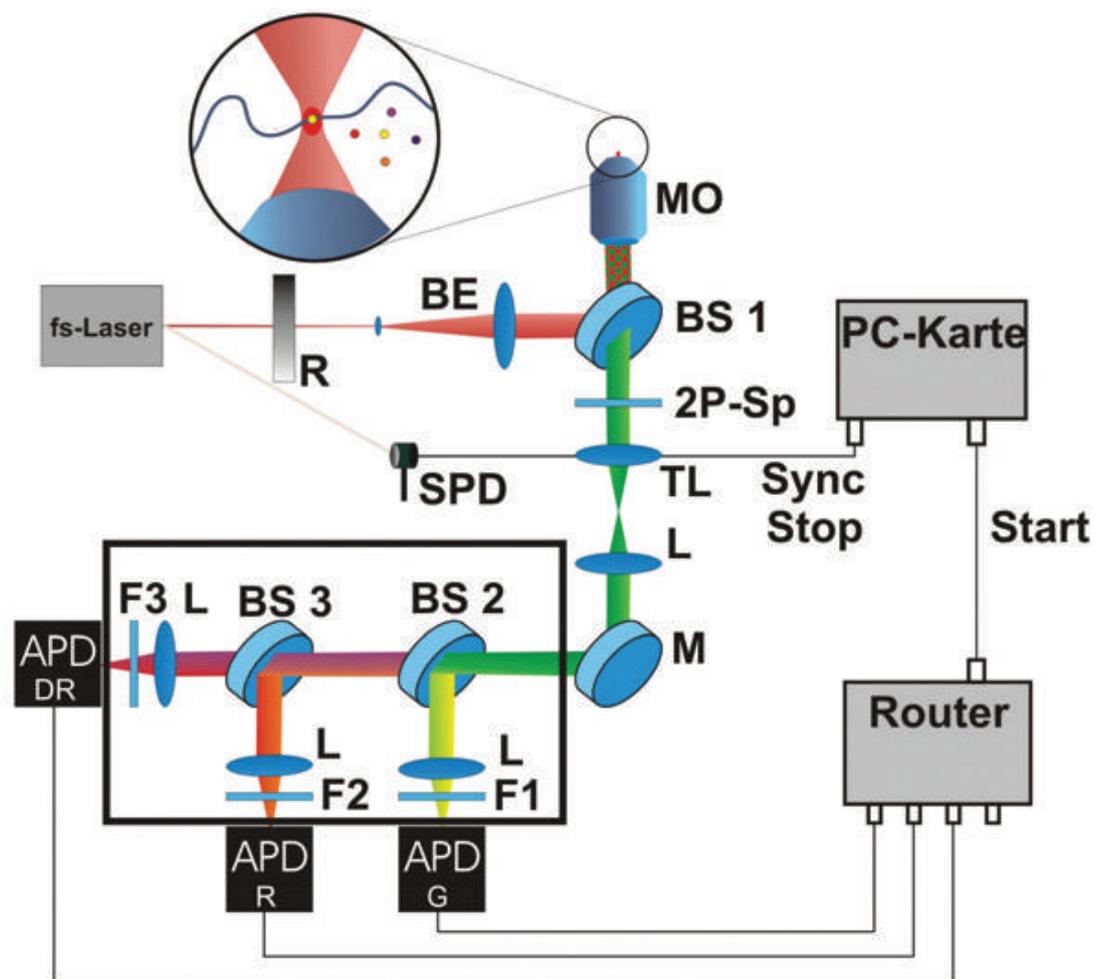


Konfokale Einzelpartikel-Detektion von fluoreszenz-kodierten Nanospheres



Konfokale Einzelpartikel-Detektion von fluoreszenz-kodierten Nanospheres

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Hendrik Hippchen
aus Thuine

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-606-1

1. Referent:	Professor Dr. Peter Jomo Walla
2. Referent:	Professor Dr. Karl-Heinz Gericke
eingereicht am:	20.02.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	05.05.2008

Druckjahr 2008

Veröffentlichung einer Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-606-1

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Einleitung	9
3	Theoretische Grundlagen	11
3.1	Grundlagen der Fluoreszenz.....	11
3.2	Fluoreszenz über Zweiphotonen-Anregung	14
3.2.1	Vorteile der Zweiphotonen-Anregung	15
3.3	Kenngrößen der Fluoreszenz.....	16
3.3.1	Die Fluoreszenzlebensdauer	16
3.3.2	Photobleaching und Quenching.....	18
3.3.3	Resonanter Energie-Transfer	19
3.4	Das Messsystem	23
3.4.1	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	23
3.4.2	Störsignale bei der Fluoreszenzmessung	24
3.4.3	Gepulste Titan-Saphir Lasersysteme	25
3.4.4	Lawinenphotodioden.....	27
3.4.5	Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen.....	27
3.5	Kurvenanpassung mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus	30
3.6	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	31
3.6.1	Die Autokorrelationsfunktion	31
3.6.2	Die Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie	35
3.6.3	Fokalvolumeneffekte auf die FCS Analyse.....	37
4	Experimenteller Teil.....	41
4.1	Die Messapparatur	41
4.1.1	Der Titan-Saphir Laser.....	41
4.1.2	Der konfokale Fluoreszenzmikroskopaufbau	42
4.1.3	Die Avalanche Photodioden	44
4.1.4	Die Datenaufnahme und Speicherstruktur.....	45

4.2	Die verwendeten Proben	46
4.3	Einphotonen-Absorptionsspektren	48
4.4	Einphotonen-Emissionsspektren	48
4.5	Zweiphotonen-Emissionsspektren	48
5	Datenauswertung.....	49
5.1	Datensegmentierung und Glätten.....	49
5.2	Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer	50
5.3	Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsanalyse	51
5.4	Bursterkennung und –validierung.....	53
5.5	Burstcharakterisierung.....	56
5.6	Generierung der Identifikationsfilterfunktionen	57
5.6.1	Der Lebensdauerfilter	57
5.6.2	Der Verhältnisfilter	58
5.6.3	Der Segmentfilter	58
5.7	Burstidentifikation.....	60
5.7.1	Identifikation mit Lebensdauer- und Verhältnisfiltern.....	60
5.7.2	Identifikation mit dem Segmentfilter.....	61
6	Ergebnisse	64
6.1	Charakterisierung der Nanosphere-Typen	64
6.1.1	Absorptions- und Emissionsspektren	64
6.1.2	Zeitspuren und prozentuale Gesamtphotonenverteilung auf die Detektoren.....	70
6.1.3	Gesamtfluoreszenzlebensdauern	73
6.1.4	FCS-Messungen	80
6.1.5	Auswahl der Typen für die Burstidentifikationsanalyse	83
6.2	Charakterisierung der Filterverteilungen.....	84
6.2.1	Charakteristika der Lebensdauerfilter.....	84
6.2.2	Charakteristika der Verhältnisfilter.....	87
6.2.3	Charakteristika der Segmentfilter	90

6.3	Anwendungen der Filterfunktionen.....	96
6.3.1	Simulation von Burstüberlappungen.....	96
6.3.2	Identifikationsresultate bei typenreinen Proben.....	101
6.3.3	Identifikationsresultate bei Mischungen mehrerer Typen	103
7	Ausblick.....	109
A	Abbildungsverzeichnis	113
B	Abkürzungsverzeichnis	116
C	Quellcode des Hauptprogramms	117
D	Quellcode der Zeitspuren.....	121
E	Quellcode der Ensemble-fluoreszenzlebensdauern	122
F	Quellcode der FCS und FCCS Bestimmung.....	124
G	Quellcode der Burstfindung	125
H	Quellcode der Burstcharakterisierung.....	127
I	Quellcode der Burstidentifikation	129
J	Quellcode der Burstsimulation	131
K	Quellcode der Bursthistogramme	132
L	Quellcode des Filterschreibens und -lesens	135
M	Quellcode der Grenzwertfindung	137
N	Literaturverzeichnis.....	138
	Danksagung.....	145
	Lebenslauf	146

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einzelne fluoreszenz-kodierte Nanopartikel von der Größe 20-40 nm bei diffusiven Durchgängen durch ein konfokales Fokolvolumen mit einem Radius von 200-300 nm identifizieren und charakterisieren zu können. Hintergrund hierbei ist, dass durch die Kodierung eine große Anzahl verschiedener Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in kurzer Zeit in einem einzelnen parallelen Reaktionsansatz untersucht werden kann, was insbesondere bei Massendurchsatzverfahren, wie z.B. der DNA-Analyse oder der Analyse von Glycokonjugaten, von Vorteil ist.

Zunächst wurde hierzu eine konfokale Mikroskopapparatur mit einer gepulsten Ti:Sa-Laserquelle zur Zweiphotonen-Anregung aufgebaut und detektionsseitig die emittierte Fluoreszenz in drei spektralen Regionen separat aufgezeichnet. Die aus den Messungen erhaltenen Daten wurden dann mit einer selbst programmierten Software ausgewertet. Für die parallelisierten Messungen mussten effektive Identifikationsalgorithmen programmiert, evaluiert und getestet werden. Hierzu war es erforderlich, zur Differenzierung geeignete Charakteristika der auftretenden Photonenbursts zu finden und die zur Verfügung stehenden Nanopartikel diesbezüglich zu analysieren.

Aus den Absorptions- und Emissionsspektren der Partikel zeigte sich bei den mehrfach gefärbten Typen, dass insbesondere bei der Zweiphotonen-Anregung effektiv nur das am langwelligsten emittierende Fluorophor Photonen abgibt.

Es stellte sich heraus, dass hierfür effektive Förster-Resonanz-Energietransfer-Prozesse (FRET) verantwortlich sind, die durch große Spektralüberlappungen und kleinen Fluorophorabständen in den Partikeln begünstigt werden.

Dadurch, dass die Unterscheidung mehrfach angefarbter Partikeltypen anhand ihrer Fluoreszenzemissionen durch FRET-Prozesse erschwert ist, wurde zunächst die parallele Unterscheidung einfach angefarbter Typen untersucht. Für diese Typen wurden dann über multiple Messungen typenreiner Proben Filterverteilungen der Identifikationsparameter aufgenommen und abgeschätzt, inwiefern die Identifikationsalgorithmen in der Lage sein sollten, sie zu unterscheiden. Um Einflüsse von Burstüberlappungen und peripheren Passagen zu quantifizieren, wurde eine Simulation programmiert und die verschiedenen Algorithmen auf die resultierenden Zeitspuren angewendet.

Die Effizienz verschiedener Algorithmen die einzelnen Typen zu differenzieren, wurde dann zunächst an fünf Einpartikelsystemen getestet wobei eine nahezu hundertprozentige Identifikation erreicht wurde. Die Anwendung der Algorithmen

auf alle möglichen Permutationen an Mehrkomponentensystemen zeigte teilweise geringfügig höhere Fehlerraten als bei den Einkomponentensystemen, allerdings konnten einzelne Nanopartikel immer noch mit einer Sicherheit von mehr als 95 % identifiziert werden.

Bei der Analyse von einzelnen Fluoreszenzbursts konnten weitere interessante Phänomene beobachtet werden. So zeigten Messungen der Fluoreszenzlebensdauer an Ensembles einiger Partikel und bei der Einzelburstfluoreszenzlebensdauer aller Partikel eine Abhängigkeit von der Anregungsleistung. Die Begründung liegt hierbei in der Zunahme äußerst effektiver zusätzlicher FRET-Wege angeregter Zustände. Darüber hinaus wurden Effekte auf die Fluoreszenzlebensdauer als Funktion der Partikelgröße beobachtet. Der Vergleich von Partikeln verschiedener Größe zeigte eine Reduzierung der Lebensdauer mit zunehmender Partikelgröße, was durch die Veränderung der Populationsverhältnisse zugunsten der schneller relaxierenden Fluorophore im Kugelnkern bedingt ist. Weitere Effekte auf die Komponenten der Fluoreszenzabklingdynamiken konnten durch veränderte Geometrie und multiplen Homoenergietransfer erklärt werden.

Bei der Autokorrelationsanalyse zeigte sich eine stark typenspezifische Abhängigkeit des Fokalvolumens von der Laserleistung, die proportional zur jeweiligen Anregbarkeit der Partikel war.

Zusammenfassend ist es gelungen, extrem effiziente Identifikationsalgorithmen für diffusive Durchgänge einzelner Nanopartikel zu entwickeln.

Zukünftige Arbeiten werden sich mit der selektiven Bestückung der verschiedenen Partikel mit unterschiedlichen Liganden und parallelisierten Messungen ihrer Interaktionen mit Zielmolekülen, wie z.B. Lektinen, befassen. In einer in ChemBioChem [12] veröffentlichten Arbeit, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Belegung von einfach gefärbten Nanopartikeln mit unterschiedlichen Oligosacchariden die Messung von relativen Lektin-Bindungsaffinitäten erlaubt. Diese Messungen lassen sich mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren nun auf die simultane Messung von Affinitäten und Kreuzaffinitäten ganzer Oligosaccharid-Bibliotheken erweitern. Die durch FRET-Prozesse verursachte Differenzierungsproblematik bei mehrfach angefärbten Nanopartikeln wird sich in zukünftigen Entwicklungen durch selektive Anregung der unterschiedlichen Absorptionsbanden, die auch als Kodierungsmerkmal verwendet werden können, umgehen lassen.

2 Einleitung

Sequenzierungen von DNA, Analysen von Glykoproteinen und die Suche nach geeigneten, pharmakologisch wirksamen Molekülen stellen aufgrund der hohen Komplexität der Systeme und der enormen Anzahl durchzuführender Einzelmessungen spezielle Anforderungen an die Wissenschaft. Aus diesen Forschungszweigen entstand das Gebiet der Massendurchsatzanalysen (HTS, *High-Throughput-Screening*), welches diese Herausforderungen z.B. mit umfangreichen Molekülbibliotheken sowie Miniaturisierung und Automatisierung der Systeme bewältigt. Zwei grundlegende Konzepte werden hauptsächlich angewendet. Zum einen die *Microarrays*, auch *Biochips* genannt, und zum anderen Mikrofluide Systeme [1]. Die *Microarrays*systeme zeichnen sich hierbei dadurch aus, dass auf engstem Raum ein Bereich mit einem bestimmten Liganden markiert ist, welcher dann potentiell mit einem anderen Molekül interagiert. Der Nachweis der gebildeten Komplexe erfolgt meist unter Detektion von Fluoreszenz. Mikrofluide Systeme, wie sie z.B. in der Analysentechnik „*Flow-Cytometry*“ benutzt werden, weisen mehrere spektroskopisch differenzierbare Liganden in einem Einzelmessvolumen auf. Potentielle Reaktionen mit einem durch einen zusätzlichen Marker gekennzeichneten Zielmolekül können auf diese Weise simultan für eine Vielzahl möglicher Kombinationen getestet werden. Optimierungspotential besteht hierbei in der Entwicklung von Ligandensystemen, die eine Vielzahl unterscheidbarer Spezies erlauben. Eine Technik, die dies ermöglicht, ist die Nutzung von Nanopartikeln als Trägermaterial der Liganden. Diese Partikel können mit verschiedenen Markern in variierenden Konzentrationen ausgestattet werden, was als „*Multiplexing*“ oder auch „*Barcoding*“ bezeichnet wird [2-6]. Ein Nachteil dieser Techniken liegt darin, dass sowohl Ligand als auch das Zielmolekül markiert sein müssen. Die zumeist kleinen Liganden erfahren hierdurch in der Regel keine strukturellen Veränderungen. Bei den größeren Zielmolekülen, wie z.B. Proteinen, kann die Markierung die biologische Wirkung unter Umständen stark beeinträchtigen, wobei das Ausmaß von der Markierungsposition abhängt [7]. Aus diesem Grund wird an einer Vielzahl labelfreier Detektionstechniken wie z.B. *Surface Plasmon Resonance* [8], *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* [9], *Deep Nulling Microscopy* [10] und *Photothermal Interference Contrast Microscopy* [11] geforscht.

Des Weiteren arbeiten die gängigen *Multiplexing* Systeme mit Partikeln im Mikrometerbereich, was es notwendig macht, ein aktives Transportsystem anzuwenden und somit Größenabschätzungen von Komplexen durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ausschließt. In einer vorherigen Veröffentlichung hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, wie relative Bindungsaffinitäten von Lektinen mit kohlenhydratmarkierten fluoreszierenden Nanopartikeln über das Agglomerationsverhalten mittels FCS gemessen werden können. Hierzu war keine Markierung des Lektins erforderlich [12].

In der vorliegenden Arbeit soll das Prinzip des Multiplexing auf 20 nm große fluoreszente Partikel unter Zweiphotonen-Anregung erweitert werden. Hierbei müssen die hohe statistische Varianz der Partikel, die durch geringere Fluoreszenzintensität bedingte schlechtere Datenqualität sowie Energietransferprozesse innerhalb der Partikel berücksichtigt werden. Ein Großteil der Arbeit widmete sich der Entwicklung, Programmierung und Erprobung geeigneter Identifikationsalgorithmen und Evaluationssoftware für die Fluoreszenzparameter. Weiterhin galt es diesbezüglich eine genaue Charakterisierung der Nanopartikel und deren Fluoreszenzparameter bei variierenden Bedingungen in dem Messaufbau durchzuführen, auftretende Effekte zu quantifizieren und potentiell unterscheidbare Typen zu sondieren.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Relaxation aus elektronisch angeregten Zuständen unter Emission elektromagnetischer Wellen des sichtbaren Spektrums lässt sich in Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterteilen. Phosphoreszenz geschieht aus einem angeregten Triplett-Zustand und Fluoreszenz aus einem angeregten Singulett-Zustand. Die Zeitkonstanten der Relaxation über Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheiden sich aufgrund der Auswahlregeln für elektronische Dipolübergänge um mehrere Größenordnungen. Bei dem Molekül im S_1 -Zustand ist das Elektron im angeregten Orbital mit jenem im Grundzustand gepaart und die Rückkehr daher drehimpulserlaubt. Beim T_1 -Zustand sind die Elektronen hingegen ungepaart was einen drehimpulsverbotenen Übergang bedingt. Hieraus resultieren Lebensdauern der angeregten Zustände von ungefähr 10^{-8} s bzw. 10^{-3} s.

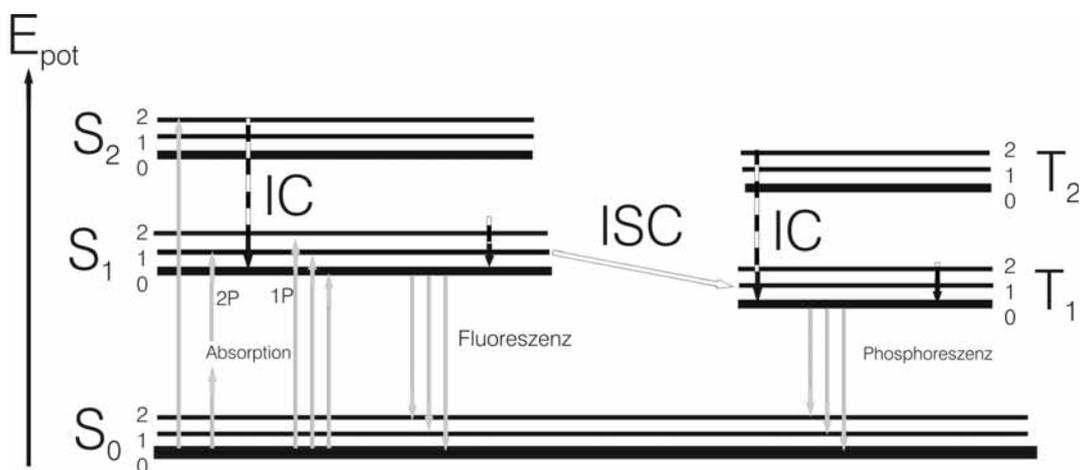


Abbildung 3.1: Darstellung der Singulett- und Triplett-Zustände mit den dazugehörigen Vibrationszuständen im Jablonski-Diagramm. Weiterhin sind die Zustandsübergänge durch Lichtanregung mit einem und zwei Photonen, Relaxation unter Fluoreszenz und Phosphoreszenz sowie *Internal-Conversion* (IC) und *Inter-System-Crossing* (ISC) dargestellt.

Zu beachten ist, dass Moleküle im T_1 -Zustand während der Lebensdauer des Zustands für Fluoreszenz nicht zur Verfügung stehen und sich somit die Konzentration der anregbaren Fluorophore temporär verringert. Das betroffene Fluorophor erscheint dunkel und steht erst nach erfolgter Phosphoreszenz

wieder für Fluoreszenz zur Verfügung. Diese An-Aus-Zustände werden auch als *Blinking* bezeichnet.

Die Anregung erfolgt in der Regel über Licht einer spezifischen Wellenlänge, z.B. durch Laserlicht. Die Anregung und Relaxation mittels Photonen werden auch als stimulierte Absorption und spontane Emission bezeichnet. Ein weiterer Prozess, die stimulierte Emission, spielt z.B. für Laser eine Rolle. Hierbei induziert ein Photon die Emission eines weiteren Photons aus einem angeregten Zustand. Dieses hat die Eigenschaft, kohärent zum induzierenden Photon vorzuliegen. Die für diese Übergänge benötigten bzw. frei werdenden Energien und die daraus resultierenden Wellenlängen λ des Lichts ergeben sich aus (3.1) und (3.2).

$$\left| E_f - E_i \right| = h\nu \quad (3.1)$$

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (3.2)$$

E_i und E_f stellen hier die potentielle Energie der Ausgangs- und Endzustände dar, h ist die Planck'sche Konstante, c die Lichtgeschwindigkeit und ν die Frequenz der Strahlung [13]. In allen Grund- und angeregten Zuständen können die Moleküle in verschiedenen Vibrationszuständen (0, 1, 2 ..., n) vorliegen.

Die Absorption eines Photons mit der Energie $\Delta E = h\nu$ erfolgt innerhalb von 10^{-15} s in einen höheren Schwingungszustand von S_1 oder S_2 , was für den Kern nicht ausreicht, um seine Position signifikant zu ändern. Dadurch wird ein breites Spektrum schwingungsangeregter Zustände mit variierender Wahrscheinlichkeit populiert. Dies ist das Franck-Condon Prinzip. Als nächstes folgt innerhalb einiger Picosekunden die Relaxation in den niedrigsten Schwingungszustand durch Energieabgabe an das umgebende Medium. Dieser Prozess wird als interne Konversion (*Internal Conversion*; IC) bezeichnet. Von hier erfolgt dann die Rückkehr unter Aussendung eines Photons in einen höheren Schwingungszustand von S_0 , welcher wiederum rasch schwingungsrelaxiert. Alternativ kann das Molekül unter Spinumkehr vom S_1 -Zustand in den T_1 -Zustand übergehen (*Inter-System-Crossing*; ISC). Zusammenfassend sind die Zustandsübergänge im sogenannten Jablonski-Diagramm dargestellt, siehe Abbildung 3.1. Hieraus ist weiterhin ersichtlich, dass die Energie der emittierten

Photonen im Allgemeinen etwas geringer als die der Absorbierten ist. Es kommt zu einer Rotverschiebung (*Stokes-Shift*) des Emissionsspektrums in Relation zum Absorptionsspektrum. Kashas Regel sagt aus, dass unabhängig von der Anregungswellenlänge bedingt durch die schnelle Relaxation in den niedrigsten Schwingungszustand ein konstantes Emissionsspektrum beobachtet wird [14]. Dies gilt jedoch nur, wenn die Fluorophore im jeweiligen Medium schnell durch Stoßrelaxation den niedrigsten Schwingungszustand erreichen können. Bei polaren Fluorophoren kann es in gefrorenen Lösemitteln oder eingebettet in Polymermatrizen, wie z.B. den in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden *Nanospheres*, dazu kommen, dass die Relaxation unvollständig ist und die Anregung am Absorptionsmaximum bzw. der roten Flanke zu einer zusätzlichen Rotverschiebung des Emissionsspektrums führt. Dies hat seine Ursache darin, dass bevorzugt Fluorophore mit einer stärkeren Van-der-Waals-Bindung angeregt werden, da sie bei niedrigeren Wellenlängen absorbieren und emittieren.

