymphozyten<sup>11</sup> der Maus bestehen. Die Zelllinie Baf3-p185 (Baf) stellt eine gentechnische Veränderung der Zelllinie Baf3-M dar, und gehört zu den Krebszellen der chronisch myeloiden Leukämie (CML). Sie lassen sich durch Behandlung mit Imatinib<sup>12</sup> hemmen und sterben nach einiger Zeit ab.

Das System aus Zellen der Baf-Zelllinie und Imatinib wurde bereits durch verschiedene Arbeiten ausführlich charakterisiert [81]. Dies ermöglicht einen Vergleich der Kraftmessung mit der holografischen Pinzette mit der Empfindlichkeit etablierter Methoden – wie der Durchflusszytometrie (siehe unten).

## Vergleichsverfahren Durchflusszytometrie (FACS)

Die mit der holografischen Pinzette durchgeführten Messungen wurden mit Messungen eines in der zellbiologischen Forschung und in der klinischen Diagnostik etablierten Verfahrens – der Durchflusszytometrie – verglichen. Die Durchflusszytometrie – auch bekannt als Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) – verwendet Fluoreszenz-Marker zur Messung von Zelleigenschaften. Dazu werden die Zellen in einer sich verengenden Kapillare vereinzelt. Dort können sie – so sie denn die markerspezifische Eigenschaft besitzen – mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt und detektiert werden. Auf diese Weise können Zellen in hoher Geschwindigkeit (bis zu 1000 Zellen/s) identifiziert werden.

---

<sup>10</sup>Adhärenente Zellen haften leicht an der Oberfläche des Probengefäßes oder bilden Agglomerate, wodurch eine vereinzelt Kraftmessung unmöglich wird. Sie lassen sich zwar durch Enzyme lösen, sterben dann jedoch nach kurzer Zeit, was die Messung deutlich erschwert.

<sup>11</sup>B-Lymphozyten gehören zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten)

<sup>12</sup>Imatinib ist ein Stoff, der die biochemische Informationsübertragung beeinflusst und auf diese Weise die Zellteilung von Krebszellen blockiert. Imatinib ist seit 2002 in der EU als Medikament zur Behandlung von chronisch myeloiden Leukämie (CML) und weiteren Tumorerkrankungen zugelassen. Imatinib kann die CML nicht vollständig heilen, da nicht alle Leukämiezellen und Leukämievorläuferzellen eliminiert werden, aber es verringert die Anzahl an Krebszellen und normalisiert so die Blutzusammensetzung und damit die Symptome der CML.

### 4.2.2. Messung der Fangkraft von Leukämiekrebszellen

Zur Charakterisierung der Messmethode wird eine Zeitanalyse durchgeführt. Dazu wird die Zelllinie Baf (Krebszellen) mit Imatinib (3  $\mu\text{mol/ml}$ ) versetzt und die Einfangkraft über mehrere Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der Behandlung gemessen. Zudem wird die Einfangkraft einer Kontrollgruppe unbehandelter Krebszellen (Baf) gemessen.

Die Fangkräfte auf die Zellen steigen mit zunehmender Dauer der Imatinibeinwirkung. Bereits nach 2 Stunden lassen sich mit dieser Messmethode die behandelten Krebszellen von der Kontrollgruppe unterscheiden (Abbildung 4.8(a)). Pro Zeitabschnitt wurden aufgrund der relativ langen Messdauer nur jeweils 5-10 Messungen durchgeführt.

Mit Hilfe chromatographischer Verfahren lässt sich bei Zellen unter Imatinibeinwirkung nach 2 Stunden die maximale Konzentration des Proteins PAR<sup>13</sup> nachweisen [119]. Die Zellen sind also unter Einfluss von Imatinib nach 2 Stunden bereits deutlich verändert, was die Detektion mittels Kraftmessung erklären kann.

Dieselbe Zeitanalyse wurde zum Vergleich ebenfalls mit dem FACS durchgeführt. Hierbei dienten die Marker Annexin und TMRM<sup>14</sup> als Zelltod-Indikatoren. Mit Hilfe der Marker können im FACS erst nach etwa 3 Stunden die mit Imatinib versetzten Zellen von der jeweiligen Kontrollgruppe ohne Imatinib unterschieden werden (siehe Abbildung 4.8(b)). Die Klassifikation mit Hilfe von Einfangkraften zeigt hier also einen Vorteil gegenüber bekannten Methoden.

Durch die geringe Anzahl an Messungen je Zeitpunkt sind die Messdaten unsicher und es zeigen sich Ausreißer. Aus diesem Grund ist eine Erhöhung der Anzahl von Messungen von Bedeutung, um eine statistisch aussagekräftige Messung zu ermöglichen.

Um eine genaue Aussage über die statistische Verteilung der Einfangkraften auf die Zellen treffen zu können, wurde eine größere Anzahl von unbehandelten Krebszellen (Baf), Krebszellen nach 2 Stunden Imatinibeinwirkung (Baf +Imatinib 2h) sowie gesunde Zellen (BafM) gemessen.

Innerhalb der Messdauer von 10 Minuten können manuell nur wenige Zellen (5-10) gemessen werden. Um die notwendige Anzahl für eine statistische Auswertung der Messungen zu erreichen, wurden deshalb für diese Untersuchungen mehrere Messreihen einer Zelllösung gemessen. Hierdurch stieg die gesamte Messdauer für 100 - 200 Messungen auf ca. 8 h.

Die gemessenen Einfangkraften wurden als Histogramm aufgetragen und die Verteilung mit einer Gaußkurve angenähert. Abbildung 4.9 zeigt die Verteilung der Kräfte für jeweils zwei

---

<sup>13</sup>Poly(ADP-Ribose)Polymerase

<sup>14</sup>Tetramethylrhodaminmethylester

	Anzahl Messungen	Scheitelwert [pN]	$\sigma$ [pN]
Baf (1)	117	1,18	3,50
Baf (2)	205	1,12	3,49
Baf + Imatinib 2h (1)	142	1,35	2,57
Baf + Imatinib 2h (2)	145	1,40	2,48
BafM (1)	102	1,27	2,00
BafM (2)	99	1,24	1,71

Tabelle 4.3.: Daten der Gauß-Fits an die Kraftverteilung ( $\sigma$  entspricht der Standardabweichung)

Messreihen der Zellen. Es ist zu erkennen, dass sich alle 3 Gruppen in ihrer Kräfteverteilung deutlich voneinander unterscheiden.

Krebszellen (Baf) und mit Imatinib behandelte Zellen nach 2h (Baf + Imatinib 2h) zeigen eine Verschiebung des Scheitelwertes um 0,23 pN und sind dadurch bereits nach 2 Stunden voneinander unterscheidbar (siehe Tabelle 4.3). Krebszellen (Baf) und gesunde Zellen (BafM) zeigen hingegen nur eine relativ geringe Verschiebung von 0,1 pN. Hier ist jedoch die Standardabweichung der Verteilung deutlich unterscheidbar (Faktor 1,5).

Es ist also möglich, verschiedene Zellzustände der Baf-Zelllinie anhand der Einfangkräfte in optischen Pinzetten zu unterscheiden. Gegenüber Messungen mit dem FACS zeigte sich der große Vorteil, dass die Veränderung der Zellen bereits nach 2 h statt nach 3 h festgestellt werden konnte.

Die Messungen an den Zellen der Baf-Zelllinie zeigen die Empfindlichkeit des Messverfahrens. Für die weitere Entwicklung ist es jedoch notwendig, Zellen zu finden, die sich mit den üblichen Verfahren nicht unterscheiden, jedoch mit optischen Pinzetten klassifizieren lassen. Zudem ist eine Automatisierung des Verfahrens zur Beschleunigung der Messungen unabdingbar.

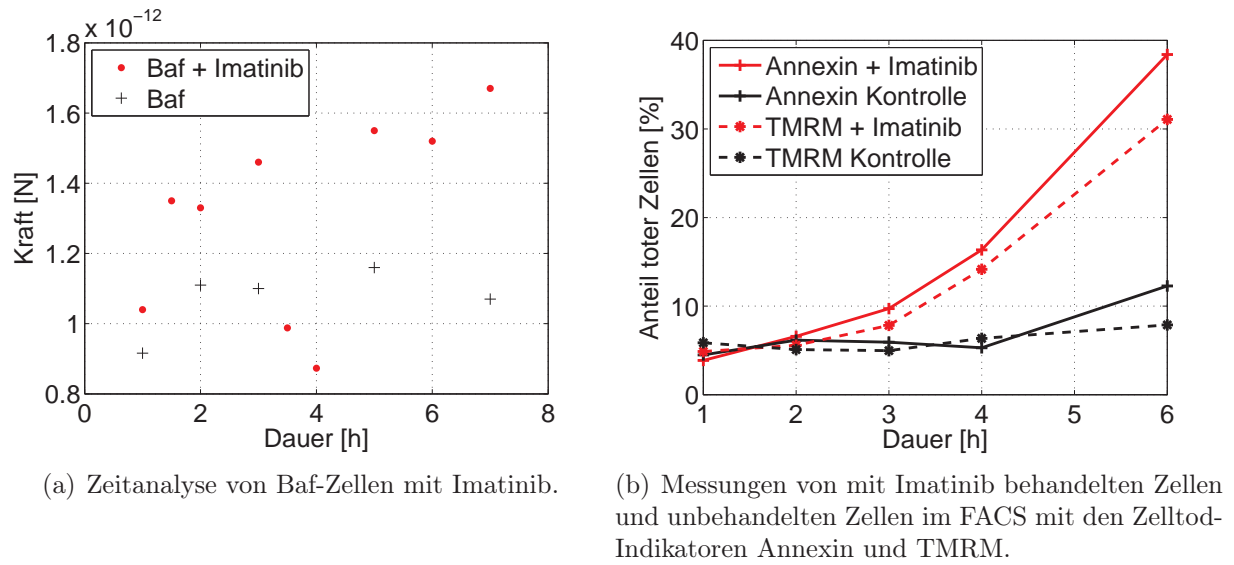


Abbildung 4.8.: Zeitanalyse durchgeführt mit holografischer Pinzette und FACS.

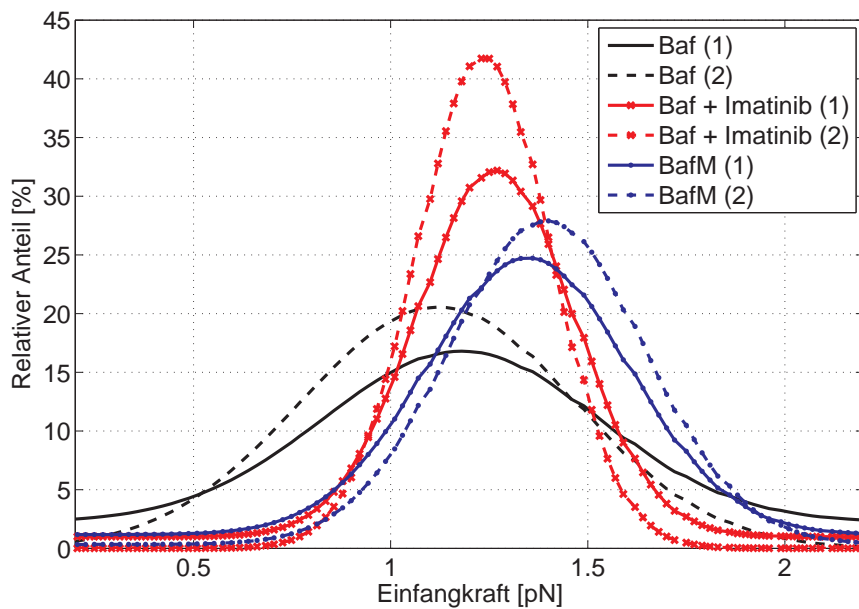


Abbildung 4.9.: Kraftverteilung von unbehandelten Krebszellen (Baf), Krebszellen nach 2 Stunden Imatinibeinwirkung (Baf +Imatinib 2h) sowie gesunden Zellen (BafM).



## 5. Untersuchung neuer Einfang- und Manipulationsverfahren

Die in Kapitel 4.2 vorgestellten Untersuchungen zeigen sehr deutlich die prinzipielle Umsetzbarkeit dieses neuartigen Analyseverfahrens in der Diagnostik oder Medikamentenforschung. Da Zellen in ihren Eigenschaften statistisch weit streuen, sind viele Messungen an verschiedenen Zellen notwendig. Eine Automatisierung und Parallelisierung, um den Zelldurchsatz zu erhöhen, ist also für den praktischen Einsatz unerlässlich.

Grundsätzlich bietet der holografische Ansatz der Mikromanipulation ideale Voraussetzungen zur Automatisierung. Da die Steuerung der Fallen ausschließlich über Software realisiert wird, ist keinerlei bewegte Mechanik nötig. Zudem kann die Anzahl der Fallen an die Aufgabenstellung angepasst werden, so dass eine Parallelisierung mit ausreichender Laserleistung im Rahmen des Orts-Bandbreite-Produkts des Lichtmodulators möglich ist.

Basis für die Automatisierung ist jedoch eine voll- oder zumindest teilautomatisierte Probenhandhabung. Dabei werden standardmäßig Mikrofluidiksysteme eingesetzt [58, 18]. Der Einsatz von Mikrofluidiken in Verbindung mit dem optischen Einfang sowie die Arbeit mit lebenden Zellen führen zu verschiedenen Herausforderungen:

**Arbeitsabstand:** Holografische Einzelfallen kooperieren nur bedingt mit Mikrofluidiksystemen. Aufgrund der benötigten hohen numerischen Apertur, die zum stabilen Einfang notwendig ist, ist ein geringer Arbeitsabstand gefordert. Hier kann bereits die Deckelung der Mikrofluidik-Komponenten ein Problem darstellen. Zudem kann je nach geometrischen Abmaßen das Mikroskopobjektiv mit Zu- und Abflüssen der Mikrofluidik-Komponenten kollidieren [125]. Entsprechende Systeme werden aus diesem Grund häufig mit Hilfe von speziell für den optischen Einfang entwickelten Mikrofluidiksystemen [34, 37, 169], Doppelfallen [163, 126, 125] oder mit Hilfe aufwändiger, in die Mikrofluidik integrierter, Fallensysteme realisiert [64, 116, 117].

**Aberrationen:** Da Aberrationen Funktionen der numerischen Apertur sind [19], stellt die hohe numerische Apertur drastische Anforderungen an die Oberflächen der Mikrofluidik.

**Objektschädigung:** Die hohe numerische Apertur kann aufgrund der hohen Leistungsdichte im Fokus zur Schädigung biologischer Objekte führen [167, 148, 118]. Neben einer Verfälschung der Messung der Einfangkraft verhindert dies zusätzlich eine weitere Analyse entsprechender Zellen.

**Axiale Objektposition:** Der Einfang mit Einzelfallen ist mit klassischen Fallen axial stark lokalisiert. D.h. außerhalb eines gewissen Einflussbereichs der Falle ist kein Einfang möglich. Dieser Bereich nimmt mit zunehmender NA ab [180]. Probenkammern, die beispielsweise wie Mikrofluidiken eine Tiefe im Bereich einiger 10  $\mu\text{m}$  bis einiger 100  $\mu\text{m}$  aufweisen, führen jedoch zu einer starken axialen Variation der Objektposition. Neben dem geringen axialen Einfangbereich führt die axiale Verteilung der Objekte (aufgrund der geringen Tiefenschärfe bei hoher NA) zu Schwierigkeiten bei der Detektion der Objekte. Beide Punkte können in der Praxis bei einer Automatisierung zu Problemen führen.

**Zellsortierung:** Insbesondere im Zusammenhang mit der Klassifizierung kann es von Interesse sein, die klassifizierten Zellen zur weiteren Analyse zu sortieren. Im Falle einer weiteren Analyse mehrerer verschiedener Zelllinien ist es notwendig, mehrere Abflüsse bereitzustellen. Interessiert jedoch nur eine bestimmte, dafür jedoch „reine“ Zelllinie, so kann eine Bereinigung der Zelllinie durch gezielte automatisierte Zerstörung uninteressanter Zellen vorteilhaft sein [168].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden untersucht, die bei einer Automatisierung des untersuchten Diagnoseverfahrens Vorteile bieten. Dabei wurden ausschließlich Ansätze verfolgt, die die hohe Flexibilität der holografischen Manipulation nutzen, während mechanische Ansätze nicht verfolgt wurden. So können die Lichtfelder an komplexe Aufgabenstellungen angepasst werden, um Objektschädigungspotential zu reduzieren oder den Arbeitsabstand zu erhöhen. Dabei kommen Mehrspottechniken mit unabhängigen, klassischen Fallenpotentialen aber auch völlig neuartige Lichtfelder zum Einsatz. Neben der Erprobung neuartiger holografischer Einfang- und Bewegungsverfahren (siehe Abschnitt 5.2-5.4) wurde auch die Manipulation mittels holografisch gesteuertem Laserskalpell zur Zellsortierung (siehe Abschnitt 5.5) erprobt. Um die technische Realisierbarkeit zu überprüfen, wurde zudem eine Methode zur Kalibrierung von Hologrammkoeffizienten zur Objektposition untersucht (siehe Abschnitt 5.6).

## 5.1. Einfang größerer Objektensembles zur Parallelisierung der optischen Manipulation

Theoretisch lässt sich bei genügend hoher Laserleistung mit holografischen Pinzetten eine nahezu beliebige Anzahl von Fallen generieren, die nur durch das Orts-Bandbreite-Produkt des Lichtmodulators beschränkt ist (siehe Abschnitt 3.3.4). Mit zunehmender Anzahl überlagelter Hologramme nimmt die Beugungseffizienz des Gesamthologramms jedoch ab, so dass schon vor Erreichen des Orts-Bandbreite-Produkts Störordnungen auftreten, die beim Einfang großer Objektensembles störend sein können. Die Stärke der Geisterfallen hängt dabei stark von der Position und der Anzahl der Fallen ab (siehe Abbildung 5.1). Aus diesem Grund ist es notwendig, beim Einsatz vieler Fallen auf optimierende Hologrammberechnungs-Algorithmen zurückzugreifen (siehe Abschnitt 3.3.2). Hier sind beispielsweise IFT-Algorithmen [48] oder direkte Suchalgorithmen, wie Direct Binary Search Algorithmus [156] oder der Simulated Annealing Algorithmus [93] geeignet. Weiterhin ist die Charakterisierung des Lichtmodulators zur Verbesserung der Beugungseffizienz von Bedeutung [99], welche wiederum in die Hologrammoptimierung einfließen kann [98].

Bei der Erzeugung einer großen Anzahl von Fallen ist zu beachten, dass mit zunehmender Anzahl an gefangenen Objekten die Laserleistung entsprechend gesteigert werden muss. Beim Einsatz sehr hoher Lichtleistungen ist jedoch eine Schädigung des LCD zu befürchten, da dieses nur bedingt gekühlt werden kann. Weil die Zerstörschwelle des eingesetzten Lichtmodulators nicht bekannt ist, wurde die maximale Leistung des Lasers bei den folgenden Versuchen auf 2,5 W begrenzt.

Der die Anzahl der Fallen beim Einsatz von ungekühlten Lichtmodulatoren beschränkende Faktor ist demnach nicht das Orts-Bandbreite-Produkt, sondern vor allem die benötigte Laserleistung pro Falle. Diese wird vor allem durch die hohen Verluste des Gesamtsystems beeinflusst. Abb. 5.2 zeigt den Einfang von 19 etwa 3  $\mu\text{m}$  großen Polystyrolkugeln mit einer Ausgangs-Laserleistung von 2,5 W. Beim Betrieb der holografischen Pinzette mit einer konstanten Lichtleistung von 2,5 W für die Dauer von etwa einer Stunde konnte bereits eine leichte Erwärmung des (ungekühlten) Displays festgestellt werden.

Dieser Versuch wurde mit dem 63 $\times$ -Objektiv durchgeführt. Aufgrund des Systemdesigns (siehe Abschnitt 4.1) tritt bei diesem Objektiv bereits ein Intensitätsverlust von 45% im Vergleich zum 40 $\times$ -Objektiv auf. Trotzdem ist auch bei idealem Systemdesign die maximale Anzahl gefangener Objekte von der Skalierung der Laserleistung abhängig. Die Zerstörschwelle ist dabei abhängig vom eingesetzten SLM und muss charakterisiert werden [87].

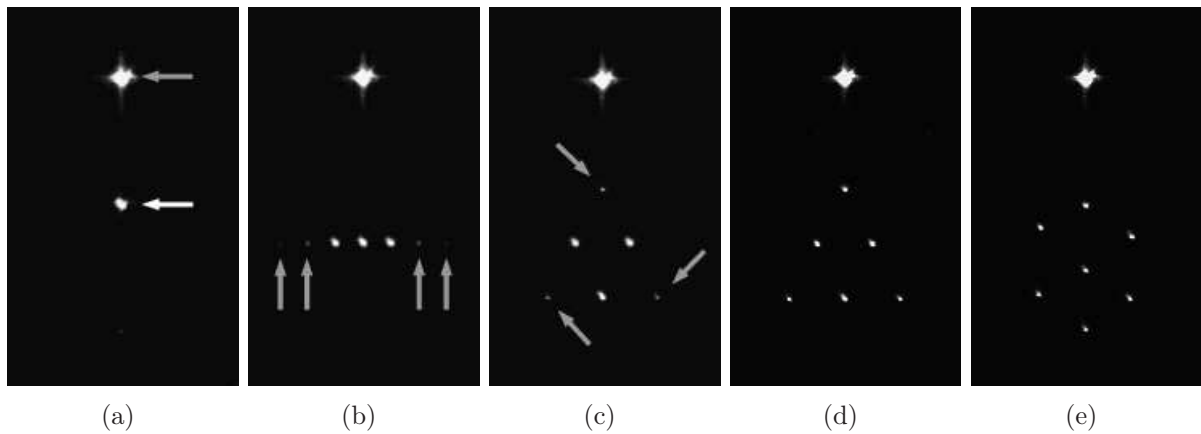


Abbildung 5.1.: Störordnungen (oder auch Geisterfallen) aufgrund der analytischen Hologrammberechnung (Gleichung 3.4). Die Stärke der Geisterfallen hängt stark von der Position und der Anzahl der Fallen ab.

- a) 0.Ordnung (oberer Pfeil) und eine Falle (unterer Pfeil)
- b) 3 Fallen und die entsprechenden Geisterfallen (Pfeile)
- c) 3 Fallen (angeordnet im Dreieck) und die entsprechenden Geisterfallen (Pfeile)
- d) 6 Fallen (Dreieck), keine Geisterfallen sichtbar
- e) 7 Fallen ohne Geisterfallen

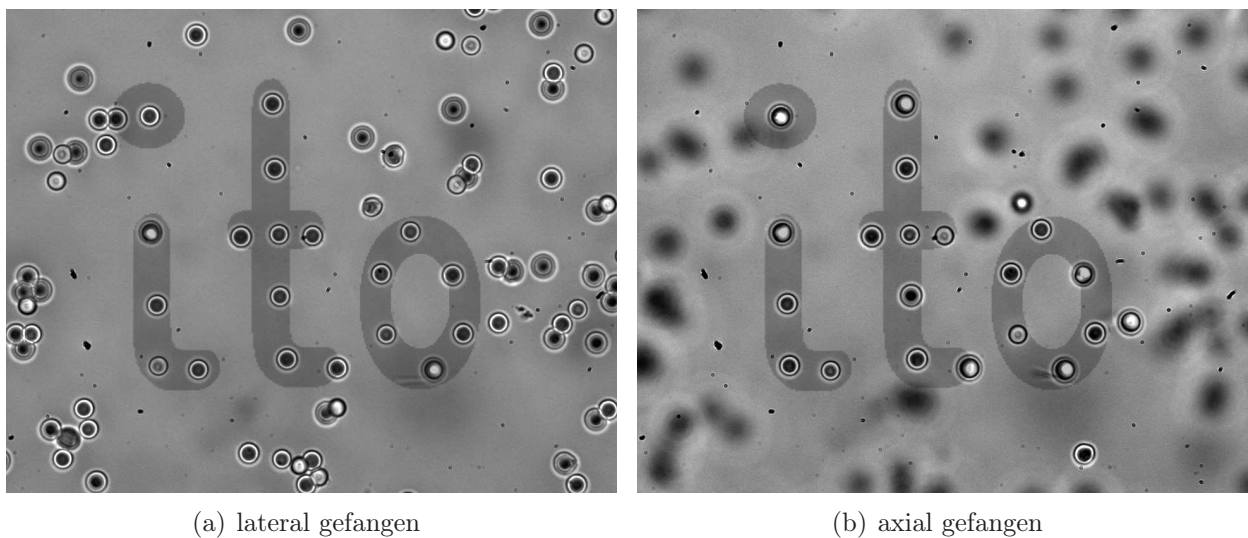


Abbildung 5.2.: Einfang eines Objektensembles von 19 3 µm großen Polystyrol-Beads.

## 5.2. Einfang mit angepassten Lichtfeldern

Komplexe und ausgedehnte Objekte lassen sich nur schwer mit einem einzigen beugungsbegrenzten Spot einfangen. Die Einfangkraft wird in diesem Fall oft mit Hilfe der Intensität des Einfanglasers erhöht. Dies kann jedoch bei biologischen Objekten leicht zu Schädigungen führen [167]. Im Folgenden werden zwei Methoden vorgestellt, den Einfang mit Hilfe angepasster Lichtfelder schonender zu gestalten.

### 5.2.1. Objektmanipulation durch Mehrspottechniken

Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, ist es mit Hilfe des holografischen Ansatzes möglich, mehrere Fallen unabhängig voneinander zu erzeugen und zu bewegen. Dies kann genutzt werden, um die schädliche, auf das Objekt wirkende Leistungsdichte zu reduzieren. Teilt man den Einfang eines Objekts auf mehrere Fallen auf, so kann die Intensität jeder einzelnen Falle verringert werden. Auf diese Weise lässt sich das Objekt mit mehreren Fallen und der daraus resultierenden, über das Objekt verteilten Intensität wesentlich einfacher bewegen, ohne der Gefahr der Schädigung ausgesetzt zu sein.

Abbildung 5.3 stellt den Einfang eines länglichen Objektes schematisch dar. Durch die unabhängige Bewegung der beiden Fallen zueinander ist neben einer einfachen Bewegung des Objektes zusätzlich eine beliebige Ausrichtung des Objektes im Raum möglich, so dass das Objekt lateral und axial in eine beliebige Stellung gedreht werden kann.

Dies wurde auch experimentell nachgewiesen: Abb. 5.4 und Abb. 5.5 zeigen beispielhaft den Einfang einer Hefezelle mit zwei Fallen. Längliche Objekte, wie Hefezellen, richten sich unter der Lasereinwirkung auf. Durch Einsatz dieser Mehrspottechniken lassen sich die Hefezellen wieder in eine waagrechte Position bringen bzw. in-plane und out-of-plane beliebig drehen. Es ist also erstmals auf einfache und flexible Weise möglich, mit Einzelfallen sowohl laterale Drehung (in plane) als auch Kippung aus der Ebene heraus (out of plane) zu realisieren.

Das Ausrichten bzw. Rotieren von Objekten wird beispielsweise für physikalische Grundlagenuntersuchungen [8] wie die Kolloidforschung [27] oder optisch angetriebene Mikromaschinen [44] eingesetzt. Dabei werden verschiedene Methoden, die bspw. auf der Helizität zirkular polarisierten Lichts (bei doppelbrechenden Objekten [41]) oder der Übertragung eines Bahndrehimpulses (realisiert durch Gauß-Laguerresche Strahlen [145, 73, 46]) basieren, eingesetzt. Bei beiden Methoden ist es schwierig, die Geschwindigkeit einzustellen bzw. unmöglich das Partikel kontrolliert in eine bestimmte Position zu drehen. Bei der Polarisationsmethode kann jedoch durch Einsatz eines Polarisators linear polarisiertes Licht erzeugt werden, mit dem sich



Abbildung 5.3.: Schematische Darstellung des Mehrfalleneinfangs eines länglichen Objektes. Durch die unabhängige Bewegung der Fallen zueinander ist eine beliebige Ausrichtung des Objekts im Raum möglich.

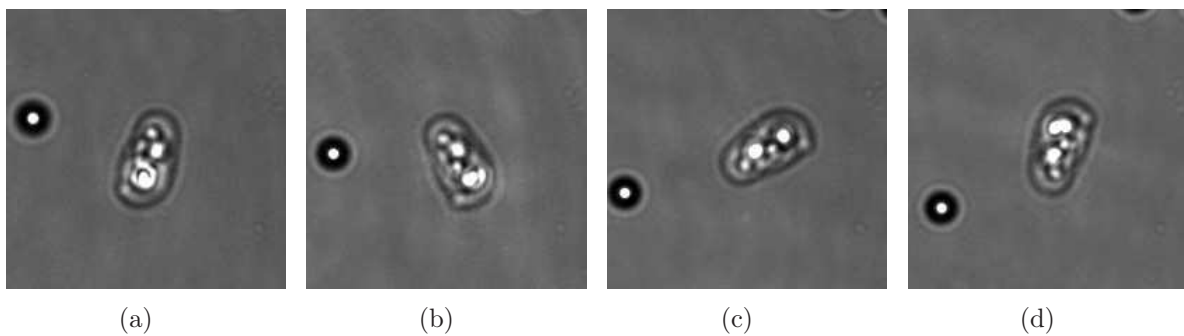


Abbildung 5.4.: 3D Manipulation Drehung: Rotation (in plane) einer Hefezelle durch Bewegen der zweiten Falle.

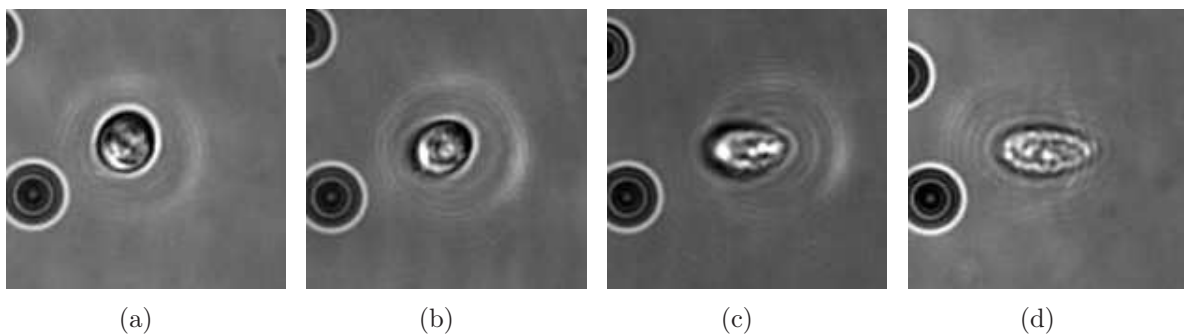


Abbildung 5.5.: 3D Manipulation Drehung: Kippung (out of plane) einer Hefezelle durch Bewegen der zweiten Falle.

der Rotationswinkel genau einstellen lässt [41]. Da hier jedoch doppelbrechende Partikel benötigt werden und biologische Objekte im Normalfall sehr gering bis gar nicht doppelbrechend sind, empfiehlt sich diese Methode eher für geeignete Mikroelemente. Zudem ist der Rotationswinkel durch Einstellung der Polarisationsrichtung global für alle gefangenen Partikel gegeben.

Allen bisher entwickelten Methoden ist die laterale Rotation gemein. Die einzige bis dato bekannte Möglichkeit, ein Drehmoment im Raum zu erzeugen und damit Objekte aus der Ebene heraus zu kippen, ist gegeben durch mehrere Doppelfallen, die mittels generalisiertem Phasenkontrast erzeugt werden [136]. Diese leiden jedoch unter hohem Leistungsverlust sowie einem relativ hohen apparativen Aufwand durch die gegenläufigen Doppelfallen. Die hier vorgestellte Technik der dreidimensionalen Ausrichtung lässt sich grundsätzlich auch in konventionellen optischen Pinzetten realisieren, ist dort jedoch mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden.

Eine weitere zukünftig interessante Einsatzmöglichkeit der Technik ist die tomographische Untersuchung von Mikroobjekten.

### 5.2.2. Lateral ausgedehnte Lichtfelder

Neben der Möglichkeit der Mehrspottechnik liefert die holografische Pinzette eine Methode, mit einer einzigen Falle schonenden und trotzdem effizienten Einfang zu erzielen. Hierbei sollen ausgedehnte Lichtfelder die auf das Objekt wirkende lokale Intensität reduzieren.

Dazu werden die Hologramme so modifiziert, dass in der Objektebene eine ausgedehnte Falle entsteht. Diese ausgedehnte Falle wird bei der Berechnung durch eine große Anzahl nahe beieinander liegenden Fallen modelliert. Da die analytische Berechnung vieler Fallen zu Störordnungen führt (siehe Abschnitt 3.3.2), wurden die Hologramme mit einem optimierenden Algorithmus (Gerchberg-Saxton-Algorithmus [48]) berechnet.

Bei den Untersuchungen wurde ein Polystyrol-Bead (Durchmesser: 6  $\mu\text{m}$ ) mit Fallen unterschiedlichen Durchmessers eingefangen. Bei gleichbleibender Gesamtlaserleistung wurde somit die auf das Objekt wirkende maximale Leistungsdichte reduziert. Der Fallendurchmesser wurde von 2 bis 5  $\mu\text{m}$  variiert und die auf das Objekt wirkende Kraftkonstante (siehe Abschnitt 3.4.1) gemessen. Dies erfolgte durch die Ermittlung der Kraftkonstante mittels Boltzmann Statistik der Brownschen Bewegung [40, 56]. Die Position des Objektes wurde dazu mit Hilfe von Bildverarbeitung ermittelt. Die genaue Auswertemethodik ist in Reicherter et al. [128] beschrieben.

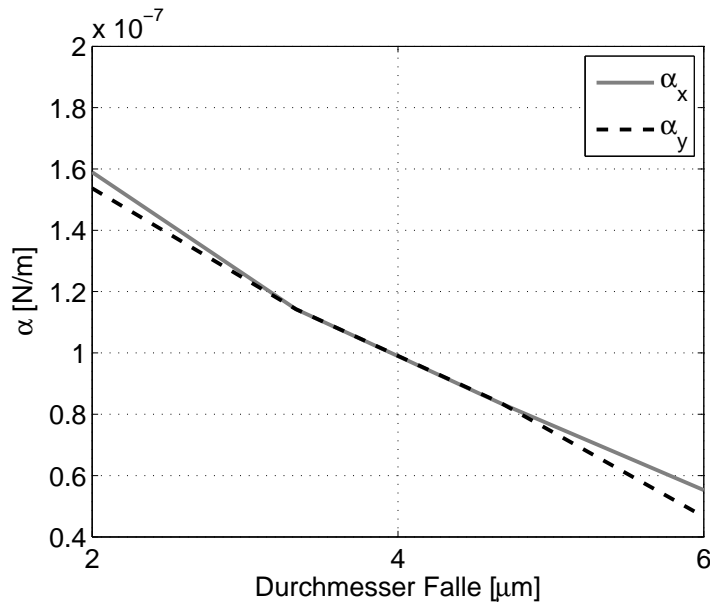


Abbildung 5.6.: Abhängigkeit der Kraftkonstante (in x- und y-Richtung) vom Fallendurchmesser bei gleichbleibender Laserleistung: eine Reduzierung der Leistungsdichte um den Faktor 9 (bei 3-fachem Durchmesser) führt zu einer Reduzierung der Einfangkraft auf nur ein Viertel.

Abb. 5.6 zeigt die (richtungsabhängige) Kraftkonstante ( $\alpha_x$ ,  $\alpha_y$ ) der Falle in Abhängigkeit des Fallendurchmessers. Es zeigt sich, dass eine Reduzierung der Leistungsdichte um das 9-fache (bei 3-fachem Durchmesser) eine Reduzierung der Einfangkraft auf ein Viertel zur Folge hat. Eine Vergrößerung des Fallendurchmessers ist also im Hinblick auf die schonende Behandlung von Zellen im Vergleich zum Einfang mit einzelnen beugungsbegrenzten Fallen zu bevorzugen. Durch die Verteilung der Laserleistung auf das gesamte Objekt kann ein schonender Einfang gewährleistet werden.

Es zeigt sich also, dass der optische Einfang stark von der Intensitätsverteilung in der Falle zum einen und vom Objekt zum anderen abhängt. Bei unsymmetrischen Objekten kann die Intensitätsverteilung eine zusätzliche Rolle spielen. Diese reagieren stark auf nicht-symmetrische Lichtfelder. Abbildung 5.7(a) zeigt eine ungefangene Polystyrol-Scheibe. Beim Einfang mit einem Gaußschen Strahl richtet sich die Scheibe im Strahlengang auf und passt sich dem Lichtfeld so an, dass eine Gleichgewichtsposition entsteht (Abb.5.7(b)). Wird nun das einfangende Lichtfeld in seiner Intensitätsverteilung geändert, z. B. durch Brechung der Symmetrie oder durch den Einsatz mehrerer Fallen, so kann die Ausrichtung dieses Objektes ähnlich wie bei der Verwendung mehrerer Fallen verändert werden. Hier wurde durch Einführen eines astigmatischen Lichtfelds in Kombination mit einem Defokus die Ausrichtung des Objektes verändert (siehe Abb. 5.7(c)). Auf diese Weise ist es möglich, ein solches Objekt zu rotieren.

Vergleicht man die Methode mit der in Abschnitt 5.2.1 vorgestellten Rotationsmethode, so kann hier durch Verteilung der Intensität auf das gesamte Objekt eine schonendere Manipula-



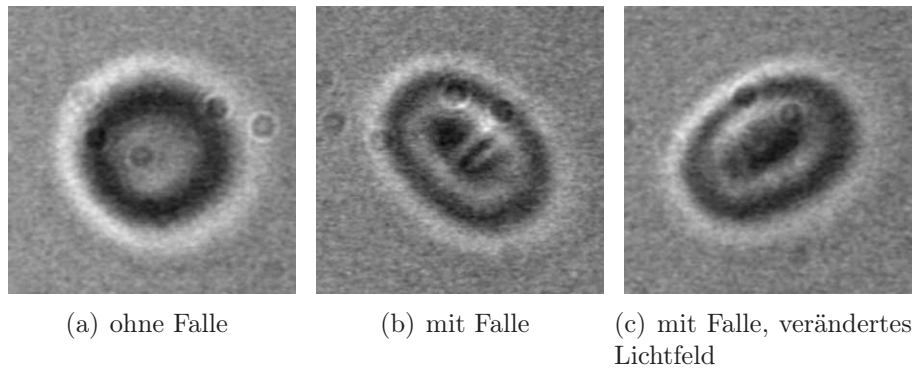


Abbildung 5.7.: Einfang einer Polystyrol-Scheibe. Beim Einfang richtet sie sich die Scheibe auf und passt sich dem Lichtfeld bei einer Veränderung an. Auf diese Weise ist eine schonende Rotation des Objekts möglich.

tion durchgeführt werden. Da in hochaperturigen Systemen in stetigen Lichtfeldern der laterale Intensitätsgradient der Punktbildfunktion immer größer ist als der axiale Intensitätsgradient [19] richten sich nicht-sphärische Objekte im Lichtfeld auf und können mit stetigen Lichtfeldern nicht in die Ebene zurück gekippt werden. Eine gezielte Manipulation in 3D (out of plane) ist also im Gegensatz zu nicht-stetigen Lichtfeldern (Mehrspotmanipulation, Abschnitt 5.2.1) nicht möglich.

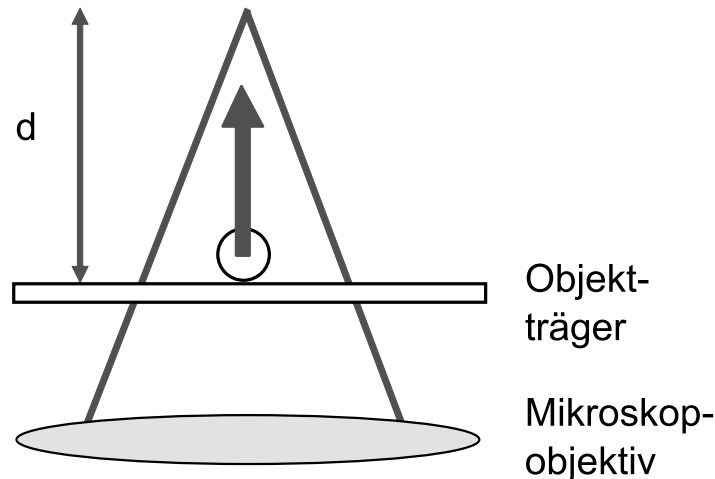


Abbildung 5.8.: Einfang eines Objektes, das sich außerhalb der Fokusebene befindet. Mit Hilfe der wirkenden Streukraft kann über einen bestimmten axialen Bereich das Objekt in die Fallenebene gedrückt werden. Ist die Entfernung zu groß bzw. die Intensität zu gering, wird das Objekt nicht bewegt.

### 5.3. Einfang mit axial ausgedehnten Lichtfeldern

Die holografische Pinzette eignet sich hervorragend zum automatisierten Einfang von Objekten, da die komplette Steuerung der Fallen mittels Software erfolgt. Gerade Anwendungen, bei denen ein relativ hoher Durchsatz erforderlich ist oder bildverarbeitungsgestützte Sortierung von Zellen können auf diese Weise zeitsparend realisiert werden.

Beim dreidimensionalen Einfang mit mittel- bis hochaperturigen Mikroskopobjektiven ist der Einfang sehr stark auf den Fokus lokalisiert. Befindet sich ein Objekt außerhalb der Ebene, wird es von der Streukraft abgestoßen. Diese Voraussetzungen machen das Einfangen in der Praxis abhängig vom Fingerspitzengefühl des Anwenders. Oft werden Objekte beim ersten Einfangversuch abgestoßen, so dass sie durch Nachfokussierung verfolgt werden müssen. Dies erschwert einerseits den gleichzeitigen Einfang mehrerer Objekte und lässt sich andererseits bei einer Automatisierung nur schwer realisieren.

