

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Christian Hermann Josef Schmitz
geboren in Prüm

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 2005

ENTWICKLUNG EINES OPTO-MECHANISCHEN
MIKROLABORS ZUR GENERIERUNG UND UNTERSUCHUNG
BIOMIMETISCHER PROTEINNETZWERKE

Gutachter:

Prof. Dr. Joachim P. Spatz

Physikalisch-Chemisches
Institut

Prof. Dr. Rainer H. A. Fink

Institut für Physiologie
und Pathophysiologie

Entwicklung eines opto-mechanischen Mikrolabors zur Generierung und Untersuchung biomimetischer Proteinnetzwerke

Kurzfassung: Der Zugang zur Untersuchung komplexer Mikrostrukturen, wie sie insbesondere durch biologische Systeme gebildet werden, verlangt spezielle Werkzeuge und Methoden, die eine aktive physikalische und chemische Kontrolle in diesem Größenbereich und die Erfassung systemspezifischer Parameter erlauben. Ein Teil dieser Anforderungen kann durch den Einsatz holographischer optischer Pinzetten (HOT) erfüllt werden, mit denen sich eine Vielzahl mikroskopischer Objekte nicht-invasiv manipulieren und Piconewtonkräfte messen lassen. In dieser Arbeit wurden die Anwendungsmöglichkeiten der HOT erstmals über eine reine Objektmanipulation hinaus durch Integration in eine neu entwickelte Mikrofluidikplattform erweitert und die HOT-Technologie in Hinblick auf komplexe Systemanwendungen weiterentwickelt: Verschiedene Algorithmen zur Hologrammberechnung wurden hinsichtlich ihrer Effizienz miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass ein hier vorgestellter erweiterter Superpositionsansatz in den meisten Fällen zur Hologrammgenerierung ausreicht, womit die Verwendung zeitaufwändiger iterativer Verfahren entfällt. Die Abhängigkeit der Effizienz von Symmetrieeigenschaften der Fallmuster wurde aufgezeigt und analysiert. Durch Verwendung der Superposition wurde eine Ortsauflösung der HOT-Positionierung im Nanometerbereich realisiert. Die Abhängigkeit der Auflösung von der Zahl der Bildpunkte und Phasenstufen der Hologramme konnte hergeleitet und experimentell demonstriert werden. Die HOT-Technologie ermöglicht die Erzeugung optischer Wirbelfallen, die gefangene Objekte durch Drehimpulsübertragung in Rotation versetzen. Eine neue Klasse modulierter optischer Wirbel wurde präsentiert, die eine Regulation des Drehimpuls optischer Wirbel erlaubt ohne die Laserintensität oder den Wirbelradius zu verändern. Die Fabrikation eines ultraflachen und optisch transparenten Mikrofluidiksystems stellt ein Werkzeug zur Kontrolle des chemischen Milieus zur Verfügung, das eine Integration der HOT erlaubte. Speziell auf die HOT angepasste Kanaldesigns wurden entwickelt, um Systemstabilität zu gewährleisten und gleichzeitig einen flexiblen Austausch von Substanzen zu ermöglichen. Dieses opto-mechanische Mikrolabor konnte schließlich zur Generierung biomimetischer quasi-zweidimensionaler Aktinnetzwerke auf durch HOT strukturierten Mikrokugeln genutzt werden: Es wurde zur Oberflächenstrukturierung, der Erzeugung kraftsensorischer Geloberflächen und der freien rein optischen Systemmanipulation eingesetzt.

Development of an opto-mechanical micro-lab for creating and probing biomimetic protein networks

Abstract: Probing complex micro-structures like cellular and sub-cellular bio-systems requires special tools which allow the active control of the physical and chemical micro-environment to realize specific system parameters. Many desirable possibilities can be realized using holographic optical tweezers (HOT), a recent and powerful manipulation tool which allows for non-invasive and independent steering of multiple microscopic objects and measuring forces in the range of pico-newtons. For that purpose HOT were extended beyond a mere manipulation tool for the first time, integrating them with a new microfluidic platform and further developing their diversity with a focus on practical applications to complex systems: The efficiencies of various algorithms for hologram calculation were compared. It could be shown that no iterative and time-consuming algorithm is necessary to calculate holograms for most holographic optical trapping patterns. Instead, holograms may be produced by a simple extension of the superposition of simple diffraction gratings. The symmetry dependence of holograms' efficiencies was demonstrated and analyzed. The application of the superposition method allowed for positioning HOT with nanometer resolution. Experimental corroboration of the spatial resolution's dependence on the hologram's number of pixels and phase levels is presented. HOT can also produce focused helical wave fronts of light known as optical vortices which can exert torque on trapped objects. So far, this torque was controlled by the intensity, the helicity, and the size of the ring. To untangle these dependences, a new class of modulated vortices is presented which allows one to control the transfer of angular momentum without changing the laser intensity or the ring-shaped intensity distribution characteristic. The fabrication of an ultra-thin and optically transparent microfluidic system provided a tool to control the chemical micro-environment and allowed the integration of HOT. Special channel designs were optimized for the application of HOT to achieve both stability and the possibility to exchange different fluids rapidly. The opto-mechanical micro-lab was then applied for the generation of biomimetic quasi two-dimensional actin networks constructed on a framework of microspheres organized or even held by the optical traps: The micro-lab was used for surface structuring, creation of hydro-gel based force-sensors and the free manipulation of an optically trapped system, supporting an actin network.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	ix
1 Einleitung	1
Teil I: Holographische optische Pinzetten	5
2 Optische Fallen	7
2.1 Grundlagen optischer Kräfte	7
2.2 Physikalische Beschreibung der Kräfte in optischen Pinzetten . . .	12
2.2.1 Strahlenoptische Betrachtung der optischen Pinzette . . .	12
2.2.2 Elektromagnetische Betrachtung der optischen Pinzette .	13
2.2.3 Weitere Kräfte in optischen Pinzetten	14
2.3 Generierung von Vielfallensystemen	15
2.4 Kalibrierung optischer Fallen	17
2.5 Anwendungen der optischen Pinzette	20
3 Prinzipien der holographischen optischen Pinzetten	23
3.1 Beugungstheorie	24
3.2 Methoden der Hologrammberechnung	28
3.2.1 Gerchberg-Saxton-Algorithmus	28
3.2.2 Prismensuperposition	30
3.2.3 Generalisierter Gerchberg-Saxton-Algorithmus	32
3.3 Optische Wirbel	33
3.4 Anwendungen der HOT	35
4 Experimenteller Aufbau	37
4.1 Laser	37
4.2 Teleskope	39
4.3 Phasenmodulator	40
4.4 Mikroskop	42
4.5 Stabilisierung des Systems	43

5	Kalibrierung und Intensitätsmodulation optischer Pinzetten	45
5.1	Materialien und Methoden	45
5.2	Hydrodynamische Reibung	47
5.3	Thermische Fluktuation	48
5.4	Intensitätsmodulation	52
5.5	Zusammenfassung	54
6	Symmetrieeffekte	55
6.1	Vergleich zwischen symmetrischen und zufälligen Fallenmustern .	55
6.2	Erweiterte Prismensuperposition	58
6.3	Zusammenfassung	63
7	Räumlich hochaufgelöste HOT	65
7.1	Räumliche Auflösung holographischer Strahllenkung	65
7.2	Hologramme mit reduzierter Pixel- oder Phasenstufenzahl	68
7.3	Vielfallensysteme	70
7.4	Zusammenfassung	71
8	Modulierte Optische Wirbel	73
8.1	Eigenschaften modulierter optischer Wirbel	73
8.2	Zahnradfallen	77
8.2.1	Kompositkugelsystem als Mikrokurbel	78
8.3	Drehimpulsübertragung durch modulierte optische Wirbel	80
8.4	Mehrfallensysteme modulierter optischer Wirbel	83
8.5	Zusammenfassung	84
	Teil II: Mikrofluidik	85
9	Grundlagen	87
9.1	Physik der Mikrofluidik	87
9.1.1	Reynoldszahl und laminare Strömung	87
9.1.2	Diffusion	88
9.1.3	Hydrodynamischer Widerstand	88
9.1.4	Oberflächen-Volumen-Verhältnis	89
9.1.5	Oberflächenspannung	89
9.2	Fabrikationstechniken	90
9.2.1	Mikromechanische Bearbeitung	90
9.2.2	Softlithographie	91
9.2.3	Elemente und Anwendungen der Mikrofluidik	91
10	Herstellung der Mikrofluidikzellen	93
10.1	Photolithographische Herstellung der Gussform	93
10.2	PDMS-Abgüsse	96
10.3	Herstellung der Zellendecke mit Schlauchanschlüssen	96
10.4	Zusammenbau der Zellen	97
10.5	Oberflächeneigenschaften der Zellen	97
10.6	Reinigung der Zellen	98

11 Mikrokanaldesign	99
11.1 Allgemeine Eigenschaften der Mikrofluidikzellen	99
11.2 Einkanalsystem	99
11.3 Parallelfusszelle	102
11.4 Picoliterpipette	103
11.4.1 Pipettenkanal	104
11.4.2 Zweiphasenschalter	105
11.5 Tropfengenerator	107
11.6 Flusskontrolle	108
Teil III: Biomimetische Systeme	111
12 Subzelluläre Mikrosysteme: Der Aktinkortex	113
12.1 Das Zytoskelett	113
12.1.1 Viskoelastizität	114
12.2 Aktin und Aktinfilamente	115
12.3 Aktinassozierte Proteine: Motorproteine	117
12.4 Der Aktinkortex	118
12.4.1 Untersuchungsmöglichkeiten	119
13 In-vitro-Aktinkortexmodelle	123
13.1 Oberflächenstrukturierung	123
13.1.1 Versuchsdurchführung	123
13.2 Sensorische Oberflächen	127
13.2.1 Hyaluronsäuregele	128
13.2.2 Herstellung der Geloberflächen	129
13.2.3 Charakterisierung der Geloberflächen	130
13.3 Freies Aktinnetzwerk	133
13.3.1 Versuchsdurchführung	134
13.4 Ausblick: Einzelzelluntersuchungen	136
14 Materialien und Methoden	139
14.1 Behandlung von Glas- und PDMS-Oberflächen	139
14.2 Aminosilylierung von Glasoberflächen	139
14.3 Präparation der Hyaluronsäuregele	139
14.4 Beschichtung der Mikrokugeln	140
14.5 Proteine	140
14.6 Pufferlösungen	141
15 Zusammenfassung	143
Abbildungsverzeichnis	149
Literaturverzeichnis	153

Abkürzungen und Symbole

ADP	Adenosindiphosphat
AHAPTMS	[<i>N</i> -(6-Aminoethyl)-aminopropyl]-trimethoxysilan
Arp	aktinverwandte Proteine (<i>actin-related proteins</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
β	Reibungskoeffizient
BSA	Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin)
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>charged coupled device</i>)
d	Durchmesser
D	Diffusionskonstante
D_h	hydrodynamischer Durchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
\vec{E}	elektrisches Feld mit dem Betrag E
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
η	Viskosität
η^ϕ	Effizienz eines Hologramms
f	Brennweite
\vec{F}	Kraft mit dem Betrag F
f_0	Eckfrequenz
ϕ	Phasenmaske/Hologramm
FT	Fourier-Transformation
GAA	generalisierter adaptiver-additiver (Algorithmus)
GS	Gerchberg-Saxton (-Algorithmus)
HA	Hyaluronsäure (<i>hyaluronic acid</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMM	schwere Meromyosinkette (<i>heavy mero myosin</i>)
HOT	Holographische optische Pinzetten (<i>holographic optical tweezers</i>)
I	Intensität
k	Federkonstante
K	Kernfunktion
k_B	Boltzmannkonstante
l	Helizität oder Windungszahl eines optischen Wirbels
\bar{l}_1	arithmetisches Mittel der Steigung einer helikalen Phasenmaske
\bar{l}_2	quadratisches Mittel der Steigung einer helikalen Phasenmaske
λ	Wellenlänge

L	Drehimpuls
L_p	Persistenzlänge
NA	numerische Apertur
Nd:YVO ₄	Neodym:Yttriumvanadat (-Laser)
NEMHMM	mit <i>N</i> -Ethylmaleimid modifiziertes HMM
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PDMS	Polydimethylsiloxan
p_s	Strahlungsdruck
PS	Prismensuperposition
Q	Gütefaktor
r	Radius
S	Prismensuperposition
\vec{S}	Poyntingvektor
$S(f)$	Leistungsspektrum
SLM	ortsaufgelöster Phasenmodulator (<i>spatial light modulator</i>)
SZ	erweiterter Superpositionsansatz mit Zufallsphasenoffset
T	Rotationsperiode eines optischen Wirbels
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat
v	Geschwindigkeit
W_{pot}	potentielle Energie

Einleitung

„*There's Plenty of Room at the Bottom*“ - In seinem visionären Vortrag¹ hat Richard P. Feynman (1918-1988) bereits 1959 das Tor zur Welt des Allerkleinsten aufgestoßen und damit gleichsam den Startschuss gegeben für die rasante Entwicklung der Mikro- und Nanotechnologie [Fey60]. Dieser Prozess wurde besonders erfolgreich in der Mikroelektronik vorangetrieben. Immer kleinere Strukturen führen zu immer leistungsfähigeren Rechenmaschinen. Eine Entwicklung, die nach dem Mooreschen Gesetz zu einer Verdopplung der Komplexität integrierter Schaltkreise in Intervallen von etwa 24 Monaten führt [Moo65]. Die dazu entwickelten Techniken sind in ihrer Anwendung nicht auf die Elektronik beschränkt, sondern bieten die Möglichkeit einer Miniaturisierung komplexer Strukturen und Systeme in unterschiedlichsten Anwendungsgebieten. So ist es nicht verwunderlich, dass die Miniaturisierung auch vor der Chemie nicht halt gemacht hat. Hier liegt das ehrgeizige Ziel in der Integration ganzer Labore auf einem Chip [Rey02, Kni02]. Die Herausforderungen, denen es sich zu stellen gilt, sind dabei ungleich größer als in der Mikroelektronik. Es müssen unterschiedlichste Analysewerkzeuge miniaturisiert und verschiedenste chemische Komponenten manipuliert werden. Mikroskopische Flüssigkeitsmengen, das Pendant zu den elektrischen Strömen in der Elektronik, müssen in kleinsten Kanälen gesteuert und gezielt miteinander vermischt werden. Die erste Realisierung eines Mikroanalysesystems, eines Gaschromatographen auf einem Siliziumchip, liegt bereits mehr als 25 Jahre zurück [Ter79]. Trotz der bemerkenswerten Eigenschaften des Systems hinsichtlich Größe und Analysegeschwindigkeit fand es nahezu keine Beachtung in der Wissenschaft. Der eigentliche Beginn der Miniaturisierung in der Chemie liegt im Jahre 1990 als Manz *et al.* das Konzept des *miniaturized total chemical analysis system* (μ TAS) oder *lab on a chip* einführten [Man90]. Dieses sieht eine Vereinigung sämtlicher Analyseschritte von der Probenvorbereitung über die Auftrennung bis zur eigentlichen Analyse vor mit dem Ziel einer höheren Leistungsfähigkeit.

Die Miniaturisierung eines chemischen Labors bietet neben dem offensichtlichen Vorteil einer massiven Reduzierung der notwendigen und handhabbaren Probenmengen, Möglichkeiten, die weit über eine reine Verkleinerung makroskopischer Systeme hinausgehen. Flüssigkeitsströme in mikrometergroßen Geometrien (Mikrofluidik) zeigen besondere Eigenschaften, die sie von ihrem ma-

¹Der Vortrag wurde am 29. Dezember 1959 während des Jahrestreffen der *American Physical Society* am *California Institute of Technology* gehalten.

kroskopischen Gegenpart unterscheiden [Sto01, Bee02, Hon03]: Das Oberfläche-Volumen-Verhältnis ist sehr hoch². Die daraus resultierende hohe Wärmeaustauschleistung erlaubt ein sehr schnelles Erwärmen und Abkühlen der Reaktionsmischungen, so dass Reaktionen unter isothermen Bedingungen mit exakt definierten Verweilzeiten durchgeführt werden können. Das sind Möglichkeiten, die im besonderen Maße für industrielle Reaktionsprozesse von großer Bedeutung sind [Jäh04]. Charakteristisch für Mikrofluidikanwendungen sind weiterhin kleine Reynoldszahlen und damit verbunden laminare Strömungsverhältnisse. Dieses Phänomen ermöglicht die Generierung komplexer nicht-trivialer chemischer Gradienten [Jeo02] und eine ultraschnelle Durchmischung von Flüssigkeiten [Pol02a]. Schließlich zeichnen sich mikrofluide Systeme durch kleine Grashofzahlen aus: Dichteunterschiede führen zu keiner Konvektion in dem System. Damit lassen sich Flüssigkeitsgrenzschichten realisieren, die zu einer hoch effizienten Kristallisation von Proteinen genutzt werden konnten [Han02].

Die Verkleinerung und Miniaturisierung komplexer Systeme in den Mikrobereich führen zu mikrofluiden Strukturen, die mannigfaltige Vorbilder in der Natur besitzen: Der Sauerstofftransport durch Erythrozyten mit einem Durchmesser von 6 bis 8 μm durch feine Kapillaren vergleichbarer Größe ist nur ein Beispiel. Ein weiteres stellt die Zelle selbst dar als ein mikrometergroßes flüssigkeitsgefülltes Kompartiment. Mikrofluide Kanäle und durch Diffusion dominierter Stofftransport sind somit essentielle Charakteristika des Lebens an sich [Vog88]. Es ist daher nicht erstaunlich, dass in den letzten Jahren das Interesse an den Mikrolaboren auf Seiten der Biologie stark angewachsen ist. Damit hat der Miniaturisierungsprozess schließlich auch Einzug in die Lebenswissenschaften gefunden und wirkt dort in vielen Bereichen als treibende Kraft für neue Entdeckungen. Die Mikrolabore liefern ein Werkzeug, das auf zellulärer Ebene operiert und mit dem sich einzelne Objekte zellulärer Dimension manipulieren und untersuchen lassen. Komplexere Strukturen sind damit handhabbar, die immer mehr in den Fokus aktueller Bestrebungen in der Biologie gelangen. Die Vielzahl bisheriger biologischer Forschung zeichnet sich durch eine reduktionistische Vorgehensweise aus. Das biologische Gesamtsystem wird in eine Vielzahl kleinerer Subsysteme gegliedert, deren Einzelbestandteile experimentell zugänglich und beschreibbar sind. Exemplarisch hierfür seien die erfolgreiche Kartierung des menschlichen Genoms oder die Strukturaufklärung von Proteinen genannt. Nach diesen Erfolgen stellt sich nun die Herausforderung, ein Verständnis des Ganzen, der Funktionsweise einer subzellulären Einheit, einer Zelle oder schließlich eines vollständigen Organ und Organismus zu erlangen. Der reduktionistische Ansatz allein ist dazu nicht ausreichend. Eine Summe aller Einzelteile beschreibt das Gesamtsystem nicht vollständig. Struktur, Dynamik, Kontrollmechanismen und Interaktionen zwischen den Grundeinheiten sind von entscheidender Bedeutung. Die Systembiologie (*systems biology*) versucht durch Fokussierung auf das Gesamtsystem die Komplexität des Lebens in den Griff zu bekommen [Kit02]. Mikrofluidische *lab-on-a-chip*-Ansätze werden hier eine wichtige Rolle spielen: Auf der einen Seite ermöglichen sie die Er-

²Die spezifischen Oberflächen liegen für Mikrostrukturen bei Werten von 10000 m^{-1} bis 100000 m^{-1} , während traditionelle Reaktoren etwa 100 m^{-1} erreichen [Jäh04].

fassung und Analyse einer großen Datenmenge, die durch Parallelisierung der Prozesse noch verstärkt wird. Auf der anderen Seite ermöglichen sie, komplexe biologische Strukturen direkt zu untersuchen und damit Wechselwirkungen innerhalb dieser Systeme aufzuklären.

Methodisch ergänzt wird die Systembiologie durch das Konzept der Biomimetik. Diese nimmt eine verbindende Position zwischen dem reduktionistischen Ansatz und dem umfassenden Systemansatz ein. Das Ziel der Methode ist die Nachbildung und Nachahmung biologischer Strukturen aus definierten Grundeinheiten. Auf diese Weise entsteht ein künstliches *In-vitro*-System, dessen Komplexitätsgrad und Zusammensetzung sich exakt steuern lässt. Dadurch können das Zusammenspiel und die Wechselwirkung der einzelnen Komponenten in einem überschaubaren reduzierten Subsystem untersucht [Upa03] und durch gezielte Veränderung der Einfluss verschiedener Faktoren auf das System beobachtet werden [Ide01]. Ein eindrucksvolles Beispiel für ein isoliertes biologisches Subsystem stellt die jüngst realisierte Kombination von Muskelzellen mit einem Mikrosystem zur *In-situ*-Charakterisierung der mechanischen Muskeleigenschaften dar [Xi05]. Gerade solche Modellsysteme zur Untersuchung chemo-mechanischer Wechselwirkungen stellen hohe Anforderungen an die Mikrolabore. Es gilt, eine Vielzahl unterschiedlicher miniaturisierter Werkzeuge in eine Mikroplattform zu integrieren. Auf der einen Seite stehen Elemente, die eine kontrollierte Chemie im Mikrometerbereich ermöglichen, hierbei handelt es sich vor allem um Mikrofluidikkomponenten zur Steuerung und Regulation von Flüssigkeiten [Ung00, Tho02]. Auf der anderen Seite müssen diese durch physikalische Mikrowerkzeuge ergänzt werden, die dazu dienen, Systeme zu strukturieren und zu manipulieren und darüber hinaus als Sensoren zur quantitativen Erfassung verschiedener Parameter eingesetzt werden können [Vli03]. Die Verschiedenartigkeit und Komplexität der Elemente, insbesondere der mechanischen Komponenten, stellt die große Herausforderung für die Integration auf kleinstem Raum dar.

Eine Lösung dieses Problems bietet die Anwendung des Lasers, der als ein nicht-invasives Steuerelement eingesetzt werden kann. Ein fokussierter Laserstrahl ist in der Lage, kleine dielektrische Objekte stabil einzufangen und wird deshalb als optische Pinzette bezeichnet [Ash86]. Damit besteht die Möglichkeit, Elemente eines Mikrolabors anzusteuern, zu bewegen, Kräfte auszuüben und auch zu messen. Erste Anwendungen haben dies bereits erfolgreich demonstriert [Ter02, Eng04, He05], beschränken sich jedoch bislang auf die Verwendung eines einzelnen Laserstrahls. Komplexere simultane Manipulationen einer Vielzahl von Elementen lassen sich daher nicht realisieren. Der Zugang zu höheren Systemen ist damit verwehrt. Die Entwicklung holographischer optischer Pinzetten (*holographic optical tweezers*, HOT) könnte an dieser Stelle einen entscheidenden Wendepunkt markieren [Gri03]: Durch gezielte Veränderung der Laserwellenfront produzieren HOT eine nahezu beliebige Zahl optischer Pinzetten, die sich unabhängig voneinander ansteuern lassen und darüber hinaus Eigenschaften besitzen, die sich mit einer konventionellen optischen Pinzette nicht erzielen lassen. Die Entwicklung der HOT befindet sich zur Zeit noch in den Kinderschuhen und konzentriert sich im Wesentlichen auf technische Aspekte und Demonstrationen der Möglichkeiten. Die Anwendungen der HOT

auf komplexere Systeme, die über eine einfache Suspension von Mikrokugeln hinausgehen [Mac03, Lad04b], existieren bislang nicht, schon gar nicht Experimente in Analogie zu den Einzelmoleküluntersuchungen mit Hilfe einer konventionellen optischen Pinzette, die zu fundamentalen Einsichten in die Interaktion und Eigenschaften von Proteinsystemen führten [Svo93, Fin94, Cec05]. Jedoch sind es gerade die letztgenannten Beispiele, welche die hohen Erwartungen an die HOT hinsichtlich der Untersuchung biologischer Systeme rechtfertigen.

An diesem Punkt soll die vorgelegte Arbeit einen Beitrag zur Weiterentwicklung und Integration der HOT im Grenzbereich zwischen angewandter Optik, Mikrofluidik und biologischen Mikrosystemen leisten. Ihr Ziel bestand in der Entwicklung eines opto-mechanischen Mikrolabors, das HOT als mikrophysikalisches und mikrofluide Elemente als chemisches Werkzeug in einer integrierten Plattform vereinigt, die schließlich einen Zugang zur Generierung und Untersuchung komplexer biologischer Strukturen ermöglicht. Entsprechend den verschiedenen Forschungsbereichen ist die Dissertation in drei Teile gegliedert: Der erste Teil umfasst die Arbeiten auf dem Gebiet der Optik. Eine HOT-Apparatur wurde aufgebaut und in ein Fluoreszenzmikroskop integriert. Verschiedene Aspekte der HOT wurden eingehend hinsichtlich einer praktischen Anwendung untersucht und weiterentwickelt. Im zweiten Teil wird die Herstellung eines Mikrofluidiksystems präsentiert, das eine Kombination mit den HOT erlaubt und verschiedene Möglichkeiten zur Kontrolle des chemischen Milieus im Mikrometerbereich bietet. Der dritte Teil zeigt schließlich erste Anwendungen des Mikrolabors zur Erzeugung biomimetischer Strukturen.

Teil I

Holographische optische Pinzetten

Eine optische Pinzette oder optische Falle, realisiert durch die Fokussierung eines Laserstrahls, ist in der Lage, Impuls des Lichts auf kleinste Objekte zu übertragen, so dass sie stabil festgehalten werden. Wird die Wellenfront des Lasers durch ortsabhängige Variation von Amplitude und Phase gezielt verändert, so lässt sich die einzelne optische Pinzette in eine Vielzahl aufspalten. Holographische optische Pinzetten (HOT) nutzen diese Manipulation des Lasers, um komplexe Anordnungen und Bewegungen optischer Fallen zu realisieren. Die grundlegenden Konzepte und Prinzipien optischer Kräfte und der HOT sollen zu Beginn des ersten Teils vorgestellt werden (Kap. 2 und 3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HOT-Apparatur aufgebaut und mit einem separaten Fluoreszenzmikroskop kombiniert. Dieses System und seine Besonderheiten werden in Kap. 4 näher beschrieben.

Die Anwendung der HOT als ein praktikables Werkzeug insbesondere für die Untersuchung komplexer Systeme setzt eine eingehende Charakterisierung ihrer Eigenschaften voraus. Essentielle Bedeutung besitzt die Berechnung der Hologramme, die zur Manipulation des Laserlichts eingesetzt werden. Im Kap. 5 werden die Ergebnisse des Vergleichs verschiedener Algorithmen zur Hologrammberechnung sowie die Auswirkungen der Geometrie der optischen Fallen auf die Effizienz und Qualität der holographisch erzeugten optischen Pinzetten präsentiert. Zur Durchführung quantitativer Kraftmessungen ist eine Kalibrierung der optischen Fallen erforderlich. Zwei verschiedene Methoden wurden auf die HOT angewandt und miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang wurden die Möglichkeiten einer individuellen Intensitätsmodulation in einem Vielfallensystem untersucht (Kap. 6). Die präzise Positionierung der optischen Pinzetten ist eine weitere wichtige Voraussetzung für eine praktische Anwendung der HOT. Die Abhängigkeiten und Limitierungen wurden ermittelt und in Kap. 7 vorgestellt. In Kap. 8 wird schließlich eine neu entwickelte Klasse sogenannter optischer Wirbel vorgestellt. Diese besonderen optischen Fallen ermöglichen den Transfer von Drehimpuls und damit die Rotation optisch gefangener Objekte.

Optische Fallen

2.1 Grundlagen optischer Kräfte

Die Idee, Licht oder elektromagnetische Strahlung im Allgemeinen zu nutzen, um Objekte aus der Ferne zu manipulieren, festzuhalten und zu bewegen, ist nicht nur ein altes Motiv der phantastischen Literatur, auch in der Wissenschaft wurde die Möglichkeit einer Kraftübertragung durch Licht schon früh aufgegriffen. So machte bereits Anfang des 17. Jahrhunderts der Astronom Johannes Kepler (1571-1630) die Entdeckung, dass der Schweif eines Kometen immer von der Sonne weg gerichtet ist und postulierte als Ursache für dieses Phänomen einen Strahlungsdruck des Sonnenlichts, der kleinste Staub- und Gasteilchen von dem Himmelskörper fortbewegen kann (Abb. 2.1). Über 200 Jahre nach Kepler konnte der schottische Physiker James Clerk Maxwell (1831-1879) schließlich in seiner Theorie des Elektromagnetismus im Jahre 1873 zeigen, dass einer elektromagnetischen Welle und damit dem Licht ein Impuls zugeschrieben werden kann.

Zur näheren Beschreibung dieses Sachverhalts sollen im Folgenden verschiedene physikalische Größen eingeführt werden, die eine quantitative Behandlung des Impulsübertrags von Licht auf Materie und einen tieferen Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglichen. Die Flussdichte der Energie einer elektromagnetischen Welle lässt sich durch das Kreuzprodukt des elektrischen Feldes \vec{E} und des magnetischen Feldes \vec{B} beschreiben:

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu_0} \vec{E} \times \vec{B} \quad (2.1)$$

mit der magnetischen Feldkonstante μ_0 . Der Vektor \vec{S} wird nach seinem Entdecker Sir John Poynting (1852-1914) als Poynting-Vektor bezeichnet. Stehen \vec{E} und \vec{B} in einer elektromagnetischen Welle senkrecht aufeinander, so gibt der Betrag von \vec{S} die momentane Leistung und die Richtung von \vec{S} die Ausbreitungsrichtung der Welle an. Die Intensität einer elektromagnetischen Welle (die mittlere übertragene Leistung $\langle P \rangle$ pro Flächeneinheit A) ist gegeben durch das zeitliche Mittel des Betrags des Poynting-Vektors:

$$I = \frac{\langle P \rangle}{A} = \langle |\vec{S}| \rangle. \quad (2.2)$$

Der Betrag des Impulses \vec{p} einer elektromagnetischen Welle ist bestimmt durch

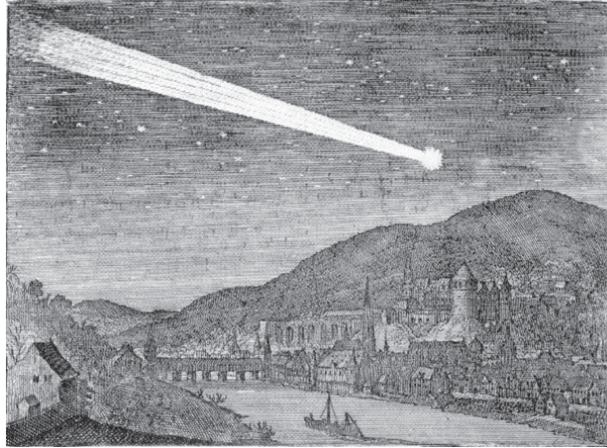


Abbildung 2.1: Im Jahre 1618, zu Lebzeiten Johannes Keplers, erscheint ein Komet über Deutschland, welcher über Monate hinweg am Firmament zu beobachten ist. Auch über Heidelberg ist dieser zu sehen und wird in einem Stich festgehalten, der wahrscheinlich von Matthäus Merian angefertigt wurde. Deutlich zu erkennen ist neben den Wahrzeichen der Stadt der charakteristische helle Schweif.

die Energie W der Welle und der Lichtgeschwindigkeit c :

$$p = \frac{W}{c}. \quad (2.3)$$

Für den aus einer Impulsänderung resultierenden Betrag der Kraft \vec{F} gilt damit

$$F = |\vec{F}| = \frac{dp}{dt} = \frac{1}{c} \frac{dW}{dt} = \frac{P}{c}. \quad (2.4)$$

Teilt man die Intensität durch die Lichtgeschwindigkeit c , erhält man nach Gl. 2.2 und Gl. 2.4 eine Kraft pro Flächeneinheit. Die durch c dividierte Intensität einer elektromagnetischen Welle stellt somit einen Druck dar, der als Strahlungsdruck p_S bezeichnet wird¹:

$$p_S = \frac{I}{c}. \quad (2.5)$$

Betrachtet man eine Welle, die senkrecht auf eine Oberfläche trifft und vollständig reflektiert wird, so wird ein Impuls übertragen, dessen Betrag aufgrund der Richtungsänderung der Welle dem doppelten Energieübertrag entspricht. Die dabei auftretende Kraft F ergibt sich damit nach Gl. 2.4 zu

$$F = \frac{2P}{c}. \quad (2.6)$$

Liegt die Leistung P des eingestrahlt Lichts in der Größenordnung von 1 W und wird vollständig an einem Objekt reflektiert, so resultiert gemäß Gl. 2.6 eine Kraft F in der Größenordnung von 1 nN. Die experimentelle Untersuchung

¹Dieser Strahlungsdruck des Sonnenlichts ist auch tatsächlich verantwortlich für die Orientierung des sogenannten Staubschweifs (Typ II-Schweifs) eines Kometen. Damit bestätigte sich für diese Art eines Kometenschweifs die frühe Keplersche Postulierung eines Strahlungsdrucks.

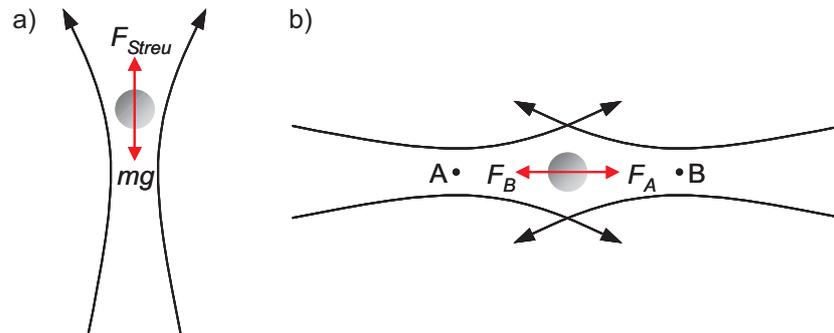


Abbildung 2.2: Die Abbildung zeigt verschiedene erste Realisierungen optischer Fallen durch Arthur Ashkin. In (a) wird eine stabile Gleichgewichtslage durch Kompensation der durch einen einzelnen Laserstrahl ausgeübten Streukraft und der Gravitationskraft (mg) erreicht; es handelt sich bei diesem Versuchsaufbau um eine sogenannte Schwebefalle. In (b) werden zwei entgegengesetzte Laserstrahlen auf das zu fangende Teilchen gerichtet. Die dabei auftretenden Streukräfte halten das Teilchen in einer stabilen Gleichgewichtsposition. Die Strahltaillen der Laser sind mit A und B gekennzeichnet.

und Anwendung dieser Kräfte war lange Zeit aufgrund ihrer geringen Größe nicht möglich. Erst die Entwicklung des Lasers in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts bot die Möglichkeit, intensitätsstarkes kollimiertes Licht zu erzeugen. Damit ließen sich nun Kräfte realisieren, die in der Lage sind, mikroskopische Objekte aufgrund ihrer geringen Masse messbar zu beeinflussen. Die ersten Experimente dazu führte Arthur Ashkin in den frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts in den AT&T Bell Laboratorien in den USA durch. Er demonstrierte, dass mit Hilfe eines Lasers kleine dielektrische Partikel in Wasser und Luft bewegt und angehoben werden können [Ash70, Ash71, Ash75, Ash80]. Bei diesen ersten Realisierungen einer optischen Falle handelte es sich um sogenannte „Schwebefallen“. Hier halten sich der Strahlungsdruck eines Lasers und die auf die Teilchen wirkende Gravitation die Waage (Abb. 2.2).

In einem anderen Versuchsaufbau nutzte Ashkin zwei entgegengerichtete Laser, um eine stabile optische Falle zu erzeugen. Seine Arbeiten zum Strahlungsdruck bereiteten damit das Fundament für die Entwicklung laserbasierter Atomfallen und Kühlmethoden [Chu91], welche schließlich in den vergangenen Jahren in der Realisierung ultrakalter Bose-Einstein-Kondensate gipfelten [Chi05]. Bereits im Jahre 1978 schlug Ashkin eine besondere Form der optischen Falle vor, welche er schließlich 1986 experimentell realisieren konnte: die optische Pinzette [Ash78, Ash86]. Eine optische Pinzette besteht aus einem stark fokussierten Laserstrahl. Diese unterscheidet sie damit von den oben vorgestellten früheren Realisierungen einer optischen Falle. Um eine starke Fokussierung zu erzielen, wird gewöhnlich ein Mikroskopobjektiv hoher numerischer Apertur (NA) verwendet. Die NA , welche ein Maß für die Lichtsammel­eigenschaften eines Objektivs darstellt, ergibt sich aus dem Brechungsindex n_m des Mediums zwischen Objektiv und Deckglas und dem halben Öffnungswinkel $\theta/2$ des

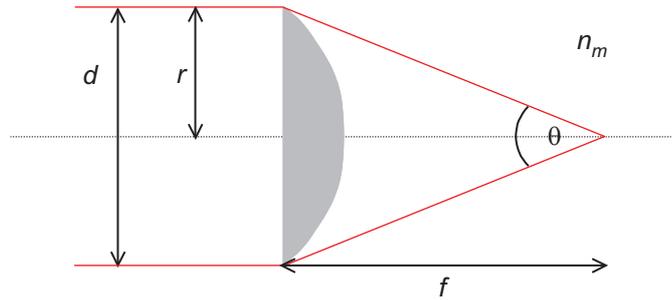


Abbildung 2.3: Die Abbildung zeigt die Größen, welche die numerische Apertur eines optischen Linsensystems definieren. Dies sind der effektive Öffnungsdurchmesser d bzw. der Aperturradius r , die Brennweite f und der Brechungsindex n_m des Mediums. Der Öffnungswinkel θ ist dann durch d und f bestimmt.

fokussierten Lichtkegels (Abb. 2.3) zu

$$NA = n_m \sin(\theta/2). \quad (2.7)$$

Gilt für ein Linsensystem die Abbesche Sinusbedingung, wie es für korrigierte Mikroskopobjektive der Fall ist, so gilt folgender Zusammenhang zwischen der NA , der Brennweite f und dem Aperturdurchmesser d des Objektivs:

$$NA = \frac{d}{2f}. \quad (2.8)$$

Befindet sich ein Teilchen in der Nähe des Fokus, so kommt es aufgrund der Wechselwirkung zwischen Licht und Materie zu einem Impulsübertrag vom Licht auf das Teilchen. Die damit verbundene Kraft wird traditionell in zwei Komponenten unterteilt: die *Streukraft*, welche in die Ausbreitungsrichtung des Lichts weist und auf dessen Streuung und Reflexion an dem Objekt basiert und die *Gradientenkraft*, welche in Richtung der räumlichen Intensitätsgradienten des elektrischen Feldes des Lasers weist. Diese Unterteilung ist ein reines Hilfsmittel zur Beschreibung der optischen Kräfte, beide basieren auf demselben physikalischen Prinzip: der Impulsübertragung von Licht auf Materie. Die vertrautere der beiden Kräfte ist die Streukraft. Diese entspricht dem bereits oben erwähnten Strahlungsdruck: Das Licht wird an der Oberfläche des Teilchens in verschiedene Richtungen gestreut bzw. absorbiert. Es kommt zu einer Kraftwirkung auf das Teilchen. Für ein isotrop streuendes Teilchen heben sich die einzelnen Komponenten bis auf die vorwärts, in Ausbreitungsrichtung des Lichts weisende Komponente auf. Das Teilchen erfährt somit eine Beschleunigung in diese Richtung. Die vorwärtsgerichtete Streukraft ist gewöhnlich die dominierende Kraft, welche auf das Teilchen einwirkt. Diese nutzte auch Ashkin in seinen ersten Realisierungen optischer Fallen. Existieren allerdings steile Intensitätsgradienten, wie nahe dem Fokus eines fokussierten Lasers, so muss auch die Gradientenkraft berücksichtigt werden: In einem inhomogenen elektrischen Feld \vec{E} erfährt ein elektrischer Dipol $\vec{\mu}$ eine Kraft in Richtung des Feldgradienten. Am Ort höchster Intensität ($I \propto |\vec{E}|^2$) wird die potentielle Energie W_{pot}

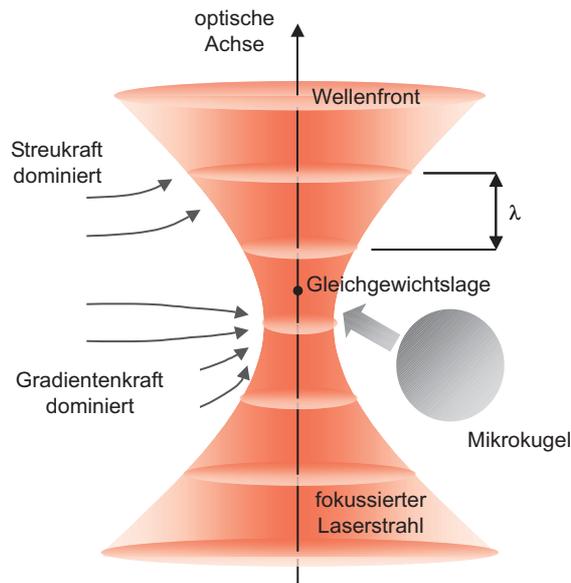


Abbildung 2.4: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer optischen Pinzette. Diese besteht im Wesentlichen aus einem stark fokussierten Laserstrahl. Die auf diese Weise erzeugten Intensitätsgradienten können mit kleinen (in der Größenordnung der Wellenlänge des verwendeten Laserlichts liegenden) Partikeln messbar wechselwirken. Die dabei auftretenden Kräfte führen zu einer stabilen Gleichgewichtslage des Teilchens etwas oberhalb des Fokus.

des Systems minimiert, es gilt:

$$W_{pot} = -\vec{\mu} \cdot \vec{E}. \quad (2.9)$$

In einer optischen Falle induziert der Laser fluktuierende Dipole in einem dielektrischen Teilchen. Die Dipole wechselwirken mit den inhomogenen Feldgradienten im Fokus und führen so zu den Gradientenkräften. Diese sind damit proportional zu der Polarisierbarkeit des dielektrischen Teilchen und dem Intensitätsgradienten im Fokus. Um eine in alle Raumrichtungen stabile optische Falle zu generieren, ist es notwendig, dass die Gradientenkräfte, welche das Teilchen in den Fokus ziehen, die Streukräfte übertreffen, welche das Teilchen aus dem Fokus hinausdrängen. Die Verwendung eines Objektivs mit hoher NA erfüllt diese Bedingung, da durch diese eine steile Intensitätsänderung entlang der optischen Achse durch Fokussierung des Laserstrahls in einen beugungslimitierten Punkt erzeugt werden kann. Als Ergebnis dieses Wechselspiels zwischen Streukraft und Gradientenkraft befindet sich die Gleichgewichtslage des gefangenen Objekts nicht exakt im Fokus des Lasers, sondern ist aufgrund der Streukraft etwas in Ausbreitungsrichtung des Lichts entlang der optischen Achse verschoben (Abb. 2.4).

2.2 Physikalische Beschreibung der Kräfte in optischen Pinzetten

In Erweiterung von Gl. 2.4 lässt sich die durch eine optische Pinzette ausgeübte Kraft auf ein gefangenes Teilchen beschreiben durch

$$F = Q \frac{n_m P}{c_0} \quad (2.10)$$

mit dem dimensionslosen Gütefaktor Q und der Vakuumlichtgeschwindigkeit c_0 . Der Gütefaktor ist ein Maß für die Effizienz eines konkreten optischen Systems bestehend aus optischer Pinzette und gefangenem Objekt. Der Gütefaktor hängt damit von der NA , der Laserwellenlänge, der Polarisation des Laserlichts, der Lasermode, dem relativen Brechungsindex und der Geometrie des Partikels ab. Bei mikrometergroßen dielektrischen sphärischen Teilchen, wie sie typischerweise in Experimenten genutzt werden, liegt Q im Bereich zwischen 0,03 und 0,1. Zur theoretischen Beschreibung einer optischen Pinzette können zwei Grenzfälle betrachtet werden, die eine Berechnung der auf ein optisch gefangenes Teilchen wirkenden Kräfte erlauben:

2.2.1 Strahlenoptische Betrachtung der optischen Pinzette

Der erste Grenzfall behandelt Objekte deren Radien wesentlich größer sind als die Wellenlänge des Fallenlasers ($r \gg \lambda$). In diesem Fall sind die Bedingungen für die Mie-Streuung (Gustav Mie, 1869-1957) erfüllt und die optischen Kräfte können durch einfache Strahlenoptik [Ash86, Ash92] berechnet werden. Brechung des einfallenden Laserlichts an der Kugel führt zu einer Änderung der Ausbreitungsrichtung des Lichts und damit zu einer Veränderung des Impulses (Abb. 2.5). Die Richtungsänderung des Lichts an der Grenzfläche zwischen einem Medium mit dem Brechungsindex n_1 und einem Medium mit dem Brechungsindex n_2 lässt sich durch das Brechungsgesetz nach Snellius (Willebrord van Roijen Snell, 1580-1626) berechnen. Es gilt

$$n_1 \sin(\alpha_1) = n_2 \sin(\alpha_2). \quad (2.11)$$

Die Winkel α_1 und α_2 werden durch den ein- und ausfallenden Lichtstrahl und dem Lot auf der Grenzfläche gebildet. Aufgrund des Impulserhaltungssatzes führt die Richtungsänderung des Lichts zu einer entgegengesetzten Impulsänderung des Teilchens. Die Kraft, welche dabei auf das Teilchen übertragen wird, ist proportional zur Intensität des Lichts. Ist der Brechungsindex des Kügelchens größer als der des umgebenden Mediums, so resultiert eine Nettokraft in Richtung des Intensitätsgradienten. Im umgekehrten Falle (Brechungsindex des Teilchens ist geringer als der des Mediums) wird das Teilchen in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt, es wird aus dem Fokus hinausgedrängt. Die äußeren Strahlen, welche in einem flachen Winkel auf die Kugeloberfläche auftreffen, tragen dabei vermehrt zu den Gradientenkräften bei, während die zentralen Strahlen keinen bzw. nur einen geringen Beitrag zu den Gradientenkräften liefern. Allerdings tragen diese Strahlen natürlich weiterhin zu den in

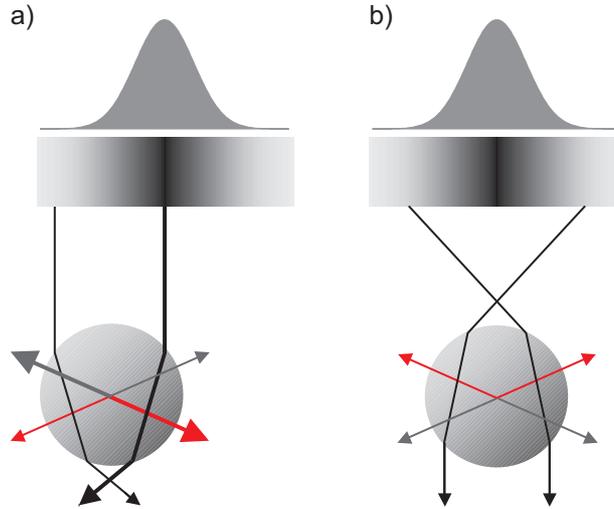


Abbildung 2.5: Strahlenoptische Beschreibung der Gradientenkraft. (a) Paralleles Licht mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung trifft auf ein transparentes Kügelchen. Zwei Strahlen unterschiedlicher Intensität (schwarze Pfeile) sind exemplarisch dargestellt: Durch Brechung an den Grenzflächen (Medium/Kugel) ändert sich die Ausbreitungsrichtung des Lichts. Damit verbunden ist eine Änderung des Impulses des Laserlichts (graue Pfeile), welcher durch eine entgegengesetzte Impulsänderung des Teilchens (rote Pfeile) kompensiert wird. Aufgrund der inhomogenen Intensitätsverteilung in dem dargestellten Fall wirkt eine Nettokraft nach rechts entlang des Intensitätsgradienten. (b) Zur Realisierung einer stabilen optischen Falle, ist es notwendig den Laserstrahl zu fokussieren, um einen dreidimensionalen Intensitätsgradienten zu erzeugen. Die Kugel befindet sich unterhalb des Fokus. Wiederum sind zwei Strahlen exemplarisch dargestellt, die durch die Kugel gebrochen werden und dadurch ihren Impuls ändern (graue Pfeile). Die Impulsänderung der Kugel (rote Pfeile) bewirkt nun eine Nettokraft nach oben entlang des Intensitätsgradienten hin zum Fokus.

der optischen Pinzette unerwünschten Streukräften bei. Daher ist es in der Praxis von Vorteil, das gaußförmige Intensitätsprofil des Laserstrahl so aufzuweiten, dass es etwas größer ist als die Eintrittsöffnung des Objektivs. Auf diese Weise kann das Verhältnis zwischen Gradienten- und Streukraft vergrößert und damit die Stabilität der optischen Falle erhöht werden.

2.2.2 Elektromagnetische Betrachtung der optischen Pinzette

Der zweite Grenzfall zur theoretischen Betrachtung und Beschreibung einer optischen Pinzette ist dadurch gekennzeichnet, dass das gefangene Teilchen wesentlich kleiner ist als die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts ($r \ll \lambda$). In diesem Falle sind die Bedingungen der Rayleigh-Streuung (Lord Rayleigh, 1842-1919) erfüllt und das gefangene Objekt kann als punktförmiger Dipol betrachtet werden. Die Streukraft resultiert dabei aus der Absorption und Reemission von Licht durch den Dipol. Für ein kugelförmiges Objekt kann die Streukraft \vec{F}_s geschrieben werden als

$$\vec{F}_s = \frac{\sigma n_m}{c_0} \langle \vec{S} \rangle \quad (2.12)$$

mit dem Streuungsquerschnitt σ , welcher für ein Objekt mit dem Radius r gegeben ist durch:

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6 n_m}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2. \quad (2.13)$$

Hierbei ist m der relative Brechungsindex definiert durch den Brechungsindex des Partikels und des Mediums (n_p/n_m). Die Streukraft wirkt in Richtung des Lichts. Die zeitlich gemittelte Gradientenkraft \vec{F}_{grad} resultiert aus den Wechselwirkungen des induzierten Dipols mit den inhomogenen elektrischen Feldern \vec{E} des Lasers

$$\vec{F}_{grad} = \frac{\alpha}{2} \nabla \langle \vec{E}^2 \rangle \quad (2.14)$$

mit der Polarisierbarkeit

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right). \quad (2.15)$$

Die Gradientenkraft ist somit proportional zum Intensitätsgradienten und weist in dessen Richtung, wenn $m > 1$.

Liegen die Dimensionen des gefangenen Teilchens in der Größenordnung der Wellenlänge des Fallenlasers ($r \approx \lambda$), so kann weder die Strahlenoptik noch die Punktdipolbetrachtung zur Berechnung der Kräfte herangezogen werden. Zur Beschreibung sind hier umfangreichere elektromagnetische Theorien notwendig [Bar88, Bar89, Alm95, Roh01].

2.2.3 Weitere Kräfte in optischen Pinzetten

Die Gradientenkräfte sind die entscheidenden Kräfte zur Realisierung einer optischen Pinzette. Diese stellen eine rückstellende Kraft dar, welche über eine Distanz von einigen Hundert Nanometern linear von der Auslenkung x abhängt. Neben den optischen Kräften sind allerdings noch weitere Kräfte aufgrund thermischer Bewegung und Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium von Bedeutung. Die Bewegungsgleichung, welche ein optisch gefangenes Objekt der Masse m in einem umgebenden Medium mit dem Reibungskoeffizienten β beschreibt, ist gegeben durch:

$$m \frac{\partial^2 x}{\partial t^2} + \beta \frac{\partial x}{\partial t} + kx = 0, \quad (2.16)$$

hier ist k die Federkonstante der optischen Falle. In Abwesenheit jeglicher Art von Dämpfung ($\beta = 0$) vereinfacht sich Gl. 2.16 zur Bewegungsgleichung des harmonischen Oszillators mit der Resonanzfrequenz f_{res} :

$$f_{res} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}. \quad (2.17)$$

In typischen biophysikalischen Anwendungen liegt die Federkonstante der optischen Falle im Bereich von $50 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ und die gefangenen Objekte besitzen einen Durchmesser von $1 \text{ } \mu\text{m}$. Daraus folgt für die Resonanzfrequenz ein Wert

von ca. 50 kHz. Im wässrigen Medium kann der Dämpfungsterm allerdings nicht vernachlässigt werden. Für kugelförmige Objekte mit dem Radius r in einer Flüssigkeit der Viskosität η lässt sich die Dämpfungskonstante nach Stokes (Sir George Gabriel Stokes, 1819-1903) wie folgt berechnen:

$$\beta = 6\pi\eta r. \quad (2.18)$$

Im Falle eines Kügelchen mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ ergibt sich in Wasser ($\eta = 1 \text{ mPa s}$) für β^2 ein Wert in der Größenordnung von $1 \times 10^{-16} \text{ N kg m}^{-1}$ und für $4mk$ ein Wert von $1 \times 10^{-19} \text{ N kg m}^{-1}$. Damit ist die Bedingung

$$\beta^2 > 4mk \quad (2.19)$$

für ein stark überdämpftes System erfüllt. Dies bedeutet, dass die Trägheitskraft ebenso wie die Gravitation keine Rolle in dem System spielen und vernachlässigt werden können. Neben den Dämpfungseigenschaften des Mediums besitzt dieses den Vorteil als Wärmebad zu fungieren, welches ein Aufheizen des Objekts durch Absorption des Laserlichts verhindert bzw. verringert.

Zur Realisierung einer stabilen optischen Falle ist es weiterhin nicht nur notwendig, dass die Gradientenkräfte die Streukräfte überwiegen. Ein weiteres Stabilitätskriterium ist, dass für den Boltzmannfaktor folgende Bedingung erfüllt sein muss

$$\exp(-U/k_B T) \ll 1 \quad (2.20)$$

mit dem Potential U der optischen Falle und der Boltzmannkonstante k_B und der absoluten Temperatur T . Diese Voraussetzung ist gleichbedeutend mit der Bedingung, dass die Zeit, in der das Objekt von außerhalb der Falle in die Falle hineingezogen wird, geringer sein muss als die Zeit, in der das Objekt durch Diffusion infolge thermischer Bewegung die Falle wieder verlassen kann [Ash86, Vis92].

2.3 Generierung von Vielfallensystemen

Optische Pinzetten wurden experimentell nicht nur in Form optischer Einzelfallen realisiert, auch Vielfallensysteme konnten erfolgreich umgesetzt werden. Erzeugt werden solche Systeme durch das schnelle zyklische Rastern eines Lasers über die verschiedenen gewünschten Fallenpositionen [Vis93], die Aufteilung des Laserstrahls in zwei separate Strahlen, die dann in unterschiedlichen Winkeln in das Objektiv eingekoppelt werden [War93] und schließlich durch die Verwendung computergenerierter Hologramme [Rei99, Duf01]. Mit Hilfe solcher Vielfallensysteme ist es möglich, verschiedene Objekte unabhängig voneinander zu positionieren und anzuordnen. Im Folgenden sollen die drei Techniken kurz vorgestellt werden, bevor dann in Kap. 3 näher auf die holographischen optischen Pinzetten eingegangen wird und deren zugrundeliegenden Prinzipien beschrieben werden.

Schnelle zyklische Rasterung

Wird der Laser mit genügend hoher Geschwindigkeit zwischen verschiedenen Positionen hin und her bewegt, so können mehrere Objekte durch einen einzigen Laserstrahl an verschiedenen Orten optisch gefangen werden [Vis93]. Dies ist möglich, da aufgrund der Viskosität des umgebenden Mediums die einzufangenden Teilchen daran gehindert werden, durch Diffusion ihre Position soweit zu verändern, dass sie im nächsten Rasterzyklus durch den Laser nicht mehr eingefangen werden könnten. Die Rastergeschwindigkeit muss daher dem Diffusionsverhalten der Teilchen und der Stärke der optischen Falle angepasst werden. Durch die Einstein-Beziehung (Albert Einstein, 1879-1953) kann das Diffusionsverhalten der Partikel beschrieben werden: Die Diffusionskonstante D ist gegeben durch

$$D = \frac{k_B T}{\beta} \quad (2.21)$$

mit der Boltzmannkonstanten k_B , der absoluten Temperatur T und dem Reibungskoeffizienten β . Für die quadratisch gemittelte Verschiebung eines Teilchens durch Diffusion nach der Zeit t gilt

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt. \quad (2.22)$$

Für den Fall eines in Wasser suspendierten Objekts mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ ist $d = 4 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Ist der Fallenlaser für einen Zeitraum von $25 \mu\text{s}$ abwesend (dies ist beispielsweise der Fall für ein Zweifallensystem mit einer Rasterfrequenz von 20 kHz), so beträgt die durch Diffusion zurückgelegte mittlere Distanz ungefähr 5 nm. Diese ist gering genug, um eine stabile Falle zu gewährleisten, stellt allerdings eine Limitierung der Präzession dar mit der das Objekt platziert und seine Position bestimmt werden kann. Zur Strahlrasterung lassen sich verschiedene Techniken einsetzen: Neben mechanischen Spiegeln bieten sich vor allem akusto-optische und elektro-optische Strahlableiter (*acousto-optic deflector*, AOD und *electro-optic deflectors*, EOD) an. Ein AOD nutzt ein optisches Beugungsgitter in einem Kristall. Dieses wird durch Dichteschwankungen, welche durch eine Ultraschallwelle erzeugt werden, generiert. Ein EOD ändert durch Anlegen eines elektrischen Feldes den Brechungsindex eines Kristalls. Auf diese Weise können Brechungsindexgradienten in dem Material erzeugt werden, die eine Strahlableitung bewirken.

Strahlaufteilung

Die konzeptionell einfachste Methode zur Generierung mehrerer optischer Fallen besteht in der Aufteilung eines Laserstrahls in Teilstrahlen, welche unabhängig voneinander ausgelenkt und in unterschiedlichen Winkeln in das Objektiv eingekoppelt werden. Wirklich praktikabel ist diese Methode allerdings nur zur Erzeugung zweier optischer Fallen, da die unabhängige präzise Kontrolle der Teilstrahlen aufwändig und kostenintensiv ist. Andererseits bietet die Strahlaufteilung den Vorteil, zeitlich konstante optische Pinzetten zur Verfügung zu haben, im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Rasterverfahren, das eine simultane Erzeugung optischer Fallen zum gleichen Zeitpunkt nicht zulässt. Dies

kann eine unabdingbare Voraussetzung sein, wenn beispielsweise mechanische Eigenschaften von Polymeren durch Dehnung mit zwei optischen Pinzetten untersucht werden sollen.

Holographische Methoden

Eine elegante Möglichkeit, einen Laserstrahl in mehrere Strahlen aufzuteilen, besteht darin, ein beugendes optisches Element (diffraktives optisches Element, DOE) in den Strahlengang des Lasers zu platzieren. Dieses Element wechselwirkt mit dem auftreffenden Laserstrahl und verändert dessen Phase und bzw. oder Amplitude so, dass er in verschiedene Unterstrahlen aufgeteilt wird. Nach Einkopplung in das Objektiv kann jeder dieser gebeugten Teilstrahlen in eine einzelne optische Falle fokussiert werden. Als beugende optische Elemente können computergenerierte Hologramme² verwendet werden, welche den auftreffenden Laserstrahl derart verändern, dass das durch das Objektiv in die Fokusebene projizierte Beugungsmuster der gewünschten Anordnung von optischen Fallen entspricht.