Um Licht im sichtbaren Spektralbereich von 380-750 nm zu absorbieren, muss das Molekül im Normalfall über ein extensives, delokalisiertes π -Elektronensystem verfügen. Nach dem „Teilchen im Kasten“ Modell gilt, dass mit zunehmender Ausdehnung des π -Systems, weniger Anregungsenergie benötigt wird. Es existieren weiterhin auch andere interessante fluoreszente Systeme, wie z.B. CdSe Halbleiter Nanokristalle (1-7 nm) genannt *Quantum Dots* [15]. Sie emittieren mit zunehmendem Durchmesser langwelliger und zeichnen sich durch ein schmales Emissionsspektrum sowie eine breitbandige Anregung aus. Diese Eigenschaften prädestinieren sie zum Farbkodieren von Polystyrolkugeln im Mikrometermaßstab, den sogenannten *Microspheres* in der Technik des *Multiplexing* [2, 4].

3.2 Fluoreszenz über Zweiphotonen-Anregung

Wie im Kapitel 3.1 beschrieben erfolgt die Anregung der Fluoreszenz im Allgemeinen über ein Photon geeigneter Wellenlänge. Es ist aber auch möglich die erforderliche Energie durch mehrere Photonen bereitzustellen. Diese Form der Anregung über zwei Photonen halber Energie wurde bereits 1931 von Maria Göppert-Mayer vorhergesagt [16].

Die Zweiphotonen-Anregung erfordert sehr hohe Lichtleistungen, da die beiden Photonen quasi simultan in 10^{-15} bis 10^{-16} Sekunden absorbiert werden müssen. Des Weiteren ist der $S_0 - S_1$ Übergang über zwei Photonen drehimpulsverboten, was dazu führt, dass die Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte der meisten Fluorophore mit 10^{-50} (cm^4s)/Photonen verglichen mit 10^{-16} cm^2 für den Fall der Einphotonen-Absorptionsquerschnitte sehr klein sind [17-20]. Für die Photonenflussdichte drehimpulsverbotener Übergänge bedeutet dies Werte von etwa 10^{31} Photonen/ (cm^2s) , was im Allgemeinen durch gepulste Lasersysteme wie z.B. einem modengekoppelten Titan-Saphir Laser, ermöglicht wird. Der erste experimentelle Nachweis wurde daher erst 30 Jahre später durch das Aufkommen geeigneter Lasersysteme von Kaiser und Garret realisiert [21].

Bei vielen Fluorophoren erscheint das Zweiphotonen-Absorptionsmaximum relativ zum doppelten des Einphotonen-Absorptionsmaximums blauverschoben. Die Erklärung hierfür liegt darin, dass aufgrund von Paritätsauswahlregeln bei der Zweiphotonen-Anregung die Population höherer Schwingungszustände als bei der Einphotonen-Anregung bevorzugt wird. Dies erklärt auch, dass die starken lokalen Absorptionsmaxima der Zweiphotonen-Anregung meist mit schwachen lokalen Absorptionsmaxima der Einphotonen-Anregung übereinstimmen [22, 23].

3.2.1 Vorteile der Zweiphotonen-Anregung

Die simultane Absorption von zwei Photonen führt zu einer quadratischen Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsleistung. Ein willkommener Effekt hiervon ist, dass nur im unmittelbaren Fokaltvolumen Fluoreszenz ermöglicht ist. Da die quadrierte Intensität in longitudinaler Richtung mit z^{-4} abnimmt, liegt eine hohe intrinsische Tiefenauflösung vor. Bei der Einphotonen-Anregung hingegen muss eine Lochblende benutzt werden, um Licht, welches nicht aus dem unmittelbaren Fokaltvolumen kommt, zu blockieren [24]. Typische Fokaltvolumina liegen bei weniger als einem Femtoliter [25-27].

Bei der von Webb et al. realisierten Zweiphotonen-Mikroskopie wird die automatische Tiefenschärfe der Zweiphotonen-Anregung ausgenutzt um dreidimensional selektiv *Photobleaching* durchzuführen [28]. Insbesondere Berland et al. adaptierten die Prinzipien der Zweiphotonen-Anregung für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, wobei das definierte Fokaltvolumen zu einer apparativen Vereinfachung führt [29, 30]. Die Zweiphotonen-Anregung eignet sich, aufgrund des räumlich stark limitierten Fokaltvolumens in welchem *Photobleaching* abläuft, auch zur Reduzierung von Photodegradation in kleinen Probenvolumina, wie z.B. Zellen mit wenigen Fluorophoren [24, 28].

Für die Untersuchung von anderweitig nicht zugänglichen Zuständen und den involvierten Mechanismen ist die Zweiphotonen-Anregung ein wertvolles Werkzeug. Sie ermöglicht es, Zustände, die für Einphotonen-Anregung Symmetrieübergangsverboten sind, wie z.B. den S_1 -Zustand im Photosystem *I*, zu populieren und zu untersuchen [31, 32].

Ein weiterer apparativer Vorteil der Zweiphotonen-Anregung liegt darin, dass es wesentlich effektiver und einfacher ist, Anregungs- vom Emissionslicht zu trennen. Bei der Einphotonen-Anregung ist die Unterscheidung vom *Stokes-Shift* abhängig. Dieser ist aber im Normalfall nicht so ausgeprägt, dass die Spektren komplett voneinander separiert werden können. Das Anregungsspektrum mit zwei Photonen hingegen liegt naturgemäß sehr stark rotverschoben gegen das Emissionsspektrum vor.

3.3 Kenngrößen der Fluoreszenz

Zwei wichtige Größen, die das Fluoreszenzverhalten eines Moleküls charakterisieren, sind die Fluoreszenzlebensdauer τ_f und die Quanteneffizienz Q . Die Quanteneffizienz gibt an, wie viele der zuvor absorbierten Photonen wieder als Photon emittiert werden, statt die zugeführte Energie über nichtstrahlende Prozesse abzugeben. Kommerziell erhältliche Fluorophore haben heutzutage eine nahezu hundertprozentige Quanteneffizienz im optimalen Lösemittel. Fluoreszenz ist ein zufälliger, statistischer Prozess und die Fluoreszenzlebensdauer ist als die durchschnittliche Verweilzeit der Moleküle im angeregten Zustand definiert.

3.3.1 Die Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer einer durch einen infinitesimal schmalen δ -Puls angeregten Ausgangspopulation n_0 , wird durch zwei Zeitkonstanten beeinflusst, die die Relaxation in den Grundzustand charakterisieren. Zum einen kann die Relaxation unter Strahlungsabgabe mit der dazugehörigen Zeitkonstante Γ erfolgen. Dies ist eine molekülspezifische Größe. Zum anderen kann die Energie nichtstrahlend abgegeben werden, was durch die Zeitkonstante k_{nr} , beschrieben wird. Die nichtstrahlenden Prozesse werden stark durch externe Faktoren wie z.B. dem umgebenden Lösemittel beeinflusst.

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr}) n(t) \tag{3.3}$$

$$n(t) = n_0 e^{\left(-t/\tau_f\right)}$$

Die strahlungslose Rückkehr in den Grundzustand wird durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst und kann unter multiplen Mechanismen ablaufen. Als Beispiele seien hierzu statisches und dynamisches *Quenching* sowie Energietransfer-Prozesse genannt (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3) [33]. Es ist ebendiese Empfindlichkeit der Fluoreszenzlebensdauer bezüglich verschiedener Parameter, die sie zu einem wichtigen spektroskopischen Werkzeug macht.

Der in Gleichung (3.3) beschriebene monoexponentiale Abfall hat nur Gültigkeit, wenn das beobachtete Fluorophorensemble, über welches gemittelt wird, eine uniforme Umgebung aufweist. Kann das Ensemble in zwei Subpopulationen differenziert werden, so weisen diese unterschiedliche Lebensdauern auf und es resultiert ein biexponentieller Abfall, der als Superposition zweier monoexponentieller Abfälle gesehen werden kann. In Gleichung (3.4) ist dieses Prinzip für beliebig viele Subpopulationen verallgemeinert, wobei τ_i die Lebensdauern der einzelnen Populationen mit den Amplituden α_i darstellt. Die Population $n(t)$ ist hier durch die zu ihr proportionale messbare Fluoreszenzintensität $I(t)$ substituiert.

$$I(t) = \sum \alpha_i e^{\left(-t/\tau_{f,i}\right)} \quad (3.4)$$

Für in Lösemittelmischungen oder in Polymeren eingebettete Fluorophore, wie z.B. bei den verwendeten *Nanospheres*, können keine diskreten Lebensdauern erwartet werden, da jedes Fluorophor im Prinzip eine einzigartige Umgebung aufweist. Es ergeben sich vielmehr Lebensdauerverteilungen und es muss α_i in Gleichung (3.4) durch Verteilungsfunktionen α_τ substituiert werden. Weiterhin muss integriert statt summiert werden. Alternativ wird, insbesondere in der Polymerforschung, der Ausdruck des gestreckten Exponentialabfalls benutzt, wobei β mit den Lebensdauerverteilungen zusammenhängt, siehe Gleichung (3.5).

$$I(t) = \int_{\tau=0}^{\infty} \alpha_\tau e^{\left(-t/\tau\right)} d\tau \quad (3.5)$$

$$I(t) = I_o e^{\left[(-t/\tau)^\beta\right]}$$

Transiente Effekte, die direkt nach der Anregung erfolgen, wie z.B. Kollisionsquenching oder resonanter Energie-Transfer (RET), können zu nicht-exponentiellen Abklingdynamiken führen. Es versteht sich, dass für komplexere Fluoreszenzabfallmodelle erhöhte Datenqualität wie auch Datenquantität erforderlich ist. Es wurde von Köllner et al. berechnet, dass, um einem monoexponentiellen Abfall mit einer Abweichung von zehn Prozent eine Lebensdauer zuzuordnen nur 185 Photonen notwendig sind. Erhöht sich die

Komplexität des Systems auf einen biexponentiellen Abfall, so sind hierfür bereits 400000 Photonen notwendig [34].

Aus der Vielzahl der Techniken, die die Fluoreszenzlebensdauer nutzen, seien hier „*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*“ (FLIM), „*Burst Integrated Fluorescence Lifetime*“ (BIFL) und „*Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis*“ (FILDA) beispielhaft genannt [35-38].

3.3.2 Photobleaching und Quenching

Wann immer Fluoreszenzmessungen insbesondere bei hohen Anregungsintensitäten durchgeführt werden, müssen Zerstörungsprozesse der Fluorophore berücksichtigt werden, die zur Erniedrigung der Fluoreszenz beitragen [39, 40]. Beim sogenannten *Photobleaching* wird das Fluorophor durch die hohe Lichtleistung in seiner Struktur so verändert, dass es nicht mehr fluoreszent ist. Dies geschieht z.B. über die Reaktion metastabiler Zustände mit Sauerstoffradikalen [39]. Das Entfernen von Sauerstoff bzw. die Verwendung von Radikalfängern wie L-Ascorbinsäure kann das *Photobleaching* reduzieren. Eggeling und Ambrose haben abgeschätzt, dass optimierte Fluorophore im Schnitt 10^5 bis 10^6 Fluoreszenzzyklen durchlaufen können bevor sie irreversibel gebleicht werden [41, 42]. Die Fluoreszenztechnik FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), nutzt das *Photobleaching* aus, um Aussagen über die Mobilität der Fluorophore zu treffen [43].

Weitere Effekte, die die Fluoreszenzintensität I reduzieren, werden als *Quenching* bezeichnet. Hierbei kann zwischen statischem und dynamischem *Quenching* unterschieden werden.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (3.6)$$

Beim statischen *Quenching* bildet das Fluorophor einen nichtfluoreszenten Komplex mit dem *Quencher*. Das dynamischen *Quenching* über Kollisionen wird durch die Stern-Volmer Gleichung (3.6) beschrieben [44]. K stellt hierbei die Stern-Volmer Konstante dar, $[Q]$ ist die *Quencher* Konzentration, τ_0 ist die ungequenchte Fluoreszenzlebensdauer und k_q die biomolekulare Konstante des *Quenchings*. Der Kontakt zwischen Fluorophor und *Quencher* führt dazu, dass

das Fluorophor deaktiviert wird. Der Mechanismus des *Quenchings*, wie z.B. Elektronentransfer, ISC oder Spin-Bahn-Kopplung, variiert hierbei je nach Fluorophor-*Quencher*-Paarung [45].

3.3.3 Resonanter Energie-Transfer

Ein Spezialfall des *Quenchings* ist der sogenannte resonante Energie-Transfer zwischen einem Donor-Fluorophor und einem oder mehreren Akzeptoren. Für RET ist es notwendig, dass sich das Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt [46]. RET des Förster-Typs erfolgt hierbei ohne intermediate Photonen, über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung und erlaubt alle Transferprozesse, bei denen keine Spinänderung beim Übergang des Akzeptors involviert ist.

Sowohl klassische als auch quantenmechanische Überlegungen führen zu ähnlichen physikalischen Beschreibungen von RET. Mit den resultierenden Gleichungen (3.7) und (3.8) lässt sich aus den spektroskopischen Eigenschaften von Donor und Akzeptor sowie der Quanteneffizienz des Donors, die Zeitkonstante des Energietransfers $k_T(r)$ sowie der Förster-Abstand R_0 berechnen. Dieser ist als Molekülabstand definiert, bei dem die Transfereffizienz E 50 % beträgt (3.10).

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} * \left(\frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 N \eta^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.7)$$

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 N \eta^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.8)$$

Dabei sind: Q_D = Quanteneffizienz des Donors ohne Akzeptor
 η = Brechungsindex des Mediums
 N = Avogadrozahl
 ε_a = Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei λ
 κ^2 = Orientierungsfaktor der Übergangsdipole
 $F_D(\lambda)$ = Fluoreszenzintensität des Donors

Wie effizient diese Prozesse stattfinden, hängt also im Wesentlichen von zwei Faktoren ab, zum einen vom Abstand zwischen den Fluorophoren r und zum anderen vom Grad der Spektralüberlappung. $k_T(r)$ hängt des Weiteren noch von der Fluoreszenzlebensdauer des Donors $\tau_{f,Donor}$ in Abwesenheit von RET ab.

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_{f,Donor}} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3.9)$$

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (3.10)$$

Da Förster-Abstände im Allgemeinen im Bereich von 2 bis 6 nm liegen und die Effizienz des Prozesses umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Radius ist (siehe Gleichungen (3.9) und (3.10)), eignet sich RET hervorragend zur Abstandsbestimmung in Biomolekülen [47]. Weiterhin kann die durch RET erfolgte Verkürzung der Donorfluoreszenzlebensdauer und das Aufkommen der Akzeptorfluoreszenz als Indikator für erfolgte Fusionen bei intrazelluläre Transportvesikeln genutzt werden [48]. Ein Beispiel für die Effizienz von RET-Prozessen sind die Lichtsammelkomplexe der Photosysteme [49] sowie künstlich hergestellte Multifluorophorsysteme [50-52].

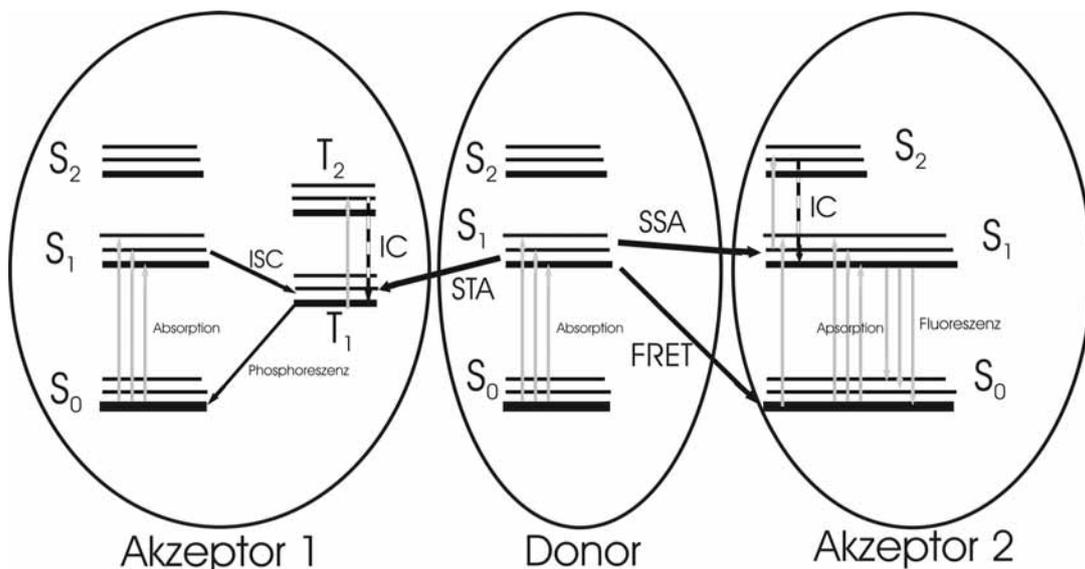


Abbildung 3.2: Darstellung der RET Wege anhand von Jablonski-Diagrammen mit einem Donor und zwei Akzeptoren, welche sich innerhalb der relevanten Förster Radien befinden.

Im Normalfall läuft der RET-Prozesses von einem sich im S_1 -Zustand befindlichem Donormolekül zu einem im Grundzustand befindlichem Akzeptormolekül eines anderen Typs ab (FRET in Abbildung 3.2). Wenn Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors nur wenig *Stokes-Shift* aufweisen, so besteht außerdem die Möglichkeit eines Homotransfers bei dem Donor und Akzeptor Fluorophore des gleichen Typs sind [53]. Dieser Prozess wird auch als *Energy Hopping* bezeichnet [54, 55]. Weiterhin sind über den Formalismus des Förster-Typs RET-Prozesse zwischen angeregten Zuständen erlaubt. Der RET-Prozess zwischen zwei angeregten Singulett-Zuständen wird hierbei als Singulett-Singulett-Auslöschung (SSA) bezeichnet. Findet RET zwischen einem angeregten Singulett- und einem angeregten Triplett-Zustand statt, so wird dies auch als Singulett-Triplett-Auslöschung (STA) bezeichnet [56, 57]. Die Transferwege dieser RET-Prozesse sind als SSA und STA in den Jablonski-Diagrammen von Abbildung 3.2 dargestellt.

Eine Grundvoraussetzung hierbei ist, dass beide Fluorophore simultan angeregt werden und somit zeitgleich in angeregten Zuständen vorliegen. Dies ist hauptsächlich bei gepulsten, zeitaufgelösten Messungen der Fall.

Bei der SSA überträgt ein Fluorophor im S_1 -Zustand die Energie an ein zweites ebenfalls im S_1 -Zustand befindendlichen. Dieses wird in einen höheren Singulett-Zustand befördert, während ersteres in den Grundzustand übergeht. Nach erfolgter IC in den S_1 -Zustand resultiert in der Summe aus zwei angeregten Fluorophoren die Emission eines einzelnen Photons. Der Nachweis des SSA-Mechanismus gelingt über die Analyse des zeitlichen Abstands zwischen emittierten Photonen in einem bichromophoren System, welches gepulst angeregt wird. Für ein einzelnes emittierendes Fluorophor existiert ein zeitlicher Minimalabstand für die konsekutive Abgabe von Photonen, das sogenannte *Photonantibunching*. Addition der Interphotonabstände, unter der Bedingung, dass die Pulsbreite wesentlich kleiner als die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors ist, ergibt für den zeitlichen Abstand zwischen den Photonen unterhalb eines Pulsabstands ein Minimum und Maxima jeweils bei vielfachen des Pulsabstands, wie in Abbildung 3.3 dargestellt.

In einem System, welches mehr als einen Emitter enthält, kann innerhalb eines Pulsabstands pro Fluorophor jeweils ein Photon emittiert werden und es existieren somit zeitliche Photonabstände unterhalb eines Pulsabstands (31 ns in Abbildung 3.3).

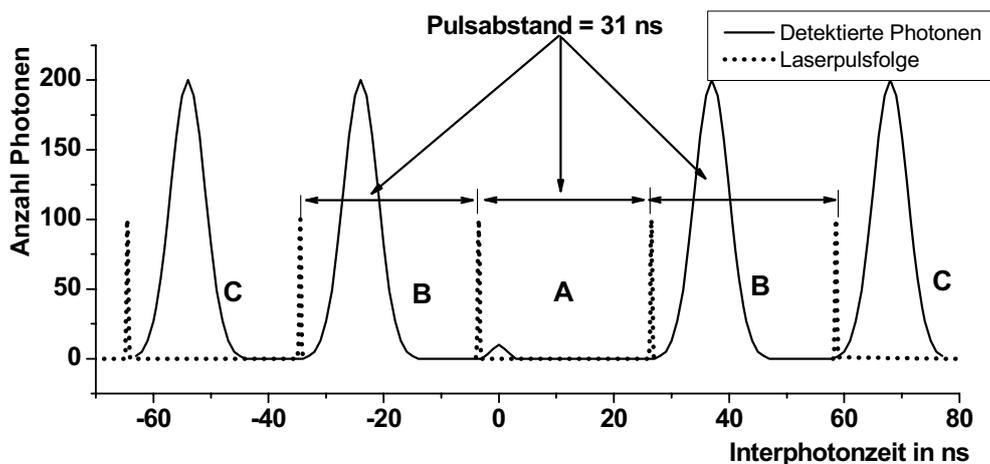


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des *Photonantibunchings*. Punktiert ist die Laserpulsfolge angedeutet. Der Bereich A repräsentiert die Interphotonzeit innerhalb eines Pulsabstands. Die Bereiche B und C stellen Interphotonzeiten von „ $n \cdot \text{Pulsabstand} + X$ “ dar, wobei n hierbei 1 bzw. 2 ist.

Wenn also ein bichromophores System untersucht wird und es tritt kein Maximum im Bereich unterhalb des Pulsabstands auf, so muss die Schlussfolgerung daraus sein, dass ein sehr effizienter SSA-Prozess das System effektiv auf einen Emitter reduziert. Bei Chromophorabständen oberhalb des SSA-Förster-Radius erscheinen wieder Photonenabstände unterhalb des Pulsabstands [56, 58].

Die STA verläuft analog zu SSA über einen höheren Triplett-Zustand. Der STA-Mechanismus jedoch kann nur indirekt über kollektive An-Aus-Zustände in einem bichromophoren System nachgewiesen werden. Hierbei kann der stabile Triplett-Zustand dazu führen, dass, bei großen STA-Förster-Radien und einer großen spektralen Überlappung, STA dominiert und das Molekül während der Lebensdauer des Triplett-Zustands dunkel erscheint [59].

Die T_n-T_1 Relaxation ist ein sehr schneller, nicht-radiativer Übergang, der aufgrund der Langlebigkeit des Triplett-Zustands und großen STA-Förster-Radien dazu führen kann, dass ein T_1 -Chromophor als Falle für eine Vielzahl sich in der Umgebung befindende S_1 -Chromophore dient, und somit kollektive Aus-Zuständen in Multichromophorsystemen verursacht [59, 60].