Zur Realisierung des automatisierten Einfangs wurde deshalb eine Vereinfachung des Einfangvorgangs untersucht. Hierbei wurde die normalerweise störende Streukraft (siehe Abschnitt 3.4.1) ausgenutzt: Die Beobachtung der gefangenen Objekte wird (besonders im automatisierten Vorgang) deutlich vereinfacht, wenn Partikel aus unterschiedlichen Ebenen durch den Einfang in dieselbe Ebene gebracht werden können. Partikel, die sich „unterhalb“ der Falle befinden (siehe Abb. 5.8), können mit Hilfe der vorwärts wirkenden Streukraft in die Fokusebene befördert und dort gefangen werden. Hierbei muss jedoch der Abstand entsprechend gering bzw. die Intensität entsprechend hoch gewählt werden, um den Einfluss der Streukraft aus-

nutzen zu können. Partikel, die sich „oberhalb“ der Falle befinden, werden von der Streukraft abgestoßen und können nicht gefangen werden, ohne den Spot nachzufokussieren.

Um den Einfluss der Streukraft axial zu erweitern muss die Intensitätsverteilung auf der optischen Achse ausgedehnt werden. Eine bekannte Möglichkeit hierzu ist der Einfang mit sogenannten Bessel-Strahlen [5, 4, 45, 115]. Diese werden mit Hilfe eines Axikons<sup>1</sup>, das in einen Gaußschen Strahl eingebracht wird, erzeugt. Die Intensitätsverteilung auf der optischen Achse hat eine axiale Ausdehnung  $z_{max}$  von [5]:

$$z_{max} = \frac{\omega_0}{(n-1)\gamma}, \quad (5.1)$$

wobei  $\gamma$  der Öffnungswinkel und  $n$  der relative Brechungsindex des Axikons ist (siehe auch Abbildung C.2). Über diesen Bereich ändert sich die axiale Ausdehnung des zentralen Maximums praktisch nicht (nicht-beugender Strahl) und bietet dadurch eine fokale Lichtlinie mit geringer lateraler Ausdehnung, die zur Mikromanipulation eingesetzt werden kann.

Durch die axiale Lichtlinie ist axiales optisches Führen (engl. optical guiding) mit Hilfe von Bessel-Strahlen sehr viel einfacher durchzuführen, da der Strahl im Gegensatz zu Gaußstrahlen über einen sehr großen axialen Bereich lateral sehr gut lokalisiert ist. Aus diesem Grund werden Objekte lateral durch die Gradientenkraft fixiert, während sie axial mittels Streukraft gezielt auf der optischen Achse verschoben werden [5].

Die bisher auf diesem Gebiet vorgestellten Arbeiten erlauben lateralen Einfang ohne Verwendung eines Mikroskopobjektivs im Nahfeld des Axikons. Um einen entsprechenden Bessel-Strahl mit Hilfe einer holografischen Pinzette zu erzeugen, muss beachtet werden, dass der Lichtmodulator hier in der Fourierebene der Objektebene angebracht ist (siehe Abschnitt 3.1). Aus diesem Grund muss die Fouriertransformierte eines Axikons in den SLM eingeschrieben werden. Diese entspricht einer ringförmigen Amplitudenmodulation. Durch diese Amplitudenmodulation treten hohe Intensitätsverluste auf, da nur ein geringer Anteil zur Erzeugung des Bessel-Strahls genutzt werden kann. Die axiale Intensitätsausdehnung führt jedoch zusätzlich zu der Amplitudenmodulation zu einer reduzierten Leistungsdichte in der eigentlichen Falle. Aus diesem Grund wurde direkt ein Axikon in das SLM eingeschrieben. Da es sich hierbei um ein reines Phasenobjekt handelt, ist mit einem deutlich geringerem Intensitätsverlust zu rechnen. Eine schematische Darstellung der Anordnung ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Um den Einfluss eines Axikons in der Fourierebene zu untersuchen, wurden zunächst Simulationen durchgeführt.

---

<sup>1</sup>das alternativ auch mit Hilfe eines Phasenmodulators dargestellt werden kann

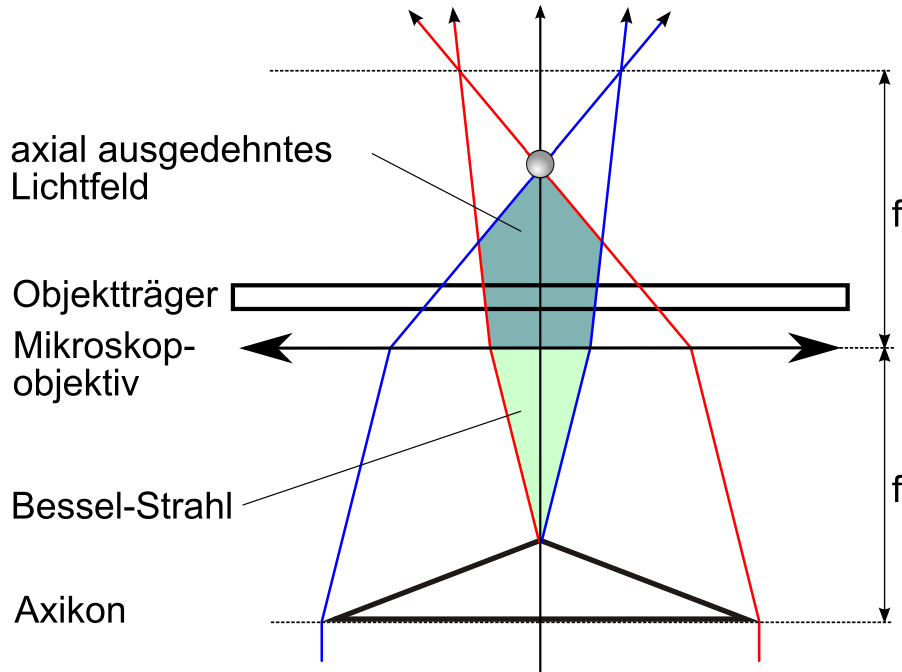


Abbildung 5.9.: Optischer Einfang mit Hilfe eines Axikons in der Fourierebene der Objektebene.

Abbildung 5.10 zeigt den axialen Verlauf der Amplitude und der jeweiligen Intensität eines Lichtfelds im Objektraum bei unterschiedlichen Ausprägungen des in den SLM eingeschriebenen Axikons. Dabei ist  $h_a$  ein Maß für den maximalen optischen Weg, den das Licht innerhalb des Axikons zurücklegt<sup>2</sup>. Abbildung 5.10(a) und 5.10(b) zeigen Amplitude und Intensität ohne eingeschriebenes Axikon ( $h_a = 0\lambda$ ). Die Intensitätsverteilung entspricht einer beugungsbegrenzten Fokussierung eines homogenen Strahls.

Abbildung 5.10(c) bzw. 5.10(d) und 5.10(e) bzw. 5.10(f) zeigen Amplitude und Intensität eines Lichtfeldes mit einem Axikon von  $h_a = 5\lambda$  bzw.  $h_a = 15\lambda$ . Es zeigt sich, dass sich mit zunehmender Axikonhöhe der axiale Intensitätsbereich ausdehnt. Zusätzlich ist eine Defokussierung zu beobachten, die im Experiment durch eine Überlagerung mit einem entsprechenden Defokusterm ausgeglichen werden muss. Die Simulationen wurden – entsprechend den Experimenten – für ein  $63\times/1,2W$ -Objektiv durchgeführt.

Abbildung 5.11 zeigt eine Simulation der lateralen Intensitätsverteilung eines axial ausgedehnten Lichtfelds in verschiedenen z-Ebenen für ein Axikon der Höhe  $h_a = 10\lambda$ . Entgegen dem klassischen Bessel-Strahl ist das axial ausgedehnte Lichtfeld nicht nicht-beugend. Es zeigt sich jedoch, wie auch beim klassischen Bessel-Strahl, eine starke axiale Ausdehnung der Intensität auf der optischen Achse.

<sup>2</sup>In dieser Arbeit wird  $h_a$  gegenüber dem für physikalische Axikons aus Glas sonst üblichen Öffnungswinkel  $\gamma$  als Maß bevorzugt, da  $h_a$  unabhängig vom Abbildungsmaßstab  $\beta'$  des SLM in die EP ist. Der Zusammenhang zwischen  $h_a$  und  $\gamma$  ist in C.2 dargestellt.

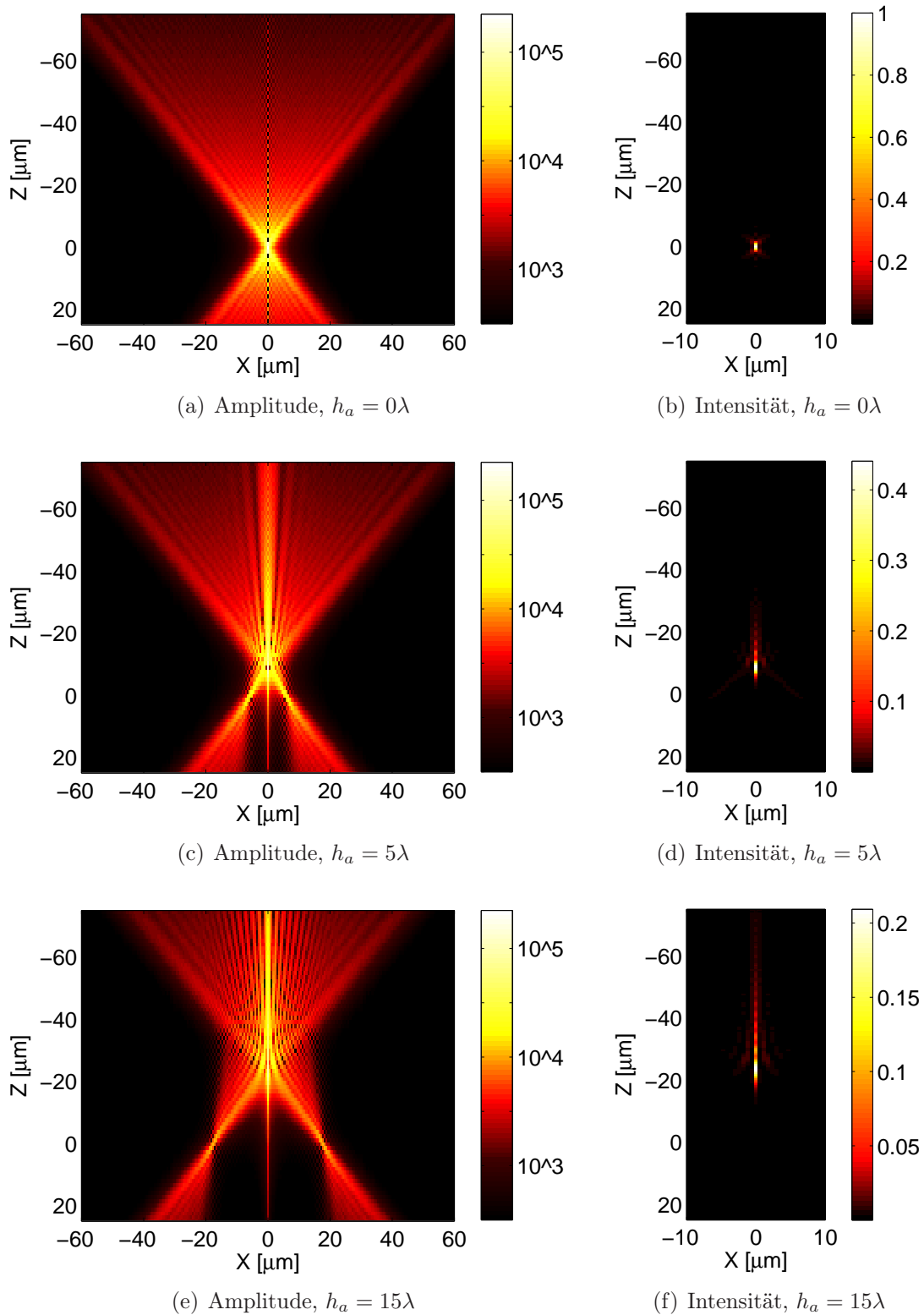


Abbildung 5.10.: Logarithmische Darstellung der Amplitude (links) und Darstellung der jeweiligen Intensität (rechts) von mit verschiedenen Axikons erzeugten Strahlprofilen in der Objektebene.  $Z=0$  ist die nominelle Fokusebene. Es zeigt sich eine axiale Ausdehnung der Intensität sowie eine Defokussierung.

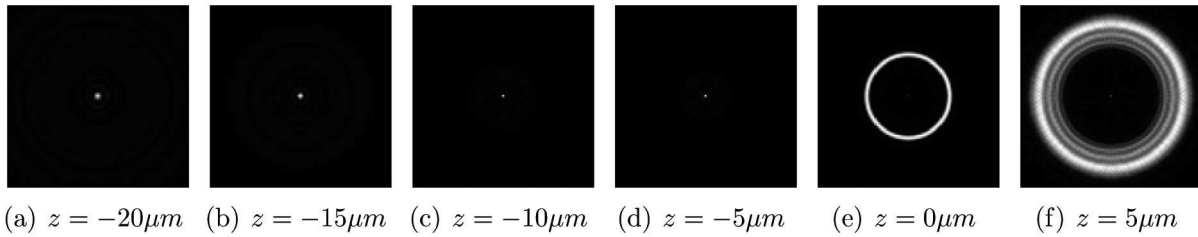


Abbildung 5.11.: Simulation der lateralen Intensitätsverteilung eines axial ausgedehnten Lichtfelds in verschiedenen  $z$ -Ebenen ( $h_a = 10\lambda$ ,  $63\times/1,2$ -Objektiv). Entgegen dem klassischen Bessel-Strahl ist das axial ausgedehnte Lichtfeld nicht nicht-beugend. Trotzdem zeigt sich eine starke axiale Ausdehnung der Intensität auf der optischen Achse.

Wie erwartet, nimmt mit zunehmender axialer Intensitäts-Ausdehnung auch die maximale Intensität und damit auch der axiale Intensitätsgradient stark ab. Dies ist in Abbildung 5.12 exemplarisch für verschiedene Axikonhöhen dargestellt. Beim Vergleich der verschiedenen Intensitätskurven wurde der Übersichtlichkeit wegen die zusätzlich eingeführte Defokussierung nicht beachtet. Abbildung 5.13(a) stellt die Abnahme der Maximalintensität in Abhängigkeit der Axikonhöhe  $h_a$  dar. Zusätzlich wurde die axiale Ausdehnung des Strahls in Abhängigkeit der Axikonhöhe ermittelt (Abb. 5.13(b)). Die axiale Ausdehnung eines Strahls wurde bis auf eine Abnahme der Intensität auf 10% der Maximalintensität definiert. Es zeigt sich ein zur Höhe des Axikons proportionales Verhalten.

Abbildung 5.14 demonstriert den stabilen dreidimensionalen Einfang mit den neuartigen Lichtfeldern. Dazu wurden einige Polystyrol-Beads (Durchmesser  $3\ \mu\text{m}$ ) auf einem Objektträger positioniert (Abbildung 5.14(a)) und dann um  $20\ \mu\text{m}$  aus der Objektebene defokussiert, so dass sie – aufgrund der geringen Tiefenschärfe – nur noch sehr schlecht erkennbar sind (Abbildung 5.14(b)). Die Objekte können mit Hilfe der ausgedehnten Lichtfelder ( $h_a = 14\lambda$ ) zuverlässig auf der Achse der Falle in die Fallenebene geführt werden. Im Gegensatz zu konventionellen Bessel-Strahlen ist in der Ebene maximaler Intensität stabiler dreidimensionaler Einfang möglich. Zudem konnte bei Durchführung der Experimente festgestellt werden, dass der Einfangvorgang mit Hilfe von ausgedehnten Lichtfeldern im Vergleich zu konventionellen Lichtfeldern bei axial verschobenen Objekten schneller und zuverlässiger vonstatten geht. Aus diesen Gründen eignen sich axial ausgedehnte Lichtfelder sehr gut um den Einfang von Objekten, welche sich zwischen Mikroskopobjektiv und Falle befinden, zu automatisieren.

Um die verbesserten Einfangeigenschaften des axial ausgedehnten Lichtfelds genauer zu untersuchen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: In einer definierten Entfernung  $d$  von einem Objekt wurde eine Falle erzeugt (siehe Abbildung 5.8) und die Zeit gemessen, die das Objekt benötigt, in die Falle „gedrückt“ zu werden. Die Intensität des Einfanglasers wurde dabei so eingestellt, dass es ohne eingeschriebenes Axikon ( $h_a=0\lambda$ ) nicht bzw. nur sehr schwer möglich

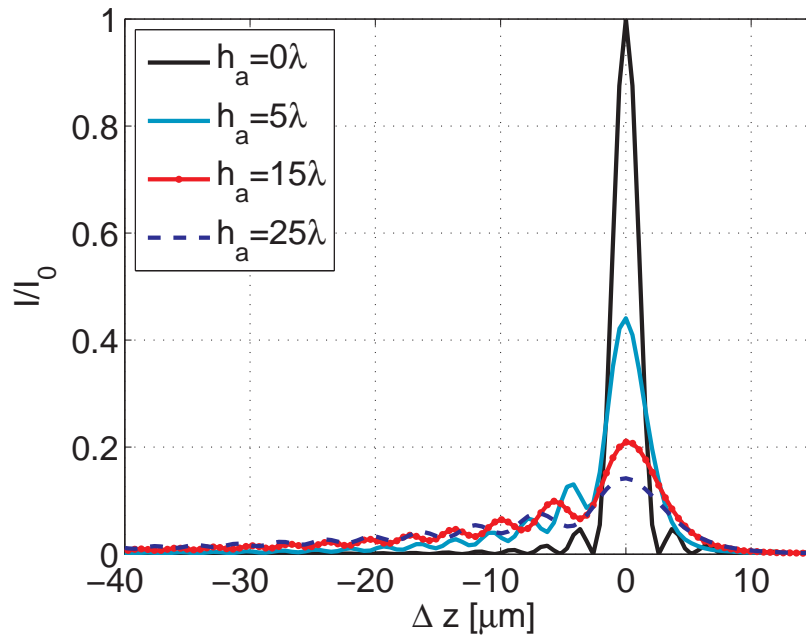
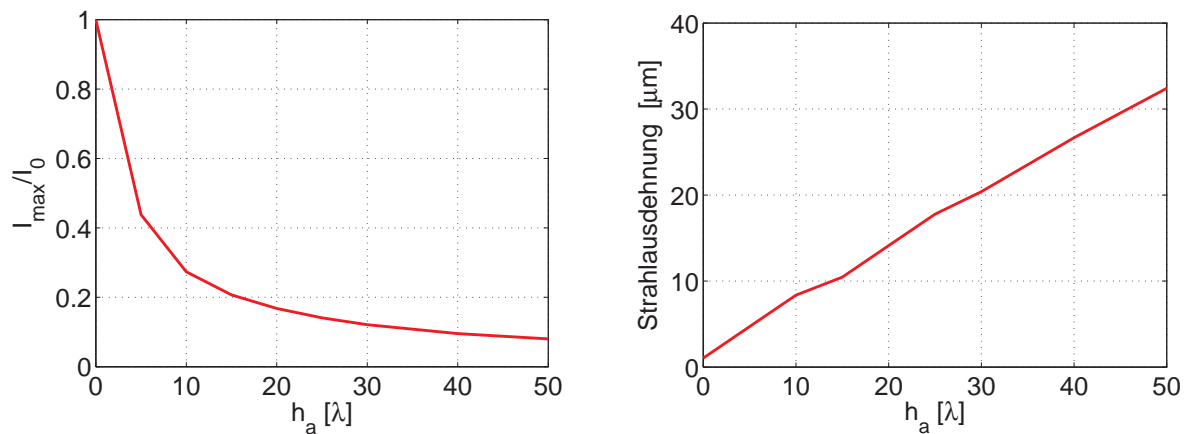


Abbildung 5.12.: Axialer Intensitätsschnitt verschiedener mit unterschiedlicher Axikonhöhe  $h_a$  erzeugter Strahlprofile. Die maximale Intensität nimmt mit zunehmender Axikonhöhe ab, während die Intensität sich axial ausdehnt. Der durch das Axikon entstehende Defokus wird hier nicht berücksichtigt.



(a) Abnahme der maximalen Intensität in Abhängigkeit der Axikonhöhe (b) axiale Ausdehnung der Intensität in Abhängigkeit der Axikonhöhe

Abbildung 5.13.: Eigenschaften des axial ausgedehnten Lichtfeld in Abhängigkeit der Axikonhöhe

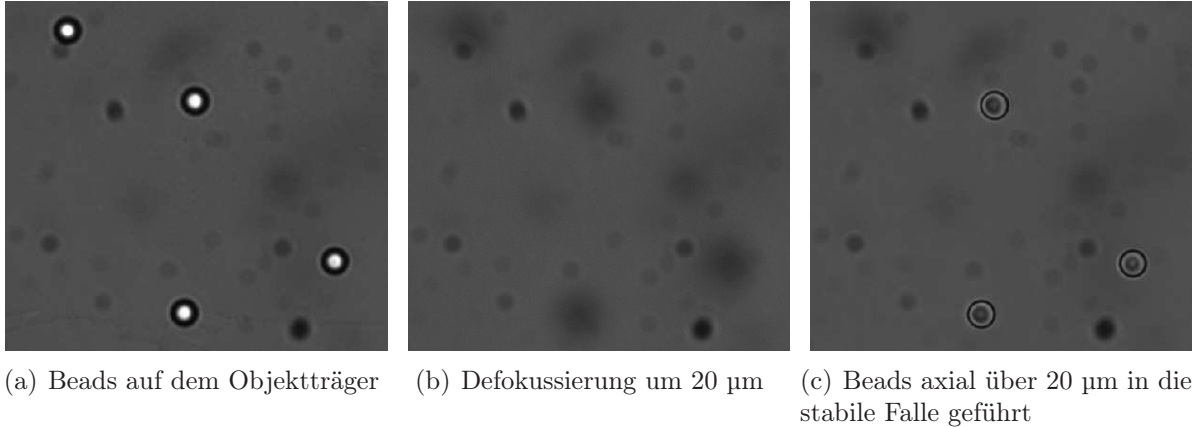


Abbildung 5.14.: Einfang von 3 Polystyrol-Beads mit Hilfe axial ausgedehnter Lichtfelder. Mit Hilfe dieser Lichtfelder ist es möglich, Objekte über einen verhältnismäßig großen Bereich (hier 20  $\mu\text{m}$  bei einem Objektdurchmesser von 3  $\mu\text{m}$ ) sicher einzufangen und sowohl axial als auch lateral in der Fokusebene einzufangen.

war, das Objekt einzufangen. Abbildung 5.15 zeigt die Einfangdauer eines Polystyrol-Beads mit dem Durchmesser von etwa 3  $\mu\text{m}$  in Abhängigkeit der zum Einfang verwendeten Axikonhöhe  $h_a$  für verschiedene Abstände  $d$ . Es wurden jeweils zwischen 10 und 20 Messungen pro Axikonhöhe durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Im Verlauf der Messungen konnte festgestellt werden, dass der Einfangvorgang mit eingeschriebenem Axikon schneller und zuverlässiger vonstatten geht als bei einem traditionellen Einfangfeld. Die Zuverlässigkeit zeigt sich in der Variation der Einfangdauer der einzelnen Messungen und somit in der Standardabweichung, welche ebenfalls in Abbildung 5.15 dargestellt ist. Trotz abnehmender maximaler Intensität kann der Einfangvorgang also deutlich verbessert werden.

Zudem konnte festgestellt werden, dass sich mit zunehmendem Abstand  $d$  das Minimum der Einfangdauer zu höheren Axikonhöhen hin verschiebt. Während für einen Abstand von  $d = 10 \mu\text{m}$  ein Axikon mit einer Höhe von etwa  $h_a = 4-10 \lambda$  vorteilhaft ist, ist für einen Abstand von  $d = 20 \mu\text{m}$  ein Axikon der Höhe  $h_a = 10-17 \lambda$  günstig. Erhöht man die Axikonhöhe über den günstigen Bereich hinaus, so nimmt die Einfangdauer wieder leicht zu, was auf einen Kompromiss zwischen Ausdehnung der Falle und Abnahme der Intensität schließen lässt. Die optimale Axikonhöhe ist somit vom axialen Abstand des Objektes zur Falle abhängig, weshalb das Axikon der Anwendung angepasst werden kann. Im Gegensatz zu konventionellen Bessel-Strahlen ist hier ein stabiler dreidimensionaler Einfang möglich. Diese Fallen eignen sich also sehr gut zur Realisierung des automatischen Einfangs. Es sind allerdings weitere, ausführliche Untersuchungen notwendig, um das axial ausgedehnte Lichtfeld an die jeweilige Aufgabenstellung anpassen zu können.



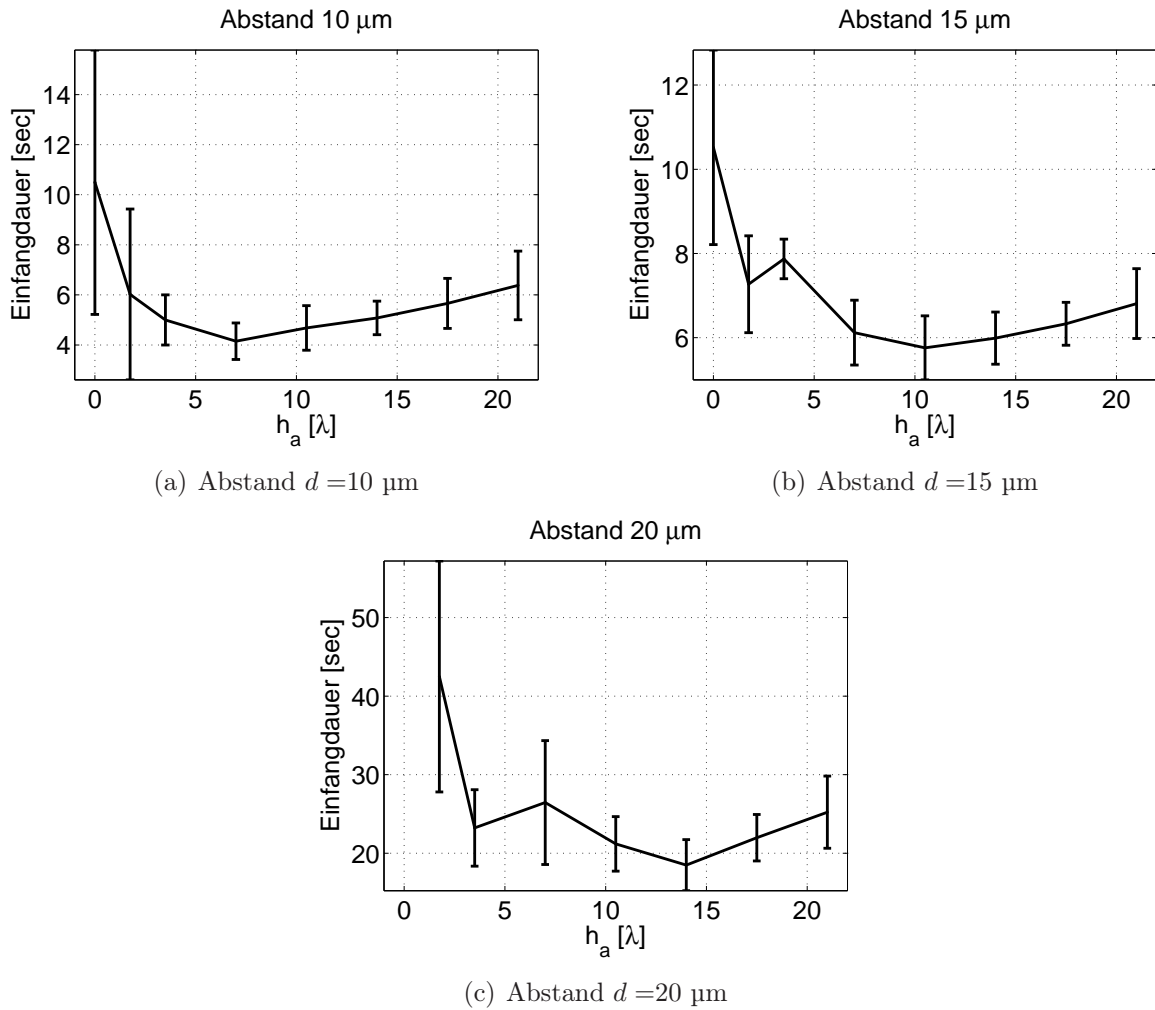


Abbildung 5.15.: Dauer bis zum Einfang eines  $3 \mu\text{m}$ -Objektes bei verschiedenen Abständen der Falle zum Objekt. Der axiale Einfangvorgang kann mit Hilfe eines Axikons beschleunigt werden. Zudem nimmt die Zuverlässigkeit des Einfangens zu. Die optimale Axikonhöhe hängt dabei vom axialen Abstand des Objekts zur Falle ab. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung bei der Messung der Einfangzeit dar.

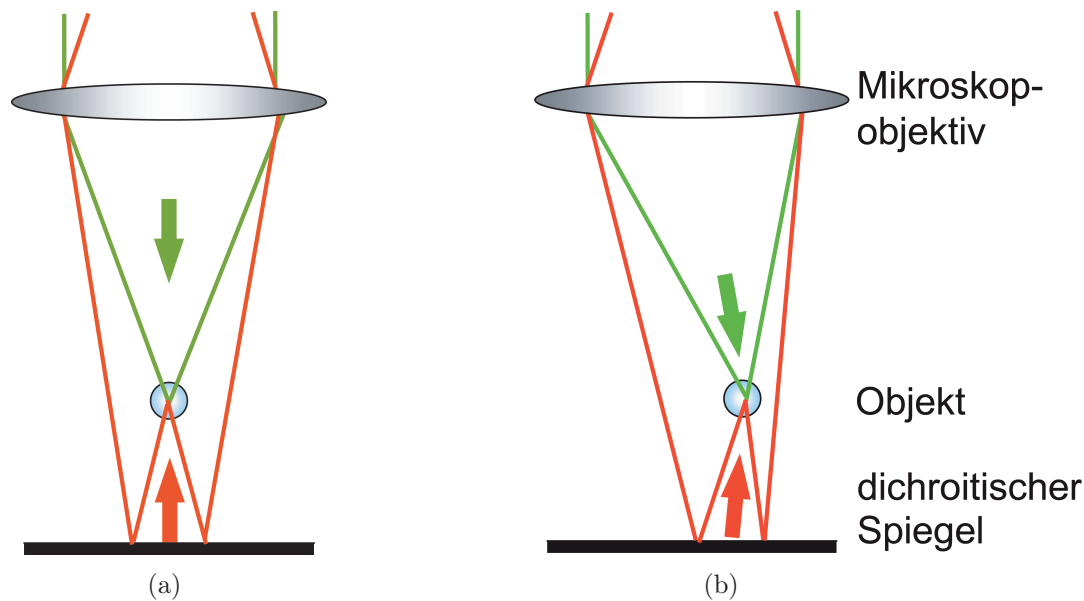


Abbildung 5.16.: Schema der Funktionsweise von holografischen Doppelfallen: Zwei holografisch defokussierte Fallen werden durch Reflexion an einer spiegelnden Fläche übereinandergelegt.

## 5.4. Holografische Doppelfallen

Der Einsatz von Einzelfallen in Kombination mit Mikrofluidik-Systemen bringt verschiedene Nachteile mit sich. Neben der hohen Leistungsdichte, die zur Schädigung biologischer Proben führen kann (siehe Abschnitt 5.2), führt die hohe numerische Apertur zu einem geringen Arbeitsabstand. Hier kann bereits die Deckelung der Mikrofluidik-Komponenten ein Problem darstellen. Zudem kann je nach geometrischen Abmaßen das Mikroskopobjektiv mit Zu- und Abflüssen der Mikrofluidik-Komponenten kollidieren.

Aus diesem Grund sind in Kombination mit Mikrofluidik-Systemen so genannte Doppelfallen vorteilhaft (siehe Abschnitt 3.4.1). Doppelfallen sind mit Objektiven mit geringer numerischer Apertur realisierbar. Dies führt aufgrund einer geringeren Lichtkonzentration zu einem geringeren Schädigungspotential der Zellen. Zudem kann mit höheren Arbeitsabständen gearbeitet werden. Andererseits sind sie jedoch gegenüber Einzelfallen mit einem erheblichen apparativen Mehraufwand verbunden.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Art von Doppelfallen vorgestellt, die mit Hilfe holografischer Pinzetten realisiert werden kann: so genannte holografische Doppelfallen (Twin Traps [187]). Diese neue Art der Doppelfallen lässt sich in ein Standard-Mikroskop mit einem einzigen MO implementieren und umgeht somit den Nachteil des hohen apparativen Aufwands herkömmlicher Doppelfallen.

Dabei werden mittels des SLM zwei unterschiedlich defokussierte Lichtfelder generiert, die zwei zueinander axial verschobene Fallen in der Objektebene erzeugen. Durch Reflexion einer der Fallen an einem dichroitischen Spiegel<sup>3</sup> oder an der dichroitischen Deckelung einer Mikrofluidik kommen die beiden Foki in derselben Position im Raum aufeinander zu liegen (siehe Abb. 5.16). Somit entstehen zwei gegenläufige konvergierende Kugelwellen. Die Justage der Fallen zueinander sowie die Positionierung erfolgen mit hoher Genauigkeit und ohne den Einsatz mechanischer Komponenten mittels Software. Zudem kann auf einfache Weise eine Aberrationskorrektur implementiert werden.

Holografische Doppelfallen erzielen bei Verwendung einer mittleren numerischen Apertur (in dieser Arbeit wurde der Einfang für ein Objektiv mit einer NA von 0,7 untersucht) optimale Einfangbedingungen, wenn die Foki exakt aufeinander liegen. Durch diese Geometrie nutzen sie axial nur die Gradientenkraft, da sich die Streukräfte der gegenläufigen Fallen genau auslöschen. Folglich hängt die axiale Einfangkraft von holografischen Doppelfallen von der NA des Objektivs ab. Konventionelle Doppelfallen hingegen nutzen das Gleichgewicht der Streukraft der gegenläufigen Fallen um axialen Einfang zu ermöglichen. Dies wird durch einen kleinen Abstand zwischen den Foki realisiert. Zwar wird auch bei konventionellen Doppelfallen die Streukraft komplett ausgelöscht, wenn die Foki genau aufeinander liegen. Da diese Doppelfallen jedoch meist mit sehr niedriger Apertur arbeiten, ist der axiale Gradient sehr gering. Somit ist in diesem Fall der axiale Abstand zwischen den Foki vorteilhaft, wie numerische Simulationen zeigen [159, 137].

---

<sup>3</sup>Ein dichroitischer Spiegel ist ein Interferenzfilter, der nur einen Teil des Lichtspektrums reflektiert, während der Rest transmittiert wird. Auf diese Weise lassen sich zwei Wellenlängen voneinander trennen. Vorteilhaft dabei ist, dass einerseits der Einfanglaser reflektiert wird und andererseits die Beleuchtung transmittiert wird, so dass eine Beobachtung ohne die störende hochintensive Laserfalle möglich ist.

### 5.4.1. Numerische Berechnung der Einfangkräfte von holografischen Doppelfallen

Im Folgenden werden die holografischen Doppelfallen einer genaueren theoretischen Betrachtung unterzogen. Im Besonderen wird der Einfluss des Fokusabstandes betrachtet, da dieser einen bedeutenden Unterschied zu konventionellen Doppelfallen darstellt. Zudem muss in der Praxis mit Aberrationen gerechnet werden (siehe hierzu Abschnitt 5.6.2). Insbesondere werden Aberrationen durch ein Missverhältnis des Brechungsindex<sup>4</sup> oder dicke Proben<sup>5</sup> eingeführt. Hierbei ist die sphärische Aberration dominant [154, 158, 90, 140]. Diese beiden Parameter werden verstärkt in den folgenden Untersuchungen des Einfangverhaltens betrachtet.

Zur Simulation von holografischen Doppelfallen wird in dieser Arbeit das Modell der geometrischen Optik angewandt, die bei  $\lambda = 1 \mu\text{m}$  für Objekte mit einem Durchmesser ab etwa  $5 \mu\text{m}$  gültig ist [180] (siehe Abschnitt 3.4.1).

Mit Hilfe geometrischer Optik ist es (im Vergleich zu wellenoptischen Modellen) relativ einfach, komplexe Systeme zu simulieren. Diese Simulationen können zum Beispiel Aberrationen [39] oder realitätsnahe Objekte wie Zellen mit nicht-sphärischer Form oder beliebigen Brechungsindexverteilungen beinhalten [23, 61].

Holografische Doppelfallen werden durch zwei gegenläufige Einzelfallen generiert. Durch die Interferenz der zwei Lichtfelder entsteht eine stehende Welle im gemeinsamen Fokus. Zemanek et al [184] untersuchten analytisch das Einfangverhalten von Gaußschen stehenden Wellen und fanden eine starke Abhängigkeit von Partikelgröße, Brechungsindex und Strahltaile. Obwohl keine Simulationen für große Partikel durchgeführt wurden, zeigte sich eine Tendenz für ansteigende Partikelgröße und abnehmende Strahltaile: Aufgrund des konkurrierenden Verhaltens der Gradientenkraft benachbarter Maxima dominiert die Gradientenkraft der Strahleinhüllen und zieht die Teilchen in Richtung der Strahltaile.

Zemanek et al. gelang es, größere Partikel mit einem Durchmesser von  $5 \mu\text{m}$  bei einer NA von 1,25 mit Hilfe einer stehenden Welle in der Nähe einer reflektierenden Oberfläche zu fangen [185]. Dabei fanden sie heraus, dass die stabilste Einfangposition jene Position ist, bei der das Partikel die meisten Minima der stehenden Welle einschließt. Basierend auf den veröffentlichten Ergebnissen ist jedoch nicht klar, ob die Existenz der stehenden Welle erforderlich ist bzw. wie sehr sie den axialen Einfang wirklich verbessert. Da Partikel dieser Größe eine große

---

<sup>4</sup>Insbesondere bei biologischen Objekten wird in der Mikroskopie häufig nicht das Immersionsmedium, für das das Mikroskopobjektiv optimiert wurde, verwendet, sondern beispielsweise das Nährmedium, in dem sich die Objekte befinden. Die Abweichung der Brechzahl des Immersionsmediums kann Aberrationen einführen.

<sup>5</sup>Biologische Objekte wie Gewebeproben oder lebende Objekte weisen eine gewisse Dicke auf, durch die die interessierende Ebene abgebildet wird.

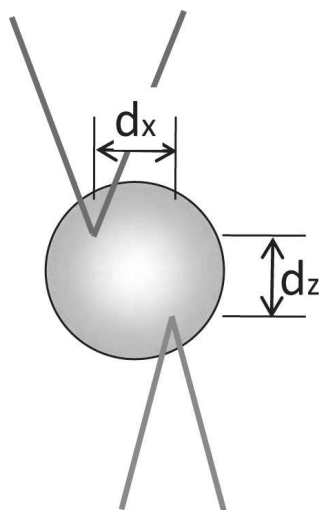


Abbildung 5.17.: Lateraler Fokusabstand  $d_x$  und axialer Fokusabstand  $d_z$  der gegenläufigen Fallen.

Anzahl von Maxima und Minima der stehenden Welle einschließen, ist anzunehmen, dass der Einfluss der stehenden Welle selbst sehr gering ist und der eigentliche Effekt auf die Auslöschung der Streukraft aufgrund der gegenläufigen Wellen zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 5.4). Dies steht in Übereinstimmung mit den konventionellen Doppelfallen, die durch inkohärente Überlagerung erzeugt werden [175, 24]. Aus diesem Grund kann die geometrische Optik für die Simulation von holografischen Doppelfallen bei großen Teilchen mit guter Näherung verwendet werden, obwohl der Einfluss der stehenden Welle hierbei nicht berücksichtigt wird.

Holografische Doppelfallen bestehen aus zwei gegenläufigen Einzelfallen und können somit durch die Überlagerung der Kraftfelder zweier Einzelfallen simuliert werden. Durch Beeinflussung des Intensitätsverhältnisses der gegenläufigen Fallen lässt sich bei konventionellen Doppelfallen die axiale Lage der Gleichgewichtsposition beeinflussen [135]. Da sich die axiale Lage und damit die der Gleichgewichtsposition der holografischen Doppelfallen einfach per Software steuern lässt, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und für die gegenläufigen Einzelfallen gleiche Intensität angenommen.

Die effektive NA der Einzelfallen ändert sich in Abhängigkeit des eingeschriebenen Defokus (siehe hierzu Abbildung 5.18). Der theoretisch maximal mögliche Defokus mit einem  $50\times/0,7$  Objektiv in der hier verwendeten Anordnung beträgt etwa  $\pm 286\ \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 5.4). Bei einem solch starken Defokus ändert sich die effektive NA, mit der die Strahlen fokussiert werden um bis zu 27%. Ein geringer Defokus von etwa  $100\ \mu\text{m}$  (Defokus einer Falle von  $100\ \mu\text{m}$  entspricht einer Position der Falle ca.  $50\ \mu\text{m}$  vom Spiegel entfernt<sup>6</sup>) führt nur zu geringen Ände-

<sup>6</sup>Liegt die vorwärtsgerichtete Falle in der Brennweite des MO, dann wird nur die gegenläufige Falle defokussiert. Aufgrund der Reflexion muss sie den Weg zwischen Fokusebene und Spiegel zweimal zurücklegen, weshalb der Abstand der Fallen zum Spiegel der halben Defokussierung entspricht.

rungen der NA von weniger als 3% (siehe Abb. 5.18). Gerade in Mikrofluidik-Anwendungen werden keine bedeutend höheren Abstände von der dichroitischen Mikrofluidik-Deckelung erwartet. Somit kann die jeweilige zur Generierung der gegenläufigen Fallen wirksame effektive NA näherungsweise als gleich angenommen werden.