2.4 Kalibrierung optischer Fallen

Die Kräfte, welche sich durch optische Pinzetten erreichen lassen, liegen in der Größenordnung von 1 bis 100 pN [Gri03, Neu04]. Um diese quantitativ zu bestimmen, werden die Kräfte gewöhnlich nicht direkt gemessen, stattdessen wird zunächst die Federkonstante k der optischen Falle bestimmt. Diese kann dann in Verbindung mit der Auslenkung x des gefangenen Objekts aus der Gleichgewichtslage dazu genutzt werden, die wirkenden Kräfte F mittels des Hookeschen Gesetzes (Sir Robert Hooke, 1637-1703)

$$F = -kx \quad (2.23)$$

zu berechnen. Die Kräftekalibrierung reduziert sich damit auf die Kalibrierung der Federkonstante und eine separate Messung der Auslenkung, die natürlich eine weitere Kalibrierung der Positionsbestimmung erfordert. Bei Verwendung einer CCD-Kamera zur Beobachtung der zu untersuchenden Objekte und deren Auslenkung aus der Falle ist dies sehr einfach durch Betrachtung eines Referenzmaßstabes möglich. Auf diese Weise lässt sich einem Bildpunkt eine absolute Größe zuweisen. Zur Bestimmung der Federkonstanten existieren verschiedene Methoden, von denen einige nun vorgestellt werden sollen.

Analyse des Leistungsspektrums

Werden Mikrokugeln mit bekanntem Radius mit einer optischen Falle gefangen, so kann deren thermische Bewegung in dem harmonischen Fallenpotential

²Ein Hologramm stellt das Interferenzmuster eines Referenzstrahls und eines anderen die Bildinformation enthaltenden Strahls dar. Wird der Referenzstrahl auf das Hologramm gerichtet, so lässt sich der Bildstrahl rekonstruieren. Ursprüngliche wurden Hologramme optisch erzeugt. Zur Unterscheidung von berechneten Hologrammen werden letztere als computergenerierte Hologramme bezeichnet.

genutzt werden, um dessen Federkonstante k zu bestimmen. Die Bewegungsgleichung des Teilchens ist gegeben durch

$$\beta \frac{\partial x}{\partial t} + kx = F(t) \quad (2.24)$$

mit dem Reibungskoeffizienten β und der thermischen Kraft $F(t)$, welche durch Kollisionen mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen auf die Kugel einwirkt. Die Dynamik des gefangenen Teilchens wird dann durch ein lorenzförmiges Leistungsspektrum wiedergegeben [Wan45]

$$S(f) = \frac{k_B T}{\pi^2 \beta (f_0^2 + f^2)}. \quad (2.25)$$

Die Größe $S(f) \cdot \Delta f$ gibt das mittlere Verschiebungsquadrat pro Frequenzintervall $[f, f + \Delta f]$ an. Die Eckfrequenz f_0 der Lorenzkurve ist durch den Reibungskoeffizienten β und die Federkonstante k bestimmt:

$$f_0 = \frac{k}{2\pi\beta}. \quad (2.26)$$

Damit lässt sich experimentell die Federkonstante durch Analyse des Leistungsspektrum der thermischen Bewegung des optisch gefangenen Objekts und aus β bestimmen. Diese Methode bedarf somit keiner Positionskalibrierung des Teilchens. Der Reibungskoeffizient lässt sich für sphärische Partikel durch das Stokes-Gesetz (Gl. 2.18) berechnen, solange sich die Kugel in großer Entfernung einer Oberfläche, wie dem Boden oder der Decke der Probenkammer, befindet. Ist dies nicht der Fall, so treten zusätzliche Wandeffekte bei der Reibung auf, welche den hydrodynamischen Widerstand erhöhen. Der Reibungskoeffizient kann in diesem Fall durch das Faxensche Gesetz berechnet werden:

$$\beta = \frac{6\pi\eta r v}{1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{h}\right)^5}. \quad (2.27)$$

Für große Abstände h zwischen Kugel und Wand geht die Gleichung über in das Stokes-Gesetz (Gl. 2.18). Relative Änderungen des Reibungskoeffizienten für verschiedene Wandabstände sind in Tab. 2.1 wiedergegeben.

Äquipartitionstheorem

Die thermische Fluktuation eines Objekts in einer optischen Falle kann auch unter Verwendung des Äquipartitionstheorem genutzt werden, um die Federkonstante zu bestimmen. Das Theorem besagt, dass jeder molekulare Freiheitsgrad mit quadratischem Energieterm mit einer mittleren Energie von $k_B T/2$ zur Gesamtenergie des Systems beiträgt. Für die Auslenkung x eines Objekts aus seiner Gleichgewichtslage in einem harmonischen Potential gilt damit:

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k \langle x^2 \rangle. \quad (2.28)$$

Tabelle 2.1: Reibungskoeffizient einer Kugel in der Nähe einer planaren Oberfläche (Faxensches Gesetz). Der Abstand zwischen Kugelmittelpunkt und Oberfläche ist gegeben durch h , der Kugelradius beträgt r .

(h/r)	Reibungskoeffizient relativ zu $h = \infty$
1,01	2,97
1,1	2,36
1,5	1,62
2	1,39
3	1,23
4	1,16
5	1,13
10	1,06
50	1,01
∞	1,00

Durch Messen des quadratischen Auslenkungsmittel $\langle x^2 \rangle$ kann somit direkt die Federkonstante bestimmt werden. In diesem Fall ist jedoch eine Positionskalibrierung notwendig. Andererseits entfällt hier die Abhängigkeit von der Reibungsdämpfung. Eine Kenntnis der Viskosität des umgebenden Mediums, der genauen Geometrie des Objekts und dessen Abstand von der Oberfläche sind daher nicht notwendig.

Analyse des optischen Potentials

Anstatt lediglich das quadratische Auslenkungsmittel der Positionen eines optisch gefangenen Objekts für die Bestimmung der Federkonstante zu nutzen (2.28), kann auch die vollständige Verteilung sämtlicher gemessener Teilchenverschiebungen zur Ermittlung des Fallenpotentials $U(x)$ herangezogen werden. Die Wahrscheinlichkeit $P(x)$ das Objekt am Ort x anzutreffen ist gegeben durch die Boltzmannverteilung (Ludwig Boltzmann, 1844-1906):

$$P(x) \propto \exp\left(-\frac{U(x)}{k_B T}\right). \quad (2.29)$$

Handelt es sich um ein harmonisches Potential ($U(x) = kx^2/2$), entspricht die Verteilung einer Gaußkurve mit der Federkonstanten als dem formbestimmenden Parameter. Ein anharmonisches Potential lässt sich prinzipiell auch mit Hilfe der Partikelverteilung unter Auflösung von Gl. 2.29 nach $U(x)$ ermitteln. In der Praxis allerdings ist dies oft nicht angebracht, da es sich immer um zu einem gewissen Grad verrauschte Daten handelt: Die Flanken der Verteilung, welche die entscheidenden Informationen über das Potential beinhalten, stellen die Datengruppe mit der geringsten Zahl an Messwerten dar und sind damit mit der höchsten Unsicherheit behaftet.

Hydrodynamische Reibungskraft

Einen unmittelbaren Zugang zur Bestimmung der Federkonstante der optischen Falle bietet die Ausnutzung der hydrodynamischen Reibung. Bewegt man das gefangene Objekt durch die Flüssigkeit bzw. die Flüssigkeit bei fixierter Positionierung der Falle, so bewirkt die auftretende Reibungskraft eine Verschiebung des Objekts. Im Gleichgewicht gilt daher

$$\beta v = kx. \quad (2.30)$$

Bei kugelförmigen Teilchen kann wieder das Stokes-Gesetz (Gl. 2.18) bzw. das Faxen-Gesetz (Gl. 2.27) zur Berechnung des Reibungskoeffizienten β benutzt werden. Misst man die Federkonstante als Funktion der Auslenkung, so kann auf einfache Weise der lineare Bereich der Federkonstante ermittelt werden.

2.5 Anwendungen der optischen Pinzette

Es verging nicht viel Zeit nach der Entwicklung und Demonstration der optischen Pinzette im Jahre 1986, bis dieses Werkzeug eine breite Anwendung in der Forschung fand. Insbesondere für die Untersuchung biologischer Fragestellungen wurde die neue Technik schnell aufgegriffen und man begann, damit mechanische Eigenschaften zellulärer und subzellulärer Systeme zu untersuchen. Beispiele hierfür sind die Charakterisierung des Fortbewegungsapparates von Bakterien [Blo89], die Messung der Kräfte, welche einzelne Motorproteine ausüben [Fin94] und der Elastizität einzelner DNA-Moleküle [Wan97]. Durch Kombination der optischen Pinzette mit einem weiteren Laser konnten optische Skalpelle realisiert werden [Lia93]. In den allerersten biologischen Experimenten, welche mit optischen Fallen durchgeführt wurden, nutzte man Proben, welche aufgrund ihrer Größe geeignet waren, direkt mit der Laserpinzette eingefangen zu werden. Bereits Ashkin *et al.* testeten das von ihnen entwickelte Werkzeug an biologischen Systemen: Sie demonstrierten das optische Einfangen von Bakterien und Tabakmosaikviren [Ash87a], die Manipulation einzelner Zellen [Ash87b] und Zellorganellen [Ash89] und konnten schließlich die optische Pinzette auch zur quantitativen Erfassung der Kräfte, welche bei der Organellenbewegung in lebenden Zellen auftreten, benutzen [Ash90]. Die ersten Experimente mit kalibrierten optischen Pinzetten wurden bereits im Jahre 1989 durchgeführt: Block *et al.* [Blo89] untersuchten die Torsionselastizität von Bakterienflagellen. Sie nutzten optische Pinzetten, um den Zellkörper von Bakterien einzufangen, deren Flagellen an einem Glasdeckgläschen fixiert waren. Zur Kalibrierung der dabei durch die optische Pinzette ausgeübten Kräfte nutzen sie die Zeitkonstante, welche die Orientierung des Bakteriums im viskosen Medium beschrieb. Mit diesem Experiment war nun der Weg geebnet für weitere quantitative Experimente unter dem Einsatz der optischen Pinzette als Kraftübermittler und als Kraftsonde. In einer Vielzahl der folgenden Untersuchungen wurden und werden die zu untersuchenden Objekte nicht direkt mit dem Laser manipuliert, vielmehr werden sie an kleine mikrometergroße Kügelchen geheftet. Diese dienen damit als optisch handhabbarer Griff mit dem es möglich ist, auch kleinste

Objekte einer Untersuchung zugänglich zu machen, z.B. biologische Makromoleküle wie DNA und Proteine. Diese besitzen Durchmesser von weniger als 25 nm und sind damit zu klein, um in einer optischen Falle fixiert zu werden. Weiterhin erlaubt die reproduzierbare Größe und Form der Mikrokugeln eine einfache Kalibrierung des Systems. Eine eindrucksvolle Anwendung von Mikrokugeln als Griffe zur Untersuchung molekularer Systeme und ein Meilenstein in der Einzelmoleküluntersuchung stellen die Untersuchungen von Svoboda *et al.* im Jahre 1993 [Svo93] dar. Sie waren in der Lage, die Einzelschritte eines molekularen Motors, des Proteins Kinesin, welches sich entlang eines Mikrotubulus bewegt, zu messen. In ihrem Experiment war ein einzelnes Kinesinmolekül an eine Mikrokugel gebunden, welche dann mit Hilfe einer optischen Pinzette in die Nähe eines auf einem Deckgläschen fixierten Mikrotubulus gebracht wurde. Sobald die beiden Proteine interagierten, bewegte sich die Mikrokugel aus ihrer Gleichgewichtslage. Diese Verschiebung und die dazu korrespondierenden Kräfte konnten experimentell erfasst und quantitativ ausgewertet werden. Auf diese Weise wurde eine diskrete Schrittlänge von 8 nm für ein Kinesinmolekül nachgewiesen. Mit diesem Experiment gelang erstmals die Beobachtung eines einzelnen Motorproteins in Echtzeit. Die Daten konnten ohne Mittelung aus mehreren Experimenten bzw. der Erfassung eines Molekülensembles aus dem Verhalten eines einzelnen Moleküls gewonnen werden. Ein Jahr später im Jahre 1994 wurde dann mit Hilfe eines Zweifallensystems die Wechselwirkungen zwischen dem Motorprotein Myosin und einem Aktinfilament, dem molekularen Grundbaustein der Muskeln, untersucht [Fin94]. Die Motorproteinsysteme stellen aufgrund ihrer mechanischen Funktion im lebenden Organismus ideale Untersuchungsobjekte für biophysikalische Kraftmessungen dar. Doch nicht nur die Interaktion zwischen zwei Proteinen ist von wissenschaftlichem Interesse. Entscheidend für die Struktur und Funktion eines Proteins ist der Prozess der Proteinfaltung und damit der Wechselwirkungen innerhalb der Aminosäurekette, welche das Protein bilden. Auch hier konnten optische Pinzetten als Werkzeug eingesetzt werden. Tskhovrebova *et al.* nutzen diese, um das Protein Titin auseinanderzuziehen und schrittweise zu entfalten [Tsk97].

Im Bereich der Physik fanden optische Pinzetten aufgrund ihrer einzigartigen Fähigkeit, Mikroobjekte nicht invasiv zu organisieren und zu strukturieren, eine Vielzahl von Anwendungen in der klassischen statistischen Mechanik. Beispielsweise konnte so erstmals die makromolekulare Wechselwirkung von Kolloiden direkt in Lösung gemessen werden [Cro94]. Die Möglichkeit des quantitativen Einblicks in die Kolloidsysteme führte dabei oft zu überraschenden Ergebnissen, wie die anomale Anziehung gleichgeladener Partikel [Cro96], oszillierender Partikelwechselwirkung aufgrund entropischer Effekte durch Zugabe kleinerer Kügelchen [Ohs97, Cro99, Ver00, Yod01] und hydrodynamischer Fluktuationen, welche als transiente Verletzungen des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik interpretiert werden können [Wan02]³. Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel aus dem Bereich der statistischen Mechanik ist der experimentelle Test

³Der Widerspruch der Beobachtungen in Bezug auf den zweiten Hauptsatz der Thermodynamik löst sich allerdings schon bei genauer Betrachtung des Titels der Veröffentlichung: Behandelt werden „... small systems and short time scales“. Das zeitliche Mittel eines größeren Ensembles steht wie zu erwarten im Einklang mit den Sätzen der Thermodynamik.

der Jarzynski Gleichung [Jar97]. Diese stellt einen Zusammenhang zwischen der freien Energie eines reversibel geführten Prozesses und der Zustandsänderung, welche fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt wird, her. Getestet wurde diese Aussage durch Entfaltung von RNA-Strukturen mit Hilfe optischer Pinzetten [Lip02].

Zunehmend bilden sich neben den klassischen Anwendungsgebieten in der Biologie und der Physik weitere Felder zum Einsatz optischer Pinzetten aus: Insbesondere die stark wachsenden Bereiche der Mikro- und Nanotechnologie suchen nach Techniken zur Strukturierung und Manipulation kleinster Objekte. Die Weiterentwicklung der optischen Pinzetten hin zu einem leistungsstarken Viellochensystem liefert ein Werkzeug, das den Bedürfnissen dieser Technologien entsprechen kann und damit zukünftig interessante neue Anwendungen liefern wird.

Prinzipien der holographischen optischen Pinzetten

Durch die Platzierung eines diffraktiven optischen Elements (DOE) in den Strahlengang eines Lasers, lässt sich dieser in eine Vielzahl von Unterstrahlen aufteilen, welche sich unter verschiedenen Winkeln und mit verschiedenen Amplituden in Abhängigkeit der spezifischen Eigenschaften des DOE weiter ausbreiten (Abb. 3.1). Werden die einzelnen Strahlen nun in ein Objektiv eingekoppelt, so können diese durch Fokussierung jeweils eine optische Falle bilden. Solche diffraktiven Strahlteiler lassen sich in Form computer-generierter Hologramme erzeugen. Die auf diese Weise gebildeten optischen Fallen werden als holographische optische Pinzetten (*holographic optical tweezers*, HOT) [Duf98b, Duf01] bezeichnet. Mit Hilfe photolithographischer Techniken lassen sich DOE erzeugen, welche die zuvor berechneten Hologramme kodieren. Auf diese Weise können eine Vielzahl statischer optischer Fallen mit einer beliebigen räumlichen Anordnung erzeugt werden. Eine Erweiterung der Technik gelang mit dem Einsatz eines computer-gesteuerten und orts aufgelösten Phasenmodulators (*spatial light modulator*, SLM). Bei diesem handelt es sich um einen Flüssigkristall, dessen optische Eigenschaften durch Anlegen eines elektrischen Feldes pixelweise verändert werden können [Rei99]. Auf diese Weise lassen sich im Rahmen der Orts- und Phasenauflösung des SLM beliebige Hologramme generieren. Durch die Projektion einer ganzen Serie von Hologrammen lassen sich mit einem SLM auch bewegte, dynamische HOT erzeugen [Cur02]. Über die bloße Kontrolle von Anzahl und Position der optischen Fallen hinaus können die Hologramme genutzt werden, die charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Fallen zu ändern: Diese können beispielsweise nicht nur lateral sondern ebenfalls in verschiedenen Ebenen senkrecht zur optischen Achse positioniert werden. Weiterhin können neben den Standardfallen komplexe Lasermoden, wie beispielsweise Laguerre-Gauß-Moden genutzt werden, um "ungewöhnliche" optische Fallen zu erzeugen, wie optische Wirbel und Ringfallen [He95b, Lie00, Cur03b, Gri03]. Ein alternativer Ansatz zur Generierung eines dynamischen Vielfallensystem mit einem SLM bietet die generalisierte Phasenkontrast-Technik (*generalized phase contrast*, GPC). Diese konvertiert ein Phasenmuster, welches durch einen SLM erzeugt wird, direkt in ein korrespondierendes Intensitätsmuster in der Fokusebene des Objektivs [Mog00]. Die Umwandlung der Phaseninformation in eine Intensitätsverteilung geschieht mit

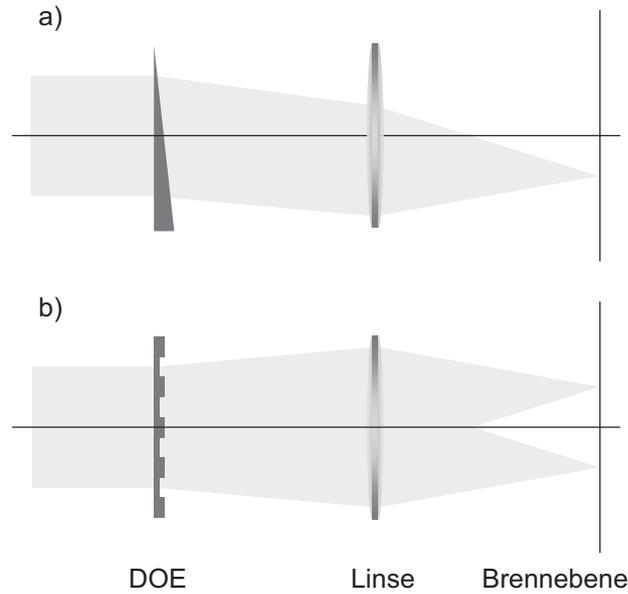


Abbildung 3.1: Wirkungsweise eines DOE. In (a) ist ein einfaches optisches Prisma dargestellt, welches die Phase des auftreffenden Lasers von oben nach unten in linear ansteigender Form erhöht. Dies führt zu einer Verschiebung des Fokus. In (b) ist ein periodisches Gitter dargestellt, welches die relative Phase des Lichts um 0 bzw. π erhöht. Das Beugungsbild in der Brennebene besteht in diesem Fall aus zwei symmetrisch zur optischen Achse angeordneten Punkten. Aus Übersichtsgründen sind nur die Beugungsmaxima erster Ordnung dargestellt, höhere Ordnungen sind hier nicht berücksichtigt (siehe Kap. 6).

Hilfe einer ringförmigen Phasenplatte, ähnlich wie in einem Phasenkontrast. Großer Vorteil dieser Technik ist der Wegfall der Hologrammberechnungen, allerdings limitiert die derzeitige Auflösung der erhältlichen SLM die Qualität und Stabilität der optischen Fallen, bei denen es sich um laterale optische Fallen handelt und nicht um dreidimensional stabile optische Pinzetten.

3.1 Beugungstheorie

Um die Wechselwirkung von DOE und Laserlicht und schließlich die Fokussierung in optische Fallen quantitativ zu erfassen, sollen detailliert die Änderungen des elektrischen Feldes des Laserlichts durch die verschiedenen optischen Komponenten beschrieben werden. Das elektrische Feld des Lichts mit der Frequenz ω und dem Polarisationsvektor \hat{e} , welches durch einen Laser erzeugt wird, ist gegeben durch

$$\vec{E}_0^{in}(\vec{r}, t) = E_0^{in}(\vec{r})e^{i\omega t}\hat{e}. \quad (3.1)$$

Der zeitunabhängige Anteil des elektrischen Feldes $E_0^{in}(\vec{r})$ lässt sich durch die Amplitude A_0^{in} und Phase $\Phi_0^{in}(\vec{r})$ vollständig beschreiben:

$$E_0^{in}(\vec{r}) = A_0^{in}(\vec{r})e^{i\Phi_0^{in}(\vec{r})}. \quad (3.2)$$

Wird ein DOE in den Strahlengang platziert, so verändert dieses durch Wechselwirkung mit dem Licht dessen elektrisches Feld, das sich nun durch $E^{in}(\vec{r})$ beschreiben lässt:

$$E^{in}(\vec{r}) = A^{in}(\vec{r})e^{i\Phi^{in}(\vec{r})}. \quad (3.3)$$

Die durch das DOE hervorgerufene Beugung des Laserstrahls kann als Aufspaltung in verschiedene Teilstrahlen unterschiedlicher Phase und Amplitude aufgefasst werden, die sich weiter ausbreiten und im Unendlichen durch Interferenz ein Beugungsmuster erzeugen. Dies sind die Voraussetzungen der Fraunhoferbeugung (Joseph Fraunhofer, 1787-1826). Durch eine Sammellinse kann das Beugungsbild aus dem Unendlichen in die Fokusebene der Linse projiziert und dort betrachtet werden (Abb. 3.2). Das elektrische Feld in der Fokusebene mit der Ortskoordinate $\vec{\rho}$ ist gegeben durch

$$E^f(\vec{\rho}) = A^f(\vec{\rho})e^{i\Phi^f(\vec{\rho})}. \quad (3.4)$$

Die beiden Felder der Eingangsebene *in*, in der sich das DOE befindet, und der Fokusebene *f*, welche das Beugungsbild enthält, sind durch eine Fourier-Transformation (FT) \mathcal{F} miteinander verknüpft:

$$E^f(\vec{\rho}) = \mathcal{F}\{E^{in}(\vec{r})\} \quad (3.5)$$

$$\equiv \frac{k}{2\pi f} e^{-i\theta(\vec{\rho})} \int d^2r E^{in}(\vec{r}) e^{ik\vec{r}\cdot\vec{\rho}/f} \quad (3.6)$$

mit der Brennweite f der verwendeten Linse und der Wellenzahl k des einfallenden Laserlichts. Die Geometrie der verwendeten Linse führt zu dem zusätzlichen Phasenprofil $\theta(\vec{\rho})$. Durch Anwendung einer inversen Fouriertransformation \mathcal{F}^{-1} erhält man entsprechend aus dem Feld in der Fokusebene das elektrische Feld in der Eingangsebene:

$$E^{in}(\vec{r}) = \mathcal{F}^{-1}\{E^f(\vec{\rho})\} \quad (3.7)$$

$$\equiv \frac{k}{2\pi f} \int d^2\rho e^{-i\theta(\vec{\rho})} E^f(\vec{\rho}) e^{ik\vec{r}\cdot\vec{\rho}/f}. \quad (3.8)$$

Zur Erzeugung von optischen Fallen in der Brennebene der Linse sind die entscheidenden physikalischen Größen die räumliche Verteilung der Intensität und der Intensitätsgradienten, da diese die Kräfte innerhalb einer optischen Pinzette bestimmen (Gl. 2.14). Die Intensität ist gegeben durch

$$I^f(\vec{\rho}) \propto |E^f(\vec{\rho})|^2 = |A^f(\vec{\rho})|^2. \quad (3.9)$$

Die Phase des Laserlichts in der Fokusebene spielt damit für die optischen Fallen keine Rolle, ebensowenig wie das zusätzliche Phasenprofil der Linse $\theta(\vec{\rho})$. Damit sind die berechneten Hologramme unabhängig von dem verwendeten Objektiv allgemein verwendbar. Die Eigenschaften eines DOE, welches eine bestimmte Intensitätsverteilung in der Fokusebene und damit die gewünschte Anordnung von optischen Fallen erzeugt, sind somit durch Anwendung der FT leicht zugänglich. In der praktischen Umsetzung ist man allerdings darum bemüht, das DOE so

zu wählen, dass ausschließlich die Phase des auftreffenden Laserlichts verändert wird und die Amplitude konstant bleibt. Eine reine Phasenmodulation gewährleistet, dass die gesamte Leistung des Lasers zur Erzeugung der optischen Pinzetten zur Verfügung steht, da in diesem Fall keine Absorption des Lichts durch das DOE nötig ist, um die Amplitude zu modulieren. Dies verhindert weiterhin eine Erwärmung des DOE, welche im Extremfall zu dessen Zerstörung führen kann. Die Maximierung der effektiv nutzbaren Leistung und damit die Minimierung der Absorption ist gerade im Falle eines Viellfallensystems von besonderer Bedeutung, da hier eine relativ hohe Gesamtleistung notwendig ist, welche auf die einzelnen Pinzetten verteilt werden muss. Die Berechnung reiner Phasenhologramme wird dadurch ermöglicht, dass die Intensitätsverteilung $I^f(\vec{\rho})$, die bestimmende Größe für die optischen Fallen, unabhängig von der Phasenverteilung $\Phi^f(\vec{\rho})$ und damit einen hohen Entartungsgrad bezüglich der Phase aufweist. Die Entartung kann nun genutzt werden, um ein Hologramm zu finden, welches durch reine Phasenmodulation das gewünschte Resultat, die gewünschte Intensitätsverteilung liefert. Dies geschieht gewöhnlich durch die Verwendung eines iterativen Algorithmus, der ausgehend von einer Zufallsphasenverteilung und der Zielintensitätsverteilung durch einen FT-Zyklus das gewünschte Hologramm liefert (Kap. 3.2). Abschließend sollen die vorgestellten Gleichungen zur Berechnung eines konkreten Systems, der Bildung einer einzelnen optischen Falle, angewendet werden. Typischerweise wird eine optische Pinzette durch Fokussierung eines Laserstrahls mit gaußförmigen Strahlprofil erzeugt. Das Intensitätsprofil eines solchen Strahls ist gegeben durch

$$I_G^{in}(\vec{r}) = \frac{P}{2\pi\sigma_{in}^2} e^{-\frac{r^2}{2\sigma_{in}^2}} \quad (3.10)$$

mit der Laserleistung P und dem Radius σ_{in} . Das elektrische Feldprofil kann damit durch

$$E_G^{in}(\vec{r}) = A_G^{in}(\vec{r}) = \sqrt{I_G^{in}(\vec{r})} \quad (3.11)$$

beschrieben werden. Die Anwendung der FT (Gl. 3.6) liefert das elektrische Feld in der Fokusebene und mit Gl. 3.9 die Intensitätsverteilung:

$$I_G^f(\vec{\rho}) = \frac{P}{2\pi\sigma_f^2} e^{-\frac{\rho^2}{2\sigma_f^2}} \quad (3.12)$$

mit dem Radius

$$\sigma_f = \frac{f}{2k\sigma_{in}} = \frac{f}{2kNA}. \quad (3.13)$$

Die optischen Gradientenkräfte werden maximiert, wenn der Radius der Intensitätsverteilung minimiert wird. Eine starke optische Falle lässt sich somit durch die Verwendung eines Objektivs hoher numerischer Apertur und eines Lasers mit geringer Wellenlänge realisieren.

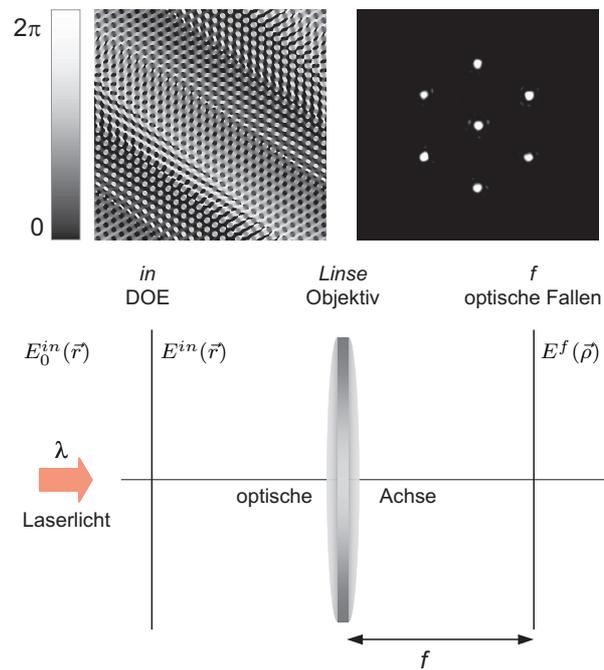


Abbildung 3.2: Die Abbildung zeigt die verschiedenen optischen Ebenen. Fällt Laserlicht der Wellenlänge λ auf ein DOE in der Eingangsebene (in), so erzeugt es nach der Fokussierung durch ein Objektiv ein Beugungsmuster in der Brennebene (f). Die obere Reihe der Abbildung zeigt eine Phasenmaske zur Erzeugung eines hexagonalen Fallenmusters und die korrespondierende Intensitätsverteilung.

3.2 Methoden der Hologrammberechnung

3.2.1 Gerchberg-Saxton-Algorithmus

In diesem Abschnitt soll der Gerchberg-Saxton-Algorithmus [Ger72] in Form der adaptiv-additiven Erweiterung von Soifer *et al.* vorgestellt werden [Soi97]. Es handelt sich dabei um eine numerische iterative Technik, welche die Entartung des Phasenprofils $\Phi^f(\vec{\rho})$ in der Fokusebene nutzt, um eine reine Phasenmodulation des eintreffenden Laserstrahls zu finden, die das gewünschte Pinzettenprofil liefert. Der Algorithmus ist in Abb. 3.3 schematisch dargestellt. Ziel ist die Berechnung eines Phasenhologramms $\Phi_0^{in}(\vec{r})$, welches einen Laserstrahl mit dem Strahlprofil $A_0^{in}(\vec{r})$ so moduliert, dass in der Fokusebene des Objektivs die gewünschte Fallenverteilung $A_0^f(\vec{\rho})$ möglichst perfekt erreicht wird. Ausgehend von einer (willkürlichen) Annahme für die Phase $\Phi_0^{in}(\vec{r})$, berechnet der Algorithmus iterativ ein geeignetes Hologramm, durch Minimierung der quadratischen Abweichung des realen vom gewünschten Intensitätsprofil,

$$\zeta_n = \frac{1}{M^2} \sum_{i=1}^{M^2} (I_n^f(\vec{\rho}_i) - I_0^f(\vec{\rho}_i))^2, \quad (3.14)$$

wobei die Fokusebene entsprechend der Pixelierung des Hologramms in $M \times M$ diskrete Punkte unterteilt wurde. Die Effizienz η^ϕ des Hologramms ist gegeben durch die Gesamtintensität, welche auf die gewünschten Fallenpositionen verteilt wird:

$$\eta_n^\phi = \sum_{i=1}^{M^2} I_n^f(\vec{\rho}_i) \times I_0^f(\vec{\rho}_i) \quad (3.15)$$

mit den Normierungsbedingungen:

$$\sum_{i=1}^{M^2} I_n^f(\vec{\rho}_i) = 1, \quad (3.16)$$

$$I_0^f(\vec{\rho}_j) = 1 \quad (3.17)$$

und den Fallenpositionen $\vec{\rho}_j$. Der erste Schritt des Algorithmus besteht in der Berechnung des elektrischen Feldprofils in der Eingangsebene. Für die erste Iteration ist diese gegeben durch $E_0^{in}(\vec{r}) = A_0^{in}(\vec{r}) \exp[i\Phi_0^{in}(\vec{r})]$. In den darauffolgenden Iterationsschritten wird $E_0^{in}(\vec{r})$ durch das Ergebnis der vorausgehenden Iteration bestimmt. Die Berechnung des korrespondierenden elektrischen Feldes in der Fokusebene $E_n^f(\vec{\rho}) = A_n^f(\vec{\rho}) \exp[i\Phi_n^f(\vec{\rho})]$ erfolgt durch Anwenden einer FT. Die Amplitude dieses Feldes $A_n^f(\vec{\rho})$, welche die tatsächliche Anordnung der optischen Fallen bestimmt (Gl. 3.9), wird mit der Zielintensitätsverteilung der gewünschten Anordnung der optischen Fallen $I_0^f(\vec{\rho})$ verglichen. Ist die Übereinstimmung nicht zufriedenstellend, so wird durch eine Beimischung der gewünschten Fallenanordnung $A_0^f(\vec{\rho})$ die Amplitude $A_n^f(\vec{\rho})$ verändert. Es resultiert ein neuer Ausdruck für das elektrische Feld:

$$\bar{E}_n^f(\vec{\rho}) = [aA_0^f(\vec{\rho}) + (1-a)A_n^f(\vec{\rho})] \exp[i\Phi_n^f(\vec{\rho})] \quad (3.18)$$

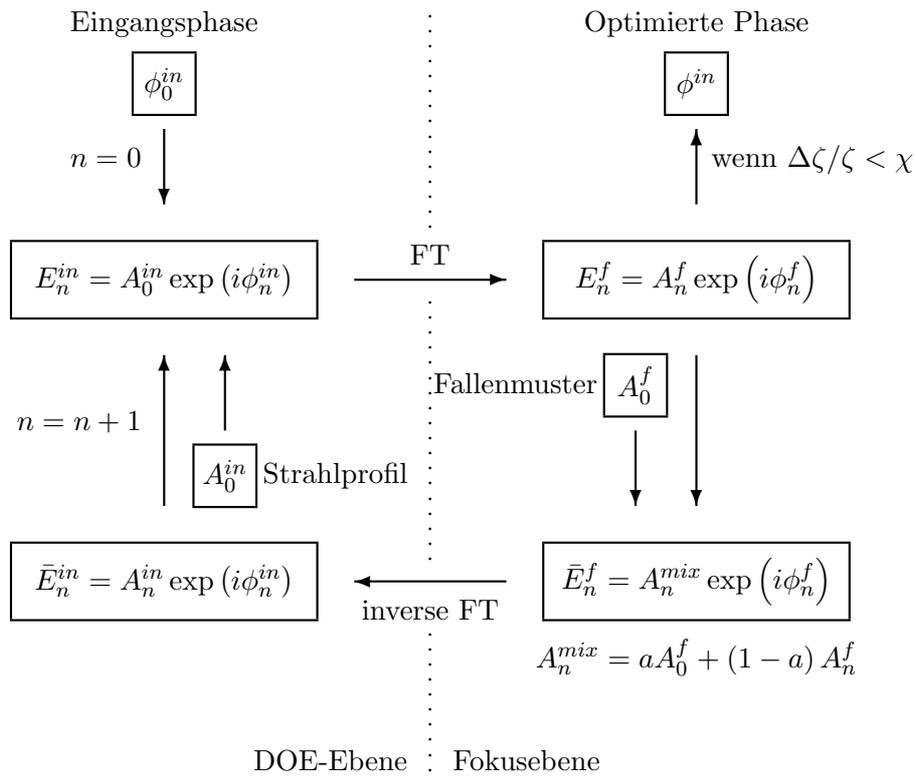


Abbildung 3.3: Der Gerchberg-Saxton-Algorithmus zur Berechnung reiner Phasenhologramme.

mit dem Mischungsparameter a , der Werte zwischen 1 und 0 annehmen kann. Dieses modifizierte Feldprofil wird dann durch eine inverse FT zurück in die Eingangsebene transformiert, es resultiert das elektrische Feld $\bar{E}_n^{in}(\vec{r})$. Dessen Amplitude $A_n^{in}(\vec{r})$ stimmt nach den Transformationen nicht mehr mit dem tatsächlichen Laserprofil $A_0^{in}(\vec{r})$ überein und wird daher durch dieses ersetzt. Der Zähler n wird um 1 erhöht womit eine vollständige Iteration des Algorithmus beendet ist. Der Zyklus wird wiederholt bis die Abbruchbedingung erfüllt ist und die relative Änderung des Fehlerparameters ζ eine vorher festgelegte Schwelle χ unterschritten hat: $\Delta\zeta/\zeta < \chi$. Der Algorithmus liefert bereits nach wenigen Zyklen Hologramme mit einer Effizienz im Bereich von 80 % bis über 90 %. Die genaueren Abhängigkeiten der Effizienzen von Anzahl und Anordnung der optischen Fallen wird in Kap. 6 untersucht.

3.2.2 Prismensuperposition

Die Auslenkung des Laserfokus aus der optischen Achse auf den Punkt ρ_j kann auf einfache Weise durch die Platzierung eines optischen Prismas in den Strahlengang erreicht werden (siehe Abb. 3.4). Dieses Element prägt dem Laser eine in Richtung des Verschiebungsvektors $\vec{\rho}_j$ linear ansteigende Phase auf. Ein solches Phasenprofil lässt sich für ein Objektiv mit der Brennweite f beschreiben durch:

$$\phi_j^{in}(\vec{r}) = \frac{2\pi}{\lambda f} \vec{\rho}_j \cdot \vec{r} \text{ mod } 2\pi. \quad (3.19)$$

Die Modulofunktion reduziert die Phasenwerte auf den effektiven Bereich zwischen 0 und 2π , der auch mit einem Phasenmodulator zugänglich ist. Diese Transformation hat keinen Einfluss auf das durch das DOE erzeugte Bild. Das korrespondierende elektrische Feld eines solchen Prismenhologramms kann analog zu Gl. 3.4 beschrieben werden durch

$$\epsilon_j^{in}(\vec{r}) = \alpha_j^{in}(\vec{r}) e^{i\phi_j^{in}(\vec{r})} \quad (3.20)$$

mit der Amplitude $\alpha_j(\vec{r})$. Ausgehend von diesen einfach zu berechnenden Prismenhologrammen können nun auch die Phasenmasken, die komplexe Anordnungen mehrerer optischer Fallen erzeugen, berechnet werden. Ausgenutzt wird hierbei die Tatsache, dass es sich bei den klassischen optischen Fallen immer um diskrete Punkte handelt. Damit lässt sich jedes Fallenmuster als Überlagerung von Einzelfallen beschreiben. Das zugehörige Hologramm zur Erzeugung von N optischen Fallen ergibt sich damit zu

$$E^{in}(\vec{r}) = \sum_{j=1}^N \epsilon_j^{in}(\vec{r}) \quad (3.21)$$

$$\equiv A^{in}(\vec{r}) e^{i\Phi^{in}(\vec{r})}. \quad (3.22)$$

Die Funktion $E^{in}(\vec{r})$ beschreibt exakt das Hologramm, welches die gewünschte Anordnung von optischen Fallen liefert. Allerdings handelt es sich hierbei nicht mehr um ein reines Phasenhologramm, sondern aufgrund der komplexen Addition der Phasen weist auch die Amplitude $A(\vec{r})$ eine Ortsabhängigkeit auf.

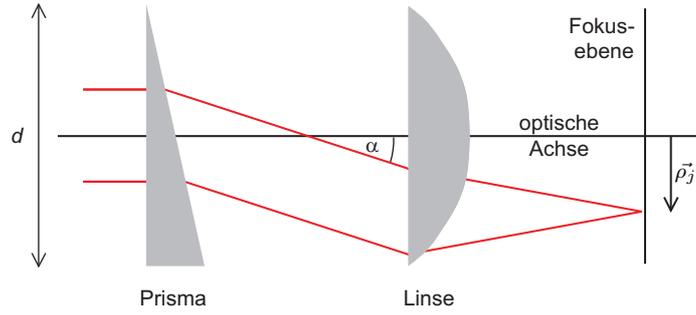


Abbildung 3.4: Ein optisches Prisma prägt dem einfallenden Licht eine linear ansteigende Phase auf, die zu einer Auslenkung des Strahls um den Winkel α und damit zu einer Verschiebung des Fokus in der Brennebene an die Position $\vec{\rho}_j$ führt.

Vernachlässigt man diese jedoch und extrahiert aus $E^{in}(\vec{r})$ die Phaseninformation Φ , so liefert diese erstaunlich gute Resultate im Vergleich zu den Hologrammen, welche durch Verwendung eines iterativen Gerchberg-Saxton-Algorithmus berechnet wurden. Ein Vorteil der Superpositionen von einzelnen Prismenhologrammen besteht in der Möglichkeit, gezielt einzelne optische Fallen und deren Eigenschaften zu verändern, indem das zugehörige Feldprofil $\epsilon_j(\vec{r})$ verändert wird

$$\bar{\epsilon}_j(\vec{r}) = K_j(\vec{r})\epsilon_j(\vec{r}). \quad (3.23)$$

Durch Einführung der Kernfunktion $K_j(\vec{r})$ lassen sich einzelne optische Pinzetten in einem Fallenensemble auf unterschiedlichste Weise unabhängig verändern. Beispielsweise kann die Position einer Falle in Richtung der optischen Achse verschoben werden indem eine Kernfunktion verwendet wird, die das Phasenprofil einer Linse beschreibt:

$$K_j^z(\vec{r}) = e^{ik|\vec{r}|^2 z_j / f^2}. \quad (3.24)$$

Die Lage des Fokus wird dadurch um z relativ zur effektiven Fokalebene des optischen Systems mit der Brennweite f verschoben. Auf diese Weise lassen sich die Wirkungen beliebiger optischer Elemente durch die Implementierung der entsprechenden Phasenprofile realisieren. Natürlich kann eine Kernfunktion auch zur Modifizierung des globalen Hologramms $\Phi^{in}(\vec{r})$ verwendet werden, es wirkt sich dann auf alle optischen Fallen in gleicher Weise aus. Ein weiteres Beispiel für ein optisches Element, welches zur Veränderung einer optischen Falle genutzt werden kann, ist eine zylindrische Linse. Diese fokussiert das Licht in einer Linie statt in einem Punkt und kann damit zur Erzeugung lateraler Linienfallen genutzt werden. Die zugehörige Kernfunktion ist gegeben durch

$$K_j^x(\vec{r}) = e^{ikr_x^2 z_j / f^2}. \quad (3.25)$$

Hier gibt z_j die axiale Verschiebung der Falle aus der Fokalebene an, r_x ist die Komponente von \vec{r} entlang derer die Phasenmodulation erfolgt. Eine besondere Art der Kernfunktion, welche dem Laserstrahl ein helikales Phasenprofil aufprägt, wird aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten gesondert im Kap. 3.3 behandelt. Diese Phasenprofile liefern nach Fokussierung

eine völlig neue Klasse von optischen Fallen: Sie bilden sogenannte optische Wirbel.

3.2.3 Generalisierter Gerchberg-Saxton-Algorithmus

Eine Hologrammberechnungsmethode, welche die beiden vorigen Techniken kombiniert, stellt der generalisierte Gerchberg-Saxton-Algorithmus (GGA) dar. Auf der einen Seite nutzt er den diskreten Prismenansatz der Superposition, andererseits beinhaltet er einen iterativen Zyklus zur Optimierung der Effizienz der Hologramme [Cur02]. Das elektrische Feld einer optischen Falle am Ort $\vec{\rho}_j$ ist unter Verwendung von Gl. 3.20 gegeben durch:

$$\epsilon_j = \epsilon_j^f(\vec{\rho}_j) \quad (3.26)$$

$$= \alpha_j^f(\vec{\rho}_j) e^{i\phi_j(\vec{\rho}_j)}. \quad (3.27)$$

Die diskreten elektrischen Felder ϵ_j an den Orten der optischen Fallen stehen über eine generalisierte FT in Beziehung zu dem elektrischen Feld $E^{in}(\vec{r})$ in der Hologrammebene:

$$E^{in}(\vec{r}) = \sum_{j=1}^N \int d^3\rho \epsilon_j \delta(\vec{\rho} - \vec{\rho}_j) K_j^{-1}(\vec{r}, \vec{\rho}) e^{ik\vec{r} \cdot \vec{\rho}/f} \quad (3.28)$$

$$= \sum_{j=1}^N \epsilon_j K_j(\vec{\rho}_j, \vec{r}) e^{ik\vec{\rho}_j \cdot \vec{r}/f} \quad (3.29)$$

$$\equiv A^{in}(\vec{r}) e^{i\Phi^{in}(\vec{r})}. \quad (3.30)$$

Die Kernfunktionen K_j können auch in diesem Ansatz zur gezielten Modifizierung der optischen Fallen genutzt werden. Falls die berechnete Amplitude $A^{in}(\vec{r})$ aus Gl. 3.30 identisch mit dem Strahlprofil des Lasers ist, so wird durch $\Phi^{in}(\vec{r})$ das Hologramm gegeben, das die gewünschte Anordnung von Fallen erzeugt. Dies ist, wie bereits oben erwähnt, in der Regel nicht der Fall. Jedoch lässt sich die so berechnete Phase als Näherung für das gesuchte Hologramm verwenden und durch den oben beschriebenen Gerchberg-Saxton-Algorithmus iterativ optimieren. Die Phasenmaske $\Phi^{in}(\vec{r})$ wird daher mit dem Strahlprofil des Lasers $A_0^{in}(\vec{r})$ kombiniert und zur Berechnung der elektrischen Felder an den einzelnen Fallenpositionen $\vec{\rho}_j$ genutzt:

$$\epsilon_j^n = \int d^2r A_0(\vec{r}) e^{i\Phi_n^{in}(\vec{r})} K_j(\vec{\rho}_j, \vec{r}) e^{-ik\vec{\rho}_j \cdot \vec{r}/f}. \quad (3.31)$$

Der Index n kennzeichnet den n -ten Iterationsschritt des Algorithmus. Bevor die Felder ϵ_j^n zur Berechnung der optimierten neuen Phasenmaske $\Phi_{n+1}^{in}(\vec{r})$ genutzt werden, wird auch hier die Amplitude α_j durch Beimischung der gewünschten Amplitude analog zu Gl. 3.18 angepasst. Dieses Verfahren entspricht damit dem beschriebenen GS mit dem Unterschied, dass die Berechnung der elektrischen Felder in der Fokusebene für diskrete Punkte, die Fallenpositionen erfolgt. Dadurch wird das globale Hologramm in die Einzelbeträge individueller optischer Fallen zerlegt. Dies bietet den Vorteil, dass über die Kernfunktionen gezielt die Eigenschaften einzelner Fallen auf unterschiedliche Art und Weise verändert werden können.

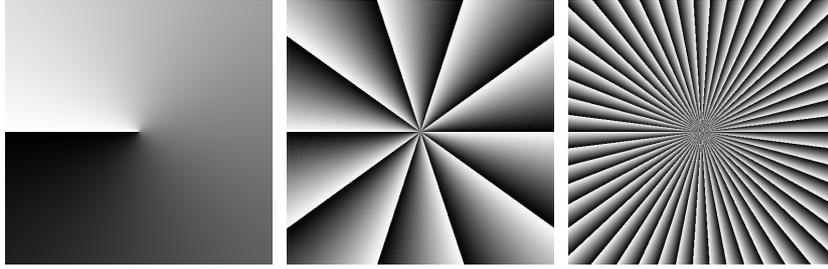


Abbildung 3.5: Hologramme zur Erzeugung optischer Wirbel mit unterschiedlichen Helizitäten: $l = 1$, $l = 10$, $l = -50$.

3.3 Optische Wirbel

Die Möglichkeiten, welche durch die Kernfunktionen gegeben sind, beschränken sich nicht auf eine Veränderung der Positionierung und Form der optischen Pinzette, durch sie ist es möglich, völlig neue Arten optischer Fallen zu generieren. Ein eindrucksvolles Beispiel stellen die optischen Wirbel dar. Optische Wirbel lassen sich durch Fokussierung helikaler Wellenfronten erzeugen. Die zur Transformation notwendigen Kernfunktionen zeichnen sich durch einen Phasenfaktor aus, der sich proportional zum Polarwinkel $\theta(\vec{r})$ verhält:

$$K_j^l(\vec{r}) = e^{il\theta(\vec{r})} \quad (3.32)$$

mit der ganzzahligen Windungszahl l , die auch als topologische Ladung und Helizität des Wirbels bezeichnet wird (Abb. 3.5). Der Winkel θ wird definiert durch die Hologrammebene und die optische Achse. Die achsensymmetrische und gleichmäßige Verteilung sämtlicher Phasen führt zu einer Auslöschung der axialen Intensität. Jeder Strahl einer solchen Wellenfront besitzt einen Gegenpart mit einer um π verschobenen Phase. Die Fokussierung eines Laserstrahls mit helikalem Phasenprofil führt daher durch destruktive Interferenz zu einem dunklen Fokus. Konstruktive Interferenz der Strahlen erzeugt eine ringförmige Intensitätsverteilung mit dem Radius R_l . Die Breite des Rings liegt in der Größenordnung der Wellenlänge λ des Lichts. Helikale Phasenprofile lassen sich durch die Umwandlung der Hermite-Gauß-Lasermode in Laguerre-Gauß-Lasermode erzeugen. Dies kann mit Hilfe zweier zylindrischer Linsen erreicht werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung statischer Hologramme [All99].

Als Besonderheit besitzen helikale Lichtmoden einen Drehimpuls [All92, All99, VS02], welcher auf Objekte übertragen werden kann [VS02, He95a, Fri96, ON02] (Abb. 3.6). Die semi-klassische Betrachtung liefert einen detaillierten Einblick in das Zustandekommen des Drehimpulses und über dessen Größe. Demnach besitzt jedes Photon einer helikalen Mode einen Drehimpuls der Größe $l\hbar$ [All99]. Durch Wechselwirkungen mit einem Objekt kann daher ein Drehmoment auf dieses ausgeübt werden, das sich proportional zur Laserintensität verhält. Eine anschauliche Herleitung dieser besonderen Eigenschaften soll anhand Abb. 3.7 erfolgen: Dargestellt ist die Wechselwirkung einer planaren Wellenfront mit einer transparenten helikalen Phasenplatte. Diese Interaktion führt

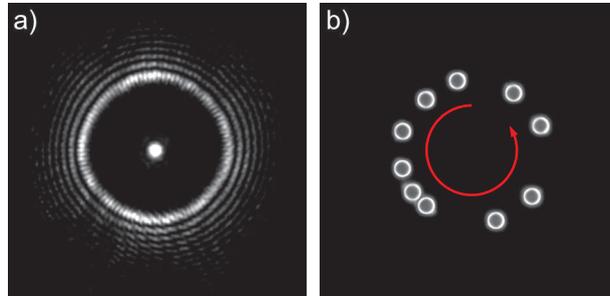


Abbildung 3.6: Aufnahme eines optischen Wirbels mit der Windungszahl $l = 50$. In (a) ist die Intensitätsverteilung des Infrarotlasers in der Fokusebene zu sehen. (b) zeigt zehn Mikrokugeln ($d = 2 \mu\text{m}$), welche durch den Wirbel eingefangen und auf einer Kreisbahn gegen den Uhrzeigersinn rotiert wurden. Das Intensitätsmaximum im Mittelpunkt des Wirbels wird durch Beugung nullter Ordnung erzeugt (Reflexion des Laserlichts durch den SLM).

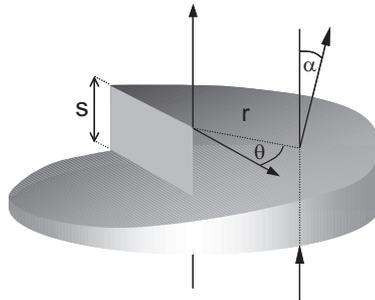


Abbildung 3.7: Wirkungsweise einer helikalen Phasenplatte, die von der Höhe 0 auf die Endhöhe s ansteigt. Ein Lichtstrahl trifft senkrecht im Abstand r vom Zentrum auf die Platte und wird beim Austritt gebrochen. Der Austrittswinkel α lässt sich durch Anwendung des Snellius-Gesetz aus der lokalen Steigung der Platte berechnen.

zur Ausbildung einer helikalen Wellenfront. Die Phasenplatte besitzt den Brechungsindex n und eine Höhe, welche linear mit dem Polarwinkel θ bis zu einer maximalen Größe von $s = l\lambda/(n - 1)$ ansteigt. In großer Entfernung r vom Mittelpunkt kann deren lokale Steigung γ angenähert werden durch

$$\gamma \approx s/(2\pi r). \quad (3.33)$$

Treffen Strahlen senkrecht im Abstand r auf die Phasenplatte, so werden diese nach Verlassen der Phasenplatte gebrochen. Der Brechungswinkel α ergibt sich nach dem Snellius-Gesetz (Gl. 2.11) zu

$$\begin{aligned} n \sin(\gamma) &= \sin(\gamma + \alpha) \\ n\gamma &\approx \gamma + \alpha. \end{aligned} \quad (3.34)$$

Vor dem Eintritt des Strahls in die Phasenplatte besitzt jedes Photon nach der quantenmechanischen Betrachtungsweise einen Impuls der Größe $p = h/\lambda$. Die Brechung des Lichts führt zu einer Richtungsänderung in der Strahlausbreitung und damit zu einer tangentialen Impulskomponente p_θ . Aus dieser Komponente lässt sich nun der Drehimpuls L berechnen, welcher durch die Phasenplatte auf den Lichtstrahl übertragen wird

$$L = rp_\theta = \frac{rh\alpha}{\lambda}. \quad (3.35)$$

Unter Verwendung von Gl. 3.33 und Gl. 3.34 ergibt sich damit für den Drehimpuls

$$L \approx \hbar \frac{s(n-1)}{\lambda} \approx l\hbar. \quad (3.36)$$

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Drehimpuls helikaler Wellenfronten einzig aus ihrer besonderen polarwinkelabhängigen Phasenstruktur und nicht aus der Intensitätsverteilung oder anderer Strahleigenschaften resultiert. Damit unterscheidet sich der Drehimpuls eines optischen Wirbels von dem Drehimpuls zirkular polarisierten Lichts. Letzteres führt dazu, dass absorbierende doppelbrechende Teilchen um ihre eigene Achse rotieren. Im Falle eines optischen Wirbels rotieren Teilchen im Gegensatz dazu mit dem Abstand R_l um die optische Achse (Abb. 3.6). Der Radius ist eine lineare Funktion der Windungszahl l [Cur03b]. Für optische Wirbel, welche sich mit einem SLM erzeugen lassen ($0 \leq l \leq 150$) liegt dieser im Bereich von 0 bis ca. 12 μm .

3.4 Anwendungen der HOT

Abschließend soll ein Überblick über die bisherigen Arbeiten auf dem Gebiet der holographischen optischen Pinzetten gegeben und der aktuelle Stand der Entwicklungen präsentiert werden. Hologramme und andere Arten diffraktiver optischer Elemente wurden ausgiebig genutzt, um komplexe optische Fallen höherer Ordnung zu generieren, wie beispielsweise die bereits oben diskutierten Laguerre-Gauß-Moden [Gri03, Mol02, Dho02, He95a, He95b]. Darüber hinaus wurden diese auch zur Erzeugung von Vielfallensystemen mit beliebiger Intensitätsverteilung eingesetzt [Gri03, Duf98b, Duf01, Kor02a]. Mit der Verwendung

eines SLM zur Projektion variabler Hologramme konnten diese Ansätze und deren Möglichkeiten schließlich einem breiten Anwendungsspektrum zugänglich gemacht werden [Rei99, Duf01, Cur02]. Die Möglichkeiten der HOT-Technologie wurden vielfach zur Strukturierung kolloidaler Partikel in dreidimensionalen definierten Anordnungen [Jor04, Lea04, Sin04a] und jüngst auch zur Generierung quasikristalliner photonischer Strukturen [Roi05] genutzt werden. Darüber hinaus ist eine stetige Weiterentwicklung der Technik bezüglich Hologrammberechnung [Sin04b, Pol05, Lee05b], alternativer SLM-Typen [Hos03] und der Ausnutzung alternativer Beugungsarten [Jes04a] zu beobachten. Exotische Fallenarten wie die optischen Wirbel konnten mit Hilfe der HOT-Technik näher charakterisiert [Cur03b] und weiterentwickelt werden [Cur03a, Jes04b]. Ein neues Anwendungsgebiet gegenüber der klassischen optischen Einzelfalle, welches durch HOT erschlossen werden konnte, liegt im Sortieren mesoskopischer Partikel. Durch unterschiedliche Wechselwirkung mit einer komplexen optischen Potentiallandschaft, die sich holographisch erzeugen lässt, können kleine Objekte nach Größe und Material fraktioniert werden [Kor02b, Mac03, Pel04, Lad04b, Lac05]. Der Transport von Kügelchen konnte durch eine Anordnung gegenläufiger optischer Wirbel, die auf diese Weise als Mikropumpe arbeiten, erzielt werden [Lad04a]. Die einfache Realisierung komplexer Potentiallandschaften eignet sich im besonderen Maße zur Untersuchung grundlegender physikalischer Phänomene wie Phasenübergänge in mesoskopischen Systemen [Man03] und die Realisierung einer Brownschen Ratsche [Lee05c, Lee05a]. Die Manipulation nanoskopischer Objekte konnte bereits erfolgreich demonstriert werden [Ple04, Aga05]. Anwendungen der HOT zur Untersuchung biologischer Systeme befinden sich erst in der Anfangsphase [Cre05], versprechen allerdings ein enormes Potential, bedenkt man die bahnbrechenden Experimente auf diesem Gebiet, welche durch die klassische optische Pinzette ermöglicht wurden.

Experimenteller Aufbau

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine Apparatur zur Erzeugung holographischer optischer Pinzetten entwickelt und realisiert, die als zentraler Bestandteil einer Mikrotechnologieplattform fungiert, welche verschiedene Methoden zur Untersuchung komplexer Mikrosysteme vereinigt. Eine Besonderheit des entwickelten Systems besteht in der Verwendung zweier Objektive: Eines dient der Fokussierung des Laserstrahls zur Generierung der optischen Fallen, das andere wird als Bestandteil eines Mikroskopiesystems zur Visualisierung der Probe verwendet. Beide Objektive sind getrennt voneinander in Richtung der optischen Achse verschiebbar. Auf diese Weise kann eine vollständige Entkopplung der Bildebene von der Ebene der optischen Fallen erreicht werden. Damit ist die Beobachtung der Proben nicht mehr auf die Ebene der optischen Fallen beschränkt, sondern kann je nach Anforderungen angepasst werden. Weiterhin ist es durch diesen Aufbau möglich, verschiedenartige Objektive zur Fallengenerierung (hohe NA) und Bildgebung (geringere NA und Vergrößerung/größeres Gesichtsfeld) zu verwenden. Dieser Vorteil des Systems bringt allerdings eine Beschränkung in der Beschaffenheit der zu untersuchenden Proben mit sich: Die räumliche Ausdehnung in Richtung der optischen Achse ist durch die beiden Objektive eingeschränkt. Insbesondere die Verwendung von stark vergrößernden Objektiven mit hoher NA, wie sie für die Fluoreszenzmikroskopie erforderlich sind, führt aufgrund des geringen Arbeitsabstandes zu einer Limitierung der Probenhöhe auf weniger als 0,4 mm. In Abb. 4.1 ist der Aufbau des Systems schematisch skizziert. Die optischen Komponenten dieses Systems, deren Implementierung und Funktionsweise sollen im Folgenden dargestellt werden.