3.4 Das Messsystem

3.4.1 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Im Gegensatz zu gängigen Ensemblemessungen ist es bei der Einzelmoleküldetektion möglich, die Eigenschaften individueller Moleküle zu untersuchen, die sonst herausgemittelt werden. Im Prinzip lässt sich das Feld der Einzelmoleküldetektion in drei Zweige unterteilen. Ein Großteil beinhaltet die Identifikation und Analyse statischer Eigenschaften frei diffundierender oder immobilisierter Moleküle. Weiterhin werden Langzeitmessungen zur Analyse von Mobilitäten und Trajektorien durchgeführt. Als drittes werden individuelle Dynamiken unter heterogenen Bedingungen oder Konformationsfluktuationen in Biomolekülen oder Polymeren untersucht. Hierzu kann eine Reihe von Fluoreszenzeigenschaften wie Intensitäten, Lebensdauern, Emissionsspektren, Diffusionszeiten und Anisotropien ausgenutzt werden [33]. Die ersten Nachweise einzelner Moleküle bei Raumtemperatur unter Ausnutzung der Fluoreszenz gelangen 1990 durch Orrit et al. und Shera et al. [61, 62]. Pionierarbeiten zur Nutzung der konfokalen Mikroskopie zur Einzelmoleküldetektion wurden von Rigler et al. geleistet [63-65].

In dieser Arbeit wird der in Abbildung 4.2 dargestellte konfokale Aufbau verwendet. Hierbei wird das Anregungslicht durch einen dichroitischen Spiegel auf die Rückapertur eines Mikroskopobjektivs reflektiert. Das Objektiv fokussiert das Licht dann zu einem beugungsbegrenzten Fokus auf die Probe. Emittiertes Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv gesammelt, kann den Dichroiten passieren und wird von *Photomultiplier Tubes (PMT)* oder Lawinenphotodioden (*Avalanche Photo Diode, APD*) registriert. Bei Einphotonen-Anregung wird das Fokalvolumen dadurch begrenzt, dass das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende fokussiert wird. Dieses blockiert Licht, welches nicht aus dem unmittelbaren Fokus kommt. Bei der Zweiphotonen-Anregung ist das Fokalvolumen automatisch durch quadratische Intensitätsabhängigkeit der Anregung begrenzt, wodurch die Lochblende redundant wird. Beide Anregungsformen führen zu einem prolaten, rotationsellipsoiden Fokalvolumen von weniger als einem Femtoliter.

Das Gesetz der beugungsbegrenzten Auflösung und dadurch limitierten Minimierung des Fokalvolumens eines Mikroskops, welches durch Ernst Abbe 1873 aufgestellt wurde [66], hielt sich sehr lange und wurde vor kurzem durch

Stefan Hell für die Fluoreszenz-Mikroskopie mit der Technik *Stimulated Emission Depletion* (STED) umgangen [67]. In der Optik ist der axiale Durchmesser w_f des Fokaltvolumens durch die Wellenlänge λ des verwendeten Lichts und den Eigenschaften der Linse begrenzt, siehe (3.11).

$$w_f = \frac{1,22 \lambda}{2 n \sin \alpha} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (3.11)$$

Hierbei ist n der Brechungsindex und α der halbe Öffnungswinkel des Mikroskopobjektivs diese werden zur numerischen Apertur NA zusammengefasst. Beispielsweise bedeutet dies für die verwendete Apperatur bei der Anregung mit Licht von 800 nm und einer Numerischen Apertur von 1,15 einen beugungsbegrenzten Fokaldurchmesser von 425 nm.

3.4.2 Störsignale bei der Fluoreszenzmessung

Ein wichtiger Parameter bei der Einzelmoleküldetektion ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R). Ist S/R sehr hoch, so enthalten nahezu alle detektierten Photonen relevante Informationen. Im Idealfall nähert sich das Hintergrundrauschen $n^{1/2}$ an, wobei n die Anzahl detektierte Photonen darstellt und das Rauschen nur noch durch die Poisson'schen Signalfuktuationen bedingt ist. Ein schlechtes S/R Verhältnis hingegen führt dazu, dass das Signal nicht mehr von Rauschen diskriminiert werden kann. Quellen für Hintergrundsignale können z.B. Raman- und Rayleigh-Streuung, fluoreszente Verunreinigungen, autofluoreszente Probenbestandteile und Dunkelzählraten der Detektoren sein.

Raman-Streuung ist die inelastische Streuung von Photonen bei der Kollision mit Molekülen. Die Wechselwirkung mit dem Molekül führt zu einer spezifischen Energiedifferenz welche aus der Analyse der abgegebenen Photonen ermittelt werden kann. Rayleigh-Streuung hingegen ist die elastische Streuung von Photonen bei der Kollision mit Molekülen, wobei kein Energieaustausch erfolgt.

Zu beachten ist, dass bedingt durch die hohen Lichtleistungen bei der Zweiphotonen-Anregung andere Quellen der Hintergrundfluoreszenz, wie die sogenannten Hyper-Raman- und Hyper-Rayleigh-Streuungen in Erscheinung treten [42]. Hierfür wurden Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitte von $8 \cdot 10^{-62}$ und $7 \cdot 10^{-63}$ (cm⁴s)/Photonen ermittelt. Im quantitativen Vergleich zur Einphotonen-Anregung zeigt sich jedoch für die Raman-Streuung eine

Erniedrigung um 1-2 Größenordnungen und für die Rayleigh-Streuung um 3-4 Größenordnungen [68].

Da das Hintergrundrauschen direkt proportional zur Anzahl der Moleküle im Detektionsvolumen ist, führt die Minimierung hiervon zur Verbesserung von S/N. Es existieren verschiedene Techniken zur Reduktion des Fokalvolumens, wie z.B. Nahfeldmikroskopie, konfokale Mikroskopie und STED [33]. Wird gepulstes Anregungslicht benutzt, so lassen sich die Lichtstreuungsquellen durch das sogenannte *Time-Gating* ausschalten. Hierbei werden die Detektoren jeweils erst kurz nach dem Puls aktiviert und registrieren somit die instantan gestreuten Photonen nicht.

3.4.3 Gepulste Titan-Saphir Lasersysteme

Das Akronym „LASER“ steht für „*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*“. Ein Laser besteht im Allgemeinen aus drei Hauptkomponenten: einem verstärkenden Medium, einer Energiepumpe und einem Resonator. Die Energiepumpe erzeugt bei genügend hoher Pumpleistung eine Besetzungsinversion im verstärkenden Medium, d.h. die Besetzungsdichte eines höheren Zustands wird größer als die eines niedrigeren Zustands. Unter dieser Bedingung überwiegt der Beitrag der stimulierten Emission und Licht kann somit beim Durchgang durch das aktive Medium verstärkt werden [13]. Das vom verstärkenden Medium emittierte Licht wird im Resonator in multiplen Durchläufen verstärkt. Es wird dazu wiederholt durch das verstärkende Medium geschickt, z.B. über zwei Endspiegel, wobei die Verstärkung im aktiven Medium die Resonatorverluste übertreffen muss. Zwischen den Endspiegeln bilden sich diskrete sogenannte Resonatormoden aus. Ein Endspiegel ist so gewählt, dass er bei genügend hoher Lichtleistung im Resonator einen gewissen Prozentsatz des Laserlichts auskoppelt. Die erste experimentelle Realisierung eines Lasers gelang Maiman 1960 mit dem aktiven Medium Rubin [69].

Ti³⁺ dotiertes Al₂O₃ ist ein aktives Medium, dessen Übergang ²E nach ²T₂ entspricht, und zusätzlich die Eigenschaft aufweist, dass die emittiert Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 660 bis 1000 nm durchgestimmt werden kann und somit die Messung von Zweiphotonen-Absorptionsspektren ermöglicht [70].

Passiert ein starker Laserstrahl ein optisches Medium mit einem nichtlinearen Brechungsindex, so erfährt er eine Selbstfokussierung. Dies wird auch als Kerr-Linse bezeichnet [71]. Durch Optimierung des Resonators wird durch Selbstphasenmodulation ein modengekoppelter Betrieb des Lasers bevorzugt. Modenkopplung bedeutet hierbei, dass Mechanismen im Resonator dafür sorgen, dass sich ein konstanter Phasenversatz der diskreten longitudinalen Resonatormoden ausbildet und somit die Energie in ultrakurzen Pulsen kumuliert ist. Die Pulsdauer hängt hierbei von der Anzahl gekoppelter Moden ab und die Pulsfolge von der Länge des Resonators. Für den passiven modengekoppelten Betrieb muss gewährleistet sein, dass das Laserlicht im gepulsten Modus eine höhere Verstärkung erfährt als im CW-Modus (*Continuous Wave*). Dies kann zum Beispiel dadurch realisiert werden, dass ein Spalt in die Kavität eingebaut wird. Das aktive Medium selbst kann unter geeigneten Bedingungen ebenfalls den gepulsten Modus bevorzugen. Dies hängt damit zusammen, dass die Verstärkung im Medium ebenfalls eine räumliche Abhängigkeit aufweisen kann, z.B. dadurch, dass der modengekoppelte Betrieb eine bessere Überlappung mit dem Pumplaser aufweist [72]. Aufgrund des nahezu instantanen Prozesses ist diese Modulation im Stande, einen ultraschnellen, sättigbaren Absorber zu simulieren, welcher Pulsbildung im Femtosekundenbereich erlaubt [71].

Durch die optischen Komponenten im Resonator wird eine Dispersion der Gruppengeschwindigkeit verursacht, welche die erzeugten, ultrakurzen Pulse zeitlich wieder verbreitert. Dieser Effekt kann dadurch kompensiert werden, dass Komponenten mit negativer Dispersion in den Resonator eingebracht werden, z.B. durch die Nutzung von Prismenpaaren [73]. Bei der Erzeugung ultrakurzer Lichtpulse wirkt sich die Heisenberg'sche Zeit-Energie-Unschärferelation aus (3.12) [74].

$$\Delta t \Delta E \geq \frac{h}{4\pi} \geq \frac{\hbar}{2} \quad (3.12)$$

Hierbei ist Δt die der Pulsdauer entsprechende Zeitunschärfe und ΔE die Energieunschärfe, welche sich in der Spektralbreite widerspiegelt. Der zuvor spektral sehr schmale Bereich im CW-Modus erfährt im modengekoppelten Modus eine starke Spektralverbreiterung, welche antiproportional zur Pulsdauer ist.

3.4.4 Lawinenphotodioden

Das Messprinzip der Lawinenphotodioden basiert darauf, dass einfallende Photonen im aktiven Detektionsbereich Elektron-Loch-Paare erzeugen. Dazu muss die Energie des Photons größer als die Energielücke im aktiven Medium sein. Für Silizium ist diese Energielücke 1,12 eV, was bedeutet, dass die entsprechenden APDs für Wellenlängen < 1100 nm geeignet sind. Diese entstehenden freien Ladungsträger sind dann nach einer Verstärkung als Photostrom messbar. Durch eine zuvor angelegte, sehr starke Grundspannung können die erzeugten Ladungsträger so stark beschleunigt werden, dass sie durch Stoßionisation weitere Ladungsträger freisetzen und sozusagen in einem Kettenprozess eine Lawine losstreuen. Im Geiger-Modus wird die Photodiode mit einer Spannung knapp über der Durchbruchsspannung betrieben. Dies führt dazu, dass ein einzelnes Photon bis zu 10^8 Ladungsträger freisetzt und die Diode demnach zur Detektion einzelner Photonen befähigt ist. Nach erfolgter Detektion muss der Photostrom unterdrückt werden, um folgende Photonen wieder detektieren zu können. Beim aktiven Unterdrücken wird durch Herabsetzen der Spannung unter die Durchbruchsspannung der Photostrom für eine gewisse Zeitspanne unterbrochen. Das zeitliche Minimum hierfür liegt bei 50 ns, woraus die Totzeit der Diode resultiert [75].

3.4.5 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (*Time Correlated Single Photon Counting*; TCSPC) ist eine äußerst sensitive, digitale Technik, die die Zeitdifferenz eines gemessenen Photons zu einem Synchronisationssignal misst. Diese zusätzliche Information ermöglicht es, kontinuierlich Aussagen bezüglich der Fluoreszenzlebensdauer zu treffen. Das Messprinzip wird schematisch in Abbildung 3.4 dargestellt. Das Probenvolumen wird mit einer gepulsten Lichtquelle angeregt. Simultan wird die Pulsrate z.B. mit einer schnellen Photodiode (SPD) gemessen und als Synchronisationssignal an die TCSPC-Einheit weitergeleitet.

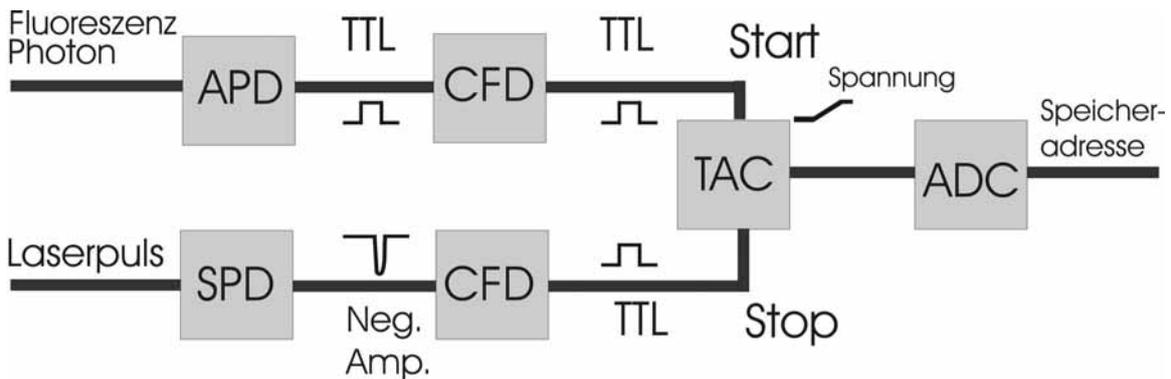


Abbildung 3.4: Flussdiagramm des TCSPC im umgekehrten Start-Stop Modus.

Im umgekehrten Start-Stop-Modus wird durch das Signal eines z.B. von einer Lawinenphotodiode detektierten Photons eine Spannungsrampe in der TAC-Einheit (*Time to Amplitude Converter*) gestartet. Das Stoppsignal wird hierbei vom Synchronisationssignal beigesteuert. Im Folgenden wird die erreichte Endspannung an die ADC (*Analog to Digital Converter*) Einheit weitergegeben, wo sie in digitale Informationen umgewandelt und gespeichert wird. Verschiedene Pulshöhen würden bei der Verwendung eines einfachen Diskriminators zu einer Startzeitvarianz führen (siehe Abbildung 3.5). Daher wird ein CFD (*Constant Fraction Discriminator*) verwendet.

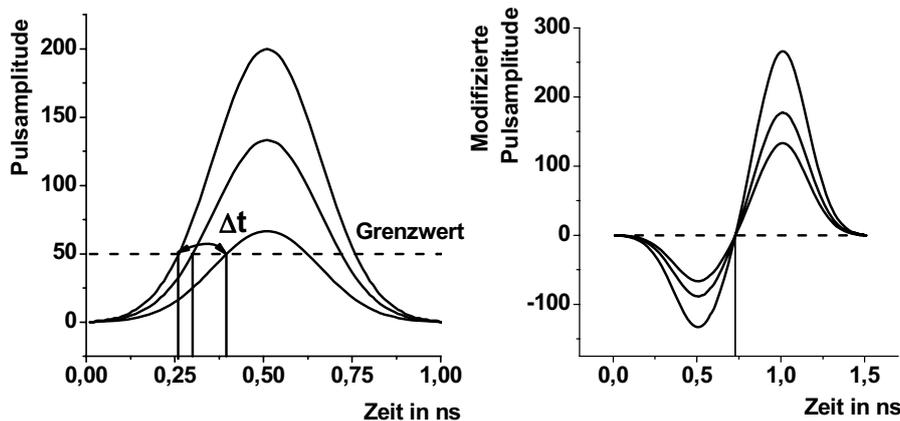


Abbildung 3.5: Verhalten der Startzeitvarianz bei variierender Pulshöhe. Links, mit einem Grenzwert Diskriminator. Rechts, mit dem *Constant Fraction Discriminator* (siehe Abbildung 3.6).

Der CFD teilt den Puls in zwei Teile, von denen einer um die halbe Pulsbreite verzögert und der andere invertiert wird. Nach Rekombination der beiden

Einzelpulse ist der Schnittpunkt mit der X-Achse weitgehend unabhängig von der Pulshöhe (siehe Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6).

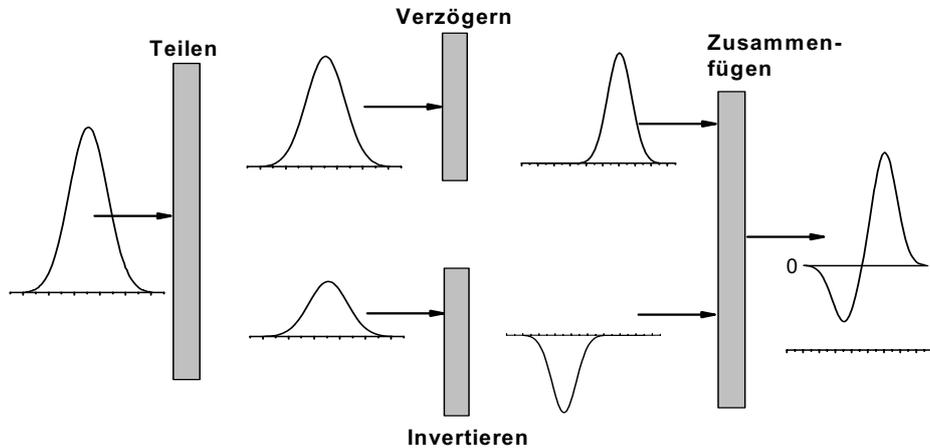


Abbildung 3.6: Arbeitsprinzip des CFD.

Der zeitlimitierende Schritt bei TCSPC ist die Entladung der TAC-Einheit, welche einige μs dauert. Dies würde insbesondere bei hohen Pulsfrequenzen im Megahertzbereich, wie sie bei modengekoppelten Lasersystemen auftreten, zu ständigen Überladungen führen. Daraus folgt für solche Anwendungen der zuvor beschriebene umgekehrte Start-Stop-Modus. Ein Nachteil hierbei ist, dass die aufgenommenen Histogramme eine invertierte Zeitachse aufweisen, was aber sehr leicht durch die Auswertungssoftware kompensiert werden kann.

Ist die Fluoreszenzrate einer Messung sehr hoch, so kommt es dazu, dass aufgrund von Totzeiten des Systems nur die ersten Photonen registriert und somit überbewertet werden. Um Verzerrungen der Lebensdauerabklingkurven durch diese sogenannten *pileup* Effekte zu verhindern, muss gewährleistet sein, dass pro Puls das Einphotonenkriterium eingehalten wird. Eine Faustregel hierfür ist, dass nur in jedem 20. – 100. Pulszyklus ein Photon registriert wird, Dies bedeutet bei einer Pulsrate von 80 MHz eine maximale Zählrate von 1 bis 4 MHz. Gerade bei sehr stark fluoreszierenden Teilchen muss bedacht werden, dass auch einzelne Photonenbursts dieses Kriterium verletzen können, ohne dass die durchschnittliche Zählrate pro Sekunde im kritischen Bereich liegt.

3.5 Kurvenanpassung mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus

Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus (LMA) ist ein mathematisches Verfahren zur Anpassung der Variablen v einer Modellfunktion f an eine Datenmenge $\{x; y\}$ [76, 77]. Er basiert auf der Minimierung der Summe der Fehlerquadrate χ^2 , welche von Carl Friedrich Gauß entwickelt wurde.

$$y_k = f(v_1 \dots v_n; x_1 \dots x_m) \quad [k = 1 \dots n] \quad (3.13)$$

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^{k=n} (g_k [y_k - y_f]^2) \rightarrow \text{Minimum} \quad (3.14)$$

Hierbei stellt g_k einen Gewichtungsfaktor dar, der die Standardabweichung des Datenpunktes berücksichtigt. Sind z.B. die Messwerte normalverteilt um ihren Erwartungswert, so gilt näherungsweise, dass die Varianz der Datenpunkte konstant ist und alle Datenpunkte gleich gewichtet werden. Bei der Messung von Photonen ist die Varianz durch Poisson'sche Fluktuationen des Messsignals gegeben. Daher ist g_k bei der Anpassung als y^{-1} definiert. Hierdurch werden Datenpunkte mit vielen Photonen, die eine geringere relative Abweichung aufweisen, stärker berücksichtigt. Der Algorithmus ist ein iterativer Prozess, zu dessen Start Schätzwerte für die Variablen der Modellfunktion angegeben werden müssen. Der LMA gehört zu den Gradientenverfahren, d.h. es wird ausgehend von einem Punkt untersucht, in welche Richtung χ^2 am schnellsten minimiert wird, also wo die Steigung am größten ist. Des Weiteren beachtet der Algorithmus wie schnell sich diese Steigung ändert, um zu entscheiden wie groß der Schritt in die zuvor bestimmte Richtung sein soll. Ändert sich die Steigung schnell, so werden kleine Schritte gemacht, ändert sie sich langsam, so werden größere Schritte gemacht.

Die Steigung und deren Änderung sind mathematisch gesehen die erste und zweite Ableitung einer Funktion. Im LMA wird dies durch Nutzung der Jacob'schen und der Hess'schen Matrix realisiert. Gradientenverfahren können Probleme mit lokalen Minima haben. Deshalb sollte möglichst mehrfach mit jeweils unterschiedlichen Startwerten arbeiten.

3.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

FCS ist eine hochauflösende räumliche und zeitliche Analyse sehr stark verdünnter Moleküle, die 1972 von Madge, Elson und Webb entwickelt wurde [78-80]. Hierzu werden spontane Fluktuationen der Fluoreszenzintensität mithilfe der Autokorrelationsanalyse untersucht. Sämtliche Parameter, die derartige Fluktuationen verursachen und beeinflussen, können mit der Methode untersucht werden. Als Beispiel seien hierzu lokale Konzentrationen und Partikelmobilitäten sowie inter- und intramolekulare Reaktionen genannt [81-84].

Um die Fluktuationen effektiv und akkurat interpretieren zu können ist es erforderlich, dass sich im Schnitt 0,1 bis 1000 Moleküle im Fokalvolumen befinden [85]. Dies wiederum bedeutet, dass möglichst kleine Fokalvolumina erstrebenswert sind, um in sinnvollen Probenkonzentrationen arbeiten zu können und störende Hintergrundsignale zu minimieren. Normalerweise wird bei FCS mit einem Konfokalaufbau gearbeitet, was effektive Fokalvolumina von Subfemtolitergröße und Partikelkonzentrationen im nanomolaren Bereich ermöglicht.