Da aus diesen Gründen die gegenläufigen Einzelfallen als identisch in Intensität, Größe und NA angenommen wurden, konnten die Simulationen der holografischen Doppelfallen durch die Simulation der Einfangkraft von Einzelfallen durchgeführt werden, welche dann gespiegelt und miteinander kombiniert wurden. Es ist anzumerken, dass hierbei nicht die eigentliche Einfangkraft, sondern der zur Einfangkraft proportionale Wirkungsgrad  $Q_{ST}$  (oder auch Einfangeffizienz) einer Einzelfalle simuliert wurde, da dieser unabhängig von der eingesetzten Laserleistung, und damit besser vergleichbar ist (siehe Gleichung 3.23). Die Einfangeffizienz der holografischen Doppelfallen  $Q_{TT}$  kann also auf folgende Weise berechnet werden:

$$Q_{TT}(x, y, z) = Q_{ST}(x, y, z)/2 + Q_{ST}(x + d_x, y + d_y, -z + d_z)/2, \quad (5.2)$$

wobei  $d_x$  und  $d_y$  der laterale Abstand und  $d_z$  der axiale Abstand zwischen den Foki sind (siehe hierzu Abbildung 5.17). Daraus ergeben sich die laterale Einfangeffizienz  $Q_x$ , bzw.  $Q_y$  sowie die axiale Einfangeffizienz  $Q_z$ :

$$Q_x = Q_{TT}(x, 0, 0) \quad (5.3)$$

$$Q_y = Q_{TT}(0, y, 0) \quad (5.4)$$

$$Q_z = Q_{TT}(0, 0, z) \quad (5.5)$$

Beim Vorhandensein von Aberrationen wurde die Fokusposition durch Optimierung im sequentiellen Modus von Zemax gefunden. Die Meritfunktion wurde dabei so gewählt, dass bei der Optimierung der kleinste Spotradius (Methode zur Minimierung der Fehlerquadrate) gefunden wurde.

### Simulation der holografischen Doppelfallen basierend auf geometrischer Optik

Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 ausgeführt, werden optische Kräfte in zwei Komponenten aufgeteilt: die Streukraft und die Gradientenkraft. Die Gradientenkraft zieht ein Objekt, das einen höheren Brechungsindex als das umgebende Medium hat, in Richtung höchster Intensität. Die Streukraft hingegen drückt das Partikel in Ausbreitungsrichtung des Lichts aus der Falle heraus. Um stabilen Einfang zu erzielen, muss die Gradientenkraft größer als die Streukraft sein.

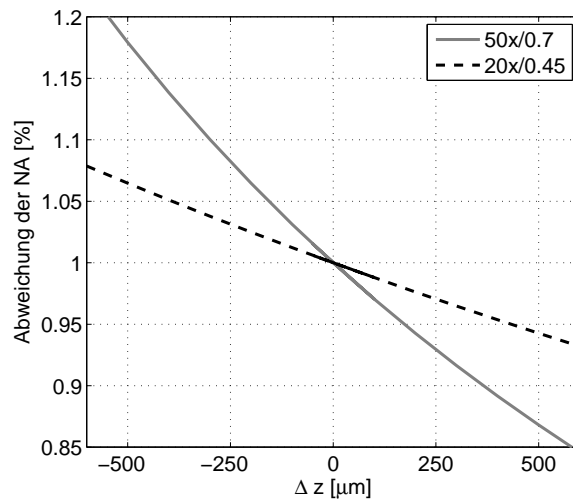


Abbildung 5.18.: Abhängigkeit der effektiven numerischen Apertur vom induzierten Defokus für zwei verschiedene Mikroskopobjektive ( $50\times/0,7$  und  $20\times/0,45$ ).

Die Einfangkraft ist abhängig vom den Ein- und Austrittswinkeln der Strahlen sowie von Reflexions- und Transmissionskoeffizienten (siehe Abschnitt 3.4.1). Im Fall einer analytischen Lösung muss diese für jeden einzelnen Eingangsstrahl gefunden werden und über die einzelnen Strahlen integriert werden, um die Einfangeffizienz der Falle zu finden [143].

Eine höhere Flexibilität ermöglicht die Anwendung eines Strahldurchrechnungsprogramms wie Zemax. Die Strahldurchrechnung durch das System erfolgt hierbei für jeden einzelnen Eingangsstrahl ohne die Lösung analytischer Formeln. Auf diese Weise ist es möglich, auf einfache Weise im Rahmen der geometrischen Optik komplexe Einfangsysteme zu modellieren, die zum Beispiel beliebige Lichtfelder oder Objektformen und Indexverteilungen berücksichtigen.

**Modellierung der Einzelfallen in Zemax:** Die Strahldurchrechnung wurde im nicht-sequentiellen Modus durchgeführt, um Mehrfachreflexionen zu berücksichtigen. Abbildung 5.19 zeigt exemplarisch eine aberrierte Einzelfalle inklusive der auftretenden Mehrfachreflexionen (zu erkennen an den seitlich austretenden Strahlen). Die Durchrechnung jedes einzelnen Strahls und seiner Verästelungen wird in einer Strahldatenbank gespeichert und mit Hilfe von Matlab analysiert. Die Impulsänderung eines (ohne Verluste durch ein Objekt transmittierten) Strahls basiert auf der Richtungsänderung des Lichtstrahls  $\vec{k}_{out} - \vec{k}_{in}$  (siehe Abbildung 3.6). In der vorliegenden Simulation werden Mehrfachreflexionen berücksichtigt, wodurch der einfallende Strahl  $m$  mit der Intensität  $I_m$  in eine bestimmte Anzahl  $l_m$  von Ästen mit jeweils der Intensität  $I_{l_m}$  aufgeteilt wird. Aus diesem Grund wird bei der Berechnung der wirkenden Kraft (Summe aller Impulsänderungen) der Einheitsvektor (normierte Richtungsvektor) des einfallenden (*in*) bzw. ausfallenden (*out*) Strahls mit seiner jeweiligen Intensität gewichtet. Mit Hilfe

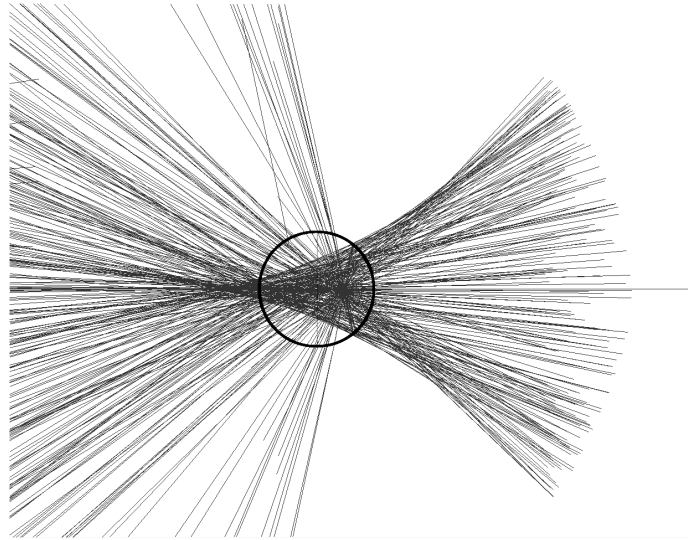


Abbildung 5.19.: Exemplarische Strahldurchrechnung einer Einzelfalle mit sphärischer Aberration unter Berücksichtigung von Mehrfachreflexionen in Zemax.

von Gleichung 3.23 lässt sich damit die von der Laserleistung unabhängige Einfangeffizienz  $Q$  aus der Kraft  $F$  bestimmen:

$$\vec{F} = \frac{n_M}{c} \cdot \sum_1^m \sum_1^{l_m} \left( \left( \frac{\vec{k}}{|k|} \right)_{l_m}^{out} \cdot dI_{l_m} \right) - \sum_1^m \left( \left( \frac{\vec{k}}{|k|} \right)_m^{in} \cdot dI_m \right). \quad (5.6)$$

Die dreidimensionale Kraft, die auf ein Partikel wirkt, kann ermittelt werden, indem für jede Partikelposition (relativ zur Falle) eine Strahldurchrechnung durchgeführt wird. Um Berechnungszeit einzusparen, besteht im Fall von achsensymmetrischen Fallen die Möglichkeit, die axiale Position der Falle nur in einem Quadranten (positive x und y- Koordinaten) zu variieren. Die Lichtquelle wurde als homogen über die Eintrittspupille angenommen. Polarisationsseffekte wurden nicht berücksichtigt, da diese bei einer mittleren NA von 0,7 (für welche die folgenden Simulationen durchgeführt wurden) sehr gering sind. Grundsätzlich sind mit dieser Methode der Kraftsimulation jedoch beliebige Lichtverteilungen und auch Polarisationsseffekte modellierbar.

Für jede einzelne Strahldurchrechnung wurden 300 Strahlen verwendet, die zufällig über die gesamte Eintrittspupille verteilt waren. Um sicherzustellen, dass diese limitierte Anzahl der Strahlen ausreicht, wurden die Ergebnisse mit einer Strahldurchrechnung von 10.000 Strahlen für ein 10  $\mu\text{m}$  Objekt verglichen. Die Abweichung der maximalen Effizienz<sup>7</sup>  $Q_{esc}$  liegt hier bei etwa 4%, während die Abweichung der Fallensteifheit<sup>8</sup>  $\alpha$  nahezu unbedeutend ist.

<sup>7</sup>proportional zu der Kraft, die benötigt wird, um das eingefangene Objekt aus der Falle zu entfernen

<sup>8</sup>definiert durch die Steigung der Effizienzkurve im Gleichgewichtspunkt, vgl. Abschnitt 3.4.1



**Modellierungs-Parameter:** Der Aufbau wurde entsprechend typischer Einfangbedingungen in der Praxis modelliert. Dazu wurde eine homogene ebene Welle mit einer Wellenlänge von  $1,064 \mu\text{m}$  mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektivs mit einer NA von 0,7 fokussiert. Als Objekt diente eine Sphäre mit einem Durchmesser von  $2r_O = 10 \mu\text{m}$  und einem Brechungsindex von  $n_O=1,4$  (der Brechungsindex von Zellen liegt typischerweise zwischen 1,3 und 1,5, kann aber in Extremfällen bis zu 1,7 betragen [154, 15]). Als Umgebungsmedium wurde Wasser eingesetzt ( $n_M = 1,327$  bei  $\lambda=1,064 \mu\text{m}$ ).

Das in Zemax erstellte Modell gehorcht der Tangens-Bedingung. Da kommerziell erhältliche Mikroskopobjektive jedoch in aller Regel der Sinus-Bedingung gehorchen, wurde zusätzlich ein Apodisationsfaktor  $A$  auf die Intensität angewendet [157, 62]. Dieser ist gegeben durch:

$$A(\theta) = \cos^4(\theta), \quad (5.7)$$

wobei  $\theta$  der Einfallswinkel auf die optische Achse ist. Vor allem beim Einfang mit mittlerer bis großer NA hat dies einen großen Einfluss (siehe hierzu auch Anhang C.3).

**Modellierung von Aberrationen:** Eine typische Ursache für Aberrationen ist das Verwenden eines Deckglases. Ist das Objektiv nicht für diesen Fall korrigiert, führt die planparallele Platte im fokussierten Strahl sphärische Aberration ein. Da der Einfluss der Aberrationen möglichst realitätsnah simuliert werden soll, wurde zur Modellierung der sphärischen Aberration ein Deckglas in den fokussierten Strahl gebracht und zur Änderung der Stärke der sphärischen Aberration verschiedene Immersionsmedien und Deckglas-Materialien eingesetzt. Die Stärke der Aberrationen werden durch Zernikekoeffizienten (siehe Anhang B) beschrieben. Ein Standard-Deckglas der Dicke  $170 \mu\text{m}$  (BK7,  $n=1,507$  bei  $\lambda=1,064 \mu\text{m}$ ) führt bei einem Objektiv mit der  $NA=0,7$  eine sphärische Aberration von  $Z_{SA}=0,1 \lambda$  ein.

## Diskussion der Simulationsergebnisse

Wichtige Parameter zur Charakterisierung einer Falle sind zum einen die Fallensteifheit  $\alpha$  (siehe Abschnitt 3.4.1) und zum anderen die maximale Effizienz  $Q_{esc}$ . Die Fallensteifheit wird ermittelt aus der Steigung der Kraftkurve (Kraft aufgetragen über die Objektposition). Die maximale Effizienz  $Q_{esc}$  ist proportional zur Fluchtkraft  $F_{esc}$ , die benötigt wird, um das eingefangene Objekt aus der Falle zu entfernen, und entspricht betragsmäßig dem Maximum der Einfangeffizienz [39].

Abbildung 5.20 zeigt die axiale Einfangeffizienz  $Q_z$  eines MOs mit einer NA von 0,7. Die gestrichelte Linie zeigt die Einfangeffizienz einer Einzelfalle. Die axiale Effizienz (und damit auch die

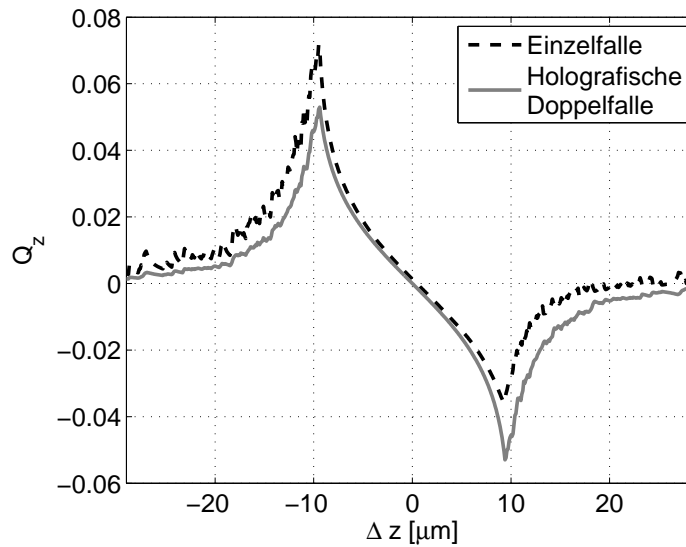


Abbildung 5.20.: Vergleich axialer Einfangeffizienz von Einzelfallen und holografischen Doppelfallen bei gleicher Gesamtintensität bei einer NA von 0,7. Die maximale axiale Effizienz in vorwärts gerichteter Richtung wird für holografische Doppelfallen deutlich verbessert. Eine axial symmetrische Falle kann mit Hilfe von holografischen Doppelfallen realisiert werden.

Kraft) ist unsymmetrisch und zeigt eine starke Tendenz, das Partikel in positiver  $z$ -Richtung aus der Falle zu drücken. Ursache hierfür ist die vorwärts wirkende Streukraft: Befindet sich das Objekt in negativer  $z$ -Richtung und damit vor der Falle, so bewirken sowohl Gradienten- als auch Streukraft den Einfang. Befindet sich das Objekt jedoch in positiver  $z$ -Richtung und damit hinter der Falle, so wirkt die Streukraft der Gradientenkraft entgegen. Da der Anteil der Gradientenkraft mit abnehmender numerischer Apertur aufgrund des reduzierten Intensitätsgradienten abnimmt, wird der Einfluss der Streukraft und somit auch die Unsymmetrie stärker. Der Einsatz von holografischen Doppelfallen hingegen führt unabhängig von der numerischen Apertur zu einer symmetrischen axialen Einfangkraft (Abb. 5.20, durchgezogene Linie), da die Streukraft bei richtiger Justage ( $d_z = 0$ ) vollständig ausgelöscht wird. Vergleicht man dies mit einer Einzelfalle gleicher Gesamtintensität, so führen holografische Doppelfallen zu einer Verbesserung der maximalen axialen Einfangeffizienz in  $+z$ -Richtung um ca. 50% (1,48-fach im Vergleich zu einer Einzelfalle). Mit abnehmender numerischer Apertur steigt diese Verbesserung der maximalen axialen Einfangeffizienz in  $+z$ -Richtung an. Beispielsweise führen holografische Doppelfallen bei einer NA von 0,45 zu mehr als einer Verdopplung der maximalen axialen Einfangeffizienz (2,13-fach, siehe [188]).

Abbildung 5.21(a) zeigt die axiale Einfangeffizienz  $Q_z$  einer Einzelfalle unter Einfluss verschieden starker sphärischer Aberration. Die Fallensteifigkeit  $\alpha$  wird durch mäßig starke Aberration leicht erhöht. Dieses Verhalten konnte ebenfalls von Fällman et. al. [39] für eine numerische Apertur von kleiner als 1,0 gefunden werden. Jedoch nimmt mit zunehmender sphärischer

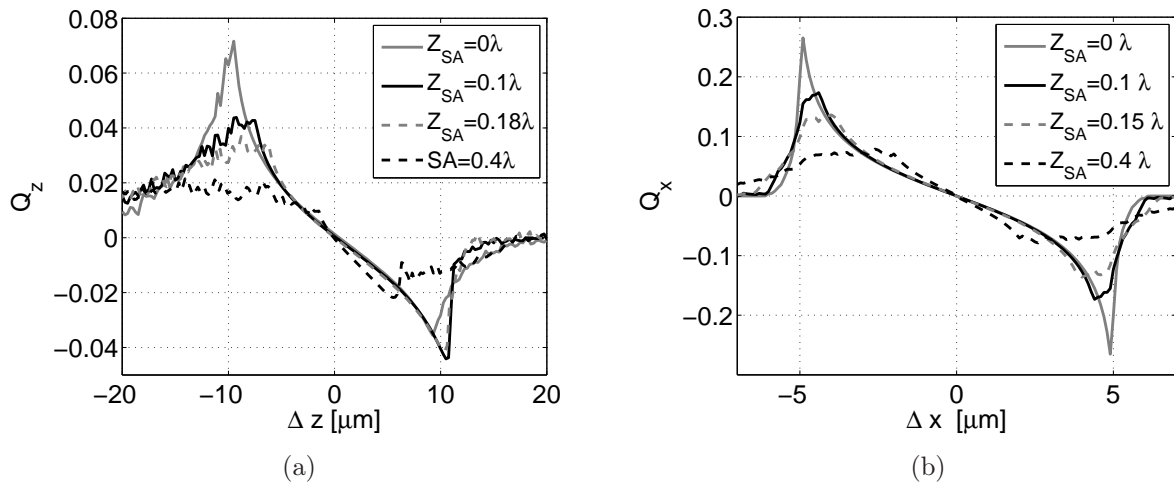


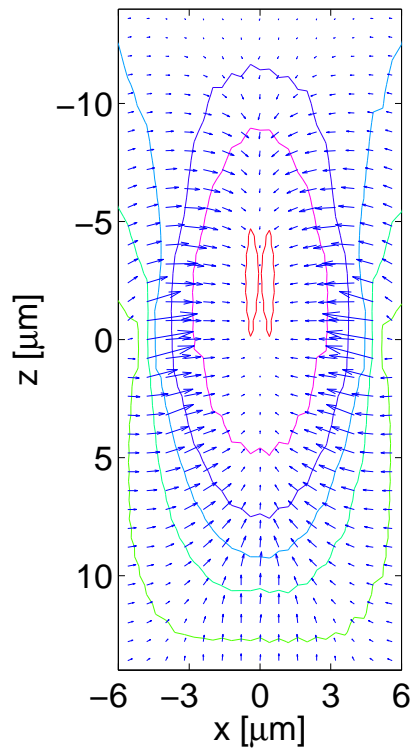
Abbildung 5.21.: Laterale und axiale Einfangeffizienz einer Einzelfalle unter dem Einfluss verschieden starker sphärischer Aberration. Bei achssymmetrischen Fällen gleicht die laterale Effizienz von Einzelfallen der von holografischen Doppelfallen.

Aberration die maximale Effizienz in negativer axialer Richtung stark ab. In positiver axialer Richtung erreicht die maximale Effizienz ein Maximum bei einer sphärischen Aberration von  $Z_{SA} \approx 0,1 \lambda$ . Die Gleichgewichtsposition des Objekts verschiebt sich axial durch Verschiebung des Fokus beim Einführen von sphärischer Aberration. Zum besseren Vergleich der Kurven zeigt Abbildung 5.21(a) die Einfangeffizienz relativ zum geometrischen Fokus (gefunden durch Optimierung in Zemax).

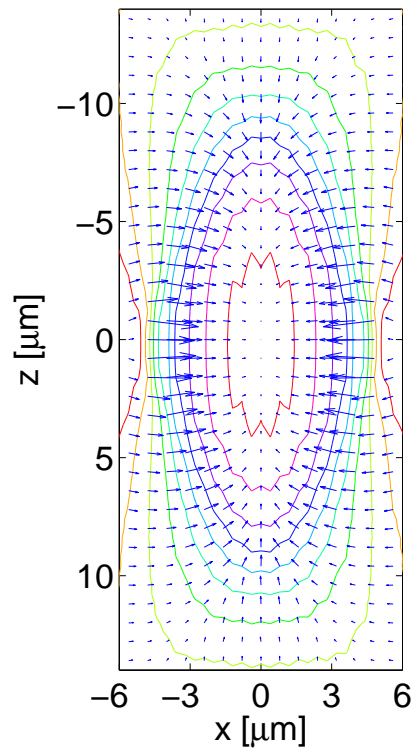
Abbildung 5.21(b) zeigt die laterale Einfangeffizienz  $Q_x$  unter dem Einfluss verschieden starker sphärischer Aberrationen. Wie bereits beim axialen Einfang festgestellt werden konnte, wird auch beim lateralen Einfang bei geringer sphärischer Aberration nur die maximale Effizienz, nicht jedoch die Kraftkonstante beeinflusst. Es ist anzumerken, dass Abbildung 5.21(b) gleichzeitig die laterale Einfangeffizienz von holografischen Doppelfallen zeigt, da diese denen von Einzelfallen gleicht.

Abbildung 5.22 zeigt die Einfangeffizienz- bzw. das Kraftfeld einer Einzelfalle (Abb. 5.22(a)) bzw. verschiedener nicht-aberrierter holografischer Doppelfallen (Abb. 5.22(b)–5.22(e)) mit einer NA von 0,7. Die Höhenlinien stellen das Einfangpotential (siehe Abschnitt 3.4.1) dar. Kleine Unstetigkeiten der Höhenlinien sind auf numerische Artefakte des einfachen numerischen Integrationsalgorithmus zurückzuführen.

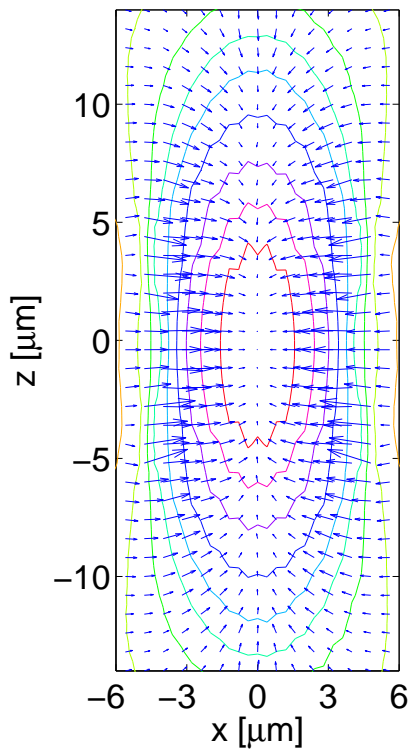
Abbildung 5.22(b) stellt die Einfangeffizienz einer holografischen Doppelfalle ohne Fokusabstand ( $d_z=0$ ) dar. Es zeigt sich, dass – wie für mittlere NA erwartet – die laterale Einfangeffizienz deutlich stärker ist als die axiale Einfangeffizienz. Es ist zu bemerken, dass die laterale Einfangeffizienz im Falle von guter Justage und nicht-aberrierten Fällen bei holografischen



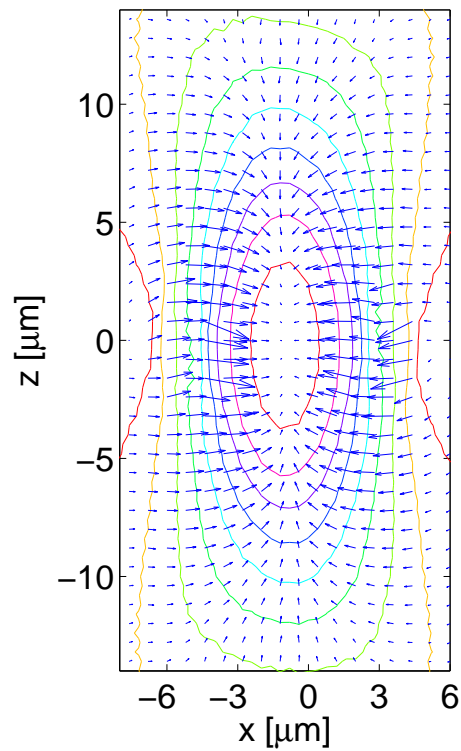
(a) Einzelfalle



(b) Doppelfalle  $d_z=0 \mu\text{m}$



(c) Doppelfalle  $d_z=4,0 \mu\text{m}$



(d) Doppelfalle  $d_x=2,0 \mu\text{m}, d_z=0 \mu\text{m}$

Abbildung 5.22.:  $x/z$ -Ebene einer Einzelfalle (a) sowie einer holografischen Doppelfalle ohne (b) und mit (c) Fokusabstand  $d_z$ . Die Pfeillänge sowie die Dichte der Konturlinien repräsentiert die Stärke der Kraft.

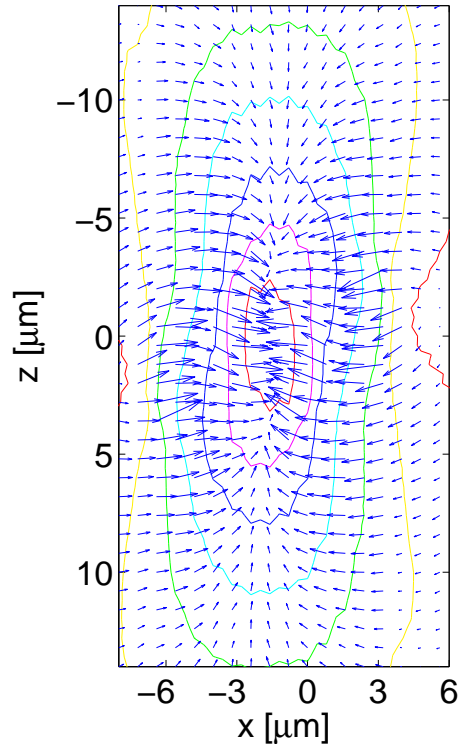
(e) Doppelfalle  $d_x=3,2 \mu\text{m}$ ,  $d_z=1,6 \mu\text{m}$ 

Abbildung 5.22.:  $x/z$ -Ebene einer holografischen Doppelfalle mit lateraler Verschiebung  $d_x = 2 \mu\text{m}$  (a) sowie lateraler und axialer Verschiebung ( $d_x = 3,2 \mu\text{m}$  und  $d_z = 1,6 \mu\text{m}$ ). Laterale Verschiebungen führen zu einer unsymmetrischen Falle und können somit zu einem instabilen Einfang führen. Die Pfeillänge sowie die Dichte der Konturlinien repräsentiert die Stärke der Kraft.

Doppelfallen mit der von Einzelfallen übereinstimmt. Das axiale Potential jedoch wird aufgrund der holografischen Doppelfallen symmetrisch und ermöglicht dadurch stabilen axialen Einfang. Zum Vergleich zeigt Abb. 5.22(a) die unsymmetrische Einfangeffizienz einer Einzelfalle.

Abbildung 5.22(c) und 5.22(d) zeigen dejustierte holografische Doppelfallen mit einem axialen Fokusabstand von  $d_z = 4 \mu\text{m}$  bzw. einem lateralen Fokusabstand von  $d_x = 2,0 \mu\text{m}$ . Während eine axiale Dejustage von  $d_z = 4 \mu\text{m}$  lediglich eine Verringerung von lateraler und axialer Einfangeffizienz (siehe auch Abb. 5.23) zur Folge hat, reagieren holografische Doppelfallen deutlich empfindlicher auf laterale Dejustage. Bereits eine Dejustage um  $d_x = 2,0 \mu\text{m}$  bewirkt eine starke Asymmetrie, die zur Instabilität der Falle beiträgt. Dies war zu erwarten, da der Spotradius weniger als  $1 \mu\text{m}$  beträgt. Fallen, bei denen sowohl eine starke laterale als auch axiale Verschiebung vorliegt (Abb. 5.22(e)), sind nicht mehr zum Einfang geeignet.

Abbildung 5.23 zeigt die maximale axiale Einfangeffizienz  $Q_{esc}$  und die axiale Kraftkonstante  $\alpha$  in Abhängigkeit des Fokusabstands  $d_z$ . Auffällig ist, dass kleine Fokusabstände von bis zu

$\pm 5 \mu\text{m}$  die Kraftkonstante  $\alpha$  nicht beeinflussen (Abb. 5.23(b), gestrichelte Linie). Die maximale Effizienz nimmt stark ab und konvergiert gegen die maximale Effizienz einer Einzelfalle (Abb. 5.23(a), gestrichelte Linie). Abbildungen 5.24(a) und (b) zeigen den Grund für dieses Verhalten: Ein positiver Fokusabstand  $d_z$  führt zu einer reduzierten Überlappung der Fallen, wobei ein negativer Fokusabstand zu einer ansteigenden Überlappung führt. In beiden Fällen wirkt die Streukraft der gegenläufigen Einzelfallen in jeweils entgegengesetzter Richtung und wird somit ausgelöscht. Im Falle eines optimierten Fokusabstandes (d.h. bei Abwesenheit von Aberrationen im Fall  $d_z=0 \mu\text{m}$ ) wird die Streukraft komplett ausgelöscht und die Gradientenkraft ist die einzige wirksame Kraftkomponente. Ein vorhandener Fokusabstand hingegen zerstört diese Balance. Wie bereits erwähnt führt ein kleiner Fokusabstand nur zu einer Reduzierung der maximalen Effizienz. Ein großer Fokusabstand hingegen führt neben der reduzierten maximalen Effizienz – in einem kleinen Bereich – zu einer stark ansteigenden Kraftkonstante (Abb. 5.24(a)). Je größer der Abstand, desto geringer ist der Einfluss der einzelnen Fallen aufeinander. Aus diesem Grund sinkt die maximale Effizienz auf das Ausmaß der maximalen Effizienz einer Einzelfalle. Ein zu großer Abstand führt – in beiden Fällen (positiv und negativ) – zu einer negativen Fallensteifheit  $\alpha$  in der Mitte zwischen beiden Einzelfallen und damit zu instabilem Einfang (Abb. 5.24(c)). Im Falle eines positiven Fokusabstands treten – neben dieser instabilen Einfangposition – zusätzlich zwei stabile Einfangpositionen mit relativ geringer Kraftkonstante auf, wie in Abbildung 5.24(c) zu erkennen ist (vergleiche hierzu [110]).

Dasselbe Verhalten wurde auch bei aberrierten holografischen Doppelfallen ermittelt. Aber im Gegensatz zum Fall ohne Aberrationen wurde in diesem Fall festgestellt, dass die maximale Effizienz mit Einführen einer gewissen Fokuseparation ansteigt (Abb. 5.23(a), durchgezogene Linie). Bei einer typischen sphärischen Aberration von  $Z_{SA} = 0,1 \lambda$  und den bereits genannten Parametern sollte ein Fokusabstand von etwa 1 bis  $1,6 \mu\text{m}$  eingeführt werden (siehe hierzu Abb. 5.23). Auf diese Weise kann der Verlust an maximaler Effizienz aufgrund der sphärischen Aberration von  $Z_{SA} = 0,1\lambda$  von 23% bei  $d_z=0$  auf weniger als 15% reduziert werden.

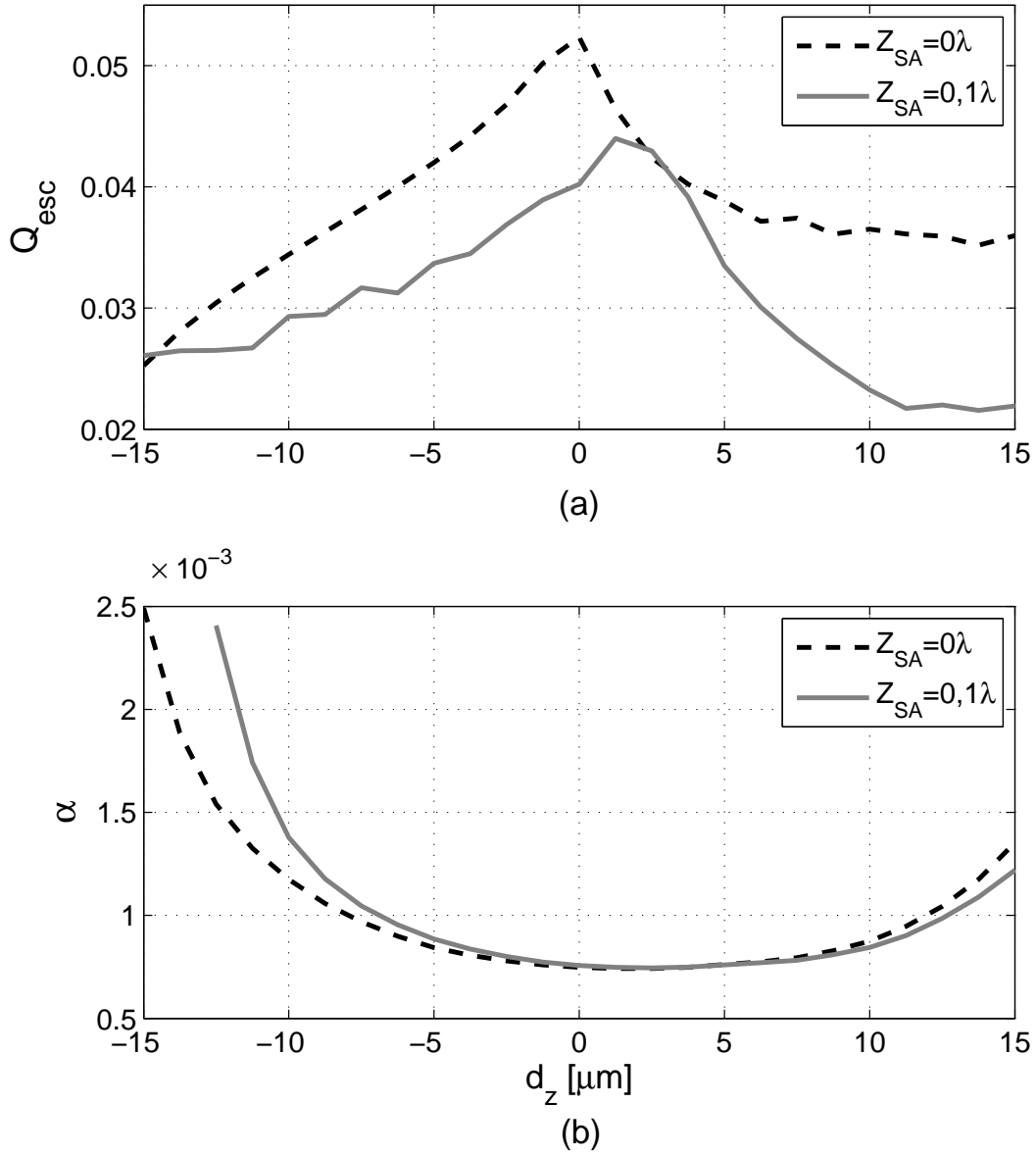


Abbildung 5.23.: (a) Axiale maximale Effizienz  $Q_{esc}$  und (b) axiale Fallensteifheit  $\alpha$  in Abhängigkeit des Fokusabstands  $d_z$  bei einer nicht-aberrierten Falle und einer Falle mit sphärischer Aberration  $Z_{SA} = 0,1\lambda$ .

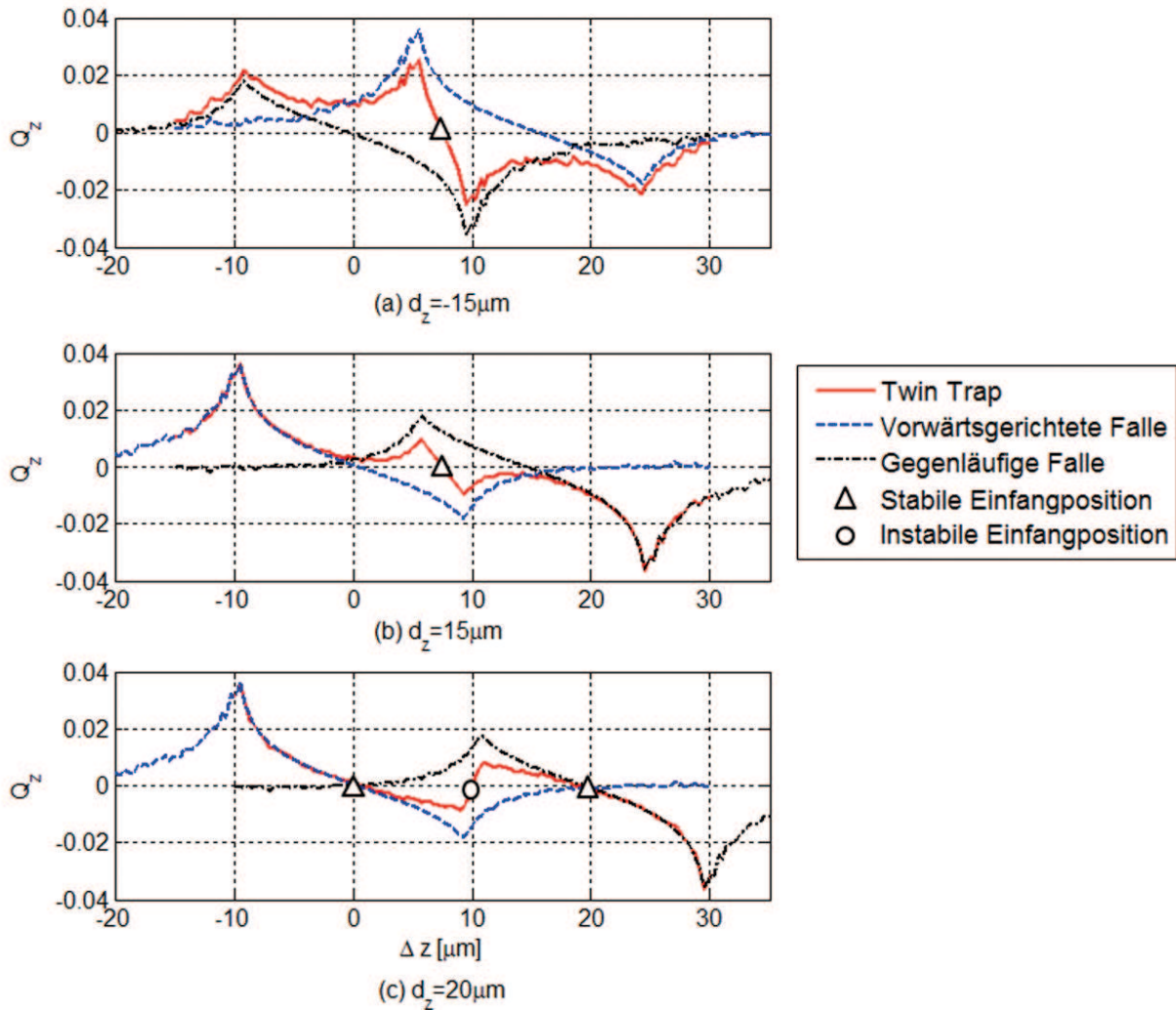


Abbildung 5.24.: Entstehung von holografischen Doppelfallen aus zwei gegenläufigen Fallen mit verschiedenen Fokusabständen ((a)  $d_z = -15 \mu\text{m}$ , (b)  $d_z = 15 \mu\text{m}$ , (c)  $d_z = 20 \mu\text{m}$ ). Bei zu großem positiven oder negativen Abstand steigt die Fallensteifigkeit (definiert als Steigung im Gleichgewichtspunkt) an, bis sie positiv wird. Dies führt einerseits zu instabilem Einfang am bisherigen Gleichgewichtspunkt, andererseits entstehen zusätzlich zwei stabile Einfangpositionen mit relativ geringer Kraftkonstante.



### 5.4.2. Experimentelle Verifikation

Zur Demonstration der Funktionsweise von holografischen Doppelfallen wurde das Zeiss Epiplan 50×/0,7 zur Rekonstruktion der Fallen eingesetzt.

Die Partikel wurden in einer selbstgefertigten Kammer in Wasser gelöst. Die Basis der Kammer bildete ein dichroitischer Spiegel. Der Abstand zum Deckglas (Dicke 170 µm) wurde mit zwei zusätzlichen Abstandshaltern (ebenfalls 170 µm) erzeugt.

Das Fourierhologramm zur Erzeugung von holografischen Doppelfallen kann aus einer einfachen Superposition zweier unterschiedlich stark defokussierter komplexer Amplituden berechnet werden (siehe Gleichung 3.3).

Gleichung 3.5 stellt schließlich die einfachste Methode dar, ein komplexes Lichtfeld  $H(x, y)$  in ein Phasenfeld zu konvertieren, das in das phase-only SLM eingeschrieben wird.

Abbildung 5.25 demonstriert die Funktionsfähigkeit der holografischen Doppelfallen. Ein Polystyrol-Bead mit einem Durchmesser von 3 µm wurde dreidimensional mit holografischen Doppelfallen eingefangen (Abb. 5.25(a)). Wird das Hologramm für die gegenläufige Falle ausgeschaltet, so wird das Bead aufgrund der starken vorwärts gerichteten Streukraft aus der verbleibenden Einzelfalle heraus (Abbildung 5.25(b)) gegen die Spiegelfläche gedrückt (Abbildung 5.25(c)). Der Abstand der holografischen Doppelfallen zur Spiegelfläche betrug bei diesem Experiment ca. 25 µm.

Wie bereits in den Simulationen festgestellt werden konnte, erfordert der erfolgreiche Einfang mit holografischen Doppelfallen eine hochgenaue Justage der Fallen zueinander. Hierzu wurden die Fallen unabhängig voneinander lateral justiert sowie deren Aberrationen korrigiert (iterativ per manueller Einstellung der Zernikekoeffizienten in der Hologramm Software [130]). Die stabile Trappingposition wurde gefunden, indem ein Partikel mit Hilfe der Streukraft einer Einzelfalle nach oben geschoben wurde. Durch Nachfokussierung des Mikroskopobjektivs konnte das Partikel so lange nach oben befördert werden, bis die durch Reflexion entgegenlaufende zweite Falle das Partikel in einer stabilen Position fixiert.