4.1 Laser

Zur Erzeugung der optischen Fallen wird ein diodenlasergepumpter Nd:YVO₄-Festkörperlaser mit der Wellenlänge $\lambda = 1064$ nm und einer maximalen Leistung von 5 W verwendet (Spectra-Physics J20-BL-106C). Der Laser arbeitet im TEM₀₀-Modenbetrieb, das erzeugte Infrarotlicht ist planar polarisiert, eine notwendige Voraussetzung, um mit dem SLM die gewünschte Phasenmodulation zu erzielen. Die Strahltaile des Lasers beträgt 320 μ m, der Öffnungswinkel beträgt 2,2 bzw. 2,3 mrad (horizontal/vertikal). Die Intensität des Laserlichts lässt sich indirekt durch Steuerung der Pumplichtintensität regulieren. Der Zusammenhang zwischen der Diodenstromstärke, welche zur Regulation des Pumplichts

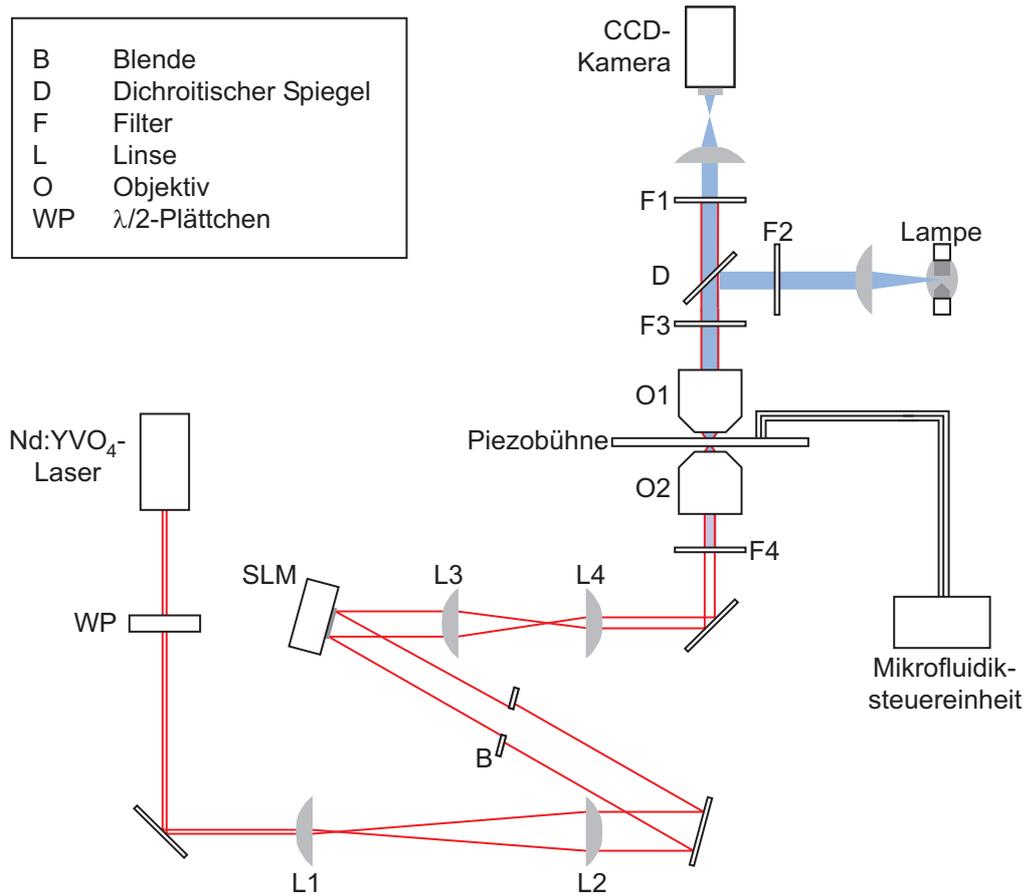


Abbildung 4.1: Experimenteller Aufbau der HOTS. Der gesamte Aufbau ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch installiert. Der Laserstrahlengang ist weiterhin durch Abdeckungen von der Umgebung abgeschirmt, um Raumluftfluktuationen insbesondere durch die vorhandenen Lüftungen und Klimaanlage zu vermeiden. Der Strahlengang des IR-Lasers ist rot, der Strahlengang der Beleuchtung ist blau dargestellt. Die Mikrofluidiksteuereinheit wird im 2. Teil dieser Arbeit ausführlich behandelt.

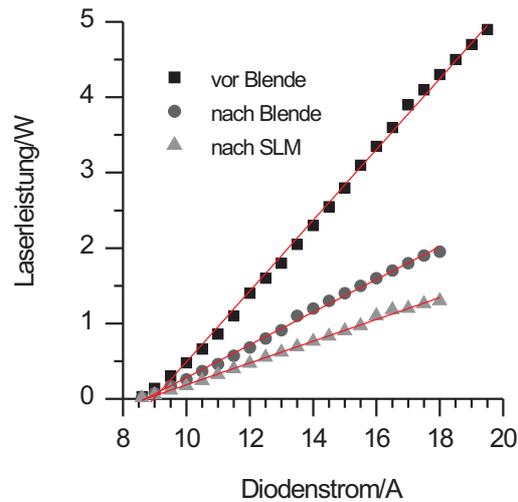


Abbildung 4.2: Laserleistung in Abhängigkeit des Diodenstroms. Dargestellt ist die Laserleistung gemessen an drei verschiedenen Punkten im Strahlengang. Die verschiedenen Positionen sind der Abb. 4.1 zu entnehmen. Für die Messung der Laserleistung hinter der Blende wurde die maximale Leistung auf 2 W beschränkt, um eine Beschädigung des SLM zu vermeiden.

verwendet wird, und der gemessenen Laserintensität ist in Abb. 4.2 dargestellt. Der kleinste Diodenstrom, welcher zum Betrieb des Lasers notwendig ist, liegt bei 8,6 A. Die maximale Laserleistung von 5 W wird bei 19,5 A erreicht.

4.2 Teleskope

Die Linsenpaare L1/L2 und L3/L4 bilden jeweils ein Teleskop. Die primäre Aufgabe der beiden Teleskope im Aufbau besteht darin, den Durchmesser des Laserstrahl an den SLM bzw. an die Apertur des Objektivs anzupassen. Die verwendeten Teleskope bestehen jeweils aus zwei Sammellinsen, deren Abstand voneinander der Summe ihrer Brennweiten entspricht. Um Leistungsverluste durch Teilreflexion zu vermeiden, werden spezielle antireflexionsbeschichtete Sammellinsen verwendet. Zur Anpassung des Laserstrahls an den quadratischen Flüssigkristalloberfläche des SLM (Kantenlänge: 7,68 mm) werden Linsen einer Brennweite von $f = 50$ mm und $f = 250$ mm verwendet. Mit dem so aufgeweiteten Laserstrahl lässt sich der gesamte SLM ausleuchten. Um die effektive Leistung zu bestimmen, welche auf den Flüssigkristall auftrifft, wurde eine Blende in den Strahlengang vor den SLM platziert. Blende und SLM besitzen eine gleich große quadratische Öffnung. Die Leistung hinter der Blende kann einfach gemessen werden (Abb. 4.2). Auf diese Weise lässt sich der effektive Anteil des Lichtes, welcher tatsächlich auf den Flüssigkristall trifft, exakt bestimmen und damit auch die Obergrenze der Laserleistung einstellen, die einen zerstörungsfreien Betrieb des SLM gewährleistet. Nach der Phasenmodulation und Reflexion durch den SLM wird der Laserstrahl durch ein zweites Teleskop so verkleinert, dass er die rückwärtige Apertur des Objektivs vollständig ausfüllt.

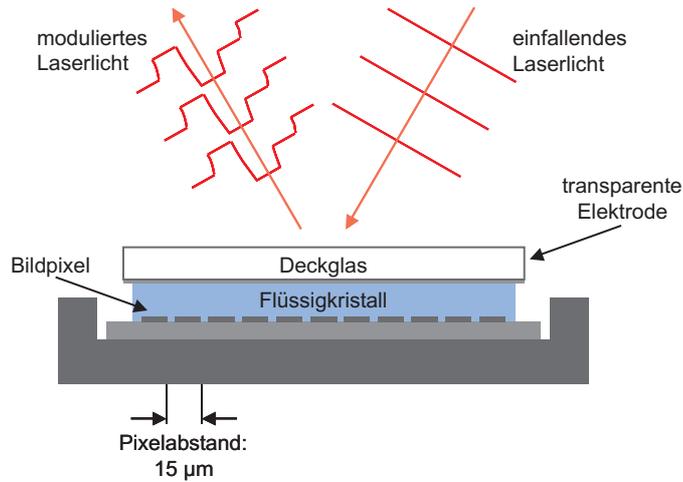


Abbildung 4.3: Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Phasenmodulators und dessen Funktionsweise. Die Kernkomponente stellt eine flüssigkristalline Schicht dar, welche eingebettet ist zwischen zwei Elektroden. Die pixelierte Struktur einer Elektrode ermöglicht die orts aufgelöste Änderung des elektrischen Feldes und damit eine Veränderung des Brechungsindex. Auf diese Weise kann die Wellenfront des auftreffenden Laserlichts (rot) moduliert werden.

Hierzu werden Linsen mit den Brennweiten $f = 300$ mm und $f = 175$ mm verwendet. Neben der Strahlverkleinerung erfüllt das zweite Teleskop eine weitere Aufgabe: Es positioniert den SLM in einer zur Eintrittsöffnung des Objektivs konjugierten Ebene. Dies ist notwendig, um sämtliche durch die Beugung am DOE erzeugten Teilstrahlen in das Objektiv einzukoppeln. Diese verlassen den SLM in unterschiedlichen Austrittswinkeln, divergieren somit und würden ohne die Verwendung eines Teleskops dazu führen, dass ein Teil des Lichtes aufgrund der Divergenz nicht in das Objektiv eingekoppelt wird. In der Ebene des SLM und damit seinen konjugierten Ebenen entspricht der Strahlquerschnitt exakt der Apertur des SLM unabhängig von der Art der Divergenz der Teilstrahlen. Das Ölimmersionsobjektiv zur Erzeugung der optischen Fallen besitzt eine NA von $1,45^1$.

4.3 Phasenmodulator

Zentraler Bestandteil des Aufbaus zur Erzeugung der optischen Fallen ist ein orts aufgelöster Phasenmodulator, welcher in der Lage ist, die computergenerierten Hologramme physikalisch zu erzeugen. Realisiert wird dies durch einen nematischen Flüssigkristall, der in einem elektrischen Feld ausgerichtet wird. Der verwendete Flüssigkristall weist eine Anisotropie bezüglich seines Brechungsindex auf. Damit ist es durch Veränderung des anliegenden elektrischen Fel-

¹Die effektive NA ist allerdings geringer: Die maximal erreichbare NA wird durch die Totalreflexion an der Grenzschicht Deckglas/Wasser limitiert und lässt sich mit dem Snelliusgesetz (Gl. 2.11) berechnen. Für den Grenzfall der Totalreflexion ($\alpha_{wasser} = 90^\circ$) gilt dann mit Gl. 2.7: $NA = n_{wasser} = 1,33$.

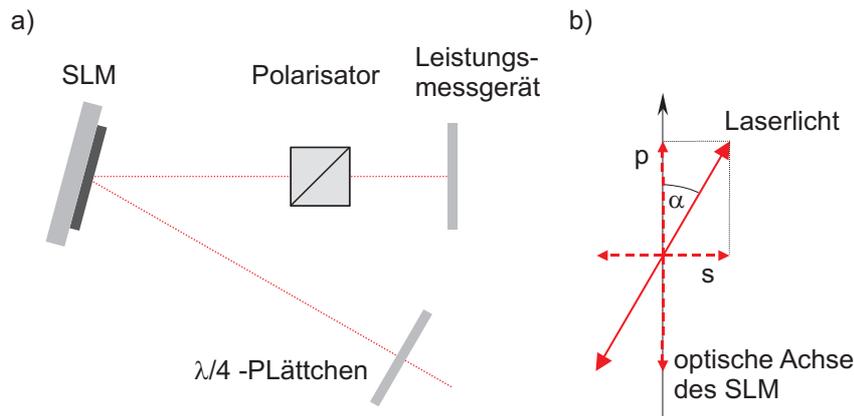


Abbildung 4.4: In (a) ist der Aufbau zur Kalibrierung des SLM dargestellt. Als zusätzliche Elemente werden ein $\lambda/4$ -Plättchen, ein Polarisator und ein Leistungsmessgerät in den Strahlengang platziert. In (b) wird das Laserlicht im Koordinatensystem betrachtet, das durch die optische Achse des SLM bestimmt wird. Die beiden Komponenten werden mit p und s gekennzeichnet. Der Winkel zwischen optischer Achse des SLM und der Polarisationsebene des Laserlichts ist durch α gegeben.

des möglich, den Brechungsindex des Materials und damit die Phase des auftreffenden Laserstrahls zu verändern. Der Aufbau ist schematisch in Abb. 4.3 dargestellt. Der in dem hier vorgestellten Aufbau verwendete SLM (Boulder Nonlinear Systems; 512×512 SLM) ist in 512×512 Pixel unterteilt, welche separat angesteuert werden können. Die Amplitude des elektrischen Feldes kann für jeden einzelnen Bildpunkt 255 verschiedene Werte zwischen dem minimalen und maximalen Wert annehmen. Effektiv sind dadurch 130 Phasenstufen zwischen 0 und 2π realisierbar. In den Hologrammen werden die verschiedenen Phasenwerte durch unterschiedliche Grauwerte repräsentiert.

Damit der SLM zur gezielten Phasenmodulation eingesetzt werden kann, ist eine Kenntnis des Zusammenhangs zwischen angelegter Spannung und der erzeugten Phasenverschiebung notwendige Voraussetzung. Um diese Information zu gewinnen wurde der in Abb. 4.4 dargestellte Versuchsaufbau verwendet. Als zusätzliche optische Elemente werden ein $\lambda/4$ -Plättchen, mit dem sich die Polarisationsebene des Laserlichts drehen lässt und ein polarisierender Strahlteiler verwendet, der als Polarisationfilter eingesetzt wurde. Zur einfacheren Beschreibung der anisotropen Brechungseigenschaften des SLM wird das Laserlicht im Koordinatensystem, welches durch die optische Achse des Phasenmodulators definiert ist, beschrieben (Abb. 4.4). Trifft Laserlicht, dessen Polarisationsebene um den Winkel α zur optischen Achse gedreht ist, auf den SLM, so weisen anschließend die senkrechte (s) und parallele (p) Komponente eine relative Phasendifferenz in Abhängigkeit von der angelegten elektrischen Spannung auf. Diese Differenz ist gleichbedeutend mit einer Drehung der Polarisationsebene des Laserlichts und einer Umwandlung der linearen in eine elliptische bzw. zirkularen Polarisation. In Kombination mit einem Polarisationsfilter kann der SLM daher zur Amplitudenmodulation verwendet werden. Eine reine Phasenmodulation, welche zur Erzeugung der Phasenmasken benötigt wird, ist für den

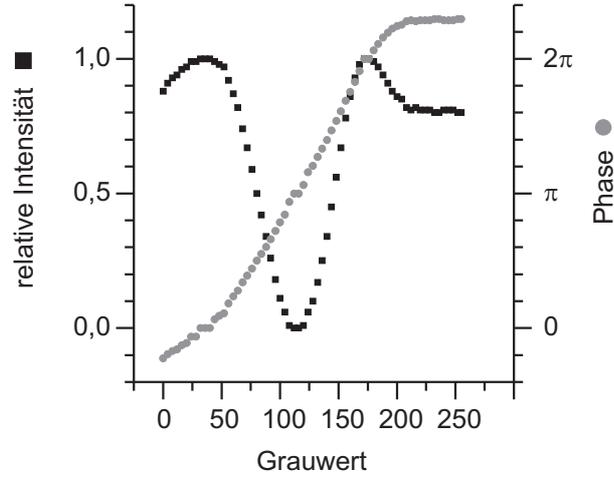


Abbildung 4.5: Zur Kalibrierung des SLM wird die Laserleistung in einem speziellen Versuchsaufbau (Abb. 4.4) als Funktion der möglichen 255 Grauwerte, welche das anliegende elektrische Feld bestimmen, gemessen. Die schwarzen Punkte stellen die gemessene relative Laserintensität dar. Aus diesen lassen sich mit Gl. 4.1 die Phasenverschiebungen berechnen (grau).

Fall $\alpha = 0$ gegeben, da in diesem Fall die senkrechte Komponente verschwindet. Um die Orientierung der optischen Achse zu bestimmen, wurde die Intensität des Laser gemäß Abb. 4.4 unter Variation des Winkels α und bei verschiedenen SLM-Spannungen gemessen. Der Polarisator weist die gleiche Orientierung wie die Polarisationssebene des einfallenden Laserlichts auf. Im Falle reiner Phasenmodulation ($\alpha = 0$) ist die Intensität unabhängig von den SLM-Einstellungen, womit die optische Achse bestimmt ist. Um nun die Phasenverschiebung des SLM exakt zu ermitteln, wurden für die Polarisationssebene des Lasers und des Polarisators die Einstellung $\alpha = 45^\circ$ gewählt. Maximale Intensität wird dann bei einer Phasenverschiebung von $\phi = 0$ erreicht. Für den Fall, dass $\phi = \pi$ wird die Polarisationssebene um 90° gedreht, womit die messbare Intensität aufgrund der Polarisatoreinstellung auf Null zurückgehen wird. Allgemein gilt für die Intensität I folgender Zusammenhang:

$$I = I_0 \cos^2\left(\frac{\phi}{2}\right). \quad (4.1)$$

Durch Messung von I und I_0 , der Intensität des auftreffenden Lasers, kann daraus die Phase ϕ für jeden Spannungswert bestimmt werden (Abb. 4.5). Zur Erzeugung der optischen Fallen wird die Polarisationssebene des Laser durch Justage des $\lambda/4$ -Plättchen so eingestellt, dass sie mit der optischen Achse des SLM übereinstimmt. Dadurch ist eine reine Phasenmodulation durch die Hologramme gewährleistet.

4.4 Mikroskop

Zur Visualisierung der Proben wird ein Mikroskop der Firma WITec verwendet (AlphaSNOM), welches Aufsicht- und Fluoreszenzmikroskopie erlaubt. Weiter-

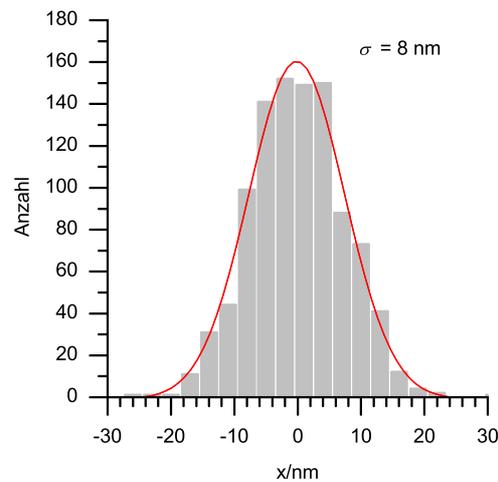


Abbildung 4.6: Die maximal erzielbare Auflösung in der Fallenpositionierung wird durch die Stabilität des Gesamtsystems beschränkt. Nach weitgehender Abschirmung des Strahlengangs und Verwendung eines schwingungsgedämpften optischen Tisches konnten die verbleibenden Fluktuationen auf 8 nm reduziert werden. Das Histogramm zeigt die Verteilung der Positionen des fokussierten Lasers im dem System.

hin besitzt dieses System bereits eine Halterung zur Aufnahme eines zweiten Objektivs, das zur Erzeugung der optischen Fallen benötigt wird. Aufgrund des sehr offen gestalteten Aufbaus ist die Einkopplung des Laserstrahls sehr einfach zu bewerkstelligen. Zur Anpassung an unsere Bedürfnisse wurden zusätzliche Filterhalter eingebaut: Ein Schwarzfilter (R850, Schott), welches sichtbares Licht absorbiert, ist unmittelbar vor dem Fallenobjektiv platziert. Auf diese Weise werden Reflexionen des Auflichts an den Teleskoplinsen vermieden, die eine Bildgebung der Probe erheblich stören. Um auch Teilreflexion an dem Schwarzfilter zu verhindern, wurde dieser in einem Winkel von 45° in dem Strahlengang platziert. Weiterhin blockieren verschiedene Infrarotfilter (KG2, KG3 und KG5, Schott) das Auftreffen des Lasers auf die CCD-Kamera (RetigaExi, QImaging).

4.5 Stabilisierung des Systems

Zur mechanischen Stabilisierung des Laserfallsystems wurde dieses auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut (Newport). Die Steuereinheit des Lasers mit dem gekühlten Pumpdiodenlaser ebenso wie die Steuereinheit des Mikroskops ist außerhalb des optischen Tisches platziert. Erste Versuche zur Kalibrierung der optischen Fallen zeigten, dass thermische Fluktuationen in der Raumluft zu einem instabilen Laserfokus führen. Durch Abdeckung des gesamten Strahlengangs konnte die Stabilität erheblich verbessert werden. Die weiterhin vorhandenen Fluktuationen und Schwingungen des Systems liegen in der Größenordnung von 8 nm. Abb. 4.6 zeigt die Verteilung der x -Positionen des Laserfokus.

Kalibrierung und Intensitätsmodulation optischer Pinzetten

Die in Kap. 2.4 vorgestellten Methoden zur Kalibrierung optischer Pinzetten, welche erfolgreich zur Kräftebestimmung in klassischen Einzelfallen eingesetzt wurden und werden, lassen sich auf Vielfallensysteme und damit auf holographische optische Pinzetten übertragen. Allerdings ist dies in der praktischen Umsetzung mit einigen Einschränkungen verbunden. Zudem müssen einige Besonderheiten, welche in der Natur der holographischen Pinzetten begründet sind, beachtet werden. Bereits in der Datenaufnahme machen sich die Unterschiede bemerkbar: So ist die Verwendung einer Quadranten-Photodiode zur Detektion der thermischen Fluktuation der optisch gefangenen Objekte nicht praktikabel. Zur Untersuchung eines Mehrfallensystems müsste das durch die Kugeln abgelenkte Laserlicht auf mehrere Photodioden aufgeteilt bzw. das Laserlicht sämtlicher optischer Fallen bis auf das der zu kalibrierenden Pinzette ausgeblendet werden. Als Alternative lässt sich eine Kamera verwenden, mit der eine simultane Aufnahme aller gefangenen Objekte erzielt werden kann. Allerdings ist die maximale Aufnahmefrequenz bei herkömmlichen Geräten wesentlich geringer (30 Hz) als bei der Verwendung einer Photodiode (100 kHz). Damit ist eine Analyse des Leistungsspektrum nicht möglich, da die Eckfrequenzen f_0 (Gl. 2.26) in der Größenordnung von 100 Hz liegen und damit außerhalb des Datenbereichs, der mit einer Kamera zugänglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der Kalibrierung von Vielfallensystemen untersucht und miteinander verglichen. Als Modellsystem wurde ein symmetrisches Dreifallensystem gewählt, um eine gleichmäßige Intensitätsverteilung auf die Fallenpositionen zu gewährleisten (Abb. 5.1).

5.1 Materialien und Methoden

Kalibrierungsmethoden

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$ verwendet (2 %-ige Suspension, Polysciences). Die Suspension wurde im Verhältnis 1:1000 mit Wasser verdünnt

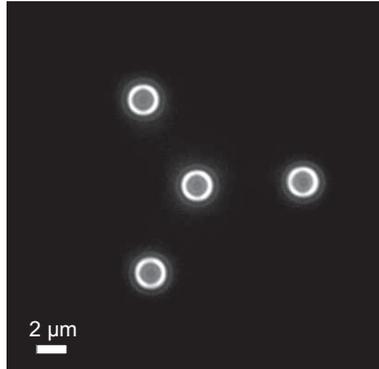


Abbildung 5.1: Ein symmetrisches Dreifallensystem wurde zur Kalibrierung der HOT verwendet. Die spezielle Anordnung der Fallen gewährleistet eine Gleichverteilung der Intensität und sollte damit optische Fallen gleicher Federkonstante erzeugen. Die optische Falle im Zentrum der Anordnung wird durch das Beugungsmaximum 0. Ordnung erzeugt.

und direkt ohne weitere Behandlung für die Versuche eingesetzt.

Zur Kalibrierung der HOT unter Ausnutzung des hydrodynamischen Widerstands als bekannte Eichgröße werden die Objekte zunächst in der gewünschten Anordnung eingefangen. Mit Hilfe einer computergesteuerten Probenbühne lässt sich ein Fluss relativ zu den statischen optisch gefangenen Teilchen erzeugen. Die Bewegung erfolgt jeweils fünfmal in positive und negative Richtung mit einer Amplitude von $50 \mu\text{m}$ und verschiedenen Geschwindigkeiten. Mit einer CCD-Kamera wird die Auslenkung der Objekte aufgenommen. Aus den Bilderserien lassen sich die Positionen der Kugeln bestimmen, die zur weiteren Auswertung verwendet werden.

Zur Kalibrierung der HOT durch Analyse der thermischen Bewegung werden mindestens 1000 Bilder der optisch gefangenen Teilchen mit einer Belichtungszeit von 1 ms aufgenommen. Auch hier werden anschließend die Positionen ermittelt und ausgewertet.

Partikeldetektion

Viele der vorgestellten Experimente und Datenauswertungen benötigen eine Methode zur exakten Positionsbestimmung verschiedenster Objekte. So basieren beispielsweise sämtliche Kalibrierungen auf der Kenntnis der zeitlichen Änderung der Ortskoordinaten der optisch gefangenen Mikrokugeln. Zu diesem Zweck wurde eine Bildbearbeitungsroutine entwickelt, welche diese Information aus dem Schwerpunkt der Intensitätsverteilung in den aufgenommenen Mikroskopiebildern gewinnt [Wui00]. Hierzu werden die Rohbilder in Unterbilder segmentiert, so dass diese jeweils nur ein Objekt enthalten, dessen Ort bestimmt werden soll. Nach Abzug des Hintergrundsignals durch Anpassung eines Schwellenwertes wird für jedes Segment der Schwerpunkt der Intensitätsverteilung \vec{S} ermittelt:

$$\vec{S} = \frac{1}{I} \sum_{i=0}^Z \vec{p} I(\vec{p}) \quad (5.1)$$

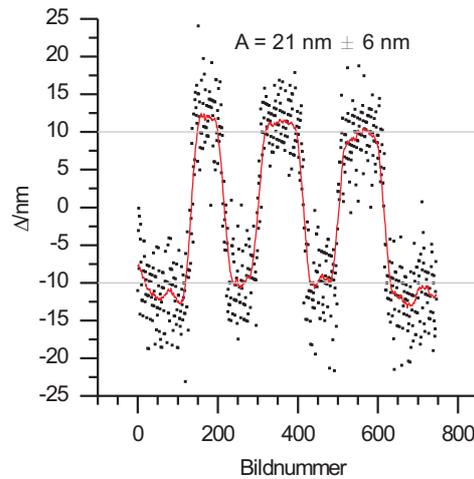


Abbildung 5.2: Eine auf einem Deckglas fixierte Mikrokugel wurde mit Hilfe der Piezobühne mehrmals um 20 nm verschoben. Durch die Analyse des Intensitätsschwerpunkts der Bildserie konnte diese Bewegung aufgelöst werden.

mit der Pixelkoordinate \vec{p} , dem zugehörigen Grauwert $I(\vec{p})$, der Gesamtintensität I und der Gesamtpixelzahl Z . Befindet sich auf den zu untersuchenden Bildserien jeweils nur ein sich bewegendes Objekt, eine Voraussetzung, welche durch die Segmentierung erfüllt ist, kann die relative Änderung des Intensitätsschwerpunkts als Maß für die Bewegung des Objekts herangezogen werden. Durch Aufnahme eines Referenzobjekts bekannter Größe lässt sich die Pixelgröße der Bilder für das verwendete System aus Kamera und Objektiv kalibrieren, womit absolute Ortsangaben möglich sind. Ist das Objekt größer als ein Pixel, so lässt sich durch Berechnung der Koordinaten eine Ortsauflösung erreichen, die weit unterhalb der Größe eines Pixels liegen. Um diese Methode der Ortsbestimmung zu überprüfen und die maximal erreichbare Auflösung innerhalb unseres Systems zu bestimmen, wurde ein $2 \mu\text{m}$ großes Kügelchen auf ein Deckgläschen fixiert und mit Hilfe der Piezobühne mit unterschiedlicher Amplitude bewegt. Die Anbindung der Mikrokugel erfolgte durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Glasoberfläche in einer 1 M NaCl-Lösung. Bewegungen mit einer Amplitude von 20 nm können problemlos aufgelöst werden (Abb. 5.2). Auch eine Bewegung von 5 nm konnte noch detektiert werden (Abb. 5.3). Allerdings liegt hier die zu messende Größe bereits in der Größenordnung der Standardabweichung von 6 nm, welche sich für die Positionsbestimmung eines nicht bewegten Teilchens ergibt.

5.2 Hydrodynamische Reibung

Die Auslenkungen der optisch gefangenen Kugeln aus der Gleichgewichtslage als Funktion der Geschwindigkeit der Probenbühne ist in Abb. 5.4 wiedergegeben. Aufgetragen sind die gemittelten Werte der drei Fallen für fünf Auslenkungen in positive und negative Richtung. Diese zeigen für alle hier verwendeten Laserleistungen eine lineare Abhängigkeit von den Geschwindigkeiten mit der die

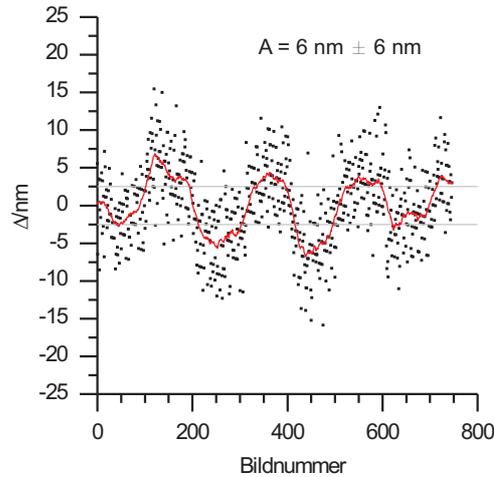


Abbildung 5.3: Eine auf einem Deckglas fixierte Mikrokugel wurde mit Hilfe der Piezobühne mehrmals um 5 nm verschoben. Die Analyse des Intensitätsschwerpunkts der Bildserie lieferte eine mittlere Auslenkung von 6 nm.

Probe bewegt wurde. Die Annahme eines harmonischen Fallenpotentials ist somit für Auslenkungen bis über 250 nm gegeben. Nach Gl. 2.30 lässt sich aus der Steigung der Kurven die Federkonstante der optischen Pinzetten berechnen. Diese sind in Abb. 5.5 in Abhängigkeit des Diodenstroms aufgetragen und zeigen den nach Gl. 2.10 zu erwartenden linearen Verlauf. Das Verhältnis von Federkonstante zur lokalen Laserleistung in den optischen Fallen beträgt damit $0,4 \text{ pN}/(\mu\text{m mW})$. Die lokale Laserleistung wurde dabei ausgehend von der gemessenen Laserleistung vor Eintritt in das Objektiv abgeschätzt. Es wurde angenommen, dass außer einem Verlust von 60 % der Laserleistung durch Absorption im Objektiv¹ und 40 % aufgrund des Beugungsmaximums 0. Ordnung² keine weiteren Leistungsverluste auftreten. Der gesamte Leistungsabfall ist in Tabelle 5.1 dargestellt.

Daraus ist ersichtlich, dass die effektiv zur Verfügung stehende Laserleistung gemessen an der Ausgangsleistung sehr gering ist, die Verluste liegen demnach bei ca. 90 %. Allerdings zeigt die Kalibrierung auch, dass bereits 10 mW Laserleistung genügen, um Kräfte in der Größenordnung von 1 pN zu erzeugen.

5.3 Thermische Fluktuation

Zwei Beispiele für die thermische Fluktuation eines optisch gefangenen Teilchens sind in Abb. 5.6 und 5.7 dargestellt. Die Datensätze lassen sich sehr gut durch eine Gaußfunktion annähern. Dies zeigt, dass die Annahme eines harmonischen

¹Laut Angabe der Fa. Zeiss absorbiert das verwendete Objektiv (Alpha Planfluor 1,45) bei einer Wellenlänge von 1064 nm 60 % der eingestrahltten Leistung.

²Das Beugungsmaximum 0. Ordnung wird durch den Anteil des Laserlichts gebildet, welcher lediglich durch den SLM reflektiert wird und keine Phasenänderung erfährt. Ursachen hierfür sind beispielsweise die nicht verschwindenden Abstände zwischen den Pixeln des Phasenmodulators.

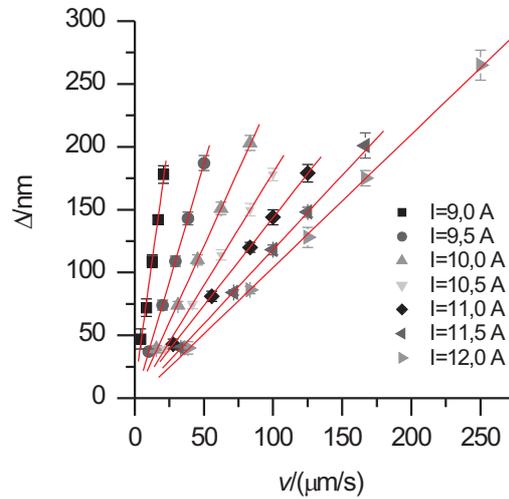


Abbildung 5.4: Die Auslenkung der Kugeln eines Dreifallensystems ist als Funktion der Geschwindigkeit, mit der die Probe relativ zu den Fallen bewegt wird, wiedergegeben. Durch Variation der Diodenstromstärke (I) wurden die Federkonstanten der optischen Fallen variiert. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung der Werte für die drei Kugeln und je 5 Messungen in positiver und negativer Auslenkungsrichtung. Lineare Trendkurven sind rot dargestellt.

Tabelle 5.1: Aufzistung der gemessenen bzw. abgeschätzten (Objektiv) Laserleistungsverluste im experimentellen Aufbau.

Position	Leistungsverlust/%	Gesamtleistung/%
Laser	0	100
Blende	52	48
SLM	33	32
Objektiv	60	13
Beugungsmaximum 0. Ordnung	40	8

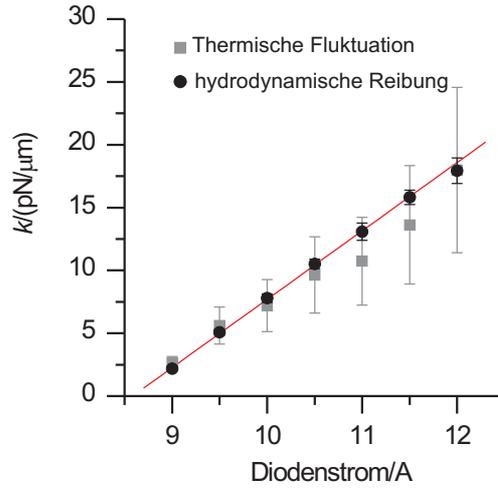


Abbildung 5.5: Die Datenreihen zeigen experimentell bestimmte Federkonstanten für ein Dreifallensystem als Funktion des Diodenstroms. Zur Ermittlung der Daten wurde die thermische Fluktuation und hydrodynamische Reibung genutzt. Die rote Kurve zeigt die lineare Fitfunktion der durch hydrodynamische Reibung gewonnenen Daten.

Fallenpotentials erfüllt ist. Aus der Varianz $\langle \sigma^2 \rangle$ der Positionsverteilung kann durch Anwendung von Gl. 2.28 die Federkonstante leicht berechnet werden. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die gemessenen Fluktuationen nicht nur auf die thermische Bewegung des Partikels in der Falle zurückzuführen sind, sondern dass jede Instabilität des Systems (Strahlführung, Partikeldetektion) zu einer Streuung der Daten beiträgt. Damit besteht die Gefahr, die Federkonstante der optischen Falle zu gering zu berechnen. Wie in Kap. 4.5 bereits dargestellt wurde, weist der Laserfokus eine Stabilität in der Größenordnung von $\sigma = 8 \text{ nm}$ auf. Damit ist eine Obergrenze für die Federkonstante gesetzt, welche sich aus der thermischen Fluktuation ermitteln lässt: $k < k_B T / (8 \text{ nm})^2 = 63 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$. Bei Kenntnis der Grundfluktuation des Systems kann diese genutzt werden, um die gemessenen Standardabweichungen zu korrigieren. Die gemessene Verteilung entspricht dabei einer Faltung der thermischen Fluktuation $R(\bar{\sigma})$ mit dem Rauschen $R(\sigma_0)$:

$$R(\sigma) = R(\bar{\sigma}) \otimes R(\sigma_0). \quad (5.2)$$

Für gaußförmige Verteilung gilt dann für die resultierende Standardabweichung:

$$\sigma = \sqrt{\bar{\sigma}^2 + \sigma_0^2}. \quad (5.3)$$

In Tab. 5.2 sind die gemessenen und korrigierten Standardabweichungen sowie die daraus resultierenden Federkonstanten dargestellt. Für Standardabweichungen, die größer als 25 nm sind, macht sich die Korrektur nicht sehr stark bemerkbar. Die berechneten Werte für die Federkonstante stimmen gut mit den Werten der hydrodynamischen Reibung überein. Die Fehler sind allerdings wesentlich höher insbesondere für kleine Standardabweichungen. Dies ist in der Verwendung der Varianz begründet, die quadratisch von den Messwerten abhängt. Die

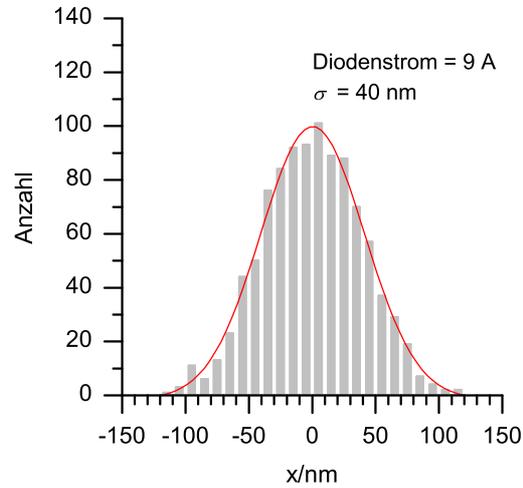


Abbildung 5.6: Das Histogramm zeigt die thermische Fluktuation einer Mikrokugel in einer optischen Falle (Diodenstrom = 9 A). Eine Gaußfunktion mit der Standardabweichung $\sigma = 40 \text{ nm}$ wurde an die experimentellen Daten angeglichen.

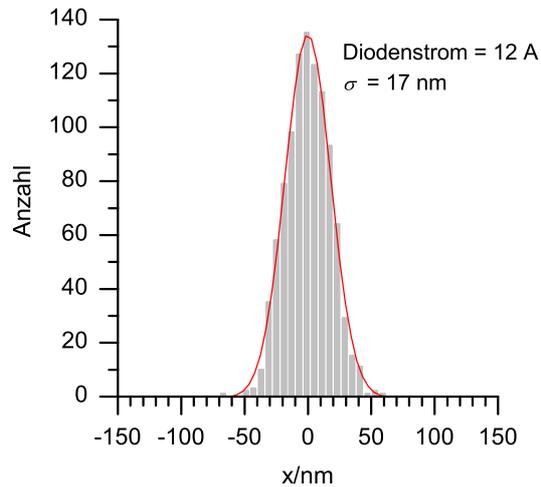


Abbildung 5.7: Das Histogramm zeigt die thermische Fluktuation einer Mikrokugel in einer optischen Falle (Diodenstrom = 12 A). Eine Gaußfunktion mit der Standardabweichung $\sigma = 17 \text{ nm}$ wurde an die experimentellen Daten angeglichen.

Tabelle 5.2: Vergleich der Federkonstante, die aus den korrigierten und nicht korrigierten Standardabweichungen der thermischen Fluktuation berechnet wurden (k_σ und $k_{\bar{\sigma}}$), mit den Werten, die sich aus den hydrodynamischen Reibungsexperimenten ergaben (k_β).

I/A	σ/nm	$\bar{\sigma}/\text{nm}$	$k_\sigma/(\text{pN } \mu\text{m}^{-1})$	$k_{\bar{\sigma}}/(\text{pN } \mu\text{m}^{-1})$	$k_\beta/(\text{pN } \mu\text{m}^{-1})$
9	40	39	2,5	$2,6 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,2$
9,5	28	27	5,2	$5,6 \pm 1,5$	$5,1 \pm 0,2$
10	25	24	6,5	$7,2 \pm 2,1$	$7,8 \pm 0,3$
10,5	22	20	8,4	$9,6 \pm 3,0$	$10,5 \pm 0,4$
11	21	19	9,2	$10,7 \pm 3,5$	$13,1 \pm 0,7$
11,5	19	17	11,2	$13,6 \pm 4,7$	$15,8 \pm 0,6$
12	17	15	14,0	$18,0 \pm 6,6$	$17,9 \pm 1,0$

Anwendbarkeit dieser Kalibrierungsmethode beschränkt sich damit auf schwache optische Fallen. Bei der Aufnahme der Fluktuationsdaten ist weiterhin darauf zu achten, dass die Belichtungszeit der Kamera genügend klein gewählt wird. Ist diese zu groß, so ergibt die Bildauswertung nicht die gewünschten momentanen Positionen des gefangenen Objekts, sondern eine Mittelung über die Zeitdauer der Belichtung. Dies macht sich insbesondere bei größeren Auslenkungen bemerkbar. Die Verweildauer des Teilchens ist hier aufgrund der höheren Beschleunigung durch das optische Potential verringert, so dass eine Mittelung über die Positionen eine zu kleine Verschiebung ergibt. Die so gemessene Standardabweichung der Verteilung ist damit kleiner als die wahre Streuung, die daraus berechnete Federkonstante ist zu hoch. So liefert beispielsweise eine Belichtungszeit von 20 ms Standardabweichungen für das hier betrachtete Dreifallensystem, welche um 10 nm bis 20 nm zu klein sind. Eine ausreichend geringe Belichtungszeit ist mit einem Wert von 1 ms gegeben, welche zur Datenerfassung für alle quantitativen Analysen der thermischen Fluktuation verwendet wurde.

5.4 Intensitätsmodulation

Wie im vorigen Abschnitt durch die Kalibrierungsexperimente bereits zu erkennen war, lässt sich die Federkonstante einer optischen Falle auf einfache Weise durch Anpassung der Laserleistung regulieren. Damit werden in einem Vielfallensystem alle optischen Pinzetten in gleicher Weise verändert. Holographisch erzeugte optische Fallen bieten die zusätzliche Möglichkeit, die Intensität jeder Falle unterschiedlich zu kontrollieren. Möglich wird dies durch Verwendung eines Superpositionsansatzes zur Hologrammberechnung, welcher es erlaubt, die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Fallen zu manipulieren. Im folgenden soll das Vorgehen am Beispiel eines Zweifallensystem demonstriert werden:

$$E^{in} = \alpha_1^{in} e^{i\phi_1^{in}(\vec{r})} + \alpha_2^{in} e^{i\phi_2^{in}(\vec{r})}. \quad (5.4)$$

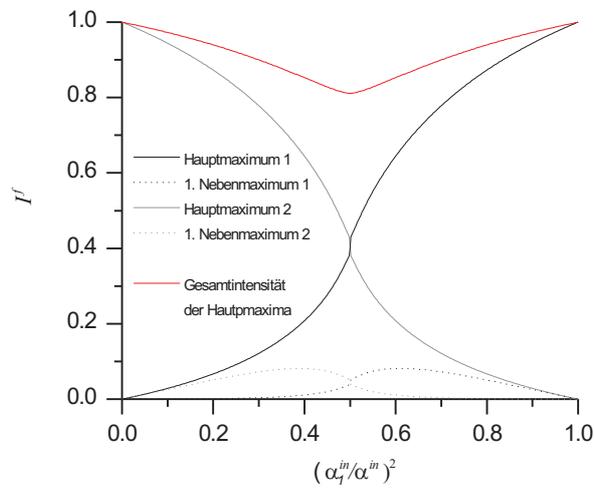


Abbildung 5.8: Berechnete, auf die Gesamtintensität normierte Intensitätsverläufe I^f eines Zweifallensystems als Funktion des normierten Amplitudenquadrats $(\alpha_1^{in}/\alpha^{in})^2$ mit der Gesamtamplitude α^{in} (Gl. 5.4). Neben den Hauptmaxima (gewünschte optische Fallen) sind auch die ersten Nebenmaxima dargestellt, sowie die Gesamtintensität der optischen Pinzetten.

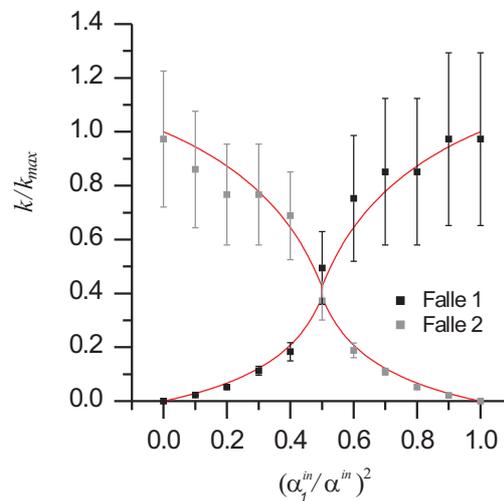


Abbildung 5.9: Normierte Federkonstanten intensitätsmodulierter optischer Fallen für ein Zweifallensystem als Funktion des normierten Amplitudenquadrats (siehe Abb. 5.8). Die Federkonstanten wurden durch Analyse der thermischen Fluktuation zweier Mikrokugeln ($d = 2 \mu\text{m}$) ermittelt. Der Diodenstrom betrug konstant 9,5 A. Die roten Linien zeigen den berechneten Intensitätsverlauf der Hauptmaxima.

Durch eine unterschiedliche Gewichtung der Prismenhologramme zur Erzeugung einer Einzelfalle kann die Intensitätsverteilung in der Fokusebene beeinflusst werden. Diese Verteilung ist jedoch nicht direkt durch die Quadrate der Amplituden α_j gegeben, sondern weist eine komplexe Abhängigkeit auf, da zur Erzeugung des Fallenmusters nur der Phasenanteil der Summe aus Gl. 5.4 und die darin enthaltene Information über die Ausgangsamplituden verwendet wird. Die Abhängigkeit der Intensitäten in der Fokusebene von den Amplitudenquadraten, welche in der Hologrammberechnung genutzt wurden, ist in Abb. 5.8 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die nicht-lineare Abhängigkeit der Intensitäten in der Hologramm- und der Fokusebene. Reine Phasenhologramme für Mehrfallensysteme besitzen eine Effizienz von deutlich weniger als 100 %, da ein Teil der Laserleistung in Nebenmaxima fokussiert wird. Der Leistungsverlust hängt ebenfalls von dem Verhältnis der Amplituden α_j ab. Bei Gleichgewichtung der Fallenpositionen nimmt dieser seinen Maximalwert an, die Effizienz bezogen auf die Hauptmaxima beträgt dann 81 %. Wird ein Zweifallensystem durch Hologramme mit variablen Amplituden generiert, so folgen die ermittelten Federkonstanten des Systems exakt dem sigmoidalen Intensitätsverlauf (Abb. 5.9).

5.5 Zusammenfassung

Die Kalibrierung eines Vielfallensystems realisiert durch HOT lässt sich durch Anwendung hydrodynamischer Reibung und einer Auswertung der thermischen Bewegung optisch gefangener Objekte erzielen. Letztere Methode ist allerdings bei der Verwendung einer Kamera zur Datengewinnung auf relativ schwache optische Fallen beschränkt. HOT bieten die Möglichkeit durch gezielte Anpassung der Hologramme, die Intensität und damit die Federkonstanten individuell für einzelne Fallen zu regulieren. Komplexe Kraftsensoranordnungen können auf diese Weise realisiert werden. Ein unmittelbarer einfacher Zusammenhang zwischen den zur Hologrammberechnung verwendeten Amplituden und den resultierenden Fallenintensitäten ist allerdings nicht gegeben. Insbesondere in Vielfallensystemen mit periodischen Strukturen kommt es zu einer Wechselwirkung der Beugungsmaxima verschiedener Ordnungen, welche die Intensitätsverteilung erheblich beeinflussen können (siehe Kap. 6). Durch die Verwendung iterativer Algorithmen oder nicht-periodischer Fallenanordnungen lässt sich dieses Problem lösen.

Symmetrieffekte: Auswirkung auf Effizienz und Berechnung der Hologramme

Erstaunlicherweise wurde bisher in der Literatur dem Einfluss der Geometrie der Fallenordnung auf die Effizienz der Hologramme, dem Konvergenzverhalten der verwendeten Algorithmen und der Intensitätsvariation innerhalb eines Vielfallensystems nur wenig Augenmerk geschenkt [Pol05]. Tatsächlich existiert ein signifikanter Trend, der allein auf Symmetrieeigenschaften beruht und wichtige Folgen nach sich zieht. In diesem Kapitel soll gezeigt werden, dass für eine Vielzahl von Anordnungen holographischer optischer Pinzetten aufgrund ihrer Symmetrieeigenschaften kein iterativer Algorithmus zur Berechnung der Phasenmasken notwendig ist. Stattdessen können diese durch eine Prismensuperposition (S) (Kap. 3.2) bzw. durch eine einfache Erweiterung dieser Methode generiert werden.

Das Ersetzen eines aufwändigen Hologrammalgorithmus durch eine einfache nicht-iterative Rechenmethode sollte die Implementierung und interaktive Verwendung holographischer optischer Pinzetten wesentlich vereinfachen. Durch Verringerung der Rechenzeit lassen sich dann Phasenmasken zur Erzeugung einer kleinen Anzahl optischer Fallen (< 10) in Echtzeit berechnen.

6.1 Vergleich zwischen symmetrischen und zufälligen Fallenmustern

Grundlegende Voraussetzung zur Erzeugung holographischer optischer Pinzetten sind Phasenhologramme, welche eine möglichst hohe Beugungseffizienz η^ϕ (Gl. 3.15) aufweisen. Diese gibt den Anteil der Laserintensität in der Fokusebene an, welcher an die gewünschten Positionen, den Orten der optischen Fallen, gelenkt wird. Das übrige Licht wird in den Beugungsnebenmaxima fokussiert. Diese weisen zwar eine im Vergleich zu den Hauptmaxima geringere Intensität auf, wirken aber dennoch als ungewollte optische Pinzetten und werden daher als Geisterfalle bezeichnet. In symmetrischen Anordnungen, wie beispielsweise einer orthogonalen Anordnung von $N \times N$ optischen Fallen, können diese Geisterfallen mit anderen Hauptmaxima überlappen und interferieren. Solche

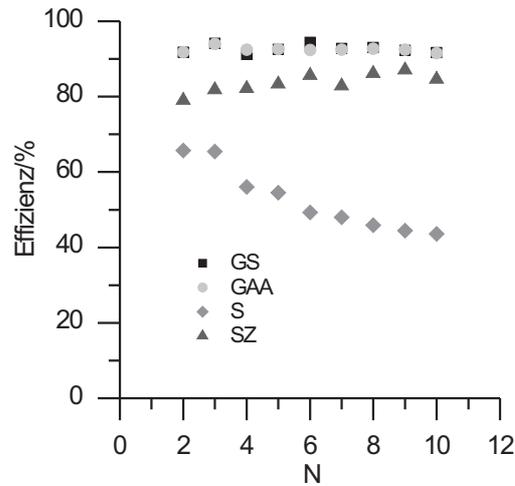


Abbildung 6.1: Vergleich der Effizienz von Hologrammen, welche durch 4 verschiedene Methoden (GS, GAA, S und SZ) berechnet wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse für eine orthogonale Anordnung von $N \times N$ optischen Fallen.

Fallenpositionen werden als entartet bezeichnet. Ein Beispiel für Geisterfallen sind die Nebenmaxima, welche durch ein Hologramm in Form eines einfachen binären Gitters erzeugt werden (Abb. 5.8). Zunächst sollen die Intensitätseffizienzen der drei in Kap. 3.2 vorgestellten Algorithmen verglichen werden. Das sind der üblicherweise benutzte iterative Gerchberg-Saxton-Algorithmus (GS), der generalisierte adaptive-additive Algorithmus (GAA) und die nicht iterative Prismensuperpositionsmethode (S). Effekte aufgrund einer diskreten Phasenverteilung und Pixelierung wie sie bei Verwendung eines SLM auftreten werden nicht berücksichtigt [Tan01]. Im Falle symmetrischer Fallenmuster sind die beiden iterativen Algorithmen, GS und GAA der einfachen Superposition klar überlegen. In Abb. 6.1 sind die Effizienzen für ein $N \times N$ Fallengitter mit einem Abstand von 50 Pixel und $2 \leq N \leq 10$ dargestellt. Die iterativen Algorithmen unterscheiden sich in der erreichten Effizienz kaum voneinander, während diese für die S-Hologramme um 15 % bis 30 % geringer sind.

Völlig anders stellt sich die Situation für eine asymmetrische Verteilung dar. Die Hologrammeffizienzen für eine zufällige Anordnung optischer Fallen unterscheiden sich für die drei verschiedenen Berechnungsmethoden nahezu gar nicht voneinander (Abb. 6.2). Die erzielten Effizienzen hängen dabei interessanterweise nicht von der tatsächlichen zufälligen Anordnung ab. Jeder Datenpunkt in der Abb. 6.2 gibt das Mittel aus 5 unterschiedlichen Fallenmustern wieder, die Standardabweichung (SD) für η^ϕ ist dabei zu vernachlässigen ($\leq 0,25\%$). Allerdings zeigt die Effizienz eine Abhängigkeit von der Anzahl der Fallen. Eine solche ist bei symmetrischen Mustern nur für die S-Hologramme zu beobachten. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die maximal zu erreichende Effizienz bei asymmetrischer Verteilung geringer ausfällt (79–80 %) als bei den orthogonalen Mustern (90 %). Auch durch wiederholte Iterationsschritte der Algorithmen lassen sich die Effizienzen der Zufallsmuster im Gegensatz zu den symmetrischen Anordnungen nur geringfügig verbessern (Abb. 6.3 und Abb. 6.4). Dieser Un-

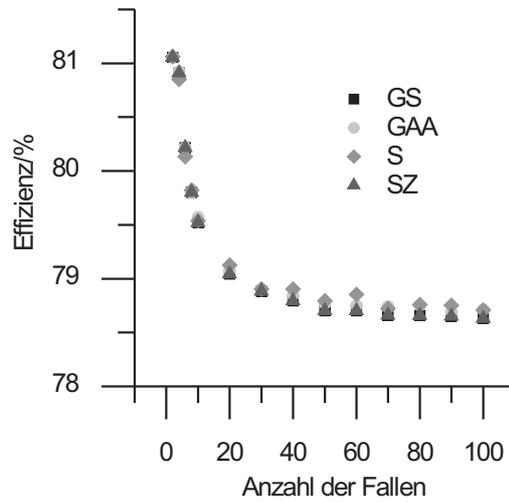


Abbildung 6.2: Vergleich der Effizienz von Hologrammen, welche durch 4 verschiedene Methoden (GS, GAA, S und SZ) berechnet wurden. Die durch die Hologramme erzeugten Fallenmuster stellen Zufallsverteilungen der optischen Fallen dar.

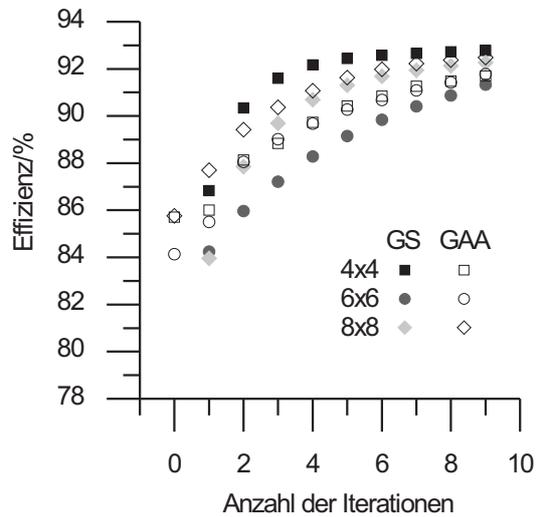


Abbildung 6.3: Das Konvergenzverhalten der iterativen Algorithmen GS und GAA ist für verschiedene $N \times N$ -Fallenanordnungen mit $L = 50$ Pixel dargestellt.

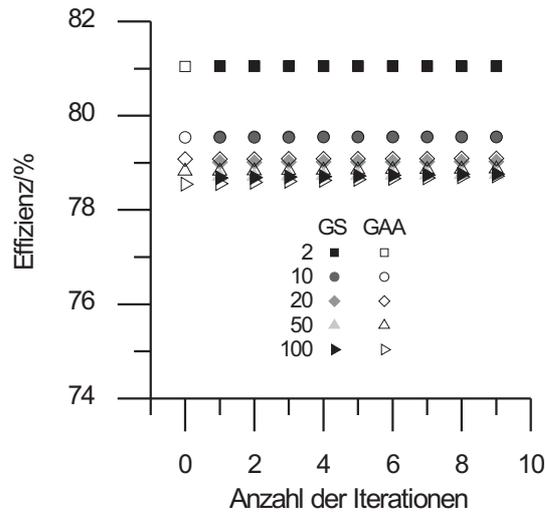


Abbildung 6.4: Das Konvergenzverhalten für die iterativen Algorithmen GS und GAA sind für verschiedene zufällige Fallenanordnungen mit unterschiedlicher Fallenzahl dargestellt (2 bis 100).

terschied legt den Schluss nahe, dass die Verbesserung der Phasenhologramme durch die iterativen Algorithmen darauf beruht, das Zusammenfallen von Geisterfallen und Hauptmaxima zu nutzen. Durch Anpassung der relativen Phasen von Haupt- und Nebenmaximum ist es möglich, deren Interferenz und damit die resultierende Intensität an diesen Punkten zu optimieren. In asymmetrischen Zufallsverteilungen ist ein solches Zusammenfallen der unterschiedlichen Maxima, das Auftreten entarteter Fallen unwahrscheinlich. Die Möglichkeiten einer Intensitätssteigerung durch Ausnutzung der Interferenzen ist damit nicht gegeben.