3.6.1 Die Autokorrelationsfunktion

Die Autokorrelationsanalyse untersucht, inwiefern ein Signal zum Zeitpunkt t sich selbst zu einem späteren Zeitpunkt $t+\tau$ ähnelt. Die normierte Autokorrelationsfunktion G_τ ist wie folgt definiert:

$$G_\tau = \frac{\langle \delta F_t \delta F_{t+\tau} \rangle}{\langle F_t \rangle^2} \quad (3.15)$$

Die gemessene Fluoreszenzintensität F_t variiert hierbei um einen Mittelwert $\langle F_t \rangle$, welcher durch die mittlere Anzahl an Fluorophoren im Detektionsvolumen, deren Fluoreszenzeigenschaften und der Detektionseffizienz des Systems bedingt ist. δF_t ist nach Gleichungen (3.16) und (3.17) als momentane Abweichung von dem Mittelwert bezogen auf die Gesamtmesszeit T definiert:

$$\delta F_t = F_t - \langle F_t \rangle \quad (3.16)$$

$$\langle F_t \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F_t dt \quad (3.17)$$

Ausgangspunkt für die Fluktuationen ist hier die Brown'sche Diffusion durch ein vorgegebenes Volumen [86, 87]. Um einer aus experimentellen Daten dieser Art resultierenden Kurve eine analytische Lösung mit sinnvollen Parametern anzupassen, müssen einige Vereinfachungen und Definitionen durchgeführt werden. Sind die Fluktuationen ausschließlich durch lokale Konzentrationsfluktuationen bedingt, so lässt sich δF_t auch wie folgt definieren:

$$\delta F_t = \kappa \int_V W_r \delta(\sigma Q C_{r,t}) dV \quad (3.18)$$

Hierbei sind: κ = die Detektionseffizienz des Systems

W_r = die Intensitätsverteilung des Anregungslichts im Fokalvolumen

$C_{r,t}$ = die lokale Konzentration

Q = die Quantenausbeute

σ = der Absorptionsquerschnitt

Die Gleichung (3.18) kann nun in (3.15) eingesetzt werden. Die Intensitätsverteilung W_r kann vereinfachend durch eine 3-dimensionale Gaußform (3.19) beschrieben werden, was insbesondere bei der Zweiphotonen-Anregung sehr gut zutrifft. Für die Einphotonen-Anregung stimmt dies nur in erster Näherung und die Abweichungen hiervon hängen mit der Ausleuchtung der Objektivrückapertur und dem Radius der Detektorapertur zusammen [88, 89].

$$W_r = e^{\left(-2 \frac{x^2 + y^2}{r_0^2}\right)} e^{\left(-2 \frac{z^2}{z_0^2}\right)} \quad (3.19)$$

Hierbei stellt r_0 den äquatorialen und z_0 den axialen Fokalradius dar, bei welchem die Intensitäten auf $1/e^2$ abgeklungen sind. Unter der Annahme, dass die Eigenschaften des Fluorophors in der Messzeit konstant sind und dass die Partikel frei in drei Dimensionen diffundieren können, vereinfacht sich das System bereits sehr. Mit dem Einfügen der folgenden Abhängigkeiten der Diffusionszeit τ_D vom Diffusionskoeffizienten D , (3.20) bzw. (3.21) und für das effektive ellipsoide Fokalvolumen V_{eff} (3.22)

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad \text{Einphotonen-Anregung} \quad (3.20)$$

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{8D} \quad \text{Zweiphotonen-Anregung} \quad (3.21)$$

$$V_{eff} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0 \quad (3.22)$$

ergibt sich die analytische Lösung der Autokorrelationsfunktion G_τ für frei diffundierende Partikel eines Typs mit den Anpassungsparametern Diffusionszeit, Teilchenzahl im effektiven Fokalvolumen und Fokalparameter r_0/z_0 [39, 85, 90].

$$G_\tau = \frac{I}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{I}{\left(I + \frac{\tau}{\tau_D} \right)} \frac{I}{\sqrt{\left(I + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)}} \quad (3.23)$$

Die Funktionsantwort bei $\tau = 0$, zeigt das Verschwinden des zweiten und dritten Faktors der analytischen Lösung und die Amplitude bei G_0 entspricht dem Inversen der Teilchenzahl $\langle N \rangle$ im Fokalvolumen, siehe (3.24).

$$G_0 = \frac{I}{V_{eff} \langle C \rangle} = \frac{I}{\langle N \rangle} \quad (3.24)$$

Sind die Dimensionen des Fokalvolumens aus Kalibrationsmessungen bekannt, so lassen sich die makroskopischen Konzentrationen $\langle C \rangle$ berechnen. Des Weiteren lässt sich durch die Anpassung der Gleichung (3.23) an die experimentellen Daten die charakteristische Diffusionszeit ermitteln und über die mittlere Teilchenzahl und die Gesamtzählrate eine durchschnittliche Helligkeit der Partikel berechnen. Abbildung 3.7 zeigt die Einflüsse der Parameter Partikelgröße und Partikelkonzentration auf die FCS-Kurven.

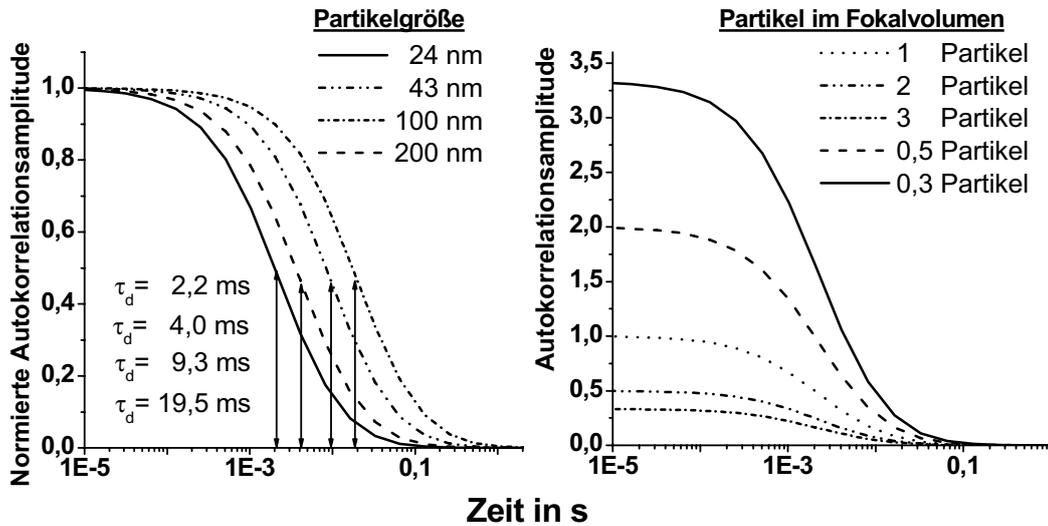


Abbildung 3.7: Links, Einfluss der Partikelgröße auf die Diffusionszeit. Hierzu wurde D für Partikel verschiedenen Durchmessers nach Stokes-Einstein und τ_d mit der Relation (3.21) berechnet wobei für $r_0 = 450$ nm und $r_0/z_0 = 0,25$ angenommen wurde. Die Kurven wurden dann anhand der Gleichung (3.23) berechnet. Rechts, Einfluss der Teilchenzahl von 24 nm Partikeln auf die Amplitude der FCS-Kurve.

Alternativ lässt sich der Diffusionskoeffizient D auch über die Stokes-Einstein Gleichung (3.25) abschätzen [91].

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta R_p} \tag{3.25}$$

Hierzu muss die dynamische Viskosität η des Lösemittels, die Temperatur T und der hydrodynamische Radius R_p des als kugelförmig angenommenen Partikels bekannt sein. Dieser kann durchaus signifikant von dem tatsächlichen Partikelradius abweichen. Durch Einsetzen von D in (3.21) lässt sich hierüber dann die zu erwartende Diffusionszeit beziehungsweise der Fokaldurchmesser berechnen [29].

Die Herleitung von (3.23) beruht auf der Annahme, dass sich die spektroskopischen Eigenschaften der Fluorophore in der Messzeit nicht ändern. Diese Annahme kann aber ungerechtfertigt sein, wenn z.B. aufgrund von angeregten Triplett-Zuständen das sogenannte *Blinking* auftritt. Dieser Effekt

macht sich in der FCS-Kurve als zusätzlicher Buckel bei kurzen Korrelationszeiten bemerkbar. Wenn die Fluktuationen G_F , die nicht durch die Teilchenbewegung G_B verursacht werden, wesentlich schneller sind, so sind die jeweiligen Dynamiken separierbar (3.26). Das *Blinking* aufgrund der Population von Triplett-Zuständen kann hierbei durch einen exponentiellen Abfall beschrieben werden, wobei τ_T die Lebensdauer des Triplett-Zustands darstellt und T den prozentualen Anteil der Moleküle welche sich im Triplett-Zustand befinden [92].

$$G_\tau = G_B G_F$$

$$G_F = 1 - T + T e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_T}\right)} \quad (3.26)$$

Die Aggregation von Biomolekülen ist ein in der Natur weit verbreiteter Prozess. Beispielhaft seien hier die Lektine genannt, welche an Kohlehydrate auf Zelloberflächen oder entsprechend markierten Nanospheres binden. Da Lektine mehrere Bindungsdomänen aufweisen, kommt es zu einer Aggregation der jeweiligen Substrate, die über FCS nachgewiesen werden kann [12]. Mehrere Parameter können beim Fortschreiten einer Aggregation beobachtet werden. Zum einen verändert sich über die Komplexierung der Teilchen die durchschnittliche Partikelzahl im Fokalvolumen. Des Weiteren weisen die Aggregate eine größere Diffusionszeit auf und die Partikelhelligkeit wird größer, da von jedem Monomer Fluorophore zum Komplex beigesteuert werden. Eine Reihe von Veröffentlichungen von Palmer und Thompson beschreiben die Analyse von Aggregationen mittels Autokorrelationsanalyse höherer Ordnung [93-96].

3.6.2 Die Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie

Während bei FCS die Selbstähnlichkeit eines zeitlichen Fluoreszenzsignals untersucht wird, vergleicht die Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) das zeitliche Fluoreszenzsignal eines Detektors F_A mit einem anderen F_B (3.27). Es lassen sich daher interagierende Teilchen mit hoher Sensitivität untersuchen.

$$G_{AB,\tau} = \frac{\langle \delta F_{A,t} \delta F_{B,t+\tau} \rangle}{\langle F_{A,t} \rangle \langle F_{B,t} \rangle} \quad (3.27)$$

Die Reaktionspartner werden hierzu mit unterschiedlichen, spektral separierbaren Fluorophoren versehen und können dann sowohl einzeln über die Autokorrelationen G_{AA} und G_{BB} als auch ihre Interaktion über die Kreuzkorrelation G_{AB} beobachtet werden. Zwar lassen sich auch bei der Autokorrelation Reaktionen über die Zunahme der Diffusionszeit beobachten, allerdings ist eine relativ große Massenzunahme des Komplexes Grundvoraussetzung um in den FCS-Kurven eine signifikante Diffusionszeitänderung erkennen zu können. Die Kreuzkorrelation hat keine derartige Abhängigkeit. Es lassen sich sogar zusätzlich über die Zunahme der Kreuzkorrelationsamplitude mit der Zeit Aussagen über die Kinetiken der Reaktionen treffen [27, 63, 97].

Experimentell werden im Detektionsstrahlengang die Signale durch dichroitische Spiegel spektral aufgetrennt und separat aufgezeichnet. Unter der Voraussetzung, dass kein Partikelaustausch in der Probe stattfindet und kein Fluoreszenzquenching bzw. keine Fluoreszenzerhöhung auftritt, können Aussagen über die Konzentration der entstandenen Komplexe getroffen werden. Aus den Amplituden der Kreuz- und Autokorrelationen bei $\tau = 0$ lässt sich mithilfe der Gleichung (3.28) die Konzentration der gebildeten Komplexe $\langle C_{AB} \rangle$ berechnen [26].

$$\langle C_{(AB)} \rangle = \frac{G_{AB(0)}}{V_{eff} (G_{AA(0)} G_{BB(0)})} \quad (3.28)$$

Meist lässt es sich experimentell nicht verhindern, dass die einzelnen Fluorophore Nebensignale in den weiteren Detektoren aufweisen. Dies trifft insbesondere auf das jeweils kurzwelliger emittierende Fluorophor zu, da die Emissionsspektren in die langwelligeren Bereiche hin abklingen. Dies bewirkt eine Kreuzkorrelationsamplitude sogar in Abwesenheit gebildeter Aggregate. Der Term der Eigenkreuzkorrelation G_{AB}^{Eigen} kann über die prozentualen Nebensignale berechnet werden (3.29). Dieser muss dann zur Konzentrationsbestimmung der gebildeten Aggregate von (3.27) subtrahiert werden. Hierbei stellt ξ_{NA} das prozentuale Nebensignal des Fluorophors im kreuzkorrelierten Kanal dar [98].

$$G_{AB,0}^{Eigen} = \left(\frac{I}{\langle N_A \rangle + \langle N_{AB} \rangle} \right) \frac{\xi_{NA}}{100 + \xi_{NA}} \quad (3.29)$$

Bei den ersten experimentellen Umsetzungen von Zweifarben-FCCS wurden die unterschiedlichen Fluorophore mit einem jeweils passenden Laser angeregt. Hierbei stellt die akkurate Überlappung der Laserfoki eine besondere Herausforderung dar. Die Notwendigkeit, zwei Foki zur perfekten Überlappung zu bringen, kann umgangen werden, indem die Fluorophore mit der gleichen Laserlinie angeregt werden. Dies ist z.B. über Zweiphotonen-Anregung möglich, da die meisten Fluorophore ein sehr breitbandiges Zweiphotonen-Absorptionsspektrum aufweisen. So lässt sich für Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsspektren annähernd das gleiche Fokolvolumen erhalten [25]. Durch Ausnutzung der Zweiphotonen-Anregung werden auch komplexere Systeme mit drei oder mehr fluoreszierenden Spezies möglich [99].

3.6.3 Fokolvolumeneffekte auf die FCS Analyse

In der konfokalen Einphotonen-Anregung ist das Fokolvolumen im Wesentlichen durch die Wellenlänge des Anregungslichtes sowie den optischen Eigenschaften des Mikroskopobjektivs und der begrenzenden Lochblende bestimmt. Die Wellenlänge und Numerische Apertur bedingen hierbei den beugungsbegrenzten Fokaldurchmesser. Da in der Einphotonen-Anregung die Fluoreszenz linear abhängig von der Anregungsleistung ist, ergibt sich ein sanduhrförmiges Fokolvolumen. Die Aufgabe der Lochblende ist es nun Fluoreszenz, die nicht aus dem unmittelbaren Fokus kommt, zu blockieren. Im Allgemeinen wird das resultierende Volumen als dreidimensional gaußförmig (3.19) angenommen, genauere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass dies nicht genau zutrifft [89, 90]. Eine exaktere Beschreibung ist z.B. ein in radialer Richtung gaußförmiges und in axialer Richtung lorentzförmiges Fokolvolumen. Insbesondere in den Randgebieten des Fokolvolumens kommt es durch Interferenzen zu weiteren, wenn auch schwächeren, Fokalbereichen. Nicht gaußförmige Fokalvolumina dieser Art können dazu führen, dass bei der Analyse der FCS-Kurven weitere Spezies, anomale Diffusion oder nicht vorhandene Kinetiken interpretiert werden. Die Minimierung dieses Effekts lässt sich durch unvollständiges Ausleuchten der

Objektivrückapertur sowie einen möglichst kleinen Durchmesser der Lochblende erreichen, was allerdings seinerseits das S/R Verhältnis negativ beeinflusst [89]. Das Fokolvolumen bei der Zweiphotonen-Anregung stimmt wesentlich besser mit einer gaußförmigen Annahme überein und benötigt zudem keine Lochblende. Allerdings zeigt sich eine starke Abhängigkeit von der Anregungsleistung und den observierten Fluorophoren, siehe Abbildung 3.8. Zum einen spielt die Sättigung der Fluorophore im Zentralbereich des Fokus eine Rolle. Hierbei führen hohe Anregungsleistungen dazu, dass die Fluorophore im zentralen Fokus ihre maximale Emissionsrate erreicht haben. Dies hat seine Ursache in *Photonantibunching*, stimulierter Emission und *Photobleaching* und führt dazu, dass das Anregungsprofil im Zentralbereich nicht mehr gaußförmig ist, sondern ein Plateau aufweist. Des Weiteren bedingt eine höhere Anregungsleistung, dass Moleküle im peripheren Bereich, welche zuvor nicht ausreichend Leistung zur Fluoreszenz erfahren haben, jetzt ebenfalls Photonen emittieren und somit eine Verbreiterung des Profils erfolgt.

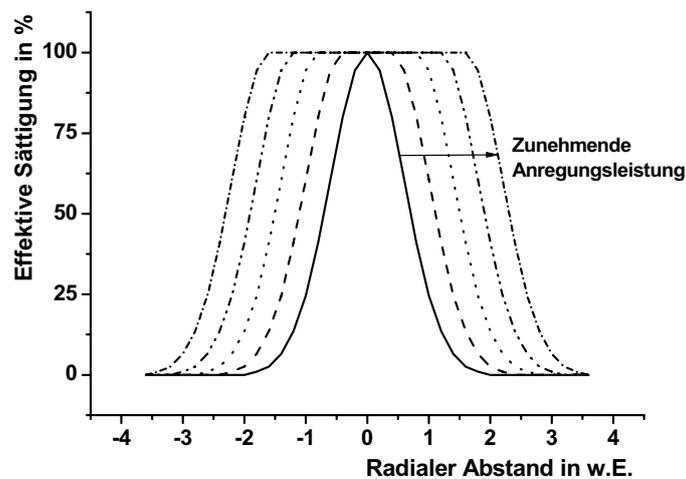


Abbildung 3.8: Schema des radialen Anregungsprofils unter zunehmender Anregungsleistung und dadurch verursachter Sättigung. Adaptiert aus [90].

Da die Anregbarkeit eines Fluorophors direkt mit dem molekulspezifischen Zweiphotonen-Absorptionsquerschnitt zusammenhängt, wird hieraus klar, dass das Fokolvolumen ebenfalls von der untersuchten Spezies abhängt. Für die FCS-Messungen bedeutet dies, dass die Diffusionszeit und Anzahl der Moleküle im Fokolvolumen mit zunehmender Leistung ansteigen, also die Amplitude der

FCS-Kurve sinkt und ihr Abfall später erfolgt. Tatsächlich trifft beides zu und wurde in Veröffentlichungen von Berland et al. beschrieben [90, 100, 101].

Ein weiterer Effekt auf die FCS-Analyse ist dadurch begründet, dass bei der Diffusion der Partikel punktförmige Fluoreszenzquellen ohne Eigenvolumen angenommen werden. Bei kugelförmigen Partikeln wie den fluoreszenten *Nanospheres*, deren Radius R relativ zum Fokalvolumenradius r_0 nicht vernachlässigbar ist ($R/r_0 > 0.2$) und in denen eine Vielzahl an Fluorophoren statistisch verteilt sind, ist diese Annahme nicht mehr gerechtfertigt. Ein Partikel mit einer signifikanten Größe fluoresziert bereits sobald sich nur ein Bruchteil des Partikels im tatsächlichen Fokalvolumen befindet. Daher muss das tatsächliche Fokalvolumen mit dem Partikelradius korrigiert werden, siehe Abbildung 3.9. Das Fokalprofil kann für Teilchen, deren Radius kleiner als der Fokalradius ist, noch als gaußförmig angenommen und demnach die Anpassungsgleichung (3.23) angewendet werden.

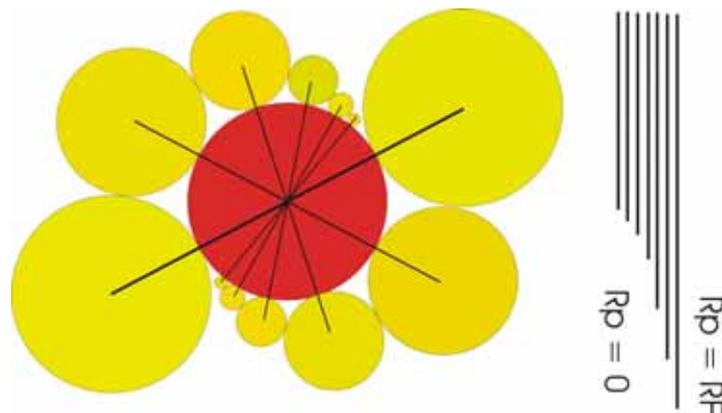


Abbildung 3.9: Einfluss der Größe der Partikel (gelbe Kreise) auf die minimale Strecke durch den Mittelpunkt des Fokus (roter Kreis). R_p = Radius des Partikels; R_F = Radius des Fokalvolumens.

Es ergeben sich dabei für Teilchenzahl und Diffusionszeit folgende Korrekturen:

$$\tau = \tau_{inf} + \frac{R^2}{4D} = \frac{r_0^2 + R^2}{4D} \quad (3.30)$$

$$G_0 = G_{0,inf} \frac{r_0^2}{r_0^2 + R^2} \quad (3.31)$$

Hierbei werden die Größen τ_{inf} und G_{inf} , welche sich aus der Annahme der Punktförmigkeit ergeben, mit dem Partikelradius korrigiert [102].

Weiterhin muss, wenn mit Partikeln nicht vernachlässigbarer Größe bei hohen Lichtintensitäten gearbeitet wird, die Generierung einer optischen Falle in Betracht gezogen werden. Elektromagnetische Strahlung kann, wenn sie stark fokussiert wird, Kräfte auf dielektrische Partikel ausüben. Zum einen wirkt eine Gradientenkraft orthogonal zum Laserstrahl und hängt von der Fokussierung des Lichts ab. Weiterhin existiert eine Streukraft der auftreffenden Photonen, welche in Richtung des Photonenimpulses wirkt. Das Verhältnis dieser Kräfte bestimmt die Stabilität der optischen Falle und ist proportional zur Anregungsleistung sowie in starkem Maße abhängig von der verwendeten Wellenlänge ($\sim \lambda^5$). Der zu erwartende Effekt ist ein Anstieg der Diffusionszeit mit zunehmender Laserleistung. Dieser wurde auch in mehreren Veröffentlichungen beobachtet und als optisches Einfangen interpretiert. Es wurden hierbei allerdings keine Effekte der Anregungsleistung auf das effektive Fokalkvolumen in Betracht gezogen [103, 104].

4 Experimenteller Teil

4.1 Die Messapparatur

4.1.1 Der Titan-Saphir Laser

Der in Abbildung 4.1 dargestellte, Eigenbau eines Titan-Saphir Lasers (Ti:Sa) wird durch einen diodengepumpten Neodym-Vanadat Laser ($\lambda = 532,1 \text{ nm}$, 5 W, Verdi Coherent Deutschland GmbH, Dieburg) gepumpt. Das Pumplicht wird durch die Linse L in das aktive Lasermedium AM, einem gekühlten mit Titanionen dotierten Saphirkristall, fokussiert.

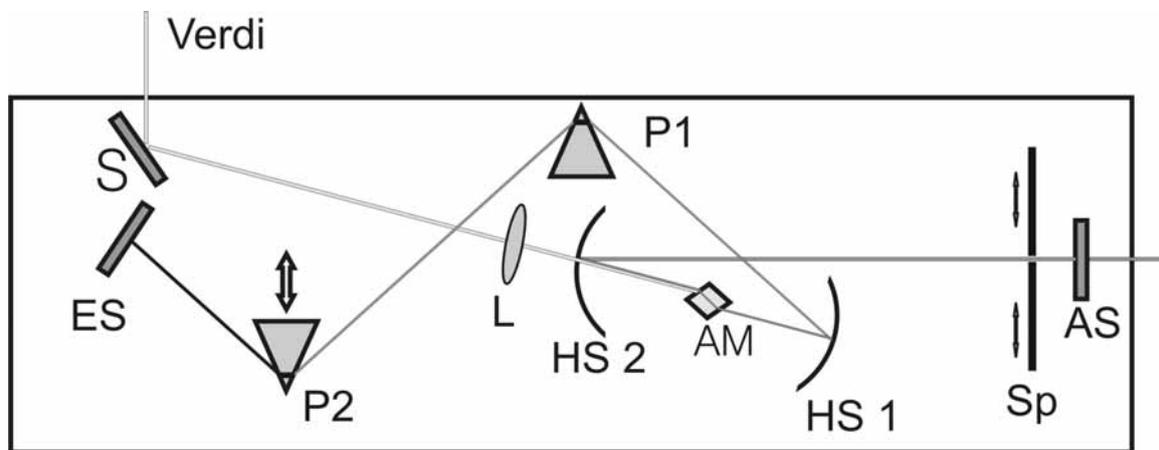


Abbildung 4.1: Aufbau des Titan-Saphir Oszillators. Aktives Medium AM, Prismenpaar P1-P2, Endspiegel ES, Auskoppelspiegel AS, Hohlspiegel HS 1-HS 2, Spalt SP und Linse L.