Dieser Einfangprozess ist sehr aufwändig und erfordert – um in der Praxis anwendbar zu sein – eine Vereinfachung. Hierzu ist eine Automatisierung des Einfangvorgangs unabdingbar. Zudem kann, wie bereits erwähnt, die laterale und axiale Bewegung des Partikels mit hoher Genauigkeit durch Steuerung per Software erreicht werden. Sowohl die Automatisierung des Einfangprozesses als auch die Steuerung per Software setzt eine hochgenaue Kalibrierung von Fallenposition und Hologrammparametern voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein Verfahren zur dreidimensionalen Kalibrierung untersucht (siehe Abschnitt 5.6).

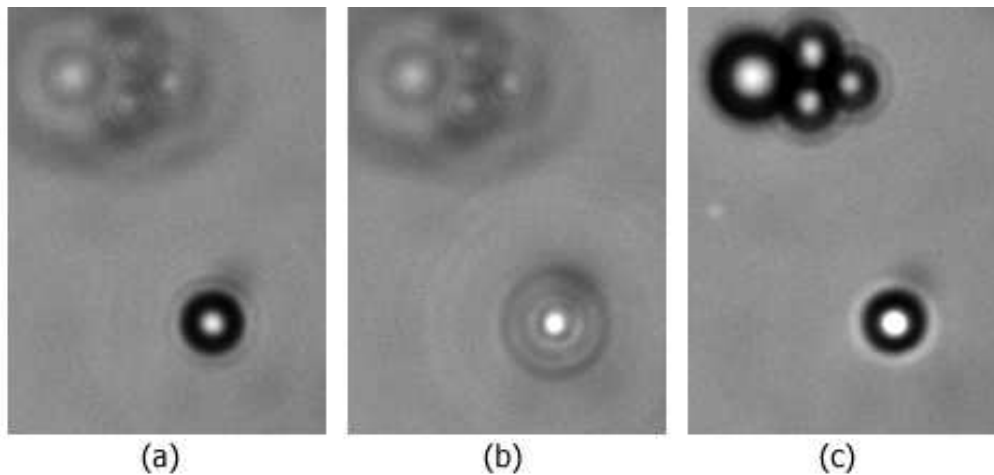


Abbildung 5.25.: Stabiler axialer Einfang mit einer holografischen Doppelfalle (a). Wird die gegenläufige Falle durch Änderung des Hologramms „ausgeschaltet“, so wird das Bead aufgrund der stark vorwärts gerichteten Streukraft aus dem Fokus hinaus (b) gegen den reflektierenden dichroitischen Spiegel gedrückt (c).

Ein Übergang zu geringerer NA könnte hierbei den Einfangprozess vereinfachen, da er geringere Anforderungen an die Genauigkeit der Kalibrierung und Positionierung der Fallen stellt.

Nach Abschluss der Arbeiten an den holografischen Doppelfallen wurde der Ansatz von der Arbeitsgruppe um M. Ritsch-Marte an der Medizinischen Universität Innsbruck übernommen und weiterverfolgt [127]. Die Arbeitsgruppe fand dabei heraus, dass eine weitere Reduktion der NA ( $NA=0,1-0,2$ ) den Einfangprozess vereinfacht. Aufgrund der geringen NA liegen die Spots dabei nicht exakt aufeinander, sondern ein Fallenabstand ist vorteilhaft. Dies steht in Übereinstimmung mit Arbeiten zu konventionellen Doppelfallen. Aufgrund der geringen NA und Vergrößerung der verwendeten Objektive und der somit sehr guten Telezentrie der Objektivs, ist dabei keine exakte dreidimensionale Kalibrierung mehr erforderlich. Die Arbeitsgruppe konnte so den Einfang und die Bewegung vieler Objekte gleichzeitig sowie den Einfang großer Objekte (bis zu  $100\ \mu\text{m}$ ) demonstrieren [165].

### 5.4.3. Holografisches $4\pi$ -Mikroskop

Neben der eigentlichen Funktion der oben erläuterten Anordnung als holografische Doppelfallen konnte eine starke Ähnlichkeit zu der Konfiguration eines  $4\pi$ -Mikroskops festgestellt werden. Bei einem  $4\pi$ -Mikroskop handelt es sich um ein konfokales (Fluoreszenz-) Mikroskop, das durch Beleuchtung bzw. Detektion mit zwei gegenüberliegenden Mikroskopobjektiven mit hoher numerischer Apertur nahezu einen Raumwinkel von  $4\pi$  abdeckt und damit eine Erhöhung der (in erster Linie) axialen Auflösung erreicht (nähere Erläuterung siehe unten). Ein solches Mikroskop ist mechanisch und optisch sehr aufwändig und aus diesem Grund auch sehr teuer.

Eine Realisierung mit Hilfe eines Lichtmodulators entsprechend dem Prinzip der holografischen Doppelfallen (siehe Abbildung 5.16) hat diverse Vorteile. Zum einen ist die Implementierung deutlich kostengünstiger, da nur ein einziges Mikroskopobjektiv benötigt wird und der zweite Strahlengang sowie die hochgenaue Justage mit Piezoelementen eingespart werden kann. Zum anderen ermöglicht ein solcher Aufbau die Korrektur von Aberrationen, die durch eine kostengünstigere Optik induziert werden sowie das Abscannen des Fokus mittels Software.

Zur Überprüfung, ob der Aufbau auch zur holografischen Generierung eines  $4\pi$ -Mikroskops geeignet ist, wurde der in Abschnitt 4.1 beschriebene Aufbau leicht modifiziert und erste Versuche durchgeführt. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es sich bei den folgenden Ausführungen um ein Nebenprodukt der holografischen Doppelfallen handelt, das nur im Ansatz untersucht wurde, um einen grundsätzlichen Nachweis der Funktionalität zu erbringen. Genaue Betrachtung und Bewertung bedürfen jedoch einer tiefergehenden Untersuchung.

#### Konventionelle $4\pi$ -Mikroskopie

Es werden drei verschiedene Arten von  $4\pi$ -Mikroskopen (Typ A, B und C) unterschieden [77, 79].

**Typ A:** In einem  $4\pi$  Typ-A Mikroskop wird der Anregungslaser in zwei Strahlengänge aufgeteilt, so dass die Probe von oben und unten kohärent beleuchtet wird. Aufgrund der hohen NA wird dabei unter dem (nahezu) gesamten Raumwinkel von  $4\pi$  beleuchtet. Durch die kohärente Beleuchtung von beiden Seiten entsteht eine stehende Welle (siehe Abbildung 5.26(b)), deren Amplitude von der Phasendifferenz der gegenläufigen Wellen zueinander abhängig ist (siehe Abbildung 5.26(c)). Die Strahlengänge müssen also so justiert werden, dass zum einen die Phasendifferenz eine maximale Amplitude liefert und zum anderen ein Wellenberg im Fokus liegt.

**Typ B:** Bei diesem Typ wird die Probe konventionell von einer Seite beleuchtet. Die Beobachtung der emittierten Strahlung erfolgt jedoch über zwei Mikroskopobjektive ober- und unterhalb der Probe, wobei die zwei Strahlengänge auf dem Detektor zur Interferenz gebracht werden. Dabei muss (aufgrund der sehr kurzen Kohärenz der emittierten Strahlung) die Wegdifferenz zwischen den Strahlengängen sehr gering sein. Sie wird so justiert, dass das Licht eines Punktes aus der Fokusebene konstruktiv auf dem Detektor interferiert. Die axiale Auflösung erhöht sich, da Licht von Objektteilen, die  $\lambda/4$  außerhalb der Fokusebene liegen, destruktiv auf dem Sensor interferiert.

**Typ C:** Typ C ist eine Kombination von Typ A und Typ B. Die Probe wird hierbei sowohl von beiden Seiten beleuchtet als auch beobachtet.

Die Anordnung holografischer Doppelfallen ermöglicht die Realisierung des  $4\pi$  Typ-A Mikroskops. Aus diesem Grunde wird im Folgenden hauptsächlich auf dessen Eigenschaften eingegangen.

**Auflösung:** In der Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Marker eingesetzt, um bestimmte Teile einer Zelle sichtbar zu machen. Bei Anregung mit einer geeigneten Wellenlänge  $\lambda_A$  emittiert das sogenannte Fluorophor Licht einer längeren (energieärmeren) Wellenlänge  $\lambda_E$ . Durch Herausfiltern der Anregungswellenlänge können somit ausschließlich die markierten Stellen<sup>9</sup> sichtbar gemacht werden.

In einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop wird die Probe nur von einer Seite beleuchtet (Anregungsspot siehe Abbildung 5.26(a)). Die laterale Auflösung ergibt sich dabei zu [164]

$$p_{lateral} = r_x = 0,61 \frac{\lambda_A}{NA} \quad (5.8)$$

und die axiale Auflösung zu [60]

$$p_{axial} = r_z = \pm 2 \frac{\lambda_A}{NA^2}. \quad (5.9)$$

Die Intensität der Beleuchtung hängt dabei quadratisch vom Abstand zum Fokus bzw. der NA ab. Im axialen Abstand von weniger als  $r_z$  ist im Normalfall noch genug Licht vorhanden, um entsprechend empfindliche Fluorophore anzuregen. Aus diesem Grund kann innerhalb des Schärfentiefebereichs des Mikroskops die Position des Fluorophors nicht aufgelöst werden.

Im Gegensatz dazu bildet sich bei einem  $4\pi$ (A) und (C) Mikroskop durch die beidseitige Beleuchtung eine stehende Welle aus (siehe Abbildung 5.26). Die Intensität fällt in jedem

---

<sup>9</sup>Durch Einsatz entsprechender Marker kann genau gesteuert werden, welche Funktionen oder Teile einer Zelle sichtbar gemacht werden sollen.

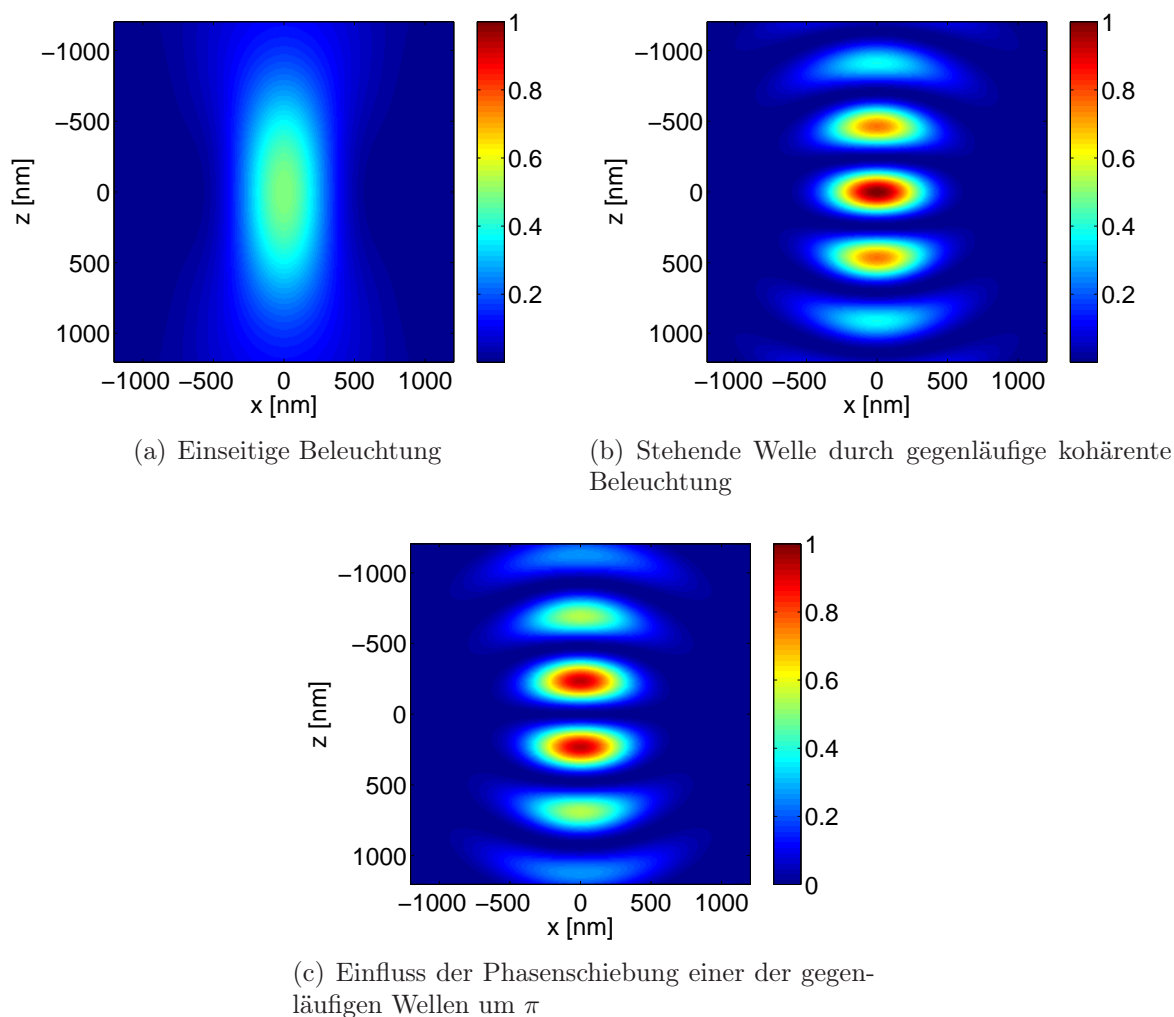


Abbildung 5.26.: Simulation der Ausbildung einer stehenden Welle durch gegenläufige kohärente Beleuchtung bei Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs mit  $NA=1,2$  und einer Wellenlänge von  $\lambda = 1,064 \mu\text{m}$ . Im Gegensatz zu einer einseitigen Beleuchtung wird deutlich an axialer Auflösung gewonnen. Die axialen Maxima können jedoch zu Doppeldeutigkeiten führen. Es wurden Gaußsche Strahlen zur Beleuchtung angenommen und Beugungseffekte vernachlässigt.

Wellenknoten auf ein Minimum ab. Eine Probe, die im Abstand  $r_z = \lambda_A/4$  von der Fokusebene entfernt ist, liegt genau in einem Wellenknoten und wird kein Licht emittieren. Somit ist die axiale Punktauflösung um den Faktor 4 bis 7 erhöht und man erreicht damit Auflösungen von bis zu 75 nm (FWHM<sup>10</sup>) [77, 78, 63].

**Nebenmaxima** Durch die stehende Welle entstehen axiale Nebenmaxima (siehe Abbildung 5.26(b)). Diese können bei der Bilderzeugung in einem  $4\pi(A)$  Mikroskop zu Doppeldeutigkeiten führen, da Fluorophore ebenfalls durch die Nebenmaxima angeregt werden. Es gibt hier verschiedene Ansätze, den Einfluss der Nebenmaxima zu verringern.

So ist der  $4\pi(C)$ -Aufbau gerade in dieser Beziehung vorteilhaft, da sich die Punktbildfunktion des Typ A und B so ergänzen, dass die Nebenmaxima deutlich reduziert werden. Diese Anordnung reagiert jedoch sehr empfindlich auf Phasenschiebungen, die durch die Probe verursacht werden. Da die Wellenlängen der Beleuchtung und Beobachtung unterschiedlich sind und aus diesem Grund unterschiedliche Phasenschiebungen entstehen, ist die Justage des Aufbaus stark von der Probe abhängig, so dass diese Anordnung in der Praxis selten eingesetzt wird [2].

Eine weit verbreitete Methode hingegen (da sie ohne zusätzlichen apparativen Aufwand betrieben werden kann) ist die so genannte Dekonvolution. Hier wird mittels Bildverarbeitung eine nachträgliche Entfaltung mit der als bekannt vorausgesetzten Punktbildfunktion durchgeführt [150, 151, 164].

Eine weitere, ebenfalls in der Praxis häufig eingesetzte Methode, ist die sogenannte Zwei-Photonen-Anregung (engl. two photon excitation) [76, 150]. Die notwendige Energie, um ein Fluorophor in einen angeregten Zustand zu versetzen, wird hierbei nicht (wie bei der konventionellen Fluoreszenzanregung) von einem Photon der Frequenz  $\nu = c/\lambda_A = \frac{\Delta E}{\hbar}$  aufgebracht, sondern durch zwei Photonen mit entsprechend halber Energie und folglich doppelter Wellenlänge. Durch die längere Wellenlänge liegen die Nebenmaxima weiter entfernt und die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen in einem entsprechend kurzen Zeitraum ein Fluorophor anregen, sinkt in den Nebenmaxima aufgrund der reduzierten Intensität deutlich ab. Ein weiterer Vorteil der längeren Wellenlänge ist, dass lebende Objekte deutlich weniger geschädigt werden. Es muss andererseits jedoch beachtet werden, dass sich bei dieser Methode auch die Größe des Hauptmaximums entsprechend verdoppelt.

---

<sup>10</sup>Halbwertsbreite, engl. full width at half maximum

**Nachteile des konventionellen  $4\pi$ -Mikroskops** Neben dem Auflösungs-vorteil birgt der  $4\pi$ -Aufbau jedoch auch Nachteile.

- Biologische Proben haben unterschiedliche Brechungsindizes, die auch innerhalb der Probe stark variieren können. Dadurch verschiebt sich die Position der Wellenbäuche der stehenden Welle. Die getrennte Auflösung zweier Punkte wird nicht beeinträchtigt, jedoch die Messung der absoluten Positionen.
- Die Konstruktion und Justage eines  $4\pi$ -Mikroskops ist sehr aufwändig. Mikroskopobjektive und optische Wege der Beleuchtung bzw. Abbildung müssen sehr genau aufeinander abgestimmt sein. Außerdem müssen sehr stabile (schwingungsarme, temperaturkonstante) Umgebungsbedingungen geschaffen werden.

Der hohe Aufwand in Produktion und Benutzung eines solchen Mikroskops stellt eine Hürde für die Verbreitung dieser Technik dar. Der einzige kommerzielle Hersteller dieser Art von Mikroskopen ist die Leica Microsystems GmbH, welche das Mikroskop unter der Produktbezeichnung Leica TCS 4Pi [2] vertreibt. Wegen der daraus resultierenden sehr hohen Anschaffungskosten sind weltweit nur wenige dieser Mikroskope im Einsatz.

### Realisierung des holografischen $4\pi$ -Mikroskops

Die Generierung der holografischen  $4\pi$ -Beleuchtung entspricht der Erzeugung der holografischen Doppelfallen. Ein Laserstrahl wird über den Lichtmodulator in das Mikroskop eingekoppelt. Durch Einschreiben eines entsprechenden Hologramms werden zwei zueinander defokussierte Lichtfelder erzeugt, wovon eines an einem Spiegel so reflektiert wird, dass die gegenläufigen Strahlen im selben Raumpunkt fokussiert werden (siehe hierzu auch Abbildung 5.16). Aufgrund der Kohärenz der gegenläufigen Strahlen entsteht dabei eine stehende Welle. Dieser Ansatz liefert eine Reihe von Vorteilen:

- Der zweite Strahlengang sowie das zweite Mikroskopobjektiv entfallen. Die Justage der Foki kann einfach über die Software eingestellt werden. Dadurch entfällt die aufwändige Mechanik komplett, wodurch auch die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit gesteigert wird.
- Mit Hilfe des SLMs können mehrere Doppelfoki gleichzeitig gebildet werden. Dadurch ist eine Parallelisierung des Scanvorgangs mittels Doppelfoki denkbar, wodurch dieser in deutlich kürzerer Zeit durchgeführt wird.
- Aberrationen, die durch (günstige) optische Komponenten eingeführt werden, können korrigiert werden.

- Es können nahezu beliebig geformte Lichtfelder generiert werden. So kann beispielsweise ein donut-förmiges Lichtfeld zur Realisierung einer STED Anregung<sup>11</sup> [80] zur Erhöhung der lateralen Auflösung wünschenswert sein.

**Versuchsaufbau** Für die ersten Versuche zum  $4\pi$ -Mikroskop wurde der bestehende Aufbau der holografischen Pinzette verwendet (siehe Abschnitt 4.1). Aufgrund der Anregung im kurzwelligigen und Emission im längerwelligen Bereich wurde jedoch zur Anregung ein Laser kürzerer Wellenlänge (HeNe-Laser,  $\lambda_A=633$  nm) so in den Strahlengang eingekoppelt, dass die holografische Pinzette weiterhin benutzt werden konnte. Die Kennlinie des SLM wurde für die Versuche an die neue Wellenlänge angepasst. Zur Beleuchtung und Beobachtung wurde aufgrund des relativ hohen Arbeitsabstands das  $50\times/0,7$  Objektiv verwendet. Grundsätzlich kann mit einem Objektiv mit höherer NA eine bessere Auflösung erreicht werden. Da es sich bei diesen Versuchen zunächst nur um einen Nachweis der grundsätzlichen Funktion handelte, wurde hier aufgrund der leichteren Handhabbarkeit der höhere Arbeitsabstand gegenüber der hohen Auflösung bevorzugt.

Die Fluoreszenzbeleuchtung des Mikroskops erfolgt standardmäßig über so genannte Reflektorwürfel (Punkt 9, Abbildung 4.1), die gleichzeitig Anregungs- und Emissionswellenlänge für vordefinierte Fluoreszenzstoffe trennen. Da hier jedoch die Einkopplung des Anregungslasers über den Seitenport (auf Höhe Punkt 6, Abbildung 4.1) erfolgt, können die Reflektoren nicht zur Filterung der Anregungswellenlänge verwendet werden. Deshalb muss ein entsprechender dichroitischer Filter vor der Kamera angebracht werden.

Die zwei gegenläufigen Strahlen werden wie die holografischen Doppelfallen ebenfalls mit Hilfe des Hologramms erzeugt. Hierbei werden zwei Hologramme so überlagert, dass ein Spot direkt und ein Spot nach Reflexion an einem dichroitischen Spiegel in der Fokusebene entsteht und diese das Objekt beidseitig beleuchten. Um die Maxima der stehenden Welle zu justieren kann die Phase eines der überlagerten Teil-Hologramme entsprechend geschoben werden, indem auf das Hologramm eine Konstante addiert wird.

Wird die stehende Welle über das Objekt gescannt, so muss beachtet werden, dass die gegenläufigen Strahlen unter einem bestimmten Winkel (abhängig vom Winkel der Auslenkung) interferieren. Auf diese Weise wird ein asymmetrischer Spot generiert, der zu einer Verfälschung des resultierenden Bildes führen kann. Entsprechende Simulationen zeigen hier jedoch eine relativ geringe Intensitätsabweichung von maximal 1% bei einem für diese Anwendung relevanten Objektiv  $40\times/1,2W$  und einem Auslenkwinkel von  $3,45^\circ$  (siehe Abbildung 5.27).

---

<sup>11</sup>engl. stimulated emission depletion. Hierbei wird die laterale Auflösung verbessert, indem eine angeregte Probe mit einem donut-förmigen Lichtfeld einer längeren Wellenlänge abgeregt wird. Nur der Teil der Probe, der sich im Zentrum des Donuts befindet, emittiert daraufhin Licht.



Hierbei wurde zudem beachtet, dass die gegenläufigen Strahlen unterschiedliche Winkel und unterschiedliche effektive NA besitzen. Problematisch an diesem Effekt ist, dass die Spotform abhängig von der Position und der Dicke des Probenhalters ist und damit einer genauen Kalibrierung bedarf. Dann kann der Effekt beispielsweise durch Dekonvolution ausgeglichen werden.

Wie bereits in Abschnitt 5.4.1 diskutiert, ist die effektive NA (und damit auch der Spotdurchmesser) der gegenläufigen Strahlen vom Defokus abhängig. Aus diesem Grund sollte der Defokus (und damit auch der Objektträger-Spiegel-Abstand) möglichst gering gewählt werden. Alternativ kann auch eine geringe NA gewählt werden, was sich wiederum negativ auf die Auflösung auswirkt. Die Verringerung der NA liegt bei dem in den Versuchen verwendeten Mikroskopobjektiv  $50\times/0,7$  und Abstand von ca.  $30\ \mu\text{m}$  vom Spiegel bei weniger als 1% (vgl. Abbildung 5.18).

**Versuche** Das  $4\pi$ -Mikroskop verbessert in erster Linie die axiale Auflösung und beeinflusst die laterale Auflösung nahezu nicht. Aus diesem Grund kann die Funktionsweise der Methode nur durch die Messung der axialen Auflösung und damit durch einen z-Scan nachgewiesen werden.

Grundsätzlich stehen zwei Möglichkeiten zur Realisierung eines z-Scans zur Verfügung: mittels Software und mechanisch. Eine Realisierung des z-Scans mittels Software hat den Vorteil, dass keine mechanische Veränderung benötigt wird. Diese Methode eignet sich jedoch nur für geringen Defokus, da im defokussierten Zustand nur ein kleiner Teil der Energie vom Objekt absorbiert (bzw. über Fluoreszenz emittiert) wird und damit eine Detektion der Emission nicht möglich ist.

Bei einer mechanischen Verstellung sind größere Bereiche scanbar, jedoch leidet die Reproduzierbarkeit. Beiden Methoden gemein ist jedoch, dass eine hochgenaue Kalibrierung des Hologramms sehr wichtig ist. Hier muss neben der exakten axialen und lateralen Position der Foki auch die Phase der Wellen zueinander kalibriert werden. Die in dieser Arbeit realisierte Kalibrierung (siehe Abschnitt 5.6.2), erfüllt diese Bedingungen nicht.

Aus diesem Grund wurde zunächst nur die Ausbildung einer stehenden Welle nachgewiesen. Dabei wurden Verschiebungen der Spotposition vermieden und nur die Phase der gegenläufigen Wellen zueinander verschoben. Dies bewirkt eine Verschiebung der Position von Wellenknoten bzw. -bergen (Abbildung 5.26(b) und 5.26(c)). Ein Bead, das sich in der stehenden Welle befindet, wird entsprechend mehr bzw. weniger angeregt.

Zur Erzeugung der stehenden Welle mit diesem Aufbau wurden die nullte und die erste Beugungsordnung verwendet. Auf diese Weise konnten zunächst zwei praktische Probleme umgan-

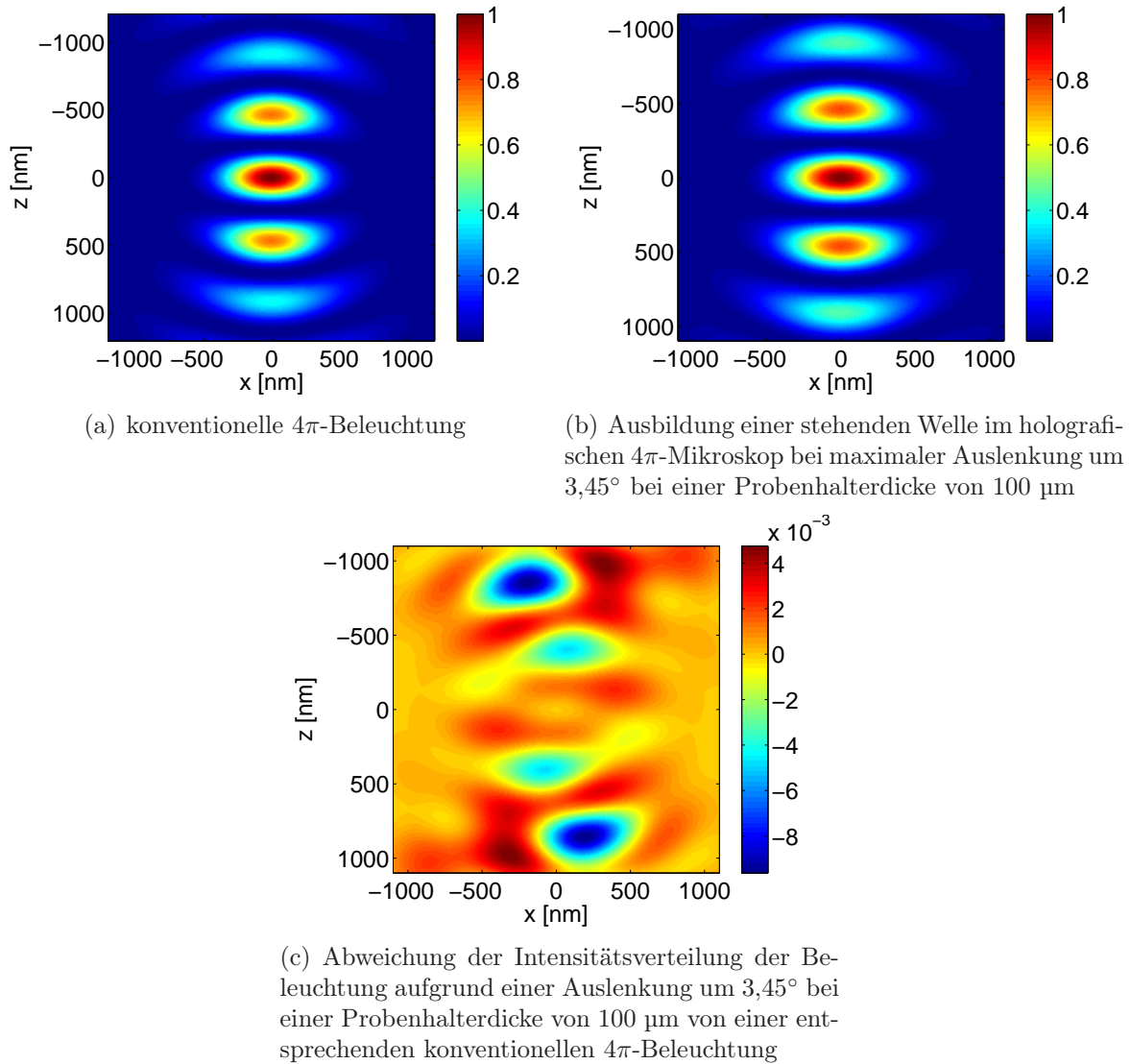


Abbildung 5.27.: Einfluss der veränderten Beleuchtungsbedingungen auf die Intensitätsverteilung im holografischen  $4\pi$ -Mikroskop aufgrund des veränderten Einfallswinkels (off-axis) und unterschiedlicher NA der gegenläufigen Wellen. Hier exemplarisch für den maximalen Auslenkwinkel von  $3,45^\circ$  (bzw.  $3,02^\circ$  für die gegenläufige Welle) bei Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs mit  $\text{NA}=1,2$  (bzw.  $\text{NA}=1,1$  gegenläufig) und einem Probenhalter der Dicke  $100\ \mu\text{m}$  bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 1,064\ \mu\text{m}$ . Es wurden Gaußsche Strahlen zur Beleuchtung angenommen und Beugungseffekte vernachlässigt.

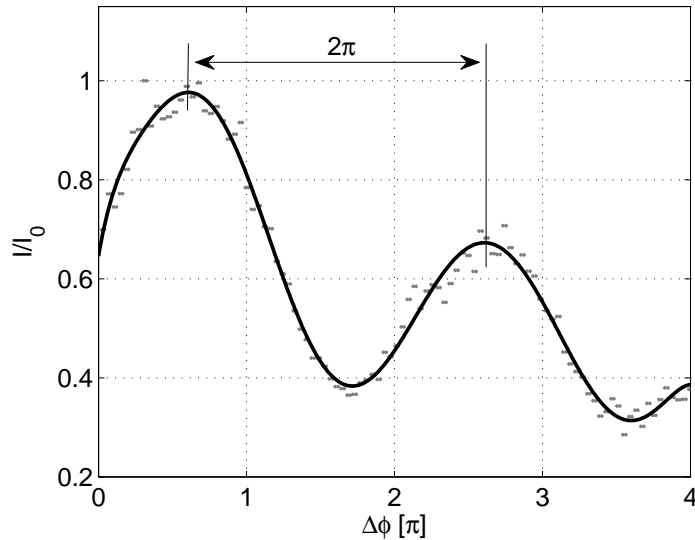


Abbildung 5.28.: Nachweis der Ausbildung einer stehenden Welle in einer holografischen  $4\pi$ -Anordnung. Bei Schiebung der Phase einer der gegenläufigen Wellen um  $\Delta\phi$  werden die Maxima und Minima der stehenden Wellen geschoben. Dies wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Beads gemessen. Die stehende Welle ist zusätzlich von Ausbleicherscheinungen des Beads überlagert.

gen werden. Zum einen stört die verbleibende nullte Beugungsordnung nicht und zum anderen entstehen keine Spotverzerrungen durch den Auslenkwinkel. Die Phase zwischen den Wellen wurde mit Hilfe des Hologramms verschoben. Hierzu wurde auf eines der Hologramme der gegenläufigen Fallen ein konstanter Offset aufaddiert, der eine zusätzliche Phasenschiebung dieser Falle bewirkt.

Zur einfachen experimentellen Verifikation wurden zwei Polfilter im Aufbau vor und hinter dem SLM so ausgerichtet, dass die nullte und erste Beugungsordnung gleiche Intensität aufweisen. Dies bedeutet jedoch, dass der Doppelfokus aufgrund der statischen Position der nullten Ordnung weder bewegt, noch Aberrationen korrigiert werden können.

Für die Versuche wurden fluoreszierende Beads des PS-SpeckTM Microscope Point Source Kit (P7 220) der Firma Invitrogen verwendet [86]. Hierbei wurden bevorzugt 175 nm große Beads, die im roten Bereich fluoreszieren (deep red fluorescent microspheres) verwendet. Die Fluorophore lassen sich mit einem relativ breiten Spektrum anregen, wobei das Maximum bei  $\lambda_A = 633$  nm liegt. Das Maximum des Emissionsspektrums liegt bei  $\lambda_E = 660$  nm.

Abbildung 5.28 zeigt die Messung der stehenden Welle. Die Abnahme der Intensität über  $\Delta\phi$  ist teilweise auf das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zurückzuführen. Die Existenz einer stehenden Welle beweist, dass sich die Methode grundsätzlich dafür eignet, ein  $4\pi$ -Mikroskop zu realisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass das hier vorgestellte holografische  $4\pi$ -Mikroskop gegenüber dem konventionellen  $4\pi$ -Mikroskop grundsätzlich Vorteile im Bezug auf Einfachheit, Automatisierung sowie Kosten des Aufbaus hat. Während der Versuche stellte sich jedoch ebenfalls heraus, dass das holografische  $4\pi$ -Mikroskop sehr hohe Anforderungen an die dreidimensionale Kalibrierung des Hologramms stellt. Zudem treten zusätzliche Effekte durch schräge Beleuchtung bei lateraler Auslenkung auf, die noch einer genaueren Untersuchung und entsprechendem Ausgleich bedürfen.

Das Themenfeld des holografischen  $4\pi$ -Mikroskops bietet also ein weites Feld an Forschungsmöglichkeiten, die leider im Rahmen dieser Arbeit nicht vertieft werden können.

## 5.5. Holografisch gesteuertes Mikro-Laser-Skalpell zur Zellsortierung

Insbesondere im Zusammenhang mit der Klassifizierung von Zellen (siehe Abschnitt 4.2) kann es von Interesse sein, die klassifizierten Zellen zur weiteren Analyse zu sortieren. Im Falle einer weiteren Analyse mehrerer verschiedener Zelllinien ist es notwendig, mehrere Abflüsse bereitzustellen. Interessiert jedoch nur eine bestimmte, dafür jedoch „reine“ Zelllinie, so reicht es aus, die unerwünschten Zellen zu eliminieren. Auch dies kann berührungslos mit Hilfe von Licht erfolgen. Absorbiert ein biologisches Objekt eine Wellenlänge, so kann dieses mit Hilfe von Licht geschnitten oder auch zerstört werden.

Im Folgenden wird eine Kombination [53, 122, 56, 123, 34] eines holografischen Mikrolaser-skalpells mit einer holografischen Pinzette vorgestellt [72, 71, 129, 25]. Wie auch bei der holografischen Pinzette können beim holografischen Mikrolaserskalpell mit Hilfe eines Lichtmodulators, der in der Fourierebene der Objektebene plaziert wird, mehrere unabhängige Bearbeitungsspot mit hoher Reproduzierbarkeit softwaregesteuert positioniert werden [69]. Dieser Ansatz ermöglicht es, Objekte gleichzeitig mit Hilfe der holografischen Pinzette zu klassifizieren und/oder mit Hilfe des holografischen Mikroskalpells zu zerstören.

Neben der reinen Zerstörung der Objekte eröffnet das kombinierte Werkzeug außerhalb der Hochdurchsatz-Verfahren neue Möglichkeiten in der Mikrobiologie und der Mikromechanik [13, 122, 57, 44, 53]. Ein solch flexibles Werkzeug ermöglicht die hochgenaue Bearbeitung von Zellen und deren Bestandteilen. Durch den holografischen Ansatz lassen sich Objekte während ihrer Bearbeitung flexibel zueinander bewegen und drehen, sowie beliebige Schneidspotgeometrien mit hoher Reproduzierbarkeit erzeugen [69]. Die Genauigkeit der Schnitte kann durch eine Korrektur der durch die Proben eingeführten Aberrationen wesentlich verbessert werden [130, 181].

Beide Teilsysteme – Laserskalpell und holografische Pinzette – wurden in einem Aufbau kombiniert. Hierzu wurde jedoch das Laserskalpell nicht in das Add-on-Modul integriert, sondern ein separater Laboraufbau konstruiert, um die optischen Komponenten des Mikroskops vor eventuellen Schädigungen durch gepulste UV-Strahlung zu schützen. Eine Aberrationskorrektur wurde integriert sowie die Funktionsweise des kombinierten Zerstörungs- und Bearbeitungswerkzeugs demonstriert.

### 5.5.1. Design des kombinierten Setups

Der Aufbau des holgrafischen Skalpells entspricht dem in Abschnitt 3.1 eingeführten Prinzip. Für Pinzette und Skalpell wurden zwei getrennte Strahlengänge entworfen, die vor Einkopplung in das Mikroskopobjektiv zusammengeführt werden.

Abbildung 5.29 zeigt den Aufbau. Das Mikroskopobjektiv (Zeiss Achroplan 100×/1,0W) und die Linse  $L_4$  werden beide sowohl für Bearbeitung als auch Einfang verwendet. Die Beleuchtung zur Beobachtung erfolgt durch eine LED ( $\lambda=633$  nm) in Transmission (nicht eingezeichnet in Abbildung 3.1). Im UV-Strahlengang wurden ausschließlich Quarzglaslinsen verwendet, die im UV-Bereich eine gute Transmission aufweisen. Als Bearbeitungslichtquelle wurde ein Nd:YAG Laser (Innolas SpitLight-600,  $\lambda=1064$  nm, 7 ns Pulsdauer, 200 mJ bei 355 nm) mit einem Frequenzverdreifachermodule verwendet. Aufgrund seiner kurzen Pulsdauer kann mit diesem Laser – abhängig von der Leistung und dem bearbeiteten Objekt –grundsätzlich sowohl Photoablation als auch Photodisruption realisiert werden (siehe hierzu Abschnitt 3.4.2). Da Laserskalpelle hauptsächlich mit Photodisruption oder Plasmainduktion arbeiten, wurde der hier verwendete Aufbau so ausgelegt, dass Photodisruption ermöglicht wird.

Als Pinzettenlaser kam der Laser IRE-Polus PYL-20M der Firma IP Group (Tabelle A.1.4) mit integrierter Aufweitungsoptik zum Einsatz. Für die Pinzette wurde das LCD LC-R 2500 der Firma Holoeye verwendet. Es handelt sich hierbei um ein twisted-nematisches phase-mostly Display mit einer Auflösung von  $1024 \times 768$  Pixeln und einem Pixelpitch von 19  $\mu\text{m}$ . Das Lichtfeld nach dem LCD wird mit Hilfe eines Kepler Teleskops mit einer Aufweitung von 0,35 ( $L_5, L_4$ ) in das MO eingekoppelt.

Da das Skalpell im UV-Bereich ( $\lambda=355$  nm) arbeitet, war die Wahl des Lichtmodulators hier problematisch. Bis dato gibt es nur wenige kommerziell erhältliche Lichtmodulatoren, die im UV-Bereich arbeiten. Da Flüssigkristalle durch UV-Licht hoher Intensität geschädigt werden können [103], müssen speziell für diesen Wellenlängenbereich ausgelegte MEMS eingesetzt werden. Hier wurde ein UV-erweitertes Modell eines DLP<sup>®</sup> Chips der Firma Texas Instruments (TI) verwendet (DMD, siehe Abschnitt 3.2.2).

Obwohl dieses Element für den UV-Bereich ausgelegt ist, sind keine zuverlässigen Angaben über seine Belastbarkeit bei gepulster UV-Laserstrahlung [30, 47, 186] oder auch bei Langzeitbestrahlung [29] verfügbar. Um das DMD nicht zu schädigen, wurde zunächst eine Abschätzung auf Basis vorhandener Angaben zur maximalen Leistungsdichte bei cw-Bestrahlung<sup>12</sup> durchgeführt. Diese beträgt laut Herstellerangabe bei der verwendeten Laserwellenlänge von  $\lambda=355$  nm etwa  $4 \text{ W/cm}^2$ .