6.2 Erweiterte Prismensuperposition

Die Superpositionsmethode extrahiert das Phasenhologramm $\Phi^{in}(\vec{r})$ aus der komplexen Addition einzelner Prismenhologramme (Gl. 3.22). In dem Ansatz wird eine mögliche Interferenz von Geisterfallen und Hauptmaxima nicht zur Intensitätssteigerung genutzt. Die Phasenmaske für ein Prismenhologramm lässt sich ausgehend von Gl. 3.19 durch Addition einer beliebigen zufälligen Phase ϕ_j^Z erweitern:

$$\phi_j^{in}(\vec{r}) = \left[\frac{2\pi}{M} \vec{\rho}_j \cdot \vec{r} + \phi_j^Z \right] \text{ mod } 2\pi. \quad (6.1)$$

Die zusätzliche Phase ändert an der Intensitätsverteilung einer einzelnen Falle nichts, es wird lediglich die Phase des elektrischen Feldes in der Pinzettenebene beeinflusst. In einem entarteten Mehrfallensystem spielt diese Phase jedoch eine entscheidene Rolle, da sie die Interferenz von Geisterfallen und Hauptmaxima und damit eine Intensitätsänderung bestimmt. Die Rolle der iterativen Algorithmen besteht somit darin, die optimalen Werte für ϕ_j^Z zu finden, um durch konstruktive Interferenz an den Fallenpositionen die resultierende Intensität zu

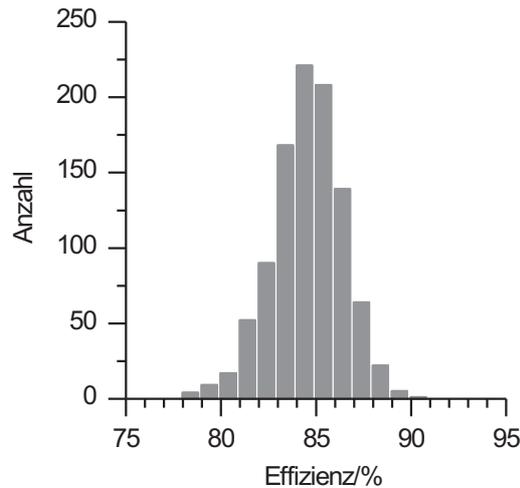


Abbildung 6.5: Histogramm der Effizienzverteilung eines SZ-Hologramms für ein 5×5 -Muster mit $L = 50$ Pixel. Die mittlere Effizienz beträgt $84,7 \pm 2,1$ %.

maximieren. Statt einer iterativen Optimierung dieser Phasenparameter wurden diesen in dem erweiterten Superpositionsansatz zufällige Werte zugewiesen (SZ-Methode) und die Auswirkung auf die Effizienz untersucht. Der Ansatz entspricht dem ersten Schritt des GAA Algorithmus und ist äquivalent zu dem Kinoform-Verfahren [Les69]. Dieses simuliert zur Phasenhologrammberechnung eine diffuse Streuung des abzubildenden Objekts, um eine nahezu konstante Amplitude in der Hologrammebene zu erzielen. Der Einfluss der Zufallsphase auf die Beugungseffizienz von Phasenhologrammen zur Erzeugung von Mustern verschiedener Symmetrie wurde jedoch bisher nicht untersucht.

In Abb. 6.1 ist zu erkennen, dass der SZ-Ansatz die Effizienz der Hologramme gegenüber denen, welche durch die einfache S-Methode berechnet wurden, erheblich verbessert ist. Die erreichten Werte liegen lediglich 5 – 10 % unterhalb der durch die iterativen Algorithmen erzielten Effizienzen. Für ein 5×5 -Fallenmuster mit einem Abstand von 50 Pixeln beträgt die mittlere Effizienz $84,7 \pm 2,1$ %. Die Daten basieren auf 1000 verschiedenen Zufallsverteilungen und sind in Abb. 6.5 dargestellt. Interessanterweise ist die Breite dieser Effizienzverteilung mit einer Standardabweichung von $SD=1,7$ % relativ gering. Durch die Addition der Zufallsphase wird damit praktisch in jedem Fall die Effizienz dramatisch verbessert, vergleicht man die Ergebnisse mit der Effizienz, welche durch die S-Methode produziert wird. Diese beträgt für das gewählte System 54,5 %. Eine Verschlechterung der Effizienz tritt dabei nie auf.

Noch bessere Ergebnisse erhält man für symmetrische nicht-periodische Anordnungen wie beispielsweise einen Kreis mit N äquidistanten optischen Fallen (Abb. 6.6). Für gerade N besitzt jeder Punkt eine einzige Geisterfalle, die mit dem Hauptmaximum zusammenfällt. Für ungerade N existieren keine zusammenfallenden Maxima. Diese reduzierte Entartung lässt damit weniger Spielraum zur Optimierung von η^ϕ durch konstruktive Interferenz: Für gerade N ist η^ϕ größer als bei einer zufälligen Fallenanordnung, allerdings kleiner als bei den höher entarteten $N \times N$ -Mustern. Für ungerade N entspricht die Effizienz der-

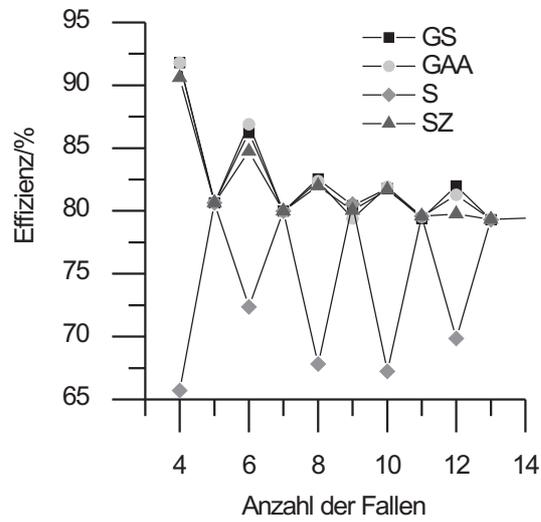


Abbildung 6.6: Effizienzen für kreisförmige Anordnungen in Abhängigkeit von der Anzahl der optischen Fallen.

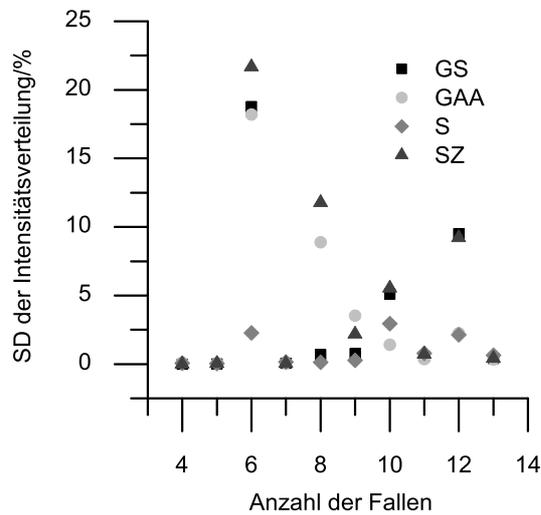


Abbildung 6.7: Intensitätsvariationen für kreisförmige Fallenanordnungen, wiedergegeben als Standardabweichung in Abhängigkeit von der Anzahl der optischen Fallen.

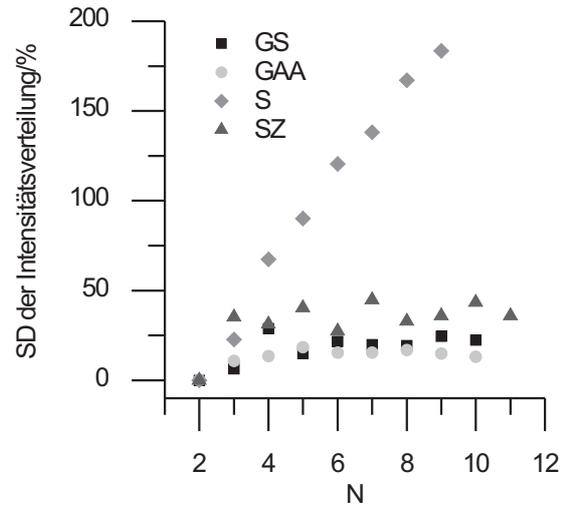


Abbildung 6.8: Intensitätsvariationen für $N \times N$ -Fallenanordnungen, wiedergegeben als Standardabweichung in Abhängigkeit von N .

jenigen, welche bei einer zufälligen Verteilung von N Fallen erreicht wird. Dies zeigt, dass die Entartung der Fallenpositionen der bestimmende Faktor für die Maximierung der Effizienz ist. Die Effizienzen, welche durch die SZ-Methode in einem solchen System erreicht werden können, liegen innerhalb von 2 % der mit dem GS und GAA Algorithmus erzielten Werte.

Für viele praktische Anwendungen der HOT ist eine geringe Intensitätsvariation innerhalb einer Gruppe von optischen Fallen von großer Bedeutung. Typischerweise ist diese Verteilung relativ breit und nicht gaußförmig. Die Abb. 6.7, 6.8 und 6.9 zeigen, dass symmetrische Muster einen sehr großen Intensitätsunterschied aufweisen. Auch für die iterativen Algorithmen liegen diese bei 20 bis 30 %¹. Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedlichen Entartungsgrade und den daraus resultierenden Interferenzen der optischen Fallen. Im Gegensatz dazu zeigen Zufallsverteilungen eine nahezu perfekte Verteilung der Intensität, unabhängig von der Art der Berechnung der Hologramme. Für $N \times N$ -Gitter liefert die S-Methode nur äußerst mäßige Resultate verglichen mit den anderen Verfahren. Für geradzahlig Kreisanordnungen jedoch lieferte die S-Methode oft die gleichmäßigste Intensitätsverteilung, allerdings ist die erreichte Effizienz nicht die bestmögliche. Die mittels der SZ-Methode produzierte Intensitätsvariation ist geringer als 15 % für $N \geq 8$ und nimmt mit steigender Anzahl von Fallen ab. Für die $N \times N$ -Anordnung liegt die Abweichung bei über 25 %. Eine Methode, die Verteilung der Intensität auf die einzelnen Fallen erheblich zu verbessern, besteht darin, eine vorhandene Symmetrie durch leichte Verschiebung der Fallenpositionen zu brechen. Dies soll anhand der $N \times N$ -Gitter demonstriert werden: Hier wird jede Falle um eine kleine Strecke ($s \cdot \delta_x, s \cdot \delta_y$) verschoben. Den Verschiebungsfaktoren δ_x, δ_y wurden willkürlich die Werte -1, 0 und 1 zugewiesen, s gibt die Verschiebung in Pixeln an. Dieses Vorgehen redu-

¹Als Maß für die Intensitätsvariation wurde die Standardabweichung (SD) der Intensität innerhalb eines Fallenensembles verwendet.

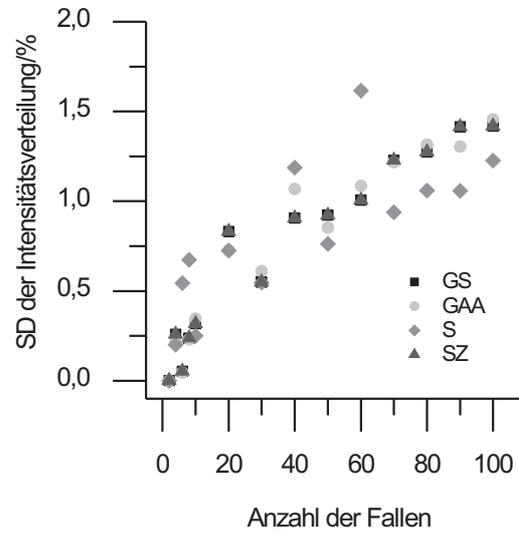


Abbildung 6.9: Intensitätsvariationen für zufällige Fallenanordnungen wiedergegeben als Standardabweichung in Abhängigkeit von der Anzahl der optischen Fallen.

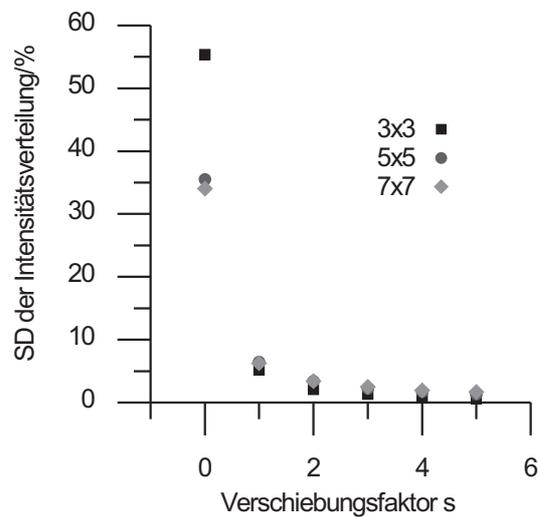


Abbildung 6.10: Abhängigkeit der Effizienzvariation in einem $N \times N$ -Fallenmuster von einer geringfügigen zufälligen Verschiebung der Fallenpositionen.

ziert die Intensitätsvariation um einen Faktor von 3 bis 4 auf Werte unter 5 %. Die Abb. 6.10 zeigt diesen Effekt gemittelt für 20 verschiedene Zuweisungen von δ und der SZ-Methode mit einer konstanten Zufallsphase. In allen Fällen wurde eine Effizienz von ungefähr 79 % erreicht, wie für asymmetrische Muster zu erwarten war.

6.3 Zusammenfassung

Die Geometrie spielt eine entscheidende Rolle sowohl für die Effizienz als auch für die Verteilung der Intensität auf verschiedene Punktfallen, welche durch Phasenhologramme generiert werden. Nur hoch-symmetrische Muster können durch iterative Algorithmen signifikant verbessert werden, während asymmetrische Verteilungen keine Verbesserung der Effizienz erlauben. In vielen Fällen können mit der SZ-Methode die gleichen Effizienzen wie mit den Standardalgorithmen GS und GAA erzielt werden ohne jegliche Iterationsschritte. Eine Verbesserung der Intensitätsverteilung kann durch leichte Verschiebung der Fallenpositionen erreicht werden, um die Symmetrie zu brechen.

Räumlich hochaufgelöste HOT

Ein wichtiger Aspekt zur praktischen Anwendung der HOT stellt die Präzision dar, mit der optische Fallen positioniert und die räumliche Auflösung mit der einzelne Fallen bewegt werden können. Gerade hier könnte ein enormes Potential der HOT liegen, wenn man sich die Anwendungsgebiete und bisherigen Arbeiten vor Augen führt, in den Einzelfallensystemen zum Einsatz kamen: Die eindrucksvollsten Beispiele stellen wohl die Einzelmoleküluntersuchungen dar, in denen Kräfte und Bewegungen einzelner Proteine analysiert werden konnten. Die hierbei auftretenden räumlichen Größenordnungen, die zu messenden Schrittweiten der molekularen Motoren liegen bei 10 nm. Zur Positionierung und Steuerung der optischen Falle wurde diese in den meisten Fällen nicht selbst bewegt, sondern die gesamte Probe relativ zu dem fixen Laserfokus verschoben. Die Möglichkeit, die Positionen einzelner optischer Pinzetten in einem Vielfallensystem nicht-mechanisch mit hoher Präzision zu kontrollieren, würde somit die einzigartige Möglichkeit eröffnen, die Einzelmolekülexperimente auf komplexe molekulare Systeme auszuweiten. Besonders interessant wäre dies in der Untersuchung biologischer Systeme, da gerade in diesen das komplexe Zusammenspiel verschiedener Komponenten von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Gesamtsystems ist. In diesem Kapitel sollen die Limitierungen in der Positionierung holographischer optischer Pinzetten untersucht und die bestimmenden Faktoren und Abhängigkeiten ermittelt werden. Es wird gezeigt, dass sich theoretisch eine Subnanometerauflösung erreichen lässt. Die durchgeführten Herleitungen und Experimente belegen, dass sich die Positionierungsauflösung proportional zum Produkt aus der Anzahl der Pixel M (in x- bzw. y-Richtung) und der Zahl der zwischen 0 und 2π zur Verfügung stehenden Phasenschritte g , welche durch das DOE bzw. den SLM vorgegeben sind, verhält. Die Kompensationsmöglichkeit eines geringen Wertes von g durch eine größere Pixelzahl M und umgekehrt wird experimentell bestätigt. Schließlich werden die gewonnenen Ergebnisse auf ein Mehrfallensystem übertragen.

7.1 Räumliche Auflösung holographischer Strahlenkung

Ein entscheidender Punkt für die Positionierung der optischen Fallen ist die Art und Weise, in der die Berechnung der zugehörigen Hologramme erfolgt. Die naheliegendste und eleganteste Methode bieten der Gerchberg-Saxton-Algorithmus und dessen Modifikationen. Vorteil bei diesen ist, dass direkt aus dem Bild, das

die gewünschte Fallenverteilung beschreibt, das globale Hologramm berechnet wird. Aufgrund der Pixelierung des SLM wird dazu für das Zielbild, welches die ideale Fallenordnung widerspiegelt, die Auflösung gewählt, welche durch das DOE vorgegeben wird ($M \times M$). Die so berechneten Hologramme können damit direkt durch den SLM realisiert werden. Dies hat jedoch zur Folge, dass die Fallenpositionen auf diskrete Punkte beschränkt sind. Die zur Pixelgröße in der Hologrammebene δ_{in} korrespondierende Pixelgröße in der Fallenebene δ_f lässt sich durch Anwendung von Gl. 3.6 berechnen:

$$\delta_f = \frac{\lambda f}{M \delta_{in}} = \frac{\lambda f}{d}. \quad (7.1)$$

Das Produkt aus Pixelzahl und Pixelgröße in der Hologrammebene $M \delta_f$ entspricht durch die übliche Anpassung des Laserstrahls mit einem Teleskop der Apertur d der zur Generierung der optischen Fallen verwendeten Linse. Durch Verwendung von Gl. 2.8 lässt sich Gl. 7.1 umformen zu:

$$\delta_f = \frac{\lambda}{2NA}. \quad (7.2)$$

Für das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HOT-System mit einer Laserwellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ und einer effektiven numerischen Apertur von $NA = 1,33$ (siehe Anmerkung S. 40) ergibt sich daraus eine maximale Auflösung in der Fallenpositionierung von 400 nm . Ein Wert, der beispielsweise für die Erfassung molekularer Wechselwirkungen viel zu groß ist. Dieser Limitierung der Fallenpositionen auf ganzzahlige Vielfache von δ_f liegt allerdings keine physikalische Beschränkung zugrunde, sondern resultiert einzig aus der diskreten Fouriertransformation des gerasterten Eingangsbildes. Durch Vermeidung dieses Verfahrens sollte sich daher eine wesentlich höhere Präzision in der Fallenpositionierung erreichen lassen, die im folgenden als Bruchteil von δ_f beschrieben wird:

$$\delta_z = \frac{\delta_f}{z} \quad (7.3)$$

mit dem Subpixelparameter z . Um die Faktoren zu ermitteln, welche δ_z bzw. z bestimmen, soll zunächst das Hologramm einer einzelnen optischen Falle j betrachtet werden, welches den Laserfokus in der Fokusebene an die Position $\vec{\rho}_j$ verschiebt. Wie bereits in Kap. 3.2 gezeigt wurde, wird eine solche einfache Verschiebung durch eine linear ansteigende Phase erzeugt, dem Phasenprofil eines optischen Prismas, welche durch Gl. 3.19 beschrieben wird.

In Abb. 7.1 sind verschiedene Beispiele für solche Hologramme illustriert. Die Geraden zeigen den idealen Phasenverlauf eines nichtpixelierten DOE mit kontinuierlichem Phasenverlauf. Die Stufenhologramme zeigen die entsprechenden realen Hologramme für ein DOE mit $N = 6$ Pixel und $g = 5$ Phasenstufen zwischen 0 und 2π . Die Prismenhologramme (a) und (b) verschieben die optische Falle um δ_f bzw. $2\delta_f$ und entsprechen damit den DOE, welche auch durch eine diskrete FT aus einem gerasterten Eingangsbild zugänglich sind. Die Steigung der Phase ϕ dieser Prismen ist durch ein ganzzahliges Vielfaches von $2\pi/N$ gegeben. Wie in Abb. 7.1 zu erkennen ist, lassen sich zusätzlich

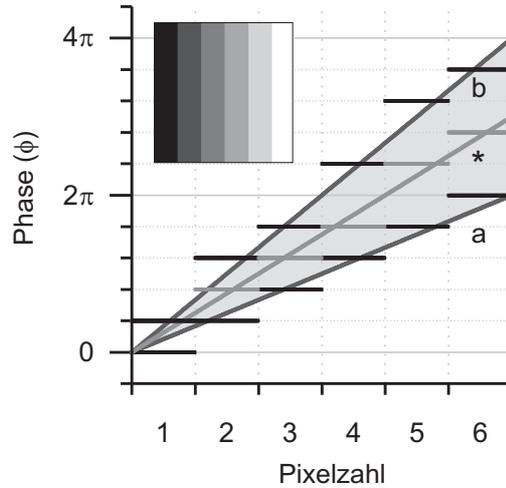


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung des Prinzips des Prismenhologramms für eine einzelne optische Falle. Die Geraden stellen ideale kontinuierliche Prismenhologramme ($M, g \rightarrow \infty$) dar. Die Stufen zeigen Hologramme für den Fall $M = 6$ und $g = 5$. Die Prismen a, b und * verschieben den Fokus jeweils um δ_f , $2\delta_f$ und $1,5\delta_f$. Oberhalb der Kurven ist die zu Prisma a korrespondierende zweidimensionale Phasenmaske dargestellt. Grau gekennzeichnet ist die Fläche zwischen den Prismen a und b, welche zur Abschätzung von z_{max} genutzt wird.

zu diesen auch Prismen konstruieren, deren Phasenanstieg ein nichtganzzahliges Vielfaches von $2\pi/N$ darstellt. So verschiebt das Prismenhologramm (*) den Laserfokus um $1,5\delta_f$. Um die maximal erreichbare Auflösung δ_f/z_{max} zu bestimmen, lässt sich als obere Grenze die Anzahl Z von Prismenphasenprofilen, deren Steigung zwischen zwei benachbarten Prismen (ϕ_j und ϕ_{j+1}) liegen, heranziehen. Die Prismen ϕ_j und ϕ_{j+1} verschieben den Laserfokus jeweils auf benachbarte ganzzahlige Vielfache von δ_f . Die Anzahl Z ergibt sich aus der von den Prismen eingeschlossene Fläche A (Abb. 7.1) dividiert durch die minimale durch das DOE darstellbare Phasenstufe $2\pi/g$:

$$z_{max} \propto Z = \frac{A}{2\pi/g} = \frac{\pi M}{2\pi/g} = \frac{Mg}{2}. \quad (7.4)$$

Die beiden Parameter Z und z_{max} sind nicht identisch, da durch Z auch Phasenprofile zwischen ϕ_j und ϕ_{j+1} erfasst werden, die sich nur im Phasenwert eines einzigen Bildpunkts bzw. weniger Bildpunkte unterscheiden und damit aufgrund der Pixelierung keinen linearen Phasenanstieg, sondern eine von 0 verschiedene Krümmung aufweisen. Jedoch eignet sich die Anzahl Z sehr gut zur Abschätzung für z_{max} , da sie einfach zu berechnen ist, einen anschaulichen Zugang zur Problematik liefert und die bestimmenden Größen erfasst. Wie Gl. 7.4 zeigt, wird z_{max} sowohl durch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Phasenstufen g als auch durch die Anzahl der Pixel M bestimmt. Erstere Abhängigkeit ist intuitiv naheliegend, da eine erhöhte Auflösung in den Phasenschritten eine bessere Auflösung in der Steigung eines Phasenprofils zur Folge hat, während die zweite Abhängigkeit von der Anzahl der Pixel auf den ersten Blick überrascht. Bevor dieser Aspekt näher untersucht wird, soll zunächst die

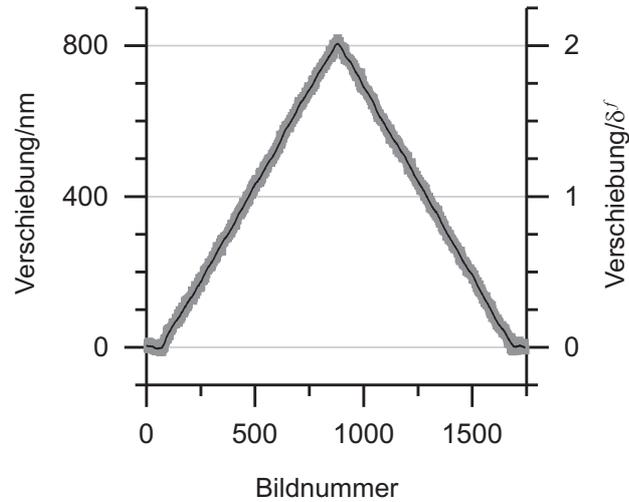


Abbildung 7.2: Die Verschiebung einer einzelnen optischen Falle um $2\delta_f$ ist dargestellt. Die Schrittweite beträgt $\delta^f/200$ (2 nm). Zur Berechnung der Hologramme wurde die maximale Zahl an verfügbaren Pixeln ($M = 512$) und Phasenschritten ($g = 130$) verwendet. Die Linie zeigt den gleitenden Durchschnitt für jeweils 20 Bilder.

Bedeutung der durch Gl. 7.4 gegebenen Abhängigkeit betrachtet werden: Unter Verwendung der SLM-Parameter des hier vorgestellten Systems ($M = 512$ und $g = 130$) ergibt sich eine maximale Auflösung in der Fallenplatzierung, welche im Subnanometerbereich liegt, weit unterhalb der Detektionsauflösung für den Laserfokus in unserem System. In Abb. 7.2 ist die Verschiebung einer einzelnen optischen Falle um $2\delta^f$ in 400 Einzelschritten dargestellt. Das entspricht einer Schrittweite von 2 nm. Zur Berechnung der Hologramme wurde die maximale Zahl der zur Verfügung stehenden Pixel ($M = 512$) und Phasenstufen ($g = 130$) verwendet. Die einzelnen Schritte konnten hier nicht mehr aufgelöst werden, die Bewegung erfolgt praktisch kontinuierlich. Aus der maximalen Verschiebung der optischen Falle konnte für δ^f ein Wert von 400 nm bestimmt werden, der exakt mit dem theoretischen nach Gl. 7.3 ermittelten Wert ($1064 \text{ nm}/1,33 = 400 \text{ nm}$) übereinstimmt.

7.2 Hologramme mit reduzierter Pixel- oder Phasenstufenzahl

Um den Einfluss der beiden Parameter M und g auf die Auflösung zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Serien von Hologrammsätzen berechnet, welche jeweils einen konstanten Parameter aufwiesen: In Serie 1 wurde die Zahl der Pixel auf 6 beschränkt und die Zahl der Grauwerte zwischen 2 und dem maximalen Wert von 130 variiert, während in der Serie 2 die Zahl der Pixel zwischen 6 und 256 variiert wurde bei der Verwendung von zwei Phasenstufen. Jeder Hologrammsatz, der aus 400 Einzelhologrammen besteht¹, verschiebt die Position der optischen Falle insgesamt um δ^f . Zum Vergleich der Serien wurde die Wurzel

¹Bei einer Beschränkung der Parameter M und g auf kleine Werte kann nach Gl. 7.4 nicht die Zahl von 400 unterschiedlichen Hologrammen erreicht werden. Zum Vergleich der Serien wurde dennoch immer ein Satz von 400 zum Teil identischer 400 Phasenverläufe berechnet.

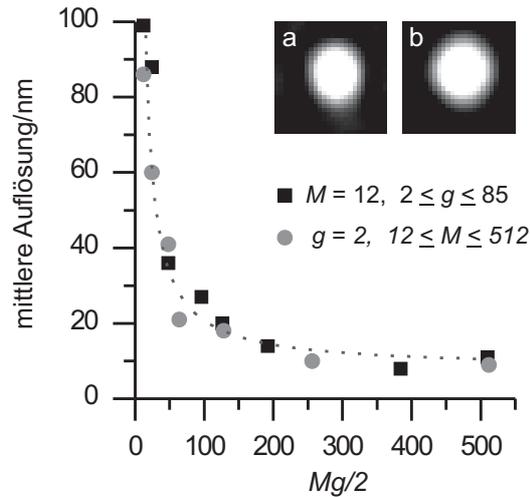


Abbildung 7.3: Vergleich zweier verschiedener Serien von Hologrammen zur Bewegung einer optischen Falle. Für die Hologramme der Serien wurde jeweils ein Parameter konstant gehalten ($M = 12$, bzw. $g = 2$). Der Unterschied zwischen den 400 Fallenpositionen und der idealen linearen Bewegung zwischen Anfangs- und Endpunkt ist durch die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung gegeben. Die Abbildung (a) zeigt den Laserfokus für $M = 512$, $g = 2$ und Abbildung (b) entsprechend für $M = 12$, $g = 85$.

des mittleren Fehlerquadrates der Fallenpositionen bezüglich einer idealen linearen und kontinuierlichen Verschiebung der optischen Falle berechnet und gegen das Produkt $Mg/2$ aufgetragen (Abb. 7.3). Deutlich zu erkennen ist, dass beide Serien die gleiche Abhängigkeit von $Mg/2$ zeigen wie sie von Gl. 7.4 gefordert wird. So lassen sich auch durch Benutzung binärer Hologramme, welche lediglich zwei verschiedene Phasenstufen verwenden, Positionierungen der optischen Fallen mit Nanometerauflösung erzielen. Beide Hologrammserien scheinen auf dem ersten Blick äquivalente Ergebnisse zu liefern. Die produzierten Laserfoki weisen allerdings Unterschiede auf. In Abb. 7.3a ist der Laserfokus abgebildet, welcher mit einem Hologramm mit den Parametern $M = 512$ und $g = 2$ verschoben wurde. Dieser zeigt eine ellipsoide Verzerrung, während der Laserfokus in Abb. 7.3b eine perfekte Kreisform besitzt. Zur Verschiebung dieser optischen Falle wurde ein Hologramm der Serie 2 mit den Parametern $M = 12$ und $g = 85$ benutzt. Das Produkt $Mg/2$ ist somit in beiden Fällen nahezu identisch (512 bzw. 510). Die Ursache für den Unterschied könnte in der unterschiedlichen Natur der Parameter M und g liegen. Obwohl sie nach Gl. 7.4 den gleichen Einfluss auf die Auflösung besitzen, unterscheiden sich ihre Wirkungen grundlegend voneinander. Dazu sollen zwei Prismenhologramme betrachtet werden, die sich nur geringfügig in ihrer Steigung unterscheiden. Werden diese Phasemasken durch DOE mit einer sehr großen Anzahl von Phasenstufen ($g \rightarrow \infty$) realisiert und vergleicht man die Phasenwerte beider Hologramme pixelweise miteinander, so unterscheiden sich auch bei einer sehr groben Pixelierung (kleines M) sämtliche Pixelwerte voneinander. Werden hingegen die Phasemasken durch DOE mit einer geringen Anzahl von Phasenstufen g und einer sehr großen

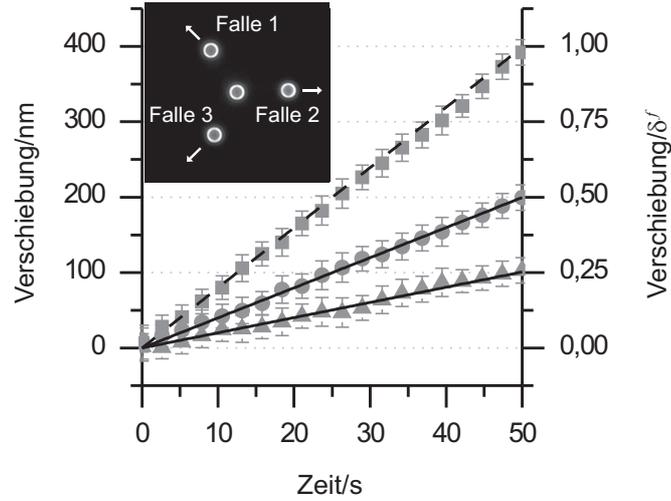


Abbildung 7.4: Die Überlagerung von 4 Prismenhologrammen wurde zur Erzeugung von 4 optischen Fallen benutzt. Diese wurden mit Polystyrolkugeln ($d = 2 \mu\text{m}$) gefüllt. Die äußeren Kugeln wurden mit unterschiedlichen Schrittweiten nach außen bewegt. Daraus resultieren unterschiedliche Geschwindigkeiten und Gesamtverschiebungen.

Pixelzahl ($M \rightarrow \infty$) gebildet, so unterscheiden sich die beiden DOE nicht mehr in jedem Bildpunkt voneinander. Die Information über die exakte Position der optischen Falle ist nicht mehr global über das DOE verteilt, sondern die lokalen Sprungstellen eines Phasenwechsels sind von entscheidender Bedeutung für die Lokalisation. Dies ist möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedliche Qualität der Laserfoki, berücksichtigt man die verschiedenen Fehlerquellen wie Pixelgröße, nichtlineare Phasenstufen etc., welche durch ihr lokales auftreten, DOE mit kleinem g stärker beeinflussen können. Ein weiterer Unterschied der Parameter M und g besteht in deren Einfluß auf das maximal zugängliche Arbeitsfeld (*field of view*, FoV). Dieses ist in Erweiterung von Gl. 7.3 gegeben durch

$$FoV = M\delta^f = \frac{M\lambda}{2NA} \quad (7.5)$$

und damit unabhängig von der Phasenauflösung. Eine Anpassung der Pixelzahl M verändert damit immer das zugängliche Arbeitsfeld.

7.3 Vielfallensysteme

Die Verwendung eines Prismenhologramms ermöglicht die hochauflösende Platzierung einer einzelnen optischen Falle. Da durch den im vorigen Kapitel vorgestellten Superpositionsansatz Hologramme für ein Mehrfallensystem leicht zugänglich sind, sollten sich auch in einem solchen System die Positionen der einzelnen Fallen mit hoher Präzision steuern lassen. Unter Verwendung von Gl. 3.22 lassen sich Hologramme für beliebige Vielfallensysteme ausgehend von einzelnen Prismenhologrammen berechnen. Die Position $\vec{\rho}$ kann dabei natürlich auch in diesem Fall ein gebrochenes Vielfaches von δ^f annehmen. Ein Beispiel

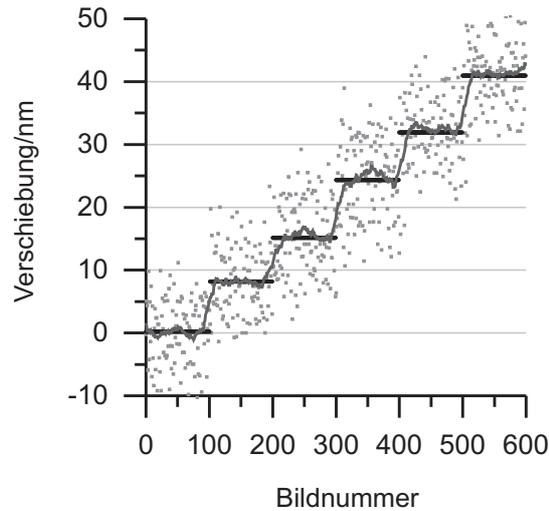


Abbildung 7.5: Bewegung einer einzelnen optischen Falle mit einer Schrittweite von $\delta^f/50$ (8 nm). Zu Berechnung der Hologramme wurde die maximale Zahl an verfügbaren Bildpunkten ($M = 512$) und Phasenschritten ($g = 130$) verwendet. Die Linie zeigt den gleitenden Durchschnitt für jeweils 20 Bilder. Die Balken stellen den Durchschnittswert für die 6 verschiedenen Fallenpositionen dar.

für ein 4-Fallensystem ist in Abb. 7.4 dargestellt. Die äußeren drei Fallen werden durch eine Serie von Hologrammen mit unterschiedlichen Schrittweiten (18 nm, 8 nm und 4 nm) radial nach außen bewegt. Diese führt zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der Bewegung der einzelnen Fallen und unterschiedlichen Gesamtverschiebungen. Mit dem System wurden schliesslich 4 Polystyrolkugeln ($d = 2 \mu\text{m}$) eingefangen. Die Teilchen konnten problemlos durch die Hologrammserie hochaufgelöst bewegt werden. In Abb. 7.4 sind die Positionen der Kolloide als Funktion der Hologramme dargestellt. Aufgrund der thermischen Fluktuationen der optisch gefangenen Partikel sind die Positionen stark veräuscht. Eine Aussage über die Güte und Präzision der Bewegung ist daher nur schwer möglich. In einem weiteren Versuch wurden die Kügelchen aus den Fallen entfernt und die Positionen der Laserfoki bestimmt. In Abb. 7.5 sind in einer Vergrößerung die ersten 5 Schritte der Falle 2 zu sehen. Deutlich zu erkennen sind die sprunghaften Positionsveränderungen. Durch Mittelung der Positionen ergibt sich hierbei ein Durchschnittswert von 8 ± 1 nm für die Schrittweite, welche hervorragend mit dem theoretischen Wert ($\delta^f/50 = 8$ nm) übereinstimmt.

7.4 Zusammenfassung

Eine räumlich hochaufgelöste Positionierung holographischer optischer Pinzetten ist durch Verwendung eines Superpositionsansatzes zur Hologrammberechnung möglich. Die Abhängigkeit der Auflösung von $(Mg)^{-1}$ bietet die Möglichkeit, durch Verringerung der Pixelzahl die Hologrammberechnungszeit zu reduzieren und gleichzeitig bei hoher Phasenstufenzahl eine hohe Positionierungsgenauigkeit zu erzielen. Andererseits erlauben auch binäre Phasenhologramme

hochaufgelöste Strahlenkung, wenn eine genügend hohe Anzahl von Bildpunkten zur Verfügung steht. Dadurch ergibt sich ein interessantes Anwendungsgebiet für ferroelektrische SLM, die lediglich zwei Phasenstufen realisieren können aber eine wesentlich höhere Bildwiederholrate aufweisen [Hos03]. Auch in Vielfallensystemen konnte die hochaufgelöste Fallensteuerung bis zu einer messtechnisch bedingten Auflösung von 8 nm demonstriert werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse sollten damit von Interesse bei der Planung von Präzisionsmessungen mit SLM generierten optischen Fallen sein, wie beispielsweise Einzelmoleküluntersuchungen oder Atomfallenexperimenten.

Modulierte Optische Wirbel

Optische Wirbel eignen sich aufgrund ihrer Fähigkeit, Drehimpuls auf Objekte zu übertragen, in idealer Weise zum nicht-invasiven Antrieb und zur Steuerung mikroskopischer Motoren, Pumpen [Lad04a] und anderer rotierender Elemente beispielsweise in miniaturisierten *Lab-on-a-chip*-Anwendungen. Die Rotationsfrequenz kann durch Variation der Laserintensität und der Helizität (Kap. 3.3) der verwendeten Phasenmasken an die Erfordernisse angepasst werden. Eingeschränkt werden die Anwendungen allerdings durch die Abhängigkeit des Vortextradius von der Windungszahl (Abb. 8.1). Die Größe des Wirbels und damit dessen Helizität ist in der Regel durch die Geometrie des zu rotierenden Objekts vorgegeben. Die Steuerungsmöglichkeit der Rotationsgeschwindigkeit reduziert sich damit auf eine Laserintensitätsanpassung. Aber auch diese ist nicht uneingeschränkt zur Kontrolle nutzbar, da eine minimale Intensität notwendig ist, um das Objekt optisch zu fangen. Die Möglichkeit, die Drehfrequenz gezielt zu steuern und simultan verschiedene Objekte mit unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeit anzutreiben, würden die Einsatzmöglichkeiten optischer Wirbel daher noch erweitern. Mit dem Ziel komplexe Vortexformen zu finden, die neben der Helizität l zusätzliche Parameter zur Kontrolle der spezifischen Wirbeleigenschaften besitzen, wurde eine Phasenmodulation optischer Wirbel untersucht, die auf einer Kombination verschiedener Wirbel gleicher Helizität unterschiedlichen Vorzeichens basiert. Deren Auswirkungen auf das Phasenprofil, die resultierende Intensitätsverteilung und den übertragbaren Drehimpuls werden in diesem Kapitel dargestellt und schließlich auf Vielfallenanordnungen übertragen und demonstriert.

8.1 Eigenschaften modulierter optischer Wirbel

Durch Anwendung des Superpositionsansatzes (Kap. 3.2) lassen sich auch optische Wirbel überlagern. Zwei Wirbel, deren Helizitäten sich nur in ihrem Vorzeichen unterscheiden und damit den identischen Radius R_l besitzen, können so an der Position ρ_j , dem Mittelpunkt der Intensitätsringe in der Fokusebene, miteinander kombiniert werden. Das elektrische Feld in der Hologrammebene einer solchen Überlagerung ergibt sich aus der komplexen Addition der beiden helikalen Phasenmasken zu

$$\epsilon_j^{in}(\vec{r}) = \left[a e^{i\theta(\vec{r})l} + b e^{-i\theta(\vec{r})l} \right] e^{i\phi_j^{in}(\vec{r})} \quad (8.1)$$

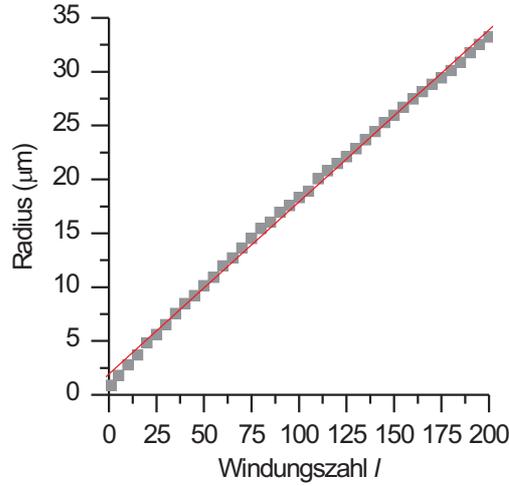


Abbildung 8.1: Der Radius optischer Wirbel ist als Funktion der Windungszahl l dargestellt. Die experimentellen Werte gelten sowohl für reine als auch für modulierte optische Wirbel. Der Radius hängt lediglich von l ab. Die rote Kurve zeigt die lineare Trendlinie.

$$\equiv \left[\alpha(\vec{r}) e^{i\varphi(\vec{r})} \right] e^{i\phi_j^{in}(\vec{r})} \quad (8.2)$$

$$\equiv K_j^{l,mod}(\vec{r}) e^{i\phi_j^{in}(\vec{r})}. \quad (8.3)$$

Mit den beiden Mischungsamplituden a und b lassen sich die jeweiligen Anteile des links- und rechtsdrehenden Wirbels steuern. Die neue durch die Superposition gebildete Kernfunktion $K_j^{l,mod}(\vec{r})$, welche das Phasenprofil des modulierten Vortex beschreibt, kann durch einfache Umformung von Gl. 8.1 dargestellt werden als

$$\alpha(\vec{r}) e^{i\varphi(\vec{r})} = (a + b) \cos(l\theta(\vec{r})) + i(a - b) \sin(l\theta(\vec{r})). \quad (8.4)$$

Die modulierte Phasenfunktion φ ist damit gegeben durch

$$\varphi(\vec{r}) = \arctan [c \tan(l\theta(\vec{r}))] \quad (8.5)$$

mit der Modulationsamplitude c , welche durch die beiden Amplituden a und b definiert wird:

$$c = \frac{a - b}{a + b}. \quad (8.6)$$

In Abb. 8.2 sind für verschiedene Mischungsamplituden die Phasenverläufe als Funktion von θ dargestellt. Für den Fall $c = 0$ resultieren binäre Hologramme, die eine stufenförmige Gliederung in $2l$ Segmente mit einer alternierenden Phase von 0 und π zeigen. Die neuen Phasenhologramme weisen nicht mehr eine konstante linear ansteigende Phase ($l\theta$) auf, wie es für die einfachen Vortexfunktionen der Fall ist, sondern sind zusätzlich mit einer Periode von π/l moduliert. Durch die Ableitungsfunktion $\partial\phi/\partial\theta$, welche gegeben ist durch

$$\partial\phi/\partial\theta = \frac{cl}{\cos^2(l\theta) + c^2 \sin^2(l\theta)}, \quad (8.7)$$

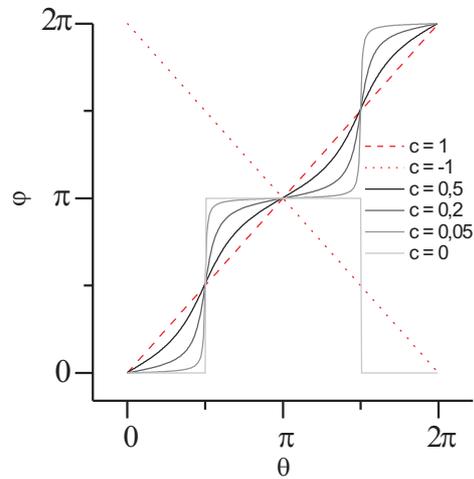


Abbildung 8.2: Phasenverläufe für modulierte optische Wirbel. In rot dargestellt sind die Phasen für reine optische Wirbel ($l = 1$) als Funktion des Polarwinkel θ . Die schwarzen und grauen Funktionen zeigen die Phase für verschiedene Mischungsamplituden.

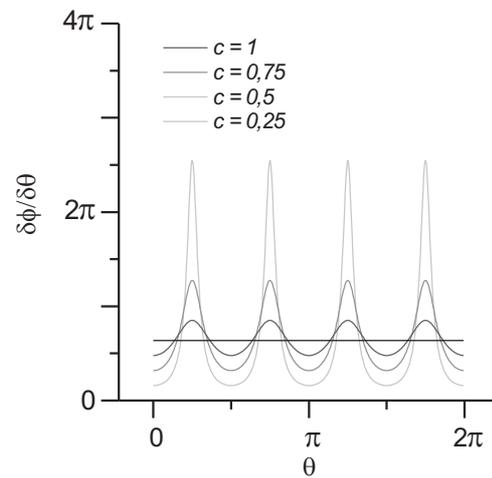


Abbildung 8.3: Ableitungsfunktionen modulierter optischer Wirbel für verschiedene Mischungsamplituden. Die Helizität beträgt 2, erkennbar an den $2l = 4$ Minima und Maxima.

lässt sich die Modulation näher charakterisieren (Abb. 8.3): Diese besitzt für alle θ ein konstantes Vorzeichen: Die Steigung ist positiv für den Fall $a > b$ und negativ im umgekehrten Fall. Die Extrema der Ableitungsfunktion nehmen die Werte cl und l/c an und befinden sich unabhängig von der Modulationsamplitude c an den Winkelpositionen

$$\theta_{min} = m \frac{\pi}{l} \quad (8.8)$$

$$\theta_{max} = \frac{\pi}{2l} + m \frac{\pi}{l} \quad (8.9)$$

mit dem ganzzahligen Faktor m . Trotz der lokalen Änderung der Ableitungsfunktion besitzt diese eine Gemeinsamkeit mit dem Phasenverlauf regulärer Vortices: Berechnet man den mittleren Wert der Ableitungsfunktion als Maß für eine mittlere Helizität \bar{l}_1 , welche gegeben ist durch

$$\bar{l}_1 = \left\langle \left(\frac{\partial \phi}{\partial \theta} \right) \right\rangle_{\theta}, \quad (8.10)$$

so erhält man sowohl für die modulierten wie auch die regulären Vortices den Wert l (für den Fall, dass $c > 0$. Ist $c < 0$, so resultiert für $\bar{l}(1)$ der Wert $-l$).

Die ausgeprägte Amplitude der Ableitungsfunktion für kleine Beträge von c sollte sich merklich auf die Modulationstiefe der Intensitätsverteilung in der Fokusebene auswirken, da für den Radius R_l eines optischen Wirbels allgemein folgende Abhängigkeit gegeben ist [Cur03a]:

$$R_l(\theta) = a \frac{\lambda}{NA} \left(1 + \frac{1}{l_0} \frac{\partial \phi}{\partial \theta} \right). \quad (8.11)$$

Die beiden konstanten Parameter a und l_0 werden durch das radiale Strahlprofil des Lasers bestimmt. Im Falle der durch Gl. 8.1 beschriebenen Phasenhologramme ist daher keine ringförmige Intensitätsverteilung zu erwarten, sondern eine Verteilung mit einer $2l$ -zähligen Symmetrie, dessen Modulationstiefe durch den Parameter c bestimmt ist. Betrachtet man die realen Beugungsbilder (Abb. 8.4), so ist festzustellen, dass keine erkennbare radiale Intensitätsmodulation auftritt. Die Intensität bleibt auf einem Kreis, der durch den entsprechenden unmodulierten Vortex mit der Helizität l vorgegeben ist, lokalisiert. Der Radius R_l ist damit unabhängig von der Mischungsamplitude c . Allerdings bilden sich auf diesem Ring in Abhängigkeit des Modulationsparameters c Intensitätsminima und -maxima aus. Die Intensität der Minima nimmt kontinuierlich mit kleiner werdenden c ab, bis schließlich für den Fall $c = 0$ das Beugungsbild aus einer zahnradförmigen Anordnung von $2l$ Intensitätsmaxima besteht [Jes04b]. Deren radiale Ausdehnung ist durch die Wellenlänge des Laserlichts λ gegeben und entspricht damit der eines unmodulierten optischen Wirbels. Der Abstand der Maxima liegt ebenfalls in der Größenordnung von λ . Dieser kleine Abstand mag die Ursache für die nicht zu beobachtende radiale Modulation sein. Die durch die Ableitungsfunktion vorgegebene Intensitätsverteilung weist eine tangential-Struktur auf, welche unterhalb des Beugungslimits liegt. Erstaunlich bleibt jedoch die Lokalisation der Intensität auf einem Ring mit dem Radius R_l . Dennoch eignet sich die Ableitungsfunktion der Phasenmaske zur Beschreibung der

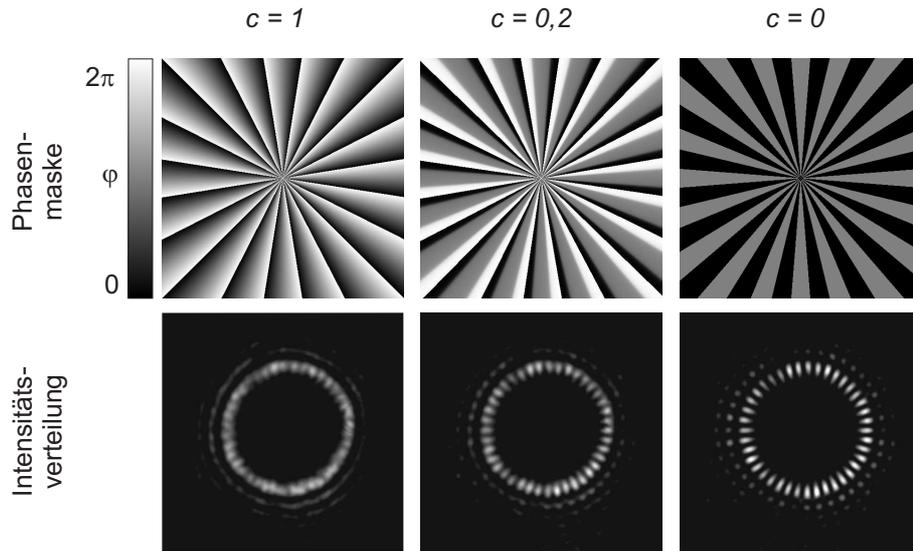


Abbildung 8.4: Dargestellt sind drei Hologramme unterschiedlicher Mischungsamplitude (obere Reihe). Die Helizität der Hologramme beträgt 8. Die untere Bildreihe zeigt die zugehörigen Intensitätsverteilungen der optischen Ringfallen. Deutlich zu erkennen sind die $2l$ Intensitätsmaxima.

resultierenden Intensitätsverteilung: Je höher die Amplitude der Ableitung, desto geringer ist die Intensität auf dem Kreisradius. Dieser bleibt jedoch konstant für alle Werte von c . Interessanterweise zeigt R_l damit ein ähnliches Verhalten wie die mittlere Helizität \bar{l}_1 .

8.2 Zahnradfallen

Durch eine zahnradförmige Ringfalle ($c = 0$) lässt sich kein Drehimpuls übertragen. Die beiden Drehimpulsanteile der zur Modulation verwendeten Wirbel heben sich im Falle einer verschwindenden Mischungsamplitude ($c = 0$) auf, so dass die resultierende Phasenmaske in ihrer Steigung keine Vorzugsrichtung mehr zeigt ($\partial\varphi/\partial\theta = 0$). Durch eine Rotation des Hologramms lassen sich jedoch die Positionen der Intensitätsmaxima auf dem Kreisradius R_l verschieben. Diese Maxima entsprechen einfachen optischen Pinzetten, die zum optischen Einfangen und damit auch zur Bewegung kleiner Objekte verwendet werden können. Paterson *et al.* nutzten ein ähnliches spiralförmiges Interferenzmuster, um Mikrokugeln, Glasstäbchen und Chromosomen kontrolliert zu rotieren [Pat01]. Ein Drehen der Phasenmaske lässt sich auf einfache Weise durch Addition einer zusätzlichen konstanten Phase α , welche dem Drehwinkel entspricht, zu $\varphi(\vec{r})$ erzeugen.

Der Mechanismus der Rotation von Objekten durch eine Serie von Zahnradfallen unterscheidet sich damit völlig von dem der optischen Wirbel: Es erfolgt eine zeitliche Änderung der Potentiallandschaft, der Positionierung der Intensitätsmaxima. Die daraus resultierenden Gradientenkräfte führen zur Kreisbewegung der Objekte. Wird die Helizität optischer Ringfallen soweit reduziert,

dass der Radius der Falle kleiner als der halbe Objektdurchmesser ist, so lassen sich einzelne Partikel mit diesen Fallen einfangen. Dies gilt für optische Wirbel ebenso wie für die korrespondierenden Zahnradfallen. Erstere können weiterhin Drehimpuls auf das Objekt übertragen und es damit in Rotation versetzen. Zweitere sind dazu, selbst durch eine Rotation der Hologramme nicht in der Lage, wenn es sich bei dem gefangenen Partikel um ein axialsymmetrisches Objekt handelt. Eine Änderung der Fallenpositionen auf dem Ringradius führt in diesem Fall zu keiner Änderung der wirkenden Kräfte. Mittels Zahnradfallen ist es daher nicht möglich, die üblicherweise in Experimenten mit optischen Pinzetten verwendeten Mikrokugeln um ihre eigene Achse zu rotieren. Aber gerade dies würde ein interessantes Werkzeug darstellen, mit dem kontrolliert und gezielt Drehmoment ausgeübt werden könnte. Die Verwendung von sphärischen Objekten gegenüber elongierten Partikeln ist aus weiteren Gründen vorzuziehen: Zum einen sind sie kommerziell erhältlich und zum anderen bietet die hohe Symmetrie einige Vorteile. Diese ermöglicht eine einfache Kalibrierung und verhindert aufgrund der fehlenden Vorzugsrichtung eine Ausrichtung in optischen Fallen durch den Strahlungsdruck. Elongierte Objekte richten sich mit ihrer Längsachse parallel zur optischen Achse aus und verhindern damit unter Umständen eine Rotation durch eine Serie von Zahnradfallen. Ideal wäre daher ein Objekt, das eine nahezu sphärische Symmetrie mit einer geringen Asymmetrie aufweist, welche die Verwendung der Zahnradfalle und damit eine kontrollierte Rotation ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden die Eigenschaften eines Kompositobjekts bestehend aus zwei unterschiedlich großen Mikrokugeln untersucht (Abb. 8.5).

8.2.1 Kompositkugelsystem als Mikrokurbel

Polystyrolkugeln lassen sich auf einfache Weise durch Ausnutzung der unspezifischen Wechselwirkung zwischen den Partikeln aneinander binden. Um die Abstoßung der Teilchen aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung zu verringern, wurden diese in einer Lösung hoher Ionenstärke suspendiert¹. Dadurch lassen sich Kompositkugeln herstellen, die aus einer großen Mikrokugel bestehen an deren Oberfläche eine kleinere Kugel stabil angeheftet ist. Die auf diese Weise gebildeten Doppelkugeln lassen sich durch optische Zahnradfallen mit einer Helizität bis einschließlich 5 stabil einfangen. Bei höheren Windungszahlen wird das System instabil bzw. lässt sich schließlich das Komposit lediglich auf dem Rand der Falle fixieren. Die stabil optisch gefangene Kompositkugel unterscheidet sich in ihrer Positionierung in der optischen Falle nicht von einer Einzelkugel mit einem Durchmesser von $6 \mu\text{m}$: Der Fokus liegt nahe dem Mittelpunkt der größeren Kugel, die kleinere Mikrokugel hat somit keinen Einfluss auf die Wirkung der optischen Pinzette auf das Gesamtsystem. Vergleicht man weiterhin die Positionierung der Kompositkugel in einer einfachen optischen Einzelfalle mit der in einer Zahnradfalle, so erkennt man auch hier keinerlei

¹100 μl einer 2-% Mikrokugelsuspension ($d = 6 \mu\text{m}$), 50 μl einer 2-% Mikrokugelsuspension ($d = 0,75 \mu\text{m}$) und 100 μl einer 1 M KCl-Lösung werden in 800 μl in Wasser für 10 min inkubiert. Anschließend wird die Suspension für 1 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Kügelchen werden in 1 ml Wasser resuspendiert.

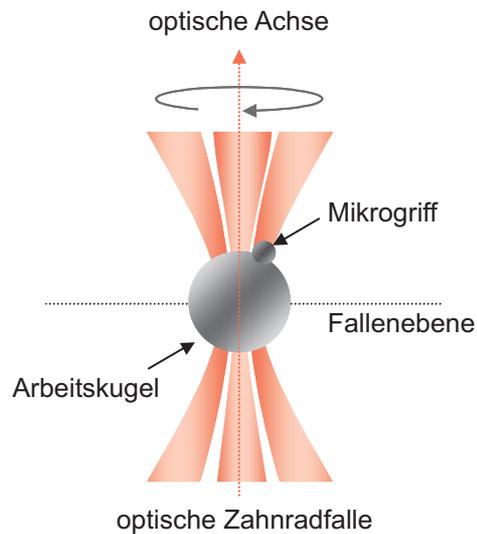


Abbildung 8.5: Zwei miteinander verbundene kolloidale Kügelchen unterschiedlicher Größe bilden ein System, welches durch eine Zahnradfalle stabil optisch gefangen werden kann. Die Gleichgewichtslage dieses Objekts entspricht dabei der einer undekorierten Kugel, der Laserfokus liegt somit nahe dem Mittelpunkt der größeren Kugel. Die zahnradförmigen Intensitätsmaxima, welche auch oberhalb der Fokusebene vorhanden sind, führen durch Wechselwirkung mit der kleineren Kugel zu einer stabilen Positionierung und Ausrichtung des Kugelpaars. Durch Rotation der Zahnradfalle kann dieses um die optische Achse gedreht werden. Auf diese Weise lässt sich eine Mikrokurbel realisieren.

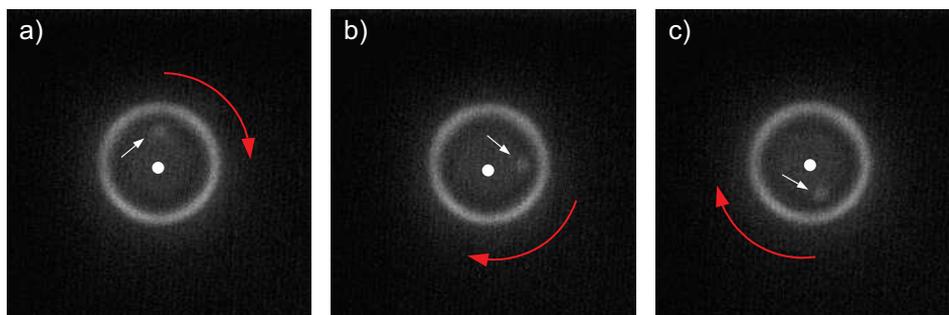


Abbildung 8.6: Die Abbildung zeigt eine $6\ \mu\text{m}$ große Kugel, an die eine $0,75\ \mu\text{m}$ große Kugel angehängt ist (weißer Pfeil). Durch Rotation des Zahnradfallenhologramms lässt sich das Kompositsystem um die mit einem weißen Punkt gekennzeichnete Achse drehen.