Durch die Hohlspiegel HS 2 und HS 1 wird das Laserlicht in das AM fokussiert und mit dem Pumpstrahl überlappt. Die Verkleinerung der Distanz zwischen den Hohlspiegeln bewirkt, dass der Resonator in einen halb-stabilen CW-Zustand gebracht wird. Aufgrund des nichtlinearen Kerr-Effekts, welcher eine zusätzliche Selbstfokussierung bei hohen Intensitäten verursacht, wird erreicht, dass im gepulsten Betrieb eine bessere Überlappung des Laserstrahls mit dem Pumpstrahl vorliegt. Der modengekoppelte Betrieb erfährt somit eine höhere Verstärkung im AM und kann stabil ablaufen [71, 105, 106]. Um den Resonator in den gepulsten Modus zu bringen, muss ein kleiner Störimpuls in das System eingebracht werden, z.B. durch Verschieben des Prismas P2. Zur Kompensierung der Gruppengeschwindigkeitsdispersion wird auf dem Hin- und

Rückweg im linken Arm des Resonators ein Prismenpaar P1, P2 durchlaufen [73]. Im rechten Arm des Resonators kann ein justierbarer Spalt SP zur zusätzlichen Stabilisierung der Modenkopplung genutzt werden. Der Auskoppelspiegel AS weist eine Transmission von ca. 8 % auf. Die emittierten Laserpulse haben eine Repetitionsrate von 87 MHz, eine Zentralwellenlänge von ca. 830 nm und eine Pulsdauer von <100 fs bei einer maximalen Leistung von 300 mW.

4.1.2 Der konfokale Fluoreszenzmikroskopaufbau

In Abbildung 4.2 ist der Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops dargestellt. Die vom Ti:Sa Laser emittierten Laserpulse werden über ein Filterrad R abgeschwächt und mit einer Strahlaufweitung BE auf den der Objektivrückapertur entsprechenden Durchmesser gebracht und kollimiert. Ein Reflex des Laserlichts wird auf eine schnelle Photodiode SPD fokussiert, die den Synchronisationspuls an die TCSPC Karte (TimeHarp200, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland) weitergibt. Der Anregungsstrahl wird nun von einem dichroitischen Spiegel (BS 1, 715 DSCPXR, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) auf die Rückapertur des Wasserimmersionsobjektivs (MO, UApo 40x, NA 1.15, Olympus) geleitet, welches dann einen beugungsbegrenzten Fokus erzeugt. Von den Fluorophoren emittiertes Licht von demselben Objektiv wieder gesammelt, kollimiert und passiert BS 1 im Spektralbereich 400 bis 715 nm. Anfallendes Streulicht des Anregungslichtes wird durch einen Zweiphotonen-Sperrfilter (E700sp2, AHF) geblockt. Im Detektionsstrahlengang wird das Fluoreszenzlicht zunächst durch eine Tubuslinse TL fokussiert, anschließend durch eine Linse L wieder kollimiert und sukzessiv durch zwei weitere dichroitische Strahlteiler (BS 2, 590 DCXR, BS 3, 645 LP, AHF) in drei unterschiedliche Spektralbereiche (Grün, Rot, Dunkelrot) aufgeteilt. Nach einer zusätzlichen spektralen Aufreinigung durch drei Bandpassfilter (F1, HQ 535/50; F2, HQ 615/40; F3, HQ 675/50; AHF) wird das so separierte Fluoreszenzlicht auf drei Lawinenphotodioden (SPCM-AQR-13, Perkin-Elmer, Dumberry, Kanada) fokussiert. Die drei resultierenden TTL-Signalströme (*Transistor-Transistor-Logic*; 0-5-0 V Rechteckpuls) werden in einen 4-Kanal Router (PRT 400, PicoQuant GmbH) geleitet, der die Signale mit einer zusätzlichen Detektorsignatur versieht und an die TCSPC Karte weiterleitet.

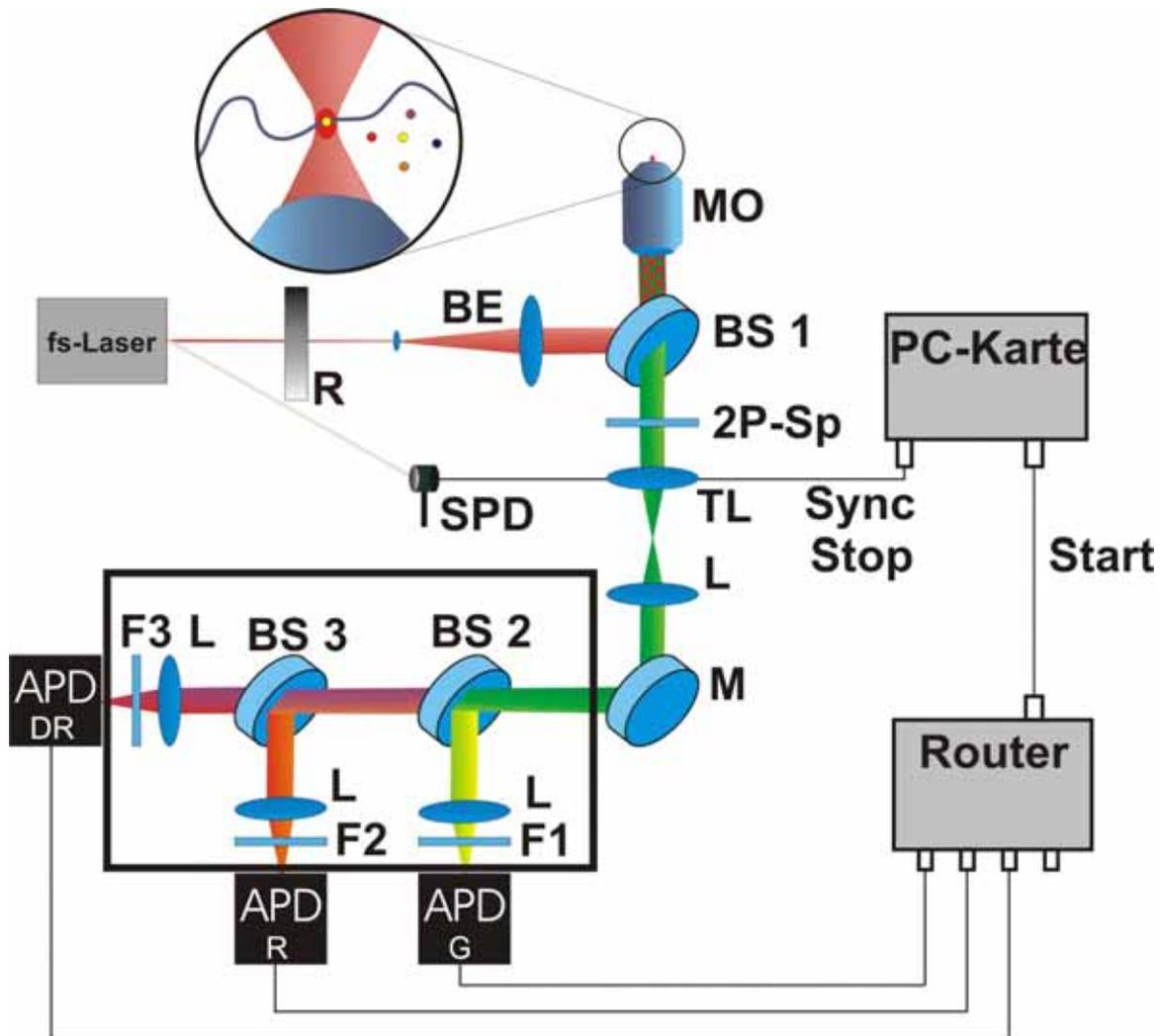


Abbildung 4.2: Aufbau des konfokalen Mikroskops. Strahlteiler BS 1-3, Bandpassfilter F 1-3, Zweiphotonen-Sperrfilter 2P-Sp, Strahlaufweitung BE, Mikroskopobjektiv MO, Linsen L, Tubuslinse TL, Lawinendetektoren APD G-R-DR, Filterrad R, Schnelle-Photodiode SPD.

Abbildung 4.3 verdeutlicht wie das Anregungslicht des Lasers (830 nm +/- 30 nm) von aufkommendem Fluoreszenzlicht (400 bis 700 nm) über den Strahlteiler BS 1 und den Zweiphotonen-Sperrfilter separiert wird. Des Weiteren ist ersichtlich wie der transmittierte Bereich durch Strahlteiler und Bandpassfilter in drei separate Spektralbereiche aufgeteilt wird.

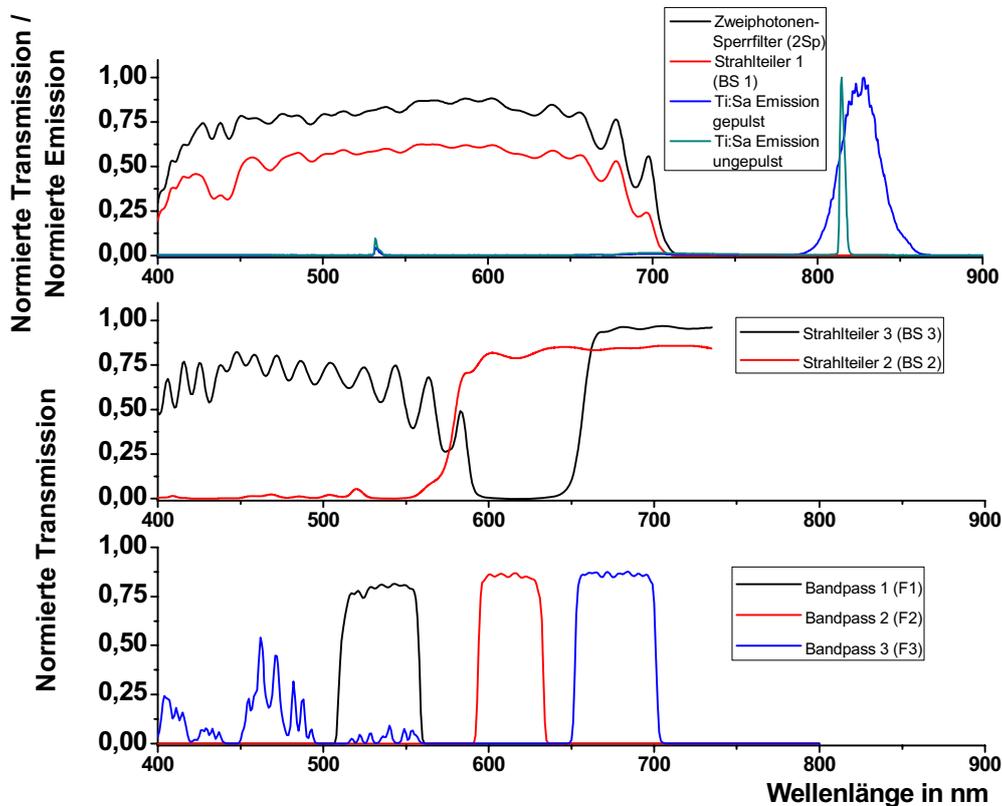


Abbildung 4.3: Oben, normierte Filtertransmissionsspektren des ersten Dichroitens, der Anregungslicht von Fluoreszenzlicht trennt sowie des Zweiphotonen-Sperrfilters, zusammen mit den Emissionsspektren des Ti:Sa Lasers im gepulsten sowie kontinuierlichen Modus. Mitte, normierte Filtertransmissionsspektren der Dichroitens des Detektionsstrahlengangs. Unten, normierte Transmissionsspektren der Fluoreszenzfilter vor den Photodioden.

4.1.3 Die Avalanche Photodioden

Die APDs des Typs SPCM-AQR 13 von Perkin Elmer zeichnen sich durch eine niedrige Dunkelzählrate von <250 Hz aus. Ihre Detektionsfläche hat einen Durchmesser von 175 μm und die Detektionseffizienz ist wellenlängenabhängig im Bereich von 400 bis 1050 nm, wobei das Maximum mit 65 % bei 700 nm liegt.

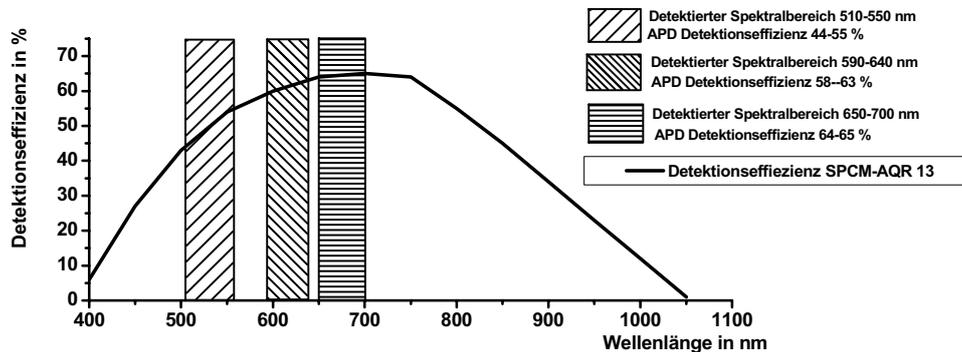


Abbildung 4.4: Detektionseffizienz der Avalanche Photo Diode in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Wie in Abbildung 4.4 zu sehen bedeutet dies, dass Fluoreszenz in den drei Spektralbereichen unterschiedlich gut von den APDs detektiert wird. Weiterhin treten bei hohen Zählraten Sättigungseffekte auf und es muss ein Korrekturfaktor angewandt werden, um die korrekten Zählraten zu berechnen. Ausgabesignal der APDs ist ein TTL-Puls von 35 ns.

4.1.4 Die Datenaufnahme und Speicherstruktur

Die TimeHarp200 PC-Karte speichert die von den APDs und Router kommenden TTL-Signale im sogenannten *Time-Tagged Time-resolved* (TTTR) Format ab. Hierbei werden im Wesentlichen vier Informationen über die detektierten Photonen festgehalten.

Zuerst wird festgehalten ob das Signal von einem gültigen Photon herrührt. Nicht gültige TTL-Signale werden durch Marker und Überläufe verursacht. Die Marker können z.B. dazu genutzt werden, die Position einer Translationsbühne in den Datenstrom einzufügen. Als zweites, wird durch eine vom Router angefügte Kodierung notiert, von welcher APD das Signal kommt.

Die makroskopische Zeit ist die dritte Information über die detektierten Photonen. Sie wird mit 16 Bit Speicherzuweisung in einer 100 ns Zeitauflösung registriert. Überläufe werden hierbei dadurch verursacht, dass die makroskopische Zeit auf $2^{16} * 100 \text{ ns} = 6,5536 \text{ ms}$ limitiert ist. Übertrifft die Messzeit diesen Wert, so wird erneut auf Null gesetzt und ein Überlauf-Ereignis im Datenstrom notiert. Die makroskopische Zeit gibt somit die Zeitspanne an, die seit dem letzten Überlauf-

Ereignis verstrichen ist. In Kombination mit der Anzahl an Überlauf-Ereignissen kann sie in eine Gesamtzeit seit dem Messbeginn umgerechnet werden. Als vierte Information wird die mikroskopische Zeit festgehalten. Diese wird mit 12 Bit bei einer maximalen Zeitauflösung von 38 ps registriert. Sie gibt im umgekehrten Start-Stop Modus an, welcher Zeitraum vom detektierten Photon bis zum nächsten Synchronisationslaserpuls vergangen ist. Eine Repetitionsrate von 87 MHz lässt sich in einen Pulsabstand von ca. 11,5 ns umrechnen. Dies bedeutet bei der maximalen Zeitauflösung, dass ungefähr 300 Speicheradressen belegt werden. Die Position der ersten Speicheradresse ergibt sich hierbei durch die Streckenunterschiede zwischen Photon und Synchronisationspuls.

4.2 Die verwendeten Proben

Für die Untersuchungen standen Polystyrolkugeln (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) mit verschiedenen Fluorophoranfärbungen, verschiedenen Oberflächenbeschichtungen und in verschiedenen Größen zur Verfügung. Hierzu gehören ein *Multiplexing* Set (C-29096 Komponenten A-G), ein Größenset (F-8888, Komponenten A-C), ein Farbsset (F-10720 Komponenten A-D) und ein einzelner Typ (F-8782).

Farbstoff	Farbe	λ_{Abs} [nm]	λ_{Em} [nm]
1	Gelb-grün	505	515
2	Orange	540	560
3	Rot	580	605
4	Karminrot	625	645
5	Dunkelrot	660	680

Tabelle 4.1: In den *Nanospheres* inkorporierte Farbstoffe mit Absorptions- und Emissionsmaxima der Farbstoffe.

Tabelle 4.2 fasst die inkorporierten Farbstoffe, Partikelgrößen, Konzentrationen und Oberflächenbeschichtungen der einzelnen *Nanospheres* zusammen und weist ihnen für die weitere Arbeit eine Typenbezeichnung zu.

Die Literaturrecherche bezüglich der Nanosphere Typenbezeichnung sowie die Aussage von Molecular Probes, dass häufig Bodipy Farbstoffe zur Anfärbung benutzt werden, macht es wahrscheinlich, dass Farbstoffe des Bodipy-Typs (4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) in den *Nanospheres* benutzt

werden. Insbesondere stimmen die gemessenen Absorptions- und Emissionsspektren mit jenen in der Literatur überein [50, 51, 107]. Der Kernkörper dieser Farbstoffgruppe sowie ein Beispiel eines rot emittierenden Bodipy-Derivats ist in Abbildung 4.5 zu sehen.

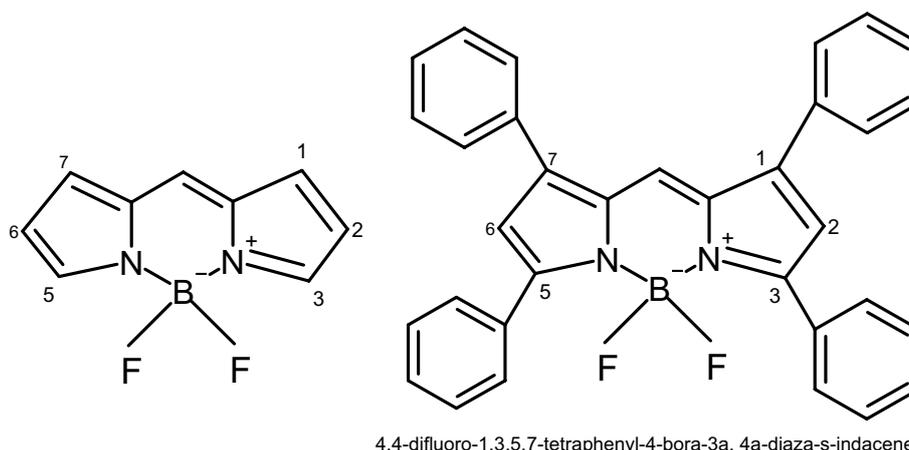


Abbildung 4.5: Links, Kernkörper der Bodipy Farbstoffgruppe. Rechts, Bodipy-derivat mit Emission im roten Spektralbereich.

Typ	Größe [nm]	Feststoff [%]	Konz. [μmol/L]	Farbstoffe	Oberfläche	Art. Nummer
1	20	1	2,19	1	Aldehyd-Sulfat	C-29096-A
1a	20	2	4,37	1	Carboxylat	F-8888-A
1b	40	5	1,90	1	Carboxylat	F-10720-A
1c	100	2	0,06	1	Carboxylat	F-8888-B
1d	200	2	0,007	1	Carboxylat	F-8888-C
2	40	5	1,90	2	Carboxylat	F-10720-B
3	20	1	2,19	3	Aldehyd-Sulfat	C-29096-B
3b	40	5	1,90	3	Carboxylat	F-10720-C
4	20	2	4,37	4	Carboxylat	F-8782
4b	20	1	2,19	5	Aldehyd-Sulfat	C-29096-C
5	40	5	1,90	5	Carboxylat	F-10720-D
6	20	1	2,19	1+3	Aldehyd-Sulfat	C-29096-D
7	20	1	2,19	1+5	Aldehyd-Sulfat	C-29096-E
8	20	1	2,19	3+5	Aldehyd-Sulfat	C-29096-F
9	20	1	2,19	1+3+5	Aldehyd-Sulfat	C-29096-G

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Parameter Größe, Konzentration, Oberflächenbeschichtung Farbstoffe, und Typenbezeichnung der zur Verfügung stehenden *Nanospheres*.

4.3 Einphotonen-Absorptionsspektren

Die Einphotonen-Absorptionsspektren und Filtertransmissionsspektren werden am Cary UV-VIS-NIR Spektrophotometer der Firma Varian gemessen. Hierbei werden die *Nanospheres* mit bidestilliertem Wasser aus den Stammlösungen zu 0,1 mikromolaren Lösungen verdünnt. Gemessen wird in einer 1 cm Quarzglasküvette. Für die Transmissionsspektren der Bandpassfilter werden diese orthogonal zum Strahlengang eingebaut. Bei den Strahlenteilern muss beachtet werden, dass diese im 45° Winkel zum Strahlengang eingebaut werden, da sich sonst eine Spektralverschiebung ergibt.

Für alle Messungen wird eine Auflösung von 1 nm und eine Integrationszeit von 0,5 s/nm gewählt.

4.4 Einphotonen-Emissionsspektren

Die Einphotonen-Emissionsspektren werden am Fluorolog FL 3-22 der Firma Jobin Yvon gemessen. Dazu werden die *Nanospheres* in bidestilliertem Wasser auf 2 nanomolare Lösungen verdünnt. Da die Farbstoffe nur einen geringen *Stokes-Shift* aufweisen, erfolgt die Anregung jeweils ca. 20 nm unterhalb des Absorptionsmaximums des jeweiligen Typs um möglichst das komplette Emissionsspektrum aufnehmen zu können. Bei den mehrfachangefärbten *Nanospheres* werden Messungen bei allen Absorptionsmaxima durchgeführt. Die Auflösung beträgt hierbei 1 nm und die Integrationszeit 1 s/nm.

4.5 Zweiphotonen-Emissionsspektren

Die Zweiphotonen-Emissionsspektren werden mit dem USB2000 *Miniatur Fiber Optic Spectrometer* der Firma Ocean Optics gemessen. Hierzu wird der gepulste Ti:Sa Laser extern auf die 2 mikromolaren Stammlösungen der *Nanospheres* in einer 1 cm Quarzglasküvette fokussiert. Im rechten Winkel zum Strahlengang wird dann über eine Linsenkombination das Fluoreszenzsignal auf den Fasereingang des Spektrometers fokussiert. Hierbei wurde die Fluoreszenz mit einer Auflösung von 0,4 nm detektiert. Die resultierenden Spektren sind Mittelungen aus 10 Messungen mit einer Integrationszeit von 1 s/Spektrum.

5 Datenauswertung

5.1 Datensegmentierung und Glätten

Zur Datenanalyse müssen zunächst die Daten der gültigen Photonen anhand der Router-Information aus dem TTTR-Format gelesen und sortiert werden.

[Anhang C].

Hierbei werden die Informationen der drei resultierenden Datenströme je nach weiterer Verwendung in Zeitintervallen kumuliert und bilden drei Zeitspuren. Für die FCS-Analyse erfolgt eine Kumulierung in 5 μ s Segmente. Für die Analyse der durch Fokalphasuren von *Nanospheres* entstandener, einzelner Photonenbursts im Datenstrom wird eine 1 ms Segmentierung gewählt.