---

<sup>12</sup>Dauerstrich, engl. continuous wave

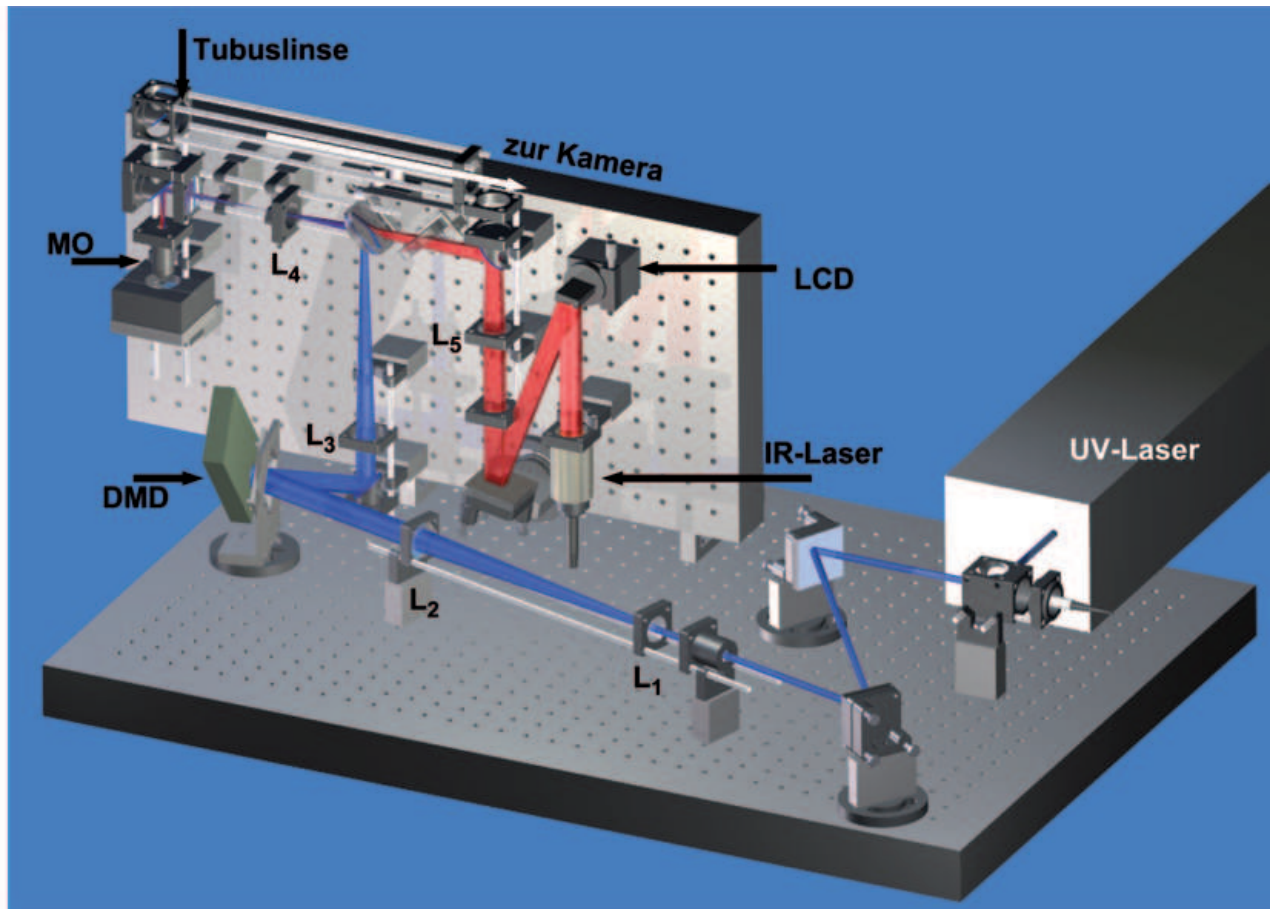


Abbildung 5.29.: Kombiniertes Aufbau von holografischem Mikrolaserskalpell und holografisch optischer Pinzette. Hierbei wird der IR-Laser für den Pinzettenmodus und der UV-Laser für den Skalpellmodus verwendet.

Abbildung 3.8 zeigt die benötigte Leistungsdichte für verschiedene Laser-Pulsdauern zur Bearbeitung von biologischen Objekten. Diese decken sich auch mit experimentellen Ergebnissen beispielweise zur Zellfusion [176] oder zum Anbohren biologischer Objekte [35]. Für den hier verwendeten Laser mit einer Pulsdauer von  $t_{Puls} = 7\text{ns}$  wird eine minimale Leistungsdichte von ca.  $I = 10^{11}\text{W/cm}^2$  zur Erzeugung von Photodisruption benötigt. Bei Verwendung eines MO mit einer NA von 1,0 ergibt sich ein Spotdurchmesser von  $d = 0,4\ \mu\text{m}$ . Unter der Berücksichtigung von Aberrationen wird ein Spotdurchmesser von  $d = 0,6\ \mu\text{m}$  angenommen. Damit wird eine Energie pro Puls im Schneidspot von mindestens

$$E_{Spot} = I \cdot \pi(d/2)^2 \cdot t_{Puls} = 2\mu\text{J} \quad (5.10)$$

zur Erzeugung von Photodisruption benötigt.

Ausgehend hiervon kann berechnet werden, wieviel Energie pro Puls auf das DMD fallen muss, um die notwendige Schneidenergie im Spot zu erzeugen. Dabei werden Verluste durch den Wirkungsgrad (Effizienz) des mit dem DMD dargestellten Amplitudenhologramms  $\eta_{DMD} = 0,061$  (siehe Anhang A.1.1) sowie durch die UV-Transmission des MOs ( $\tau_{MO} = 0,60$ ) und der restlichen optischen Komponenten ( $\tau_{Optik} \approx 0,85$ ) miteinbezogen:

$$E_{DMD} = \frac{E_{Spot}}{\eta_{DMD} \tau_{Optik} \tau_{MO}} \approx 70\ \mu\text{J}, \quad (5.11)$$

Basierend hierauf wurde das optische Design entsprechend ausgelegt. So ergab sich in Simulationen bei Minimalbetrieb des Lasers (die Laserschwelle liegt bei etwa 60 mJ) sowie der Sperrstellung eines zwischengeschalteten Glan-Taylor-Polarisators (Durchlass ca. 1%) eine Aufweitung des Lasers um den Faktor 6, um den gewünschten Mindestwert nicht zu überschreiten. Die Erhöhung der Energie kann einfach durch Drehen des Polarisators oder Erhöhung der Laserleistung bewerkstelligt werden.

Beim Entwurf der Laseraufweitung wurde ein Galilei Teleskop bevorzugt, um eine Fokussierung und damit eventuelle Plasmabildung aufgrund hoher Leistungsdichte zu vermeiden, da diese zu einer Verschlechterung der Strahlqualität führen könnte.

Zur Einkopplung des holografisch generierten Schneidlichtfelds in das MO wurde ein Kepler Teleskop mit einer Aufweitung von 0,19 ( $L_3, L_4$ ) verwendet. Hierbei wurde auf möglichst hohe Energieeffizienz geachtet, weshalb im Gegensatz zur optischen Pinzette nicht der Innenkreis sondern das gesamte DMD (unter Verlust von numerischer Apertur und Spotqualität) eingekoppelt wurde. In diesem Teil des Aufbaus (nach dem DMD) ist die Leistungsdichte gering genug, um Plasma im Fokus des Kepler Teleskops auszuschließen.



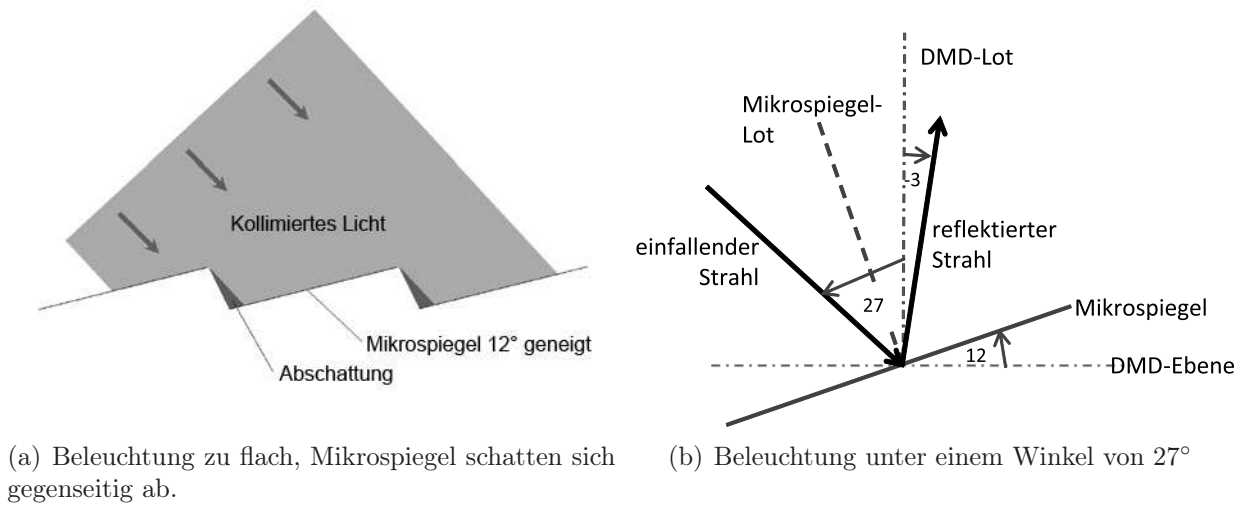


Abbildung 5.30.: Beleuchtung des DMD zur Minimierung der Abschattung.

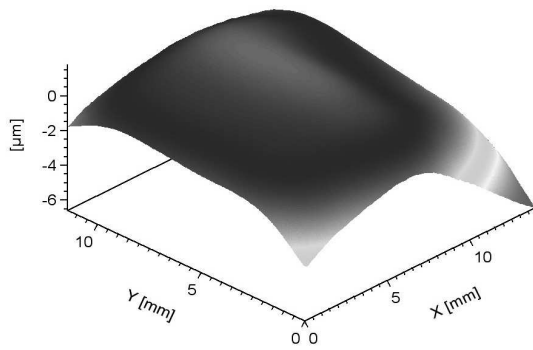
Zur Modulation werden die Mikrospiegel um  $\pm 12^\circ$  um eine diagonale Achse gekippt [30]. Um Abschattungen zu vermeiden (siehe Abbildung 5.30(a)) wurde mittels elementarer geometrischer Rechnung der ideale Beleuchtungswinkel berechnet. Dieser beträgt  $\pm 27^\circ$  (Winkel gemessen zum DMD-Lot) und führt aufgrund der Verkippung der Mikrospiegel zu einem Reflexionswinkel von  $-3^\circ$  bzw.  $-51^\circ$  (für den Kippwinkel  $+12^\circ$  bzw.  $-12^\circ$ ), siehe Abbildung 5.30(b). Für diesen Einfallswinkel wird gleichzeitig der Anteil des Lichts, der in den Bereich zwischen den Spiegeln fällt, minimiert. Das zwischen die Spiegel fallende Licht kann neben dem Energieverlust auch zur Schädigung des darunter liegenden Chips führen.

Für den experimentellen Aufbau wird als Nutzordnung das unter  $-3^\circ$  reflektierte Licht gewählt, da die Projektion des Hologramms aufgrund des geringen Ausfallwinkels nur wenig verzerrt wird.

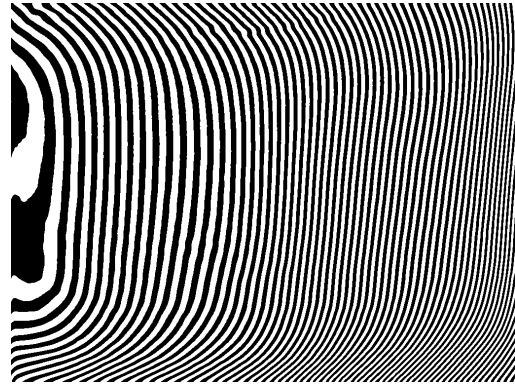
Aufgrund der diagonalen Kippachse des Mikrospiegels wurde das DMD um  $45^\circ$  verkippert im Aufbau fixiert. Dadurch wird die optische Achse in der Ebene gehalten, was den Aufbau und die Justage vereinfacht.

### 5.5.2. Aberrationskorrektur

Das verwendete DMD induziert durch seine Unebenheit starke Aberrationen. Dies wirkt sich negativ auf die Qualität des Schneidspots aus. Um diese Aberrationen korrigieren zu können, wurden sie mit einem Twyman-Green Interferometer vermessen (Abb. 5.31(a)). Basierend auf der interferometrischen Messung wurde ein Korrekturhologramm berechnet, welches den Steuerhologrammen überlagert wurde (Abb. 5.31(b)). Eine Vorstellung über die Stärke der Ab-



(a) Eingeführter Wellenfrontfehler



(b) korrigiertes Steuerhologramm

Abbildung 5.31.: Durch Messung der DMD-Oberfläche mit Hilfe eines Twyman-Green Interferometer wurde der durch Reflexion am DMD eingeführte Wellenfrontfehler bestimmt. Dieser wurde der Berechnung eines Korrekturhologramms zu Grunde gelegt. Das Korrekturhologramm wird bei Bewegung des Schneidspots jedem einzelnen binären Steuerhologramm überlagert.

Zernikekoeffizient Wellenfront [ $\mu\text{m}$ ]	Beschreibung
-1.67089	Verkippung in x-Richtung
0.609721	Verkippung in y-Richtung
0.575233	Astigmatismus mit Achse $45^\circ$
-1.55501	Defokus
1.38162	Astigmatismus mit Achsen $0^\circ$ und $90^\circ$
-0.928246	Koma entlang der x-Achse
0.0285712	Koma entlang der y-Achse
-0.568049	Sphärische Aberration

Tabelle 5.1.: Übersicht über die Zernikekoeffizienten des DMD.

errationen gibt Tabelle 5.1. Hier werden die Zernikekoeffizienten der primären Aberrationen des DMD dargestellt. Aufgrund der Definition der Zernikekoeffizienten auf den Pupillenradius können die Aberrationen in dieser Tabelle nur im Bezug auf den Innenkreis des DMD angegeben werden. Zur Visualisierung der holografischen Steuerung wurde eine mit einem Fotoresist beschichtete Glasplatte bearbeitet. Dazu wurde das Shipley Resist S1828 (Schichtdicke etwa 2-3  $\mu\text{m}$ ) gewählt, da dieser Resist eine geringe Absorption im Bereich der Wellenlänge der Beleuchtung ( $\lambda=633\text{ nm}$ ) aufweist, welche zur Beobachtung benötigt wird und somit durch die Beobachtung quasi nicht beeinflusst wird. Gleichzeitig ist die Absorption des Resists bei der bearbeitenden Wellenlänge (UV) sehr hoch, wodurch er an den bearbeiteten Stellen beschädigt wird.

Zur Steuerung des Schneidspots müssen die entsprechenden Hologramme im Vorfeld berechnet und auf den internen Speicher des DMD übertragen werden. Aufgrund der langsamen Ansteuerung des DMD Experimentalboards ist eine interaktive Steuerung in Echtzeit nicht möglich.

Wie in Abschnitt 3.2.2 dargestellt, lassen sich mit dem DMD nur binäre Amplitudenhologramme darstellen. Diese weisen eine zur 0. Beugungsordnung symmetrische Rekonstruktion auf, was neben der eigentlichen gewünschten Rekonstruktion (1. Beugungsordnung) zu einer gleichintensiven symmetrischen -1. Beugungsordnung führt. Abbildung 5.32(a) zeigt die symmetrische Rekonstruktion. Dabei wurde ein Kreis punktwise in den Resist geschnitten. Das Scannen erfolgte durch Änderung des Hologramms. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist die verhältnismäßig starke 0. Beugungsordnung.

Bei Abbildung 5.32(b) wurde hingegen dem Steuerhologramm zusätzlich ein Korrekturhologramm überlagert. Aufgrund der Nichtlinearität des Schreibvorgangs im Resist scheint die Spotqualität bei beiden Versuchen gleich gut zu sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Der positive Effekt der Aberrationskorrektur ist gut an der -1. Ordnung sichtbar. Da die Aberrationskorrektur auf die -1. Beugungsordnung einen konjugierten Effekt hat, wird dieser durch die Aberrationskorrektur entsprechend verschwommen und führt aufgrund der reduzierten Leistungsdichte nicht zu einer Belichtung. Die 1. Ordnung hingegen weist aufgrund der Aberrationskorrektur eine höhere Leistungsdichte auf. Durch die geringere Belichtungszeit fiel die Beschädigung durch die 0. Ordnung geringer aus.

### 5.5.3. Verschiedene Schneidexperimente

Es wurde zudem versucht, komplexe Felder und Muster durch direkte Rekonstruktion des Hologramms zu schneiden und damit auf das in konventionellen Systemen übliche Scannen zu verzichten. Die Intensität, die zuvor in einem Punkt konzentriert war, wurde dabei über das gesamte Feld verteilt. Aus diesem Grund waren die Leistungsdichte der Spots zu gering (vergleiche [69]), um Einfluss auf das Resist zu haben. Da die kritische Leistungsdichte des DMD nicht bekannt ist, wurde die Intensität nicht bis zur Bearbeitung erhöht.

Das Bearbeiten von Zellen und anderen Objekten in einer Lösung ist anspruchsvoll, da die Partikel durch jeden einzelnen Laserpuls aufgrund des Strahlendrucks aus dem Bearbeitungsfeld heraus gedrückt werden. Aus diesem Grund müssen sie mit einer optischen Pinzette fixiert werden, um eine Bearbeitung zu ermöglichen. Abbildung 5.33 zeigt einen Erythrozyten<sup>13</sup>, der mit dem kombinierten Tool bewegt, fixiert und zerstört wurde. Ein weiteres Beispiel für die

---

<sup>13</sup>rote Blutkörperchen

Flexibilität eines solchen kombinierten Setups zeigt Abbildung 5.34. Hier wurde eine Hybridomazelle<sup>14</sup> mit Hilfe des holografischen Setups gefangen, bearbeitet und danach ein Polystyrol-Bead mit Hilfe der Pinzette in die Zelle eingeführt. Es ist also möglich, gezielt biologische Objekte zu bearbeiten und zu manipulieren. Dies eröffnet ein weites Feld an Anwendungen (z.B. gezielte Manipulation in der Mikrobiologie).

Widerstandsfähigere Objekte müssen mit höherer Pulsenergie und über einen längeren Zeitraum hinweg bearbeitet werden. Aus diesem Grund müssen sie zur Bearbeitung fixiert werden. Abb. 5.35 zeigt ein 10 µm großes Polystyrol-Bead, das gespalten wurde (Bearbeitungszeit ca. 30 s). Dieses Experiment wurde jedoch anstelle des DMD mit einem Spiegel durchgeführt, da die Zerstörschwelle des DMD nicht bekannt ist. Während der Bearbeitung wurde das Bead mit der Pinzette auf dem Objektträger fixiert.

Alle Experimente mit dem DMD wurden mit einer Pulsenergie zwischen 10 und 40 mJ durchgeführt. Die Genauigkeit der Messung wird auf etwa 10% geschätzt. Die Pulsenergie, die auf das DMD fiel, wurde durch einen Glan-Taylor Polarisator eingestellt, der etwa 2% der Energie transmittierte. Aufgrund des Teleskops wurde das DMD mit etwa 24% der Ausgangsleistung beleuchtet. Daraus folgt, dass das DMD mit maximal 0,05 bis 0,2 mJ pro Puls beleuchtet wurde. Dies führt zu einer Energie des Schneidspots von etwa 1,8 - 7,4 µJ pro Puls.

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination einer holografischen Pinzette und eines holografischen Laserskalpells Sortieren durch Zerstörung unerwünschter Zellen möglich ist. Zum erstem Mal wurde ein Lichtmodulator in einem Mikrolaserskalpell zur Steuerung eingesetzt. Dies eröffnet auf einfache Weise die automatisierte Steuerung der Bearbeitungsspots.

Daneben eröffnet das hier vorgestellte kombinierte Werkzeug neue Flexibilität in Mikrobiologie und Mikromechanik. Durch Einsatz der Lichtmodulatoren ist die gleichzeitige Bearbeitung und Bewegung von Zellen oder Zellbestandteilen möglich. Die durch den Lichtmodulator stark aberrierten Lichtfelder konnten deutlich verbessert werden und damit sogar inhärente negative Beugungsordnungen reduziert werden. Trotz allem erzeugt das DMD verhältnismäßig starke Störordnungen (inkl. der 0. Ordnung), die bei einer entsprechenden Manipulation störend bzw. schädigend wirken können. Zudem wird aufgrund der geringen Beugungseffizienz eine sehr hohe Laserleistung benötigt. Hier besteht die Hoffnung auf phasenmodulierende MEMS, die zwar bereits in der Entwicklung sind (z.B. das Fraunhofer Piston-MMA, siehe Abschnitt

---

<sup>14</sup>Zellhybrid aus Plasmazelle und Tumorzelle. Hybridomazellen wurden entwickelt, um Antikörper in beliebiger Menge herzustellen. Durch die Plasmazelle (aus Milz oder Lymphknoten) besitzt sie die Fähigkeit, einen bestimmten Antikörper herzustellen, während sie durch die Tumorzelle die Eigenschaft besitzt, sich in Kultur beliebig zu vermehren. Die in dieser Arbeit eingesetzten Hybridomazellen stammen von der Ratte und wurden freundlicherweise vom Institut für Zellbiologie und Immunologie der Uni Stuttgart zur Verfügung gestellt.

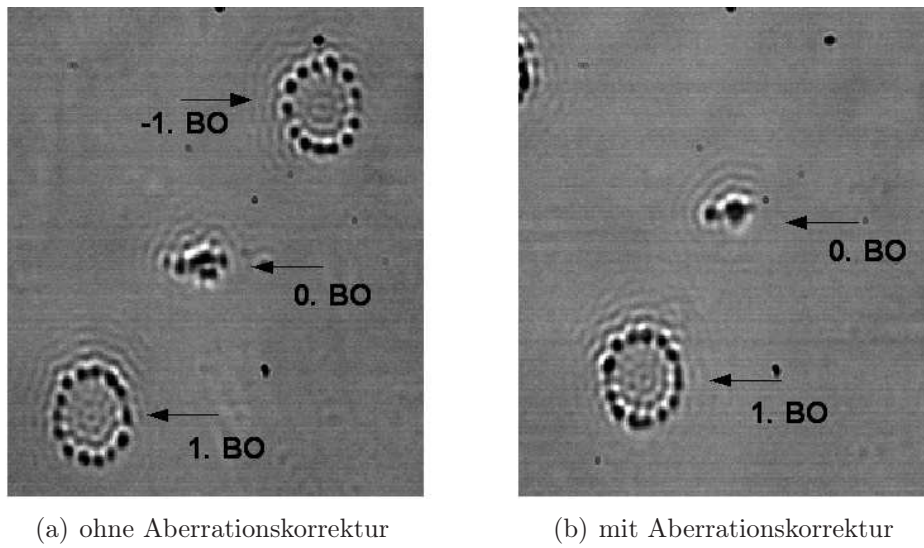


Abbildung 5.32.: Einfluss der Aberrationskorrektur beim Schreiben eines Kreises in Photoresist.

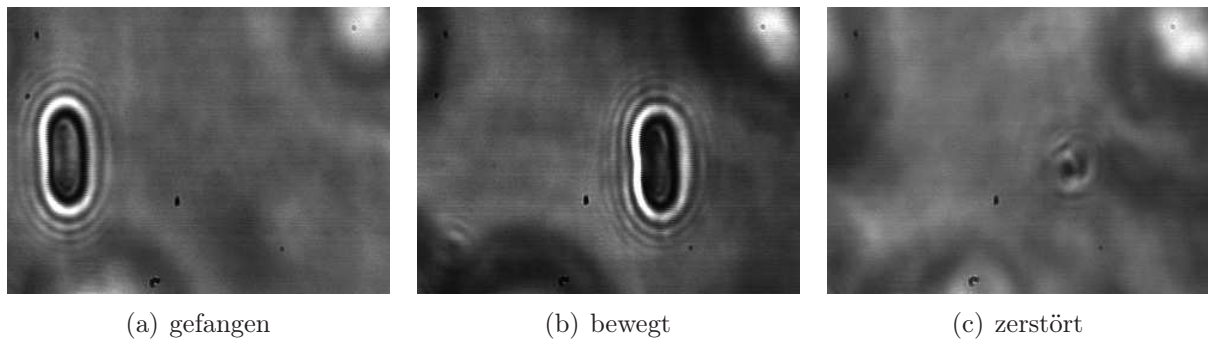


Abbildung 5.33.: Rotes Blutkörperchen (Erythrozyt) a) mit Hilfe einer holografischen Pinzette gefangen, b) bewegt und c) mit Hilfe eines holografischen Mikroskalpells zerstört.

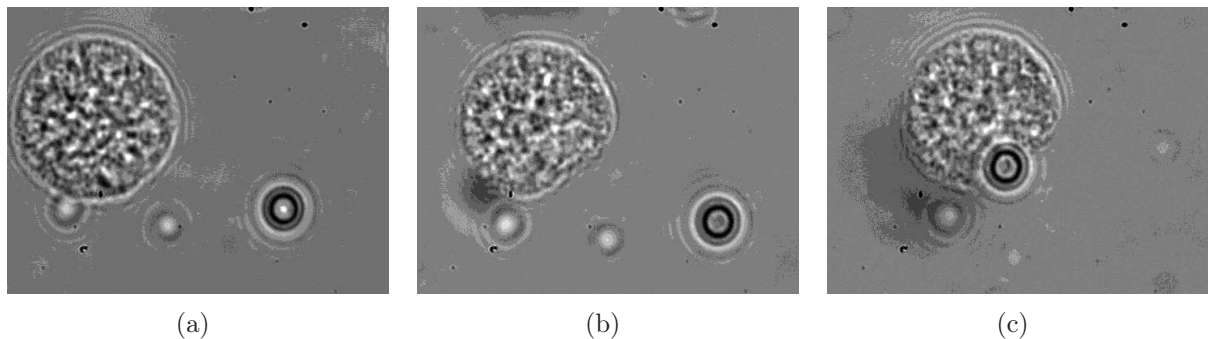


Abbildung 5.34.: Hybridomazelle und Polystyrol-Bead a) gefangen, b) Hybridomazelle mit Skalpell bearbeitet c) eingeführtes Bead in Hybridomazelle.

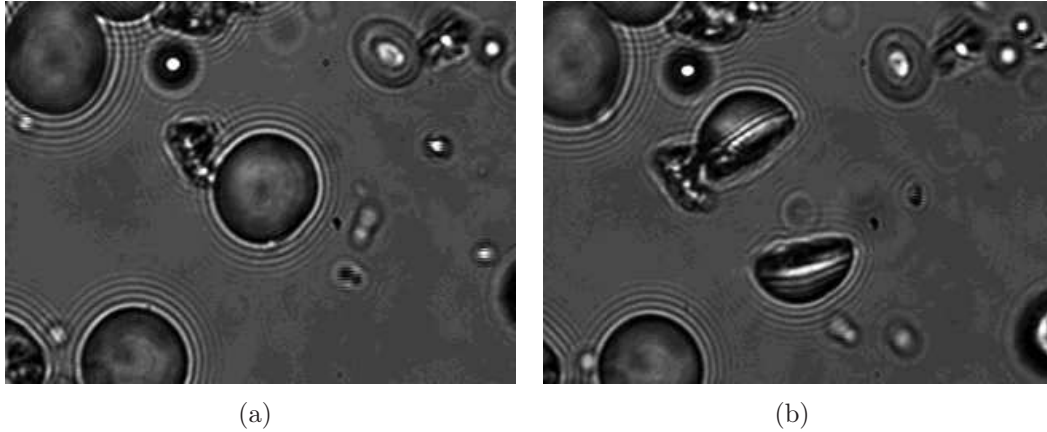


Abbildung 5.35.: 10  $\mu\text{m}$ -großes Polystyrol-Bead, das mit Hilfe von UV-Licht durch Langzeitbelichtung zerschnitten wurde.

3.2.2 [106]), momentan jedoch nicht mit ausreichender Auflösung verfügbar, bzw. die einen schlechten Duty-Cycle aufweisen. Aufgrund der raschen Entwicklungen auf diesem Gebiet wird davon ausgegangen, dass ein holografisches Skalpell mit deutlich besserer Effizienz in naher Zukunft realisierbar ist.

Eine Alternative wäre der Einsatz von Femtosekundenlasern im sichtbaren Wellenlängenbereich, wie von Kuang et al. bereits zur Bearbeitung demonstriert wurde [102]. Aufgrund der sichtbaren Wellenlängen sind hierzu wiederum Flüssigkristall-Lichtmodulatoren geeignet. Um denselben Energieeintrag wie bei der Arbeit im UV-Bereich zu erzeugen, könnte hierbei mit Multi-Photonen-Prozessen gearbeitet werden [100].

## 5.6. Untersuchungen der technischen Realisierbarkeit der Automatisierung

Die holografische Pinzette ist aufgrund der Softwaresteuerung sehr gut geeignet, automatisierte Einfangaufgaben durchzuführen. Dabei ist eine hohe Genauigkeit der Positionierung erforderlich. In diesem Abschnitt wird zunächst untersucht, ob die grundsätzliche, durch die holografische Steuerung gegebene Positioniergenauigkeit ausreicht. Darauf folgend wird ein Verfahren zur Kalibrierung des Zusammenhangs zwischen Hologrammparametern und tatsächlicher Position der Falle in der Objektebene untersucht, da eine entsprechende Kalibrierung für einen automatisierten Einfang unabdingbar ist.

### 5.6.1. Laterale Positioniergenauigkeit

Die Positioniergenauigkeit wurde mit Hilfe eines zweiten LCoS-Displays (Holoeye, LC-R 2500) untersucht. Dies ist möglich, da der kritische Faktor der Positioniergenauigkeit durch die Hologrammberechnung gegeben ist.

Zur Ermittlung der Positioniergenauigkeit  $\Delta x_{min}$  wurde das in ein Holoeye LC-R 2500 (Pixelpitch 19  $\mu\text{m}$ , für mehr Details siehe Anhang A.1.3) eingeschriebene Hologramm mit Hilfe eines Fotoobjektivs im Abstand von  $d = 2,615$  m rekonstruiert und mit einer CCD-Kamera (Pixelpitch 9,9  $\mu\text{m}$ ) aufgenommen. Die Auslenkung der Rekonstruktion wurde mit einer Schrittweite von  $\Delta x = 0,88$  Pixel (kameraseitig) verändert. Die verwendete Schrittweite wurde gut aufgelöst. Mit Hilfe des Strahlensatzes lassen sich die hier gewonnenen Ergebnisse auf eine Rekonstruktion mit einem Mikroskopobjektiv übertragen.

Bei einer Änderung der Ortsfrequenz des eingeschriebenen Gitters mit der Schrittweite  $\Delta k_x = 1$  kann mit dem LC-R 2500 und den verwendeten Mikroskopobjektiven eine Verschiebung der Falle mit Minimalschritten von bis zu 0,9 nm erreicht werden (siehe Tabelle 5.2). Werden die gewonnenen Erkenntnisse auf das hier verwendete Holoeye HEO 1080 P (Pixelpitch 8  $\mu\text{m}$ ) übertragen, so ergeben sich Positioniergenauigkeiten bis 2 nm. Diese Genauigkeit übersteigt bei weitem praktische Anforderungen, da die Positionierung im Allgemeinen durch die Brownsche Bewegung beschränkt ist.

Holografische Pinzetten zeichnen sich also unter anderem durch ihre hohe Positioniergenauigkeit aus. Die beugende Struktur ist durch die digitale Ansteuerung des lithografisch strukturierten SLM gegeben und damit hochgenau und reproduzierbar einstellbar.

Objektiv	$f_{MO}$ [mm]	$\Delta x_{min}$ [nm] (LC-R 2500)	$\Delta x_{min}$ [nm] (HEO 1080 P)
40×/1,2W	4,11	1,4	3,25
50×/0,7	3,29	1,1	2,6
63×/1,2W	2,61	0,9	2,0

Tabelle 5.2.: Positioniergenauigkeit bei den verschiedenen Mikroskopobjektiven

### 5.6.2. Kalibrierung Hologramm - Objektebene

Zur Bewegung der holografischen Doppelfallen (siehe hierzu Abschnitt 5.4) sowie zur Realisierung eines automatischen, bildverarbeitungsbasierten Einfangs ist die Kenntnis des genauen Zusammenhangs zwischen der Ansteuerung des Lichtmodulators und dem Objektvolumen von zentraler Bedeutung. Ziel der Kalibrierung des Hologramms zur Fallenposition ist es also, eine Beziehung zwischen den Hologramm-Eingabeparametern  $k_x, k_y, k_z$  (im folgenden Hologrammparameter genannt) und der Position der Rekonstruktion in der Objektebene  $x_{CCD}, y_{CCD}$  (gemessen durch Abbildung auf eine Kamera) sowie  $z_{MO}$  (gemessen durch z-Verschiebung des Mikroskopobjektivs) herzustellen.

Dieser Zusammenhang ist nicht trivial, denn aufgrund von Justage- und Elementtoleranzen kann der Zusammenhang nicht vollständig aus der Simulation bzw. aus theoretischen Abschätzungen übernommen werden, sondern muss messtechnisch ermittelt werden. Trotzdem ist es hilfreich, den theoretischen Zusammenhang zu ermitteln, da so bereits eine Abschätzung der Position möglich ist.

Daher wurde sowohl eine modellbasierte Kalibrierung auf Basis des optischen Designs und der Hologrammberechnung durchgeführt, als auch eine experimentelle Kalibrierung, die das gesamte optische System berücksichtigt, jedoch auf eine hohe Messgenauigkeit angewiesen ist.

#### Modellbasierte Kalibrierung

Die modellbasierte Kalibrierung nutzt die Informationen des optischen Designs und der Hologrammberechnung. Mit der modellbasierten Kalibrierung ist es möglich, den durch den SLM erzeugten Beugungswinkel hochgenau zu bestimmen. Dadurch kann die relative Bewegung zur 0. Beugungsordnung lateral ( $\Delta x, \Delta y$ ), bzw. axial ( $\Delta z$ ) bestimmt werden. Die Transformation durch das optische System in die Objektebene ist jedoch Ungenauigkeiten wie Dejustage, Elementtoleranzen oder Aberrationen unterworfen, welche - aufgrund fehlender Informationen über das reale System - nur schwer zu simulieren sind.



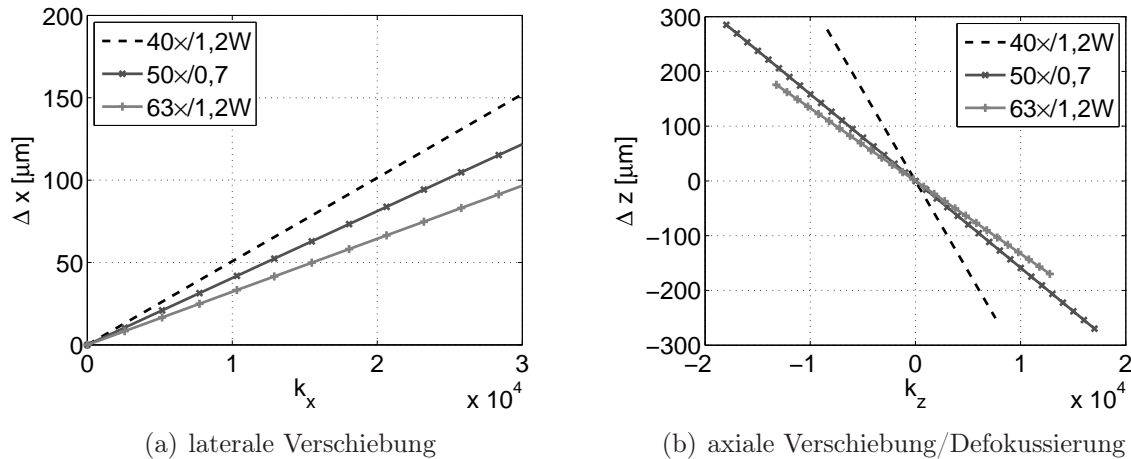


Abbildung 5.36.: Laterale Verschiebung und Defokus in Abhängigkeit des normierten Hologrammparameter  $k_z/k_{zmax}$  für das Add-on Modul.

Eine laterale Bewegung der Falle wird durch einen Phasenkeil erzeugt, welcher zum Hologramm addiert wird (vgl. Gleichung 3.4). Eine axiale Bewegung hingegen wird durch einen quadratischen Phasenterm erzeugt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Phasenterme werden die laterale und axiale Kalibrierung getrennt betrachtet. In Anhang C.1.1 und C.1.2 findet sich eine ausführliche Herleitung.

**Laterale Kalibrierung:** Der Beugungswinkel  $\alpha_x$  ergibt sich in Abhängigkeit des Hologrammparameters  $k_x$ , der Wellenlänge  $\lambda$ , dem Pixelpitch  $pp$  sowie softwareinternen Konstanten:

$$\sin \alpha_x = \frac{\lambda}{3 \cdot 2^{15} \cdot pp} \cdot k_x \quad (5.12)$$

Bezieht man das optische System mit ein, kann man hieraus die Verschiebung in der Objektebene berechnen:

$$\Delta x = f_{MO} \cdot \frac{f_1}{f_{TL}} \cdot \alpha_x \quad (5.13)$$

Dabei ist  $f_{MO}$  die Brennweite des Mikroskopobjektivs,  $f_{TL}$  die Brennweite der Tubuslinse und  $f_1$  die Brennweite von Linse 1 des Add-on Moduls. Hieraus lässt sich die Verschiebung  $\Delta x$  in der Objektebene in Abhängigkeit vom Hologrammparameter berechnen.

Ein Überblick über die laterale Verschiebung bei Verwendung verschiedener Mikroskopobjektive mit Hilfe des hier entwickelten Add-on Moduls ist in Abbildung 5.36(a) dargestellt. Dabei ist die Auslenkung linear abhängig von der Brennweite des Mikroskopobjektivs. Gleichzeitig wächst auch das Objektfeld<sup>15</sup> mit der Brennweite linear an (siehe

<sup>15</sup>Auf der Kamera sichtbarer Bereich des Objekts. Die Größe des Objektfelds hängt (bei gegebener Kamera) von der Vergrößerung (und damit Brennweite) des MO ab.

	$f_{MO}$	$\alpha_{xmax}$ 4GS	$k_x$	$\Delta x_{max}$	Objektfeld $O_{CCD}$ (Breite)
40×/1,2W	4,11	±1,9°	24576	±125 μm	224 μm
63×/1,2W	2,61	±1,9°	24576	±79 μm	142 μm
50×/0,7	3,29	±1,9°	24576	±100 μm	179 μm

Tabelle 5.3.: Übersicht über die maximale Auslenkung der Falle bei verschiedenen Mikroskopobjektiven.

hierzu Anhang A.2.2). Die Auslenkung  $\Delta x$  für ein Gitter mit 4 Graustufen ist in Tabelle 5.3 dargestellt. So kann mit einem 4-stufigen Blazegitter beispielsweise mit dem 40×-Objektiv eine Auslenkung von  $\pm 125 \mu\text{m}$  realisiert werden, und somit (wie auch mit jedem anderen Objektiv) das gesamte sichtbare Objektfeld mit der holografischen Pinzette erreicht werden.

**Axiale Kalibrierung:** Die axiale Bewegung des Spots  $\Delta z$  wird mit einem im SLM dargestellte Linsenterm erzeugt. Dieser Linsenterm besitzt die Brennweite  $f_{SLM}$ . Der Zusammenhang zwischen  $f_{SLM}$  und  $k_z$  ergibt sich zu

$$f_{SLM} = \frac{9 \cdot 2^{20} \cdot pp^2}{k_z \lambda} \quad (5.14)$$

Mit Hilfe von  $f_{SLM}$  lässt sich nun die Defokussierung  $\Delta z$  in Abhängigkeit der Vergrößerung  $V$  des Mikroskopobjektivs berechnen:

$$\Delta z = \frac{-n f_1^2}{V^2 f_{SLM}}, \quad (5.15)$$

Für den hier entworfenen Aufbau wird bei einer positiven Brennweite des SLM eine negative Defokussierung in der Brennebene erzeugt und umgekehrt. Die genaue Herleitung ist in Anhang C.1.2 dargestellt.

Die maximale Brennweite  $f_{SLM}$  ist beschränkt durch zwei Faktoren: Zum einen durch die maximale Phasensteigung, die das SLM darstellen kann ( $d\phi/d\rho = 2\pi/2pp$ ), zum anderen durch die Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs, die den Radius bestimmt, innerhalb welchem die maximale Phasensteigung auftritt. So kann bei einem Objektiv mit kleinerer Eintrittspupille eine kürzere Brennweite  $f_{SLM}$  eingeschrieben werden als bei einem Objektiv mit großer Eintrittspupille. Die maximale Brennweite für das jeweilige Objektiv ergibt sich in Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabs  $\beta'$  des SLM in die Eintrittspupille des MO zu (siehe Herleitung Anhang C.1.3):

$$f_{SLM} = \pm 2 \frac{r_{EP} pp}{\beta' \lambda}. \quad (5.16)$$

	$f_{SLMmax}$	$k_{zmax}$	$\Delta z_{max}$
40×/1,2W	64,5mm	8414	±277 $\mu\text{m}$
63×/1,2W	42,8mm	13252	±176 $\mu\text{m}$
50×/0,7	31,5mm	18030	±286 $\mu\text{m}$

Tabelle 5.4.: Maximale Defokussierung simuliert für verschiedene Mikroskopobjektive.  $k_{zmax}$  ist der Hologrammkoeffizient, der für das jeweilige Objektiv die maximale Brennweite  $f_{SLMmax}$  erzeugt. Diese ist gegeben durch die Auflösung des Modulators sowie die Eintrittspupille des Objektivs.  $\Delta z_{max}$  gibt den gesamten Defokusbereich an, indem der Spot ohne Aliasing bewegt werden kann.

Mit Hilfe von Gleichung 5.15 und 5.16 konnte somit die Defokussierung der Falle simuliert werden. Abbildung 5.36(b) zeigt die Ergebnisse der Simulation. Wie erwartet hängt der nominelle Defokus  $\Delta z$  linear von  $k_z$  ab. Es zeigt sich, dass das Defokusverhalten der Objektive sehr unterschiedlich ist. Während das 40× und das 50× nahezu einen ähnlichen maximalen Defokusumfang von etwa  $\pm 280 \mu\text{m}$  besitzen, erreicht man mit dem 63×-Objektiv nur etwa  $\pm 180 \mu\text{m}$ . Da die maximale Defokussierung mit sehr unterschiedlichen Hologrammparametern  $k_z$  erreicht werden, zeigt sich dies besonders gut bei einer Darstellung über den normierten Hologrammparameter  $k_z/k_{zmax}$  (siehe Abbildung 5.37(a)).

Tabelle 5.4 zeigt eine Übersicht über die maximale Defokussierung.  $k_{zmax}$  ist dabei der Hologrammkoeffizient, der für das jeweilige Mikroskopobjektiv maximal möglichen Defokussierung  $f_{SLMmax}$  entspricht.