Tabelle 8.1: Rotation eines Kompositsystems mittels Zahnradfallen.

l	α	SLM-Frequenz/Hz	Rotation/Hz erwartet	Rotation/Hz gemessen
2	$\pi/20$	7	0,18	0,17
2	$\pi/20$	12	0,30	0,29
2	$\pi/20$	15	0,38	0,37
4	$\pi/80$	7	0,04	0,04
4	$\pi/80$	12	0,08	0,07
4	$\pi/80$	15	0,09	0,09

Unterschiede. Es kommt zu keiner Verschiebung des Objekts beim Umschalten zwischen den Fallentypen. Die kleinere Kugel reagiert jedoch auf den Wechsel des Fallentyps: Wird die einfache Pinzette verwendet, so richtet sich die kleinere Kugel in Richtung der optischen Achse aufgrund des Strahlungsdruckes aus. Ein Umschalten auf eine Zahnradfalle führt dazu, dass die Kugel in eines der Intensitätsmaxima oberhalb der Fokusebene gezogen und dort fixiert wird. Damit ist die Ausrichtung der Kompositkugel in der optischen Falle fixiert. Durch Rotation des Hologramms kann die größere Kugel mit Hilfe der kleineren um ihre eigene Achse rotiert werden (Abb. 8.5 und 8.6). Die kleinere Kugel fungiert damit als eine Griff, mit der die große Arbeitskugel bewegt wird. Es resultiert eine Mikrokurbel. Mit dieser sind stabile Rotationen realisierbar, wenn für den Rotationswinkel $\Delta\alpha$ des Hologramme folgende Bedingung erfüllt ist:

$$\Delta\alpha = \frac{\pi}{ml} \quad \text{mit } m \geq 3. \quad (8.12)$$

Diese Bedingung gewährleistet, dass die Hebelkugel immer durch dasselbe fortbewegte Intensitätsmaximum fixiert wird und nicht in die benachbarte Falle zurückspringt. Die experimentell bestimmten Rotationsfrequenzen stimmen sehr gut mit den erwarteten überein. Beispiele sind in Tab. 8.1 gegeben. Neben der stabilen Rotation bietet das Kompositsystem zusammen mit den Zahnradfallen einen weiteren Vorteil gegenüber optischen Wirbeln: Das System kann in definierte Winkel ausgerichtet und in dieser Position fixiert werden.

8.3 Drehimpulsübertragung durch modulierte optische Wirbel

Um die Auswirkung der Vortexmodulierung auf eine mögliche Übertragung von Drehimpuls für nicht verschwindende Mischungsamplituden ($c \neq 0$) zu untersuchen, wurden Phasenmasken mit verschiedenen Werten für c erzeugt. Die damit erzeugten optischen Ringfallen wurden vollständig mit Mikrokugeln gefüllt. Auf diese Weise wird eine gleichmäßige Rotation durch einen optischen Wirbel gewährleistet. Ein ruckartiges Fortbewegen und „Steckenbleiben“ einzelner Partikel, hervorgerufen durch lokale Intensitätsschwankungen, wird dadurch verhindert. Die Rotationsperiode T kann dann auf einfache Weise ermittelt werden. Die experimentelle Realisierung eines solchen Systems zeigt, dass durch die

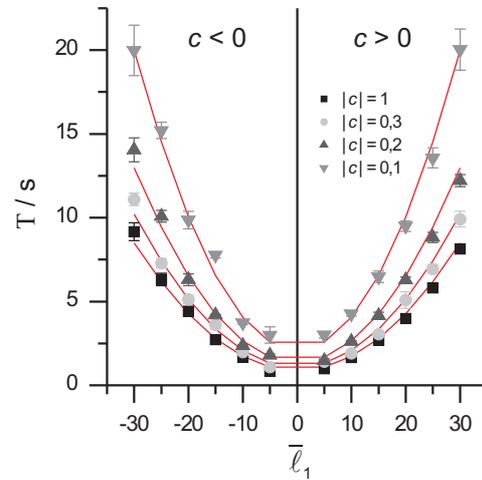


Abbildung 8.7: Die Rotationsperiode eines modulierten optischen Vortex ($l = 8$, Ringfalle vollständig mit 6 Kugeln ($d = 2 \mu\text{m}$) gefüllt) ist in Abhängigkeit von der mittleren Helizität \bar{l}_1 dargestellt. Die roten Kurven geben die Fitfunktionen nach Gl. 8.13 mit $t = 0,00862$ für alle Datenserien wieder.

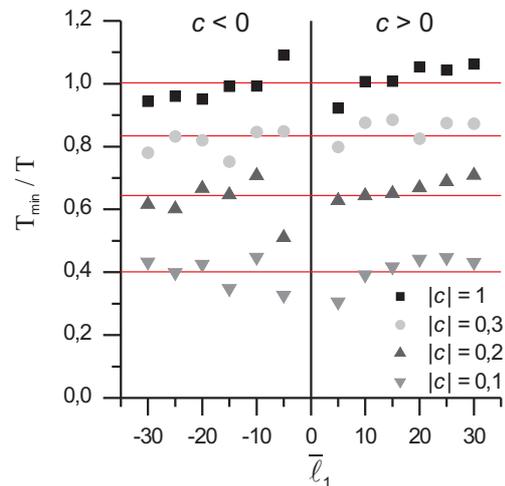


Abbildung 8.8: Die normierte Rotationsperiode T_{\min}/T als Funktion der mittleren Helizität \bar{l}_1 . Die waagerechten Linien entsprechen den Mittelwerten für verschiedene Werte von c .

Tabelle 8.2: Verschiedene Parameter zur Charakterisierung modulierter optischer Vortices.

	regulärer Vortex	modulierter Vortex
\bar{l}_1	l	l
R_l	$\propto l$	$\propto l$
\bar{l}_2	l	αl
T/T_{min}	1	α

modulierten Wirbel weiterhin Drehimpuls übertragen werden kann. Die optisch gefangenen Kügelchen bewegen sich in Abhängigkeit von der Modulationsamplitude mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und in unterschiedlicher Richtung auf einer kreisförmigen Bahn. Diese Bahn entspricht exakt der eines nicht modulierten Vortex, unabhängig von dem für c gewählten Wert. Durch Verwendung von Hologrammen mit verschwindender Modulationsamplitude ist erwartungsgemäß keine Rotation zu beobachten: Die Kugeln bleiben auf ihren Positionen fixiert und bilden einen ruhenden Ring.

In Abb. 8.7 sind die experimentell ermittelten Rotationsperioden als Funktion der mittleren Helizität \bar{l}_1 und für verschiedene Mischungsamplituden c aufgetragen. Die Laserleistung wurde für sämtliche Messungen konstant gehalten. Rotationsperioden, die auf Hologrammen mit gleichem Betrag der Mischungsamplitude basieren, zeigen eine quadratische Abhängigkeit von \bar{l}_1 . Dieses Verhalten findet sich ebenfalls bei regulären optischen Wirbeln [Cur03b]. Die hier gezeigten Datenserien lassen sich sehr gut durch eine Funktion der Form

$$T = s(1 + t(\bar{l}_1)^2) \quad (8.13)$$

annähern. Der Parameter t ist dabei eine konstante Größe für sämtliche Datenreihen unabhängig von der Größe c . Normiert man daher die Rotationsperiode auf die minimale Umlaufzeit T_{min} , welche gegeben ist für $|c| = 1$, so ergibt sich eine Größe zur Beschreibung des Rotationsverhaltens, die unabhängig von der mittleren Helizität ist und nur noch von der Mischungsamplitude abhängt. In Abb. 8.8 ist diese Größe T_{min}/T gegen \bar{l}_1 aufgetragen. Da sich die Rotationsperioden für verschiedene Werte von c unterscheiden, lässt sich zur Beschreibung des Drehimpulses der modulierten Vortices weder die Helizität l noch die mittlere Helizität \bar{l}_1 heranziehen. Bildet man jedoch das quadratische Mittel der Ableitungsfunktion \bar{l}_2 , welches gegeben ist durch

$$\bar{l}_2 = \sqrt{\left\langle \left(\frac{\partial \phi}{\partial \theta} \right)^2 \right\rangle_{\theta}} \equiv \alpha l, \quad (8.14)$$

so ergibt sich ein Ausdruck, der als Produkt aus der zur Hologrammberechnung verwendeten Helizität l und einem Faktor α geschrieben werden kann. Dieser Faktor ist eine Funktion von c und weist eine erstaunliche Ähnlichkeit zu dem Parameter s auf (Gl. 8.13). Trägt man analog zu T_{min}/T den Wert $1/\alpha$ gegen

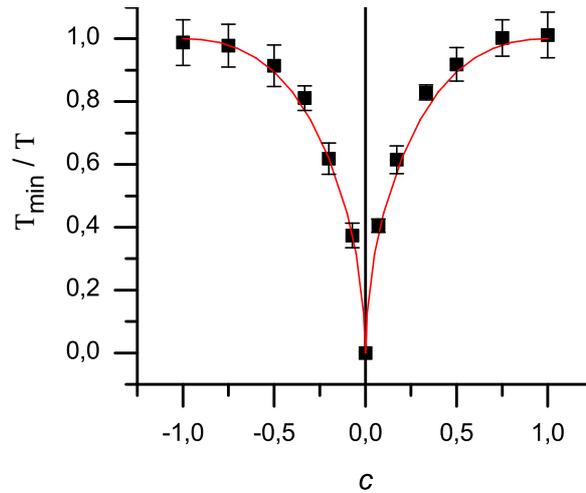


Abbildung 8.9: Normierte Rotationsperiode als Funktion der Mischungsamplitude c . Rot dargestellt ist der Verlauf von $1/\alpha$, der durch Gl. 8.14 gegeben ist.

die Mischungsamplitude c auf, so ergibt sich der in Abb. 8.9 dargestellte Verlauf, der sehr gut mit den normierten Rotationsperioden übereinstimmt.

8.4 Mehrfallensysteme modulierter optischer Wirbel

Durch eine erweiterte Verwendung des Superpositionsansatzes sollten auch mehrere modulierte optische Wirbel erzeugt werden können, deren Rotationseigenschaften sich unabhängig voneinander verändern lassen. Zur Demonstration und näheren Untersuchung dieser Möglichkeit wurde eine Anordnung von drei optischen Wirbeln mit den Helizitäten $l = 8$ bzw. $l = -8$ gewählt. Die relativen effektiven Amplituden wurden für zwei Wirbel (2 und 3) konstant gewählt ($c = -1$ und $c = 0,2$), für den dritten Wirbel (1) wurde diese schrittweise zwischen 1 und -1 variiert (siehe Abb. 8.10). Die auf diese Weise erzielten Rotationsperioden zeigen die durch Gl. 8.14 gegebene Abhängigkeit von c . Das Drehverhalten der Wirbel 2 und 3 wird durch eine veränderte Mischungsamplitude für den Wirbel 1 nicht verändert. Die Standardabweichungen der gemessenen relativen Frequenzen bezüglich der erwarteten liegen in allen drei Fällen in der Größenordnung von 2 %. Mit dem gewählten Ansatz ist es somit möglich, beliebige Rotationsfrequenzen unabhängig von der Helizität und der Laserintensität zu realisieren. Auch die simultane Erzeugung optischer Wirbel unterschiedlichen Drehverhaltens ist durch eine statische Phasenmaske zu erreichen, welche die lokalen Eigenschaften des Lichts in der Fokusebene so verändert, dass verschiedene Drehimpulsbeträge auf die optisch gefangenen Objekte übertragen werden können. Die Steuerungsmöglichkeiten sind dabei unabhängig von der Beschaffenheit der verwendeten Objekte: Wie demonstriert wurde, lassen sich identische Partikelanordnungen mit beliebigen Rotationsgeschwindigkeiten bewegen.

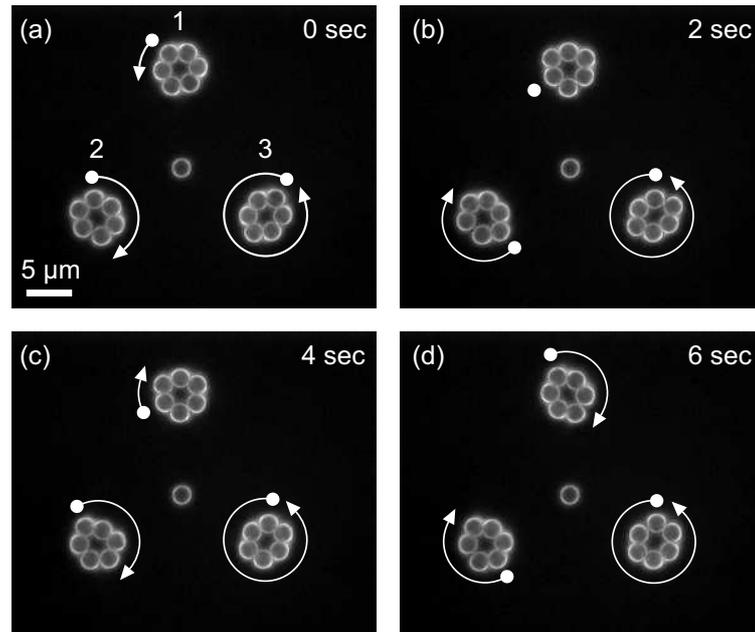


Abbildung 8.10: Fallenmuster bestehend aus zwei modulierten optischen Wirbeln (1,2) und einem reinen optischen Wirbel (3). Die Helizität beträgt in allen Fällen 8, allerdings mit unterschiedlicher Vorzeichenrichtung. Die Vortices 2 und 3 besitzen eine konstante effektive Amplitude von $-0,5$ bzw. 1 . Die Amplitudenmodulation von Vortex 1 wurde schrittweise zwischen -1 und 1 verändert.

8.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine neue Klasse optischer Wirbel vorgestellt, die neben der Helizität l einen zusätzlichen Parameter aufweist: die Mischungsamplitude c . Diese erlaubt eine Kontrolle des durch optische Wirbel übertragbaren Drehimpuls ohne den Radius des Wirbels zu verändern. Diese Eigenschaften konnten an Einzelfallensystemen wie auch an Mehrfallensystemen demonstriert werden. Gerade für letztere bietet sich ein vielversprechendes Anwendungsgebiet in der Steuerung mikrofluider Systeme. Interessanterweise konnten die Eigenschaften der neuen Wirbelklasse mit dem arithmetischen und quadratischen Mittel der Steigung des Phasenprofils korreliert werden. Ersteres scheint den Radius zu bestimmen, während zweiteres den übertragenen Drehimpuls sehr gut wiedergibt. Die beiden Kenngrößen lassen sich auch ohne Einschränkung auf einen regulären Vortex anwenden um dessen Eigenschaften zu charakterisieren (Tab. 8.2). Die Verwendung zahnradförmiger Ringfallen in Kombination mit einem Kompositkugelsystem konnte zur Realisierung einer Mikrokurbel genutzt werden. Diese ermöglicht die gezielte Ausrichtung und Rotation eines mikroskopischen optisch gefangenen Objekts.

Teil II

Mikrofluidik

Der zweite Teil der Arbeit widmet sich der Entwicklung eines Mikrofluidiksystems, das eine flexible Kontrolle des chemischen Milieus im Mikrometerbereich ermöglicht. Die Integration der HOT stellt darüber hinaus weitere Anforderungen an die Plattform: Zum einen müssen die optischen Eigenschaften und Dimensionen des Systems eine Platzierung in den Strahlengang zwischen den beiden Objektiven erlauben. Transparenz und ein sehr flaches Systemdesign sind daher entscheidende Kriterien, die zu erfüllen sind. Zum anderen muss ein hohes Maß an Stabilität gewährleistet sein, bedingt durch den extrem kleinen Kraftbereich in der Größenordnung von 1 - 10 pN, in dem die HOT operieren. Gleichzeitig sollte das System jedoch zu einer gewissen Dynamik in der Lage sein. Flüssigkeiten und Substanzen sind in einer angemessenen kurzen Zeit auszutauschen, um einen praktikablen experimentellen Einsatz zu ermöglichen.

Im Kap. 9 wird zunächst auf grundlegende Eigenschaften, Methoden und Konzepte der Mikrofluidik eingegangen. Im Anschluss daran folgt die Beschreibung der Fabrikation der in dieser Arbeit entwickelten Mikroplattform (Kap. 10). Abschließend werden verschiedene Kanaldesigns präsentiert, die hinsichtlich eines effektiven Einsatzes der HOT entworfen wurden (Kap. 11).

Grundlagen

Die Mikrofluidik als ein Teilgebiet der Mikrosystemtechnik beschäftigt sich mit der Handhabung und Analyse von Flüssigkeiten in Strukturen, welche in der Größenordnung von 1 bis 100 μm liegen. Zu Beginn der Entwicklung mikrofluidischer Systeme stand die Verwendung von Methoden, die ursprünglich für die Mikrochipindustrie entwickelt wurden. Mittlerweile ist das Gebiet zu einem eigenständigen Forschungsbereich herangewachsen, das neue Konzepte und Techniken hervorgebracht hat [Rey02, Bee02]. Vergleicht man das Verhalten und die Merkmale von Flüssigkeiten in unserer Alltagswelt mit Flüssigkeiten im Mikrometerbereich, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Jeweils andere Kräfte dominieren die Eigenschaften in Abhängigkeit von der Größenordnung. Eine einfache Verkleinerung existierender makroskopischer Apparaturen und Techniken auf den Mikrobereich ist oft kontraproduktiv und würde nicht die erwarteten Eigenschaften zeigen [Pur77]. Die Mikrofluidik muss daher neue Konzepte und Strukturen entwickeln, welche die besonderen Eigenarten berücksichtigen und die dominierenden Effekte und Kräfte ausnutzen. Von entscheidender Bedeutung sind vor allem laminare Strömungseigenschaften, Diffusion, der hydrodynamische Widerstand, das Oberflächen-Volumen-Verhältnis und die Oberflächenspannung.

9.1 Physik der Mikrofluidik

9.1.1 Reynoldszahl und laminare Strömung

Zur Klassifizierung des Strömungsverhaltens von Flüssigkeiten lässt sich das Verhältnis von Trägheitskraft zu den auftretenden Reibungskräften heranziehen. Überwiegt die Trägheit, so bezeichnet man die Strömung als turbulent. Es kommt zur Ausbildung von Wirbeln und damit zu einem Massetransport senkrecht zur Hauptströmungsrichtung. Die Bewegung einzelner Flüssigkeitspakete zeigt eine zufällige Verteilung in Raum und Zeit. Überwiegen hingegen die Reibungskräfte, so spricht man von laminarer Strömung. Die Flüssigkeit wird in parallelen Schichten fortbewegt, ohne dass es zu einer Durchmischung der Schichten kommt. Ein Stofftransport zwischen verschiedenen Schichten kann lediglich durch Diffusion erfolgen. Bei konstanten Randbedingungen ist die Strömungsgeschwindigkeit an verschiedenen Orten unabhängig von der Zeit. Einen quantitativen Vergleich von Trägheits- und Reibungskräften in einem Flüssigkeitsstrom liefert die Reynoldszahl (Osborne Reynolds, 1842-1912), wel-

che definiert ist als

$$Re = \frac{\rho D_h v}{\eta}. \quad (9.1)$$

Dabei sind ρ , η und v die Dichte, die Viskosität und die mittlere Geschwindigkeit der Flüssigkeit. Die Geometrie des flüssigkeitsführenden Objekts wird durch den hydraulischen Durchmesser D_h erfasst. Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis der vierfachen Querschnittsfläche A zu dem von der Flüssigkeit benetzten Umfang U :

$$D_h = \frac{4A}{U}. \quad (9.2)$$

Der Übergang von einer laminaren Strömung zu einer turbulenten erfolgt bei Reynoldszahlen, die größer sind als 2000. Für typische Mikrofluidikplattformen, welche mit wässrigen Medien (d.h. $\rho \approx 1000 \text{ kg m}^{-3}$ und $\eta \approx 10^{-3} \text{ Pa s}$), Strömungsgeschwindigkeiten von bis zu 10^{-3} m s^{-1} und einem hydrodynamischen Durchmesser von $100 \text{ }\mu\text{m}$ arbeiten, beträgt die Reynoldszahl weniger als 0,1. Damit liegen die mikrofluiden Strömungseigenschaften eindeutig im laminaren Bereich.

9.1.2 Diffusion

Aufgrund der Brownschen Bewegung (Robert Brown, 1773-1858) werden Teilchen nach einer gewissen Zeit das gesamte ihnen zugängliche Volumen, beispielsweise einer Lösung, einnehmen. Die mittlere Konzentration der Teilchen erreicht schließlich einen konstanten Wert im gesamten Volumen. Dieser Prozess wird als Diffusion bezeichnet. Die mittlere quadratische Auslenkung durch freie Diffusion ist gegeben durch

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (9.3)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D und der Zeit t . Die mittlere zurückgelegte Strecke hängt somit von der Quadratwurzel der Zeit ab. Die Diffusion ist damit ein entscheidendes und wichtiges Transportphänomen im Bereich kleiner Geometrien. Als Beispiel soll Hämoglobin mit einem Diffusionskoeffizienten von $7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ betrachtet werden. Um eine Strecke von 1 cm in Wasser durch Diffusion zurückzulegen benötigt es 10^6 s , für eine Strecke von $1 \text{ }\mu\text{m}$ nur 1 s . Da die Diffusionszeiten im Mikrometerbereich sehr klein sind, können mikrofluide Systeme zur Generierung komplexer Konzentrationgradienten genutzt werden [Der01]. Weiterhin stellt die Diffusion damit eine praktikable Methode dar, um Stoffe miteinander zu mischen, da die zu überbrückenden Distanzen in Mikrofluidiksystemen sehr gering sind. Durch spezielle Techniken wie der hydrodynamischen Fokussierung lassen sich die Abstände noch weiter verringern und chemische Reaktionen auf diese Weise extrem beschleunigen [Hat01].

9.1.3 Hydrodynamischer Widerstand

Der Volumenfluss \dot{V} , welcher gegeben ist durch das Produkt aus Flussgeschwindigkeit v und der Querschnittsfläche A , lässt sich für einen Kanal der Länge L

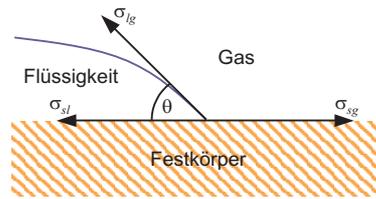


Abbildung 9.1: Dargestellt ist die Gleichgewichtssituation dreier Phasen, die eine Kontaktlinie ausbilden. Der Kontaktwinkel ist mit θ und die Oberflächenenergien sind durch σ mit den entsprechenden Indizes gekennzeichnet.

berechnen zu:

$$\dot{V} = \frac{\pi D_h^4 \Delta p}{8 \eta L} \equiv \frac{\Delta p}{R_h}, \quad (9.4)$$

mit der Druckdifferenz Δp . In Analogie zu einem elektrischen Schaltkreis kann für Flüssigkeitsströme ein hydrodynamischer Widerstand R_h definiert werden, über den die Druckdifferenz und der Volumenstrom miteinander verknüpft sind.

9.1.4 Oberflächen-Volumen-Verhältnis

Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis ist eine weitere Eigenschaft, die im Mikrobereich eine entscheidende Änderung erfährt. Beispielsweise besitzt Wasser in einer gewöhnliche Petrischale ($d = 3,5 \text{ cm}$), die zur Hälfte befüllt ist ($2,5 \text{ ml}$) ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von 400 cm^{-1} . Im Gegensatz dazu steht ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von 80000 m^{-1} für einen typischen gefüllten Mikrokanal der Größe $50 \text{ }\mu\text{m} \times 50 \text{ }\mu\text{m} \times 30 \text{ mm}$. Diese Eigenschaft macht Mikrofluidiksysteme besonders geeignet für einen raschen Wärmeaustausch. Ebenso profitiert davon die Durchführung oberflächenkatalysierter Reaktionen in Mikrokanälen.

9.1.5 Oberflächenspannung

Zur Vergrößerung der Oberfläche A einer Flüssigkeit muss eine Arbeit verrichtet werden. Die Änderung der Energie W , die bei diesem Vorgang auftritt, definiert die Oberflächenspannung σ der Flüssigkeit:

$$\sigma = \frac{\partial W}{\partial A}. \quad (9.5)$$

Bei der Befüllung kleiner Kanäle spielen typischerweise drei verschiedene Phasen eine Rolle: die feste Phase der Kanalwände (s), die flüssige Phase (l) und die zu Beginn vorhandene gasförmige Phase (g). Treffen all diese Phasen aufeinander, so bilden diese eine Kontaktlinie (Abb. 9.1) aus, deren Geometrie durch die verschiedenen Oberflächenspannungen definiert ist. Im Gleichgewicht gilt die Young-Beziehung (Thomas Young, 1773-1829):

$$\sigma_{sl} + \sigma_{lg} \cos \theta = \sigma_{sg} \quad (9.6)$$

mit dem Kontaktwinkel θ . Ist dieser kleiner als 90° , so wird die Flüssigkeit als benetzend bezeichnet. Ist der Winkel größer als 90° so spricht man von einer

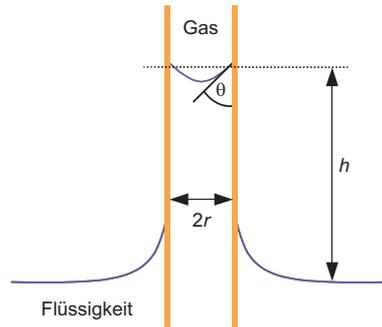


Abbildung 9.2: Die Oberflächenspannung bewirkt in Kapillaren einen Anstieg bzw. eine Absenkung der Flüssigkeit um die Höhe h . Der Kontaktwinkel ist durch θ gekennzeichnet.

nicht benetzenden Flüssigkeit. Die Festkörperoberflächen heißen dementsprechend hydrophil oder hydrophob bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel. Aufgrund der Oberflächenspannung besteht zwischen den Phasen eine Druckdifferenz Δp . Diese lässt sich aus der Krümmung der Oberfläche, welche durch die beiden Radien R_1 und R_2 bestimmt ist, durch die Laplace-Beziehung (Pierre-Simon Laplace, 1749-1827) berechnen:

$$\Delta p = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right). \quad (9.7)$$

Durch Kombination der Young und der Laplace-Beziehung 9.6 und 9.7 lassen sich eine Vielzahl einfacher aber wichtiger Kontaktlinienprobleme lösen. Wird beispielweise eine Glaskapillare mit dem Durchmesser $2r$ in Wasser eingetaucht, so steigt dieses bis zu einer gewissen Höhe h die Kapillare hinauf (Abb. 9.2). Im Gleichgewicht entspricht der hydrostatische Druck der Druckdifferenz, welche aufgrund der Oberflächenspannung zwischen Wasser und Gasphase herrscht. Damit lässt sich die Höhe berechnen:

$$\rho g h = \Delta p = \frac{2\sigma_{lg} \cos(\theta)}{r} \quad (9.8)$$

mit der Dichte ρ und der Erdbeschleunigung g . Die Tendenz von Flüssigkeiten, sich selbständig in kleine Kanäle, welche benetzt werden können, hineinzuziehen, wird als Kapillarität bezeichnet. Diese erschwert das Befüllen hydrophober Mikrofluidikkanäle und die Entleerung hydrophiler Kanäle.

9.2 Fabrikationstechniken

9.2.1 Mikromechanische Bearbeitung

Die mikromechanische Bearbeitung von Siliziumsubstraten ist eine weit verbreitete Methode zur Herstellung mikroelektromechanischer Systeme (*micro-electromechanical systems*, MEMS) und gehört zu den ersten Techniken, die zur Fabrikation mikrofluider Systeme genutzt wurden [Kov98, Koh99]. Komplexe Strukturen lassen sich damit in Siliziumoberflächen erzeugen. Fortschritte in der

Nanotechnologie ermöglichen den Zugang zu noch kleineren Elementen. Allerdings ist Silizium für viele Anwendungen hinsichtlich optischer Eigenschaften, Kosten und Oberflächenbeschaffenheit nicht das ideale Material.

9.2.2 Softlithographie

Zu einer weiten Verbreitung von Mikrofluidiksystemen in chemischen und biologischen Anwendungen war die Entwicklung von Methoden notwendig, die eine schnelle, einfache und preiswerte Fabrikation der Mikroplattformen ermöglicht. Im Jahre 1974 wurde erstmals eine Technik eingesetzt, welche die gewünschte Struktur als Abguss einer lithographisch erzeugten Negativform liefert [Aum74]. Entscheidend weiterentwickelt wurde die als Softlithographie bezeichnete Technik durch Whitesides *et al.* [Xia98]. Gewöhnlich wird in dem Verfahren eine dreidimensionale Struktur durch Einsatz photolithographischer Methoden produziert. Darauf wird ein viskoses Elastomer (z. B. Polydimethylsiloxan, PDMS) gegeben. Die Zugabe einer aushärtenden Substanz führt zur Vernetzung des PDMS, welches sich nun von der Gussform ablösen lässt [Duf98a, Coo02]. Die Strukturen der aus PDMS erzeugten Elemente werden lediglich durch die verwendeten Gussformen beschränkt. Komplexere Mikrofluidikzellen lassen sich daher unter Einsatz komplexerer Formen ohne weiteres realisieren [And00].

9.2.3 Elemente und Anwendungen der Mikrofluidik

Zur Steuerung und Manipulation des Flüssigkeitstransports innerhalb eines Mikrokanalsystems wurden verschiedenste spezielle Elemente entwickelt, welche die oben beschriebenen besonderen Mikrofluidikeigenschaften ausnutzen: Der T-Sensor bringt zwei getrennte Flüssigkeitsströme in unmittelbaren Kontakt zueinander. Eine Durchmischung findet lediglich aufgrund der Diffusion statt. Anhand dieser ist eine Identifizierung der gelösten Substanzen möglich [Kam99]. Mikroventile und Pumpen lassen sich durch Einsatz mehrschichtiger PDMS-Systeme realisieren [Ung00]. Die Kombination von PDMS und Hydrogelstrukturen ermöglicht die Konstruktion biomimetischer organischer Elemente, die als pH-sensitive Ventile genutzt werden [Moo03]. Mehrphasensysteme erlauben die Generierung von Tropfen und Mikroemulsionen. Die so erzeugten Kompartimente lassen sich als Mikroreaktoren einsetzen [Zhe04]. Die Integration hunderter verschiedener Mikroelemente in einer Plattform stellt ein weiteres Beispiel für das beachtliche Potential der Mikrofluidik hinsichtlich einer parallelen Prozessführung dar [Tho02, Hon03]. Anwendung findet die Mikrofluidik in den verschiedensten Forschungsbereichen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei analytische Fragestellungen [Ism03], biologische Anwendungen [Bee02, Mel02, Han03] und hier im zunehmenden Maße zellexperimentelle Untersuchungen [And03] und biomimetische Mikrosysteme [Run04, Pet04].

Herstellung der Mikrofluidikzellen

Die Herstellung der Mikrofluidikzellen stellt einen vielstufigen Prozess dar, dessen Kern auf einer Abgusstechnik der Softlithographie basiert. Zunächst wird eine Gussform, das Negativ der gewünschten Kanalstruktur, photolithographisch erzeugt. Auf diese wird ein Polymer gegossen, das nach seiner Aushärtung von der Form abgelöst wird und zusammen mit zwei Deckgläsern die Mikrofluidikzelle bildet. Die verschiedenen Schritte sind schematisch in Abb. 10.1 dargestellt und werden im folgenden näher erläutert.

10.1 Photolithographische Herstellung der Gussform

Herstellung der Belichtungsmaske

Bevor die Abgussform durch photolithographische Techniken erzeugt werden kann, muss eine passende Belichtungsmaske, welche die Struktur der Zelle wiedergibt, hergestellt werden. Dies geschieht ebenfalls in einem Lithographieprozess. Dazu wird zunächst eine etwa 120 nm dicke und damit nicht transparente Chromschicht auf ein Glassubstrat aufgebracht. Darauf wird ein positiver Photolack (AZ-1505, Microchemicals) aufgeschleudert (3000 U/min, 30 s) und für 30 min bei 80° getrocknet. Mit einem Laserlithographen (DWL 66, Heidelberg Instruments) wird die gewünschte Struktur in den Photolack geschrieben und anschließend für 1 min entwickelt. Das an den belichteten Stellen nun freiliegende Chrom kann durch eine Ätzlösung (Chromätzlösung, Merck; Verdünnung im Verhältnis 1:3 mit Wasser, Anwendung ca. 1 min) entfernt werden. Schließlich wird der übrige Photolack mit Aceton entfernt. Die resultierende Chrommaske kann nun zur Belichtung eingesetzt werden.

Herstellung der Gussform

Die Abgussformen werden aus dem negativen Epoxidphotolack SU-8 (Microresist Technologies) hergestellt. Dieses findet weite Verbreitung zur Mikrostrukturierung von Oberflächen und eignet sich insbesondere zur Erzeugung von Strukturen, die sich durch ein großes Aspektverhältnis¹ auszeichnen [Sha97, Hes02]. Der Lack basiert auf dem Epoxid SU-8, welcher über eine kationische Ringöffnungspolymerisation der Epoxidgruppen vernetzt werden kann. Als Photoinitia-

¹Das Aspektverhältnis wird definiert durch den Quotienten aus Höhe und Breite eines Objektes.

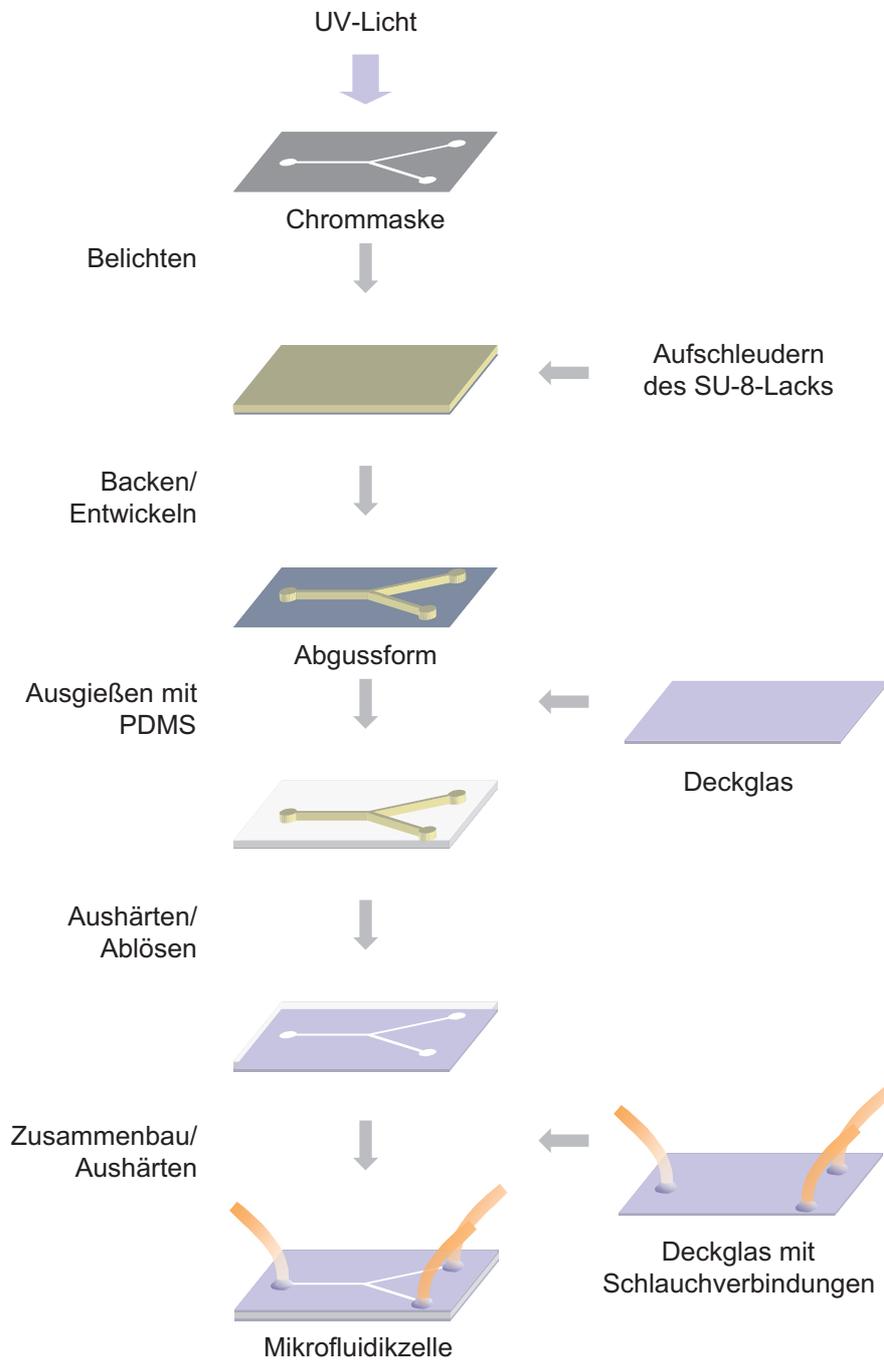


Abbildung 10.1: Schematische Darstellung des Softlithographieprozesses zur Herstellung der Mikrofluidikzellen.

Tabelle 10.1: Photolithographische Arbeitsschritte zur Gussformherstellung.

Arbeitsschritt	Parameter	
	15 μm Schicht	30 μm Schicht
Substratreinigung	15 min in Extranlösung (1:5) im Ultraschallbad 15 min in Wasser im Ultraschallbad Trocknen im Stickstoffstrom 15 min trocknen bei 200°	
Belacken	Auftragen von 2 ml Photolack (SU-8 10) 5 s bei 500 U/min 30 s bei 2000 U/min bei mittlerer Beschleunigung (Stufe 6)	
Vorbacken	2 min bei 65° 5 min bei 95°	3 min bei 65° 7 min bei 95°
Belichten	5 s	10 s
härtendes Backen	1 min bei 65° 2 min bei 95°	1 min bei 65° 3 min bei 95°
Entwickeln	5 min in SU-8-Entwickler	
Trocknen	im Stickstoffstrom	

tor wird ein Triarylsulfoniumsalz eingesetzt. Durch UV-Bestrahlung kann dieses eine Arylgruppe unter Bildung einer Säure abspalten. Bei Erwärmung reagiert die Säure mit den Epoxidgruppen und initiiert die Vernetzung des Photolacks. Die verwendeten Parameter und Bedingungen für das Herstellungsverfahren sind Tab. 10.1 zu entnehmen. Alle Schritte wurden unter Reinraumbedingungen durchgeführt. Zur Herstellung der Abgussformen wird zunächst eine 10 μm bis 40 μm dicke Schicht des Photolacks auf ein gründlich gereinigtes Glassubstrat ($5 \times 5 \text{ cm}^2$) aufgetragen. Anschließend wird dieses auf einer Heizplatte auf 65° und dann 95° erwärmt, um einen Großteil des Lösungsmittels aus dem Lack zu vertreiben (*soft bake*). Hierauf folgt die Belichtung mit einem Maskenschreiber (MJB3, Karl Süss), welcher mit einer 400 W Quecksilberdampflampe ausgestattet ist. Um den Photolack an den belichteten Stellen vollständig zu vernetzen, erfolgt ein weiteres Erwärmen der Probe wiederum in zwei Schritten auf 65° und 95° (*post exposure bake*). Um ein Reißen des Lacks zu vermeiden, werden die Proben in einem Teflonhalter langsam abgekühlt. Die Formherstellung endet mit dem Entwickeln des Lacks und anschließendem Trocknen im Stickstoffstrom.

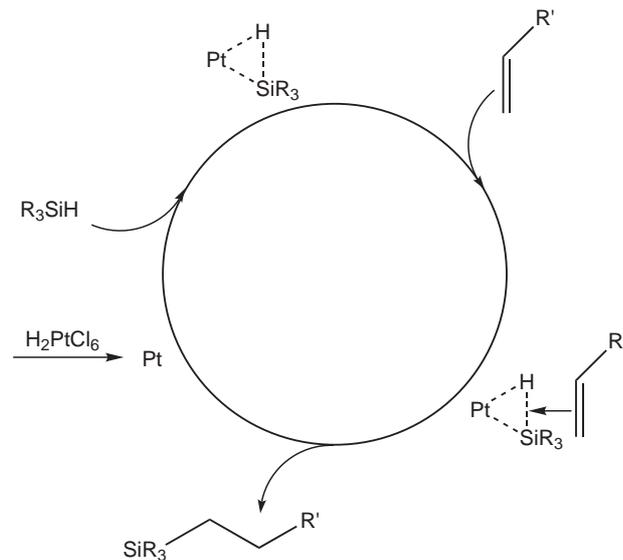


Abbildung 10.2: Platinkatalysierter Hydrosilylierungszyklus zur Vernetzung des PDMS.

10.2 PDMS-Abgüsse

Zur Herstellung der eigentlichen Zellen wird das Elastomer PDMS genutzt. Das hier verwendete Siloxan (Sylgard 184, Dow Corning) besteht aus einem vinylterminierten Siloxan mit 250 Untereinheiten und honigartiger Viskosität. Zum Vernetzen dieser Präpolymere wird ein Reagenz, bestehend aus einem Hydrosilan und einem Platinkatalysator, zugegeben (Abb. 10.2). Beide Komponenten werden gründlich miteinander vermischt und anschließend für 15 min im Vakuum entgast. Mit einer Spritze wird das Siloxan auf die Gussformen aufgetragen (ca. 0,5 ml pro Form). Auf die Polymermasse wird abschließend ein Deckglas gedrückt, die spätere Unterseite der Mikrofluidikzelle. Das Deckglas wurde vorher gründlich in Extran (Merck) und Wasser im Ultraschallbad gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet. Zum Aushärten werden die Proben über Nacht bei 65° im Ofen belassen. Nach dem Aushärten werden die Zellböden vorsichtig von den Gussmasken abgelöst, mit Ethanol gründlich gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Gussmasken werden ebenfalls mit Ethanol abgespült und eventuell vorhandene PDMS-Reste entfernt. Die Masken können nun für weitere Abdrücke genutzt werden.

10.3 Herstellung der Zellendecke mit Schlauchanschlüssen

Die Decken der Mikrofluidikzellen werden wie die Böden durch ein Deckglas gebildet. Allerdings sind im Falle der Decke zusätzliche Bohrungen erforderlich, welche als Zugang für die Schläuche dienen, mit denen die Zelle befüllt und der Flüssigkeitsstrom gesteuert wird (Abb. 10.3). Dazu werden an den gewünschten Stellen mit einem Diamantbohrer Löcher mit einem Durchmesser von ca. 1 mm gebohrt. In diese werden Polyethylenschläuche (Innendurchmes-

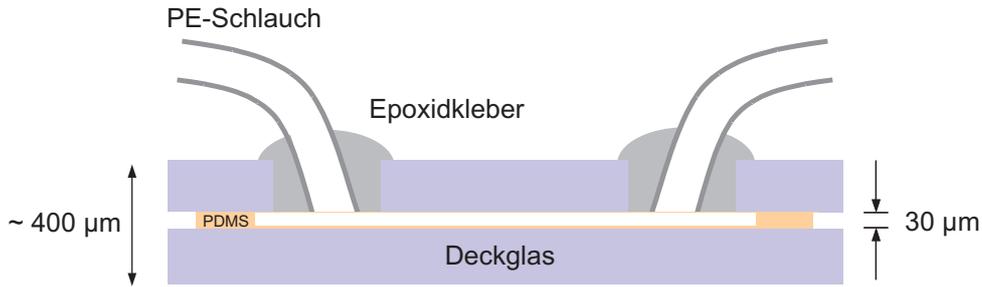


Abbildung 10.3: Schematische Darstellung der Mikrofluidikzelle. Die Abbildung zeigt den mehrschichtigen Aufbau der Zelle und die Anbringung der Schläuche.

ser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, Portex) eingeführt. Der freibleibende Raum zwischen Schlauch und dem Rand der Bohrung wird mit einem schnell härtenden Epoxidharz (UHU plus schnellfest) ausgefüllt. Nach der vollständigen Aushärtung werden die überstehenden Schläuche und hervortretender Harz vorsichtig mit einer Rasierklinge entfernt, bis sämtliche Unebenheiten auf der Unterseite der Zellendecke beseitigt sind. Abschließend wird das Glasplättchen in einer Extranlösung (1:5) für 15 min im Ultraschallbad gereinigt, gründlich mit Wasser gespült und für 15 min in Wasser im Ultraschallbad belassen. Das Extran dient nicht nur der Reinigung, sondern aktiviert auch die Glasoberfläche und macht sie stark hydrophil. Dies ist wichtig für den späteren Zusammenbau der Zelle, um eine feste kovalente Anbindung des PDMS an die Oberfläche zu gewährleisten. Um den aktiven Zustand des Glases zu erhalten, wird dieses erst kurz vor dem Zusammenbau in Extran gereinigt und unmittelbar vor der Weiterverwendung aus dem Wasser entnommen und im Stickstoffstrom getrocknet.

10.4 Zusammenbau der Zellen

Um eine kovalente Anbindung des PDMS auf die aktivierte Glasoberfläche der Zellendecke zu erreichen, wird die PDMS-Struktur einem Sauerstoffplasma ausgesetzt (100-E, TePla; 0,5 mbar, 150 W, 30 s). Es wird angenommen, dass dieser Prozess einen Teil der Methylgruppen des Siloxans zerstört und an deren Stelle Hydroxylgruppen erzeugt. Diese können mit den SiOH-Gruppen des aktivierten Glases unter Wasserabspaltung reagieren und so eine irreversible Bindung gewährleisten [Mor90, Cha91, Cha92]. Zur Anbindung von Zelldecke und Zellboden werden beide ausgerichtet und mit leichtem Druck aufeinander gepresst und über Nacht bei 65° im Ofen belassen.

10.5 Oberflächeneigenschaften der Zellen

Die Kanäle der Mikrofluidikzelle besitzen aufgrund des Herstellungsprozesses eine heterogene Oberflächenstruktur: Die Decke wird durch eine Glasoberfläche gebildet, während die Wände aus PDMS und der Boden aus einer dünnen PDMS-Schicht besteht. Letztere ist bedingt durch das Abgussverfahren und

kann nicht vermieden werden. Die Dicke dieser Schicht liegt in der Größenordnung von $10\ \mu\text{m}$. Die Eigenschaften der Oberflächen lassen sich jedoch je nach Anwendung verändern. Nach der oben beschriebenen Glasaktivierung und der Plasmabehandlung sind die Kanalwände und -decken hydrophil. Dieser Zustand kann bewahrt werden, wenn die Zellen unmittelbar nach dem Zusammenbau mit Wasser befüllt werden. Geschieht dies nicht, so setzt ein Alterungsprozess ein. Die SiOH-Gruppen der Oberflächen bilden intramolekulare Silizium-Sauerstoffbindungen aus und verringern dadurch die Hydrophilie. Eine hydrophile Oberfläche ist in der Regel wünschenswert, wenn die Zelle mit wässrigen Lösungen befüllt werden soll. Aufgrund der guten Benetzung ist dies dann sehr einfach zu erreichen. Die Gefahr der Ausbildung von Luftblasen ist dann äußerst gering. Vorhandene Luftblasen lassen sich sehr einfach durch leichte Erhöhung des hydrodynamischen Drucks entfernen. Die separate Herstellung des Bodens und der Decke der Zelle erlaubt weiterhin eine unterschiedliche Modifizierung der Oberflächeneigenschaften innerhalb einer Zelle. So lassen sich beispielsweise verschiedene Oberflächenladungen an Boden und Decke realisieren. Auf diese Weise präparierte Zellen ermöglichen beispielsweise eine kontrollierte Strukturierung durch *In-situ*-Lithographie mit Hilfe der optischen Pinzetten (Kap. 13.1).

10.6 Reinigung der Zellen

Nach der kovalenten Anbindung der Zelldecke an die PDMS-Wände lassen sich die beiden Zellkomponenten nicht mehr zerstörungsfrei voneinander trennen. Die mechanische Belastbarkeit der Zellen ist sehr hoch. Drücke in der Größe von 0,5 bar können ohne Beschädigung der Zelle zum Befüllen der Kanäle angelegt werden. Auch eine Befüllung mit einer alkalischen Reinigungslösung und die Platzierung im Ultraschallbad ist ohne eine Beschädigung der Zelle möglich. Auf diese Weise lassen sich die Zellen nach dem Gebrauch reinigen und für eine neue Verwendung vorbereiten.

Mikrokanaldesign

11.1 Allgemeine Eigenschaften der Mikrofluidikzellen

Die hier entwickelten Mikrofluidikzellen zeichnen sich insbesondere in einer Eigenschaft gegenüber einer Vielzahl existierender z.T. kommerziell erhältlicher Flusssysteme aus [Mac02]: Sie sind in hohem Grad kompatibel mit verschiedenen optischen Techniken. Durch die Verwendung zweier Deckgläser für Boden und Decke können die Zellen je nach experimenteller Anforderung von beiden Seiten durch ein Mikroskop betrachtet werden. Der entscheidende Vorteil liegt allerdings in der Höhe der Zellen: Inklusive beider Deckgläser beträgt diese für die verwendete Standardhöhe von $30\ \mu\text{m}$ für die Zellwände weniger als $400\ \mu\text{m}$ für das Gesamtsystem (Abb. 11.1). Damit können auch zwei stark vergrößernde Objektive mit kleinem Arbeitsabstand gleichzeitig eingesetzt werden. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für den Einsatz der hier vorgestellten HOT-Apparatur, welche zwei verschiedene Objektive zur Generierung der optischen Falle und zur Betrachtung der Probe verwendet, um ein hohes Maß an Flexibilität zu erreichen (Abb. 11.2). Das Hauptziel des Einsatzes der Mikrofluidikzelle besteht in der Erzeugung und Änderung eines definierten chemischen Milieus durch eine kontrollierte Bereitstellung verschiedener Flüssigkeiten. Dabei ist zu beachten, dass die Einsatzfähigkeit der HOT nicht gestört wird. Hohe Fließgeschwindigkeiten und abrupt auftretende Änderungen des Flusses müssen daher ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zelldesigns entwickelt und getestet, welche die beiden Kriterien Kompartimentierung definierter chemischer Umgebungen und Stabilität hinsichtlich des Einsatzes optischer Pinzetten erfüllen. Dazu wurden verschiedene physikalische Phänomene und Möglichkeiten der Mikrofluidik ausgenutzt. Die drei entwickelten Haupttypen werden im folgenden vorgestellt.

11.2 Einkanalssystem

Um die Entwicklung komplexerer Flusszellensysteme verständlich zu machen, sollen zunächst die Eigenschaften eines Einkanalensystems in Verbindung mit holographisch optischen Pinzetten dargestellt werden. Das System, das aus einem einzelnen Kanal besteht, über den nacheinander verschiedene Substanzen eingebracht werden können, stellt wohl die naheliegendste Lösung dar, wenn es gilt, das chemische Milieu durch Austausch von Flüssigkeiten zu kontrollieren.

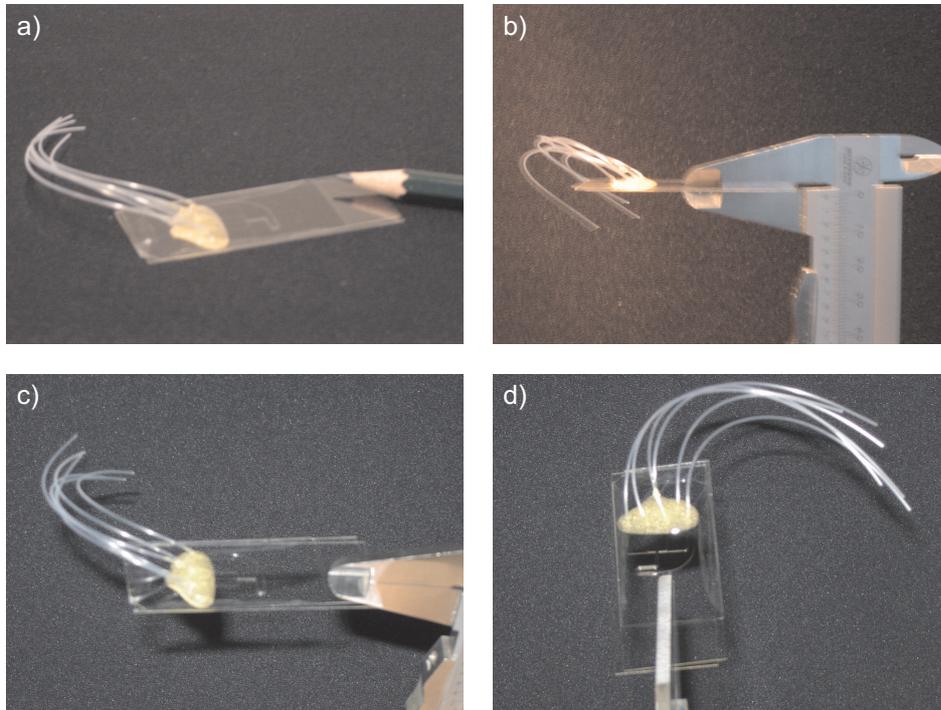


Abbildung 11.1: Die Abbildung zeigt verschiedene Ansichten der Mikrofluidikzelle. Gut erkennbar sind die mit Epoxidharz fixierten Schläuche zur Befüllung des Systems. Die Seitenansicht in (b) zeigt deutlich den ultraflachen Aufbau.

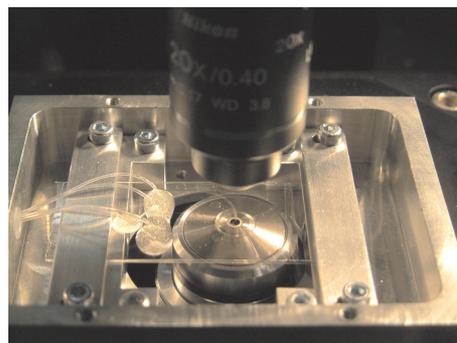


Abbildung 11.2: Platzierung der Mikrofluidikzelle in der HOT-Apparatur zwischen den beiden Objektiven. Das flache Zelldesign und die flexible Halterung erlauben je nach den experimentellen Anforderungen eine beliebige Orientierung der Zelle.

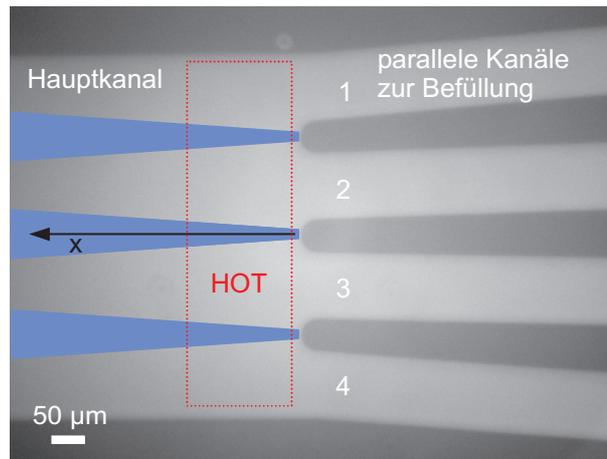


Abbildung 11.3: Vier separate Kanäle der Parallelflosszelle münden in einen breiteren Hauptkanal. Aufgrund der laminaren Strömungseigenschaften werden Bereiche definierter chemischer Zusammensetzung erzeugt, welche durch Diffusionskeile (blau) voneinander getrennt sind.

Dieses einfache System ist allerdings mit einigen Einschränkungen verbunden, die einen praktikablen Einsatz erschweren. Aufgrund der geringen Kräfte, welche durch die optische Pinzette übertragen werden, ist die maximale Fließgeschwindigkeit limitiert. In Verbindung mit dem stets vorhandenen Totvolumen (Schlauchverbindungen und Flüssigkeitsreservoirs) erhöht sich die Zeit für den Austausch einer Flüssigkeit erheblich. Das wiederum führt dazu, dass sich die auszutauschenden Flüssigkeiten durch Diffusion schon erheblich vermischen können. Kommen in einem Experiment kolloidale Suspensionen zum Einsatz, wie es bei der Verwendung optischer Pinzetten prinzipiell der Fall ist, so stellt die Durchmischung der Flüssigkeiten ein besonderes Problem dar. Die Mikrokugeln tragen gewöhnlich bei $\text{pH} = 7$ geladene chemische Gruppen an ihrer Oberfläche¹. Deren elektrostatische Abstoßung verhindert eine Aggregation der Partikel aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen. Ebenso wird beim Vorhandensein entsprechender Oberflächenladungen an den Kanalwänden eine Anbindung an die Zelle vermieden. Erhöht sich jedoch die Ionenstärke der Lösung, beispielsweise durch das Einbringen einer Pufferlösung in die Zelle, so reduziert sich die Dielektrizitätskonstante des Mediums. Dadurch kann die elektrostatische Abstoßung zwischen den Kugeln sowie zwischen Kugel und Zelloberflächen soweit reduziert werden, dass sie aneinander gebunden werden. Derart fixierte Partikel lassen sich nicht mehr durch optische Pinzetten entfernen und stehen damit nicht mehr für die Experimente zur Verfügung. Die Bereitstellung eines Reservoirs an freien, optisch manipulierbaren Kugeln stellt daher bei der Arbeit mit salzhaltigen Lösungen ein ernstes Problem dar. Eine starke Erhöhung der Kugelkonzentration ist als Lösung dieses Problems nicht geeignet. Zwar wird so die Zahl der freien Partikel erhöht, allerdings steigt ebenfalls die Zahl der auf dem Zellboden fixierten Kolloide. Diese können das eintreffende Laserlicht

¹Die in dieser Arbeit verwendeten Polystyrolkugeln tragen Sulfatgruppen an ihrer Oberfläche. Die Anzahl liegt in der Größenordnung von 5 bis 10 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

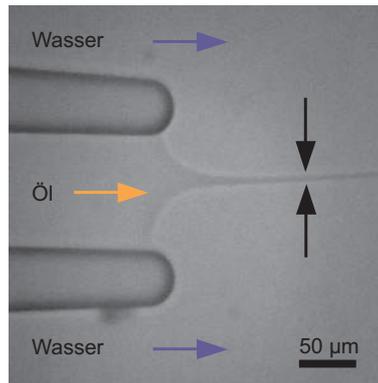


Abbildung 11.4: Durch Regulation der Geschwindigkeit der beiden flankierenden Wasserströme lässt sich die Breite des mittleren Ölstroms variieren (hydrodynamische Fokussierung). Sehr viel kleinere laterale Abmessungen als die durch das Kanaldesign vorgegebene sind dadurch zu realisieren.

beugen und streuen und damit die Fokussierung in eine stabile optische Falle verhindern. Desweiteren ist es in einem Ein-Kanalsystem ohne entsprechende Marker nicht möglich, die verschiedenen Flüssigkeiten zu unterscheiden.