Um eine genaue Erkennung der Burstgrenzen zu gewährleisten, wird von jeder 1 ms Zeitspur eine geglättete Zeitspur, welche die Poisson'schen Signalfuktuationen der detektierten Photonen kompensieren soll, erstellt. Zur Glättung wird ein sogenannter Lee-Filter [108] benutzt. Dabei wird für die Rohdaten n_k ein laufender Mittelwert \bar{n}_k und eine laufende Varianz σ_k^2 berechnet, siehe Gleichungen (5.1) und (5.2). Dafür werden jeweils m Segmente vor und hinter dem zu glättenden Segment betrachtet.

$$\bar{n}_k = \frac{1}{(2m + 1)} \sum_{j=-m}^{j=m} n_{k+j} \quad [k = m \dots (\text{Anz. Segmente} - m)] \quad (5.1)$$

$$\sigma_k^2 = \frac{1}{(2m + 1)} \sum_{j=-m}^{j=m} (n_{k+j} - \bar{n}_k)^2 \quad [k = m \dots (\text{Anz. Segmente} - m)] \quad (5.2)$$

Anschließend werden die geglätteten Daten über die Gleichung (5.3) berechnet, wobei σ_0 eine Konstante ist, welche die Varianz des Rauschens darstellt.

$$\tilde{n}_k = \bar{n}_k + (n_k - \bar{n}_k) \frac{\sigma_k^2}{\sigma_k^2 + \sigma_0^2} \quad (5.3)$$

Der Lee-Filter zeichnet sich dadurch aus, dass in Bereichen mit konstanter Zählrate der geglättete Wert dem Mittelwert des Zeitfensters entspricht, während in sich stark ändernden Bereichen der geglättete Wert gleich dem ungeglätteten

ist. Somit wird Rauschen geglättet während Kontraste erhalten bleiben. Die Parameter des Filters wurden anhand von Zeitspuren optimiert und haben sich zu $m = 7$ und $\sigma_0 = 60$ ergeben.

[Anhang D]

5.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer in einem definierten Zeitintervall, sei es ein einzelner Photonenburst oder eine Ensemblemessung über mehrere Sekunden, erfolgt unter Ausnutzung der mikroskopischen Zeitinformationen der Photonen. Hierzu werden zunächst die Photonen im untersuchten Detektor anhand ihrer Kanalinformationen in einem Histogramm kumuliert. Nach Transformation der Kanaldaten in reale Zeitabstände zum Synchronisationspuls wird nun die Abklingkurve an die Gleichungen (5.4) für monoexponentielles und (5.5) für biexponentielles Abklingen angepasst (siehe Abbildung 5.1).

$$f_t = A_1 e^{\left(-t/\tau_{F1}\right)} \quad (5.4)$$

$$f_t = A_1 e^{\left(-t/\tau_{F1}\right)} + A_2 e^{\left(-t/\tau_{F2}\right)} \quad (5.5)$$

Die Anpassung erfolgt über einen Levenberg-Marquardt-Algorithmus, welcher die Summe der Fehlerquadrate minimiert. Hierfür wird der Bereich der Abklingkurve, der nicht durch die Geräteantwortfunktion (IRF) überlagert ist, ausgewählt.

Die Qualität der Anpassung wird über das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben. Hierzu wird zunächst der Mittelwert der Daten Y nach (5.6) berechnet. Dann wird die totale Varianz SS_T nach Gleichung (5.7) und die Varianz SS_R der angepassten Daten f_i nach (5.8) berechnet. Das Bestimmtheitsmaß ergibt sich nun nach (5.9) und nähert sich im Idealfall 1 an.

[Anhang E, Anhang H]

$$\bar{Y} = \frac{\sum_{i=0}^N Y_i}{N} \quad (5.6)$$

$$SS_T = \sum_{i=0}^N (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (5.7)$$

$$SS_R = \sum_{i=0}^N (Y_i - F_i)^2 \quad (5.8)$$

$$R^2 = \frac{(SS_T - SS_R)}{SS_T} \quad (5.9)$$

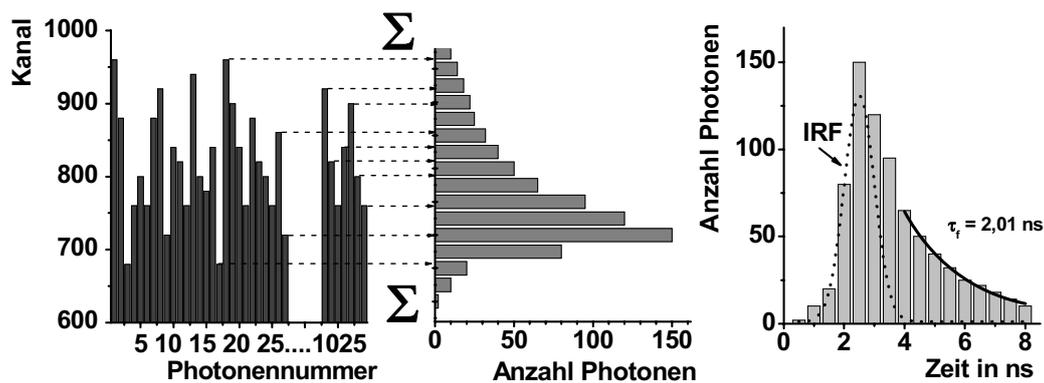


Abbildung 5.1 : Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer anhand der Kanalinformationen der Einzelphotonen. Links, Photonendatenstrom mit der Kanalinformation. Mitte, Ausbildung des Histogramms. Rechts, Anpassung eines monoexponentiellen Abklingens an die Daten außerhalb der von der IRF beeinflussten Region.

5.3 Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsanalyse

Die Berechnung der Autokorrelationskurve erfolgt sequenziell in den Korrelationszeitschritten von τ , wobei die erste korrelierte Zeit der gewählten Segmentgröße der FCS Zeitspur von $5 \mu\text{s}$ entspricht. Für die nachfolgenden Schritte werden je zwei benachbarte Segmente kombiniert. Hieraus ergibt sich die folgende Sequenz von Korrelationszeiten: 5, 10, 20, 40.. [μs]. Bei einer Messzeit von 30 Sekunden bedeutet dies 22 Datenpunkte. Wird jeweils bei jedem ersten Korrelationsschritt einer Serie eine temporäre Zeitspur, die aus je drei benachbarten Segmenten summiert wird, erstellt, so kann nach deren Abarbeitung mit ihr wiederum eine neue Serie begonnen werden. Auf diese Weise wird dann eine Vielzahl zusätzlicher Korrelationspunkte berechnet.

- 1. Serie 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320,... [μs]
- 2. Serie 15, 30, 60, 120, 240,... [μs]
- 3. Serie 45, 90, 180, 360,... [μs]
- 4. Serie 135, 270,... [μs]

usw.

Um die Amplitude G_τ der Autokorrelationskurve für eine bestimmte Korrelationszeit aus zwei Zeitspuren a und b zu berechnen, müssen zunächst für dieses Zeitintervall durchschnittliche Photonenzählraten \bar{P} in den Zeitspuren bezogen auf die Gesamtmesszeit t_M berechnet werden (5.10)..

$$\bar{P}_{a,\tau} = \frac{\sum_{i=0}^{i=t_M} P_{a,i} \tau}{t_M} \quad (5.10)$$

Nun werden die Differenzen der zu korrelierenden Datenpunkte von diesem Mittelwert miteinander multipliziert und summiert (5.11) und ergeben den Korrelationswert K . Im Fall der Kreuzkorrelation ergeben sich die Zeitspuren a und b aus verschiedenen Detektoren und bei der Autokorrelation sind die Zeitspuren a und b essentiell dieselbe Zeitspur.

$$K_{a,b,\tau} = \sum_{i=0}^{i=t_M} \left((P_{a,i,t} - \bar{P}_{a,\tau})(P_{b,i,t+\tau} - \bar{P}_{b,\tau}) \right) \quad (5.11)$$

Zuletzt erfolgt nun noch eine Normierung der Daten durch eine Multiplikation mit der Anzahl durchgeführter Korrelationen und eine Division mit den miteinander multiplizierten Photonenzahlen der jeweiligen Detektoren (5.12).

$$G_\tau = \frac{K\tau \left(\frac{t_M}{\tau} \right)}{\sum_{i=0}^{i=t_M} P_{a,i} \sum_{i=0}^{i=t_M} P_{b,i}} \quad (5.12)$$

An die Daten der Autokorrelation bzw. Der Kreuzkorrelation kann dann die in Kapitel 3.8 hergeleitete Gleichung (3.23) mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus angepasst werden. Der Fokalparameter r_0/z_0 hat sich aus Kalibrationsmessungen als 0,25 ergeben.

[Anhang F]

5.4 Bursterkennung und –validierung

Begin und Ende eines Photonenbursts in einer geglätteten Zeitspur werden durch Über- bzw. Unterschreiten eines Grenzwertes G (3 Photonen/ms) bestimmt. Dieser ist so gewählt, dass er über dem mittleren Hintergrundrauschen liegt und zugleich maximale Photonenausbeute der Bursts gewährleistet.

Der Grenzwert kann auch direkt aus den Zeitspuren mithilfe eines Zählratenverteilungshistogramms ermittelt werden. Dies ist z.B. von Interesse, wenn Aggregationsexperimente durchgeführt werden sollen, bei denen der Hintergrund nicht aus Dunkelrauschen, sondern aus Signalen besteht und abhängig von der jeweiligen Messung ist.

Um zeitspurspezifische Grenzwerte zu ermitteln, werden die Zählraten pro Segment Z über die gesamte Zeitspur in einem Histogramm kumuliert. Das Hintergrundsignal, sei es nun durch Dunkelrauschen oder aber durch die Einzelpartikelfluoreszenz bedingt, liegt statistisch wesentlich häufiger vor als die tatsächlichen Burstereignisse. Dies führt zu einem Histogramm wie in Abbildung 5.2 dargestellt. Über die Erfüllung der Gleichung (5.13) lässt sich für diese Verteilung ein Median sowie durch Substitution von 0,5 durch 0,25 bzw. 0,75 das erste Quartil $1.Q$ und das dritte Quartil $3.Q$ berechnen. Der Grenzwert für diese Zeitspur ergibt sich dann aus dem Median plus dem doppelten mittleren Quartilabstand MQ (5.14).

[Anhang N]

$$N - \frac{\sum_{i=0}^{i=Median} Z_i}{N} = 0,5 \tag{5.13}$$

$$G = \text{Median} + (2 MQ)$$

(5.14)

$$G = \text{Median} + \left[2 \frac{(3.Q - 1.Q)}{2} \right]$$

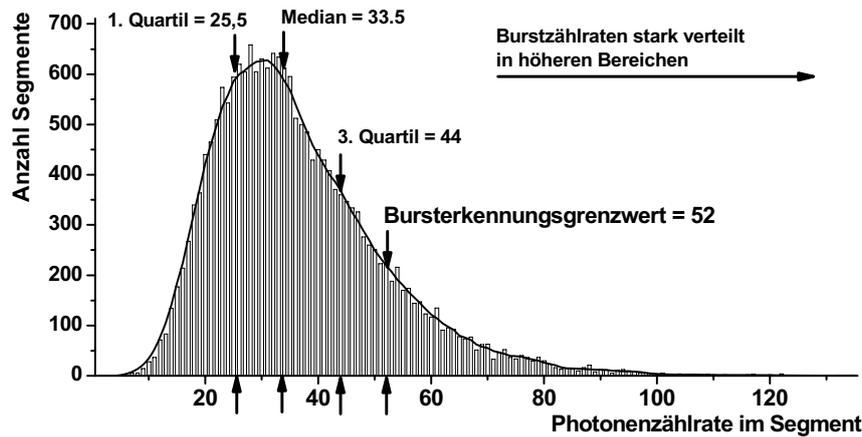


Abbildung 5.2: Zählratenverteilungshistogramm einer Probe mit durchschnittlich zehn *Nanospheres* im Schnitt im Fokalvolumen. Des Weiteren angegeben sind die drei Quartile und der nach (5.14) berechnete Bursterkennungsgrenzwert für diese Zeitspur.

Um nur signifikante Bursts zu selektieren, die durch die Passage eines Teilchens durch das Fokalvolumen hervorgerufen wurden, erfolgt eine Validierung über definierte Mindestanforderungen. Detektierte Bursts müssen in der Summe mindestens 200 Photonen und eine Mindesthöhe von 20 Photonen in der untersuchten Zeitspur aufweisen (siehe Abbildung 5.3).

Durch die breiten Emissionsspektren der *Nanospheres* kann es dazu kommen, dass nicht nur im dominanten Detektor des jeweiligen Typs primäre Bursts ermittelt werden, sondern simultan in den schwächeren Detektoren sekundäre und tertiäre Bursts erkannt werden können. Sekundäre Bursts korrelieren stets zeitlich mit den primären Bursts des Typs, da sie aus derselben Fokalpassage resultieren. Analog hierzu korrelieren die tertiären Bursts mit sekundären sowie primären Bursts.

Photonen, die bei einem validierten Burst in den Detektoren registriert werden, werden in Hauptsignal und Nebensignale (*crosstalk*) unterteilt. Hierbei werden, unabhängig von der tatsächlichen Signalstärke, die Photonen des Detektors in welchem der Burst validiert wurde, als Hauptsignal bezeichnet. Die im jeweils

kürzerwelligen Spektralbereich detektierten Photonen werden als Nebensignal 1 bezeichnet und die im längerwellig detektiertem Spektralbereich vorhandene Photonen als Nebensignal 2. Abbildung 5.4 zeigt die typischen Zeitspuren von Typ 2 *Nanospheres* mit erkannten und validierten primären Bursts. [Anhang G]. Für die validierten Bursts werden dann folgende Parameter gespeichert:

- 1.) Burstnummer
- 2.) Burstgröße (Anzahl Photonen)
- 3.) Bursthöhe (Anzahl Photonen)
- 4.) Burststart (Segmentnummer)
- 5.) Burststop (Segmentnummer)
- 6.) Startphoton
- 7.) Stopphoton
- 8.) Korrelation mit Burstnummer in Nebensignal 1 (Burstnummer)
- 9.) Korrelation mit Burstnummer in Nebensignal 2 (Burstnummer)

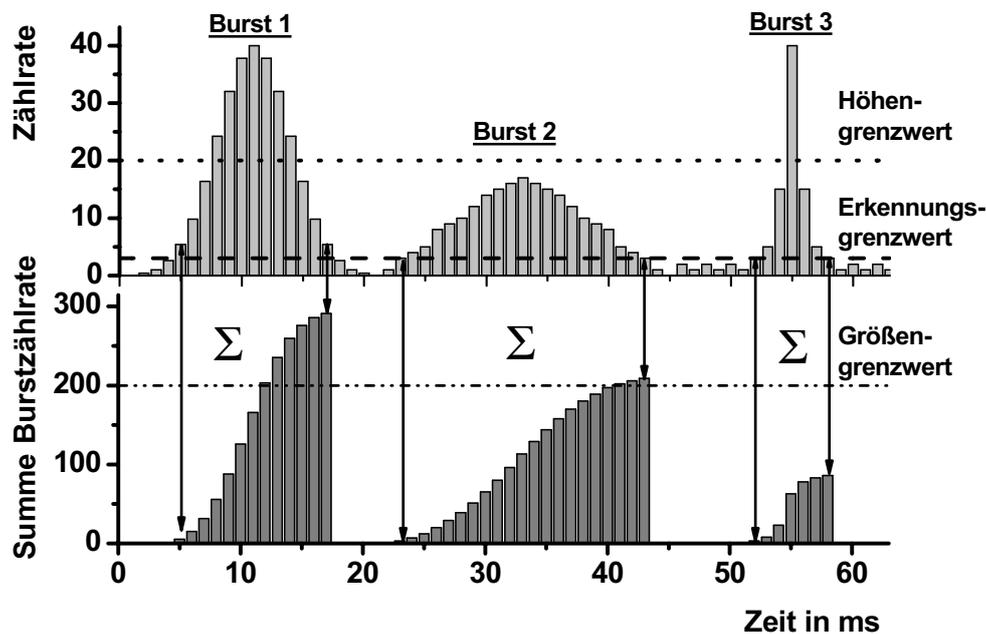


Abbildung 5.3: Schema der Bursterkennung über den Erkennungsgrenzwert und Validierung über die zwei Grenzwerte Höhe und Größe, am Beispiel von drei Photonenbursts. Burst 1 erfüllt alle Bedingungen, Burst 2 scheitert an der Mindesthöhe und Burst 3 kann die Mindestgröße nicht erfüllen.

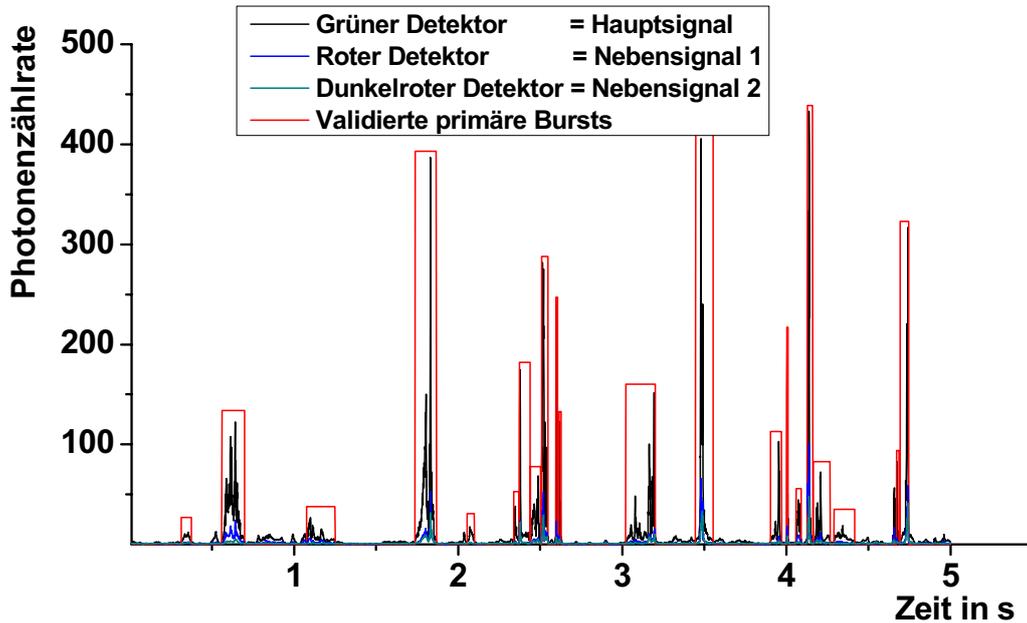


Abbildung 5.4: Typische Zeitspuren der drei Detektoren einer Typ 2 Messung. Erkannte und validierte primäre Bursts im grünen Detektor sind in eine rote Box eingefasst. Aus Übersichtsgründen sind validierte sekundäre und tertiäre Bursts der Zeitspuren nicht gekennzeichnet

5.5 Burstcharakterisierung

Um validierte Bursts weiter zu charakterisieren, werden die Einzelburstanaloga zu Ensemblefluoreszenzlebensdauer und prozentualer Gesamtphotonenverteilung in den Detektoren berechnet. Zur Berechnung der Einzelburstfluoreszenzlebensdauer (*Burst Integrated Fluorescence Lifetime*, BIFL) wird nach der in Kapitel 5.2 beschriebenen Methodik für monoexponentielles Abklingen verfahren. Hierzu wird das durch die Burstgrenzen beschriebene Zeitintervall Burststart bis Burststop evaluiert und die mikroskopische Zeitinformation von Startphoton bis Stopphoton kumuliert.

$$BICR = \frac{\sum_{i=Burststart}^{i=Burststop} X_i}{\sum_{i=Burststart} C_i} \tag{5.15}$$

Die Photonenverhältnisse (*Burst Integrated Count Ratio*, BICR) der Nebensignale in Relation zum Hauptsignal werden anhand der Gleichung (5.15) berechnet. Hierbei werden die Photonen in den Detektoren des Nebensignals X und des Burstsignals C von Burststart bis Burststop summiert und anschließend miteinander dividiert. Es werden zwei charakteristische Photonenverhältnisse, BICR1 und BICR2 sowie eine charakteristische Fluoreszenzlebensdauer BIFL berechnet. [Anhang H]

5.6 Generierung der Identifikationsfilterfunktionen

Um eine hochwertige und flexible Identifikation von Photonenbursts zu gewährleisten, sind Burstcharakteristika notwendig, die typenspezifisch sowie unabhängig von der Trajektorie der Teilchen durch den Anregungsfokus sind. Da auch Aggregationen mit der Methode bestimmt werden sollen, dürfen auch diese nicht zu signifikanten Veränderungen führen, die eine falsche Identifikation bedingen würden. BIFL und BICR erfüllen diese Bedingungen und bieten sich daher als Grundlage der Identifikationsfilter an. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Photonenburst zu segmentieren und auf die Nebensignale in die weiteren Detektoren hin zu untersuchen. Hierbei bietet sich die schon vorhandene Segmentierung in 1 ms Schritten an.

Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei diesen Parametern nicht um typenspezifische Konstanten handelt, sondern dass sie Verteilungen bilden. Dies ist begründet durch die statistische Varianz der *Nanospheres* bezüglich Fluorophorbeschickung und Größe sowie Poisson'schen Signalfuktuationen. Zur Bestimmung der entsprechenden Verteilungen mit einer soliden Statistik werden multiple Messungen der Einzeltypproben durchgeführt. [Anhang K, Anhang L]

5.6.1 Der Lebensdauerfilter

Verteilungen der BIFL werden für alle ausgewählten Typen erstellt. Hierzu werden Histogramme der BIFL im Intervall 0 bis 10 ns mit einer Schrittweite von 0,1 ns generiert. Um die Datenqualität der Verteilung zu verbessern werden nur BIFL-Werte verwendet, deren Anpassungskoeffizient R^2 größer als 0,75 ist. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Typen werden die Daten jeweils mit der Anzahl der evaluierten Bursts normiert.

5.6.2 Der Verhältnisfilter

Für den Verhältnisfilter werden Histogramme der zwei BICR-Parameter im Intervall 0 bis 2 mit einer Schrittweite von 0,02 kumuliert. Auch hier werden zur Vergleichbarkeit der Histogramme die Verteilungen mit der Anzahl der jeweils evaluierten Bursts normiert.

5.6.3 Der Segmentfilter

Da der Segmentfilter jede Millisekunde einzeln untersucht, werden Nebensignalverteilungen der Detektoren als Funktion der Anzahl detektierter Photonen pro Millisekunde im Hauptsignal c benötigt. Das bedeutet für jede mögliche Photonenanzahl in einem Segment des Hauptsignals zwei Nebensignalverteilungen. Hierfür werden alle Bursts in der Messreihe eines Typs auf eine bestimmte Photonenanzahl in einem Segment der Burstdetektorzeitspur untersucht. Die beiden resultierenden Nebensignale x werden in Histogrammen kumuliert. Hierbei ist N die Anzahl der Segmente, die c Photonencounts im Burstdetektor aufweisen.

Die Daten folgen einer Gauß'schen Verteilung um einen Mittelwert. Mit der Gleichung (5.16) kann das mittlere Nebensignal \bar{X}_c für eine bestimmte Photonenanzahl berechnet werden. Mit Gleichung (5.17) kann dann die Standardabweichung σ der Verteilung um diesen Mittelwert bestimmt werden.

$$\bar{X}_c = \frac{\sum_0^N X_{c,i}}{N} \quad (5.16)$$

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{1}{(N - 1)} \sum_0^N (X_{c,i} - \bar{X}_c)^2} \quad (5.17)$$

Wird für alle validierten Bursts in einer Einzeltyp-Messreihe das Nebensignal als Funktion des Hauptsignals pro Segment in einem Punktdiagramm aufgetragen, so resultiert eine Punktwolke. Abbildung 5.5 veranschaulicht wie die Parameter \bar{X} und σ hieraus bestimmt werden können.