Die Simulationen wurden mit Messungen im Experimentalaufbau verglichen. Hierzu wurde ein Spiegel in der Objektebene so verschoben, dass bei verschiedenen  $k_z$  der Fokus scharf abgebildet wurde. Abbildung 5.37(b) zeigt Messung und Simulation zweier Mikroskopobjektive im Vergleich aufgetragen über den normierten Hologrammparameter  $k_z/z_{max}$ . Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung.

Es konnte zudem beobachtet werden, dass eine Defokussierung über den theoretisch erwarteten Wert hinaus möglich ist. Abbildung 5.37(b) zeigt dies für das 40×-Objektiv. Dies ist möglich, da die Brennweite  $f_{SLM}$  über die maximale Brennweite erhöht werden kann. Da jedoch der eingekoppelte Bereich des SLM von der Eintrittspupille abhängt, wird beim Überschreiten von  $k_{zmax}$  das Abtasttheorem in den Randbereichen des Hologramms nicht mehr erfüllt. Dies ist in der Praxis mit hohen Intensitätsverlusten sowie einer reduzierten effektiven NA verbunden. In Extremwendungen, in denen der das Abtasttheorem erfüllende Defokusbereich nicht ausreicht, kann dies jedoch von Vorteil sein.

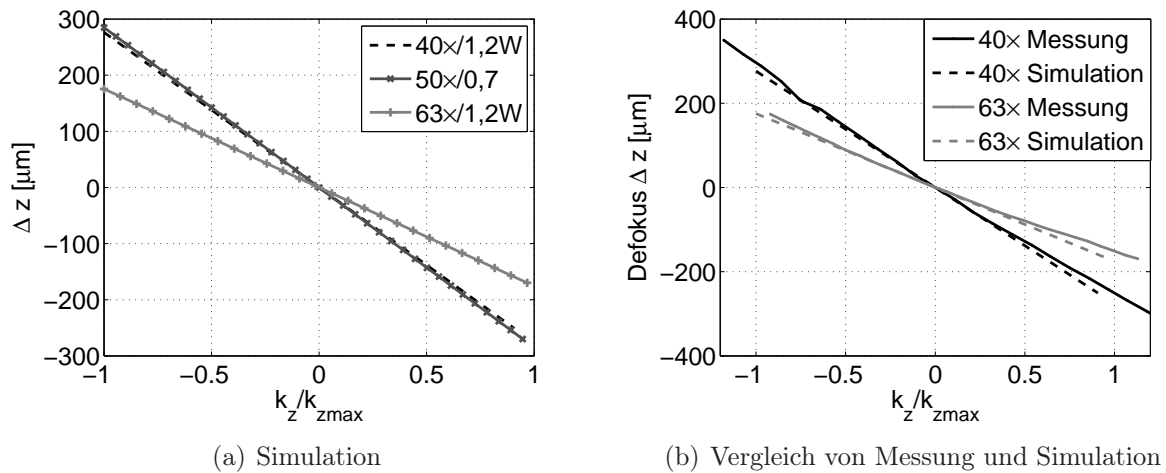


Abbildung 5.37.: Defokus auf der optischen Achse in Abhängigkeit des normierten Hologrammparameter  $k_z/k_{zmax}$ . Messung und Simulation stimmen gut überein. In der Praxis ist zu beobachten, dass über den maximalen Defokusbereich ( $k_z/k_{zmax} = 1$ ) hinaus defokussiert werden kann. Hierbei wird jedoch in den Randbereichen des Hologramms das Abtasttheorem verletzt, wodurch die Beugungseffizienz als auch die effektive NA abnimmt.

Die Aberrationen nehmen mit zunehmender Defokussierung stark zu. Da diese sehr stark vom eigentlichen Aufbau abhängen, wurden sie experimentell ermittelt (siehe Abschnitt 5.6.2). Um trotzdem stabilen Einfang mit einer defokussierten Falle zu ermöglichen, wird ein Teil des Orts-Bandbreite-Produkts des Modulators zum Ausgleich der Aberrationen verwendet. Dies kann auf der anderen Seite wiederum die maximal mögliche Defokussierung reduzieren.

## Experimentelle Kalibrierung

Während bei der modellbasierten Kalibrierung die Position relativ zur 0. Beugungsordnung bestimmt wurde, kann die Position der Falle messtechnisch absolut bestimmt werden. Dabei wird der optische Aufbau als Blackbox behandelt und somit Element- und Justagetoleranzen berücksichtigt.

**Vorgehensweise:** Zur experimentellen Kalibrierung wird das Objektfeld mit dem Spot des Einfanglasers abgetastet. Da in der Objektebene keine Kamera angebracht werden kann, wird das Objektfeld in Reflexion mit Hilfe eines Spiegels auf die Kamera abgebildet. Die laterale Kalibrierung erfolgt also nicht direkt zwischen Hologrammparameter und Objektfeld, sondern zwischen Hologrammparameter und Kameraebene (Bildfeld). Die Beziehung zwischen Objektfeld  $o$  und Bildfeld  $o'$  ergibt sich durch die Vergrößerung  $V = o'/o$ . Die axiale Kalibrierung

hingegen ( $Z_{MO}(k_z)$ ) erfolgt zwischen Hologrammkoeffizient und Objektebene, da  $Z_{MO}$  durch Verschiebung des Mikroskopobjektivs und damit direkt in der Objektebene gemessen wird.

Kombiniert man laterale und axiale Kalibrierung, so kann eine dreidimensionale Kalibrierung durchgeführt werden.

Die Abrasterung des Objekt- und damit auch Bildfeldes wird durch schrittweise Änderung der Hologrammparameter  $k_x$  und  $k_y$  realisiert. Zur dreidimensionalen Kalibrierung werden zusätzlich verschiedene z-Ebenen abgerastert. Während die Position des Spots in x- und y-Richtung ( $X_{CCD}, Y_{CCD}$ ) mittels Bildverarbeitung ausgewertet wird, wird die axiale Verschiebung  $Z_{MO}$  durch Nachfokussierung des Mikroskopobjektivs bestimmt. Es sei angemerkt, dass die Defokussierung - aufgrund der Reflexion am Spiegel - der doppelten Objektivverschiebung entspricht (siehe hierzu Anhang A.2.3).

Die Auswertung mittels Bildverarbeitung erfolgt in drei Schritten: Mit Hilfe einer dynamischen Maske werden zunächst störende Reflexe ausgeblendet, um Fehlinterpretation zu vermeiden. Hierzu werden zu Beginn der Messung drei Referenzmessungen durchgeführt, welche eine grobe Abschätzung der Fallen- und damit auch Maskenposition auf Basis der Hologrammparameter erlauben. Im zweiten Schritt wird eine feinere Positionierung der Maske auf Basis einer Maximalwertuntersuchung vorgenommen. Dies erlaubt im dritten Schritt die Ermittlung der Fallenposition ( $X_{CCD}, Y_{CCD}$ ) mittels Schwerpunktbildung.

Die Beziehung zwischen den Hologrammparametern  $k_x, k_y$  und  $k_z$  und der Position des Spots in der Bildebene  $X_{CCD}, Y_{CCD}$  und  $Z_{MO}$  kann über eine Polynominterpolation hergestellt werden. Diese lässt sich in beide Richtungen durchführen, so dass man sowohl die Hologrammparameter auf Basis der Spotposition in der Bildebene ( $k_x, k_y, k_z$  jeweils als Funktion von  $X_{CCD}, Y_{CCD}, Z_{MO}$ ), als auch die Spotposition auf Basis der Hologrammparameter ( $X_{CCD}, Y_{CCD}, Z_{MO}$  jeweils als Funktion von  $k_x, k_y, k_z$ ) berechnen kann.

Die dreidimensionale Kalibrierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird eine laterale Kalibrierung mit zweidimensionaler Polynominterpolation für verschiedene Ebenen durchgeführt. Da  $Z_{MO}$  ausschließlich eine Funktion von  $k_z$ , nicht aber von  $k_x$  und  $k_y$  ist,  $X_{CCD}$  und  $Y_{CCD}$  jedoch neben  $k_x$  und  $k_y$  auch anhängig von  $k_z$  sind, kann auf eine komplexe dreidimensionale Polynominterpolation verzichtet werden. Stattdessen reicht es aus, die Polynomkoeffizienten der verschiedenen Ebenen zu interpolieren, um die Polynome für dazwischenliegende Ebenen zu bestimmen.

Es stellte sich heraus, dass die laterale Position des Spots mit  $k_z$  variiert. Abbildung 5.38(a) zeigt in einer Vektordarstellung das Verhalten der Fokiposition für  $k_z \in [0, 10000]$ . Diese Bewegung (Stauchung) ist auf eine nicht-perfekte Telezentrie des MOs zurückzuführen. Es

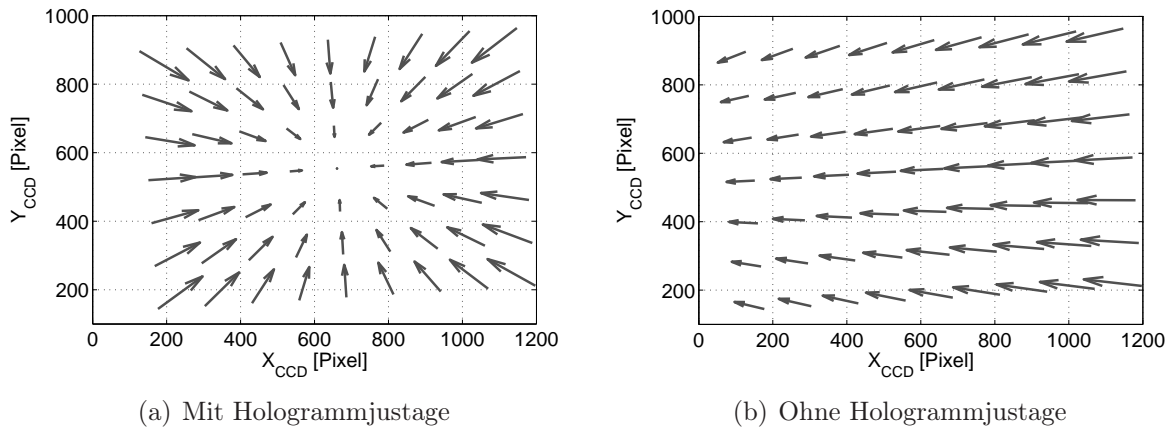


Abbildung 5.38.: Verschiebung der Spotposition in Abhängigkeit von  $k_z$  aufgrund der nicht-perfekten Telezentrie des MO bzw. Dejustage des Hologramms.

sei hierbei angemerkt, dass ein positives  $k_z$  zu einer negativen Defokussierung  $-Z_{MO}$  führt (siehe Abschnitt A.2.3). Aus diesem Grund bewegen sich die Spots mit zunehmendem  $k_z$  in Richtung optische Achse. Stimmen die optischen Achsen des Hologramms und des Lasers bei der Defokussierung nicht überein, so wird ein zusätzlicher Offset eingeführt (siehe Abb. 5.38(b)).

**Aberrationen:** Bei Defokussierung des Strahls werden zudem starke Aberrationen eingeführt. Da schon geringe Aberrationen die Einfangeffizienz stark verringern, müssen sie bei einer axialen Kalibrierung korrigiert werden. Dies kann durch Anwendung eines konjugierten Phasenterms  $\Phi_j$  in Gleichung (3.3) erreicht werden [130, 181, 141]. Aufgrund des Fehlens der Mikroskopdaten konnten die eingeführten Aberrationen nicht simuliert werden, sondern wurden gemessen.

Hierzu wurden die Aberrationen in verschiedenen z-Ebenen durch visuelle Beurteilung der Punktbildfunktion und manuelle iterative Korrektur ermittelt. Auf diese Weise werden die Aberrationen nicht sehr genau gemessen, aber die Messungen mittels manueller Korrektur sind völlig ausreichend, optischen Einfang zu ermöglichen und liefern damit einen zuverlässigen Anhaltspunkt über die Ausprägung der Aberrationen. Es konnten hauptsächlich neben der theoretisch zu erwartenden sphärischen Aberration zusätzlich auch Astigmatismus festgestellt werden. Das Einführen von Astigmatismus auf der optischen Achse wurde bei dieser Messung hauptsächlich durch ein nicht auf der optischen Achse zentriertes Hologramm eingeführt. Grundsätzlich ist also eine Justage des Hologramms bei Defokussierungsanwendungen vorteilhaft.

Abbildung 5.39 zeigt exemplarisch den Astigmatismus auf der optischen Achse für zwei verschiedene Mikroskopobjektive. Es zeigt sich ein lineares Verhalten in Abhängigkeit vom Hologrammparameter  $k_z$ . Zudem ist zu erkennen, dass die Aberrationen unabhängig vom Mikroskopobjektiv ansteigen (siehe Abbildung 5.39(a)). Dies ist ein Zeichen dafür, dass der Astigmatismus nicht durch das MO eingeführt wird, sondern auf zusätzliche Komponenten (nicht-zentriertes Hologramm, Add-on Modul) zurückzuführen ist. Trotzdem haben die Aberrationen abhängig vom verwendeten MO unterschiedlich starken Einfluss. So weist das 63×-Objektiv bei maximaler Defokussierung ( $k_z/k_{zmax}=1$ ) stärkere Aberrationen auf, als das 40×-Objektiv. Dies ist zurückzuführen auf die unterschiedlich große Eintrittspupille und das damit benötigte  $k_{zmax}$ . Aufgrund der geringeren Aberrationen des 40×-Objektivs sowie dem gleichzeitig größeren Defokus-Umfang (siehe Tabelle 5.4) eignet es sich in diesem Aufbau besser für Defokussierungsaufgaben.

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die Aberrationen nicht nur bei Defokussierung sondern auch mit ansteigendem Feldwinkel zunehmen. Aus diesem Grund wurden die Aberrationen neben den verschiedenen Ebenen auch für verschiedene Feldpunkte gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese im Rahmen der visuellen Beurteilung nicht mit ansteigendem Feld zunehmen. Aus diesem Grund können die Aberrationen als unabhängig von  $k_x$  und  $k_y$  und damit für jede Ebene konstant angenommen werden. Somit kann auf einfache Weise zwischen den gemessenen Ebenen linear interpoliert werden und die Aberrationen entsprechend ausgeglichen werden.

**Genauigkeit:** Für den automatisierten Einfang müssen die Abweichungen der Kalibrierung kleiner als der Radius des zu fangenden Objekts sein. Die Genauigkeit, mit der die Spotposition in der Objektebene ermittelt werden kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine wichtige Rolle hierbei spielt die durch die eigentliche Messung eingeführte Unsicherheit. Diese können beispielsweise bei der Abbildung der Objektebene in die Bildebene (z.B. Abbildungsmaßstab, Aberrationen), durch das mechanische System bei der Messung von  $Z_{MO}$  (Wiederholgenauigkeit, Vibrationen), oder durch die Kamera (Rauschen, Bildhelligkeit, Pixelgröße) eingeführt werden. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist das Kalibriermodell selbst. Besonders fehleranfällig sind hier der Auswertalgorithmus sowie die durch die Polynominterpolation eingeführten Abweichungen (Polynomgüte).

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde keine vollständige Unsicherheitsanalyse durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war die Automatisierung bzw. die Vereinfachung des optischen Einfangs. Hierzu muss keine quantitative Aussage über die Messunsicherheit getroffen werden, sondern es muss ein Grenzwert eingehalten werden. Für den automatisierten Einfang sollte die eigentliche Fallenposition nicht um mehr als den Radius zu fangender Objekte abweichen.

Die Güte der Interpolation kann auf verschiedene Arten beschrieben werden. Bei dieser Untersuchung wurde die maximale und die RMS-Abweichung der Differenz zwischen gemessenen und interpolierten Werten zur Beurteilung herangezogen. Die Güte der Interpolation hängt stark von der Anzahl der Stützstellen sowie dem Grad des Polynoms ab. Dabei kann nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass ein höherer Polynomgrad auch die Interpolationsgüte verbessert. Bei den hier vorliegenden nahezu linearen Kurven ist jedoch davon auszugehen, dass bei Interpolation mit höherem Grad leichte Abweichungen besser erfasst werden. Die Anzahl an benötigten Stützwerten (und damit Messpunkte) nimmt jedoch mit zunehmendem Polynomgrad zu, was sich sehr stark auf die Messdauer auswirkt. Aus diesem Grund wurde versucht, einen Kompromiss zwischen Interpolationsgüte und Messdauer zu finden.

Tabelle 5.5 zeigt die Abweichung für die laterale Kalibrierung und Tabelle 5.6 die Abweichung für die dreidimensionale Kalibrierung mit einem 63×-Objektiv in Abhängigkeit verschiedener Polynomgrade. Wie zu erwarten, verbessert sich die Interpolationsgüte mit zunehmendem Polynomgrad. Bei der lateralen Kalibrierung ist ab einem Polynomgrad von  $n=4$  keine deutliche Verbesserung der Interpolationsgüte zu erkennen. Bei der dreidimensionalen Kalibrierung kann dies erst ab einem Polynomgrad von  $n=8$  festgestellt werden. Hier spielt insbesondere die hohe Ungenauigkeit der Reproduzierbarkeit der z-Positionierung eine große Rolle. Die Reproduzierbarkeit der Objektivposition<sup>16</sup> und damit die Genauigkeit der axialen Positionierung beträgt etwa  $\pm 400 \text{ nm}$ , und ist damit deutlich ungenauer als der Polynomfit. Diese relativ starken axialen Positionsabweichungen können vor allem beim Einfang kleinerer Objekte zu Problemen führen. Es wird also bereits bei der Messung ein starker Fehler eingeführt.

Wird davon ausgegangen, dass im Regelfall Objekte mit einem Radius von mindestens  $0,5 \mu\text{m}$  gefangen werden, so ist die Genauigkeit der lateralen Positionierung für jeden Polynomgrad völlig ausreichend. Um die Zuverlässigkeit zu erhöhen, kann jedoch ein höherer Polynomgrad gewählt werden. Grad 2-4 stellen dabei einen guten Kompromiss zwischen Genauigkeit und Messdauer dar.

Die dreidimensionale Kalibrierung benötigt hingegen eine deutlich höhere Anzahl von Messstellen, um eine ausreichende Interpolationsgüte zu erreichen. Da sich die Messdauer mit zunehmendem Polynomgrad sehr stark erhöht ( $(m_1 + 1)^2 \cdot (m_2 + 1)$ ), muss abhängig von der Anwendung entschieden werden, welche Genauigkeit der axialen Positionierung erforderlich ist. Grundsätzlich muss jedoch zusätzlich die relativ hohe Ungenauigkeit der Reproduzierbarkeit der z-Positionierung miteinbezogen werden.

---

<sup>16</sup>Gemessen durch mehrmaliges Scharfstellen der Objektebene.



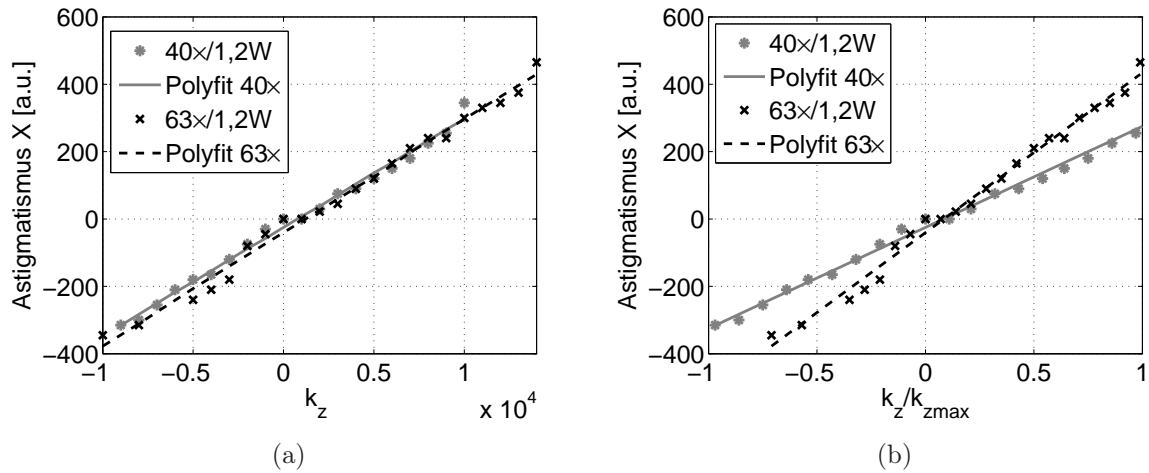


Abbildung 5.39.: Messung des Astigmatismus bei Defokussierung der Falle.

(a) in Abhängigkeit des Hologrammparameters  $k_z$ . Der eingeführte Astigmatismus ist nahezu unabhängig vom verwendeten Objektiv sondern abhängig vom eingeschriebenen Defokus. Dies lässt darauf schließen, dass der größte Teil des Astigmatismus bereits im Add-on-Modul sowie der restlichen Mikroskopoptik eingeführt wird.

(b) in Abhängigkeit des normierten Hologrammparameters  $k_z/k_{zmax}$ . Aufgrund des geringeren Durchmessers der EP des 63x-Objektivs wird zur Defokussierung ein größeres  $k_{zmax}$  verwendet. Dies führt zu einem verstärkten Einfluss der Aberrationen über den Defokusbereich.

Polynomgrad $m_1$	1	2	4	6	8	10	12
Maximale Abweichung [ $\mu\text{m}$ ]	210,37	97,98	77,30	71,17	67,14	64,56	59,94
RMS-Abweichung [ $\mu\text{m}$ ]	55,36	36,15	33,40	31,53	29,81	27,31	25,59
Benötigte Messpunktanzahl [ $\mu\text{m}$ ]	4	9	25	49	81	121	169

Tabelle 5.5.: Abweichung der Position sowie Anzahl der benötigten Messpunktanzahl für verschiedene Polynomgrade des lateralen Polynomfits.

Polynomgrad $m_2$	1	2	4	6	8	10
Maximale Abweichung [ $\mu\text{m}$ ]	1453,23	579,87	440,86	220,98	118,65	119,70
RMS-Abweichung [ $\mu\text{m}$ ]	657,85	218,17	165,83	97,56	47,94	39,09
Benötigte Messpunktanzahl [ $\mu\text{m}$ ]	50	75	125	175	225	275

Tabelle 5.6.: Abweichung der Position sowie Anzahl der benötigten Messpunktanzahl (bei Annahme eines lateralen Polynomfit mit dem Grad 4) für verschiedene Polynomgrade des axialen Polynomfits.

Grundsätzlich zeigt sich jedoch, dass (besonders die laterale) Kalibrierung von Hologramm und Objektebene mit einem relativ einfachen Verfahren ermöglicht werden kann. Dies ist eine wichtige Voraussetzung zur Realisierung eines automatischen Einfangs sowie einer automatisierten Manipulation der Objekte. Die hier vorgestellte axiale Kalibrierung ist aufgrund der relativ hohen Ungenauigkeit der z-Verstellung nicht ausreichend für eine Automatisierung des Einfangs mit holografischer Doppelfallen. Hier kann aber mit einer entsprechend hochwertigeren Mechanik Abhilfe geschaffen werden.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Diagnose-Verfahren mit Hilfe der holografischen Pinzette untersucht, welches markerfrei arbeitet und damit die Schädigung von biologischen Objekten verhindert. Hierfür wurde zunächst ein kompaktes Add-on-Modul für ein Standard-Forschungsmikroskop entwickelt. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von optischen Kräften zwischen gesunden Zellen, Krebszellen und mit Medikamenten behandelten Krebszellen bereits in einem sehr frühen Stadium unterschieden werden kann. Da Zellen in ihren Eigenschaften stark streuen, ist eine Automatisierung und Parallelisierung für den praktischen Einsatz unerlässlich um den Zelldurchsatz zu erhöhen.

Als ein erster Schritt in diese Richtung wurden die Aspekte der Automatisierung des optischen Einfangs beleuchtet und Verbesserungsansätze untersucht, welche die Vorteile der holografischen Manipulation nutzen.

Es konnte die zur Parallelisierung benötigte gleichzeitige Manipulation mehrerer Objekte demonstriert werden. Dabei ist die Anzahl eingefangener Objekte nicht ausschließlich vom Orts-Bandbreite-Produkt des Lichtmodulators sondern auch von der Laserleistung, der der Lichtmodulator standhält, abhängig.

Durch Verwendung axial ausgedehnter Lichtfelder basierend auf modifizierten Besselstrahlen wurde die Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit des Einfangprozesses erhöht. Dies ist bei einer Automatisierung von großem Vorteil. Es konnte gezeigt werden, dass die Genauigkeit der Positionierung der Fallen mit Hilfe des holografischen Ansatzes weit über den technischen Anforderungen liegt. Mit Hilfe eines Kalibrier-Verfahrens wurde demonstriert, dass eine Automatisierung der lateralen Fallenpositionierung möglich ist. Die axiale Positionierung hingegen leidet unter der geringen Reproduzierbarkeit der Mikroskopobjektiv-Position im gegebenen kommerziellen Mikroskop. Hier kann ein entsprechend geregelter Piezosteller Abhilfe schaffen.

Insbesondere die (für den axialen Einfang benötigte) hohe numerische Apertur führt im praktischen Einsatz zu Beschränkungen. Neben geringem Arbeitsabstand, Schärfentiefe und verhältnismäßig kleinem Objektfeld führt eine hohe NA leicht zu starken Aberrationen. Weiterhin kann die starke Leistungsdichte im Spot zur Schädigung biologischer Objekte führen.

Der holografische Ansatz erlaubt es, Lichtfelder an komplexe Aufgabenstellungen anzupassen. Mit Hilfe von Mehrspottechniken oder auch ausgedehnten Fallen konnte die Leistungsdichte bei Erhaltung des stabilen Einfangs reduziert werden. Zusätzlich erlauben es beide Methoden, nicht-sphärische Objekte zu drehen. Mit Hilfe der Mehrspottechnik ist erstmals eine dreidimensionale Ausrichtung von Objekten im Raum mittels Einzelfallen möglich. Dies kann beispielsweise zur tomographischen Untersuchung von Zellen angewandt werden.

Weiterhin wurde eine neue Methode zum optischen Einfang basierend auf holografischen Doppelfallen (Twin Traps) entwickelt und untersucht. Diese ermöglichen es in konventionellen Mikroskopen erstmals, mit geringer bis mittlerer NA stabil dreidimensional zu fangen. So kann mit einer reduzierten Leistungsdichte bei gleichzeitig erhöhtem Arbeitsabstand, erhöhter Schärfentiefe sowie erweitertem Bildfeld gearbeitet werden.

Eine weitere mögliche Anwendung holografischer Doppelfallen ist deren Einsatz als Beleuchtungssystem in einer holografischen Realisierung des  $4\pi$ -Mikroskops. Auf diese Weise kann der apparative Aufwand eines solchen Geräts deutlich reduziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Funktionsweise prinzipiell nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde eine Methode zur Sortierung bzw. Bereinigung von Zelllinien untersucht. Prinzip hierbei ist die softwaregesteuerte Zerstörung einzelner, unerwünschter Zellen. Zur Automatisierung des Prozesses wurde (aufgrund der UV-Empfindlichkeit von LC-Molekülen) ein DMD-basierter Lichtmodulator eingesetzt. Die Funktionsweise des Skalpells konnte unter Einbeziehung einer Aberrationskorrektur demonstriert werden. Neben der reinen Zerstörung von Zellen ist auch die weitergehende Manipulation durch Schneiden und Bearbeiten von Zellen oder Zellbestandteilen sowie eine Parallelisierung der Vorgänge möglich. Aufgrund der geringen Beugungseffizienz ist das DMD für holografische Anwendungen nicht ideal. Hier besteht die Hoffnung, dass effiziente Schneidkonzepte auf Basis von Multi-Photonen-Prozessen zukünftig mittels LC-Modulatoren realisiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die holografische Pinzette sich sehr gut als Werkzeug zur markerfreien Diagnostik eignet. Die beispielhaften Messungen an den Zellen der Baf-Zelllinie zeigen die Empfindlichkeit und prinzipielle Funktion des Messverfahrens.

Herausforderungen bei der Umsetzung eines automatisierten Einfangs wurden identifiziert und Lösungsvorschläge erarbeitet und untersucht. Somit bildet diese Arbeit den ersten Schritt in Richtung eines vollautomatisierten Werkzeugs, welches zur Diagnose und Medikamentenentwicklung eingesetzt werden kann.

# A. Ergänzendes zum Add-on Modul

## A.1. Eigenschaften eingesetzter Elemente

### A.1.1. Modulationseigenschaften DMD

Die technischen Daten des DMD sind in Tabelle A.1 dargestellt. Die Gesamtbeugungseffizienz des DMD beträgt  $\eta_{DMD} = 0,061$ . Dies berechnet sich nach Gleichung 3.3.5. Herstellerangaben zufolge ist die Reflektivität  $R$  der Spiegel  $R = 89,4\%$  und die Transmission (zweimaliger Durchgang) des Deckglas ist  $1 - A = 97^2\% = 94,1\%$ . Der Füllfaktor beträgt  $FF = 85,2\%$ . DMDs arbeiten grundsätzlich — im Gegensatz zu LCDs — in binärer Amplitudenmodulation, die deutlich ineffizienter ist als Phasenmodulation. Die Effizienz eines binären Amplitudenhologramms eines einfachen Gitters ist  $\eta_H = 10\%$  [152]. Aus diesem Grund ist die Gesamteffizienz der in das DMD eingeschriebenen Hologramme etwa  $\eta_{DMD} = 0,61 \cdot 0,1 = 0,061$ .

Auflösung	1024 × 768 Pixel
Pixelpitch	13,7 μm
Kippwinkel	±12°
Kippachse	45° verdreht
Füllfaktor	85,2%
Spiegelreflektivität	89,4%
DMD Effizienz	64% bei $\lambda = 355$ nm

Tabelle A.1.: Technische Daten des Digital Micromirror Device der Firma Texas Instruments

### A.1.2. Modulationseigenschaften des Holoeye HEO 1080-P

Die Modulationseigenschaften des SLM sind abhängig von der Polarisierung des auf den SLM einfallenden Lichtes. Abbildung A.1 zeigt die Phasen- und Amplitudenmodulation des SLM für zwei unterschiedliche Eingangspolarisationen. Obwohl die Phasenmodulation nahezu unbeeinflusst bleibt, zeigt die Amplitudenmodulation eine starke Abhängigkeit. Ideale Modulationseigenschaften (lineare Phasenmodulation, nahezu konstante Amplitudenmodulation) erhält man für diesen Lichtmodulator bei einer Ein- und Ausgangspolarisation von  $90^\circ$  (parallel zur Tischebene).

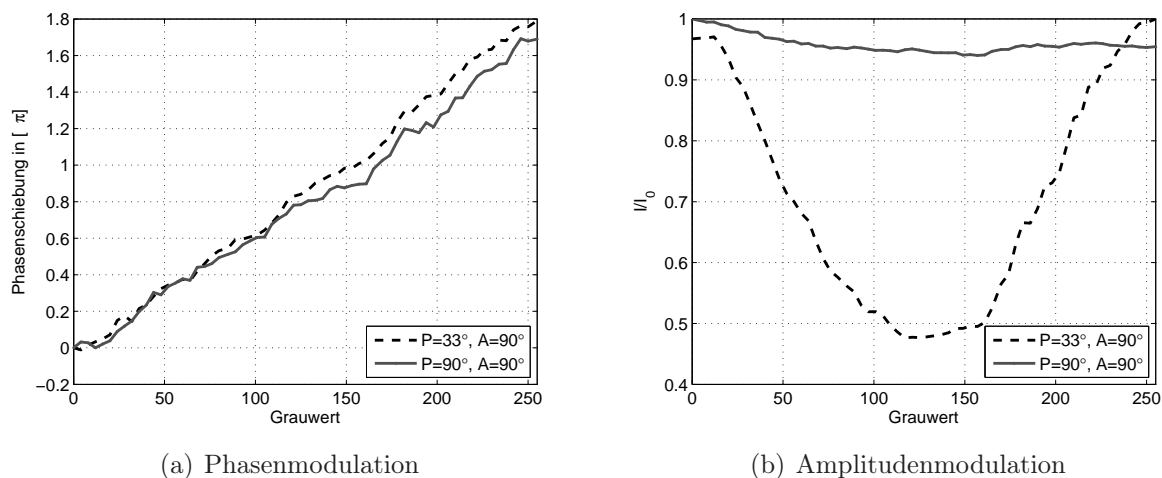


Abbildung A.1.: Modulationseigenschaften des HEO 1080-P Die Analysatorstellung (A) gibt die Eingangspolarisation, die Polarisatorstellung (P) die Ausgangspolarisation an. Ideale Modulationseigenschaften ergeben sich für eine Ein- und Ausgangspolarisation von  $90^\circ$  (parallel zur Tischebene).

Auflösung	$1980 \times 1080$ Pixel
Pixelpitch	$8 \mu\text{m}$
Chipgröße	$15,36 \times 8,64 \text{ mm}^2$
Füllfaktor	87%
Phasenshift	$2\pi$ für bis zu $\lambda = 1550 \text{ nm}$

Tabelle A.2.: Technische Daten des phase-only Displays HEO 1080 P der Firma Holoeye

### A.1.3. Modulationseigenschaften des Holoeye LC-R 2500

Beim LC-R 2500 handelt es sich um ein verdrillt-nematisches LCD der Firma Holoeye. Aufgrund seiner Bauart muss zur Erreichung der für dieses Display optimierten Modulationseigenschaften sowohl ein Polarisator vor, als auch ein Analysator nach dem Display verwendet werden. Bei der Charakterisierung des Elements stellte sich heraus, dass dieses LCD kein reiner Phasenmodulator ist, sondern zusätzlich Amplitudenmodulation aufweist. Für die verwendete Wellenlänge von  $\lambda=1064$  nm kann dieser Modulator keine Phasenschiebung von  $2\pi$  realisieren.

Auflösung	1024 × 768 Pixel
Pixelpitch	19 $\mu\text{m}$
Chipgröße	9,5 × 14,6 mm <sup>2</sup>
Füllfaktor	93%
Phasenshift	$2\pi$ für bis zu $\lambda = 700$ nm

Tabelle A.3.: Technische Daten des Displays LC-R 2500 der Firma Holoeye

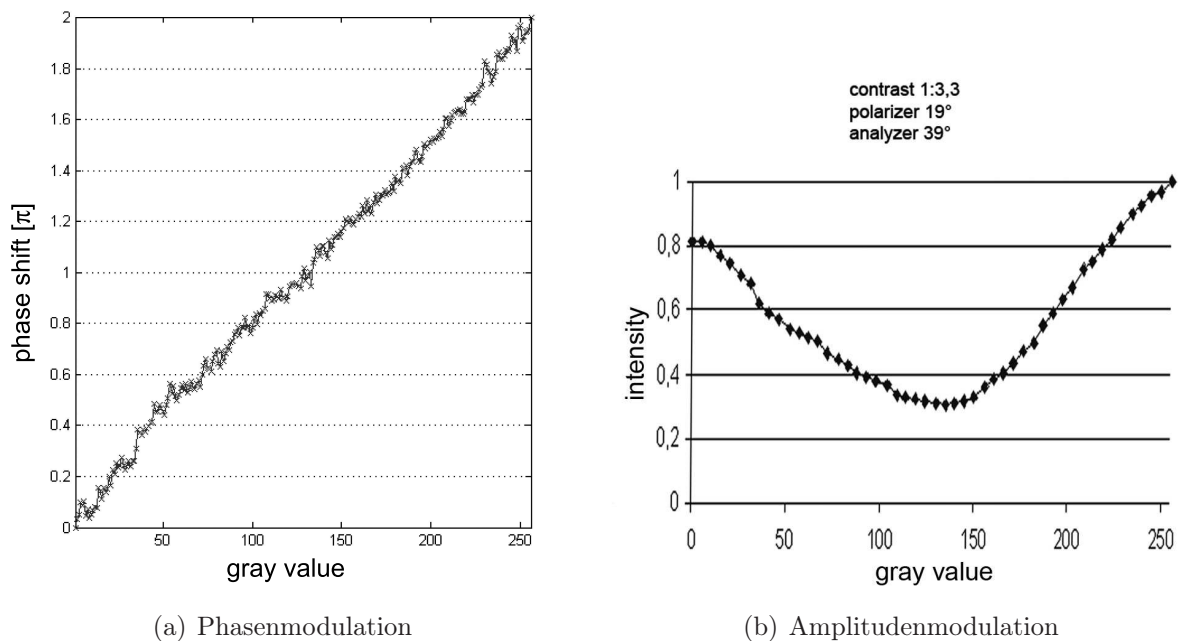


Abbildung A.2.: Modulationseigenschaften des LC-R 2500, gemessen bei einer Wellenlänge von  $\lambda=830$  nm für die optimalen Polarisatoreinstellungen (Polarisator  $39^\circ$ /Analysator  $19^\circ$ , gemessen senkrecht zur Tischebene).

#### A.1.4. Technische Daten des Laser IRE-Polus

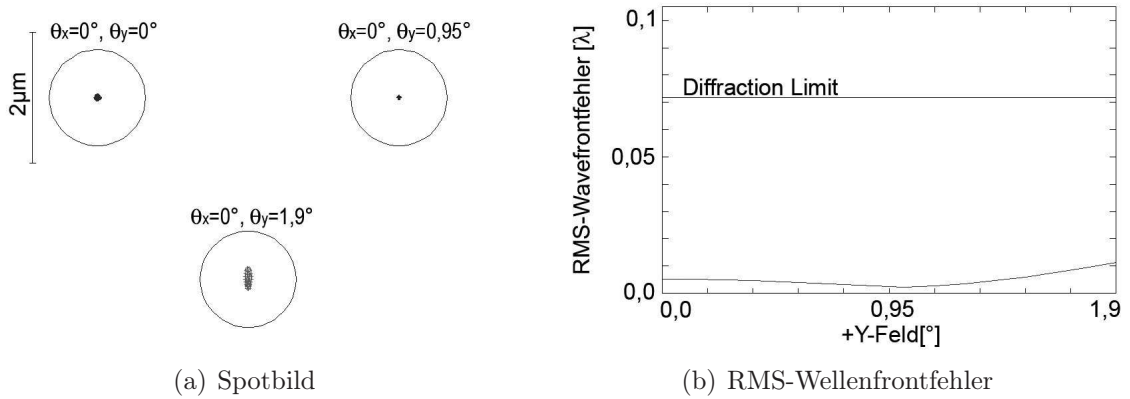
Der zum Einfang verwendete Laser hat die in Tabelle A.4 dargestellten technischen Daten. Es handelt sich hierbei um einen Faserlaser mit einer integrierten Kollimationsoptik, die einen Strahldurchmesser von ca. 70 mm Durchmesser erzeugt. Die maximale Ausgangsleistung beträgt 20 W. Da jedoch der verwendete Lichtmodulator geschont werden soll, wurde die Leistung des Lasers nie über 3 W erhöht. Aufgrund des unpolarisierten Ausgangsstrahls muss zwischen Laser und SLM ein Polarisator eingefügt werden.

Betriebsart	cw
Strahlqualität	TEM <sub>00</sub>
$\lambda$	1064 nm
max. Leistung	20 W
Polarisation	unpolarisiert

Tabelle A.4.: Technische Daten des Lasers IRE-Polus PYL-20M der Firma IP Group



## A.2. Technische Daten des Add-on Moduls



Surf:Type	Comment	Radius	Thickness	Class	Semi-Diameter	Focal Length
Standard	-252.501015	Infinity	Infinity		Infinity	
Standard		Infinity	0.000000		7.100000	
Coordinate E..			0.000000	-	0.000000	0.000000
Standard		Infinity	0.000000	MIRROR	7.350461	
Coordinate E..			-26.000000	-	0.000000	0.000000
Standard	Polarisator	Infinity	-272.506011	V	5.000000	U
Standard	322271	-92.390000	-5.300000	N-BK7	15.750000	U
Standard		84.747000	-2.800000	F4	15.750000	U
Standard		1074.600000	-186.184862	P	15.750000	U
Coordinate E..			0.000000	-	0.000000	0.000000
Standard		Infinity	0.000000	MIRROR	8.454103	
Coordinate E..			4.000000	-	0.000000	0.000000
Standard	Port	Infinity	170.000000		5.495648	
Paraxial	TUBUSLINSE		100.000000		8.952222	164.500000
Standard		Infinity	0.000000		5.900860	
Paraxial	H0		4.112500		5.900860	4.112500
Standard		Infinity	-		0.131684	

(c) Linsendaten

Abbildung A.3.: Spotbild, RMS-Wellenfrontfehler und technische Daten des Add-on Moduls.

### A.2.1. Toleranzen

Zur Analyse der Toleranzen wurden – soweit verfügbar – die Herstellerangaben zu Fertigungstoleranzen verwendet. Bei Achromaten kann davon ausgegangen werden, dass die Toleranz der Ausrichtung der Linsen zueinander aufgrund der Justage bei der Herstellung vernachlässigt werden kann. Es interessiert bei der Toleranzierung also nur die Verkippung und Dezentrierung des gesamten Elements. Über Brechzahl-, Abbezahl- und Radientoleranzen sind keine Angaben verfügbar, weshalb die in ZEMAX vorgegeben Standardtoleranzen übernommen wurden (siehe Tabelle A.5). Neben den Toleranzen für die Linse wurden zudem Toleranzen für die Oberfläche des SLM und Abstände zwischen den Elementen angenommen. Die optischen Elemente des Mikroskops (TL und MO) wurden nicht in die Toleranzierung einbezogen, da sie als perfekt angenommen werden.

	Linse 1 mit Fassung (Linos 322271)	SLM
Dezentrierung	0,08 mm	
Verkippung	0,07°	
Dicken/Abstände	0,20 mm	
Oberflächenunebenheiten	0,2 $\lambda$	
Radius	0,20 mm	–
Brechungsindex	0,001	–
Abbezahl	1%	–

Tabelle A.5.: Toleranzen für die Linsen. Außer für Dezentrierung und Verkippung wurden von den Herstellern keine Angaben gemacht. Aus diesem Grund wurden die ZEMAX Standardeinstellungen übernommen.