11.3 Parallelflosszelle

Zur Erzeugung definierter chemischer Umgebungen lassen sich die laminaren Strömungseigenschaften in den Mikrokanälen ausnutzen. Wie bereits erläutert wurde, bewegt sich eine Flüssigkeit im Falle kleiner Reynoldszahlen schichtförmig entlang der Kanäle, ohne dass es dabei zu einer turbulenten Durchmischung kommt. Ein Stoffaustausch zwischen den Schichten findet lediglich durch Diffusion statt. Diese Art der Durchmischung lässt sich bei Kenntnis der Diffusionskonstanten exakt berechnen und stellt damit im Gegensatz zur turbulenten Strömung ein System definierter Zusammensetzung dar. Die Parallelflosszelle besteht aus einer Anzahl voneinander getrennt verlaufender Kanäle, welche schließlich zusammen in einen großen Kanal münden. Abb. 11.3 zeigt ein solches System, bestehend aus vier $100\ \mu\text{m}$ breiten Kanälen. Jeder dieser Kanäle kann separat befüllt und zur Geschwindigkeitskontrolle angesteuert werden. Die laminaren Strömungseigenschaften führen schließlich in dem breiten Kanal zu räumlich voneinander getrennten chemischen Kompartimenten, welche durch Diffusionskeile voneinander getrennt sind. Innerhalb dieser Keile kommt es durch Diffusion zu einer Vermischung der angrenzenden Flüssigkeiten. Die Ausdehnung y dieser Bereiche kann bei Kenntnis der Diffusionskonstante D und der Fließgeschwindigkeit v in Erweiterung von Gl. 9.3 berechnet werden:

$$y(x) = \sqrt{\frac{2Dx}{v}}. \quad (11.1)$$

Bei konstanter Fließgeschwindigkeit bleibt damit auch die Form der Diffusionskeile unverändert. Durch Aufrechterhaltung eines konstanten Flusses ermöglicht

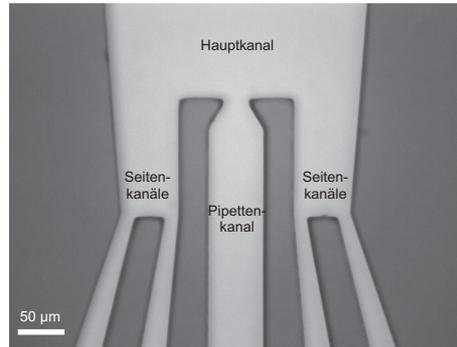


Abbildung 11.5: Das Picoliterpipettendesign. Die Mikrokanalstruktur besitzt einen Pipettenkanal und jeweils zwei flankierende Seitenkanäle, welche in einen gemeinsamen Hauptkanal münden.

die Parallelfusszelle somit die Erzeugung definierter chemischer Regionen auf kleinstem Raum. Die laminaren Flüssigkeitsschichten bilden in diesem Fall virtuelle Wände. Eine Eingrenzung durch eine solide Wand ist damit nicht notwendig. Damit sind die verschiedenen Regionen ohne Einschränkung mit Hilfe der HOT zugänglich: Optisch gefangene Teilchen können senkrecht zur Fließrichtung in die verschiedenen Regionen transportiert werden. Aufgrund der geringen Abmessungen im Bereich weniger $100 \mu\text{m}$ kann somit, im Gegensatz zu einem seriellen Flüssigkeitsaustausch in einem einfachen Einkanalsystem, ein Wechsel der chemischen Umgebung äußerst schnell erreicht werden. Auch die Unterscheidung der verschiedenen chemischen Milieus ist in einer Parallelzelle ohne weiteres möglich, da die verschiedenen Substanzen nicht zeitlich voneinander sondern räumlich voneinander getrennt sind. Die Position bestimmt somit die Art der umgebenden Flüssigkeit. Weiterhin sind alle notwendigen Substanzen gleichzeitig in dem Mikrofluidikchip präsent und können durch Bewegen der HOT in kurzer Zeit erreicht werden. Eine Wiederholung der Experimente ist damit problemlos möglich. Durch Variation der Fließgeschwindigkeiten für die einzelnen Kanäle lassen sich die lateralen Ausdehnungen der Flüssigkeitsströme in dem großen Kanal verändern. Damit ist es möglich, durch Erhöhung der Fließgeschwindigkeit zweier flankierender Kanäle die Strombreite der eingeschlossenen Flüssigkeit extrem zu minimieren (hydrodynamische Fokussierung; Abb. 11.4). Einen Nachteil weist das Parallelfusssystem neben den vielen Vorteilen allerdings auf. Zur Aufrechterhaltung der definierten chemischen Regionen ist ein konstanter Fluss notwendig. Diese Einschränkung kann insbesondere bei quantitativen Krätemessungen einen störenden Einfluss besitzen, da aufgrund der hydrodynamischen Reibung eine konstante Kraft auf das System wirkt. Ausgehend von dem Parallelsystem wurde ein weiteres Zelldesign entwickelt, welches auch den kontrollierten Betrieb bei verschwindendem Fluss erlaubt.

11.4 Picoliterpipette

Auch die Picoliterpipette besteht aus parallelen Kanälen, welche separat befüllt und angesteuert werden können und die gemeinsam in einen großen Kanal



Abbildung 11.6: Dargestellt ist die Funktionsweise der integrierten Picoliterpipette. Der mittlere Kanal der Zelle dient als Pipettierkanal und ist im Endbereich mit einem Luftkompartiment gefüllt (a). Der übrige (hier nicht zu sehende) Teil ist mit Wasser gefüllt und dient zur Steuerung. Die beiden Luft-Wasser-Grenzflächen erhöhen den Widerstand erheblich und dienen der Stabilisierung des Systems. Durch Druckerniedrigung können kleinste Flüssigkeitsvolumina in den Pipettenkanal eingebracht werden (b, c). Die blaue Markierung in (b) entspricht bei der verwendeten Zellohne von $30\ \mu\text{m}$ einem Volumen von 18 pl.

münden (Abb. 11.5). In diesem Fall kommt dem mittleren Kanal allerdings eine andere Funktion zu: Er dient als stabiler Arbeitsbereich für die optischen Pinzetten und wirkt als Pipette, mit der verschiedene Flüssigkeiten eingesaugt werden können, die über die flankierenden Kanäle in das System eingebracht werden. Ein wesentlicher Unterschied zu dem letzten Design besteht in der zusätzlichen Verwendung von Luftkompartimenten. Diese ermöglichen die stabile Handhabung kleinster Flüssigkeitsmengen ohne komplexere mehrlagige Lithographietechniken zu verwenden [Wu04].

11.4.1 Pipettenkanal

Zur Realisierung einer stabilen Pipettenfunktion wird der mittlere Kanal der Zelle nicht vollständig mit der Pumpflüssigkeit (Wasser) befüllt. Es verbleibt ein Luftreservoir, welches das Wasser von den zu pipettierenden Arbeitsflüssigkeiten trennt. Auf diese Weise entstehen zwei zusätzliche Luft-Wasser-Grenzflächen, die bei einem Einsatz der Pipette bewegt werden müssen (Abb. 11.6). Im Falle des Picoliterpipettendesigns werden hydrophobe Mikrofluidkanäle verwendet, die ein Befüllen mit Wasser erschweren, da so die Wände nicht benetzt werden. Das Bewegen der Luft-Wasser-Grenzschicht erfordert daher relativ große Druckdifferenzen und macht das System damit unempfindlich gegenüber auftretenden kleinen Druckschwankungen. Die Flüssigkeitsfront lässt sich auf diese Weise mit einer Präzision von $< 5\ \mu\text{m}$ stabil bewegen. Dies entspricht für die hier realisierten Abmessungen der Zelle ($60\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$) einem Volumen von weniger als 10 pl. Zur Aufnahme der Flüssigkeiten mit dem Pipettenkanal können verschiedene Substanzen über die Seitenkanäle in den Hauptkanal gepumpt werden. Mikrokügelchen lassen sich so in die Zelle einbringen, können mit Hilfe der optischen Pinzetten eingefangen und im Pipettenkanal platziert werden. Dieser stellt aufgrund des hohen Widerstands der Luft-Wasser-Grenzflächen einen geschützten Bereich dar, in dem kein Flüssigkeitsstrom auftritt. Auch bei einer Befüllung des Hauptkanals über die Seitenkanäle mit Flussgeschwindigkeiten von mehreren $100\ \mu\text{m s}^{-1}$ können eine Vielzahl von Objekten im Pipettierka-

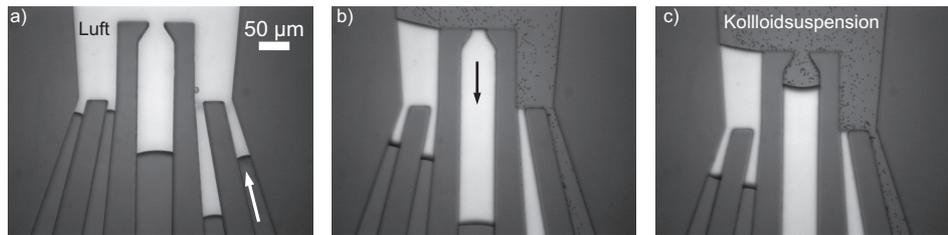


Abbildung 11.7: Die sich verjüngenden Kanäle des Picopipettendesigns ermöglichen eine einfache kontrollierte Befüllung der Zelle, ohne dass es zu einer Durchmischung der Flüssigkeiten kommt. Die abnehmenden Kanalbreiten erhöhen den hydrodynamischen Widerstand und wirken damit als bremsendes Element, die den Flüssigkeitsfluss vor Erreichen des Hauptkanals zum Erliegen bringen (a). Sind alle Flüssigkeiten in den Chip injiziert, kann durch Erhöhung des Drucks in einem Seitenkanal das Hauptreservoir befüllt werden (b). Gleichzeitig bilden sich aufgrund des speziellen Designs automatisch Luftkompartimente aus, die als Mikroschalter genutzt werden können. Durch die Picoliterpipette kann nun der mittlere Arbeitskanal befüllt werden (c).

nal stabil optisch gefangen werden. Ein Austausch der Medien kann damit in kürzester Zeit erfolgen, da die Befüllungsgeschwindigkeiten nicht mehr durch die optischen Kräfte der HOT limitiert werden. Die Flussgeschwindigkeiten in dem geschützten mittleren Kanal werden allein durch den Pipettiervorgang bestimmt, mit dem neue Substanzen aufgenommen und bereits vorhandene Flüssigkeiten abgegeben werden können. In dem bisher beschriebenen System sind die zuführenden Kanäle und damit die zu transportierenden Flüssigkeiten nicht voneinander getrennt. Es kommt also auch hier durch Diffusion zu einer Durchmischung. Zeitlich konstante Regionen mit definierter chemischer Zusammensetzung wie im Falle der Parallelflosszelle existieren nicht. Gerade bei längeren experimentellen Wartezeiten kann es daher zu einer erheblichen Durchmischung der Substanzen in den Kanälen kommen. Dieser Nachteil wird teilweise durch die Möglichkeit der Verwendung hoher Strömungsgeschwindigkeiten aufgehoben: Der Hauptkanal kann, bevor die benötigte Flüssigkeit mit der Pipette aufgenommen wird, für eine gewisse Zeit gespült werden, um eine Befüllung mit der gewünschten Substanz sicherzustellen. Eine ideale Lösung des Durchmischungsproblems besteht in der vollständigen Trennung der verschiedenen Flüssigkeiten voneinander durch schaltbare Mikroelemente auf dem Mikrofluidikchip. Solche Miniaturschalter lassen sich beispielsweise durch mehrlagige Softlithographietechniken erzeugen [And00]. Die Herstellung ist allerdings zum einen aufwändig und wirkt sich zum anderen negativ auf die optischen Anforderungen an die Zelle bezüglich Transparenz und Höhe aus. Es wurde daher eine alternative Schalttechnik entwickelt, deren Funktion allein auf dem Kanaldesign basiert.

11.4.2 Zweiphasenschalter

Als Schaltelement wird in den Kanälen neben den wässrigen Lösungen eine zweite Phase verwendet. Luftkompartimente eignen sich in idealer Weise für diesen Zweck: Sie bilden definierte Grenzflächen zu wässrigen Phasen aus und

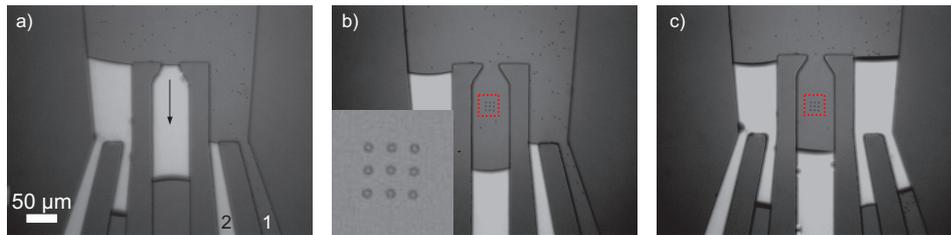


Abbildung 11.8: Dargestellt ist die Funktionsweise des Zwei-Phasen-Mikroschalters. Der Hauptkanal der Zelle wurde über den Kanal 1 mit einer Mikrokugelsuspension befüllt (a). Diese wird in den Pipettenkanal gesaugt. Mittels einer 3×3 -Anordnung von optischen Fallen (rote Markierung und vergrößerter Ausschnitt) werden 9 der Kugeln gefangen (b). Durch Druckerhöhung in Kanal 2 werden die beiden rechten Seitenkanäle durch Verschieben des Luftkompartiments geschlossen. Dieses Schalten wirkt sich nicht störend auf die HOT aus. Die Objekte bleiben stabil in den Fallen fixiert (c).

eignen sich damit zu deren Trennung [Iri04]. Aufgrund des Brechungsindexunterschieds zu Wasser bilden sie kontrastreiche Elemente, die sich sehr gut unter dem Mikroskop erkennen lassen. Weiterhin sind die Mikrofluidikkanäle nach ihrer Herstellung ohnehin mit Luft gefüllt, eine aufwändige Injektion einer zusätzlichen Substanz entfällt somit. Damit sich einzelne Luftkompartimente an den entscheidenden Positionen und mit der erforderlichen Größe ausbilden, ist einerseits eine spezielle Kanalstruktur erforderlich und andererseits sind die Zellen in einer bestimmten Weise zu füllen. Das Zusammenspiel aus Kanaldesign und Füllprotokoll führt dann zu den gewünschten Mikroschaltern (Abb. 11.7). Die zuführenden flankierenden Kanäle verjüngen sich bis zum Eintritt in den Hauptkanal von $100 \mu\text{m}$ auf $10 \mu\text{m}$. Nach Gl. 9.4 ist damit ein erheblicher Anstieg des hydrodynamischen Widerstandes verbunden. Beim Befüllen der Kanäle kommt es daher zu einer Bremswirkung, die den Flüssigkeitsstrom bei moderaten Druckdifferenzen schnell zum Erliegen bringen. Dies ermöglicht eine sehr einfache Injektion der verschiedenen Flüssigkeiten in den Chip, ohne dass die Gefahr eines Überschießens in den Haupt- und andere Seitenkanäle besteht. Zu Beginn eines Experiments werden auf diese Weise sämtliche Flüssigkeiten in die Zelle injiziert, ohne den Hauptkanal zu befüllen. Dies erfolgt schließlich, indem der Druck in einem der Kanäle soweit erhöht wird, dass der Widerstand der schmalen Öffnung überwunden wird. Dadurch wird der Hauptkanal befüllt und die übrigen Seitenkanäle werden durch Luftkompartimente verschlossen, welche eine Durchmischung der Flüssigkeiten verhindern. Die Luftkompartimente trennen die einzelnen Lösungen vollständig voneinander ab. Durch Regulation des Drucks in zwei benachbarten Seitenkanälen können die Luftreservoirs einfach von einem Kanal in den anderen verschoben werden. Auf diese Weise lassen sich je nach Bedarf beide Kanäle verschließen oder ein Kanal zum Befüllen der Zelle öffnen. Ein Verschieben der Luft in den Hauptkanal wird durch die Geometrie der Zelle verhindert. Um das Luftreservoir in den Hauptkanal zu bewegen, muss die Luft-Wasser-Kontaktfläche vergrößert und damit die Oberflächenenergie erhöht werden. Energetisch günstiger ist der Kontakt der Luft zu den hydrophoben Zellwänden. Ein Bewegen der Luft zwischen zwei Seitenkanälen erfordert daher eine wesentlich geringere Druckdifferenz als das

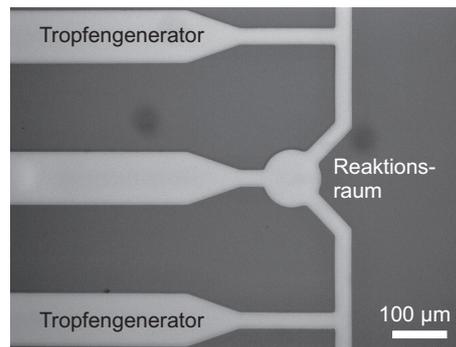


Abbildung 11.9: Das Tropfgeneratordesign besteht aus zwei T-förmigen Tropfgeneratoren und einem gemeinsamen Reaktionsraum, welcher die Vereinigung der Tropfen erlaubt.

Verschieben der Luft in den Hauptkanal.

Die Verwendung der Luftkompartimente ermöglicht somit auf einfache Weise die Generierung von schaltbaren Mikroelementen, mit denen sich Flüssigkeiten vollständig voneinander abtrennen lassen (Abb. 11.8). Die Schalter können beliebig oft verwendet werden. Verschleißerscheinungen wie bei herkömmlichen Schaltern treten nicht auf, da die begrenzenden und steuernden Einheiten allein durch die Luft-Wasser-Phasengrenzen und nicht durch ein zusätzliches drittes Element gebildet werden. Die Verwendung von Detergentien sollte allerdings vermieden werden, da durch diese die hydrophoben Oberflächeneigenschaften der Kanalwände verändert werden können. Wässrige Lösungen können dann an den Wänden entlang fließend die Luftreservoirs umgehen. Die Verwendung üblicher biologischer Puffer- und Proteinlösungen stellt aber in der Regel kein Problem dar. Erst nach wiederholtem Einsatz der Mikrofluidikchips ist eine Veränderung der Kanaleigenschaften zu beobachten.

11.5 Tropfgenerator

Die Idee der vollständige Kompartimentierung der zu dosierenden Flüssigkeiten wird auch von dem folgenden Zelldesign aufgegriffen. Dieses besteht im Wesentlichen aus zwei T-förmigen Tropfgeneratoren [Tho01] und einem gemeinsamen Reaktionsraum (Abb. 11.9). Zwei verschiedene Flüssigkeiten können so auf dem Chip in Form definierter Tropfen mit variabler Größe abgeschieden, bewegt und gezielt fusioniert werden. Um eine Tropfenbildung zu ermöglichen, wird die Zelle zunächst mit einer hydrophoben, mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeit (Perfluordekalin im folgenden als Öl bezeichnet) über die Kanäle 1 und 5 befüllt. Die auf diese senkrecht auftreffenden Kanäle 2 und 4 dienen der Injektion der wässrigen Lösungen. Durch abgestimmte Anpassung des Drucks in den Wasser- und Ölkanälen lässt sich ein definiertes Volumen der wässrigen Phase in den Ölkanal einbringen (Abb. 11.10). Durch eine weitere Druckerhöhung im Ölkanal kann das zuvor gebildete Kompartiment vollständig von der wässrigen Phase im zuführenden Kanal getrennt werden. Das minimale Volumen, das sich auf diese Weise abscheiden lässt, ist durch die Geometrie des T-förmigen Seg-

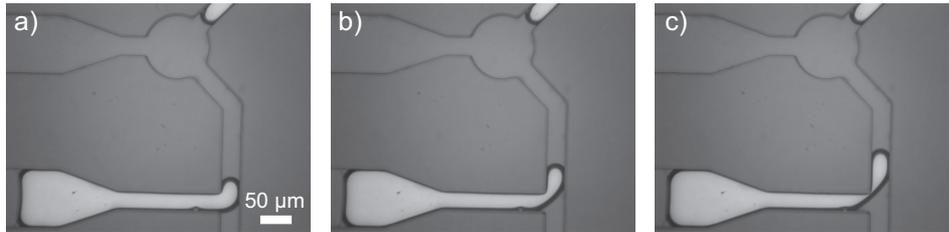


Abbildung 11.10: Generierung von Tropfen in Mikrofluidikkanälen. Durch ein T-Segment lassen sich einzelne Tropfenkompartimente durch Regulierung des Drucks in den beiden zuführenden Kanälen erzeugen. Die Abbildung zeigt diesen Prozess zu drei verschiedenen Zeitpunkten bis kurz vor dem Tropfenabriss.

ments bestimmt. Eine Tropfenbildung gelingt, wenn das vorgebildete wässrige Kompartiment im Ölkanal eine Länge aufweist, welche mindestens der doppelten Kanalbreite des zuführenden Wasserkanals entspricht. Auf diese Weise wird erreicht, dass die durch Druckerhöhung im Ölkanal auftretenden Scherkräfte ein Ablösen des Tropfens vom Wasserreservoir bewirken. Weist das vorgebildete Volumen eine geringere Ausdehnung auf, so schiebt sich das Öl bei Druckerhöhung zwischen Zellwand und wässrige Phase.

Die abgetrennten Tropfen können durch Druckregulierung in den Ölkanälen in den Reaktionsraum gebracht und dort miteinander fusioniert werden. Neben dem Kanaldesign spielt ein weiterer Punkt eine entscheidende Rolle für den experimentellen Einsatz der Mikrofluidikzellen: die Regulierung der Flussgeschwindigkeit innerhalb der Kanäle. Wie aus Gl. 9.4 ersichtlich, gelingt dies durch eine gezielte Veränderung der Druckdifferenz zwischen Kanaleingang und -ausgang. Die hier vorgestellten Kanalsysteme ($D_h \approx 50 \mu\text{m}$, $L \approx 40 \text{mm}$) weisen einen hydrodynamischen Widerstand in der Größe von $400 \text{kPa s } \mu\text{l}^{-1}$ auf. Die experimentell erforderlichen Flussgeschwindigkeiten liegen in der Größenordnung von $100 \mu\text{m s}^{-1}$. Dies entspricht einem Volumenfluss von gerade einmal 300pl s^{-1} . Die dazu erforderlichen Druckdifferenzen liegen bei 100Pa . Zur Realisierung solcher Druckdifferenzen mit der notwendigen Präzision wurde eine Dosiereinheit entwickelt, mit deren Hilfe sich der Luftdruck in kleinen Kompartimenten regulieren lässt.

11.6 Flusskontrolle

Für jeden anzusteuern Kanal wird eine separate Dosiereinheit verwendet. Diese besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten: Einer Spritze, deren Stempel mit Hilfe einer Mikrometerschraube stufenlos bewegt werden kann, einem Flüssigkeitsreservoir und einem Schalter, der eine vollständige Unterbrechung des Flusses ermöglicht (Abb. 11.11 und 11.12). Durch die indirekte Druckregulierung über den Luftdruck wird eine stufenlose Geschwindigkeitskontrolle ermöglicht. Das Luftvolumen der Spritze wirkt als dämpfendes Element. Weiterhin ist das System so konstruiert, dass verschiedene Spritzengrößen verwendet werden können. Damit können die Volumina und Volumenänderungen an die jeweiligen Erfordernisse so angepasst werden, dass sich die notwendige

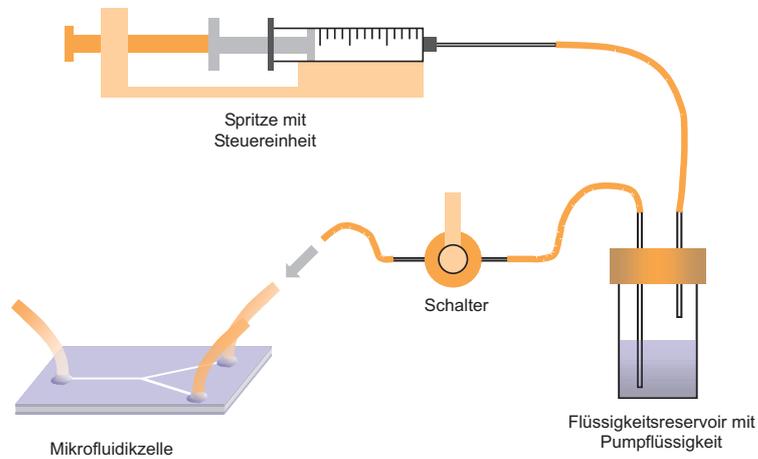


Abbildung 11.11: Dosiereinheit zur Steuerung der Flussgeschwindigkeit in den Mikrofluidikkanälen. Die Einheit besteht aus drei Komponenten: Einer Spritze, deren Stempel mit Hilfe einer Mikrometerschraube stufenlos bewegt werden kann, einem Flüssigkeitsreservoir und einem Schalter, der eine vollständige Unterbrechung des Flusses ermöglicht.

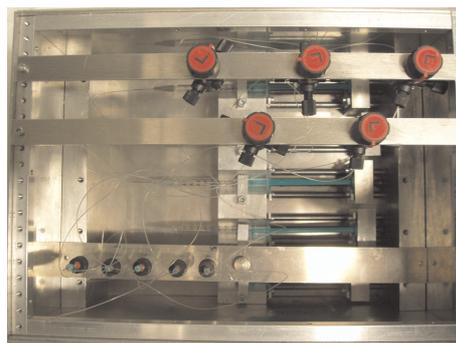


Abbildung 11.12: Blick in die Mikrofluidikdosiereinheit. Zu erkennen sind die verschiedenen Spritzen, die der Druckregulierung dienen. Diese sind über Schläuche mit den Flüssigkeitsreservoirs und den Schaltventilen verbunden.

Auflösung in der Druckregulierung erreichen lässt. Durch die Verwendung von Spritzen mit einem Volumen von 2 ml lässt sich bereits mit den hier vorgestellten Kanalgeometrien eine Präzision erreichen, die es ermöglicht, Polystyrolkugeln mit einer Geschwindigkeit von etwa $10 \mu\text{m s}^{-1}$ zu bewegen. Die Bewegung kann weiterhin vollständig gestoppt und die Richtung umgekehrt werden.

Teil III

Biomimetische Systeme

Im dritten Teil der vorgelegten Dissertation sollen abschließend die Möglichkeiten des entwickelten Mikrolabors anhand erster Anwendungen zur Untersuchung biologischer Systeme demonstriert werden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf subzellulären Proteinstrukturen. Diese Netzwerke stellen komplexe chemische und physikalische Systeme dar. Insbesondere die Interaktion zwischen mechanischen Eigenschaften und biochemischen Reaktionen bilden die Basis für ihre biologische Funktion in der lebenden Zelle.

Zu Beginn steht in Kap. 12 ein Überblick über den Aktinkortex. Dieses Proteinnetzwerk innerhalb der Zelle ist von entscheidender Bedeutung für verschiedenste essentielle Zellprozesse und soll daher als Untersuchungsobjekt für die Anwendung des Mikrolabors Verwendung finden. Dazu werden in Kap. 13 verschiedene Strategien und Konzepte eingeführt und vorgestellt, die einen Zugang zu diesen komplexen biologischen Systemen ermöglichen. Im Mittelpunkt steht dabei die Generierung und Untersuchung biomimetischer *In-vitro*-Modelle. Abschließend sollen die Möglichkeiten und Anwendungen des Mikrolabors in Einzelzellexperimenten aufgezeigt werden.

Subzelluläre Mikrosysteme: Der Aktinkortex

12.1 Das Zytoskelett

Die mechanischen Eigenschaften und die Gestalt einer Zelle sind von entscheidender Bedeutung für ihre biologische Funktion [Sac04]. Dies gilt nicht nur für den offensichtlichen Fall eines vielzelligen Organismus, in dem komplexe Zellverbände gezielt strukturiert werden müssen, sondern bereits für die einzelne Zelle. Sie muss in der Lage sein, Kräfte zu übertragen und auf Kräfte zu reagieren. Erst dadurch werden essentielle Vorgänge wie die Zelladhäsion, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung ermöglicht. Maßgeblich bestimmt werden die mechanischen und morphologischen Eigenschaften einer Zelle durch das Zytoskelett. Dies gilt insbesondere für tierische Zellen, die keine Zellwand besitzen und deren flüssigkeitsähnliche Plasmamembran allein nicht in der Lage ist, die komplexe Morphologie zu ermöglichen. Eine Zelle ist damit weit mehr als ein mit Flüssigkeit gefüllter Membranbeutel. Vielmehr ist das Zytoplasma von Polymernetzwerken durchsetzt, die Kräfte übertragen und mechanischer Spannung standhalten können. Das Zytoskelett ist ein Proteingerüst, das im wesentlichen aus drei verschiedenen Klassen von Filamenten besteht: Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten. Mikrotubuli sind starre röhrenförmige Strukturen mit einem äußeren Durchmesser von 25 nm und einem inneren Durchmesser von 18 nm. Ihre Persistenzlänge L_p liegt in der Größenordnung von 6 μm .¹ Aufgrund ihrer Struktur sind sie in der Lage, sowohl Kompression als auch Zugspannung zu widerstehen. Daher lassen sich durch Mikrotubuli asymmetrische zelluläre Prozesse umsetzen, wie beispielsweise die Ausbildung des Spindelapparats und Trennung der Chromatiden während der Zellteilung. Die Aktinfilamente, auch Mikrofilamente genannt, besitzen eine kabelartige Struktur mit einem Durchmesser von ca. 6 nm. Sie sind wesentlich flexibler als die Mikrotubuli. Ihre Persistenzlänge beträgt 15 μm . Aufgrund ihrer flexiblen Natur müssen die Aktinfilamente vernetzt werden, um Kompressionen widerstehen zu können. Die Intermediärfilamente besitzen eine seilartige Struktur. Sie sind

¹In der Polymermechanik ist die Persistenzlänge ein Maß für die Flexibilität einer Polymerkette. Definiert wird diese über die Korrelationsfunktion $\langle \vec{e}(0)\vec{e}(s) \rangle = \exp(-s/L_p)$. Die Koordinate s bezeichnet die Position entlang der Kontur des Polymers, der Einheitsvektor $\vec{e}(s)$ gibt die lokale Orientierung der Kette an.

Tabelle 12.1: Verschiedene Eigenschaften der Zytoskelettproteine und -filamente [How01]: Molekulargewicht (MG) Durchmesser (d), Querschnittsfläche (A) und Persistenzlänge (L_p).

Filamentart	MG (kDa)	d (nm)	A (nm ²)	L_p μm
Aktin	42	6	19	15
Tubulin	50	25	200	6000
Intermediär- filamente	40-180	ca. 10	ca. 60	

wesentlich flexibler im Vergleich zu den Aktinfilamenten. Strukturell sind sie aus verschiedenen ineinander verdrillten Proteinketten aufgebaut. Ihr Durchmesser beträgt ungefähr 10 nm. Verschiedene Eigenschaften der Filamente und der sie aufbauenden Proteine sind in Tab. 12.1 zusammengefasst.

Ein wesentliches Kennzeichen der mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts und der zugrundeliegenden Proteinnetzwerke ist die Viskoelastizität. Die Strukturen vereinen sowohl elastische Eigenschaften eines Festkörpers wie auch viskose Eigenschaften einer Flüssigkeit.

12.1.1 Viskoelastizität

Greift eine kleine Kraft F an einem homogenen, isotropen Körper mit der Querschnittsfläche A an, so gilt für die Spannung σ

$$\sigma = \frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L} = E\gamma \quad (12.1)$$

mit dem Elastizitätsmodul E und der relativen Längenänderung oder Dehnung $\gamma = \Delta L/L$. Dieses proportionale Verhalten von Spannung und Dehnung wird als Hookesches Gesetz bezeichnet. Ist die Zugbelastung zu groß, kann es zur Zerstörung des Körpers kommen. Die zugehörige Spannung wird Zugfestigkeit genannt. Der Elastizitätsmodul, auch Young-Modul genannt, ist eine Materialkonstante, aus der sich die Steifigkeiten für verschiedene Geometrien und Kräfteinwirkungen berechnen lassen. Die Elastizitätsmoduln verschiedener Materialien sind in Tab. 12.2 wiedergegeben.

Flüssigkeiten zeichnen sich durch eine gewisse Zähigkeit oder Viskosität η aus, die sich als Widerstand bemerkbar macht, versucht man einen Körper durch die Flüssigkeit zu bewegen. Bringt man eine Flüssigkeit zwischen zwei Platten gleicher Fläche A , welche sich relativ zueinander mit der Geschwindigkeit v bewegen, so ist die Kraft, die für die Bewegung aufgebracht werden muss, gegeben durch

$$F = \eta A \frac{\partial v}{\partial z}. \quad (12.2)$$

Durch Umformung erhält man daraus für die Spannung σ

$$\sigma = \eta \frac{\partial v}{\partial z}. \quad (12.3)$$

Tabelle 12.2: Elastizitätsmodule verschiedener Festkörper [How01].

Material	Elastizitätsmodul (GPa)	Zugfestigkeit (GPa)
Diamant	1300	-
Glas	73	1 (Faser)
Plexiglas	3	0,05
Seide	2,3	0,03
Aktin	2,3	0,03
Kollagen	2	0,1
Tubulin	1,9	-

Ist die Viskosität unabhängig vom Geschwindigkeitsgradienten, so spricht man von einer Newtonschen Flüssigkeit. Zur mechanischen Beschreibung von Systemen, die sowohl elastisches wie viskoses Verhalten aufweisen (Viskoelastizität), können der Hookesche und Newtonsche Ansatz kombiniert werden. In diesem Fall wird die Spannung beschrieben durch

$$\sigma = G' \gamma + G'' \frac{\partial \gamma}{\partial t}. \quad (12.4)$$

Der elastische Anteil wird beschrieben durch den Elastizitäts- oder Speichermodul G' . Das dissipative Verhalten des Materials wird beschrieben durch den Verlustmodul G'' .

Den einfachsten Ansatz, mit dem sich ein viskoelastischer Körper beschreiben lässt, liefert das Voigt-Modell (Abb. 12.1). Bei diesem handelt es sich um eine parallele Anordnung einer Feder mit der Federkonstante k und eines dämpfenden Elements mit dem Reibungskoeffizienten β . Die elastische Kraft F_k und die Reibungskraft F_β addieren sich in diesem Modell zu der Gesamtkraft F . Die korrespondierenden Auslenkungen sind identisch: $x = x_k = x_\beta$. Aus diesen Bedingungen resultiert die Differentialgleichung:

$$F = kx + \beta \frac{\partial x}{\partial t}. \quad (12.5)$$

Die Lösung liefert den zeitlichen Verlauf der Deformation des viskoelastischen Körpers:

$$x(t) = \frac{F}{k} \left(1 - e^{-t/\tau}\right) \quad (12.6)$$

mit der Zeitkonstante τ , welche gegeben ist durch β/k .

12.2 Aktin und Aktinfilamente

Die gesamte Aktinfamilie besteht aus mehr als einem Dutzend Proteinklassen. Neben Aktin selbst, welches die Mikrofilamente bildet, existieren verschiedene Klassen sogenannter aktinverwandter Proteine (*actin-related proteins*, Arps). Deren Aminosäuresequenz ist zu etwa 50 % identisch mit der des gewöhnlichen

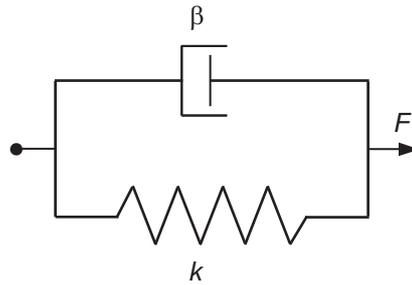


Abbildung 12.1: Durch das Voigt-Modell lässt sich das viskoelastische Verhalten eines Körpers beschreiben. Das Modell besteht aus einer parallelen Anordnung einer elastischen Feder mit der Federkonstante k und einem dämpfenden Element mit dem Reibungskoeffizienten β .

Aktins. G-Aktin, die Monomereinheit des Aktins, ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Es kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und ist das häufigste Protein in Eukaryoten: In Muskelzellen ist jedes zehnte Proteinmolekül ein Aktinmolekül, in anderen Zellen beträgt der Anteil 15 %. Die Struktur des Aktins weist eine Tasche auf, in welcher die Nukleotide Adenosintriphosphat (ATP) oder Adenosindiphosphat (ADP) und Mg^{2+} -Ionen anbinden können [Kab90]. Durch die Bindung der Nukleotide kann die Polymerisation und Depolymerisation reguliert werden (s.u.). Die polymerisierte, filamentöse Form des Aktin wird als F-Aktin bezeichnet. Die Struktur der Aktinfilamente konnte mit Hilfe einer Kombination aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen [Hol90] und der Röntgenstrukturanalyse von in Gelen eingebetteten Filamenten [Lor93] aufgeklärt werden. In einem Filament formen die Aktinmonomere eine linkshändige Helix mit einer Periode von 72 nm [Moo70]. Eine volle Periode wird aus 26 Untereinheiten gebildet, die insgesamt 12 vollständige Rotationen durchführen. Aufgrund dieser sehr hohen Drehung pro Monomer (166°) und der großen Kontaktfläche zwischen alternierenden Monomeren lässt sich ein Filament auch als rechts-händige Helix aus zwei Strängen, den Protofilamenten, beschreiben. Die Asymmetrie der Aktinmonomere überträgt sich auf die Aktinfilamente, die damit eine Polarität aufweisen. Die beiden Enden unterscheiden sich in struktureller Hinsicht. Daraus resultiert ein ebenfalls unterschiedliches dynamisches Polymerisationsverhalten: Das schneller wachsende Ende wird als Plus-Ende, das langsamer wachsende Ende als Minus-Ende bezeichnet. Die Polymerisation des Aktins verläuft in einem Zweischrittmechanismus [Oos62, Weg75] und beginnt mit dem relativ langsamen Prozess der Nukleation. In diesem wird ein Trimer aus G-Aktin gebildet, welches durch Mg^{2+} -Ionen stabilisiert wird. Daran anschließend erfolgt die schnelle Elongation des vorgebildeten Polymerisationskeims und damit die Ausbildung der Filamente. Es stellt sich schließlich ein Gleichgewichtszustand ein, in dem Polymerisations- und Depolymerisationsrate identisch sind. Um den Nukleationsprozess zu initiieren, ist eine kritische Monomerkonzentration erforderlich². ATP ist zur Polymerisation nicht zwingend notwendig. Aktin kann jedoch gebundenes ATP hydrolysieren. Dies geschieht

²Die kritische Konzentration entspricht der Gleichgewichtskonstante der Dissoziation und ist abhängig von dem an das monomere G-Aktin gebundene Nukleotid (Abb. 12.2).

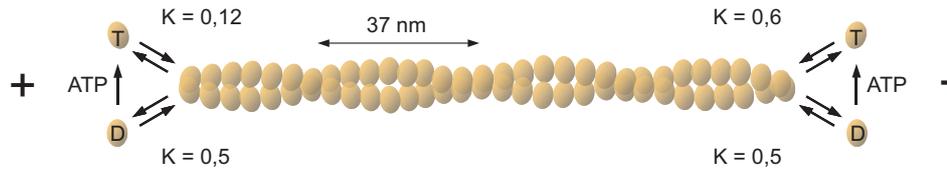


Abbildung 12.2: Struktureller Aufbau eines Aktinfilaments und Kinetik der Polymerisation. Die Abbildung zeigt die kritischen Konzentrationen K (μM) für die Dissoziation und Assoziation von Mg-ATP-Aktin (T) und Mg-ADP-Aktin (D) unter physiologischen Bedingungen. Die kritischen Konzentrationen an den beiden Enden des Filaments sind identisch für Mg-ADP-Aktin, aber unterschiedlich für Mg-ATP-Aktin. Begründet ist dieses Verhalten in der irreversiblen Hydrolyse des ATP nach dem Einbau in das Filament.

gewöhnlich nach dem Einbau eines ATP-Aktin-Komplexes in eine wachsende Polymerkette. Die ATPase-Aktivität gehört zu den ersten entdeckten biochemischen Eigenschaften des Aktins [Str50]. Die physiologische Bedeutung dieser Funktion, welche immerhin einen signifikanten Anteil an der gesamten zellulären ATPase-Aktivität ausmacht [Dan86], ist bislang nicht vollständig geklärt. Mit der Kopplung von ATP-Hydrolyse und Polymerisation sind die Voraussetzungen für eine mikroskopische Reversibilität nicht mehr gegeben. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Dissoziations- und Assoziationsraten an den beiden Enden eines Filaments unterschiedlich sein können. Das führt zu einer Gleichgewichtssituation, in der an einem Ende das Polymer verlängert wird, während es am anderen Ende abgebaut wird. Der Prozess wird als Tretmühlmechanismus bezeichnet [Weg76]. In diesem wird G-Aktin mit gebundenem ATP an das schneller wachsende Filamentende gebunden. Das ATP wird zu ADP und Phosphat (P_i) hydrolysiert. Das Phosphat wird schließlich in die Lösung abgegeben, so dass in dem Filament G-Aktin-Untereinheiten mit gebundenem ADP verbleiben. Da die ATP-Hydrolyse nicht fest mit der Monomeraddition gekoppelt ist, hängt das Verhältnis von im Filament gebundenem ATP, ADP- P_i und ADP von der Polymerisationsrate und ATPase-Rate ab [Kor87, Car89, Car94]. Am Ende des Filaments mit der geringen Affinität zur Polymerisation, dem Minusende, ist an die Aktinmonomere hauptsächlich ADP angebunden. Im Gleichgewicht entspricht die Depolymerisationsrate an diesem Ende der Polymerisationsrate am anderen Filamentende. Während des Tretmühlprozesses bleibt damit die Gesamtlänge des Polymers konstant. Es findet allerdings ein Fluss von Monomeren durch das Polymer statt. Die Rate dieses Prozesses liegt bei etwa $2 \mu\text{m h}^{-1}$.

12.3 Aktinassoziierte Proteine: Motorproteine

Die Vielzahl weiterer Proteine, welche mit dem Aktin assoziiert sind [Win05], können verschiedene Filamente miteinander verknüpfen, die Nukleation des Aktins initiieren und monomeres Aktin binden [Wel99, Paa04, Mat94]. Eine besondere Klasse bilden die verschiedenen Formen des Myosins. Bei diesen handelt es sich um Motorproteine, welche sich an Aktinfilamenten entlang bewegen [Gee05]. Die Interaktion zwischen Aktin und Myosin bildet die molekula-

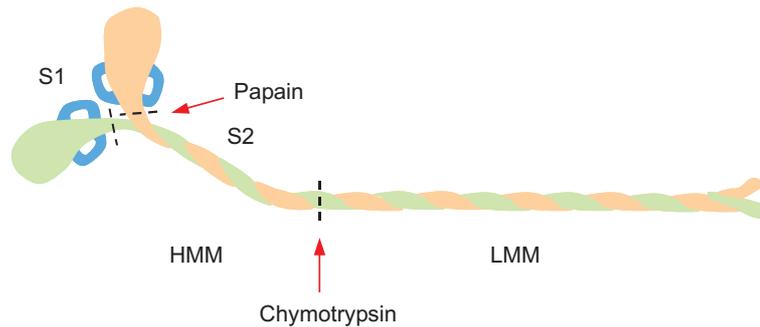


Abbildung 12.3: Myosin II besteht aus zwei schweren (grün und braun) und vier leichten Ketten (blau). Funktionell und strukturell lassen sich die schweren Ketten in drei Bereiche unterteilen: Den Kopfteil mit den Aktin- und ATP-Bindungsstellen, einem verbindenden regulatorischen Bereich mit den leichten Ketten und schließlich den Endbereich der *Supercoil*-Struktur. Die Protease Chymotrypsin spaltet Myosin II in das schwere Meromyosin (HMM) und das leichte Meromyosin (LMM). HMM kann wiederum durch Papain in die Untereinheiten S1 und S2 gespalten werden.

re Grundlage für die Muskelkontraktion, den intrazellulären Organelltransport und die Zellteilung. Bei dem ersten entdeckten Myosinmotor handelt es sich um Myosin II. Er kommt in hoher Konzentration im Muskelgewebe vor. In diesem bildet das Protein dicke Bündel aus, die im Zusammenspiel mit den dünneren F-Aktinbündeln für die Muskelkontraktion verantwortlich sind. Die Energie für diesen Prozess stammt dabei aus der Hydrolyse von ATP. Myosin II ist ein Dimer, das aus zwei schweren und vier leichten Ketten besteht (Abb. 12.3). Die beiden C-terminalen α -Helices der schweren Ketten sind umeinander gewunden und bilden so eine *Supercoil*-Struktur aus. Der Teil des Myosins, der sich durch Chymotrypsinbehandlung von dem übrigen Proteinteil abtrennen lässt [SG53], wird mit LMM (*light meromyosin*) bezeichnet. Der Kopfteil des Myosins trägt dementsprechend die Bezeichnung HMM (*heavy meromyosin*). Er enthält die Bindungsstelle für Aktin und ATP [Hux63]. Durch das Enzym Papain kann die HMM-Einheit weiter aufgespalten werden: Es resultieren die beiden Kopfreionen S1 und der verbindende Proteinrest S2 [Low69]. *In-vitro*-Experimente zeigten, dass der S1-Kopf allein in der Lage ist, Aktinfilamente fortzubewegen [Toy87]. Die katalytische Domäne zur ATP-Hydrolyse und die Aktinbindungsstelle sind damit beide in S1 lokalisiert.

12.4 Der Aktinkortex

Der Aktinkortex ist ein hoch-adaptives und reguliertes Polymernetzwerk aufgebaut aus Aktin und Arps. Als ein essentieller Bestandteil des Zytoskeletts bildet es eine entscheidende Schnittstelle zwischen mechanischen äußeren Reizen auf der einen und biochemischen regulativen Prozessen zur Anpassung der Zelleigenschaften auf der anderen Seite. Dieses Netzwerk aus quervernetzten Aktinfilamenten schützt die Zelle vor Deformationen, überträgt Kräfte und beschränkt die Diffusion von Organellen im Zellinnern [Pol02b]. Es spielt damit eine entscheidende Rolle in der Beweglichkeit der Zelle [Pol03], der Zelladhäsi-

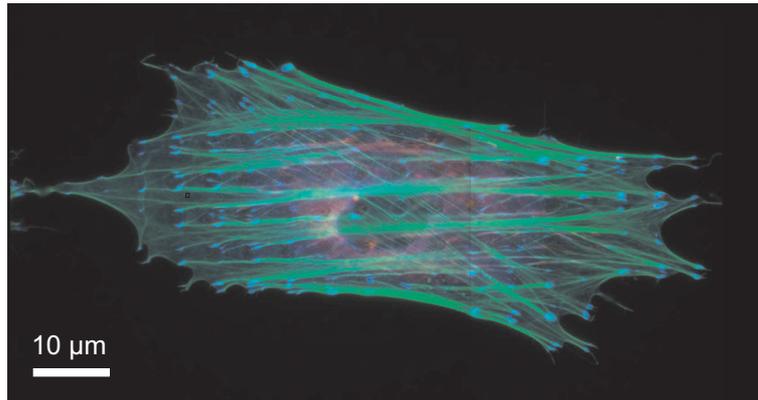


Abbildung 12.4: Fluoreszenzaufnahme eines adhärenzhaften Fibroblasten mit angefärbten Aktinfilamenten (grün). Deutlich erkennbar sind die ausgebildeten Aktinstressfasern. Die Adhäsion der Zelle erfolgte auf einer mikrostrukturierten Oberfläche (Abb. aus [Ulm05]).

on [Bal01] und Zellteilung [Pel02], der Endo- und Exozytose [Qua00] und dem intrazellulären Transport [Eva95].

Der Aktinkortex bildet eine dünne quasi zweidimensionale Schale unmittelbar unterhalb der Zellmembran. Die Dicke dieser Hülle reicht von einer Monolage von Aktinfilamenten in roten Blutkörperchen bis zu mehr als $1\ \mu\text{m}$ in amoeboiden Zellen [Pol02b]. Die strukturellen und viskoelastischen Eigenschaften des Netzwerks werden durch eine Vielzahl von aktinbindenden Proteinen reguliert [Kre99]. Das Aktinnetzwerk ist ein hochdynamisches Gebilde, das ständig Umformungen durch Auf-, Ab- und Umbau der Aktinfilamente erfährt. Diese können in einer sehr dichten netzartigen Struktur organisiert sein, aber auch beispielsweise während der Zelladhäsion bündelartige Stressfasern ausbilden (Abb. 12.4).

12.4.1 Untersuchungsmöglichkeiten

Studien der strukturellen Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der Pseudopodienausbildung³ [Svi99], der zentripetalen Kontraktion von Endothelzellen durch Entzündungssignale wie Thrombin [Gar95] oder der Bildung von Fokalkontakten zur Stabilisierung der Zelladhäsion [Gei02, Bal01] haben einen ersten Einblick in die Regulation des Aktinkortex durch biochemische Signale gegeben. Mikromechanische Untersuchungen der Zellmembran lieferten Informationen über eine Korrelation zwischen viskoelastischem Verhalten der Zelle und der Kortexstruktur [Bau99] und dessen Rolle in der Kraftgenerierung [Eva93]. Generell sind Untersuchungen der viskoelastischen Eigenschaften in einer lebenden Zelle mit großen Schwierigkeiten verbunden. Diese setzen Techniken voraus, mit denen sich lokale Informationen gewinnen lassen mit einer Auflösung in der Größenordnung eines Mikrometers [Jan04]. Eine Methode, die

³Pseudopodien (Scheinfüßchen) sind Plasmaausstülpungen von Zellen, welche der Fortbewegung und auch der Aufnahme von Nahrung dienen.

bereits vor über 80 Jahren entwickelt wurde [Fre22], besteht in der Beobachtung der Bewegung eines kleinen Objekts, welches in die Zelle eingebracht wird. Ist das Teilchen magnetisch, lässt es sich durch ein externes Magnetfeld bewegen und die resultierende Dehnung kann durch ein Mikroskop gemessen werden [Bau01]. Ebenso können optische Pinzetten zur Kraftübertragung genutzt werden und die Brownsche Bewegung des Objekts lässt sich zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Mikroumgebung auswerten [Lau03a]. Um die lokale Natur der Untersuchungstechnik unter Verwendung einer Mikroprobe hervorzuheben, wird diese auch als *Mikrorheologie* bezeichnet. Erweiterungen der Methode basieren auf der Verwendung mehrerer Mikrokugeln und nutzen die korrelierte thermische Bewegung benachbarter Partikel zur Informationsgewinnung [Cro00]. Mikrorheologische Untersuchungen von Zellen haben gezeigt, dass das Zytoplasma eine viskose Flüssigkeit ist, welche mit einem gelartigen Netzwerk durchzogen ist. Die Maschengröße ist relativ groß, Kügelchen mit einem Durchmesser von 50 nm können frei durch die Zelle diffundieren [Jon96]. Die Viskosität des Zytoplasma ist mit 10-100 mPa s bis zu 100 mal größer als die von reinem Wasser. Hierin spiegelt sich die hohe Proteinkonzentration in der Zelle wider [LP00]. Der Elastizitätsmodul des Aktinnetzwerks der Zelle besitzt Werte im Bereich von 100-1000 Pa [Sat96, Lau03b, Tri04]. Mit Hilfe solcher Messungen ist man nun in der Lage, ein erstes Profil der mechanischen Eigenschaften einer Zelle und insbesondere des Aktinzytoskeletts zu zeichnen. Interessante Effekte kamen dabei zum Vorschein: So entsprach die Fluktuation der Organellen innerhalb einer Zelle nicht den Bewegungen einer reinen Diffusion, die allein durch die thermische Bewegung bestimmt wird. Dies deutet darauf hin, dass die mechanischen Eigenschaften einer Zelle und ihr Antwortverhalten sich fundamental von den viskoelastischen Eigenschaften herkömmlicher Materialien im thermodynamischen Gleichgewicht unterscheidet [Lau03a].

Trotz der vielfältigen Informationen, welche aus den beschriebenen *In-vivo*-Studien gewonnen werden konnten, werden diese in ihren Möglichkeiten zur detaillierten Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der Funktionen des Aktinkortex durch die Komplexität des Systems und dessen Kopplung mit anderen Zellbestandteilen wie der Membran und dem Plasma eingeschränkt. Eine Strategie, dieses Problem zu lösen, besteht in der Verwendung von *In-vitro*-Modellen, deren Zusammensetzung und Komplexitätsgrad sich gezielt steuern und reduzieren lassen. Da Aktinfilamente *in vitro* Konturlängen von bis zu 30 μm besitzen, kann ihre Struktur und Bewegung nach Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Goldpartikels [Dic99] mikroskopisch betrachtet werden. Auf diese Weise lassen sich mechanische Eigenschaften eines einzelnen Filaments ermitteln [Git93, Gof02], aus denen Rückschlüsse auf die Eigenschaften komplexe Netzwerke gezogen werden können [Gar04b]. Ergänzend zu diesen Einzelfilamentsystemen (eindimensionale Aktinsysteme) lassen sich auch dreidimensionale Aktinnetzwerke *in vitro* erzeugen, rheologisch untersuchen und als Modell für den Aktinkortex heranziehen [Jan94, Shi04, Gar04a]. Diese Systeme eignen sich ebenfalls zur quantitativen Untersuchung der Auswirkungen aktiver Motorproteine auf die mechanischen Netzwerkeigenschaften [Hum02]. Eine weitere Strategie, die bei der Generierung von biologischen *In-vitro*-Systemen Anwendung findet, basiert auf der Nachahmung der natürlichen Vorbilder. Die-

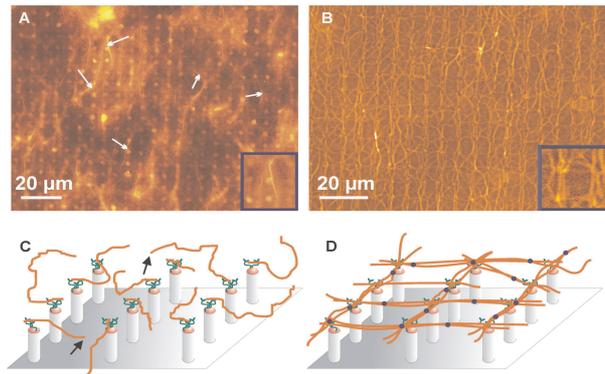


Abbildung 12.5: A) Fluoreszenzaufnahme von Aktinfilamenten, die auf den Köpfen von Siliziumsäulen angeordnet sind. Besonders deutlich zu erkennen sind die Filamente, die über mehrere Köpfe gespannt und damit in ihrer thermischen Fluktuation eingeschränkt sind (weisse Pfeile und vergrößerter Ausschnitt). B) Aufnahme des Netzwerks nach Zugabe des vernetzenden Proteins Filamin. Durch die zusätzlichen Querverbindungen wird der Bewegungsfreiheitsgrad der Filamente eingeschränkt, so dass diese sehr gut als definierte Stränge aufgelöst werden können. In Abbildung C) und D) sind die beiden oben beschriebenen Situationen nochmals in Form einer schematischen Zeichnung zur Verdeutlichung wiedergegeben (Abb. aus [Roo03]).

ser Ansatz wird als Biomimetik bezeichnet und bildet damit einen Gegenpol zur Reduktion und Vereinfachung, das erste Ziel der Verwendung von *In-vitro*-Systemen. Das Zusammenspiel beider Motive ermöglicht eine Vorgehensweise, die ein tieferes Verständnis der untersuchten Vorgänge erlaubt: Zu Beginn steht eine maximale Reduktion auf ein charakterisierbares System, dessen Komplexitätsgrad anschließend schrittweise erhöht wird, um dem natürlichen Vorbild näher zu kommen. Ein interessantes Beispiel für ein biomimetisches Modellsystem liefert das Studium des Bakteriums *Listeria monocytogenes*. Der Einzeller bewegt sich innerhalb seiner Wirtszelle, indem es Aktin an seiner Oberfläche polymerisiert [The92]. In Modellsystemen wurde die Wirtszelle durch Zellextrakt und das Bakterium durch Mikrokugeln ersetzt, an deren Oberfläche verschiedene Proteine gebunden waren [Cam99]. Dadurch ließen sich die entscheidenden Faktoren und Mechanismen des Bewegungsapparates von *Listeria monocytogenes* aufdecken. Im Falle der Untersuchung von Aktinkortexmodellen legt der biomimetische Ansatz die Verwendung von räumlich begrenzten Aktinnetzwerken als realistisches Modell des Aktinzytoskeletts nahe. Es ist zu erwarten, dass die geometrischen Randbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften und die durch die Aktinpolymerisation erzeugten Strukturen besitzen. Erste Experimente, in denen Aktinnetzwerke in begrenzten Geometrien untersucht wurden, bestätigen diese Annahmen. Als Modellsysteme für die Untersuchungen wurden Vesikel in der Größenordnung von $10\ \mu\text{m}$ verwendet, die eine Kontrolle des Polymerisationsvolumens erlauben [Hel01, Lim02]. Durch Einsatz photolithographischer Techniken erreichten Roos *et al.* eine entscheidende Weiterentwicklung der biomimetischen Modelle hinsichtlich der geometrischen Randbedingungen: Ihnen gelang die Konstruktion eines quasi zweidimensionalen Aktinnetzwerks, welches auf Mikrosäulen

fixiert ist [Roo03]. Dieses Netzwerk, das durch seine Struktur ein sehr realistisches Modell des äußerst dünnen schalenförmigen Aktinkortex darstellt, konnte durch Zugabe von quervernetzenden Proteinen weiter strukturiert werden (Abb. 12.5). Die quantitative Analyse der Filamentfluktuationen innerhalb des Netzwerks ebenso wie der Transport kleiner an Myosin V gebundener Partikel entlang der Filamente war möglich.

In-vitro-Aktinkortexmodelle

13.1 Oberflächenstrukturierung

Die gezielte Polymerisation quasi zweidimensionaler Aktinnetzwerke erfordert eine definierte chemische und topologische Strukturierung: Zum einen müssen chemische Signale vorhanden sein, die eine Reaktion wie die Aktinpolymerisation initiieren können, und zum anderen physische Randbedingungen, welche die chemisch eingeleitete Strukturbildung in festgelegte Geometrien lenkt.

Ausgehend von der Arbeit von Roos *et al.* [Roo03] sollte das Potential der HOT zur Mikrostrukturierung von Oberflächen untersucht werden. Die Mikrosäulen werden dabei durch präparierte Mikrokugeln ersetzt. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Oberflächen *in situ* während eines Experimentes zu verschiedenen Zeitpunkten modifiziert werden können. Dazu werden Kügelchen optisch gefangen und an die Oberfläche der Probenkammer gebracht, an der sie durch Ausnutzung elektrostatischer und unspezifischer Wechselwirkungen gebunden werden können. Darüber hinaus bietet die Technik die Möglichkeit, neben einer topologischen Strukturierung ebenfalls eine chemische Strukturierung zu erzielen, indem unterschiedlich behandelte Kügelchen verwendet werden. Der Gebrauch von Mikrokugeln mit verschiedenen Oberflächen ermöglicht damit die Erzeugung von Oberflächen mit komplexen chemischen Eigenschaften. Da die Mikrokugeln an die Oberflächen angebonden werden, stellt ein Austausch verschiedener Medien in diesem Ansatz kein Problem dar. Die dabei auftretenden Kräfte sind nicht ausreichend, um die fixierten Partikel wieder abzulösen.