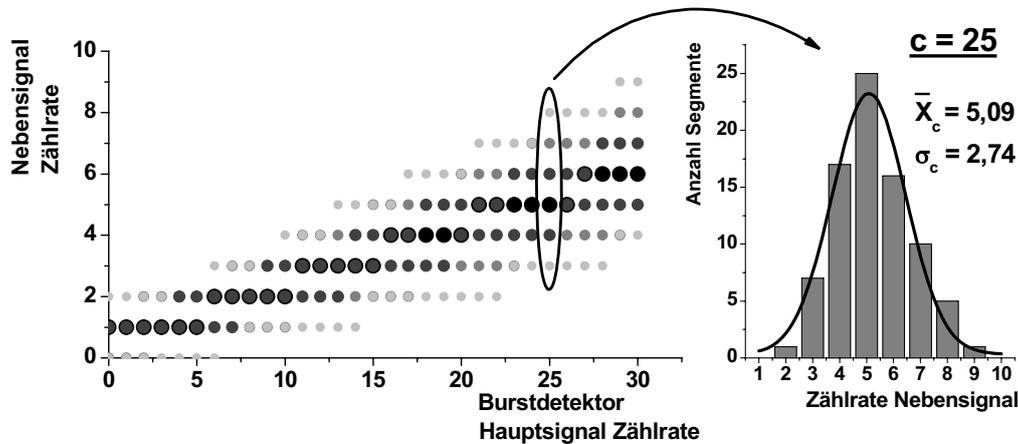


Abbildung 5.5: Links, Punktwolke aus der Auftragung von Burstdetektorzählraten gegen die dazugehörigen Zählraten eines Nebensignals resultierend aus multiplen Photonenbursts. Farbintensität und Größe der Datenpunkte spiegeln die Häufigkeit der Ereignisse wieder. Rechts, für eine spezifische Zählrate (25 Photonen) in den Photonenbursts generiertes Histogramm eines Nebensignals zusammen mit einer Gauß-Anpassung der Daten und den daraus angepassten Parametern Mittelwert und Standardabweichung.

Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen sind nur dann repräsentativ, wenn sie aus einer genügend großen Datenmenge N ermittelt wurden. Dies trifft bei den Einzelpartikelmessungen aber nur für die niedrigen Photonenzählraten zu. Segmente mit hohen Zählraten sind statistisch selten. Daher werden den experimentellen Daten für Mittelwert und Standardabweichung im niedrigen Zählratenbereich eine Gerade angepasst. Mithilfe der Anpassungsparameter lassen sich dann die Mittelwerte und Standardabweichungen für höhere Zählraten extrapolieren.

5.7 Burstidentifikation

Die Identifikation eines Photonenbursts erfolgt über die Berechnung von Gesamtsicherheitsfaktoren GSF im Vergleich zweier Typen. Der GSF ergibt sich wiederum aus der Multiplikation einzelner unabhängiger Sicherheitsfaktoren SF . Diese sind das Ergebnis aus der Division der Bestimmungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Typen bei der Anwendung der jeweiligen Filterfunktionen.

Mit jeder Filterfunktion lässt sich demnach ein Sicherheitsfaktor berechnen, d.h. es resultiert ein SF für den Lebensdauerfilter, pro Nebensignal ein SF für die Verhältnisfilter und analog hierzu pro Nebensignal ein SF für die Segmentfilter.

Für eine positive Identifikation muss gelten, dass die Gesamtsicherheitsfaktoren eines Typs in Relation zu allen anderen Typen, die Photonenbursts im jeweiligen Detektor hervorrufen können, größer als 10 ist. Daraus folgt, dass dieser Typ eine mindestens 10-mal höhere Wahrscheinlichkeit aufweist als alle anderen möglichen Typen. Bei der Anwendung des Segmentfilters können noch zusätzliche Identifikationskriterien wie Mindestbestimmbarkeit und Mindestwahrscheinlichkeit angewendet werden. [Anhang M; Anhang I]

5.7.1 Identifikation mit Lebensdauer- und Verhältnisfiltern

Bei den Lebensdauer- und den Verhältnisfiltern wird direkt mit den normierten, typenspezifischen Verteilungen der Identifikationsparameter gearbeitet. Dazu werden zunächst bei dem zu identifizierende Burst die Parameter BIFL und BICR bestimmt. Nun werden innerhalb der jeweiligen Filterverteilung die Schnittpunkte des Parameters X mit den jeweiligen Filterverteilungen der zu vergleichenden Typen j und k ermittelt. Die korrespondierenden Y-Werte entsprechen den typenspezifischen Häufigkeiten H , deren Quotient nach Gleichung (5.18) den Sicherheitsfaktor zwischen diesen beiden Typen ergibt.

$$SF_{j/k} = \frac{H_{x,j}}{H_{x,k}} \quad (5.18)$$

In Abbildung 5.6 ist beispielhaft das Vorgehen für die Sicherheitsfaktorberechnung anhand von BICR-Filterverteilungen dargestellt. In dem konkreten

Beispiel ergibt sich ein SF von 7,5. Dieser SF alleine erfüllt die Identifikationskriterien zwar noch nicht, da aber noch ein weiterer SF aus den zweiten BICR Filterverteilungen berechnet wird, ist es wahrscheinlich, dass beide SF miteinander multipliziert den GSF-Mindestwert von 10 überschreiten.

Liegt der berechnete BICR über 2, so liegt ein sekundärer oder tertiärer Burst vor. In einem solchen Fall wird der BICR invertiert und die relevante Filterverteilung des primären Bursts genutzt.

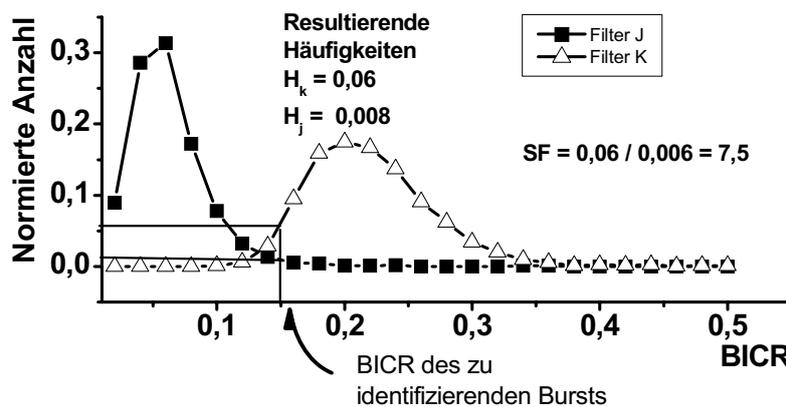


Abbildung 5.6: Filterverteilungen eines BICR Parameters von Typ 1 und 2 *Nanospheres*. Berechnungsschema eines Sicherheitsfaktors für einen zu identifizierenden Burst aus den Filterverteilungen.

5.7.2 Identifikation mit dem Segmentfilter

Bei der Identifikation mit dem Segmentfilter ergeben sich Faktoren für jede einzelne Millisekunde des Photonenbursts (5.20). Die Wahrscheinlichkeiten P eines Segments für die zu vergleichenden Typen werden über die Gaußverteilungen anhand von Gleichung (5.19) ermittelt.

Hierzu wird die zu der im untersuchten Segment vorhandenen Photonenzahl c im Hauptsignal zugehörige Verteilung des Nebensignals angewendet und das tatsächliche Nebensignal x des Segments eingesetzt. Unter Ausnutzung der Daten für mittleres Nebensignal \bar{X} und der korrespondierenden Standardabweichung σ der Nebensignalverteilung ergibt sich dann pro Filter eine Zugehörigkeitswahrscheinlichkeit für dieses Segment. Diese führen dann nach Gleichung (5.20) zu einem Faktor im Vergleich zweier Typen j und k .

$$P_{i,j} = \left(\frac{1}{\sigma_{c,j} \sqrt{2\pi}} \right) e^{\left(-0.5 \left(\frac{x_i - \bar{x}_{c,j}}{\sigma_{c,j}} \right)^2 \right)} \quad (5.19)$$

$$F_{j/k} = \frac{P_{x,j}}{P_{x,k}} \quad (5.20)$$

Die Sicherheitsfaktoren SF werden dann multiplikativ für den gesamten Burst nach Gleichung (5.21) berechnet. Da wiederum beide Nebensignale evaluiert werden, ergeben sich zwei SF , die miteinander multipliziert werden können.

$$SF_{j/k} = \prod_{i=Burststart}^{Burststop} \left(F_{j,k,i} \right) = \prod_{i=Burststart}^{Burststop} \left(\frac{P_{i,j}}{P_{i,k}} \right) \quad (5.21)$$

Der Segmentfilter ermöglicht es, zusätzliche Identifikationskriterien zur Optimierung der Identifikationen anzuwenden. Das zu untersuchende Segment muss innerhalb einer Standardabweichung eines der angewendeten Segmentfilter sein. Hierdurch wird die Verfälschung des SF durch Ausreißer (siehe Abbildung 5.7, Segment B1) verhindert. Diese Bedingung führt nun dazu, dass nicht alle Segmente eines Bursts identifizierbar sind und ermöglicht die Einführung einer Mindestbestimmbarkeit. Simulationen haben gezeigt, dass ein sinnvoller Grenzwert hierfür bei 35 % liegt. Die Anwendung dieses Grenzwertes verhindert die Zuordnung eines Bursts durch eine kleine Minderheit an bestimmmbaren Segmenten.

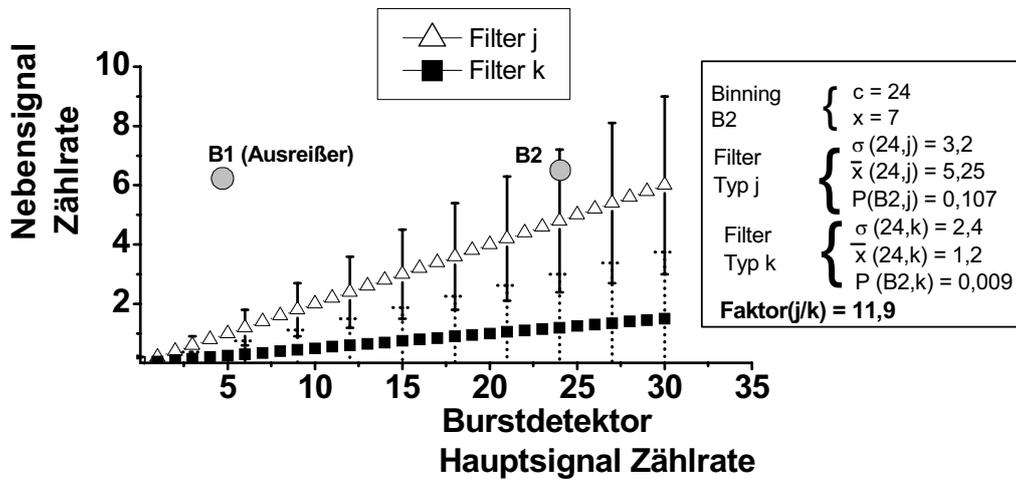


Abbildung 5.7: Schema der Berechnung eines Faktors für ein Segment eines zu identifizierenden Bursts aus Segmentfilterverteilungen zweier Typen j und k. Zur besseren Übersicht ist nur jede dritte Standardabweichung dargestellt.

Als weiteres Zusatzkriterium wird die Mindestwahrscheinlichkeit eingeführt. Die Gesamtwahrscheinlichkeit einer Burstidentifikation ergibt sich aus der Mittelung der Zugehörigkeitswahrscheinlichkeiten aller evaluierten Segmente. Liegen diese Gesamtwahrscheinlichkeiten für alle Typen bei sehr niedrigen Prozentsätzen, so können dennoch gültige Sicherheitsfaktoren resultieren, wenn z.B. alle Typen außer einem bei 1 % liegen und jener bei 11 %. Die Datenqualität ist in diesem Fall jedoch so schlecht, dass von einer Identifikation abgesehen werden muss. Bei der Grenzwertfindung für die Mindestwahrscheinlichkeit muss ein sinnvoller Kompromiss zwischen Fehlerausschluss und Zunahme nicht identifizierter Bursts gefunden werden. Die Grenzfindung für diesen Parameter wurde über die Optimierung der Identifikationsresultate der Einzelproben durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Optimum bei einer Mindestwahrscheinlichkeit von 55 % für die Gesamtwahrscheinlichkeit bei der Untersuchung eines einzelnen Nebensignals und von 75 % bei der Mittelung der Wahrscheinlichkeiten beider Nebensignale. Die Anwendung der Grenzwerte kann Fehler minimieren, während der Prozentsatz nicht identifizierter Bursts in sinnvollen Grenzen gehalten wird.

6 Ergebnisse

6.1 Charakterisierung der Nanosphere-Typen

Um die verschiedenen Typen der *Nanospheres* zu charakterisieren und um festzustellen, welche von ihnen bei einzelnen Passagen durch das Fokalvolumen zu unterscheiden sind, wurde für die *Nanospheres* Absorptions-, Fluoreszenz- und Diffusionsparameter bestimmt.

6.1.1 Absorptions- und Emissionsspektren

Die Einphotonen-Absorptionsspektren dienen dazu, erste Erkenntnisse über den Farbstoffgehalt der *Nanospheres* zu erhalten. Insbesondere die mehrfachangefärbten Typen 6 bis 9 sind hierbei von Interesse.

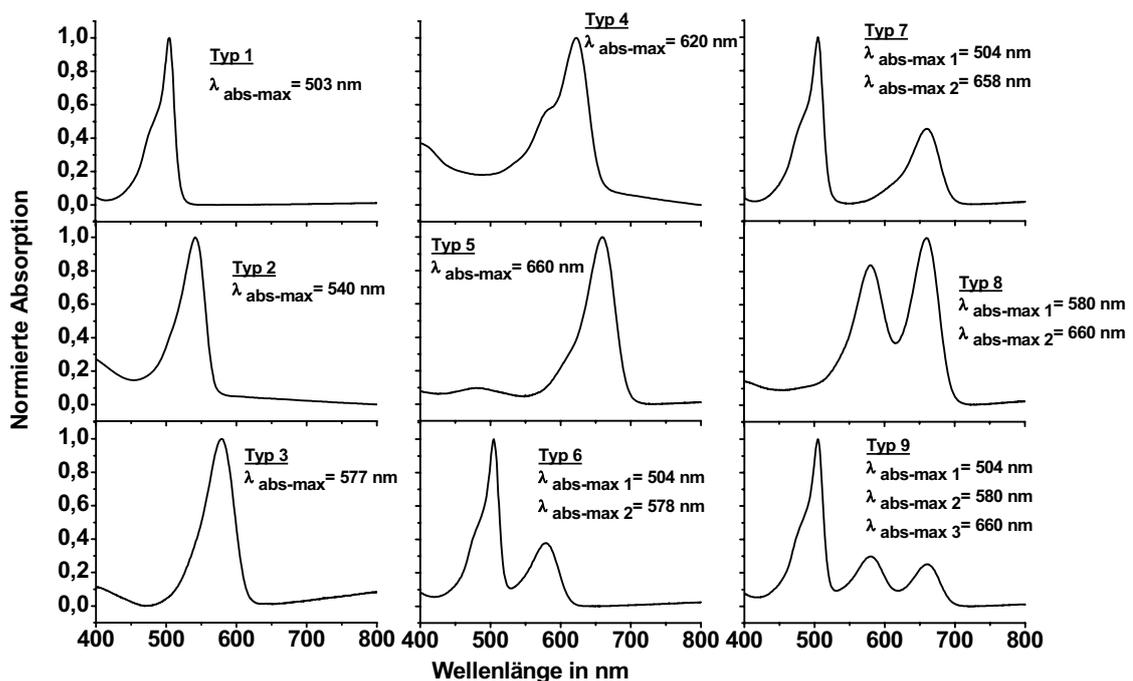


Abbildung 6.1: Normierte Einphotonen-Absorptionsspektren aller verschieden gefärbten Typen 1 bis 9. In den Graphen sind weiterhin die lokalen Absorptionsmaxima in nm angegeben. Die Typen 1 bis 5 sind einfach angefärbt (gelb-grün; orange; rot; karminrot und dunkelrot). Die mehrfachangefärbten Typen 6 bis 9 enthalten Farbstoffkombinationen der Typen 1, 3 und 5.

Anhand der Absorptionsspektren in Abbildung 6.1 lässt sich erkennen, dass auch bei den mehrfach angefärbten Typen alle Fluorophore in signifikanten Mengen durch den Hersteller in den *Nanospheres* inkorporiert wurden. Tabelle 6.1 fasst die aus unnormierten Absorptionsspektren erhaltenen Verhältnisse der Absorptionen der drei involvierten Farbstoffe für mehrfach und einfach angefärbte Typen zusammen. Hierbei wurde für jeden der drei Farbstoffe auf den am stärksten absorbierenden Typ normiert. Über die Zweiphotonen-Emissionsspektren in Kombination mit dem Filtersystem des Detektionsstrahlengangs und den Quantenausbeuten der APDs lassen sich die anzunehmenden Zählraten in den drei Spektralbereichen berechnen (vgl. Tabelle 6.2). Die Zweiphotonen-Emissionsspektren spezifizieren die *Nanospheres* auf die benutzte Messapparatur. Über die Emissionsspektren der einfach angefärbten Typen können Aussagen bezüglich der Anregbarkeit der Fluorophore getroffen werden. Des Weiteren lässt der Vergleich der Absorptions- und Emissionsspektren der mehrfach angefärbten Typen Rückschlüsse bezüglich Energie-transfer zwischen den inkorporierten Farbstoffen zu.

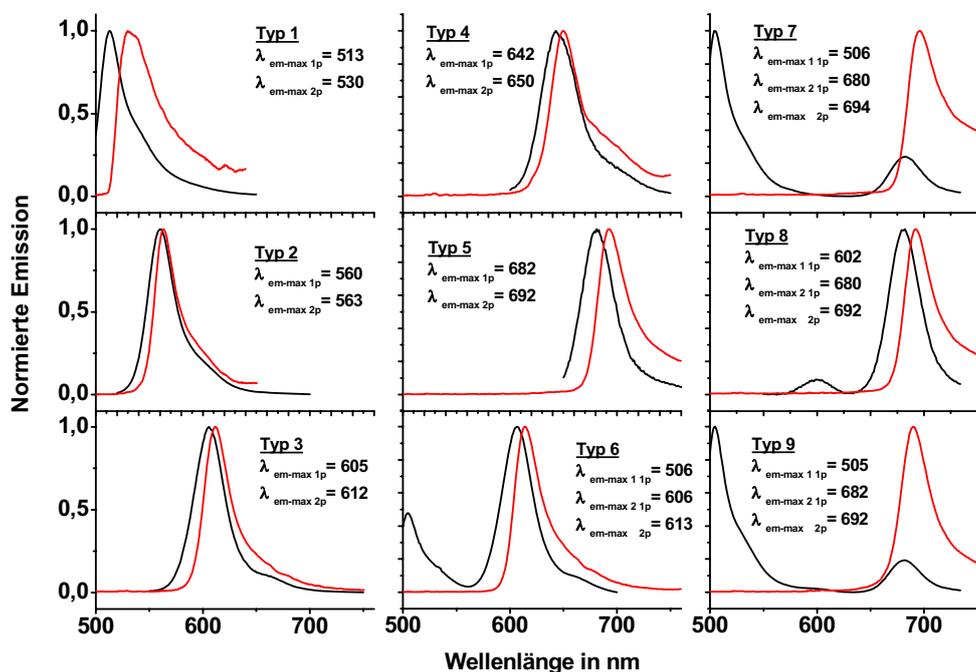


Abbildung 6.2: Normierte Einphotonen- und Zweiphotonen-Emissionsspektren aller Typen. Die Einphotonen-Anregung erfolgte jeweils 20 nm unterhalb des ersten Absorptionsmaximums der Farbstoffe und die Zweiphotonen-Anregung mit dem gepulsten Ti:Sa Laserlicht (830 nm +/- 30 nm). Des Weiteren sind die lokalen Emissionsmaxima beider Anregungsformen in nm angegeben.

Typ	Absorptionsverhältnisse			Int. Max 1p	Int. Max. 2p	$\Delta\lambda_{\text{em max}}$ in nm
	Grün	Rot	Dunkelrot			
1 (20 nm)	1,00	0,00	0,00	100,0	6,1	+17
2 (40 nm)	-	-	-	52,2	60,4	+ 3
3 (20 nm)	0,00	0,69	0,00	7,4	72,7	+ 7
4 (20 nm)	-	-	-	4,8	100,0	+12
5 (20 nm)	0,00	0,00	1,00	1,7	95,3	+10
6 (20 nm)	0,61	0,90	0,00	37,5	96,8	+ 7
7 (20 nm)	0,42	0,00	0,58	11,0	34,5	+14
8 (20 nm)	0,00	1,00	1,00	1,1	50,4	+12
9 (20 nm)	0,62	0,73	0,43	21,4	70,9	+10

Tabelle 6.1: Normierte Absorptionsverhältnisse der mehrfach angefärbten *Nanospheres* 6 bis 9 und der entsprechenden einfach angefärbten Typen 1, 3 und 5 für die Farbstoffe Grün, Rot und Dunkelrot. Für alle Typen normierte Maximalintensitäten unter Einphotonen- und Zweiphotonen-Anregung sowie Rotverschiebung der Emissionsspektren.

Im Vergleich zu den Einphotonen-Emissionsspektren zeigen jene über Zweiphotonen-Anregung zwei Effekte. Erstens ist in allen Fällen das Emissionsspektrum um 3 bis 17 nm rotverschoben (Tabelle 6.1). Trotz Überprüfung der Kalibration des Spektrometers der Zweiphotonen-Anregung über die Bestimmung verschiedener Laserlinien kann bei derart kleinen Differenzen nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt von apparativen Unterschieden herrührt. Ähnliche Rotverschiebungen bei Fluorophoren wurden bereits von Bestvater et al. beschrieben [109], hier zeigte ein Bodipy Farbstoff die stärkste Verschiebung mit 61 nm. Es wurde jedoch keine Erklärung publiziert. Weiterhin zeigt der Vergleich der fünf verwendeten Farbstoffe (Typen 1 bis 5), dass die relativen Fluoreszenzintensitäten bei der Einphotonen-Anregung von Typ 1 nach Typ 5, d.h. von kurzweiliger zu langweiliger Anregung, abnimmt. Bei der Zweiphotonen-Anregung ergibt sich eine genau gegenläufige Tendenz, wobei hierbei zu beachten ist, dass jeweils mit demselben Zweiphotonen-Anregungslicht gearbeitet wird, und somit zwangsläufig nicht an den jeweiligen Zweiphotonen-Absorptionsmaxima angeregt wird.

Bei den mehrfach gefärbten *Nanospheres* zeigt der Vergleich der Einphotonen-Absorptionsspektren mit den Einphotonen-Emissionsspektren eine Tendenz, nach der die relativen Anteile der Fluoreszenzintensität kurzweilig emittierender Fluorophore zugunsten der langweiliger emittierenden Fluorophore verschoben werden. Da hierbei jeweils unterhalb des kurzweiligsten Absorptionsmaximums angeregt wurde, ist die Fluoreszenz der langweiliger emittierenden Fluorophore primär durch Energietransfer zu erklären. Dies ist insbesondere gut bei den doppelt angefärbten Typen 6 (Grün+Rot) und 8 (Rot+Dunkelrot) zu erkennen.

Der Typ 7 (Grün+Dunkelrot) macht in der Hinsicht eine Ausnahme, als dass er nur sehr wenig Transfer aufweist. Beim dreifach angefärbten Typ 9 fällt auf, dass das rote Emissionsmaximum nahezu vollständig verschwindet. Aus den Emissionsspektren ist bereits ersichtlich, dass die Typen 7 und 9 wahrscheinlich nicht und die Typen 5 und 8 nur sehr schwer bei einer Einphotonen-Anregung voneinander zu unterscheiden sind.