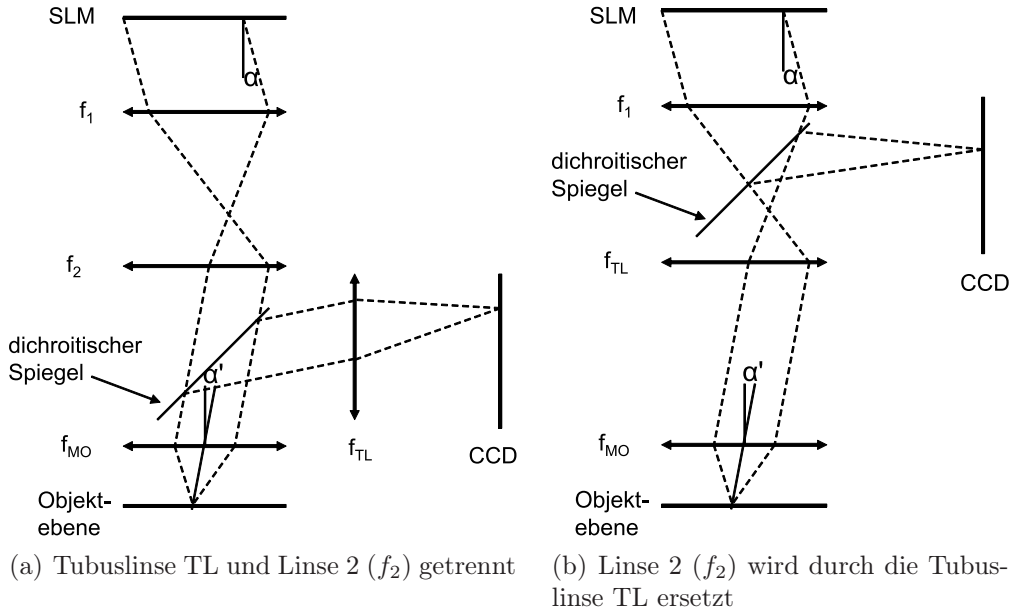


Abbildung A.4.: Zwei mögliche Aufbauten.

### A.2.2. Arbeits- und Objektfeld

Der Arbeitsbereich holografischer Pinzetten  $O_{SLM}$  stimmt meist nicht mit dem Objektfeld  $O_{CCD}$  von Mikroskopen überein. Das Arbeitsfeld hängt neben dem maximalen Beugungswinkel des SLMs auch von der Einkopplung sowie dem verwendeten MO ab. Das Objektfeld wiederum hängt vom Mikroskopobjektiv, der Tubuslinse und der Größe des CCD-Chips ab.

Das SLM realisiert einen maximalen Beugungswinkel  $\alpha$ , der durch  $\sin \alpha = \lambda/g$  gegeben ist. Dabei ist  $g = N \cdot pp$  die Gitterperiode, mit dem Pixelpitch  $pp$  und der Anzahl  $N$  an Graustufen, mit denen das Gitter dargestellt wird (Minimum  $N=2$ ).

Das SLM wird mit Hilfe eines Teleskops mit dem Abbildungsmaßstab  $\beta' = f_2/f_1$  in die Eintrittspupille abgebildet (siehe Abb. A.4(a)). Der Winkel  $\alpha'$  eines Strahls in der Ebene der EP, der durch das SLM um  $\alpha$  ausgelenkt wurde, ergibt sich zu:

$$\alpha' = f_1/f_2 \cdot \alpha = \text{atan} \frac{O_{SLM}}{f_{MO}} \quad (\text{A.1})$$

Für kleine Winkel ( $\sin \alpha = \alpha$ ,  $\sin \alpha' = \alpha'$ ) ergibt sich deshalb für das Arbeitsfeld:

$$O_{SLM} = f_{MO} \cdot \alpha' = f_{MO} \cdot \frac{f_1}{f_2} \cdot \alpha \quad (\text{A.2})$$

Das Objektfeld hingegen ist gegeben durch:

$$O_{CCD} = b_{CCD} \cdot \frac{f_{MO}}{f_{TL}} \cdot \alpha, \quad (\text{A.3})$$

wobei  $b_{CCD}$  die Breite des CCD-Chips darstellt. Deshalb ist das Verhältnis von Arbeitsfeld zu Objektfeld abhängig von der Größe des CCD-Chips und der Brennweite der Linse 1. Das Verhältnis ist hingegen unabhängig vom Mikroskopobjektiv:

$$\frac{O_{SLM}}{O_{CCD}} = \frac{f_1 \cdot f_{TL} \cdot \alpha}{b_{CCD} \cdot f_2} \quad (\text{A.4})$$

Wird die Tubuslinse als Linse 2 verwendet, wie das für das Add-on Modul der Fall ist ( $f_2 = f_{TL}$ , siehe Abb. A.4(b)), so hängt das Arbeitsfeld nur vom maximalen Beugungswinkel  $\alpha$  des SLM, der Größe des CCD-Chips und  $f_1$  ab:

$$\frac{O_{SLM}}{O_{CCD}} = \frac{f_1 \cdot \alpha}{b_{CCD}} \quad (\text{A.5})$$

Tabelle A.6 zeigt das relative und absolute Arbeitsfeld des Add-on Moduls (Abschnitt 4.1) für zwei verschiedene Mikroskopobjektive. Dabei wird die Breite des CCD-Chips als Referenz verwendet ( $b_{CCD} = 8952,6 \mu\text{m}$ ). Das Arbeitsfeld wurde für zwei verschiedene Werte  $\alpha$  betrachtet: den maximalen Wert  $\alpha$  mit N=2 Graustufen sowie N=4 Graustufen, da hierbei im Gegensatz zu N=2 noch eine sehr gute Beugungseffizienz gewährleistet wird (80%).

Objective (Zeiss)	40×/1,2W	63×/1,2W
$O_{SLM}$ N=4	124 $\mu\text{m}$	78 $\mu\text{m}$
$\frac{O_{SLM}}{O_{CCD}}$ , N=4	0,55	0,55
$O_{SLM}$ N=2	248 $\mu\text{m}$	157 $\mu\text{m}$
$\frac{O_{SLM}}{O_{CCD}}$ , N=2	1,11	1,11

Tabelle A.6.: Relatives Arbeitsfeld  $\frac{O_{SLM}}{O_{CCD}}$  und absolutes Arbeitsfeld  $O_{SLM}$  für zwei verschiedene Beugungsgitter.

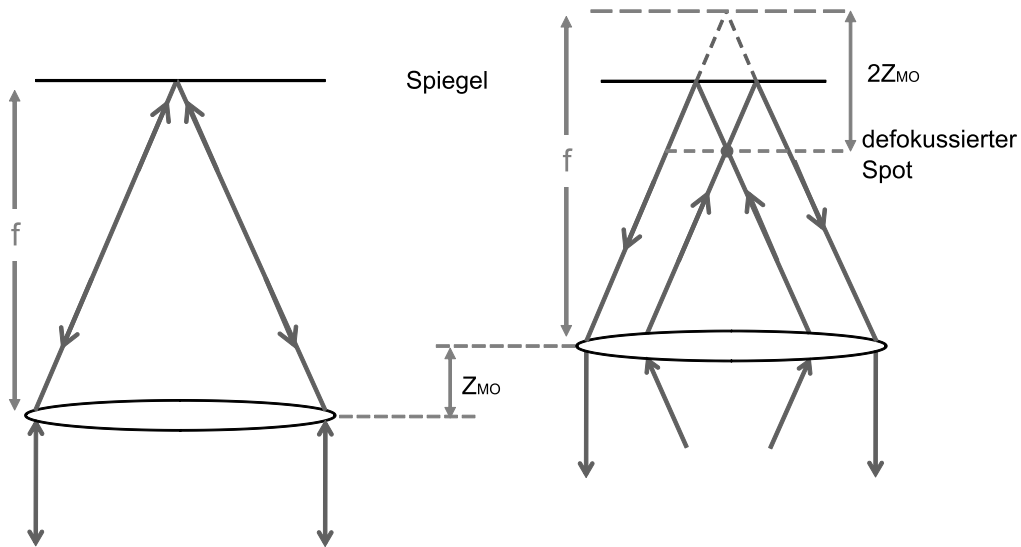


Abbildung A.5.: Defokussierung des Mikroskopobjektivs.

### A.2.3. Verschiebung des Mikroskopobjektivs

Zur Messung der Defokussierung der Falle wird ein Spiegel in die Objektebene eingebracht. Es wird also die Reflexion des Spots am Spiegel betrachtet.

Die Beobachtungsebene eines auf Unendlich korrigierten Mikroskopobjektivs – also die Ebene, die scharf auf die Kamera abgebildet wird – ist immer die Fokusebene des Mikroskopobjektivs. Das heißt, um eine andere Ebene scharf zu stellen, muss das Objekt oder das Mikroskopobjektiv axial verschoben werden. Bei dem hier verwendeten kommerziellen Zeiss Axiovert 200M wird das Mikroskopobjektiv verschoben.

Abbildung A.5 zeigt den Strahlengang bei Einkopplung eines kollimierten Laserstrahls (links) und eines defokussierten Laserstrahls (rechts). Um den Spot des defokussierten Laserstrahls scharf auf die Kamera abbilden zu können, muss auf dem Rückweg hinter dem Mikroskopobjektiv wieder ein paralleler Strahl vorliegen. Dies wird erreicht, indem das MO so verschoben wird, dass der Fokus oder das virtuelle Bild des Fokus in der Fokusebene des Objektivs liegt. Hierzu wird das Mikroskopobjektiv um  $Z_{MO}$  verschoben, um einen um  $2Z_{MO}$  verschobenen Spot abzubilden. Im hier verwendeten Aufbau führt eine Defokussierung mit einem positiven Hologrammparameter  $k_z$  zu einer negativen Defokussierung  $-Z_{MO}$ .

Objektiv	Abstand SLM–Linse 1 [mm]	Abstand TL-EP
20×	217	154,3
40×	231	145,0
50×	238	140,3
63×	231	145,0

Tabelle A.7.: Gemessener Abstand SLM–Linse 1 für verschiedene Objektive und die daraus (mit Zemax) ermittelten Abstände TL-EP

#### A.2.4. Justagevorschrift für das Add-on Modul

Die Justage des Systems erfolgt in mehreren Schritten:

1. Justage des Teleskops: Mit Hilfe eines Kollimationstesters der Firma Mirage (basierend auf einer Doppel-Shearplatte) in der Objektebene (ohne Mikroskopobjektiv) wird Linse 1 in die richtige Position gebracht.
2. Die Position des SLM kann nun ermittelt werden. Hierzu wird ein Filter (z.B. Zernike Ringblende) in die Mikroskopbeleuchtung eingeschwenkt und dessen Abbildung in der Fourierebene der Objektebene – und damit SLM-Ebene – gesucht. Hierzu muss eine korrekte Köhlersche Beleuchtung vorliegen sowie das MO für den „Standard-Trapping-Fall“ (Fokussierung auf Oberseite Deckglas 0,17 mm) fokussiert werden. Da die Lage der EP und damit auch der Fourierebene der verschiedenen MOs variiert, muss ein Kompromiss für die Position des SLM gefunden werden (siehe hierzu Tabelle A.7). Da die Lage der Eintrittspupille des 40×- und des 63×-Objektivs nahezu an der gleichen Stelle liegen und diese Objektive sich am besten für den Einfang eignen, wurde der SLM an dieser Stelle fixiert. Für die anderen Objektive ergibt sich ein Defokus in der EP, der über das Hologramm ausgeglichen werden muss (siehe hierzu Abschnitt 4.1.3).
3. Der Laser kann nun nach Entfernung von Linse 1 unter Zuhilfenahme von Blenden und einer Kamera zur Beobachtung auf die optische Achse gebracht werden. Hierbei hilft das zweistufige Spiegelsystem.
4. In einem letzten Schritt wird ein Polarisator eingefügt, der die unpolarisierte Laserstrahlung parallel zur Tischebene polarisiert. Dies entspricht der idealen Einfallspolarisation des SLM und in diesem Fall zufälligerweise auch der des polarisationsabhängigen Prismas. Sollte dies nicht der Fall sein kann mit Hilfe einer  $\lambda/2$ -Platte die Polarisation entsprechend gedreht werden. Anschließend kann nach erneuter Kontrolle der optischen Achse Linse 1 wieder eingefügt werden.

### A.3. 4f-Aufbau mit verschobener Abbildungsebene

Da der Abstand zwischen Tubuslinse und Eintrittspupille nicht genau der Brennweite der Tubuslinse entspricht, kann nicht mit einem traditionellen 4f-Aufbau eingekoppelt werden. Es wird eine 4f-ähnliche Anordnung verwendet, deren Bild- und Objektebene sich nicht in der Brennweite der beiden Linsen befinden.

Zur Berechnung des Einflusses dieser Verschiebung wird die Operatorrechnung verwendet [55]. Dabei wird eine skalierte Fouriertransformation folgendermaßen dargestellt:

$$\mathcal{V} \left[ \frac{1}{\lambda f} \right] \mathcal{F} = \mathcal{R} [f] \mathcal{Q} \left[ -\frac{1}{f} \right] \mathcal{R} [f] \quad (\text{A.6})$$

Hierbei wird die Skalierung um einen Faktor  $c$  durch  $\mathcal{V} [c]$  und die Fouriertransformation durch  $\mathcal{F}$  dargestellt. Die skalierte Fouriertransformation kann aus einer Folge aus Propagation  $\mathcal{R}$  um die Brennweite  $f$ , einem Linsenterm  $\mathcal{Q}$  mit der Brennweite  $f$  sowie einer weiteren Propagation um die Brennweite  $f$  darstellt werden.

Für einen traditionellen 4f-Aufbau mit den Brennweiten  $f_1$  und  $f_2$  ergibt sich eine Folge aus zwei (abhängig von der jeweiligen Brennweite unterschiedlich skalierten) Fouriertransformationen (Skalierung  $\mathcal{V}$ , Fouriertransformation  $\mathcal{F}$ ), die nach den Regeln der Operatorrechnung umgestellt werden können:

$$\mathcal{V} \left[ \frac{1}{\lambda f_2} \right] \mathcal{F} \mathcal{V} \left[ \frac{1}{\lambda f_1} \right] \mathcal{F} \quad (\text{A.7})$$

$$= \mathcal{V} \left[ \frac{1}{\lambda f_2} \right] \mathcal{F} \mathcal{F} \mathcal{V} [\lambda f_1] \quad (\text{A.8})$$

$$= \mathcal{V} \left[ \frac{1}{\lambda f_2} \right] \mathcal{V} [-1] \mathcal{V} [\lambda f_1] \quad (\text{A.9})$$

$$= \mathcal{V} \left[ -\frac{f_1}{f_2} \right] \quad (\text{A.10})$$

$$= \mathcal{V} \left[ -\frac{1}{\beta'} \right] \quad (\text{A.11})$$

Entsprechend ergibt sich für einen 4f-Aufbau mit verschobener Abbildung (siehe Abbildung A.6) die Folge aus der Propagation zur Brennebene, der traditionellen 4f-Anordnung und darauf folgend die Propagation zur Bildebene. Befindet sich das Objekt in der Entfernung  $\Delta z$  vom Brennpunkt der Linse 1 entfernt, so gilt für die Ebene in der Entfernung  $\Delta z' = \beta'^2 \Delta z$  vom Brennpunkt der Linse 2:

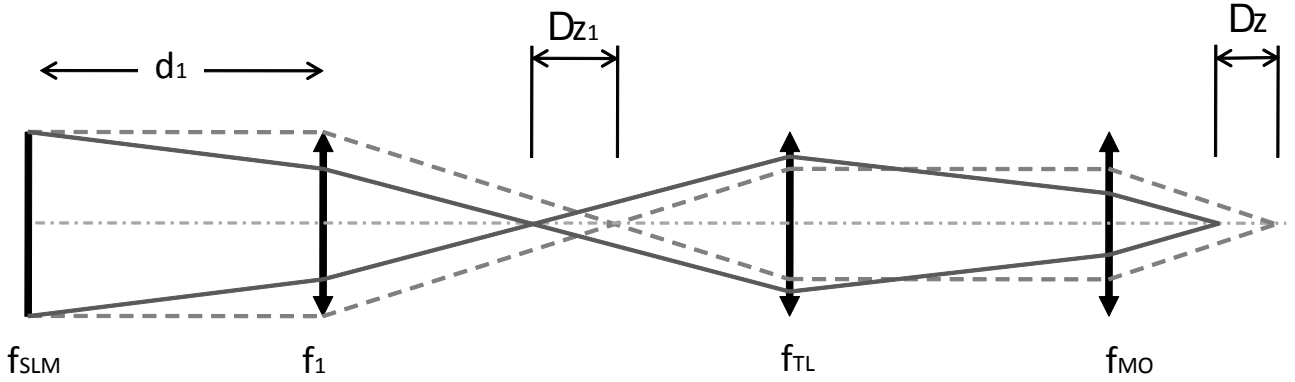


Abbildung A.6.: Traditionelle 4f-Anordnung (gestrichelte Linie) und 4f-Anordnung mit verschobener Abbildung (durchgezogene Linie).

$$\mathcal{R}[-\beta'^2 \Delta z] \mathcal{V} \left[ -\frac{1}{\beta'} \right] \mathcal{R}[\Delta z] \quad (\text{A.12})$$

$$= \mathcal{V} \left[ -\frac{1}{\beta'} \right] \mathcal{R}[-\Delta z] \mathcal{R}[\Delta z] \quad (\text{A.13})$$

$$= \mathcal{V} \left[ -\frac{1}{\beta'} \right] \quad (\text{A.14})$$

Es ergibt sich also für eine konventionelle 4f-Anordnung und eine 4f-Anordnung mit verschobener Abbildung dieselbe Wellenfront in der entsprechenden Bildebene. Die Bildebene einer 4f-Anordnung mit verschobener Abbildung befindet sich in der Entfernung  $\Delta z' = \beta'^2 \Delta z$ .



## B. Zernike Polynome

Wellenfronten werden häufig mit Hilfe von Zernikepolynomen beschrieben, da diese eine direkte Aussage über die Aberrationen erster Ordnung (sphärische Aberration, Astigmatismus, Koma, etc.) zulassen [112]. Eine kontinuierliche Wellenfront kann mit Hilfe einer Linearkombination von Zernikepolynomen dargestellt werden:

$$W(x, y) = \sum_{r=0}^L Z_r U_r(x, y), \quad (\text{B.1})$$

mit dem Zernikekoeffizient  $Z_r$  und dem Zernikepolynom  $U_r$  der Aberration  $r$ . Tabelle B.1 zeigt eine Übersicht über die ersten 13 Zernikepolynome. Es sei angemerkt, dass unterschiedliche Autoren die Zernikepolynome unterschiedlich ordnen. Hier wird die Definition nach Malacara [112] verwendet.

r	Zernikepolynom $U_r$	Zernikekoeffizient	Bedeutung
1	1	$Z_1$	Piston, Phasenoffset
2	$\rho \sin \vartheta$	$Z_2 = k'_x$	Tilt x-Achse
3	$\rho \cos \vartheta$	$Z_3 = k'_y$	Tilt y-Achse
4	$\rho^2 \sin 2\vartheta$	$Z_4 = Z_{Ax}$	Astigmatismus 45°
5	$2\rho^2 - 1$	$Z_5 = k'_z$	Defokus
6	$\rho^2 \cos 2\vartheta$	$Z_6 = Z_{Ay}$	Astigmatismus 90°
7	$\rho^3 \sin 3\vartheta$	$Z_7$	
8	$(3\rho^3 - 2\rho) \sin \vartheta$	$Z_8 = Z_{Cx}$	Primäre Koma x-Achse
9	$(3\rho^3 - 2\rho) \cos \vartheta$	$Z_9 = Z_{Cy}$	Primäre Koma y-Achse
10	$\rho^3 \cos 3\vartheta$	$Z_{10}$	
11	$\rho^4 \sin 4\vartheta$	$Z_{11}$	
12	$(4\rho^4 - 3\rho^2) \sin 2\vartheta$	$Z_{12}$	
13	$6\rho^4 - 6\rho^2 + 1$	$Z_{13} = Z_{SA}$	Primäre sphärische Aberration

Tabelle B.1.: Übersicht über die ersten 13 Zernikepolynome nach Malacara [112] sowie die Bezeichnung der Zernikekoeffizienten, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden.

# C. Herleitungen

## C.1. Herleitung der Kalibrierungsfunktionen

Bei der Kalibrierung wird der Zusammenhang zwischen Hologrammparametern und der Spotauslenkung ermittelt. Bei der modellbasierten Kalibrierung wird hierzu der Softwarecode betrachtet und die Auslenkung des berechneten Hologramms einbezogen.

### C.1.1. Laterale Kalibrierung

Die Herleitung wird hier für den Hologrammparameter  $k_x$  durchgeführt. Die Herleitung für  $k_y$  ergibt sich analog.

Die Hologrammberechnungssoftware berechnet die Phasenschiebung  $\varphi(r_0)$  für jedes einzelne Pixel im (normierten) Abstand  $r$  vom Mittelpunkt des SLM mit  $r_0 = r/r_1$ . Hierbei ist  $r$  der Abstand (in Pixeln) vom Mittelpunkt des SLM und  $r_1$  der Radius der Normierung. Aus historischen Gründen wird hier  $r_1 = 384$  verwendet<sup>1</sup>.

Die laterale Bewegung der Falle wird durch einen Phasenkeil  $\varphi(r_0) = k'_x \cdot r_0$  erzeugt. Aufgrund der Normierung auf 256 Graustufen ergibt sich dabei als Phasenschiebung jedes einzelnen Pixels:

$$\varphi(r) = k'_x \cdot r = \frac{1}{256} \cdot \frac{r}{r_1} \cdot k_x = \frac{1}{3 \cdot 2^{15}} \cdot k_x \quad (\text{C.1})$$

Damit ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Hologramm-Eingabeparametern  $k_x$  (im folgenden Hologrammparameter genannt) und dem Hologrammkoeffizienten  $k'_x$  (siehe Gleichung 3.3):

$$k_x = 3 \cdot 2^{15} \cdot k'_x \quad (\text{C.2})$$

---

<sup>1</sup>Am ITO wurde der Algorithmus ursprünglich für ein SLM mit 768 Pixeln Höhe programmiert. Um die gleichen Hologramme mit unterschiedlichen SLMs darstellen zu können, wurde der Algorithmus seither nicht angepasst.

Die Phasenschiebung  $\varphi(r) = 1$  entspricht dabei einer Phasenschiebung von  $2\pi$  durch den SLM. Der Beugungswinkel  $\alpha$  eines Hologramms mit der Gitterkonstante  $g$  ist gegeben durch

$$\sin \alpha = \lambda/g. \quad (\text{C.3})$$

Ein Hologramm, das mit Hilfe eines SLM mit dem Pixelpitch  $pp$  dargestellt wird, besitzt die Gitterkonstante

$$g = N \cdot pp = \frac{pp}{k'_x} \quad (\text{C.4})$$

Dabei ist  $N = 1/k'_x$  die Anzahl von Pixeln, die eine Periode darstellen.

Mit Gleichungen C.1, C.3 und C.4 ergibt sich der Beugungswinkel in Abhängigkeit des Hologrammkoeffizienten  $k_x$ :

$$\sin \alpha_x = \frac{\lambda}{3 \cdot 2^{15} \cdot pp} \cdot k_x \quad (\text{C.5})$$

Oder anders ausgedrückt: Das Produkt von Hologrammkoeffizient  $k_x$  und Gitterkonstante  $g$  ist konstant:

$$k_x \cdot g = k_x \cdot \frac{\lambda}{\sin \alpha_x} = 3 \cdot 2^{15} \cdot pp = \text{const.} \quad (\text{C.6})$$

Mit Hilfe des Beugungswinkel lässt sich nun die laterale Verschiebung  $\Delta x$  des Spots in der Objektebene berechnen. Diese Verschiebung ist abhängig vom optischen System, das zur Transformation verwendet wird. Das Hologramm wird mit Hilfe eines 4f-Aufbaus mit den Brennweiten  $f_1$  und  $f_{TL}$  (siehe Abschnitt A.2.2) in die Eintrittspupille des MO abgebildet. Der Beugungswinkel in der Eintrittspupille  $\alpha'$  ist gegeben durch  $\alpha' = f_1/f_{TL} \cdot \alpha$  (siehe Abschnitt A.2.2). Dieser Beugungswinkel in der Eintrittspupille führt zu einer Verschiebung des Spots  $\Delta x$ :

$$\tan \alpha' = \frac{\Delta x}{f_{MO}}. \quad (\text{C.7})$$

Für kleine Winkel gilt dann :

$$\Delta x = f_{MO} \cdot \frac{f_1}{f_{TL}} \cdot \alpha_x. \quad (\text{C.8})$$

### C.1.2. Axiale Kalibrierung

Die Hologrammberechnungssoftware berechnet die Phasenschiebung  $\varphi(r)$  für jedes einzelne Pixel im Abstand  $r$  vom Mittelpunkt des SLM. Die axiale Bewegung der Falle wird durch einen quadratischen Phasenterm  $\varphi_z(r_0) = (2r_0^2 - 1) \cdot k'_z$  (vergleiche Zernikepolynom Defokus) realisiert.

Die Phasenschiebung  $\varphi_z$  eines Pixels in der SLM-Ebene in einem bestimmten Abstand vom Mittelpunkt des SLM  $r = r_1 \cdot r_0$  mit  $r_1 = 384$  ist im Algorithmus der Hologrammberechnung unter Berücksichtigung der Graustufennormierung wie folgt gegeben:

$$\varphi_z = (2r_0^2 - 1) \cdot k'_z = \left( 2 \cdot \left( \frac{r}{r_1} \right)^2 - 1 \right) \cdot \frac{1}{256} \cdot k_z \quad (\text{C.9})$$

Wie auch bei der lateralen Kalibrierung entspricht  $\varphi_z(r) = 1$  einer realen Phasenschiebung von  $2\pi$ . Der dadurch dargestellte Linsenterm erzeugt eine Brennweite in der Entfernung  $f_{SLM}$ . Die im SLM dargestellte Linse entspricht einer Fresnelschen Zonenplatte. Aus diesem Grund lässt sich die Brennweite  $f_{SLM}$  analog berechnen. Für eine ebene Beleuchtung einer Zonenplatte gilt [144]:

$$f_{SLM} = \frac{(pp \cdot r)^2}{n\lambda}, \quad (\text{C.10})$$

wobei  $n$  die Anzahl der Zonen der Zonenplatte ist (bei der Zonenplatte entspricht eine Zone einem Phasenhub von  $\pi$ ). Für eine Phasenschiebung von  $2\pi$  ergeben sich also  $n=2$  Zonen, was in unserem Fall jedoch einer Phase von  $\varphi_z = 1$  entspricht. Somit ergibt sich:

$$f_{SLM} = \frac{(pp \cdot r)^2}{2\varphi_z \lambda}. \quad (\text{C.11})$$

Mit den Gleichungen C.9 und C.11 ergibt sich die Brennweite des SLMs in Abhängigkeit des Hologrammkoeffizienten  $k_z$ :

$$f_{SLM} = \frac{9 \cdot 2^{20} \cdot pp^2}{k_z \cdot \lambda} \quad (\text{C.12})$$

Wird eine Punktlichtquelle in der Objektebene des Mikroskops um einen Offset  $\Delta z$  aus der nominellen Fokusebene verschoben, so ergibt sich die Phasenfront  $\phi$  in der Pupille (EP) des Mikroskopobjektivs, das nach der Sinusbedingung korrigiert ist, zu [20]:

$$\phi = nk\Delta z \left( 1 - s^2 \frac{\rho^2}{2} - s^4 \frac{\rho^4}{8} + \dots \right), \quad (\text{C.13})$$

mit der Wellenzahl  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ , dem normierten Pupillenradius  $\rho = r/r_{EP}$  und  $s = NA/n$ , wobei  $NA$  die numerische Apertur des Objektivs und  $n$  der Brechungsindex des Immersionsmediums ist.

Will man nun einen eingekoppelten Laserstrahl um  $\Delta z$  in der Objektebene defokussieren, so muss man die Phasenfront in der Eintrittspupille entsprechend Gleichung C.13 manipulieren. Vernachlässigt man dabei den Einfluss sphärischer Aberration, so ergibt sich:

$$\phi = nk\Delta z \left( 1 - s^2 \frac{\rho^2}{2} \right), \quad (\text{C.14})$$

Die Steigung in einem Punkt der Wellenfront einer defokussierten Welle ergibt sich zu

$$\frac{\delta\phi}{\delta\rho} = -nk\Delta z s^2 \rho. \quad (\text{C.15})$$

Hieraus ergibt sich  $\Delta z$ :

$$\Delta z = \frac{-1}{nks^2\rho} \cdot \frac{\delta\phi}{\delta\rho}. \quad (\text{C.16})$$

Die Krümmung  $\frac{\delta\phi}{\delta\rho}$  der Wellenfront in der Eintrittspupille des MO kann durch eine Brennweite  $f_{EP}$  (siehe hierzu Abschnitt C.1.3, Gleichung C.28) dargestellt werden. Nach Abbildung C.1 ergibt sich mit  $\rho = r/r_{EP}$  dann folgender Zusammenhang:

$$\frac{\delta\phi}{dr} \frac{\lambda}{2\pi} = \frac{\delta\phi/k}{\delta\rho \cdot r_{EP}} = \frac{r}{f_{EP}} \quad (\text{C.17})$$

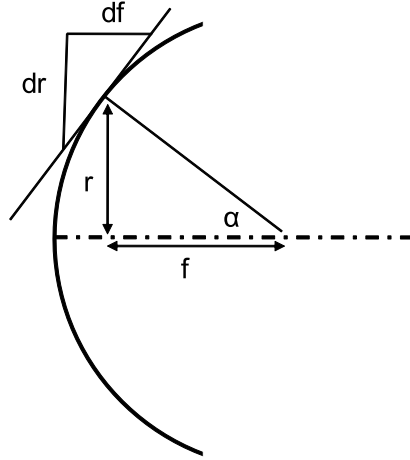
$$\frac{\delta\phi}{\delta\rho} = \frac{\rho \cdot r_{EP}^2 \cdot k}{f_{EP}} \quad (\text{C.18})$$

Aus den Gleichungen C.16 und C.18 ergibt sich dann für die Defokussierung der Falle:

$$\Delta z = \frac{-r_{EP}^2}{ns^2 \cdot f_{EP}}, \quad (\text{C.19})$$

oder mit  $f_{EP} = \beta'^2 \cdot f_{SLM}$  (siehe Abschnitt C.1.3) und  $s = NA/n$ :

$$\Delta z = \frac{-nr_{EP}^2}{NA^2 \cdot \beta'^2 \cdot f_{SLM}}. \quad (\text{C.20})$$


 Abbildung C.1.: Kugelwelle, die in der Brennweite  $f$  konvergiert.

### C.1.3. Brennweite des mittels SLM dargestellten Defokusterns

Zur Berechnung der Brennweite des SLMs wird die Steigung der durch das Hologramm  $U_P$  erzeugten Wellenfront  $W_{SLM}$  betrachtet (siehe Gleichung C.14):

$$\phi_{SLM} = nk\Delta z \left( 1 - s^2 \frac{r^2}{2r_{SLM}^2} \right) \quad (C.21)$$

mit dem effektiv genutzten Radius des SLM  $r_{SLM}$ . Die Steigung der Wellenfront ergibt sich zu

$$\frac{\delta W_{SLM}}{\delta r} = -nk\Delta z s^2 \frac{r}{r_{SLM}^2}. \quad (C.22)$$

Das SLM wird mit dem Abbildungsmaßstab  $\beta'$  in die Eintrittspupille abgebildet. Wird nur ein Teil des SLM in die EP eingekoppelt, so gilt folglich:

$$r_{EP} = \beta' r_{SLM} \quad (C.23)$$

Aus diesem Grund gilt für die Wellenfront in der EP analog zur Wellenfront hinter dem SLM:

$$\phi_{EP} = nk\Delta z \left( 1 - s^2 \frac{r^2}{2(\beta' \cdot r_{SLM})^2} \right) \quad (C.24)$$

$$\frac{\delta\phi_{EP}}{\delta r} = -nk\Delta z s^2 \frac{r}{(\beta' \cdot r_{SLM})^2}. \quad (\text{C.25})$$

Aus Gleichung C.22 und C.25 folgt:

$$\beta'^2 \frac{r}{f_{EP}} = \beta'^2 \frac{\delta\phi_{EP}}{\delta r} = \frac{\delta\phi_{SLM}}{\delta r} = \frac{r}{f_{SLM}} \quad (\text{C.26})$$

Mit

$$\frac{\delta\phi}{\delta r} = \frac{r}{f} \quad (\text{C.27})$$

(siehe hierzu Abbildung C.1) ergibt sich damit

$$f_{EP} = \beta'^2 f_{SLM} \quad (\text{C.28})$$

Die maximale Brennweite, die mit Hilfe des SLM erzeugt werden kann, ist limitiert durch dessen Auflösung: die maximale Steigung  $d\phi/dr$  (siehe Gleichung C.27) ist gegeben durch ein Beugungsgitter mit einer Periode von 2 Pixeln ( $dr = 2pp$  und  $d\phi = \lambda$ ). Da jedoch für die verschiedenen Mikroskopobjektive aufgrund der unterschiedlichen Eintrittspupillen jeweils ein anderer Bereich des SLM  $r_{EP}/\beta'$  eingekoppelt wird, ergeben sich für die Mikroskopobjektive unterschiedlichen maximale Brennweiten:

$$f_{SLMmax} = \frac{r_{EP}}{\beta' \lambda} \cdot 2pp \quad (\text{C.29})$$



## C.2. Öffnungswinkel und maximaler Phasenshift eines Axikons

Das Axikon wird in die Eintrittspupille des MO (Durchmesser  $D_{EP}$ ) mit dem Abbildungsmaßstabe  $\beta'$  abgebildet. Dieser bestimmt damit den Durchmesser des Axikons  $D_a$ , der eingekoppelt wird:

$$\beta' = \frac{D_{EP}}{D_a} \quad (\text{C.30})$$

Der maximale optische Weg  $h_a$ , den das Licht im Axikon zurücklegt, ist abhängig von der physikalische Höhe  $z_a$  des Axikon mit dem Brechungsindex  $n$ :

$$h_a = n \cdot z_a \quad (\text{C.31})$$

Damit ist der Öffnungswinkel  $\gamma$  des Axikons gegeben durch

$$\tan \gamma = \frac{z_a}{D_a/2} = \frac{2h_a \cdot \beta'}{nD_{EP}} \quad (\text{C.32})$$

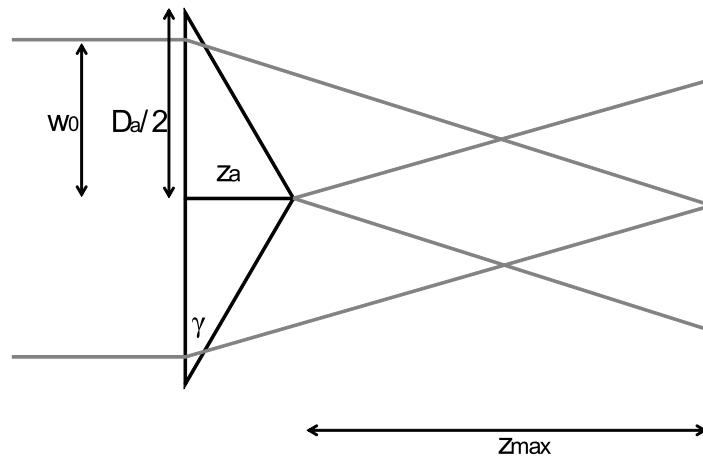


Abbildung C.2.: Schema Axikon

### C.3. Sinus- und Tangens-Bedingung sowie daraus bedingte Apodisation

Optische Systeme, wie bspw. Mikroskopobjektive, werden normalerweise nach der Abbeschen Sinus-Bedingung korrigiert. Dies führt zu einer gekrümmten Eintrittspupille [157]. Paraxiale Systeme hingegen erfüllen beispielsweise die Tangensbedingung, bei der die Eintrittspupille eine Ebene ist (siehe Abb. C.3). Diese unterschiedlichen Auslegungen des Systems führen bei gleicher Punktlichtquelle im Brennpunkt  $F$  zu unterschiedlicher Intensitätsverteilung in der Pupille [157]. Diese Intensitätsverteilung ist durch den Apodisierungsfaktor  $a(\theta)^2$  gegeben. Besonders bei Systemen mit hoher numerischer Apertur spielt dieser Apodisierungsfaktor eine signifikante Rolle. Dabei gibt  $I_H$  eine homogene Intensität in der Pupille an, wobei die Herschel-Bedingung erfüllt ist.

Die Intensität  $I_S$  in der Pupille eines nach Sinus-Bedingung korrigierten Systems ist durch den Apodisierungsfaktor  $a_S$  gegeben [157]:

$$I_S = I_H \cdot a_S^2(\theta) = I_H \cdot \cos(\theta), \quad (\text{C.33})$$

Die Intensität  $I_T$  in der Pupille eines nach Tangens-Bedingung korrigierten Systems ist durch den Apodisierungsfaktor  $a_T$  gegeben [157]:

$$I_T = I_H \cdot a_T^2(\theta) = I_H \cdot \frac{1}{\cos^3(\theta)}, \quad (\text{C.34})$$

Will man ein nach Tangensbedingung modelliertes System an ein nach Sinus-Bedingung modelliertes System anpassen, so ergibt sich nach Gleichung C.33 und Gleichung C.34 für die Intensität:

$$I_S = A(\theta) \cdot I_T = \frac{a_S^2(\theta)}{a_T^2(\theta)} \cdot I_T = \cos^4(\theta) \quad (\text{C.35})$$

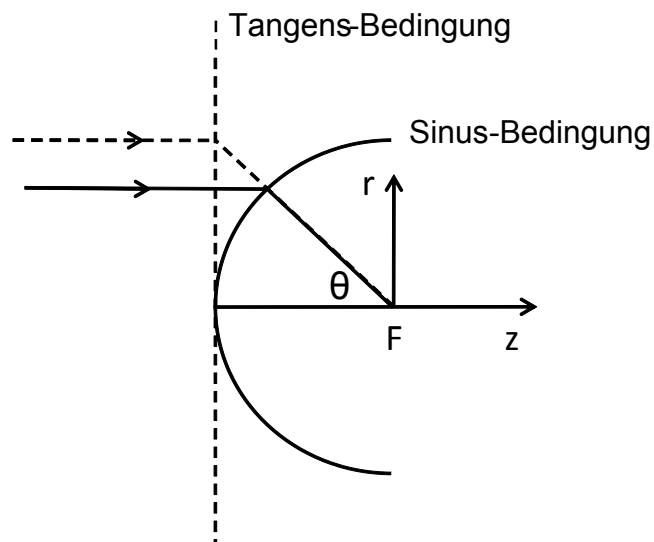


Abbildung C.3.: Derselbe fokussierte Strahl in Systemen, die nach Tangens- bzw. Sinusbedingung korrigiert sind, befindet sich in der Pupille an anderer Stelle. Dies führt zu unterschiedlicher Apodisierung.