13.1.1 Versuchsdurchführung

Um eine Oberflächenstrukturierung mit dem Ziel einer anschließenden gezielten Aktinpolymerisation mit Hilfe der HOT zu erreichen, muss das verwendete System mehrere Bedingungen erfüllen. Die Mikrokugeln, mit denen die Oberfläche strukturiert werden soll, müssen chemisch so modifiziert sein, dass auf ihren Oberflächen die Polymerisation und Anbindung von Aktinfilamenten erfolgen kann, ebenso müssen sie sich durch spezifische oder unspezifische Wechselwirkung mit der Zelloberfläche an diese anbinden lassen. Die Oberfläche selbst sollte darüber hinaus passivierende Eigenschaften bezüglich einer Aktinadsorption bzw. Proteinadsorption im Allgemeinen besitzen. Das Mikroflusssystem sollte in der Lage sein, verschiedene Substanzen und insbesondere ein Reservoir an

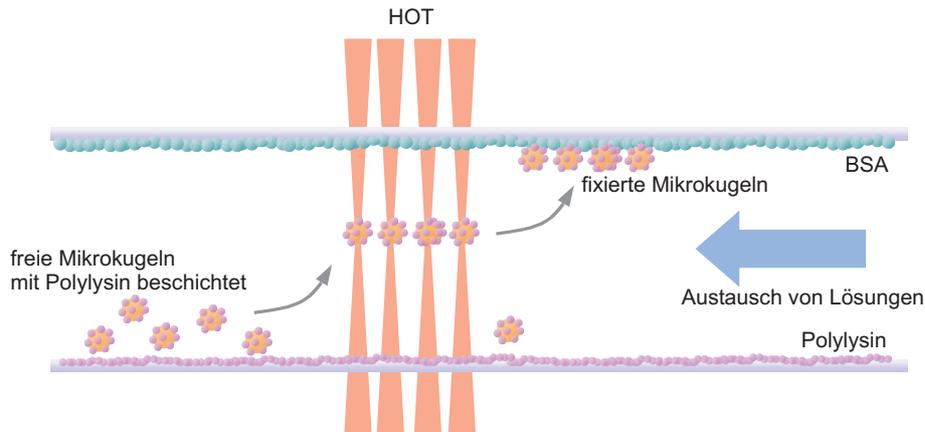


Abbildung 13.1: Schematische Darstellung der *In-situ*-Lithographie mit HOT zur topologischen und chemischen Strukturierung von Oberflächen. Der Boden der Zelle ist mit Polylysin beschichtet, um eine Anheftung der ebenfalls mit Polylysin beschichteten Mikrokugeln zu verhindern. Mittels HOT werden die Kolloide eingefangen, strukturiert und an die mit BSA beschichtete Flusszelldecke geheftet. Die negative Ladung der BSA-Schicht bewirkt eine dauerhafte Fixierung der Struktur durch elektrostatische Anziehung.

freien Mikrokugeln bereitzustellen. Zur Erfüllung der letztgenannten Voraussetzung wurde das in Kap. 11.3 vorgestellte Parallelflusszellensystem verwendet. Dieses stellt für jede verwendete Substanz einen separaten Kanal zur Verfügung. Zusätzlich wird ein Kanal mit Wasser befüllt, um die Zelle vor und nach Injektion einer Mikrokugelsuspension zu spülen. Auf diese Weise wird verhindert, dass sich die Suspension mit den Pufferlösungen durchmischt, wodurch ein unspezifisches Anbinden der Kügelchen an die Zelloberfläche vermieden wird. Um eine Nukleation der Aktinpolymerisation an den Kugeloberflächen zu erreichen, werden diese mit Polylysin beschichtet. Bereits 1979 konnten Brown *et al.* [Bro79] zeigen, dass auf solche Weise präparierte Partikel in der Lage sind, die Aktinpolymerisation zu initiieren und zu beschleunigen.¹ Durch die Beschichtung mit Polylysin besitzen die Mikrokugeln bei $\text{pH} = 7$ eine sehr hohe positive Oberflächenladung und würden daher sofort an die negativ geladenen Glasoberflächen und plasmabehandelten PDMS-Oberflächen binden. Um das zu verhindern, wird der kanalbildende Boden der Mikroflusszelle ebenfalls mit Polylysin inkubiert. Die elektrostatische Abstoßung verhindert dann das ungewünschte Festkleben der Kolloide an der Oberfläche.

Die Decke der Zelle wird mit Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin, BSA) beschichtet. Die Proteinlage erfüllt zwei Aufgaben: Zum einen besitzt BSA bei $\text{pH} = 7$ eine negative Nettoladung, so dass die positiv geladenen Mikrokugeln durch elektrostatische Wechselwirkung an der Decke der Flusszelle fixiert werden können. Zum anderen besitzt BSA proteinabweisende Eigenschaften.

¹Erstaunlicherweise bewirkt das Polylysin nicht nur die Ausbildung radial nach außen weisender Aktinfilamente auf der Kugeloberfläche. Darüber hinaus stellten Brown *et al.* durch elektronenmikroskopische Aufnahmen fest, dass sämtliche Filamente bezüglich ihrer Polarität die gleiche Orientierung relativ zur Kugeloberfläche aufweisen [Bro79].

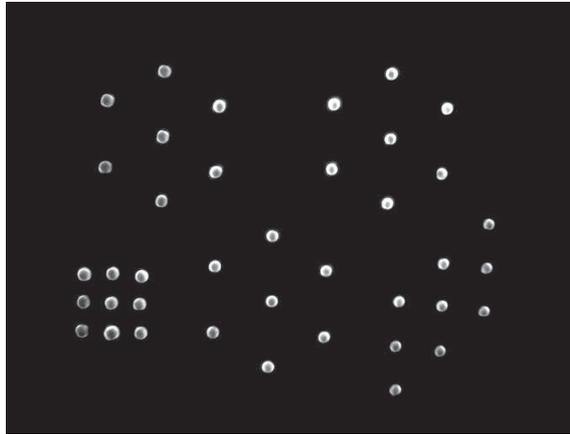


Abbildung 13.2: Drei verschiedene HOT-Anordnungen wurden zur sequentiellen Oberflächenstrukturierung in fünf Teilschritten eingesetzt. Jeweils ein hexagonales, ein orthogonales und ein geschertes Arrangement optischer Fallen wurden mit polylisinbeschichteten Kügelchen ($d = 2 \mu\text{m}$) befüllt. Anschließend wurden diese auf einer BSA-Oberfläche fixiert.

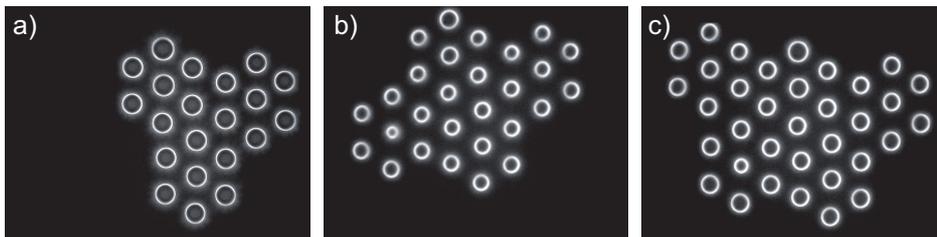


Abbildung 13.3: Eine hexagonal strukturierte Oberfläche lässt sich in sequentieller Weise durch Anheftung von jeweils sieben optisch gefangenen Mikrokugeln erzeugen. Die Fläche lässt sich beliebig erweitern.

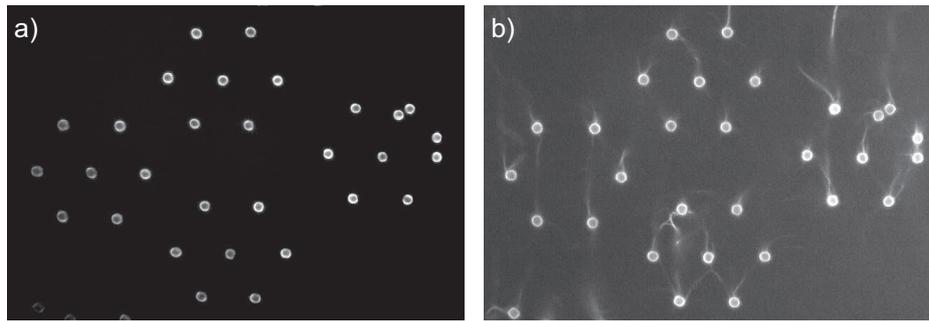


Abbildung 13.4: Vier hexagonale Anordnungen von polylysinbeschichteten Mikrokugeln wurden auf einer BSA-Oberfläche fixiert (a). Nach Inkubation mit G-Aktin-Lösung und Anfärbung sind deutlich Aktinfilamente zu erkennen, welche fest an die Mikrokugeln gebunden sind.

ten auf und verhindert somit die unspezifische Anbindung des Aktins [McG00]. Die Vorgehensweise zur Strukturierung der Zelloberfläche mit biofunktionalisierten Mikrokugeln ist schematisch in Abb. 13.1 zusammengefasst. Über einen der zuführenden Kanäle werden die beschichteten Partikel in die Zelle eingebracht. Aufgrund ihrer spezifischen Dichte ($\rho = 1,01 \text{ g ml}^{-1}$) sedimentieren diese innerhalb weniger Minuten und bilden am Boden der Flusszelle ein Reservoir frei beweglicher Kügelchen. Die elektrostatische Abstoßung verhindert eine Anbindung an den Zellboden. HOTS können nun dazu genutzt werden, eine Vielzahl von Kügelchen optisch einzufangen, in einem bestimmten Muster anzuordnen und an die Decke der Zelle zu bewegen. Aufgrund elektrostatischer Anziehung zwischen den positiv geladenen Kügelchen und der negativ geladenen Proteinschicht der Decke kommt es zum Anbinden der Kolloide [Hoo02]. Die durch die HOTS vorgegebene Struktur ist damit auf die Glasoberfläche übertragen worden. Der Vorgang lässt sich beliebig oft wiederholen. Dadurch lassen sich auch größere Flächen in kurzer Zeit strukturieren. Diese sequentielle Vorgehensweise ist in vielen Fällen einer einstufigen Strukturierung durch HOTS vorzuziehen. Zwar ist es möglich, eine extrem große Zahl optischer Fallen durch die HOTS-Technologie zu erzeugen, jedoch muss bedacht werden, dass die zur Verfügung stehende Laserleistung auf sämtliche optische Fallen verteilt wird. Die resultierenden Federkonstanten und damit die Stabilität der Fallen sinken. Dies erschwert das Befüllen. Effizienter ist daher oft die Zerlegung des Zielmusters in Untereinheiten, die nacheinander erzeugt werden (Abb. 13.3). Auch die Kombination verschiedener Muster ist möglich. Abb. 13.2 zeigt die sequentielle Oberflächenstrukturierung mit fünf verschiedenen HOTS-Mustern. Sind die Mikrokugeln an der beschichteten Glasoberfläche fixiert, lassen sie sich nicht mehr durch optische Pinzetten entfernen. Auch einem höheren Fluss von mehreren $100 \mu\text{l s}^{-1}$ halten die Strukturen stand.

Zur Erzeugung von Aktinnetzwerken werden nach der Anheftung der Mikrokugeln an die Zelloberfläche die überschüssigen Kügelchen durch Spülen der Flusszelle mit Wasser entfernt. Daraufhin wird eine frisch bereitete G-Aktin-Lösung ($1,25 \mu\text{M}$ in F-Puffer) injiziert und für 20 min inkubiert. Die geringe G-Aktin-Konzentration bewirkt eine relativ langsame Neubildung von Fila-

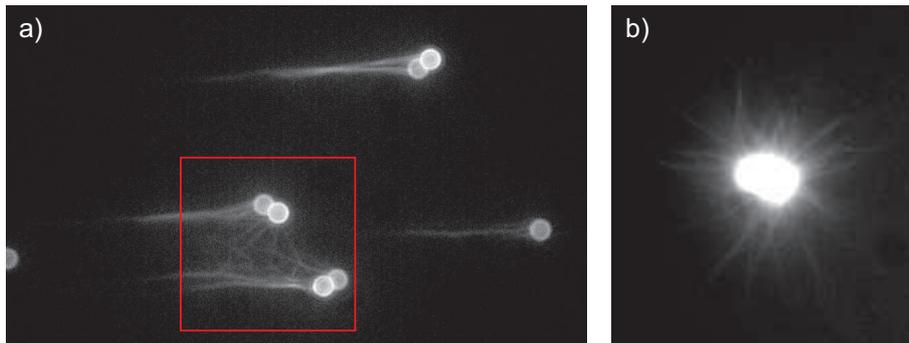


Abbildung 13.5: Fluoreszenzaufnahme von Aktinfilamenten, deren Polymerisation durch auf Polystyrokügelchen (Durchmesser $2\ \mu\text{m}$) angebundenem Polylysin induziert wurde. Die Mikrokugeln sind auf einer BSA-beschichteten Oberfläche fixiert. In a) sind die Filamente im Flüssigkeitsstrom in Bündeln ausgerichtet. Der rot markierte Ausschnitt zeigt die Ausbildung einer Netzwerkstruktur zwischen benachbarten Mikrokugeln. Abbildung b) zeigt die sternförmige Polymerisation der Aktinfilamente auf den Kugeloberflächen.

menten in Lösung. Polylysin beschleunigt den Nukleationsprozess, den ersten Schritt der Aktinpolymerisation, und initiiert so die Bildung von Aktinfilamenten auf den Mikrokugeloberflächen. Anschließend wird die Zelle mit einer Phalloidin-TRITC-Lösung ($1,25\ \mu\text{M}$ in A^+ -Puffer) gespült und 10 min inkubiert. Phalloidin² bindet spezifisch an die Aktinfilamente und verhindert deren Depolymerisation. Durch Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC wird gleichzeitig ein Marker in das System eingebracht, der eine lichtmikroskopische Visualisierung der Aktinpolymere erlaubt. Vor der mikroskopischen Betrachtung der Probe wird überschüssiger Farbstoff durch Spülen mit A^+ -Puffer aus der Zelle entfernt.

In Abb. 13.4 ist das Ergebnis eines nach dem beschriebenen Verfahren erzeugten Systems zu sehen. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt deutlich erkennbar Aktinfilamente, die an den Mikrokugeln fixiert sind. Einige von ihnen ragen in die Flüssigkeit hinein, andere sind über mehrere Kügelchen gespannt. Auf der BSA-beschichteten Zelloberfläche befinden sich keine Aktinfilamente. Eine Vergrößerung (Abb. 13.5) zeigt, dass auch die Filamente nur an den Mikrokugeln verankert sind. Der zwischen diesen liegende Teil des Filaments kann weiterhin frei fluktuieren und heftet sich nicht an die Oberfläche (Abb. 13.6).

13.2 Sensorische Oberflächen

Die vorgestellte *In-situ*-Lithographie durch HOT stellt einen vielversprechenden Zugang zur flexiblen Mikrostrukturierung von Oberflächen dar. Insbesondere in Verbindung mit speziellen Mikrofluidiksystemen sind komplexere Anordnungen realisierbar, die auch eine chemische Strukturierung erlauben. Trotz der vielen

²Phalloidin ist eines der Gifte des Knollenblätterpilzes. Die Giftwirkung besteht in der Inhibition der Depolymerisation zellulärer Aktinfilamente. Dies behindert die Zellmotilität und zerstört die Dynamik des Zytoskeletts.

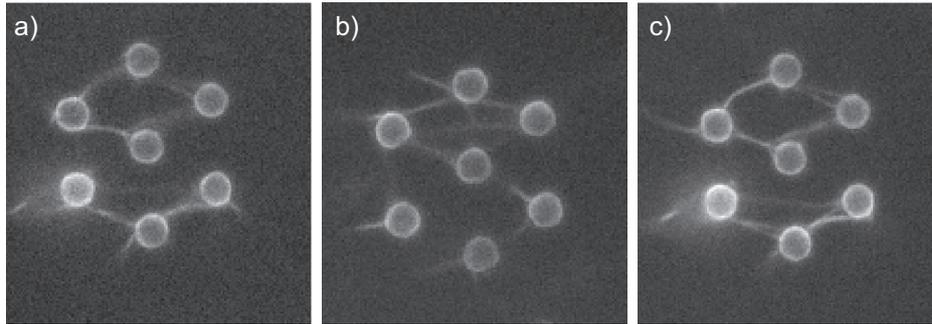


Abbildung 13.6: Fluoreszenzaufnahme eines Aktinnetzwerks auf einer hexagonalen fixierten Mikrokugelstruktur. Die thermische Bewegung der einzelnen Filamente ist in der Zeitserie deutlich zu erkennen.

Vorteile einer stabilen Fixierung der Strukturen hinsichtlich ihrer Handhabung, so ermöglicht das robuste System einen problemlosen Austausch von Flüssigkeiten ohne die Strukturierung zu zerstören, bleibt ein Nachteil, der in ihrer Stabilität begründet ist. Die ausgebildeten Strukturen sind starr und lassen sich durch optische Pinzetten nicht mehr verändern. Ein Einsatz als Kraftsensor zur Messung der mechanischen Eigenschaften eines Proteinnetzwerks ist damit nicht möglich. In diesem Abschnitt soll daher eine Erweiterung der Oberflächenstrukturierung vorgestellt werden, die zum einen weiterhin die Vorteile eines fixierten Systems besitzt und zum anderen flexiblere Strukturen liefert, die einen gewissen Freiheitsgrad in ihrer Bewegung aufweisen. Dazu wird ein Ansatz von Ladam *et al.* aufgegriffen [Lad03]. Diese erzeugten viskoelastische Hydrogele auf Glasoberflächen und charakterisierten deren mechanische Eigenschaften. Die Federkonstanten der 200 - 2000 μm dicken Gele lagen in der Größenordnung von einigen $\text{pN } \mu\text{m}^{-1}$. Das entspricht dem Bereich der mit optischen Pinzetten zugänglich ist. Ebenso liegen die Kräfte der Protein-Protein-Wechselwirkung in diesem Bereich. Die elastischen Oberflächen stellen damit ein interessantes System zur Charakterisierung der biomimetischen *In-vitro*-Systeme dar. Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie dieses System mit der Mikrofluidik und HOT-Technik kombiniert wurde, um kraftsensorische Mikrooberflächen zu realisieren.

13.2.1 Hyaluronsäuregele

Die Hydrogele werden aus dem Polysaccharid Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) gebildet. Das hoch negativ geladene Polymer zählt zur Gruppe der Glycosaminoglycane (GAG) und ist aus der Disaccharid-Einheit D-N-Acetyl-Glucosamin- β -D-Glucuronsäure aufgebaut (Abb. 13.7). HA finden sich als Hauptbestandteil in verschiedenen Geweben wieder. Beispiele hierfür sind die Haut, wo sie als Matrix für die Zellen dient. Aufgrund der besonderen viskoelastischen Eigenschaften ist sie Hauptbestandteil der Gelenkflüssigkeit und wirkt als Schmiermittel bei allen Gelenkbewegungen. Schließlich wirkt HA als Regulator während der Zelladhäsion [Sac02, Zim02] und spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Embryonalentwicklung, indem es als Puffer zwischen den

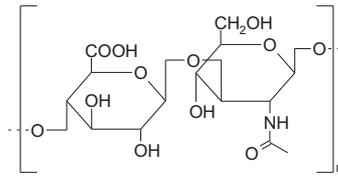


Abbildung 13.7: Dissaccharid-Grundeinheit der Hyaluronsäure.

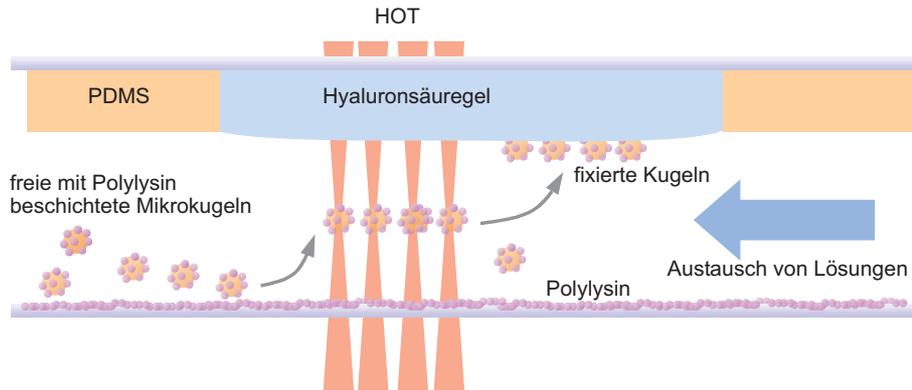


Abbildung 13.8: Schematische Darstellung der Oberflächenstrukturierung von Mikrogelkissen zur Erzeugung kraftsensorischer Elemente.

Bindegewebszellen wirkt [Too92]. Neben der biologischen Bedeutung, welche der HA zukommt, ist diese ein interessantes Objekt zur Untersuchung physikochemischer Eigenschaften von Lösungen und Netzwerken aus Polyelektrolyten. HA ist ein riesiges Polymer mit einem Molekulargewicht von bis zu 4 MDa. Dies entspricht 10^4 Wiederholungseinheiten und einer Konturlänge von etwa $10 \mu\text{m}$. Bei neutralem pH ist die HA deprotoniert und besitzt eine Ladungsdichte von etwa $1 e \text{ nm}^{-1}$.

13.2.2 Herstellung der Geloberflächen

Die Vernetzung und Anbindung der Hyaluronsäure an die Glasoberfläche der Mikrofluidikzelle entspricht weitgehend dem Protokoll von Ladam *et al.* [Lad03], wurde jedoch in einem entscheidenden Punkt erweitert, um extrem dünne Gelschichten bestimmter Geometrie zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden Gussformen aus PDMS hergestellt, welche Aussparungen besitzen, die mit dem Gel befüllt werden können. Bei dieser Herstellungsmethode lässt sich die Höhe des Gels durch die Höhe der PDMS-Wände bestimmen. Gelschichten mit einer Dicke von $30 \mu\text{m}$ sind auf diese Weise zugänglich und können mit der oben vorgestellten Mikrofluidiktechnik kombiniert werden. Der schematische Aufbau einer solchen Zelle ist in Abb. 13.8 dargestellt. Nach Herstellung der PDMS-Gussformen, der späteren Decke der Flusszelle, wird die Glasoberfläche mit einer alkalischen Lösung aktiviert. Auf diese Weise werden an der Glasoberfläche aktive Si-OH-Gruppen erzeugt, welche mit dem [*N*-(6-Amino-hexyl)-aminopropyl]-trimethoxysilan (AHAPTMS) umgesetzt werden können. Nach

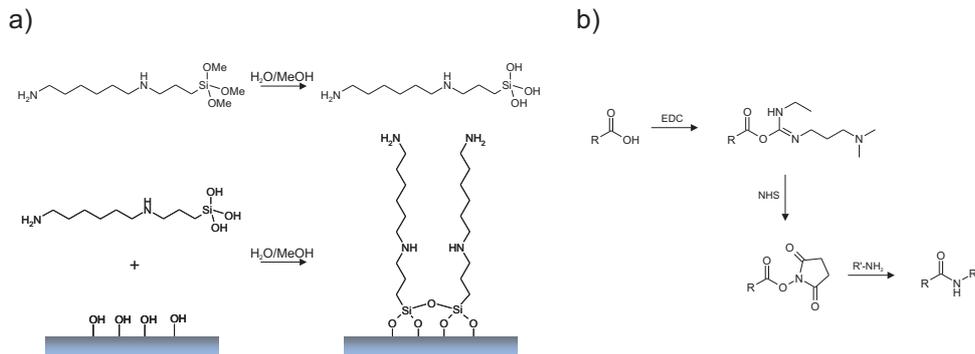


Abbildung 13.9: In (a) ist der Prozess der Aminosilylierung von aktivierten Glasoberflächen dargestellt. Abb. (b) zeigt die Aktivierung einer Säure zur anschließenden Reaktion mit Aminogruppen. Auf diese Weise lässt sich Hyaluronsäure an Glassubstrate anbinden und vernetzen.

erfolgreicher Reaktion trägt die Glasoberfläche freie Aminogruppen, die zur kovalenten Anbindung der Hyaluronsäure genutzt werden. Die Carboxylfunktion des Polysaccharids wird mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethyl-carbodiimidhydrochlorid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert (Abb. 13.9). Durch Reaktion mit den Aminogruppen der Glasoberfläche und den Aminogruppen der Hyaluronsäure kommt es zur Anbindung und Vernetzung des Polysaccharids. Nach Hinzufügen des Bodens der Flusszelle mit zusätzlichen Kanälen ist das System einsatzbereit und steht für die Experimente zur Verfügung.

Die Strukturierung der Geloberflächen erfolgt analog zu der in Kap. 13.1 beschriebenen Dekorierung von Glasoberflächen. Aufgrund der negativen Ladung der Hyaluronsäure bei pH = 7 eignen sich auch in diesem Fall mit Polylysin beschichtete Mikrokugeln zur Anheftung. Die elektrostatische Anziehung fixiert die Kugeln auf dem Gel, so dass sie sich nicht mehr durch die optischen Pinzetten entfernen lassen.

13.2.3 Charakterisierung der Geloberflächen

Die Anbindung der Mikrokugeln an die Geloberflächen und das auf diese Weise gebildete flexible System wurde durch Analyse der thermischen Bewegung und mittels Kraftexperimenten unter Anwendung der HOT näher untersucht. Zur Auslenkung einer fixierten Mikrokugel wurde unter Anwendung des in Kap. 7 beschriebenen Verfahrens eine Hologrammserie generiert, welche den Laserfokus in 40 nm-Schritten bis zu einer maximalen Auslenkung von 8 μm verschiebt. Die optische Pinzette wird auf der Mikrokugel positioniert, so dass diese stabil gefangen wird. Erkennbar ist dies an einer Abnahme der Amplitude der thermischen Bewegung. Wird nun der Fokus verschoben, so folgt die Kugel der Pinzette bis zu dem Punkt, an dem die optische Kraft die rückstellende Kraft des Gelkissens nicht mehr kompensieren kann (Abb. 13.10). Die Mikrokugel verlässt die sich weiter bewegende optische Falle und kehrt zur Ausgangsposition zurück. Eine mehrmalige Wiederholung der Auslenkung führt jeweils zu identischen Resultaten: Die maximale Auslenkung und die Ausgangs- oder Ru-

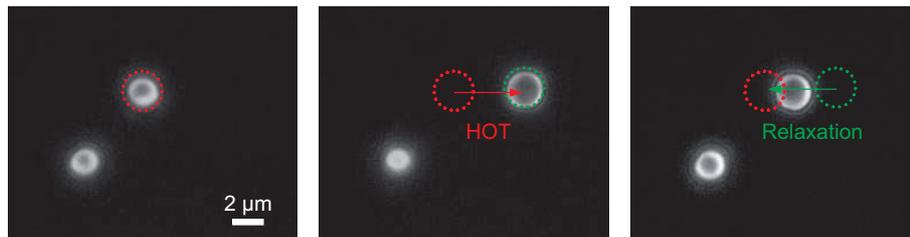


Abbildung 13.10: Zwei polylysinbeschichtete Mikrokugeln sind auf einem Hyaluronsäuregel fixiert (a). Durch HOT wird eine der beiden Kugeln aus ihrer Ruhelage (grün) ausgelenkt (b). Bei einer maximalen Auslenkung von $5,3 \mu\text{m}$ (rot) verlässt die Kugel die optische Falle und relaxiert in ihre Ausgangsposition.

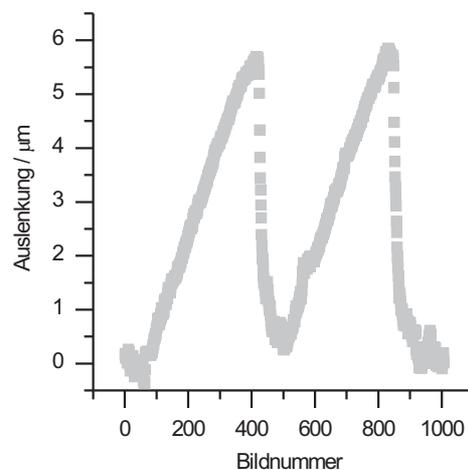


Abbildung 13.11: Mehrmalige Auslenkung einer auf einem HA-Gel fixierten Mikrokugel. Die Kugel wird durch eine optische Pinzette ausgelenkt und kehrt anschließend wieder in ihre Ausgangsposition zurück.

heposition des Kügelchen ändern sich nicht (Abb. 13.11). Dies zeigt, dass die Partikel fest an die Geloberfläche angebunden sind und durch eine elastische Deformation des Gels bewegt werden können. Die rückstellenden Kräfte lassen sich durch Federkonstanten charakterisieren, welche in der gleichen Größenordnung liegen wie diejenigen der optischen Pinzetten ($\text{pN}/\mu\text{m}$).

Das Relaxationsverhalten der Mikrokugel kann zur Gewinnung der viskoelastischen Eigenschaften des Hyaluronsäuregels herangezogen werden. Unter der Annahme, dass sich dieses wie ein Voigt-System verhält, wird die Bewegung des Teilchens nach Auslenkung und Verlassen der optischen Falle durch Gl. 12.6 beschrieben. Die Kraft F entspricht in dem hier beschriebenen Verfahren der maximalen Kraft bei gegebener Laserleistung, welche sich durch die optische Pinzette auf ein gefangenes Teilchen ausüben lässt. Bestimmen lässt sich diese in einem Stokeschen Kalibrierungsansatz (Kap. 5.1) durch Ermittlung der maximalen Auslenkungsgeschwindigkeit. Exemplarisch ist eine solche Analyse in Abb. 13.12 dargestellt. Die Verwendung einer optischen Pinzette mit einer maximalen ausübenden Kraft von $15,7 \text{ pN}$ führt zu einer Auslenkung

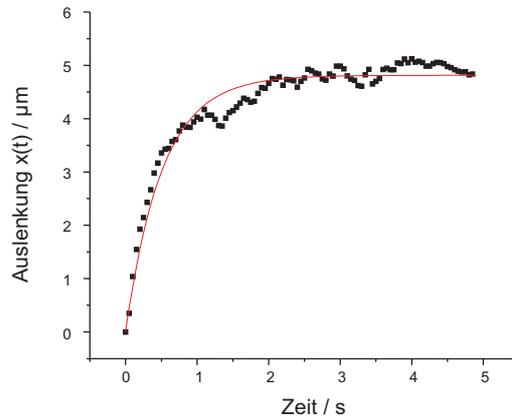


Abbildung 13.12: Relaxation einer auf einem HA-Gel fixierten Mikrokugel, nach Auslenkung durch eine optische Pinzette. Die Kugel kehrt in ihre Ausgangslage zurück und beschreibt einen Verlauf, welcher durch das Voigt-Modell angenähert werden kann (rot).

der Mikrokugel um $5,3 \mu\text{m}$. Durch Angleichen der Funktion aus Gl. 12.6 an die experimentell ermittelte Orts-Zeitkurve können die Federkonstante k und der Reibungskoeffizient β bestimmt werden. Die thermische Bewegung der Partikel lässt sich ebenfalls nutzen, um Informationen über die elastischen Eigenschaften des Systems zu gewinnen. Dieses Vorgehen entspricht im Wesentlichen der Kalibrierung einer optischen Pinzette durch die Auswertung der thermischen Fluktuationen. Auf diese Weise lässt sich k bestimmen, welches das Potential der optischen Falle bzw. des Systems aus Gel und Mikrokugel beschreibt. Die ermittelten Federkonstanten besitzen im Mittel einen Wert von $1 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, zeigen allerdings eine große Streuung, die Standardabweichung beträgt $0,5 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$. Die mit Mikrokugeln strukturierte Geloberfläche stellt sich somit als sehr inhomogen dar. Dies ist verständlich, bedenkt man die ungeordnete Struktur des Polymernetzwerks und die nicht-planare Oberfläche des Gekissens. Vereinzelt können Polymerstränge weiter in die Lösung hineinragen und auf diese Weise durch Anbinden an die Mikrokugeln diese stärker fixieren. Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass die mit Kolloiden strukturierten Gele mikroskopisch betrachtet keine auffälligen Oberflächenhöhenunterschiede aufweisen. Sämtliche Mikrokugeln befinden sich mit einer Abweichung von weniger als $1 \mu\text{m}$ in der gleichen Ebene.

Zur Anwendung als quantitative Kraftsensoren sind die Strukturen damit prinzipiell geeignet. Kräfte in der Größenordnungen von 1 pN lassen sich detektieren. Allerdings muss die zur exakten Erfassung der wirkenden Kräfte jeder Kraftsensor einzeln kalibriert werden, bedingt durch die Inhomogenität des Systems. Die vorgestellte Herstellungsmethode unter Verwendung von PDMS-Formen bietet einen Zugang zu sehr dünnen Mikrogelkissen, die sich in das Mikrolabor integrieren lassen. Die Schichtdicken im Bereich von $30 \mu\text{m}$ sind wesentlich geringer als die von Ladam *et al.* in ihrem makroskopischen Ansatz hergestellten Substrate. Die HA-Gele bilden nicht nur ein viskoelastisches System mit einem äußerst geringen Elastizitätsmodul, sondern stellen gleichzeitig ein bioanalogenes Substrat dar, das der Oberfläche von Geweben ähnelt.

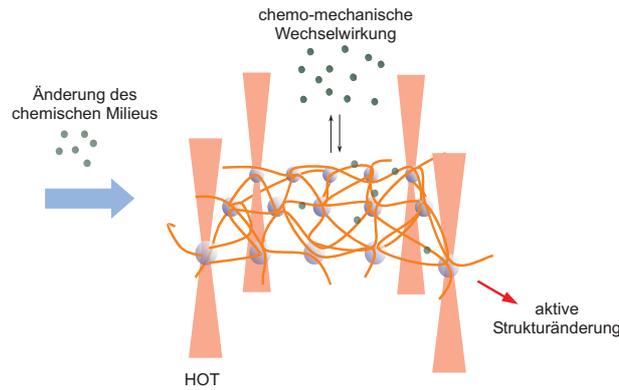


Abbildung 13.13: Schematische Darstellung eines optisch fixierten flexiblen Aktinnetzwerks. Durch HOT werden Mikrokugeln strukturiert. Diese bilden ein Gerüst, das zur Generierung eines quasi zweidimensionalen Aktinnetzwerks genutzt werden kann. Eine anschließende Manipulation durch Bewegen der einzelnen optischen Fallen ist möglich. Auf diese Weise lassen sich gezielt Kräfte übertragen und quantitativ bestimmen. Durch einen Austausch der umgebenden Flüssigkeiten lassen sich Interaktionen mit anderen chemischen Faktoren realisieren und deren Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften untersuchen.

13.3 Freies Aktinnetzwerk

Trotz der vielfältigen und flexiblen Einsatzmöglichkeiten der oben beschriebenen chemischen Mikrostrukturierung nutzt diese nicht das gesamte Spektrum der Möglichkeiten der HOT aus. Manipulationen der Strukturen und Kraftmessungen sind aufgrund der Fixierung der Kügelchen auf einen begrenzten Bereich eingeschränkt. Die sensorischen Oberflächen lassen sich zwar zur Kraftmessung einsetzen, eine weitreichende Veränderung der strukturellen Anordnung der Partikel ist jedoch ebenfalls nicht realisierbar. Der größtmögliche Grad an Flexibilität ließe sich durch ein System erreichen, welches keinerlei Fixierung der Objekte an einer Oberfläche aufweist. Im Falle eines biomimetischen Aktinnetzwerks entspricht dies einer Anordnung von Mikrokugeln, welche allein durch HOT in einer Lösung an ihren jeweiligen Positionen fixiert sind (Abb. 13.13). Zwischen ihnen lassen sich Aktinfilamente aufspannen, die auf diese Weise ein Modellsystem des zweidimensionalen Aktinkortex ausbilden. Die hohe Flexibilität des Systems würde dann eine weitergehende aktive Manipulation ermöglichen. Durch Veränderung der Mikrokugeln lassen sich gezielt Deformationen erzeugen und Kräfte übertragen, die sich gleichzeitig durch die Auslenkung der benachbarten Kugeln quantitativ erfassen lassen. Ein Flüssigkeitsaustausch sollte darüber hinaus einen Zugang zu dem Einfluss verschiedener chemischer Signale auf die mechanischen Eigenschaften des Modells ermöglichen.

Die notwendigen Voraussetzungen, welche an den apparativen Aufbau und die eingesetzten Techniken zu stellen sind, um ein solches Modellsystem zu generieren, sind nicht zu unterschätzen. Die zahlreichen Experimentierschritte, wie Strukturierung der Mikrokugeln, wiederholte Änderung des chemischen Milieus und Manipulation der Struktur, stellen höchste Ansprüche an die Stabilität und Reproduzierbarkeit der verwendeten Methoden. Abschließend soll

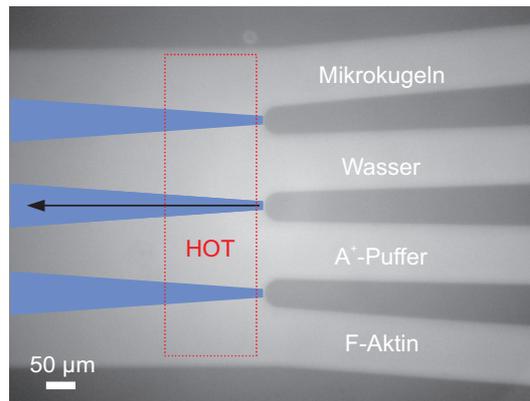


Abbildung 13.14: Befüllungsschema der Parallelflusszelle zur Erzeugung eines freien Aktinnetzwerks. Die blauen Areale kennzeichnen den Bereich der Durchmischung benachbarter Flüssigkeiten aufgrund von Diffusion. Rot gekennzeichnet ist der Arbeitsbereich der HOT.

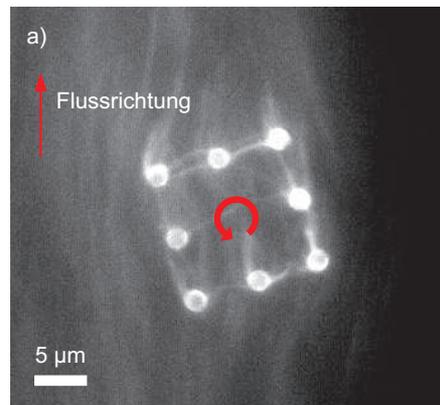


Abbildung 13.15: Bildung eines Aktinnetzwerks durch Anwendung der Parallelflusszelle. Mit NEMHMM beschichtete Mikrokugeln werden in einem Strom von Aktinfilamenten platziert. Durch Rotation des Kugelgerüsts werden Filamente zwischen den Kolloiden in sämtlichen Richtungen ausgerichtet und angebunden.

daher das in dieser Arbeit entwickelte Mikrolabor an dieser Aufgabenstellung getestet werden.

13.3.1 Versuchsdurchführung

Die Parallelflusszelle wurde genutzt, um ein freies optisch gefangenes Aktinnetzwerk zu erzeugen (Abb. 13.14). Dazu wurden die vier Kanäle mit einer Suspension von mit NEMHMM beschichteten Mikrokugeln, reinem Wasser, einer Pufferlösung und fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten gefüllt. Um die einzelnen Flüssigkeitszonen vor einer Durchmischung durch Diffusion zu schützen, wird ein konstanter Flüssigkeitsfluss von etwa $40 \mu\text{l s}^{-1}$ in allen Kanälen eingestellt. Der Wasserkanal trennt die Kügelchen vollständig von den salzhaltigen Puffersystemen. Ein Anbinden der Mikrokugeln an die Zelloberfläche wird auf

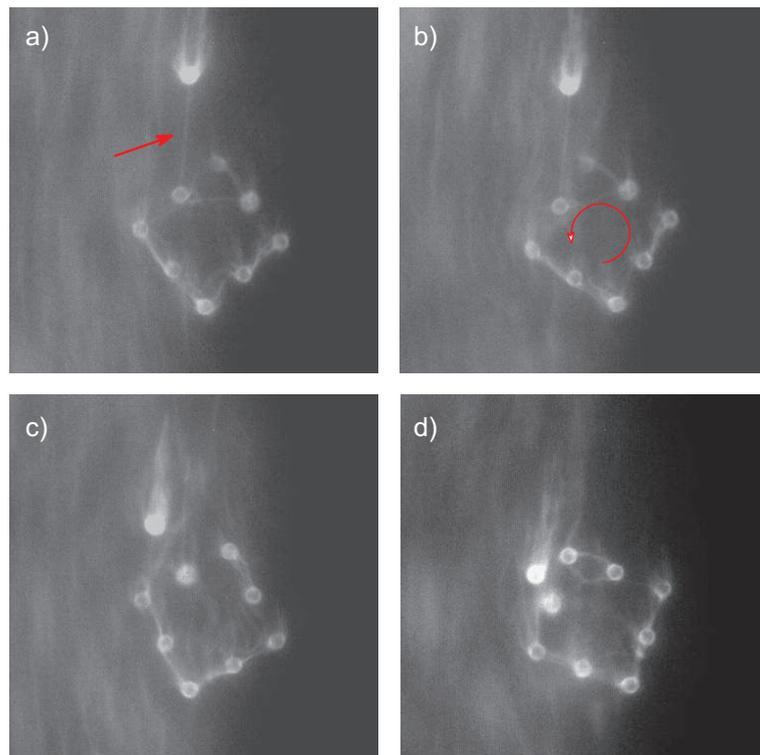


Abbildung 13.16: Die Bildserie zeigt die Bildung eines Aktinnetzwerks mit Hilfe des parallelen Mikroflusssystems. Eine optisch gefangene Anordnung von 8 Kügelchen wird in einem konstanten Strom von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten platziert. Die Anbindung dieser Filamente wird durch ein kontinuierliches Drehen des Netzwerks erleichtert. Dabei wird eine freie Mikrokugel, welche durch ein Aktinfilament mit dem Netzwerk verbunden ist, aufgewickelt und in dieses hineingezogen.

diese Weise verhindert. Mit den HOT werden im ersten Kanal 8 Kugeln eingefangen und in einem Quadrat angeordnet. Dieses wird durch den Wasser- und Pufferbereich bewegt und in den F-Aktin-Strom gebracht. Sobald die Filamente auf die Kugeln treffen, können diese durch das NEMHHM auf den Kolloiden fixiert werden. Nach einigen Minuten bildet sich auf diese Weise ein Bündel vieler Aktinfilamente an den einzelnen Kugeln aus, die im Flüssigkeitsstrom ausgerichtet sind. Um eine Verteilung auch zwischen den Kugeln in sämtlichen Richtungen zu erreichen und damit die Generierung eines Netzwerks, werden die Möglichkeiten der dynamischen HOT genutzt, um das gesamte Kolloidensemble zu rotieren (Abb. 13.15). In Kombination mit dem konstanten Flüssigkeitsstrom wird dadurch eine homogene Verteilung der Filamente in allen Richtungen zwischen den Mikrokugeln des optisch fixierten Gerüsts gewährleistet.

Eine quadratische Anordnung von acht Mikrokugeln ($2\ \mu\text{m}$ Durchmesser) wurde optisch eingefangen und in den konstanten Fluss von Aktinfilamenten eingebracht. Die Polymere wurden an die Kugeln gebunden und im Flüssigkeitsstrom ausgerichtet. Eine Rotation des kolloidalen Netzwerks durch Rotation des Hologramms ermöglichte eine Verteilung der Filamente in verschiedene Richtung innerhalb der Netzwerkebene (Abb. 13.16).

13.4 Ausblick: Einzelzelluntersuchungen

Zum Abschluss soll ein Ausblick hinsichtlich der Möglichkeiten des Mikrolabors auf ein neues Anwendungsgebiet gegeben werden, den Einsatz der vorgestellten Mikroplattform für Einzelzellexperimente. Zellen stellen die fundamentale strukturelle und funktionelle Grundlage des Lebens dar. Eine Untersuchung der vielfältigen biochemischen Bausteine und Stoffwechselfvorgänge auf zellulärer Ebene ist somit essentiell für das Verständnis der komplexen physiologischen und pathologischen Vorgänge jedes Organismus. Gewöhnlich werden solche Informationen aus der Analyse einer großen Zellpopulation von mehreren tausend Zellen gewonnen. Die Daten reflektieren somit einen über das gesamte Zellensemble gemittelten Parameter. Diese Ergebnisse können irreführend sein. Immer mehr biologische Prozesse werden aufgedeckt, in denen das individuelle Verhalten der einzelnen Zellen nicht durch das mittlere Verhalten einer Vielzahl von Zellen beschrieben werden kann [Lid03]. Ein Beispiel hierfür stellt die Kontrolle des Lactose- und Arabinose-Promotors in *Escherichia coli* dar. Bei dieser Funktion handelt es sich um ein binäres System, das lediglich die zwei Zustände „ein“ und „aus“ annehmen kann. Eine Zellpopulation, die einer nicht sättigenden Initiatorkonzentration ausgesetzt ist, besteht aus zwei Subgruppen, deren Proteinexpression entweder ein- bzw. ausgeschaltet ist [Mal73, Sie97]. Der gemessene Durchschnittswert über die gesamte Population liefert daher Aussagen über die Zahl der Zellen im jeweiligen Zustand und nicht über scheinbares graduelles Expressionsverhalten einer einzelnen Zelle. Insbesondere in der funktionellen Genomanalyse, bei der Momentaufnahme der Transkription und Translation analysiert werden, ist dieser Aspekt von entscheidender Bedeutung. Ein weiteres Problem, das bei der funktionellen Genomanalyse von Zellpopulationen auftritt, basiert auf den üblicherweise erforderlichen Reinigungs- und

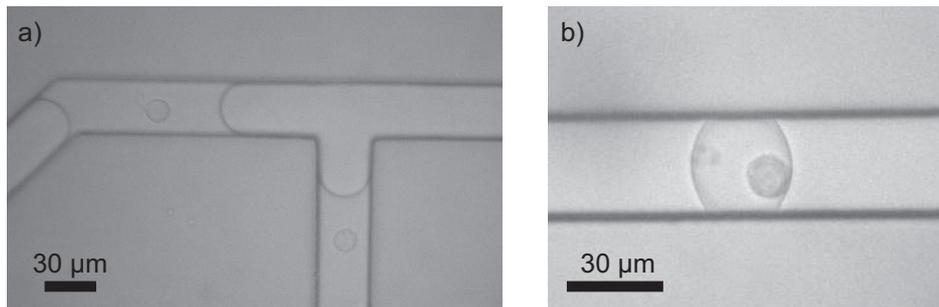


Abbildung 13.17: Durch den T-förmigen Tropfengenerator lassen sich einzelne Zellen gezielt selektieren (a) und in kleinste Kompartimente einschliessen. Das Volumen des in (b) dargestellten zellenthaltenden Tropfens entspricht etwa 30 pL.

Konzentrationschritten. Da Zellen innerhalb von Sekunden und Minuten auf Reize reagieren können, besteht die Gefahr, dass die gemessenen Daten eine Reaktion auf die Probenpräparation ist.

Die direkte Untersuchung an einer einzelnen Zelle würde diese Probleme lösen und gleichzeitig die erforderlichen Zellmengen auf ein Minimum reduzieren. Es besteht daher ein großes Interesse an neuen Methoden der Probenbereitung und präzisen Analyse auf der Einzelzellebene. Zur Zeit stellen solche Untersuchungen eine große Herausforderung dar, jedoch liefert die Anwendung neuer Technologien vielversprechende Ansätze. Die Mikrofluidik nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da mit ihr kleinste Probenmengen im Mikrometerbereich manipuliert und analysiert werden können [And03]. Verschiedene Flusszellendesigns konnten erfolgreich zur Separation und Handhabung einzelner Zellen eingesetzt werden [Whe03, Iri04, Wu04, He05].

Durch die Kombination mit einer temperierbaren Probenhalterung konnte auch das in dieser Arbeit vorgestellte Mikrolabor für die Handhabung von Zellsuspensionen eingesetzt werden. Die Kanäle konnten problemlos mit den Zellen befüllt werden, ohne dass diese Schaden nahmen. Mit Hilfe des Tropfengenerators gelang es, einzelnen Zellen gezielt zu selektieren und in Kompartimente einzuschließen, deren Volumen weniger als 100 pL betrug (Abb. 13.17).

Materialien und Methoden

14.1 Behandlung von Glas- und PDMS-Oberflächen

Glasoberflächen werden in einer im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnten alkalischen Lösung (Extran, Merck) für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Proben werden gründlich mit Wasser gespült und anschließend für weitere 15 min im Wasser im Ultraschallbad belassen. Anschließend werden die Proben mit Millipore-Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Inkubation werden die Glasoberflächen mit einer BSA-Lösung (10 mg ml^{-1}) oder Polylysinslösung (5 mg ml^{-1}) bedeckt und 15 min inkubiert. Die Proben werden mit Millipore-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Beschichtung der PDMS-Oberflächen der Mikroflussszellen werden diese unmittelbar nach der Plasmabehandlung (0,5 mbar Sauerstoff, 150 W, 30 s) mit den jeweiligen Lösungen bedeckt. Nach 15minütiger Inkubationszeit werden die PDMS-Proben gründlich mit Millipore-Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

14.2 Aminosilylierung von Glasoberflächen

Die PDMS-Formen werden gemäß dem Protokoll zur Herstellung der Mikrofluidikzellen erzeugt. Die Strukturen entsprechen nun allerdings nicht den zur Aufnahme des Hyaluronsäuregels benötigten Kammern. Nach Reinigung und Plasmaaktivierung werden die Kammern mit einer 5%igen Lösung aus [*N*-(6-Aminoethyl)-aminopropyl]-trimethoxysilan (AHAPTMS) in Methanol befüllt und über Nacht in einer gesättigten Methanolatmosphäre inkubiert. Anschließend wird die Zelle mit Methanol und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Nun können die Schlauchverbindungen zur Befüllung der Zelle angebracht werden.

14.3 Präparation der Hyaluronsäuregele

In einem Schraubdeckelglas werden unter heftigem Rühren 2 mg ml^{-1} Hyaluronsäure in 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure-Puffer (HEPES) bei $\text{pH} = 7$ gelöst. Zur Aktivierung der Carboxylgruppen der Hyaluronsäure, werden $0,2 \text{ M}$ *N*-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) und $0,05 \text{ M}$ *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in die Lösung gegeben. Diese Lösung

wird vorsichtig in die vorbereiteten PDMS-Kammern gefüllt. Die Proben werden in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre aufbewahrt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach etwa 4 h hat sich ein viskoelastisches Hydrogel gebildet. Eventuell über die Kammerränder herausragende Gele können mit einem Skalpell vorsichtig abgetragen werden.

14.4 Beschichtung der Mikrokugeln

Zur Reinigung der carboxylierten Polystyrol-Mikrokugeln (20 mg ml^{-1} , Durchmesser: $2 \text{ }\mu\text{m}$) werden $100 \text{ }\mu\text{l}$ dieser Suspension bei 5000 U min^{-1} für 1 min zentrifugiert und anschließend in $100 \text{ }\mu\text{l}$ Millipore-Wasser resuspendiert. Zur Beschichtung der Kugeloberflächen mit Polylysin werden zu $10 \text{ }\mu\text{l}$ der gewaschenen Suspension $90 \text{ }\mu\text{l}$ einer Polylysinlösung (5 mg ml^{-1}) gegeben und über Nacht unter fortwährender Überkopfrotation inkubiert. Anschließend wird die Suspension durch fünfmaliges Zentrifugieren ($1 \text{ min bei } 5000 \text{ U min}^{-1}$) und Resuspendieren in $100 \text{ }\mu\text{l}$ Millipore-Wasser gereinigt. Die so beschichteten Mikrokugeln werden für jeden Versuch frisch bereitete und unmittelbar nach dem Waschvorgang eingesetzt. Zur Beschichtung von Mikrokugeln mit NEMHMM (der durch N-Ethylmaleimid modifizierten schweren Kette des Meromyosins) werden nicht-funktionalisierte Polystyrol-Mikrokugeln (20 mg ml^{-1} , Durchmesser: $2 \text{ }\mu\text{m}$) verwendet. Diese werden ebenso wie oben beschrieben gereinigt. $10 \text{ }\mu\text{l}$ der Suspension werden zu $90 \text{ }\mu\text{l}$ einer NEMHMM-Lösung ($5 \text{ }\mu\text{M}$ in A-Puffer) gegeben und über Nacht unter fortwährender Überkopfrotation inkubiert. Anschließend wird die Suspension durch fünfmaliges Zentrifugieren ($1 \text{ min bei } 5000 \text{ U min}^{-1}$) und Resuspendieren in $100 \text{ }\mu\text{l}$ Millipore-Wasser gereinigt und schließlich in $100 \text{ }\mu\text{l}$ A-Puffer aufgenommen.

14.5 Proteine

Aktin und NEMHMM wurden von E. Sackmann (TU München) zur Verfügung gestellt. Das Aktin wurde aus Kaninchenmuskeln nach Protokollen von MacLean-Fletcher *et al.* und Pardee *et al.* gewonnen und aufgereinigt [MF80, Par82]. NEMHMM wurde nach dem Protokoll von Cande präpariert [Can86]. Die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin wird durch Verdünnen des G-Aktins in $95 \text{ }\mu\text{l}$ F-Puffer (Aktinkonzentration: $5 \text{ }\mu\text{M}$) initiiert. Nach 30 min werden zur Anfärbung der Aktinfilamente $5 \text{ }\mu\text{l}$ einer Phalloidin-TRITC-Lösung ($0,1 \text{ mM}$ in Methanol) zugegeben.

14.6 Pufferlösungen

G-Puffer		F-Puffer	
TRIS	2 mM	TRIS	2 mM
CaCl ₂	0,2 mM	MgCl ₂	2 mM
DTT	0,2 mM	KCl	25 mM
ATP	0,2 mM	CaCl ₂	0,2 mM
NaN ₃	50 μg ml ⁻¹	DTT	0,2 mM
pH = 8,0		ATP	0,5 mM
		pH = 7,4	

A-Puffer (Verdünnungspuffer)	
Imidazol	25 mM
EGTA	1 mM
MgCl ₂	4 mM
KCl	25 mM
pH = 7,4	

Die Pufferlösungen werden in Form 10fach konzentrierter Stocklösungen hergestellt und bei Bedarf entsprechend verdünnt.

Antioxidationspuffer

Den Lösungen, welche zur Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden, wird zusätzlich ein Enzymsystem zugegeben, welches den gelösten Sauerstoff reduziert, um ein schnelles Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden. Die jeweiligen Puffernamen erhalten zur Unterscheidung den hochgestellten Index „+“.

DTT	5 mM
Glukose	3 mg ml ⁻¹
Glukoseoxidase	0,2 mg ml ⁻¹
Catalase	0,05 mg ml ⁻¹

Das für die Herstellung der Lösungen verwendete Wasser wird im Vakuum entgast. DTT wird in Form einer 1 M Lösung (in Wasser) zu den jeweiligen Puffern zugegeben. Die Enzyme werden unmittelbar vor der Zubereitung der Pufferlösungen in jeweils 100 μl A-Puffer gelöst (50× konzentriert).

Zusammenfassung

Motiviert durch die großen Erfolge, die durch den Einsatz klassischer optischer Pinzetten in der Erforschung von Einzelmolekülwechselwirkungen erzielt wurden, sollte das Potential holographischer optischer Pinzetten (HOT) hinsichtlich einer Anwendung auf komplexe Proteinnetzwerke untersucht werden. Dies erforderte eine eingehende Charakterisierung und Weiterentwicklung der HOT als physikalisches und strukturgebendes Mikroinstrument. Um darüber hinaus die essentielle Kontrolle des chemischen Milieus durch Bereitstellung und Steuerung verschiedener Substanzen zu ermöglichen, wurden die HOT in eine Mikrofluidikplattform integriert.

Optische Entwicklungen auf dem Gebiet der HOT

Aufbau einer HOT-Apparatur und Kalibrierung

Zu Beginn der Arbeit stand die Entwicklung einer HOT-Apparatur und deren Integration in ein Fluoreszenzmikroskop (Kap. 4). Der realisierte Aufbau wurde dabei im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen HOT mit dem Ziel einer flexibleren Probenhandhabung abgeändert: Anstatt eines gemeinsamen Objektivs zur Erzeugung der optischen Fallen und zur Bildgebung wurden zwei unabhängig voneinander ansteuerbare Objektive verwendet. Auf diese Weise lassen sich Bildebene des Mikroskops und optische Fallenebene voneinander entkoppeln. Dadurch wird eine optimale Anpassung der Objektivwahl an die jeweiligen Erfordernisse erreicht: Ein Objektiv hoher numerischer Apertur zur Erzeugung stabiler optischer Fallen lässt sich gleichzeitig mit einem Objektiv geringer Vergrößerung einsetzen, welches durch sein weites Gesichtsfeld die Betrachtung eines größeren Objektausschnitts ermöglicht. Weiterhin ist die Bildgebung nicht mehr auf die Ebene der optischen Pinzetten beschränkt, sondern kann unabhängig von dieser verändert werden. Ebenso lassen sich durch Steuerung des Fallenobjektivs die optischen Pinzetten leicht in Richtung der optischen Achse verschieben ohne die Hologramme anpassen zu müssen.

Der Einsatz optischer Pinzetten zur quantitativen Erfassung von Kräften im Piconewtonbereich setzt eine Kalibrierung voraus. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden angewendet und miteinander verglichen (Kap. 5): die hydrodynamische Reibung einer bewegten Probe auf die optisch gefangenen Mikrokugeln und die Analyse der thermischen Fluktuation der Objekte in den optischen Fallen. Beide Techniken lieferten vergleichbare Resultate für die Fe-

derkonstanten im Bereich von 2 bis 20 pN μm^{-1} . Aufgrund von Systeminstabilitäten ist eine Kalibrierung über die Brownsche Bewegung nur für schwache optische Fallen geeignet ($< 10 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$), während die aufwändigere Methode über die hydrodynamische Reibung ohne Einschränkung eingesetzt werden kann. HOT bieten die Möglichkeit durch gezielte Anpassung der Hologramme, die Intensität und damit die Federkonstanten individuell für einzelne Fallen zu regulieren. Komplexe Kraftsensoranordnungen lassen sich auf diese Weise realisieren. Exemplarisch wurde die Vorgehensweise an einem Zweifallensystem demonstriert und quantitativ analysiert.

Effiziente Hologrammberechnung

Essentielles Element der HOT stellen die computer-generierten Hologramme dar. Zur Berechnung der Hologramme, die lediglich die Phase des Laserlichts modulieren, kommen verschiedene, meist iterative Algorithmen zum Einsatz, welche die Effizienz der Hologramme optimieren. Die Effizienz gibt den Anteil der Laserintensität in den gewünschten optischen Fallenpositionen an der Gesamtintensität an. Eine interaktive Verwendung der HOT, bei der Hologramme in Echtzeit berechnet und an den Phasenmodulator übertragen werden, benötigt dagegen schnelle, möglichst nicht-iterative Methoden zur Erzeugung der Phasenmasken. Aus diesem Grund wurden verschiedene iterative Algorithmen mit einem einfachen Superpositionsansatz verglichen (Kap. 6). Letzterer liefert die Hologramme durch Überlagerung von einzelnen Prismenhologrammen. Diese entsprechen den durch optische Prismen erzeugten Phasenverschiebungen und bilden jeweils eine einzelne optische Falle. Unter Vernachlässigung der Amplitudenmodulation wird die Phaseninformation direkt als neues Hologramm verwendet. Es findet keine zeitaufwändige iterative Optimierung statt. Bei dem Vergleich der verschiedenen Methoden wurde eine Abhängigkeit der Effizienz von Symmetrieeigenschaften der Fallenmuster beobachtet: Es konnte festgestellt werden, dass sich die Effizienz asymmetrischer Verteilungen der optischen Fallen nicht durch die Verwendung iterativer Algorithmen verbessern lässt. Sie lieferten die gleichen Ergebnisse wie der einfache Superpositionsansatz. Die zu symmetrischen Fallenanordnungen korrespondierenden Hologramme ließen sich hingegen iterativ optimieren. Effizienzen über 90 % waren so zu erreichen. Begründen ließ sich diese Symmetrieabhängigkeit mit einer Interferenz der Beugungsmaxima verschiedener Ordnung. Im Falle hochsymmetrischer periodischer Fallenanordnungen ist eine Überlappung von Haupt- und Nebenmaxima möglich. Konstruktive Interferenz führt zu einer Steigerung, während destruktive Interferenz zu einer Erniedrigung der Effizienz im Vergleich zu einer asymmetrischen Anordnung führt. Basierend auf diesen Beobachtungen konnte daher eine Brechung der Symmetrie durch leichte Verschiebung der Fallenpositionen zu einer Verbesserung der Hologramme genutzt werden. Eine dramatische Effizienzerhöhung wurde durch eine einfache Erweiterung des Superpositionsansatzes erreicht: Durch Addition einer zufälligen Phase zu den einzelnen Prismenhologrammen vor der Superposition wurde die Effizienz um bis zu 30 % erhöht. Auch wenn die erreichten Werte nicht immer den Maximalwerten iterativ optimierter Hologramme entsprachen, konnte durch den erweiterten

Superpositionsansatz in jedem Fall eine Verbesserung der Effizienz gegenüber der einfachen Superposition erzielt werden. Damit wurde demonstriert, dass in den meisten Fällen zeitaufwändige Iterationsalgorithmen zur Hologrammberechnung nicht notwendig sind. Die durch den vorgestellten erweiterten Superpositionsansatz generierten Hologramme sind für nahezu alle experimentellen Anwendungen der HOT völlig ausreichend.

Hochaufgelöste Positionierung der HOT

Eine wichtige Rolle in der praktischen Anwendung der HOT spielt die Präzision der Fallenpositionierung und Fallensteuerung. Die bestimmenden Größen und Abhängigkeiten sollten daher in dieser Arbeit untersucht und ihre Limitierungen bestimmt werden (Kap. 7). Gewöhnlich erfolgt die Hologrammberechnung mittels einer globalen Fouriertransformation der gewünschten Zielintensitätsverteilung, eines Bildes mit $M \times M$ Bildpunkten. Dieses Raster entspricht der Pixelaufteilung des Phasenmodulators (SLM) und führt zu einer Beschränkung der zugänglichen Fallenpositionen auf Vielfache von $\lambda/2NA$ (mit der Laserwellenlänge λ und der numerischen Apertur NA des verwendeten Objektivs). Es konnte demonstriert werden, dass die Verwendung eines Superpositionsansatzes diese künstliche Beschränkung aufhebt: Einzelne Prismenhologramme lassen sich erzeugen, die eine optische Falle mit einer Auflösung von Bruchteilen von $\lambda/2NA$ platzieren können. Aus der Struktur der Hologramme wurde abgeleitet, dass die maximal zu erzielende Auflösung proportional zu dem Produkt aus der Anzahl der Bildpunkte in x- bzw. y-Richtung und der Anzahl der durch den SLM realisierbaren Phasenschritte zwischen 0 und 2π ist. Eine Positionierung und Bewegung optischer Fallen mit Nanometerauflösung konnte für Einzel- und Mehrfallensysteme demonstriert werden. Die Verwendung von Hologrammen mit künstlich reduzierten Bildpunkten und Phasenschritten zeigte die vorhergesagte Abhängigkeit der Auflösung von den beiden Parametern. Es wurde gezeigt, dass selbst mit binären Hologrammen, die lediglich die beiden Phasenwerte 0 und π enthalten, bei einer hohen Bildpunktzahl des SLM eine Fallenpositionierung mit Nanometerauflösung zu erzielen ist. Das Ergebnis ist von besonderer Bedeutung für die Verwendung ferroelektrischer SLM zur Hologrammerzeugung. Diese weisen eine hohe Bildwiederholrate aus, können allerdings nur zwei Phasenwerte erzeugen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass sich durch Prismensuperposition auch eine Vielzahl optischer Fallen unabhängig voneinander mit Nanometerauflösung platzieren lässt.

Drehimpulsmodulation optischer Wirbel

Optische Wirbel oder Vortices lassen sich durch helikale Phasenmasken erzeugen und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Drehimpuls auf optisch gefangene Objekte zu übertragen. Die Erzeugung komplexer Anordnungen durch die HOT-Technik eignet sich somit zur nicht-invasiven Steuerung mikroskopischer Motoren und anderer Elemente in Mikrolaboren. Der Radius eines optischen Wirbels und der übertragbare Drehimpuls werden durch die Helizität l der Phasenmaske bestimmt. Eine unabhängige Kontrolle beider Eigenschaften ist nicht

ohne weiteres möglich, da optische Vortices vollständig durch den Parameter l bestimmt werden. Um die Möglichkeiten einer experimentellen Anwendung zu erweitern, wurde in dieser Arbeit eine neue Klasse modulierter optischer Wirbel entwickelt, welche neben der Helizität einen weiteren Steuerungsparameter besitzt. Ausgangspunkt für die Modulierung stellte die Überlagerung zweier Wirbel gleicher Helizität unterschiedlichen Vorzeichens dar. Der relative Anteil der gegenläufigen Wirbel lässt sich durch einen neuen Mischungsparameter regulieren. Es wurde gezeigt, dass die Intensitätsverteilung der neuen Wirbelklasse weiterhin auf einem Ring erfolgt, dessen Radius dem eines regulären Wirbels entspricht. Damit weicht die Klasse in einem entscheidenden Punkt von den bisher bekannten modulierten Wirbeln ab, welche eine veränderte Geometrie der Intensitätsverteilung zeigen. Eine Übertragung von Drehimpuls durch die neuen optischen Wirbel in Abhängigkeit von dem Mischungsparameter wurde demonstriert. Damit konnte das Ziel einer unabhängigen Kontrolle von Wirbelradius und Drehimpulsübertrag erreicht werden. Zur Charakterisierung der Eigenschaften der Phasenmasken modulierter und regulärer optischer Wirbel wurden die zwei mittleren Helizitäten \bar{l}_1 und \bar{l}_2 eingeführt, die sich mit dem Radius und dem Drehimpulsinhalt der Wirbel korrelieren ließen. Schließlich wurde die Anwendung der Wirbelklasse zur simultanen und unabhängigen Rotation vieler Objekte demonstriert. Eine beliebige Kontrolle der Rotationsfrequenz war möglich ohne die Laserleistung und den Vortextradius zu verändern. Im Falle einer vollständigen Auslöschung des Drehimpulses durch die Vortexmodulation resultieren zahnradförmige Ringfallen. In Kombination mit einem Kompositkugelsystem konnte ein Werkzeug entwickelt werden, das eine kontrollierte Rotation und gezielte Ausrichtung einer Mikrokugel erlaubt.

Entwicklungen einer Mikrofluidikplattform

Der zweite Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit lag auf der Entwicklung einer Mikrofluidikplattform zur Kontrolle des chemischen Milieus durch Regulation und Steuerung verschiedener Flüssigkeiten. Die Plattform sollte damit als ein chemisches Mikrowerkzeug das physikalische Werkzeug der HOT ergänzen. Um eine Integration der HOT zu ermöglichen, mussten zwei Grundanforderungen erfüllt werden: Es galt, optische Transparenz und ein extrem flachen Systemaufbau, bedingt durch die Verwendung zweier Objektive, zu erzielen. Durch die Verwendung von Softlithographietechniken und der Entwicklung eines speziellen Zellaufbaus konnten ultraflache Mikrofluidiksysteme mit einer Höhe von weniger als 0,4 mm erstellt werden, welche die geforderten Eigenschaften besaßen. Weiterhin wurde durch eine direkte Integration der zuführenden Schläuche, die der Befüllung des Systems dienen, das Totvolumen der flüssigkeitsführenden Elemente auf ein Mindestmaß reduziert. Der Einsatz der HOT verlangt aufgrund der extrem kleinen optischen Kräfte in der Größenordnung von 1 - 10 pN eine sehr hohe Systemstabilität. Gleichzeitig muss die Plattform zu einem dynamischen Austausch verschiedener Flüssigkeiten in der Lage sein. Es wurden daher verschiedene Mikrokanaldesigns entwickelt, welche die besonderen Eigenschaften der Mikrofluidik ausnutzen, um den Erfordernissen zu genügen: Die

Parallelflosszelle erzeugt durch laminare Strömung zeitlich stabile Regionen definierter chemischer Zusammensetzung. Optisch gefangene Objekte ließen sich mit HOT innerhalb von Sekunden in die verschiedenen Bereiche bewegen, womit ein schneller Wechsel des chemischen Milieus einhergeht. Das Design der Picoliterpipette schafft ein stabiles strömungsfreies Kompartiment für den Einsatz der HOT. Flüssigkeitsmengen in der Größenordnung von 10 pl konnten mit der Pipette bewegt und dosiert werden. Durch die Erzeugung definierter beweglicher Luftreservoirs in dem Mikrofluidiksystem unter Ausnutzung der Kanalgeometrie und hydrophober Oberflächeneigenschaften wurden verschleißfreie Schaltelemente realisiert. Diese ermöglichten eine vollständige Trennung verschiedener Flüssigkeiten und durch ihre Steuerung eine gezielte Injektion der Flüssigkeiten in die Hauptkammer der Mikrofluidikzelle.

Biomimetische Aktinkortexmodelle

Das neu entwickelte opto-mechanische Mikrolabor wurde schließlich in ersten Anwendungen zur Generierung biomimetischer Systeme eingesetzt. Das Ziel bestand in der Erzeugung und Charakterisierung quasi zweidimensionaler Aktinnetzwerke als Modell für den Aktinkortex, einen essentiellen Bestandteil des Zellskeletts. In einem ersten Ansatz wurde die Plattform zur Strukturierung der Oberfläche mit Mikrokugeln eingesetzt. Durch eine unterschiedliche Beschichtung von Kugeln und Oberflächen konnte ein System erzeugt werden, das die gezielte Aktinpolymerisation ausgehend von den Kugeln erlaubte. Dadurch ließen sich kleine Netzwerke aus Aktinfilamenten bilden, die auf eine Ebene beschränkt und lediglich an den Kugeln fixiert waren ohne an die passivierende BSA-Oberfläche zu binden. Die Herstellung dünner viskoelastischer Hyaluronsäuregelkissen in dem Mikrofluidiksystem in Verbindung mit der gezielten Dekoration mit Mikrokugeln führte zu einer sensorischen Oberfläche, die zur Erfassung von Piconewtonkräften genutzt werden konnte. Die hohe Stabilität und das Potential des Mikrolabors konnte schließlich durch die Generierung eines freien optisch fixierten Aktinnetzwerks demonstriert werden: Aktinfilamente wurden auf einer optisch gesteuerten Gerüststruktur aus Mikrokugeln angebunden. Die Mikrostruktur ließ sich durch HOT frei bewegen und rotieren.

Mit dem hier vorgestellten opto-mechanischen Mikrolabor konnte erstmals die Integration der neuen HOT-Technologie in eine Mikrofluidikplattform realisiert werden, deren Elemente speziell für den Einsatz optischer Vielfallensysteme konstruiert wurden. Die Möglichkeiten der HOT-Technologie wurden damit über eine reine Objektmanipulation hinaus erweitert. Durch die eingehende Charakterisierung und Weiterentwicklung der HOT hinsichtlich der Hologrammberechnung, der Steuerungsmöglichkeit optischer Fallen und des gezielten Drehimpulsübertrags konnte ein leistungsfähiges Mikrowerkzeug zur Verfügung gestellt werden, dessen Potential in ersten Anwendungen zur Erzeugung biomimetischer Proteinnetzwerke demonstriert wurde.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Komet über Heidelberg (Stich von Matthäus Merian)	8
2.2	Erste Realisierungen optischer Fallen	9
2.3	Schematische Darstellung zur numerischen Apertur (NA)	10
2.4	Schematische Darstellung einer optischen Pinzette	11
2.5	Strahlenoptische Beschreibung der Gradientenkraft	13
3.1	Wirkungsweise eines DOE	24
3.2	Die optischen Ebenen	27
3.3	Der Gerchberg-Saxton-Algorithmus	29
3.4	Optisches Prisma	31
3.5	Hologramme zur Erzeugung optischer Wirbel	33
3.6	Aufnahme eines optischen Wirbels	34
3.7	Wirkungsweise einer helikalen Phasenplatte	34
4.1	Experimenteller Aufbau der HOT	38
4.2	Laserleistung in Abhängigkeit des Diodenstroms	39
4.3	Schematische Darstellung des Phasenmodulators	40
4.4	Aufbau zur Phasenkalibrierung des SLM	41
4.5	Zusammenhang zwischen Grauwert und Phasenverschiebung des SLM	42
4.6	Histogramm der Laserfokusfluktuation der HOT-Apparatur	43
5.1	Dreifallensystem zur Kalibrierung der HOT	46
5.2	Detektion einer 20 nm Bewegung	47
5.3	Detektion einer 5 nm Bewegung	48
5.4	Kalibrierung optischer Pinzetten durch hydrodynamische Reibung	49
5.5	Vergleich der Federkonstanten für verschiedene Laserleistungen und Kalibrierungsmethoden	50
5.6	Histogramm der thermischen Fluktuation einer optisch gefangenen Mikrokugel (Diodenstrom = 9 A)	51
5.7	Histogramm der thermischen Fluktuation einer optisch gefangenen Mikrokugel (Diodenstrom = 12 A)	51
5.8	Intensitätsverläufe amplitudenmodulierter optischer Fallen	53
5.9	Federkonstanten intensitätsmodulierter optischer Fallen	53

6.1	Beugungseffizienz für $N \times N$ -Fallenanordnungen	56
6.2	Beugungseffizienz für zufällige Fallenanordnungen	57
6.3	Konvergenzverhalten der Effizienz für $N \times N$ -Fallenanordnungen	57
6.4	Konvergenzverhalten der Effizienz für zufällige Fallenanordnungen	58
6.5	Histogramm der Effizienzverteilung eines SZ-Hologramms	59
6.6	Hologrammeffizienzen einer kreisförmigen Fallenanordnung	60
6.7	Intensitätsvariationen für kreisförmige Fallenanordnungen	60
6.8	Intensitätsvariationen für $N \times N$ -Fallenanordnungen	61
6.9	Intensitätsvariationen für zufällige Fallenanordnungen	62
6.10	Effekt der Symmetriebrechung auf die Intensitätsvariation	62
7.1	Prismenhologramm	67
7.2	Verschiebung einer optischen Falle in 2 nm Schritten	68
7.3	Räumliche Auflösung von HOT für verschiedene Hologrammpa- rameter (Grauwerte, Bildpunkte)	69
7.4	Hochaufgelöste simultane Bewegung vier optischer Fallen	70
7.5	Bewegung einer optischen Falle in 8 nm Schritten	71
8.1	Radius optischer Wirbel als Funktion der Windungszahl l	74
8.2	Phasenverläufe modulierter optischer Wirbel	75
8.3	Ableitungsfunktionen modulierter optischer Wirbel	75
8.4	Phasenmasken und Intensitätsverteilungen modulierter optischer Wirbel	77
8.5	Schematische Darstellung der Mikrokurbel	79
8.6	Rotation eines Kompositkugelsystems mit einer Zahnradfalle	79
8.7	Rotationsperiode als Funktion der mittleren Helizität \bar{l}_1	81
8.8	Normierte Rotationsperiode als Funktion der mittleren Helizität \bar{l}_1	81
8.9	Normierte Rotationsperiode als Funktion von c	83
8.10	Drei modulierte optische Wirbel	84
9.1	Gleichgewichtssituation dreier Phasen in einer Kontaktlinie	89
9.2	Flüssigkeit in einer Kapillare	90
10.1	Softlithographieprozess zur Mikrofluidikzellenherstellung	94
10.2	Platinkatalysierte PDMS-Polymerisation	96
10.3	Schematische Darstellung der Mikrofluidikzelle	97
11.1	Verschiedene Ansichten der Mikrofluidikzelle	100
11.2	Platzierung der Mikrofluidikzelle in der HOT-Apparatur zwi- schen den beiden Objektiven	100
11.3	Parallelflosszelle mit vier Zuflusskanälen	101
11.4	Hydrodynamische Fokussierung	102
11.5	Picoliterpipettendesign	103
11.6	Funktionsweise der integrierten Picoliterpipette	104
11.7	Kontrollierte Befüllung der Picoliterpipette	105
11.8	Zwei-Phasen-Mikroschalter	106
11.9	Tropfengeneratordesign	107
11.10	Generierung von Tropfen in Mikrofluidikkanälen	108

11.11 Schematische Darstellung der Mikrofluidikdosiereinheit	109
11.12 Mikrofluidikdosiereinheit	109
12.1 Voigt-Modell eines viskoelastischen Körpers	116
12.2 Kinetik der Aktinpolymerisation	117
12.3 Schematische Zeichnung von Myosin II	118
12.4 Fluoreszenzaufnahme eines adhärirten Fibroblasten mit angefärb-	
ten Aktin [Ulm05]	119
12.5 2D-Aktinnetzwerk auf Mikrosäulen [Roo03]	121
13.1 Schemazeichnung der Oberflächenstrukturierung mit HOT	124
13.2 Mit HOT mikrostrukturierte Oberfläche	125
13.3 Sequentielle Oberflächenstrukturierung mit HOT	125
13.4 Induzierte Aktinpolymerisation auf mikrostrukturierten Polyly-	
sinkügelchen	126
13.5 Nukleation der Aktinpolymerisation durch Polylysin	127
13.6 Aktinnetzwerk auf hexagonaler fixierter Mikrokugelstruktur	128
13.7 Dissacharid-Grundeinheit der Hyaluronsäure.	129
13.8 Schematische Darstellung der Oberflächenstrukturierung von Mi-	
krogelkissen zur Erzeugung kraftsensorischer Elemente.	129
13.9 Aminosilylierung von Glasoberflächen und Anbindung von akti-	
vierten Säuren	130
13.10 Auslenkung einer auf Gelkissen fixierten Mikrokugel	131
13.11 Experimentelle Dehnung eines Hyaluronsäuregels	131
13.12 Viskoelastisches Relaxationsverhalten des Hyaluronsäuregels	132
13.13 Schematische Darstellung eines optisch fixierten Aktinnetzwerks	133
13.14 Befüllungsschema zur Erzeugung eines freien Aktinnetzwerks	134
13.15 Bildung eines freien Aktinnetzwerks	134
13.16 Rotierendes freies Aktinnetzwerk	135
13.17 Kompartimentierung einzelner Zellen in Picolitertropfen	137

Literaturverzeichnis

- [Aga05] R. Agarwal, K. Ladavac, Y. Roichman, G. Yu, C. M. Lieber und D. G. Grier: „Manipulation and assembly of nanowires with holographic optical traps“, *Opt. Express* **2005**, *13*, 8906–8912.
- [All92] L. Allen, M. W. Beijersbergen, R. J. C. Spreeuw und J. P. Woerdman: „Orbital angular momentum of light and the transformation of Laguerre-Gaussian laser modes“, *Phys. Rev. A* **1992**, *45*, 8185–8189.
- [All99] L. Allen, M. J. Padgett und M. Babiker: „The orbital angular momentum of light“, *Prog. Opt.* **1999**, *39*, 291–372.
- [Alm95] E. Almaas und I. Brevik: „Radiation force on a micrometer-sized sphere in an evanescent field“, *J. Opt. Soc. Am. B* **1995**, *12*, 2429–2438.
- [And00] J. Anderson, D. Chiu, R. Jackman, O. Cherniavskaya und J. McDonald: „Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping“, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3158–3164.
- [And03] H. Andersson und A. van den Berg: „Microfluidic devices for cellomics: a review“, *Sens. Actuators B* **2003**, *92*, 315–325.
- [Ash70] A. Ashkin: „Acceleration and trapping of particles by radiation pressure“, *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 156–159.
- [Ash71] A. Ashkin und J. M. Dziedzic: „Optical levitation by radiation pressure“, *Appl. Phys. Lett.* **1971**, *19*, 283–285.
- [Ash75] A. Ashkin und J. M. Dziedzic: „Optical levitation of liquid drops by radiation pressure“, *Science* **1975**, *187*, 1073–1075.
- [Ash78] A. Ashkin: „Trapping of atoms by resonance radiation pressure“, *Phys. Rev. Lett.* **1978**, *40*, 729–732.
- [Ash80] A. Ashkin: „Applications of laser radiation pressure“, *Science* **1980**, *210*, 1081–1088.

- [Ash86] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. Bjorkholm und S. Chu: „Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles“, *Opt. Lett.* **1986**, *11*, 288–290.
- [Ash87a] A. Ashkin und J. M. Dziedzic: „Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria“, *Science* **1987**, *235*, 1517–1520.
- [Ash87b] A. Ashkin, J. M. Dziedzic und T. Yamane: „Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams“, *Nature* **1987**, *330*, 769–771.
- [Ash89] A. Ashkin und J. M. Dziedzic: „Internal cell manipulation using infrared laser traps“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7914–7918.
- [Ash90] A. Ashkin, K. Schuetze, J. M. Dziedzic, U. Euteneuer und M. Schliwa: „Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap“, *Nature* **1990**, *348*, 346–348.
- [Ash92] A. Ashkin: „Forces of a Single-Beam Gradient Laser Trap on a Dielectric Sphere in the Ray Optics Regime“, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 569–582.
- [Aum74] G. Aumiller, E. Chandross, W. Tomlinson und H. Weber: „Submicrometer resolution replication of relief patterns for integrated optics“, *J. Appl. Phys.* **1974**, *45*, 4557–4552.
- [Bal01] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi und B. Geiger: „Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates“, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 466–472.
- [Bar88] J. P. Barton: „Internal and near-surface electromagnetic fields for spherical particle irradiated by a focused light beam“, *J. Appl. Phys.* **1988**, *64*, 1632–1639.
- [Bar89] J. P. Barton und D. R. Alexandre: „Fifth-order corrected electromagnetic field components for a fundamental Gaussian beam“, *J. Appl. Phys.* **1989**, *66*, 2800–2802.
- [Bau99] A. R. Bausch, W. Möller und E. Sackmann: „Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers“, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 573–579.
- [Bau01] A. R. Bausch, U. Hellerer, M. Essler, M. Aepfelbacher und E. Sackmann: „Rapid stiffening of integrin receptor-actin linkages in endothelial cells stimulated with thrombin: a magnetic bead microrheology study“, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2649–2657.
- [Bee02] D. J. Beebe, G. A. Mensing und G. M. Walker: „Physics and applications of microfluidics in biology“, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 261–286.

- [Blo89] S. M. Block, D. F. Blair und H. C. Berg: „Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers“, *Nature* **1989**, *338*, 514–518.
- [Bro79] S. Brown und J. Spudich: „Nucleation of polar actin filament assembly by a positively charged surface“, *J. Cell Biol.* **1979**, *80*, 499–504.
- [Cam99] L. A. Cameron, M. J. Footer, A. V. Oudenaarden und J. A. Theriot: „Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization“, *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96*, 4908–4913.
- [Can86] W. Z. Cande: „Preparation of N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin and its use as a functional probe of actomyosin-based motility“, *Methods Enzymol.* **1986**, *134*, 473–477.
- [Car89] M. Carlier: „Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules“, *Int. Rev. Cytol.* **1989**, *115*, 139–170.
- [Car94] M. F. Carlier, R. C. Valentin, C. Combeau, S. Fievez und D. Pantaloni: „Actin polymerization: regulation by divalent metal ion and nucleotide binding, ATP hydrolysis and binding of myosin“, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**, *358*, 71–81.
- [Cec05] C. Cecconi, E. A. Shank, C. Bustamante und S. Marqusee: „Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule“, *Science* **2005**, *309*, 2057–2060.
- [Cha91] M. K. Chaudhury und G. M. Whitesides: „Direct Measurement of Interfacial Interactions between Semispherical Lenses and Flat Sheets of Poly(Dimethylsiloxane) and Their Chemical Derivatives“, *Langmuir* **1991**, *7*, 1013–1025.
- [Cha92] M. K. Chaudhury und G. M. Whitesides: „Correlation Between Surface Energy and Surface Constitution“, *Science* **1992**, *255*, 1230–1232.
- [Chi05] A. P. Chikkatur, Y. Shin, A. E. Leanhardt, D. Kielpinski, E. Tsikata, T. L. Gustavson, D. E. Pritchard und W. Ketterle: „A continuous source of Bose-Einstein condensed atoms“, *Science* **2005**, *296*, 2193–2195.
- [Chu91] S. Chu: „Laser manipulation of atoms and particles“, *Science* **1991**, *253*, 861–866.
- [Coo02] J. Cooper und G. M. Whitesides: „Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices“, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 491–499.
- [Cre05] C. M. Creely, G. Volpe, G. P. Singh, M. Soler und D. Petrov: „Raman imaging of floating cells“, *Opt. Express* **2005**, *13*, 6105–6110.

- [Cro94] J. C. Crocker und D. G. Grier: „Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid“, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *73*, 352–355.
- [Cro96] J. C. Crocker und D. G. Grier: „When like charges attract: The effects of geometrical confinement on long-range colloidal interactions“, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 1897–2000.
- [Cro99] J. C. Crocker, J. A. Matteo, A. D. Dinsmore und A. G. Yodh: „Entropic attraction and repulsion in binary colloids probed with a line optical tweezer“, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 4352–4355.
- [Cro00] J. C. Crocker, M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh und D. A. Weitz: „Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials“, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 888–891.
- [Cur02] J. E. Curtis, B. A. Koss und D. G. Grier: „Dynamic holographic optical tweezers“, *Opt. Commun.* **2002**, *207*, 169–175.
- [Cur03a] J. E. Curtis und D. G. Grier: „Modulated optical vortices“, *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 872–874.
- [Cur03b] J. E. Curtis und D. G. Grier: „Structure of optical vortices“, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 133901.
- [Dan86] J. Daniel, I. Molish, L. Robkin und H. Holmsen: „Nucleotide exchange between cytosolic ATP and F-actin-bound ADP may be a major energy-utilizing process in unstimulated platelets“, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156*, 677–684.
- [Der01] S. Dertinger, D. Chiu, N. Jeon und G. Whitesides: „Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks“, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1240–1246.
- [Dho02] K. Dholakia, G. Spalding und M. MacDonald: „Optical tweezers: the next generation“, *Phys. World* **2002**, *15*, 31–35.
- [Dic99] M. A. Dichtl und E. Sackmann: „Colloidal probe study of short time local and long time reptational motion of semiflexible macromolecules in entangled networks“, *New J. Phys.* **1999**, *1*, 18.
- [Duf98a] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller und G. M. Whitesides: „Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)“, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974–4984.
- [Duf98b] E. R. Dufresne und D. G. Grier: „Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optical elements“, *Rev. Sci. Instr.* **1998**, *69*, 1974–1977.
- [Duf01] E. R. Dufresne, G. C. Spalding, M. T. Dearing, S. A. Sheets und D. G. Grier: „Computer-generated holographic optical tweezer arrays“, *Rev. Sci. Instr.* **2001**, *72*, 1810–1816.

- [Eng04] J. Enger, M. Goksör, K. Ramser, P. Hagberg und D. Hanstorp: „Optical tweezers applied to a microfluidic system“, *Lab Chip* **2004**, *4*, 196–200.
- [Eva93] E. Evans: „New physical concepts for cell amoeboid motion“, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 1306–1322.
- [Eva95] L. L. Evans und P. C. Bridgman: „Particles move along actin filament bundles in nerve growth cones“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10954–10958.
- [Fey60] R. P. Feynman: „There’s plenty of room at the bottom“, *Eng. Sci.* **1960**, *23*, 22–36.
- [Fin94] J. T. Finer, R. M. Simmons und J. A. Spudich: „Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps“, *Nature* **1994**, *368*, 113–119.
- [Fre22] H. Freundlich und W. Seifriz: „Über die Elastizität von Solen und Gelen“, *Z. Phys. Chem.* **1922**, *104*, 233–261.
- [Fri96] M. E. J. Friese, J. Enger, H. Rubinsztein-Dunlop und N. R. Heckenberg: „Optical angular-momentum transfer to trapped absorbing particles“, *Phys. Rev. A* **1996**, *54*, 1593–1596.
- [Gar95] J. G. Garcia und K. L. Schaphorst: „Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability“, *J. Investig. Med.* **1995**, *43*, 117–126.
- [Gar04a] M. L. Gardel, J. H. Shin, F. C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira und D. A. Weitz: „Elastic behavior of crosslinked and bundled actin networks“, *Science* **2004**, *304*, 1301–1305.
- [Gar04b] M. L. Gardel, J. H. Shin, F. C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira und D. A. Weitz: „Scaling of F-Actin Network Rheology to Probe Single Filament Elasticity and Dynamics“, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 188102.
- [Gee05] M. A. Geeves, R. Fedorov und D. J. Manstein: „Molecular mechanism of actomyosin-based motility“, *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1462–1477.
- [Gei02] B. Geiger und A. Bershadsky: „Exploring the neighborhood: Adhesion-coupled cell mechanosensors“, *Cell* **2002**, *110*, 139–142.
- [Ger72] R. W. Gerchberg und W. O. Saxton: „A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures“, *Optik* **1972**, *35*, 237–246.
- [Git93] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton und J. Howard: „Flexural Rigidity of Microtubules and Actin Filaments Measured from Thermal Fluctuations in Shape“, *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 923–934.

- [Gof02] L. L. Goff, O. Hallatschek, E. Frey und F. Amblard: „Tracer Studies on F-Actin Fluctuations“, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 258101.
- [Gri03] D. G. Grier: „A revolution in optical manipulation“, *Nature* **2003**, *424*, 810–816.
- [Han02] C. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger und S. R. Quake: „A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16531–16536.
- [Han03] C. Hansen und S. R. Quake: „Microfluidics in structural biology: smaller, faster. . . better“, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2003**, *13*, 538–544.
- [Hat01] A. Hatch, A. E. Kamholz, K. R. Hawkins, M. S. Munson, E. A. Schilling, B. H. Weigl und P. Yager: „A rapid diffusion immuno-assay in a T-sensor“, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 461–465.
- [He95a] H. He, M. E. Friese, N. R. Heckenberg und H. Rubinsztein-Dunlop: „Direct observation of transfer of angular momentum to absorptive particles from a laser beam with a phase singularity“, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *75*, 826–829.
- [He95b] H. He, N. R. Heckenberg und H. Rubinsztein-Dunlop: „Optical particle trapping with higher-order doughnut beams produced using high efficiency computer generated holograms“, *J. Mod. Opt.* **1995**, *42*, 217–223.
- [He05] M. He, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, R. M. Lorenz, J. P. Shelby und D. Chiu: „Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets“, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1539–1544.
- [Hel01] E. Helfer, S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F. C. MacKintosh und D. Chatenay: „Buckling of actin-coated membranes under application of a local force“, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 88–103.
- [Hes02] H. Hess, J. Clemmens, C. M. Matzke, G. D. Bachard, B. C. Bunker und V. Vogel: „Ratchet patterns sort molecular shuttles“, *Appl. Phys. A* **2002**, *75*, 309–313.
- [Hol90] K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard und W. Kabsch: „Atomic model of the actin filament“, *Nature* **1990**, *347*, 44–49.
- [Hon03] J. W. Hong und S. R. Quake: „Integrated nanoliter systems“, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1179–1183.
- [Hoo02] J. P. Hoogenboom, D. L. J. Vossen, C. Faivre-Moskalenko, M. Dogterom und A. van Blaaderen: „Patterning surfaces with colloidal particles using optical tweezers“, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 4828–4830.

- [Hos03] W. J. Hossack, E. Theofanidou und J. Crain: „High-speed holographic optical tweezers using a ferroelectric liquid crystal microdisplay“, *Opt. Express* **2003**, *11*, 253–259.
- [How01] J. Howard: *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton* (Sinauer Associates, Sunderland, **2001**).
- [Hum02] D. Humphrey, C. Duggan, D. Saha, D. Smith und J. Käs: „Active fluidization of polymer networks through molecular motors“, *Nature* **2002**, *416*, 413–416.
- [Hux63] H. E. Huxley: „Electron microscope studies of the structure of natural and synthetic protein filaments in striated muscle“, *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 281–308.
- [Ide01] T. Ideker, V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. E. R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold und L. Hood: „Integrated genomics and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network“, *Science* **2001**, *292*, 929–934.
- [Iri04] D. Irimia, R. G. Tompkins und M. Toner: „Single-cell chemical lysis in picoliter-scale closed volumes using a microfabricated device“, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6137–6143.
- [Ism03] R. F. Ismagilov: „Integrated microfluidic systems“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4130–4132.
- [Jan94] P. A. Janmey, S. Hvidt, J. Käs, D. Lerche, A. Maggs, E. Sackmann, M. Schliwa und T. P. Stossel: „The mechanical properties of actin gels“, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32503–32513.
- [Jan04] P. A. Janmey und D. A. Weitz: „Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells“, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 364–370.
- [Jar97] C. Jarzynski: „Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences“, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 2690–2693.
- [Jeo02] N. L. Jeon, H. Baskaran, S. K. Dertinger, G. M. Whitesides, L. V. de Water und M. Toner: „Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device“, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 826–830.
- [Jes04a] A. Jesacher, S. Fürhapter, S. Bernet und M. Ritsch-Marte: „Diffractive optical tweezers in the Fresnel regime“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 2243–2250.
- [Jes04b] A. Jesacher, S. Fürhapter, S. Bernet und M. Ritsch-Marte: „Size selective trapping with optical cogwheel tweezers“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 4129–4135.

- [Jäh04] K. Jähnisch, V. Hessel und H. L. und M. Baerns: „Chemie in Mikrostrukturreaktoren“, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 410–451.
- [Jon96] J. D. Jones und K. Luby-Phelps: „Tracer diffusion through F-actin: effect of filament length and cross-linking“, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2742–2750.
- [Jor04] P. Jordan, H. Clare, L. Flendrig, J. Leach, J. Cooper und M. Padgett: „Permanent 3D microstructures in a polymeric host created using holographic optical tweezers“, *J. Mod. Opt.* **2004**, *51*, 627–632.
- [Kab90] W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai und K. C. Holmes: „Atomic structure of the actin:DNase I complex“, *Nature* **1990**, *347*, 37–44.
- [Kam99] A. E. Kamholz, B. H. Weigl, B. A. Finlayson und P. Yager: „Quantitative analysis of molecular interaction microfluidic channel: the T-sensor“, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5340–5347.
- [Kit02] H. Kitano: „Systems biology: a brief overview“, *Science* **2002**, *295*, 1662–1664.
- [Kni02] J. Knight: „Honey, I shrunk the lab“, *Nature* **2002**, *418*, 474–475.
- [Koh99] J. M. Kohler, , T. Mejevaia und H. P. Saluz: *Microsystem technology: a powerful tool for biomolecular studies* (Birkhäuser, Boston, **1999**).
- [Kor87] E. D. Korn, M. Carlier und D. Pantaloni: „Actin polymerization and ATP hydrolysis“, *Science* **1987**, *238*, 638–644.
- [Kor02a] P. Korda, G. C. Spalding, E. R. Dufresne und D. G. Grier: „Nanofabrication with holographic optical tweezers“, *Rev. Sci. Instrum.* **2002**, *73*, 1956–1957.
- [Kor02b] P. T. Korda, M. B. Taylor und D. G. Grier: „Kinetically locked-in colloidal transport in an array of optical tweezers“, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 128301.
- [Kov98] G. T. A. Kovacs: *Micromachined transducers sourcebook* (McGraw-Hill, New York, **1998**).
- [Kre99] T. Kreis und R. Vale: *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins* (Oxford University Press, Oxford, **1999**).
- [Lac05] A. M. Lacasta, J. M. Sancho, A. H. Romero und K. Lindenberg: „Sorting on periodic surfaces“, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 0401141.
- [Lad03] G. Ladam, L. Vonna und E. Sackmann: „Micromechanics of Surface-Grafted Hyaluronic Acid Gels“, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8965–8971.

- [Lad04a] K. Ladavac, und D. G. Grier: „Microoptomechanical pumps assembled and driven by holographic optical vortex arrays“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 1144–1149.
- [Lad04b] K. Ladavac, K. Kasza und D. G. Grier: „Sorting mesoscopic objects with periodic potential landscapes: optical fractionation“, *Phys. Rev. E* **2004**, *70*, 010901.
- [Lau03a] A. Lau, D. Hoffman, A. Davies, J. C. Crocker und T. C. Lubensky: „Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells“, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 198101.
- [Lau03b] V. M. Laurent, R. Fodil, P. Canadas, S. Fereol, B. Louis, E. Planus und D. Isabey: „Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting“, *Ann. Biomed. Eng.* **2003**, *31*, 1263–1278.
- [Lea04] J. Leach, G. Sinclair, P. Jordan, J. Courtial, M. J. Padgett, J. Cooper und Z. Laczik: „Assembly of 3-dimensional structures using programmable holographic optical tweezers“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 5475–5480.
- [Lee05a] S.-H. Lee und D. G. Grier: „Flux reversal in a two-state symmetric optical thermal ratchet“, *Phys. Rev. E* **2005**, *71*, 060102.
- [Lee05b] S.-H. Lee und D. G. Grier: „Robustness of holographic optical traps against phase scaling errors“, *Opt. Express*. **2005**, *13*, 7458–7465.
- [Lee05c] S.-H. Lee, K. Ladavac und D. G. Grier: „Observation of flux reversal in a symmetric optical thermal ratchet“, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 110601.
- [Les69] L. B. Lesem, P. M. Hirsch und J. A. Jordan: „The Kinoform: A new wavefront reconstruction device“, *IBM J. Res. Develop.* **1969**, *13*, 150–155.
- [Lia93] H. Liang, W. H. Wright, W. He und M. W. Berns: „Micromanipulation of chromosomes in PTK-2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers)“, *Exp. Cell. Res.* **1993**, *204*, 110–120.
- [Lid03] M. E. Lidstrom und D. R. Meldrum: „Life-on-a-chip“, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 158–164.
- [Lie00] J. Liesener, M. Reicherter, T. Haist und H. J. Tiziani: „Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms“, *Opt. Commun.* **2000**, *185*, 77.
- [Lim02] L. Limozin und E. Sackmann: „Polymorphism of Cross-Linked Actin Networks in Giant Vesicles“, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 168103.

- [Lip02] J. Liphardt, S. Dumont, S. B. Smith, I. T. Jr. und C. Bustamante: „Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski’s equality“, *Science* **2002**, *296*, 1832–1835.
- [Lor93] M. Lorenz, D. Popp und K. C. Holmes: „Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm“, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 826–836.
- [Low69] S. Lowey, H. S. Slayter, A. G. Weeds und H. Baker: „Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation“, *J. Mol. Biol.* **1969**, *42*, 1–29.
- [LP00] K. Luby-Phelps: „Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area“, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 189–221.
- [Mac02] J. C. MacDonald und G. M. Whitesides: „Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabrication of microfluidic devices“, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 491–499.
- [Mac03] M. P. MacDonald, G. C. Spalding und K. Dholakia: „Microfluidic sorting in an optical lattice“, *Nature* **2003**, *426*, 421–424.
- [Mal73] P. C. Maloney und B. Rotman: „Distribution of suboptimally induces -D-galactosidase in Escherichia coli. The enzyme content of individual cells“, *J. Mol. Biol.* **1973**, *73*, 77–91.
- [Man90] A. Manz, N. Graber und H. Widmer: „Miniaturized total chemical analysis systems - a novel concept for chemical sensing“, *Sens. Actuators B* **1990**, *1*, 244–248.
- [Man03] K. Mangold, P. Leiderer und C. Bechinger: „Phase transitions of colloidal monolayers in periodic pinning arrays“, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 158302.
- [Mat94] P. Matsudaira: „Actin crosslinking proteins at the leading edge“, *Semin. Cell Biol.* **1994**, *5*, 165–174.
- [McG00] J. L. McGrath, J. H. Hartwig und S. C. Kuo: „The Mechanics of F-Actin Microenvironments Depend on the Chemistry of Probing Surfaces“, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3258–3266.
- [Mel02] D. R. Meldrum und M. R. Holl: „Microscale bioanalytical systems“, *Science* **2002**, *297*, 1197–1198.
- [MF80] S. MacLean-Fletcher und T. D. Pollard: „Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 18–27.

- [Mog00] P. C. Mogensen und J. Glückstad: „Dynamic array generation and pattern formation for optical tweezers“, *Opt. Commun.* **2000**, *175*, 75–81.
- [Mol02] J. E. Molloy und M. J. Padgett: „Lights, action: optical tweezers“, *Contemp. Phys.* **2002**, *43*, 241–258.
- [Moo65] G. E. Moore: „Cramming more components onto integrated circuits“, *Electronics* **1965**, *38*, 114–117.
- [Moo70] P. B. Moore, H. E. Huxley und D. J. DeRosier: „Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments“, *J. Mol. Biol.* **1970**, *50*, 279–295.
- [Moo03] J. Moorthy und D. J. Beebe: „Organic and biomimetic designs for microfluidic systems“, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 292A–301A.
- [Mor90] M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphrey und D. Johnson: „On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces“, *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *137*, 11–24.
- [Neu04] K. C. Neuman und S. M. Block: „Optical trapping“, *Rev. Sci. Instr.* **2004**, *75*, 2787–2809.
- [Ohs97] Y. N. Ohshima, H. Sakagami, K. Okumoto, A. Tokoyoda, T. Igarashi, K. B. Shintaku, S. Toride, H. Sekino, K. Kabuto und I. Nishio: „Direct measurement of infinitesimal depletion force in colloid-polymer mixture by laser radiation pressure“, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 3963–3966.
- [ON02] A. T. O’Neil, I. MacVicar, L. Allen und M. Padgett: „Intrinsic and extrinsic nature of the orbital angular momentum of a light beam“, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 053601.
- [Oos62] F. Oosawa und M. Kasai: „A theory of linear and helical aggregations of macromolecules“, *PJ. Mol. Biol.* **1962**, *4*, 10–21.
- [Paa04] V. O. Paavilainen, E. Bertling, S. Falck und P. Lappalainen: „Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins“, *Trends Cell. Biol.* **2004**, *14*, 386–394.
- [Par82] J. D. Pardee und J. A. Spudich: „Purification of muscle actin“, *Methods Enzymol.* **1982**, *85*, 164–181.
- [Pat01] L. Paterson, M. P. MacDonald, J. Arlt, W. Sibbett, P. E. Bryant und K. Dholakia: „Controlled rotation of optically trapped microscopic particles“, *Science* **2001**, *292*, 912–914.
- [Pel02] R. J. Pelham und F. Chang: „Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast“, *Nature* **2002**, *419*, 82–86.

- [Pel04] M. Pelton, K. Ladavac und D. G. Grier: „Transport and fractionation in periodic potential-energy landscapes“, *Phys. Rev. E* **2004**, *70*, 031108.
- [Pet04] M. C. Peterman, J. Noolandi, M. S. Blumenkranz und H. A. Fishman: „Localized chemical release from an artificial synapse chip“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9951–9954.
- [Ple04] J. Plewa, E. Tanner, D. M. Mueth und D. G. Grier: „Processing carbon nanotubes with holographic optical tweezers“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 1978–1981.
- [Pol02a] L. Pollack, M. Tate, A. C. Finnefrock, C. Kalidas, S. Trotter, N. C. Darnton, L. Lurio, R. H. Austin, C. A. Batt, S. M. Gruner und S. G. J. Mochrie: „Time-resolved collapse of a folding protein observed with small angle X-ray scattering“, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *86*, 4962–4965.
- [Pol02b] T. D. Pollard und W. C. Earnshaw: *Cell Biology* (Saunders, Philadelphia, **2002**).
- [Pol03] T. D. Pollard und G. G. Borisy: „Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments“, *Cell* **2003**, *112*, 453–465.
- [Pol05] M. Polin, K. Ladavac, S.-H. Lee, Y. Roichman und D. G. Grier: „Optimized holographic optical traps“, *Opt. Express* **2005**, *13*, 5831.
- [Pur77] E. M. Purcell: „Life at low Reynolds numbers“, *Am. J. Phys.* **1977**, *45*, 3–11.
- [Qua00] B. Qualmann, M. M. Kessels und R. B. Kelly: „Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton“, *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, F111–F116.
- [Rei99] M. Reicherter, T. Haist, E. U. Wagemann und H. J. Tiziani: „Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display“, *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 608–610.
- [Rey02] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux und A. Manz: „Micro total analysis systems. 1. introduction, theory, and technology“, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2623–2636.
- [Roh01] A. Rohrbach und E. H. K. Stelzer: „Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields“, *J. Opt. Soc. Am. A* **2001**, *18*, 839–853.
- [Roi05] Y. Roichman und D. G. Grier: „Holographic assembly of quasicrystalline photonic heterostructures“, *Opt. Express* **2005**, *13*, 5434–5439.
- [Roo03] W. H. Roos, A. Roth, J. Konle, H. Presting, E. Sackmann und J. P. Spatz: „Freely suspended actin cortex models on arrays of microfabricated pillars“, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 872–877.

- [Run04] M. K. Runyon, L. B. L. Johnson-Kerner und R. F. Ismagilov: „Minimal functional model of hemostasis in a biomimetic microfluidic system“, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1557–1562.
- [Sac02] E. Sackmann und R. F. Bruinsma: „Cell adhesion as wetting transition?“, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 262–269.
- [Sac04] E. Sackmann: „Mikromechanik der Zelle“, *Physik Journal* **2004**, *3*, 35–42.
- [Sat96] R. L. Satcher und C. F. Dewey: „Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton“, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 109–118.
- [SG53] A. Szent-Györgyi: „Meromyosins, the subunits of myosin“, *Arch. Biochem. Biophys.* **1953**, *42*, 305–320.
- [Sha97] J. M. Shaw, J. D. Gelorme, N. C. LaBianca, W. Conley und S. J. Holmes: „Negative photoresists for optical lithography“, *IBM J. Res. Develop.* **1997**, *41*, 81–94.
- [Shi04] J. H. Shin, M. L. Gardel, L. Mahadevan, P. Matsudaira und D. A. Weitz: „Relating microstructure to rheology of a bundled and cross-linked F-actin network in vitro“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9636–9641.
- [Sie97] D. A. Siegele und J. C. Hu: „Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8168–8172.
- [Sin04a] G. Sinclair, P. Jordan, J. Courtial und M. Padgett: „Assembly of 3-dimensional structures using programmable holographic optical tweezers“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 5475–5480.
- [Sin04b] G. Sinclair, J. Leach, P. Jordan, G. Gibson, E. Yao, Z. Laczik, M. J. Padgett und J. Courtial: „Interactive application in holographic optical tweezers of a multi-plane Gerchberg-Saxton algorithm for three-dimensional light shaping“, *Opt. Express* **2004**, *12*, 1665–1670.
- [Soi97] V. Soifer, V. Kotlyar und L. Doskolovich: *Iterative methods for diffractive optical elements computation* (Taylor & Francis, Bristol, **1997**).
- [Sto01] H. A. Stone und S. Kim: „Microfluidics: basic issues, applications, and challenges“, *AIChE J.* **2001**, *47*, 1250–1254.
- [Str50] F. B. Straub und G. Feuer: „Adenosinetriphosphate. The functional group of actin“, *Biochim. Biophys. Acta* **1950**, *4*, 455–470.
- [Svi99] T. M. Svitkina und G. G. Borisy: „Progress in protrusion: The tell-tale scar.“, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 432–436.

- [Svo93] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp und S. M. Block: „Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry“, *Nature* **1993**, *365*, 721–727.
- [Tan01] K. L. Tan, S. T. Warr, I. G. Manolis, T. D. Wilkinson, M. M. Redmond, W. A. Crossland, R. J. Mears und B. Robertson: „Dynamic holography for optical interconnections. II. Routing holograms with predictable location and intensity of each diffraction order“, *J. Opt. Soc. Am. A* **2001**, *18*, 205–215.
- [Ter79] S. C. Terry, J. H. Jerman und J. B. Angell: „A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer“, *IEEE Trans. Electron. Dev.* **1979**, *ED-26*, 1880–1886.
- [Ter02] A. Terray, J. Oakey und D. Marr: „Microfluidic control using colloidal devices“, *Science* **2002**, *296*, 1841–1844.
- [The92] J. A. Theriot, T. J. Mitchison, L. G. Tilney und D. A. Portnoy: „The rate of actinbased motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization“, *Nature* **1992**, *357*, 257–260.
- [Tho01] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold und S. R. Quake: „Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device“, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163–4166.
- [Tho02] T. Thorsen, J. S. ans S. Maerkl und S. R. Quake: „Microfluidic large-scale integration“, *Science* **2002**, *298*, 580–584.
- [Too92] B. P. Toole: *Cell Biology of Extracellular Matrix* (Plenum Publishing Corp., New York, **1992**).
- [Toy87] Y. Y. Toyoshima, S. J. Kron, E. McNally, K. R. Niebling, C. Toyoshima und J. A. Spudich: „Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro“, *Nature* **1987**, *328*, 536–539.
- [Tri04] W. R. Trickey, T. P. Vail und F. Guilak: „The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes“, *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 131–139.
- [Tsk97] L. Tskhovrebova, J. Trinick, J. A. Sleep und R. M. Simmons: „Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin“, *Nature* **1997**, *387*, 308–312.
- [Ulm05] J. Ulmer: „Quantitative measurements of force distribution in single and multi cellular systems“, *Dissertation* **2005**.
- [Ung00] M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer und S. R. Quake: „Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography“, *Science* **2000**, *288*, 113–116.
- [Upa03] A. Upadhyaya und A. van Oudenaarden: „Biomimetic systems for studying actin-based motility“, *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R734–R744.

- [Ver00] R. Verma, J. C. Crocker, T. C. Lubensky und A. G. Yodh: „Attractions between hard colloidal spheres in semiflexible polymer solutions“, *Macromolecules* **2000**, *33*, 177–186.
- [Vis92] K. Visscher und G. J. Brakenhoff: „Theoretical study of optically induced forces on spherical particles in a single beam trap I: Rayleigh scatterers“, *Optik* **1992**, *89*, 174–180.
- [Vis93] K. Visscher, G. J. Brakenhoff und J. J. Krol: „Micromanipulation by multiple optical traps created by a single fast scanning trap integrated with the bilateral confocal scanning microscope“, *Cytometrie* **1993**, *14*, 105–114.
- [Vli03] K. V. Vliet, G. Bao und S. Suresh: „The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules“, *Acta. Mater.* **2003**, *51*, 5881–5905.
- [Vog88] S. Vogel: *Lifes devices: the physical world of animals and plants* (Princeton University Press, Princeton, **1988**).
- [VS02] K. Volke-Sepulveda, V. Garcés-Chávez, S. Chávez-Cerda, J. Arlt und K. Dholakia: „Orbital angular momentum of a high-order Bessel light beam“, *J. Opt. B* **2002**, *4*, S82–S89.
- [Wan45] M. C. Wang und G. E. Uhlenbeck: „On the theory of the Brownian motion II“, *Rev. Mod. Phys.* **1945**, *17*, 323–341.
- [Wan97] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles und S. M. Block: „Force-extension relationships were measured for single DNA molecules using a position clamp“, *Biophys. J* **1997**, *72*, 1335–1346.
- [Wan02] G. M. Wang, E. M. Sevick, E. Mittag, D. J. Searles und D. J. Evans: „Experimental demonstration of violations of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales“, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 050601.
- [War93] H. M. Warrick, R. M. Simmons, J. T. Finer, T. Q. P. Uyeda, S. Chu und J. A. Spudich: „In vitro methods for measuring force and velocity of the actin-myosin interaction using purified proteins“, *Methods Cell Biol.* **1993**, *39*, 1–21.
- [Weg75] A. Wegner und J. Engel: „Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments“, *Biophys. Chem.* **1975**, *3*, 215–225.
- [Weg76] A. Wegner: „Head to tail polymerization of actin“, *J. Mol. Biol.* **1976**, *108*, 139–150.
- [Wel99] M. D. Welch: „The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex“, *Trends Cell. Biol.* **1999**, *9*, 423–427.

- [Whe03] A. R. Wheeler, W. R. Throdsset, R. J. Whelan, A. M. Leach, R. Zare, Y. H. Liao, K. Farrell, I. D. Manger und A. Daridon: „Microfluidic Device for Single-Cell Analysis“, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3581–3586.
- [Win05] S. J. Winder und K. R. Ayscough: „Actin-binding proteins“, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 651–654.
- [Wu04] H. Wu, A. Wheeler und R. N. Zare: „Chemical cytometry on a picoliter-scale integrated microfluidic chip“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12809–12813.
- [Wui00] G. J. Wuite, R. J. Davenport, A. Rappaport und C. Bustamante: „An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules“, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1155–1167.
- [Xi05] J. Xi, J. J. Schmidt und C. D. Montemagno: „Self-assembled micro-devices driven by muscle“, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 180–184.
- [Xia98] Y. N. Xia und G. M. Whitesides: „Softlithographie“, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568–594.
- [Yod01] A. Yodh, K.-H. Lin, J. C. Crocker, A. D. Dinsmore, R. Verma und P. D. Kaplan: „Entropically driven self-assembly and interaction in suspension“, *Phil. Trans. Roy. Soc. A* **2001**, *359*, 921–937.
- [Zhe04] B. Zheng, J. Tice und R. F. Ismagilov: „Formation of droplets of alternating composition in microfluidic channels and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays“, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4977–4982.
- [Zim02] E. Zimmerman, B. Geiger und L. Addadi: „Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan“, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1848–1857.

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen, die aus der vorgelegten Arbeit resultieren:

- C. H. J. Schmitz, J. E. Curtis und J. P. Spatz:
„Constructing and probing biomimetic actin networks with holographic optical tweezers“
Proc. SPIE **2004**, *5514*, 446-454.
- C. H. J. Schmitz, J. E. Curtis und J. P. Spatz:
„Symmetrie dependence of holograms for optical trapping“
Opt. Lett. **2005**, *30*, 2086-2088.
- C. H. J. Schmitz, J. P. Spatz und J. E. Curtis:
„High-precision steering of multiple holographic optical traps“
Opt. Express **2005**, *13*, 8678-8685.
- C. H. J. Schmitz, K. Uhrig, J. P. Spatz und J. E. Curtis:
„Tuning the orbital angular momentum in optical vortices“
Appl. Phys. Lett. **2005**, *eingereicht*.

Darüber hinaus publizierte Arbeiten, entstanden in einer Kooperation während der Promotionsphase:

- L. Schröder, C. H. J. Schmitz und P. Bachert:
„Phase modulation in dipolar-coupled A_2 spin systems: effect of maximum state mixing in ^1H NMR in vivo“
J. Magn. Reson. **2004**, *171*, 207-212.
- L. Schröder, C. H. J. Schmitz und P. Bachert:
„Molecular dynamics and information on possible sites of interaction of intramyocellular metabolites in vivo from resolved dipolar couplings in localized ^1H NMR spectra“
J. Magn. Reson. **2004**, *171*, 213-224.
- L. Schröder, C. H. J. Schmitz und P. Bachert:
„Cumulative “roof effect“ in high-resolution in vivo ^{31}P NMR spectra of human calf muscle and the Clebsch-Gordan coefficients of ATP at 1.5 T“
J. Magn. Reson. **2005**, *174*, 68-77.

Danksagung

Zu allererst geht mein Dank an Prof. Joachim Spatz: natürlich für das äußerst interessante und herausfordernde Thema, die perfekte Ausstattung und die vielfältigen Möglichkeiten und Gelegenheiten, meine Arbeit zu präsentieren und zu diskutieren, insbesondere aber für sein Vertrauen, das mir in manch verzweifelter Phase neuen Mut und Motivation gegeben hat.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Rainer Fink für seine Bereitschaft, das Gutachten für diese Arbeit zu erstellen und die Bereitstellung des Aktins und verschiedener Gerätschaften zur Proteinaufbereitung.

Großen Dank schulde ich Jennifer Curtis, dem Kopf unserer kleinen Pinzettengruppe, für unzählige Diskussionen, Unterstützung bei den Experimenten und Hilfestellung bei allen erdenklichen Problemen. Dankeschön!

Bedanken möchte ich mich bei Kai Uhrig für seine großartige Unterstützung bei den Experimenten und seine konstruktiven Diskussionsbeiträge.

Mein Dank geht an Prof. Peter Bachert und Leif Schröder vom DKFZ für die fruchtbare Kooperation während der vergangenen Jahre.

Für das Engagement, Interesse und die investierte Arbeit von Dennis von Berlepsch, Kerstin Schmöe, Peter Kaiser, Martin Loose, Roland Heym und Andreas Bonertz, die als Praktikanten und HiWis die Pinzettengruppe unterstützt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Nicht zu vergessen sind die beiden Spatzen 1 und 2: Mein Dank geht an Wouter Roos für die Einarbeitung in die Aktinhandhabung und Lithographietechniken sowie an Alexandre Micoulet, meinem ehemaligen Labornachbarn. Ihr Interesse an dieser Arbeit und ihr kritisches Hinterfragen haben zu vielen fruchtbaren Diskussionen geführt und den Anstoß für manche Entwicklung geliefert.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Boczek für den reibungslosen Ablauf des nicht zu unterschätzenden Drumherum.

Ich bedanke mich bei Monika Rusp aus der Gruppe von Prof. Erich Sackmann für die Aktinpräparation und perfekte Lieferung der Proteine, ebenso bei Tobias Ober und Conny Weber aus der Gruppe von Prof. Rainer Fink für die Unterstützung bei der Aktinaufreinigung.

Mein Dank geht an Herrn Weiss und die gesamte Feinmechanikwerkstatt für die Herstellung einer Vielzahl von Bauteilen, an Herrn Wolf für seine Unterstützung bei den Reinraumarbeiten und an Richard Morlang für die technische Unterstützung.

Danken möchte ich dem Fonds der chemischen Industrie, der meine Promotionsarbeit mit einem Kekulé-Stipendium unterstützt und gefördert hat.

Für das zeitintensive und nicht immer einfache Korrekturlesen möchte ich mich ganz herzlich bei Heike Böhm, meiner Mutter, Kai Uhrig, Jacques Blümmel, Babak Hosseini und Jennifer Curtis bedanken.

Besonders danken möchte ich der 8-Uhr-Frühstücks-Gruppe Kai Uhrig, Babak Hosseini, Heike Böhm und Theo Lohmüller für den motivierenden Start in den Tag und die vielfältigen erfrischenden Diskussionen, in denen es galt, über den Tellerrand hinaus zu schauen.

Mein Dank geht an die Dauerlaufgruppe mit Theo Lohmüller und Sebastian Lechner, die einen wunderbaren Ausgleich zur Arbeit bot.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern für die große Unterstützung während der gesamten Studienzzeit und das uneingeschränkte Vertrauen, das sie mir geschenkt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei der gesamten Spatzgruppe für die ganz besondere, quirlige Atmosphäre herzlich bedanken!



Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den 10. November 2005

.....
Christian Schmitz