# Literaturverzeichnis

- [1] *ZEMAX Optical Design Program User's Guide*, ZEMAX Development Corporation
- [2] Confocal Application Letter - Leica TCS 4Pi: Discover the Fluorescence Nanoworld / Leica Microsystems GmbH. 2005 (19). – Forschungsbericht
- [3] APTER, B. ; EFRON, U. ; BAHAT-TREIDEL, E.: On the fringing-field effect in liquid-crystal beam-steering devices. In: *Applied Optics* 43 (2004), S. 11–19
- [4] ARLT, J. ; DHOLAKIA, K. ; SONESON, J. ; WRIGHT, E. M.: Optical dipole traps and atomic waveguides based on Bessel light beams. In: *Phys. Rev. A* 63 (2001), S. 063602
- [5] ARLT, J. ; GARCES-CHAVEZ, V. ; SIBBETT, W. ; DHOLAKIA, K.: Optical micromanipulation using a Bessel light beam. In: *Optics Communications* 197 (2001), S. 239–45
- [6] ASHKIN, A.: Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. In: *Phys. Rev. Lett.* 24 (1970), S. 156
- [7] ASHKIN, A.: Trapping of atoms by resonance radiation pressure. In: *Physical Review Letters* 40 (1978), S. 729–32
- [8] ASHKIN, A.: Applications of Laser Radiation Pressure. In: *Science* 210 (1980), S. 1081–1088
- [9] ASHKIN, A.: Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. In: *Biophysical Journal* 61 (1992), S. 569–82
- [10] ASHKIN, A. ; DZIEDZIC, J. M. ; BJORKHOLM, J. E. ; CHU, S.: Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. In: *Optics Letters* 11 (1986), S. 288–90
- [11] BARTON, J. P. ; ALEXANDER, D. R. ; SCHAUB, S. A.: Theoretical determination of net radiation force and torque for a spherical particle illuminated by a focused laser beam. In: *Journal of Applied Physics* 66 (1989), S. 4594–602
- [12] BERNS, M. W.: Laser surgery. In: *Sci. Amer.* 264 (1991), S. 84–90

- 
- [13] BERNS, M. W. ; AIST, J. ; EDWARDS, J. ; STRAHS, K. ; GIRTON, J. ; MCNEILL, P. ; RATTNER, J. B. ; KITZES, M. ; HAMMER-WILSON, M. ; LIAW, L.-H. ; SIEMENS, A. ; KOONCE, M. ; PETERSON, S. ; BRENNER, S. ; BURT, J. ; WALTER, R. ; BRYANT, P. J. ; VAN DYK, D. ; COULOMBE, J. ; CAHILL, T. ; BERNS, G. S.: Laser microsurgery in cell and developmental biology. In: *Science* 213 (1981), Nr. 4507, S. 505–13
- [14] BERNS, M.W.: Laser scissors and tweezers. In: *Scientific American (International Edition)* 278 (1998), S. 52–7
- [15] BEUTHAN, J. ; MINET, O. ; HELFMAN, J. ; MULLER, G: The spatial variation of the refractive index in biological cells. In: *Physics in Medicine and Biology* 41 (1996), S. 369–382
- [16] BEWERSDORF, J. ; EGNER, A. ; HELL, S. W.: Die 4Pi-konfokale Mikroskopie auf dem Weg zur Routineanwendung. In: *BIOforum* 3 (2005), S. 46–47
- [17] BILLE, J. ; BILLE, J. (Hrsg.): *Laser-Gewebe-Wechselwirkungen*. Springer, 2005
- [18] BLEIL, S. ; MARR, D. W. M. ; BECHINGER, C.: Field-mediated self-assembly and actuation of highly parallel microfluidic devices. In: *Applied Physics Letters* 88 (2006), S. 263515
- [19] BORN, M. ; WOLF, E.: *Principles of Optics*. Sixth. Oxford, England : Pergamon Press, 1980
- [20] BOTCHERBY, E. J. ; JUSKAITIS, R. ; BOOTH, M. J. ; WILSON, T.: Aberration-free optical refocusing in high numerical aperture microscopy. In: *Opt. Lett.* 32 (2007), S. 2007–2009
- [21] CANNY, J.: A Computational Approach to Edge Detection. In: *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 8 (1986), S. 679
- [22] Carl Zeiss Lichtmikroskopie (Veranst.): *Axiovert 200 - Der neue Maßstab in der inversen Mikroskopie*
- [23] CHANG, Y.-R. ; HSU, L. ; CHI, S.: Optical trapping of a spherically symmetric sphere in the ray-optics regime: a model for optical tweezers upon cells. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), S. 3885–3892
- [24] CONSTABLE, A. ; KIM, J. ; MERVIS, J. ; ZARINETCHI, F. ; PRENTISS, M.: Demonstration of a fiber-optical light-force trap. In: *Opt. Lett.* 18 (1993), S. 1867

- [25] CURTIS, J. E. ; KOSS, B. A. ; GRIER, D.G.: Dynamic holographic optical tweezers. In: *Optics Communications* 207 (2002), S. 169–75
- [26] DHARMADHIKARI, J. A. ; ROY, S. ; DHARMADHIKARI, A. K. ; SHARMA, S. ; MATHUR, D.: Torque-generating malaria-infected red blood cells in an optical trap. In: *Optics Express* 12 (2004), S. 1179–1184
- [27] DOBNIKAR, J. ; BRUNNER, M. ; GRÜNBERG, H. H. v. ; BECHINGER, C.: Three-body interactions in colloidal suspensions. In: *Phys. Rev. E* 69 (2004), S. 031402
- [28] DOORNBOS, R. M. P. ; SCHAEFFER, M. ; HOEKSTRA, A. G. ; SLOOT, P. M. A. ; GROOTH, B. G. de ; GREVE, J.: Elastic light-scattering measurements of single biological cells in an optical trap. In: *Appl. Opt.* 35 (1996), S. 729–734
- [29] DOUGLASS, M. R.: Lifetime Estimates and Unique Failure Mechanisms of the Digital Micromirror Device (DMD). In: *Proc. IEEE The 36th Annual Int. Reliability Physics Symp* (1998), S. 9–16
- [30] DUDLEY, D. ; DUNCAN, W. M. ; SLAUGHTER, J.: Emerging digital micromirror device (DMD) applications. In: *Proc. of SPIE* 4985 (2003), S. 14–25
- [31] EFRON, U.: *Spatial light modulator technology : materials, devices, and applications*. Marcel Dekker, 1995
- [32] EFRON, U. ; APTER, B. ; BAHAT-TREIDEL, E.: Fringing-field effect in liquid-crystal beam-steering devices: an approximate analytical model. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 21 (2004), S. 1996–2008
- [33] EMMERT-BUCK, M. R. ; BONNER, R. F. ; SMITH, P. D. ; CHUAQUI, R. F. ; ZHENGPING, Zhuang ; GOLDSTEIN, S. R. ; WEISS, R. A. ; LIOTTA, LA.: Laser capture microdissection. In: *Science* 274 (1996), Nr. 5289, S. 998–1001
- [34] ENGER, J. ; GOKSOR, M. ; RAMSER, K. ; HAGBERG, P. ; HANSTORP, D.: Optical tweezers applied to a microfluidic system. In: *Lab on a Chip* 4 (2004), S. 196–200
- [35] ENGINSU, M. E. ; SCHÜTZE, K. ; BELLANCA, S. ; PENSIS, M. ; CAMPO, R. ; BASSIL, S. ; DONNEZ, J. ; GORDTS, S.: Micromanipulation of mouse gametes with laser microbeam and optical tweezers. In: *Human Reproduction* 10 (1995), S. 1761–1764
- [36] ERIKSEN, R. L. ; MOGENSEN, P. C. ; GLÜCKSTAD, J.: Multiple-beam optical tweezers generated by the generalized phase-contrast method. In: *Optics Letters* 27 (2002), S. 267–269

- 
- [37] ERIKSSON, E ; SCRIMGEOUR, J ; GRANÉLI, A ; RAMSER, K ; WELLANDER, R ; ENGER, J ; HANSTORP, D ; GOKSÖR, M: Optical manipulation and microfluidics for studies of single cell dynamics. In: *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* 9 (2007), S. S113
- [38] FÄLLMAN, E. ; AXNER, O.: Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. In: *Applied Optics* 36 (1997), S. 2107–13
- [39] FÄLLMAN, E. ; AXNER, O.: Influence of a Glass-Water Interface on the On-Axis Trapping of Micrometer-Sized Spherical Objects by Optical Tweezers. In: *Appl. Opt.* 42 (2003), S. 3915–3926
- [40] FLORIN, E. L. ; PRALLE, A. ; STELZER, E. H. K. ; HOERBER, J. K. H.: Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis. In: *Appl. Phys* 66 (1998), S. 75–78
- [41] FRIESE, M. E. J. ; NIEMINEN, T. A. ; HECKENBERG, N. R. ; RUBINSZTEIN-DUNLOP, H.: Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles. In: *Nature* 394 (1998), Nr. 6691, S. 348–50
- [42] GABOR, D.: A New Microscopic Principle. In: *Nature* 161 (1948), S. 777–778
- [43] GAHAGAN, K. T. ; SWARTZLANDER, G. A. J.: Optical vortex trapping of particles. In: *Optics Letters* 21 (1996), S. 827–9
- [44] GALAJDA, P. ; ORMOS, P.: Complex micromachines produced and driven by light. In: *Applied Physics Letters* 78 (2001), S. 249–51
- [45] GARCÉS-CHAVEZ, V. ; MCGLOIN, D. ; MELVILLE, H. ; SIBBETT, W. ; DHOLAKIA, K.: Simultaneous micromanipulation in multiple planes using a self-reconstructing light beam. In: *Nature* 419 (2002), Nr. 6903, S. 145–7
- [46] GARCÉS-CHÁVEZ, V. ; VOLKE-SEPULVEDA, K. ; CHÁVEZ-CERDA, S. ; SIBBETT, W. ; DHOLAKIA, K.: Transfer of orbital angular momentum to an optically trapped low-index particle. In: *Phys. Rev. A* 66 (2002), S. 063402
- [47] GATTO, A. ; YANG, M. ; KAISER, N. ; HEBER, J. ; SCHMIDT, J.-U. ; SANDNER, T. ; SCHENK, H. ; LAKNER, H.: High-performance coatings for micromechanical mirrors. In: *Applied Optics* 45 (2006), S. 1602–1607
- [48] GERCHBERG, R. ; SAXTON, W.: A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures. In: *Optik* 35 (1972), S. 237–246
- [49] GERTHSEN, C. ; KNESER, H. O. ; VOGEL, H. ; VOGEL, H. (Hrsg.): *Physik*. 16. Springer Verlag, 1989

- [50] GHISLAIN, L. P. ; SWITZ, N. A. ; WEBB, W. W.: Measurement of small forces using an optical trap. In: *Review of Scientific Instruments* 65 (1994), S. 2762–8
- [51] GIBSON, G. ; CARBERRY, D. M. ; WHYTE, G. ; LEACH, J. ; COURTIAL, J. ; JACKSON, J. C. ; ROBERT, D. ; MILES, M. ; PADGETT, M.: Holographic assembly workstation for optical manipulation. In: *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 10 (2008), S. 044009
- [52] GLÜCKSTADT, J.: Sorting particles with light. In: *Nature Materials* 3 (2004), S. 9–10
- [53] GOKSOR, M. ; ENGER, J. ; RAMSER, K. ; HANSTORP, D.: An experimental setup for combining optical tweezers and laser scalpels with advanced imaging techniques. In: *Proc. of SPIE* 4966 (2003), S. 50–57
- [54] GOLDSTEIN, S. R. ; POHIDA, T. ; SMITH, P. D. ; PETERSON, J. I. ; WELLNER, E. ; MALEKAFZALI, A. ; SUAREZ-QIAN, C. A. ; BONNER, R. F.: An instrument for performing laser capture microdissection of single cells. In: *Review of Scientific Instruments* 70 (1999), S. 4377–85
- [55] GOODMAN, J. W.: *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill International Editions, 1996
- [56] GREULICH, K. O.: *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine: The Laser Microbeam and Optical Tweezers*. Basel; Boston; Berlin; Birkhäuser Verlag, 1999
- [57] GREULICH, K. O. ; PILARCZYK, G. ; HOFFMANN, A. ; MEYER, Zu Horste G. ; SCHAFER, B. ; UHL, V. ; MONAJEMBASHI, S.: Micromanipulation by laser microbeam and optical tweezers: from plant cells to single molecules. In: *Journal of Microscopy* 198 (2000), S. 182–187
- [58] GRIER, D. G.: A revolution in optical manipulation. In: *Nature* 424 (2003), S. 810–816
- [59] GRIMMETT, J. D.: Thermal analysis of a light reflecting digital micromirror device. In: *Proc. of IEEE ISPS* (1997), S. 242–247
- [60] GROSS, H. (Hrsg.): *Handbook of optical systems: 1. Fundamentals of technical optics*. Wiley-VCH, 2005
- [61] GROVER, S. C. ; SKIRTACH, A. G. ; GAUTHIER, R. C. ; GROVER, C. P.: Automated single-cell sorting system based on optical trapping. In: *Journal of Biomedical Optics* 6 (2001), S. 14–22
- [62] GU, M. ; KE, P. C. ; GAN, X. S.: Trapping force by a high numerical-aperture microscope objective obeying the sine condition. In: *Review of Scientific Instruments* 68 (1997), S. 3666–3668



- 
- [63] GU, M. ; SHEPPARD, C. J. R.: Three-dimensional transfer functions in 4Pi confocal microscopes. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 11 (1994), S. 1619–1627
- [64] GUCK, J. ; ANANTHAKRISHNAN, R. ; MAHMOOD, H. ; MOON, T. J. ; CUNNINGHAM, C. C. ; KÄS, J.: The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. In: *Biophysical Journal* 81 (2001), S. 767–84
- [65] GUCK, J. ; ANANTHAKRISHNAN, R. ; MOON, T. J. ; CUNNINGHAM, C. C. ; KÄS, J.: Optical Deformability of Soft Biological Dielectrics. In: *The American Physical Society* 84 (2000), S. 5451–5454
- [66] GUSSGARD, R. ; LINDMO, T. ; BREVIK, I.: Calculation of the trapping force in a strongly focused laser beam. In: *J. Opt. Soc. Am. B* 9 (1992), S. 1922–30
- [67] HAIST, T. ; REICHERTER, M. ; BURLA, A. ; SEIFERT, L. ; HOLLIS, M. ; OSTEN, W.: Fast hologram computation for holographic tweezers. In: *Fringe05 Proceedings* (2005), S. 126–133
- [68] HAIST, T. ; REICHERTER, M. ; WU, M. ; SEIFERT, L.: How to use your Graphics Board for the Computation of holograms. In: *Computing in Science & Engineering* 8 (2006), S. 8–13
- [69] HAIST, T. ; WAGEMANN, E. U. ; TIZIANI, H. J.: Pulsed-laser ablation using dynamic computergenerated holograms written into a liquid crystal display. In: *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 1 (1999), S. 428–430
- [70] HAIST, T. ; ZWICK, S. ; WARBER, M. ; OSTEN, W.: Spatial light modulators – versatile tools for holography. In: *J. Holography Speckle* 3 (2006), S. 125–36
- [71] HAYASAKI, Y. ; ITOH, M. ; YATAGAI, T. ; NISHIDA, N.: Nonmechanical Optical Manipulation of Microparticle Using Spatial Light Modulator. In: *Optical Review* 6 (1999), S. 24–27
- [72] HAYASAKI, Y. ; SUMI, S. ; MUTOH, K. ; SUZUKI, S. ; ITOH, M. ; YATAGA, T. ; NISHIDA, N.: Optical manipulation of microparticles using diffractive optical elements. In: *Optics for Science and New Technology* 27778 (1996), S. 229
- [73] HE, H. ; FRIESE, M. E. J. ; HECKENBERG, N. R. ; RUBINSZTEIN-DUNLOP, H.: Direct observation of transfer of angular momentum to absorptive particles from a laser beam with a phase singularity. In: *Physical Review Letters* 75 (1995), S. 826–9

- [74] HE, H. ; HECKENBERG, N. R. ; RUBINSZTEIN-DUNLOP, H.: Optical particle trapping with higher-order doughnut beams produced using high efficiency computer generated holograms. In: *Journal of Modern Optics* 42 (1995), S. 217–23
- [75] HECHT, E.: *Optik*. Oldenbourg Verlag, 2001
- [76] HELL, S. ; STELZER, E. H. K.: Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. In: *Opt. Commun.* 93 (1992), S. 277–282
- [77] HELL, S. ; STELZER, E. H. K.: Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 9 (1992), S. 2159
- [78] HELL, S. W. ; LINDEK, S. ; CREMER, C. ; STELZER, E. H. K.: Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution. In: *Applied Physics Letters* 64 (1994), S. 1335
- [79] HELL, S. W. ; STELZER, E. H. K. ; LINDEK, S. ; CREMER, C.: Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. In: *Opt. Lett.* 19 (1994), S. 222
- [80] HELL, S. W. ; WICHMANN, J.: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. In: *Optics Letters* 19 (1994), S. 780–2
- [81] HENKES, M. ; VAN DER KUIP, H. ; AULITZKY, W. E.: Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib. In: *Therapeutics and Clinical Risk Management* 4 (2008), S. 1–26
- [82] HERMERSCHMIDT, A. ; KRÜGER, S. ; HAIST, T. ; ZWICK, S. ; WARBER, M. ; OSTEN, W.: Holographic optical tweezers with real-time hologram calculation using a phase-only modulating LCOS-based SLM at 1064 nm. In: *Proc. of SPIE* 6905 (2008)
- [83] HERMERSCHMIDT, A. ; KRÜGER, S. ; HAIST, T. ; ZWICK, S. ; WARBER, M. ; OSTEN, W.: Holographic optical tweezers with real-time hologram calculation using a phase-only modulating LCOS-based SLM at 1064 nm. In: *Proc. of SPIE* 6905 (2008)
- [84] HOO, W. S. ; WANG, M. ; KOHRUMEL, J. R. ; HALL, J.: A Novel Method for Detection of Virus-Infected Cells Through Moving Optical Gradient Fields Using Adenovirus as a Model System. In: *Cytometry Part A* 48A (2004), S. 140–146
- [85] IGNATOVICH, F. V. ; TOPHAN, D. ; NOVOTNY, L.: Optical Detection of Single Nanoparticles and Viruses. In: *IEEE J. Sel. Top. Quant.* 12 (2006), S. 1292–1300

- 
- [86] Invitrogen (Veranst.): Artikel P7220. – URL <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07220.pdf>
- [87] JESACHER, A.: *Advanced shaping of light fields with cascaded spatial light modulators*, Leopold-Franzens-Universität, Medizinische Universität, Dissertation, 2008
- [88] JESS, P. R. T. ; GARCÉS-CHÁVEZ, V. ; SMITH, D. ; MAZILU, M. ; PATERSON, L. ; RICHES, A. ; HERRINGTON, C. S. ; SIBBETT, W. ; DHOLAKIA, K.: Dual beam fibre trap for Raman micro-spectroscopy of single cells. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 5779–5791
- [89] JÜRGENS, M. ; POPP, J.: Leuchtende Nanokristalle für die medizinische Diagnose. In: *Photonik* 2 (2007), S. 62–65
- [90] KE, P. C. ; GU, M.: Characterization of trapping force in the presence of spherical aberration. In: *Journal of Modern Optics* 45 (1998), S. 2159–2168
- [91] KEMPER, B. ; CARL, D. ; BALLY, G. v.: Digitalholographische Mikroskopie: Ein Verfahren zur markerfreien dynamischen Analyse lebender Zellen. In: *Photonik* 2 (2006), S. 44–47
- [92] KIM, H. I. ; JOO, I. J. ; SONG, S. H. ; KIM, P. S. ; IM, K. B. ; OH, C. H.: Dependence of the optical trapping efficiency on the ratio of the beam radius-to-the aperture radius. In: *J. Korean Phys. Soc* 43 (2003), S. 348–351
- [93] KIRKPATRICK, S. ; GELATT, C. D. ; VECCH, M. P.: Optimization by Simualted Annealing. In: *Science* 220 (1983), S. 671–680
- [94] KÖNIG, K.: Multiphoton microscopy in life sciences. In: *Journal of Microscopy* 200 (2000), S. 83–104
- [95] KÖNIG, K. ; RIEMANN, I. ; EHLERS, A. ; BÜCKLE, R. ; DIMITROW, E. ; KAATZ, M. ; FLUHR, J. ; ELSNER, P.: In vivo multiphoton tomography of skin cancer. In: *Proc. of SPIE* 6089 (2006)
- [96] KOESTER, H. J. ; BAUR, D. ; UHL, R. ; HELL, S. W.: Ca<sup>2+</sup> Fluorescence Imaging with Pico- and Femtosecond Two-Photon Excitation: Signal and Photodamage. In: *Biophysical Journal* 77 (1999), S. 2226–2236
- [97] KOHLER, C. ; HAIST, T. ; OSTEN, W.: Model-free method for measuring the full Jones matrix of reflective liquid-crystal displays. In: *Opt. Eng.* 48 (2009), S. 044002

- [98] KOHLER, C. ; HAIST, T. ; SCHWAB, X. ; OSTEN, W.: Hologram optimization for SLM-based reconstruction with regard to polarization effects. In: *Opt. Express* 16 (2008), S. 14853–14861
- [99] KOHLER, C. ; SCHWAB, X. ; OSTEN, W.: Optimally tuned spatial light modulators for digital holography. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), S. 960–967
- [100] KÖNIG, K. ; RIEMANN, I. ; FRITZSCHE, W.: Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. In: *Opt. Lett.* 26 (2001), S. 819–821
- [101] KRAFFT, C. ; SALZER, R.: Markerfreie Bildgebung von Zellen und Geweben mittels Raman- und Infrarot-Spektroskopie. In: *Gesellschaft Deutscher Chemiker, Fachgruppe Analytische Chemie, Wochenschau 2005* Woche 47 (2005)
- [102] KUANG, Z. ; LIU, D. ; PERRIE, W. ; EDWARDSON, S. ; SHARP, M. ; FEARON, E. ; DEARDEN, G. ; WATKINS, K.: Fast parallel diffractive multi-beam femtosecond laser surface micro-structuring. In: *Applied Surface Science* 255 (2009), S. 6582 – 88
- [103] LACKNER, A. M. ; MARGERUM, J. D. ; VAN AST, C.: Near ultraviolet photostability of liquid crystal mixtures. In: *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 141 (1986), S. 289–310
- [104] LADAVAC, K. ; KASZA, K. ; GRIER, D. G.: Sorting by periodic potential energy landscapes: optical fractionation. In: *Phys. Rev. E* 70 (2004), S. 010901(R)
- [105] LEITH, E. N. ; UPATNIEKS, J.: Reconstructed Wavefronts and Communication Theory. In: *J. Opt. Soc. Am.* 52 (1962), S. 1123–1128
- [106] LIESENER, J ; HUPFER, W. J. ; GEHNER, A ; WALLACE, K: Test on Micromirror Arrays for Adaptive Optics. In: *Proc. of SPIE* 5553 (2004), S. 319–329
- [107] LIESENER, J. ; REICHERTER, M. ; HAIST, T. ; TIZIANI, H. J.: Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms. In: *Optics Communications* 185 (2000), S. 77–82
- [108] LU, J. ; DESHPANDE, S. V. ; GULARI, E. ; KANICKI, J. ; WARREN, W. L.: Ultraviolet light induced changes in polyimide liquid-crystal alignment films. In: *Journal of Applied Physics* 80 (1996), S. 5028–5034
- [109] LUEDER, E.: *Liquid Crystal Displays*. John Wiley & Sons, 2001 (Wiley Series in Display Technology)

- 
- [110] LYONS, E.R. ; SONEK, G.J.: Confinement and bistability in a tapered hemispherically lensed optical fiber trap. In: *Applied Physics Letters* 66 (1995), S. 1584–6
- [111] MACDONALD, M. P. ; SPALDING, G. C. ; DHOLAKIA, K.: Microfluidic sorting in an optical lattice. In: *Nature* 426 (2003), Nr. 6965, S. 421–4
- [112] MALACARA, D. ; MALACARA, Z.: *Handbook of Optical Design*. 2nd. Dekker, 2004
- [113] MARQUET, P. ; RAPPAZ, B. ; MAGISTRETTI, P. J. ; CUCHE, E. ; EMERY, Y. ; COLOMB, T. ; DEPEURSINGE, C.: Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. In: *Optics Letters* 30 (2005), S. 468–470
- [114] MARTIN, M. ; MUELLER, K. ; WOTTAWAH, F. ; SCHINKINGER, S. ; LINCOLN, B. ; ROMEYKE, M. ; KÄS, J.: Feeling with light for cancer. In: *Proc. of SPIE* 6080 (2006), S. 60800P
- [115] MCGLOIN, D. ; GARCES-CHAVEZ, V. ; DHOLAKIA, K.: Interfering Bessel beams for optical micromanipulation. In: *Optics Letters* 28 (2003), S. 657–9
- [116] McMULLIN, C. J. ; AU, A. A. ; QUINSAAT, J. ; LYONS, E. R. ; LEE, H. P.: Fiber-optic-based optical trapping and detection for lab-on-a-chip (LOC) applications. In: *Proc. of SPIE* 4622 (2002), S. 188–194
- [117] MERENDA, F. ; ROHNER, J. ; FOURNIER, J.-M. ; SALATHÉ, R.-P.: Miniaturized high-NA focusing-mirror multiple optical tweezers. In: *Opt. Express* 15 (2007), S. 6075–6086
- [118] MIRSAIDOV, U. ; TIMP, W. ; TIMP, K. ; MIR, M. ; MATSUDAIRA, P. ; TIMP, G.: Optimal optical trap for bacterial viability. In: *Physical Review E* 78 (2008), S. 021910
- [119] MOEHRING, A. ; WOHLBOLD, L. ; AULITZKY, W. E. ; VAN DER KUIP, H.: Role of poly(ADP-ribose) polymerase activity in imatinib mesylate-induced cell death. In: *Cell Death and Differentiation* 12 (2005), S. 627–636
- [120] MOGENSEN, P. C. ; GÜCKSTAD, J.: Dynamic array generation and pattern formation for optical tweezers. In: *Optics Communications* 175 (2000), S. 75–81
- [121] MOHANTY, S. K. ; DIVAKAR, R. K. ; GUPTA, P. K.: Controlled spatial orientation of birefringent microscopic particles using optical trap with polarization grating. In: *Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO)* 2 (2004)
- [122] MONAJEMBASHI, S. ; HOYER, C. ; GREULICH, K. O.: Laser microbeams and optical tweezers convert the microscope into a versatile microtool. In: *Microscopy and Analysis* 97 (1997), S. 7–9

- [123] MUNCE, N. ; LI, J. ; HERMAN, P. R. ; LILGE, L.: Single Cell Analysis on a Microchip Platform using Optical Tweezers and Optical Scissors. In: *Proc. of SPIE* 4982 (2003), Jan, S. 28–36
- [124] NIEMZ, M. H. (Hrsg.): *Laser tissue interactions : fundamentals and applications*. Springer, 2002
- [125] OEDER, A. ; AMBERG, M. ; KREMIN, C. ; GRODRIAN, A. ; HOFMANN, M. ; METZE, J. ; SINZINGER, S.: Optische Manipulation von Mikropartikeln in mikro-opto-fluidischen Systemen. In: *Proc. der DGaO*, 2008
- [126] PERCH-NIELSEN, I. R. ; RODRIGO, P. J. ; ALONZO, C. A. ; GLÜCKSTAD, J.: Autonomous and 3D real-time multi-beam manipulation in a microfluidic environment. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 12199–12205
- [127] PITZEK, M. ; STEIGER, R. ; THALHAMMER, G. ; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: Optical mirror trap with a large field of view. In: *Opt. Express* 17 (2009), S. 19414–19423
- [128] REICHERTER, M.: *Einsatz von Lichtmodulatoren zum Teilcheneinfang und zur Aberrationskontrolle in holografischen Pinzetten*, Universität Stuttgart, PhD-Thesis, 2006
- [129] REICHERTER, M. ; HAIST, T. ; WAGEMANN, E. U. ; TIZIANI, H. J.: Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display. In: *Optics Letters* 24 (1999), S. 608–610
- [130] REICHERTER, M. ; HAIST, T. ; ZWICK, S. ; BURLA, A. ; SEIFERT, L. ; OSTEN, W.: Fast hologram computation and aberration control for holographic tweezers. In: *Proc. of SPIE* 5930 (2005)
- [131] REICHERTER, M. ; LIESENER, J. ; HAIST, T. ; TIZIANI, H. J.: Advantages of holographic optical tweezers. In: *Proc. of SPIE* 5143 (2003), S. 76–83
- [132] REICHERTER, M. ; ZWICK, S. ; HAIST, T. ; KOHLER, C. ; TIZIANI, H. J. ; OSTEN, W.: Fast digital hologram generation and adaptive force measurement in LCD based holographic tweezers. In: *Applied Optics* 45 (2006), S. 888–896
- [133] REN, K. F. ; GREHA, G. ; GOUESBET, G.: Radiation pressure forces exerted on a particle arbitrarily located in a Gaussian beam by using the generalized Lorenz-Mie theory, and associated resonance effects. In: *Optics Communications* 108 (1994), S. 343–54
- [134] RODENACKER, K. ; BENGTSSON, E.: A feature set for cytometry on digitized microscopic images. In: *Analytical Cellular Pathology* 25 (2003), S. 1–36

- 
- [135] RODRIGO, P. J. ; DARIA, V. R. ; GLÜCKSTAD, J.: Real-time three-dimensional optical micromanipulation of multiple particles and living cells. In: *Opt. Lett.* 29 (2004), S. 2270–2272
- [136] RODRIGO, P. J. ; KELEMEN, L. ; PALIMA, D. ; ALONZO, C. A. ; ORMOS, P. ; GLÜCKSTAD, J.: Optical microassembly platform for constructing reconfigurable microenvironments for biomedical studies. In: *Opt. Express* 17 (2009), S. 6578–6583
- [137] RODRIGO, P. J. ; PERCH-NIELSEN, I. R. ; GLÜCKSTAD, J.: Three-dimensional forces in GPC-based counterpropagating-beam traps. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 5812–5822
- [138] ROESCH, P. ; SCHMITT, M. ; KIEFER, W. ; POPP, J.: The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy. In: *Journal of Molecular Structure* 661-662 (2003), S. 363–369
- [139] ROHRBACH, A. ; STELZER, E. H. K.: Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 18 (2001), S. 839–53
- [140] ROHRBACH, A. ; STELZER, E.H.K.: Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. In: *Applied Optics* 41 (2002), S. 2494–507
- [141] ROICHMAN, Y. ; WALDRON, A. ; GARDEL, E. ; GRIER, D. G.: Optical traps with geometric aberrations. In: *Applied Optics* 45 (2006), S. 3425–9
- [142] ROMAN, V. E. ; POPP, J.: In situ microparticle diagnostics by stimulated Raman scattering. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1 (1999), S. 5491–5495
- [143] ROOSEN, G. ; IMBERT, C.: Optical levitation by means of two horizontal laser beams: a theoretical and experimental study. In: *Physics Letters A* 59A (1976), S. 6–8
- [144] SALEH, B. E. A. ; TEICH, M. C.: *Fundamentals of Photonics*. John Wiley and Sons Inc., 1991
- [145] SATO, S. ; ISHIGURE, M. ; INABA, H.: Optical trapping and rotational manipulation of microscopic particles and biological cells using higher-order mode Nd:YAG laser beams. In: *Electronics Letters* 27 (1991), S. 1831–2
- [146] SCHAAL, F. ; WARBER, M. ; ZWICK, S. ; HAIST, T. ; OSTEN, W.: Marker-free cell discrimination by holographic optical tweezers. In: *J. Europ. Opt. Soc. Rap. Public.* 4 (2009), S. 09028

- [147] SCHMITZER, H. ; KLEIN, S. ; DULTZ, W.: Nonlinearity of Pancharatnam's topological phase. In: *Phys. Rev. Lett.* 71 (1993), S. 1530–1533
- [148] SCHNECKENBURGER, H. ; HENDINGER, A. ; SAILER, R. ; GSCHWEND, M. H. ; STRAUSS, W. S. L. ; BAUER, M. ; SCHÜTZE, K.: Cell viability in optical tweezers: high power red laser diode versus Nd:YAG laser. In: *Journal of Biomedical Optics* 5 (2000), Nr. 1, S. 40–44
- [149] SCHNECKENBURGER, H. ; SAILER, R. ; HENDINGER, A. ; GSCHWEND, M. H. ; BAUER, M. ; STRAUSS, W. S. L.: Phagotosis: Studies by optical tweezers and time-resolved microspectrofluorometry. In: *Proc. of SPIE* 3568 (1998), S. 148–153
- [150] SCHRADER, M. ; HELL, S. W.: 4Pi-confocal images with axial superresolution. In: *Journal of Microscopy* 183 (1996), S. 189–193
- [151] SCHRADER, M. ; HELL, S. W.: Three-dimensional super-resolution with a 4Pi-confocal microscope using image restoration. In: *Journal of Applied Physics* 84 (1998), S. 4033–4042
- [152] SCHREIER, D.: *Synthetische Holografie*. Physik Verlag, 1984
- [153] SCHWAB, X. ; MEISTER, E. ; PEDRINI, G. ; OSTEN, W.: Alignment of master and sample in comparative digital holography. In: *Proc. of SPIE* 6341 (2006), S. 63410Y
- [154] SCHWERTNER, M. ; BOOTH, M. ; WILSON, T.: Characterizing specimen induced aberrations for high NA adaptive optical microscopy. In: *Opt. Express* 12 (2004), S. 6540–6552
- [155] SEITZ, P. C. ; STELZER, E. H. K. ; ROHRBACH, A.: Interferometric tracking of optically trapped probes behind structured surfaces: a phase correction method. In: *Applied Optics* 45 (2006), S. 7309–7315
- [156] SELDOWITZ, M. A. ; ALLEBACH, J. P. ; SWEENEY, D. W.: Synthesis of digital holograms by direct binary search. In: *Applied Optics* 26 (1987), S. 2788–2798
- [157] SHEPPARD, C. J. R. ; GU, M.: Imaging by a High Aperture Optical System. In: *Journal of Modern Optics* 40 (1993), S. 1631–1651
- [158] SHEPPARD, C. R. J. ; GU, M.: Aberration Compensation in confocal microscopy. In: *Applied Optics* 30 (1991), S. 3563–68
- [159] SIDICK, E. ; COLLINS, S. D. ; KNOESEN, A.: Trapping forces in a multiple-beam fiber-optic trap. In: *Appl. Opt.* 36 (1997), S. 6423–6433



- [160] SIMPSON, N. B. ; ALLEN, L. ; PADGETT, M. J.: Optical tweezers and optical spanners with Laguerre-Gaussian modes. In: *Journal of Modern Optics* 43 (1996), S. 2485–91
- [161] SINCLAIR, G. ; JORDAN, P. ; COURTIAL, J. ; PADGETT, M. ; COOPER, J. ; LACZIK, ZJ.: Assembly of 3-dimensional structures using programmable holographic optical tweezers. In: *Optics Express* 12 (2004), S. 2004
- [162] SINGER, W. ; BERNET, S. ; HECKER, N. ; RITSCH-MARTE, M.: Three-dimensional force calibration of optical tweezers. In: *Journal of Modern Optics* 47 (2000), S. 2921–31
- [163] SINGER, W. ; FRICK, M. ; HALLER, T. ; DIETL, P. ; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: Combined optical tweezers and optical stretcher in microscopy. In: *Proc. of SPIE* 4434 (2001), S. 227–32
- [164] SLUDER, G. (Hrsg.) ; WOLF, D.E. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology - Digital Microscopy: A second edition of "Video Microscopy"*. Bd. 72. Elsevier Academic Press, 2003
- [165] STEIGER, R. ; THALHAMMER, G. ; PITZEK, M. ; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: Optical Mirror Trap for large objects. In: *Trends in Optical Manipulation II, Obergurgl*, 2010
- [166] STRIEBEL, H. M. ; SCHELLENBERG, P. ; GRIGARAVICIUS, P. ; GREULICH, K. O.: Readout of protein microarrays using intrinsic time resolved UV Fluorescence for label-free detection. In: *Proteomics* 4 (2004), S. 1703–1711
- [167] SVOBODA, K. ; BLOCK, S. M.: Biological Applications of Optical Forces. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23 (1994), S. 257–85
- [168] UCHUGONOVA, A. ; ISEMANN, A. ; GORJUP, E. ; TEMPEA, G. ; BÜCKLE, R. ; WATANABE, W. ; KÖNIG, K.: Optical knock out of stem cells with extremely ultrashort femtosecond laser pulses. In: *Journal of Biophotonics* 1 (2008), S. 463–469
- [169] UHRIG, K. ; KURRE, R. ; SCHMITZ, C. ; CURTIS, J. E. ; HARASZTI, T. ; CLEMEN, A. E.-M. ; SPATZ, J. P.: Optical force sensor array in a microfluidic device based on holographic optical tweezers. In: *Lab on a Chip* 9 (2009), S. 661
- [170] ULRIKSEN, H.-U. ; THØGERSEN, J. ; KEIDING, S. ; PERCH-NIELSEN, I. ; DAM, J. ; PALIMA, D. Z. ; STAPELFELDT, H. ; GLÜCKSTAD, J.: Independent trapping, manipulation and characterization by an all-optical biophotonics workstation. In: *J. Europ. Opt. Soc. Rap. Public.* 3 (2008), S. 08034

- [171] VOROBJEV, I. A. ; LIANG, H. ; WRIGHT, W. H. ; BERNS, M. W.: Optical trapping for chromosome manipulation: a wavelength dependence of induced chromosome bridges. In: *Biophysical Journal* 64 (1993), S. 533–8
- [172] VOSSEN, D. L. J. ; VAN DER HORST, A. ; DOGTEROM, M. ; VAN BLAADEREN, A.: Optical tweezers and confocal microscopy for simultaneous three-dimensional manipulation and imaging in concentrated colloidal dispersions. In: *Review of Scientific Instruments* 75 (2004), S. 2960–70
- [173] WANG, M. D. ; KOCH, S. J. ; SHUNDROVSKY, A. ; JANTZEN, BC.: Unzipping force analysis of protein association (UFAPA): a novel technique to probe protein-DNA interactions. In: *Proc. of SPIE* 5110 (2003), S. 22–7
- [174] WANG, W. ; CHIOU, A. E. ; SONEK, G. J. ; BERNS, M. W.: Self-aligned dual-beam optical laser trap using photorefractive phase conjugation. In: *J. Opt. Soc. Am. B* 14 (1997), S. 697–704
- [175] WEI, M. T. ; YANG, K. T. ; KARMENYAN, A. ; CHIOU, A.: Three-dimensional optical force field on a Chinese hamster ovary cell in a fiber-optical dual-beam trap. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 3056–3064
- [176] WIEGAND STEUBING, R. ; CHENG, S. ; WRIGHT, W. H. ; NUMAJIRI, Y. ; BERNS, M. W.: Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: The laser cell fusion trap. In: *Cytometry* 12 (1991), S. 505–510
- [177] WILLIAMS, M. C.: Optical Tweezers: Measuring Piconewton Forces. In: *Biophysics Society Textbook Online* (2002). – URL <http://www.biophysics.org/education/williams.pdf>.
- [178] WOHLAND, T. ; ROSIN, A. ; STELZER, E. H. K.: Theoretical determination of the influence of the polarization on forces exerted by optical tweezers. In: *Optik* 102 (1996), S. 181–90
- [179] WRIGHT, W. H. ; SONEK, G. J. ; BERNS, M. W.: Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers. In: *Applied Physics Letters* 63 (1993), S. 715–17
- [180] WRIGHT, W. H. ; SONEK, G. J. ; BERNS, M. W.: Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers. In: *Applied Optics* 33 (1994), S. 1735–48
- [181] WULFF, K. D. ; COLE, D. G. ; CLARK, R. L. ; DI LEONARDO, R. ; LEACH, J. ; COOPER, J. ; GIBSON, G. ; PADGETT, M. J.: Aberration correction in holographic optical tweezers. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 4169–4174

- 
- [182] WYATT, P.: Identification of bacteria by differential light scattering. In: *Nature* 221 (1969), S. 1257–1258
- [183] YAO, X.-C. ; LI, Z.-L. ; GUO, H.-L. ; CHENG, B.-Y. ; ZHANG, D.-Z.: Optical trap steering system. In: *Optics & Precision Engineering* 9 (2001), S. 55–8
- [184] ZEMANEK, P. ; JONAS, A. ; JAKL, P. ; JEZEK, J. ; SERY, M. ; LISKA, M.: Theoretical comparison of optical traps created by standing wave and single beam. In: *Optics Communications* 220 (2003), S. 401–12
- [185] ZEMANEK, P. ; JONS, A. ; SRMEK, L. ; LISKA, M.: Optical trapping of nanoparticles and microparticles by a Gaussian standingwave. In: *Opt. Lett.* 24 (1999), S. 1448–1450
- [186] ZHANG, J. ; LEE, Y. C. ; TUANTRANONT, A. ; BRIGHT, V. M.: Thermal Analysis of Micromirrors for High-energy Applications. In: *IEEE Transactions on Advanced Packaging* (2004)
- [187] ZWICK, S. ; HAIST, T. ; MIYAMOTO, Y. ; HE, L. ; WARBER, M. ; HERMERSCHMIDT, A. ; OSTEN, W.: Holographic twin traps. In: *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 11 (2009), S. 034011
- [188] ZWICK, S. ; LIN, H. ; WARBER, M. ; HAIST, T. ; OSTEN, W.: Holografisch generierte Doppelfallen für dreidimensionales Trapping. In: *Proc. der DGaO* (2007), S. B1
- [189] ZWICK, S. ; WARBER, M. ; HAIST, T. ; OSTEN, W.: Realisation of a holographic microlaser scalpel using a digital micromirror device. In: *Proc. of SPIE* 6616 (2007), S. 66160N

# Lebenslauf

Susanne Zwick, geboren am 30. Juni 1981 in Stuttgart

1987 bis 1991	Grundschule in Filderstadt
1991 bis 2000	Eduard-Spranger-Gymnasium in Filderstadt, Abitur
10/2000 bis 02/2005	Studium des Photoingenieurwesens an der Fachhochschule Köln, Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)
03/2005 bis 05/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart
03/2009 bis 05/2010	Leiterin der Arbeitsgruppe „Aktive Optische Systeme“ am Institut für Technische Optik
seit 06/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik (IOF) in Jena

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Osten, der mir diese Arbeit durch die Aufnahme am Institut ermöglicht hat. Insbesondere die Unterstützung, Förderung und das stetige Interesse an meiner Arbeit haben mich sehr weitergebracht.

Zudem möchte ich Herrn Professor Kück sehr für die freundliche Übernahme des Mitberichts danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Aktive Optische Systeme Avinash Burla, ShiHao Dong, Tobias Haist, Malte Hasler und Michael Warber für die sehr gute, kreative und angenehme Zusammenarbeit und Kollegialität. Insbesondere hervorzuheben sind Tobias Haist, dem ich für fruchtbare Diskussionen, tolle Ideen sowie ein offenes Ohr und Hilfestellungen optischer und nicht-optischer Natur herzlich danken möchte, sowie Michael Warber, bei dem ich mich für die enge Zusammenarbeit, an- und aufregende Diskussionen sowie die langjährige nette Büronachbarschaft bedanken möchte.

Nicht zu vergessen ist Marcus Reicherter, dem ich das spannende Thema meiner Diplomarbeit verdanke, ohne die ich vielleicht nicht am Institut gelandet wäre.

Zudem möchte ich mich explizit bei Lin He, Martin Henke, Frederik Schaal und Christian Schaub bedanken, die im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten bedeutend zu dieser Arbeit beigetragen haben. Thomas Schuster danke ich für die Unterstützung bei wellenoptischen Simulationen.

Desweiteren danke ich Andreas Lorenz und Ralph Knoll von der mechanischen bzw. elektronischen Werkstatt für schnelle und kreative Lösungen kleiner und großer Probleme.

Daneben möchte ich mich bei meinen Kollegen des Instituts für Technische Optik bedanken, die ich hier leider nicht alle namentlich nennen kann. Die tolle Arbeitsatmosphäre, der offene Diskussions- und Ideenaustausch sowie die Hilfsbereitschaft vieler Kollegen waren nicht nur aus fachlicher Sicht eine Bereicherung.

Für die Suche nach fachlichen und formellen Fehlerteufeln möchte ich mich insbesondere bei Tobias Haist, Jasmin Braunisch, Katrin Weber und Stefanie Zwick bedanken.

Der Großteil der Arbeiten entstand innerhalb öffentlich geförderter Projekte. Aus diesem Grund bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Landesstiftung Baden-Württemberg und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Förderung dieser Projekte.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Promotion bedanken, sowie Christophe Maufroy, der insbesondere in der Endphase meiner Promotion für moralische Unterstützung und den seelischen Ausgleich sorgte.

ISBN 978-3-923560-65-3