Bei den Zweiphotonen-Emissionsspektren ist die Bevorzugung der langwellig emittierenden Fluorophore noch wesentlich stärker ausgeprägt. Während bei der Einphotonen-Anregung noch teilweise starke Intensitäten der kurzwelliger emittierenden Fluorophore zu beobachten sind, kann bei der Zweiphotonen-Anregung effektiv nur noch das jeweils am langwelligsten emittierende Fluorophor beobachtet werden. Dies führt dazu, dass die Typen 5, 7, 8 und 9, die als langwelligsten Emittier das dunkelrote Fluorophor inkorporiert haben, essentiell dasselbe Emissionsspektrum aufweisen. Gleiches gilt für die Typen 3 und 6 mit dem roten Fluorophor. Die Ursache hiervon liegt in zwei Punkten. Die Quanteneffizienz bei der Zweiphotonen-Anregung mit einer Zentralwellenlänge von 830 nm steigt mit zunehmendem Emissionsmaximum der Fluorophore an (Tabelle 6.1), wodurch sich ein Anteil der zusätzlichen Verschiebung erklären lässt. Das komplette Verschwinden aller kurzwelligeren Emissionen in den mehrfach angefärbten Typen macht aber einen effizienteren Energietransfer angeregter Zustände als weitere Ursache wahrscheinlich (siehe Kapitel 3.3.3).

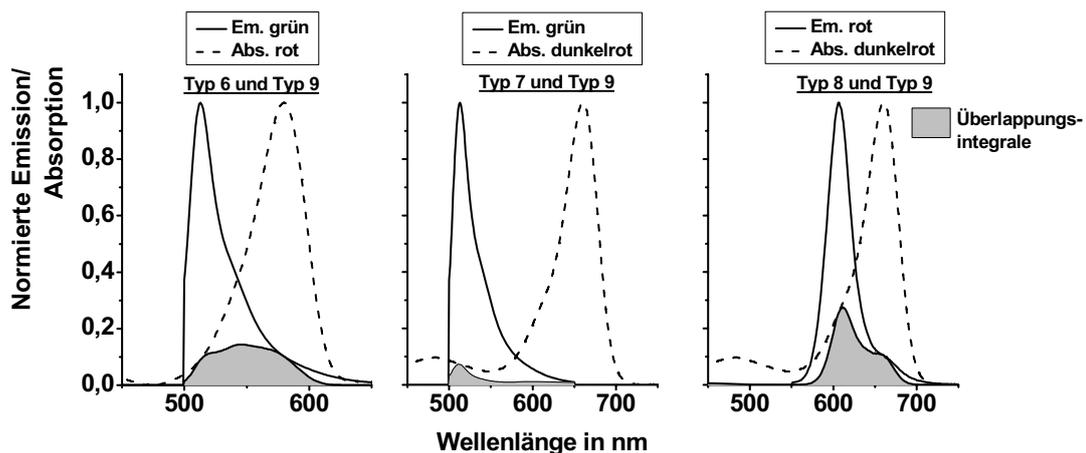


Abbildung 6.3: Spektralüberlappung der Farbstoffe 1, 3 und 5 (gelb-grün, rot, dunkelrot) in den mehrfach angefärbten *Nanospheres* 6 bis 9 zur Abschätzung des Vorkommens von hetero FRET.

Die FRET-Effizienz hängt im Wesentlichen von der Spektralüberlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors sowie dem durchschnittlichen Molekülabstand von Donor zu Akzeptor zusammen.

In Abbildung 6.3 ist gut zu sehen, dass für die Farbstoffkombinationen grün mit rot sowie rot mit dunkelrot eine starke spektrale Überlappung auftreten. Es liegt auf der Hand, dass hier sehr effiziente Energietransferprozesse vom S_1 -Zustand des Donors, also dem kurzwelliger emittierenden Molekül, zum S_0 -Zustand des langwelliger emittierenden Akzeptors möglich sind.

Mit den vom Hersteller angegebenen durchschnittlichen Fluorophoranzahlen pro Partikel N_{Fl} und dem Kugelradius r , sowie der Annahme, dass die Fluorophore statistisch verteilt sind, lässt sich durch Lösen der Gleichung (6.1) ein durchschnittlicher Fluorophorabstand φ_{Fl} in dem Partikel berechnen. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Fluorophore auch auf dem äußersten Rand der Kugel liegen können. Der Nominalradius der Kugel muss daher um den durchschnittlichen Fluorophorabstand korrigiert werden.

$$\varphi_{Fl} = \sqrt[3]{\frac{V_{Kugel}}{N_{Fl}}} = \sqrt[3]{\frac{\frac{4}{3}\pi(r + \varphi_{Fl})^3}{N_{Fl}}} \quad (6.1)$$

Es ergeben sich durchschnittliche Fluorophorabstände für die verschieden großen *Nanospheres* im Bereich von 3 bis 6 nm, was wiederum typischen Förster-Radien entspricht, siehe Tabelle 6.4. Die spektrale Überlappung sowie die durchschnittlichen Fluorophorabstände erklären somit den Energietransfer der mehrfach angefärbten Typen 6, 8 und 9. Da der spektrale Überlapp im Falle der Kombination grün mit dunkelrot (Typ 7) sehr viel kleiner ist, erklärt sich auch der wesentlich geringere Energietransfer.

Der effizientere Energietransfer bei der gepulsten Zweiphotonen-Anregung lässt sich durch das Aufkommen zusätzlicher RET-Wege erklären. Werden simultan mehrere Fluorophore angeregt, so kann es zu RET zwischen den angeregten Spezies kommen. Da hierfür die Überlappung des Absorptionsspektrums der jeweiligen angeregten Spezies mit dem Emissionsspektrum des Donors verantwortlich ist, können hieraus andere Förster-Radien resultieren, die sich als effektiver erweisen [56, 57].

Aus den Absorptions- und Emissionsspektren der einfach angefärbten *Nanospheres* in Abbildung 6.4 ist weiterhin ersichtlich, dass die verwendeten Fluorophore nur einen geringen *Stokes-Shift* aufweisen und somit signifikante Spektralüberlappungen zeigen. Dies führt dazu, dass es ihnen möglich ist einen FRET-Homotransfer durchzuführen. Für diese Art der Donor-Donor-Energiewanderung in Bodipy Farbstoffen sind in der Literatur Förster-Radien von 47 bis 67 Angström zu finden [53, 110-112].

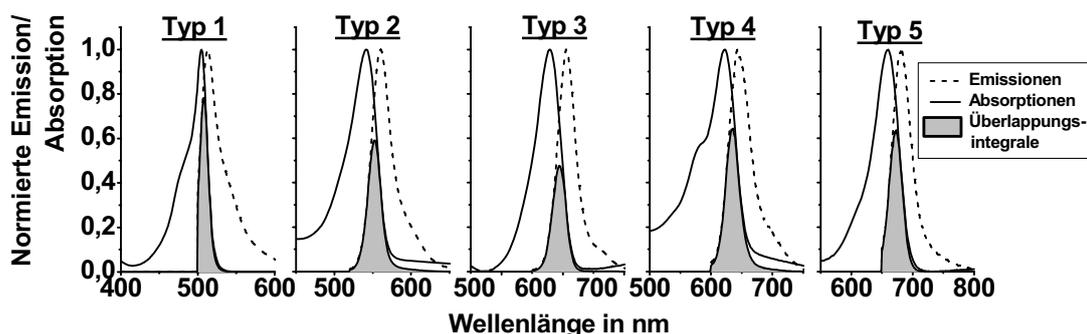


Abbildung 6.4: Emissions- und Absorptionsspektren aller fünf einfach angefärbten Typen. In einem Graphen sind jeweils die Spektren desselben Farbstoffs mit Kennzeichnung der Spektralüberlappung, die das *Energy Hopping* ermöglicht, dargestellt.

Die Effizienz des Homotransfers lässt sich bei einem Förster-Radius von 60 Angström und einem Interfluorophorabstand von 4 nm mit Gleichung (3.8) auf 92 % abschätzen. Die Zeitkonstante des FRET kann mittels Gleichung (3.7) und einer Donor-Fluoreszenzlebensdauer des freien Farbstoffs von $\tau_D = 5 \text{ ns}$ auf $2,2 \text{ ns}^{-1}$ überschlagen werden. Aufgrund der statistischen Verteilung der Fluorophore werden immer auch kleinere Abstände vorhanden sein. Des Weiteren ist der Förster-Radius auch noch von der Orientierung der Fluorophore zueinander abhängig. Dies führt zu einem willkürlichen Weg der Energie durch das *Nanosphere*, ähnlich der Brown'schen Diffusion von Teilchen in Lösung. Zu Vergleichszwecken wird angenommen, dass die Energie einen geradlinigen Weg zur Kugeloberfläche nimmt von wo bevorzugt emittiert wird (siehe Kapitel 6.1.3). Es resultieren für ein im Mittelpunkt angeregtes Fluorophor bei den verschiedenen Partikelgrößen die folgenden Häufigkeiten für den Homotransfer: 24 nm = 5; 43 nm = 10; 100 nm = 24; 200 nm = 49.

6.1.2 Zeitspuren und prozentuale Gesamtphotonenverteilung auf die Detektoren

Um akkurate Aussagen bezüglich der Gesamtphotonenverteilung der einzelnen Typen unter Zweiphotonen-Anregung machen zu können und um einen ersten Eindruck bezüglich der Photonenbursts bei Einzelpassagen von *Nanospheres* zu erhalten wurden Messungen mit dem konfokalen Mikroskop aufbau durchgeführt. Insbesondere die Zeitspuren der mehrfachangefärbten *Nanospheres* sind hierbei von großem Interesse. Die Abbildung 6.5 und die Abbildung 6.6 zeigen jene Typen, die voneinander nicht zu unterscheiden sind. Die Energietransferprozesse sind offenbar so effizient, dass jeweils nur der am langwelligsten emittierende Akzeptor fluoresziert. In Abbildung 6.5 ist zu sehen, dass im Vergleich der grün+rot gefärbte Typ 6 nicht mehr Zählrate im grünen Kanal aufweist als der nur rot gefärbte Typ 3. In Abbildung 6.6 ist zu sehen, wie alle Typen, die dunkelrote Fluorophore enthalten, jeweils nahezu nur Photonen zählraten im dunkelroten Kanal zeigen und unabhängig von der weiteren Färbung die beiden anderen Kanäle keine signifikanten Zählraten aufweisen. Als weiterer Faktor kommt hinzu, dass eben jene Fluorophore, die langwelliger anzuregen sind, auch einen größeren Zweiphotonen-Absorptionskoeffizienten aufweisen.

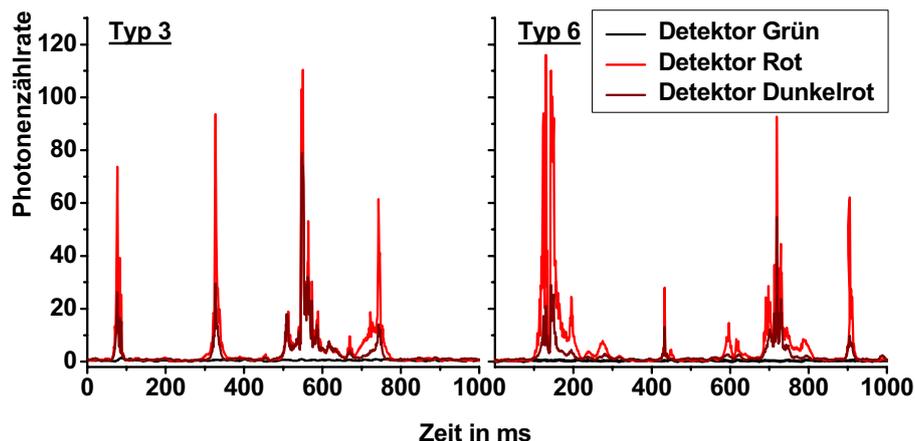


Abbildung 6.5: Ausschnitt aus den Zeitspuren der Typen 3 und 6 in den drei Detektoren.

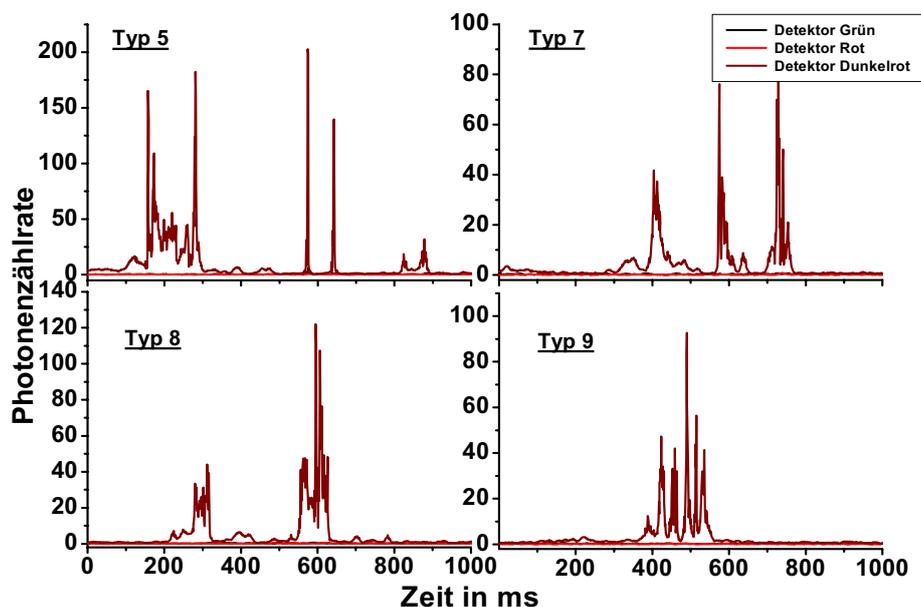


Abbildung 6.6: Ausschnitt aus den Zeitspuren der Typen 5, 7, 8 und 9 in den drei Detektoren.

Aus den so gemessenen Zeitspuren lassen sich nun die prozentualen Gesamtphotonenverteilungen für alle Typen unter Zweiphotonen-Anregung ermitteln. Ein Vergleich der Resultate aus der Berechnung über Emissions- und Filtertransmissionsspektren mit den Daten aus der Zeitspuranalyse (siehe Tabelle 6.2), zeigt, dass insbesondere bei stark überlappendem Emissionsspektrum eines Donor-Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum eines Akzeptor-Fluorophors nahezu nur der langwelligste Emitter zu beobachten ist. Dies ist jeweils in den mehrfach angefärbten Typen 6, 8 und 9 der Fall, wobei diese *Nanosphere*-Typen nicht mehr über die Donor-Fluoreszenz von dem einfach angefärbten *Nanosphere*-Typ unterschieden werden können. Allerdings weist Typ 6 eine veränderte prozentuale Gesamtphotonenverteilung in den Kanäle Rot und Dunkelrot auf. Die einzige mehrfach angefärbte Spezies, die nur eine sehr geringe Spektralüberlagerung aufweist, ist der Typ 7. Hier ist zumindest in der Summe über die Zeitspuren noch eine geringe Donor-Fluoreszenz erkennbar.

Typ	Über Zeitspuren			Über Spektren		
	Grün	Rot	Dunkelrot	Grün	Rot	Dunkelrot
1	91,8	4,9	3,2	95,0	5,0	0,0
2	75,9	19,1	5,0	73,2	25,2	1,5
3	1,2	71,1	28,5	0,3	91,4	8,3
4	2,8	24,9	72,3	0,0	34,3	65,7
5	2,4	0,6	97,0	0,0	0,0	100,0
6	5,0	56,9	38,1	21,5	73,3	5,3
7	12,0	0,0	88,0	70,7	0,6	28,7
8	2,7	3,4	93,9	0,1	5,7	94,2
9	6,9	2,3	90,8	73,4	1,7	24,9

Tabelle 6.2: Prozentuale Gesamtphotonenverteilung auf die drei Detektoren berechnet über Spektren und Zeitspuren.

Bei näherer Betrachtung der auftretenden Fluoreszenzbursts lassen sich des öfteren Bursts, die wie der Typ 9 Burst in Abbildung 6.6 eine Art *Blinking* aufweisen, finden. Da es sich hierbei um frei diffundierende Partikel handelt, kann dies natürlich durch wiederholtes Hinein- und Hinausdiffundieren in das Fokolvolumen erklärt werden. Eine alternative Erklärung stellt das Auftreten eines sich im Triplet-Zustand befindenden Fluorophors dar, welches als Energiefalle für das Multifluorophorsystem über den Mechanismus der Singulett-Triplett-Auslöschung fungieren kann [59]. Diese Hypothese könnte durch Messung immobilisierter *Nanospheres* bestätigt werden.

Bei den Bursts der mehrfach angefärbten *Nanospheres* die zumindest eine gewisse Zählrate des kurzweilliger emittierenden Fluorophors aufweisen fällt auf, dass die Fluoreszenz des kurzweilliger emittierenden Fluorophors meistens am Ende eines solchen Photonenbursts auftritt. Die Begründung hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass durch *Photobleaching* oder Anregung die unmittelbare Umgebung des Donor-Fluorophors von geeigneten RET-Akzeptoren befreit wurde. Ob es sich hierbei um destruktives *Photobleaching* oder einen reversiblen Sättigungsprozess handelt, ließe sich ebenfalls durch Messungen an immobilisierten *Nanospheres* zeigen.

6.1.3 Gesamtfluoreszenzlebensdauern

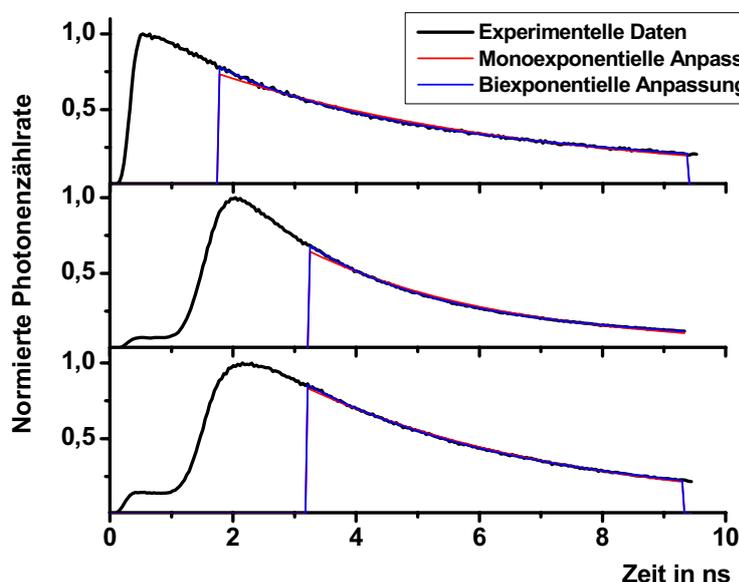


Abbildung 6.7: Fluoreszenzabklingkurven für die Typen 1 im grünen Detektor, 4 und 5 im dunkelroten Detektor, in ihren jeweils stärksten Detektoren zusammen mit einer monoexponentiellen und einer biexponentiellen Anpassung.

Ein erstes Indiz bezüglich der Unterscheidbarkeit der Spezies über ihre Fluoreszenzlebensdauern kann mit den Ensemblefluoreszenzlebensdauern der einzelnen Typen in den jeweils für die Spezies dominanten Detektoren erhalten werden. Der in Abbildung 6.7 sichtbare zeitliche Versatz der Abklingkurven hat seine Ursache in Wegstreckenunterschieden des Fluoreszenzlichtes zu den Detektoren. Der zusätzliche Weg von 30 cm bis zum dunkelroten Detektor ergibt mit der Lichtgeschwindigkeit von $c = 299792 \text{ km/s}$ eine Zeitdifferenz von ungefähr einer Nanosekunde.

Besonders informativ wären in diesen Messungen die Fluoreszenzlebensdauern der Donor-Fluorophore in mehrfach angefärbten Typen, da sich hier eine kleinere Zeitkonstante im Vergleich zum einfach angefärbten Typ aufgrund von FRET ergibt. Da der Energietransfer jedoch höchst effektiv ist, kommen keine ausreichenden Zählraten für eine entsprechende Auswertung zustande. Die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauern erfolgt nach dem in Kapitel 5.2 dargestellten Schema. Es wird sowohl mono- als auch biexponentielles Abklingen mit dem Levenberg–Marquardt-Algorithmus angepasst. Generell gelingt hierbei die biexponentielle Anpassung geringfügig besser. Die Daten der monoexponentiellen Anpassungen sind von der Qualität der Anpassung an die

Experimentaldaten etwas schlechter, weisen dafür aber durchgehend eine geringere Streuung der angepassten Lebensdauern auf.

Typ	Anpassung	A ₁	τ ₁	A ₂	τ ₂	R ²
1	Monoexp. :	1	4,21 +/- 0,07	-	-	0,9860
	Biexp. :	0,38 +/- 0,04	1,46 +/- 0,11	0,62 +/- 0,04	5,88 +/- 0,29	0,9997
2	Monoexp. :	1	3,96 +/- 0,04	-	-	0,9986
	Biexp. :	0,73 +/- 0,08	3,01 +/- 0,15	0,27 +/- 0,08	7,78 +/- 1,36	0,9998
3	Monoexp. :	1	4,36 +/- 0,05	-	-	0,9994
	Biexp. :	-	-	-	-	-
4	Monoexp. :	1	3,64 +/- 0,03	-	-	0,9988
	Biexp. :	0,37 +/- 0,20	2,06 +/- 0,50	0,63 +/- 0,20	4,86 +/- 1,07	0,9997
5	Monoexp. :	1	2,68 +/- 0,05	-	-	0,9972
	Biexp. :	0,49 +/- 0,18	1,58 +/- 0,25	0,51 +/- 0,18	4,51 +/- 3,21	0,9998
6	Monoexp. :	1	4,09 +/- 0,05	-	-	0,9991
	Biexp. :	-	-	-	-	-
7	Monoexp. :	1	2,33 +/- 0,03	-	-	0,9934
	Biexp. :	0,55 +/- 0,05	1,30 +/- 0,08	0,45 +/- 0,05	3,47 +/- 0,24	0,9998
8	Monoexp. :	1	2,79 +/- 0,01	-	-	0,9969
	Biexp. :	0,44 +/- 0,08	1,55 +/- 0,12	0,56 +/- 0,08	3,76 +/- 0,26	0,9999
9	Monoexp. :	1	2,74 +/- 0,02	-	-	0,9966
	Biexp. :	0,49 +/- 0,10	1,58 +/- 0,17	0,51 +/- 0,10	3,88 +/- 0,39	0,9998

Tabelle 6.3: Ensemblefluoreszenzlebensdauern der Typen in den jeweils dominanten Detektoren über monoexponentielle sowie biexponentielle Anpassung zusammen mit den jeweiligen Bestimmtheitskoeffizienten bei einer Anregungsleistung von 150 mW.

Im Vergleich zu Literaturdaten bezüglich der Fluoreszenzlebensdauern von Bodipy Farbstoffen in Lösungen, die im Bereich von 4,0 - 6,5 ns liegen, fällt auf, dass innerhalb der *Nanospheres* tendenziell kürzere Lebensdauern ermittelt werden [110, 112-114]. Des Weiteren existiert ein schwacher Trend zu kürzeren Lebensdauern mit zunehmendem Emissionsmaximum. Um abzuschätzen, ob und in welchem Umfang die Anregungsleistung einen Effekt auf die angepassten Fluoreszenzlebensdauern hat, wurden umfangreiche Messreihen der Einzeltypen bei variierender Anregungsleistung durchgeführt.

Die hieraus erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Hier lässt sich erkennen, dass die Fluoreszenzlebensdauern der meisten Typen nahezu unabhängig von der Anregungsleistung sind. Auffällig ist, dass die drei am kurzweiligsten emittierenden Typen 1 bis 3 bei niedrigeren Anregungsleistungen eine Abhängigkeit mit linearer Abnahme der Lebensdauer zeigen. Bei höheren Leistungen wird bei Typ 1 und 3 dann ein Plateau erreicht während bei Typ 2 die Abhängigkeit sogar wieder in einen linearen Anstieg übergeht. Die Absenkung der Lebensdauer mit zunehmender Anregungsleistung bei den schlechter anzuregenden Fluorophoren ist ein weiteres Indiz dafür, dass bei hoher gepulster

Anregungsleistung zusätzliche RET Wege eröffnet werden, die die Lebensdauer verkürzen. Gerade die schlechter anzuregenden Fluorophore werden erst bei höherer Anregungsleistung die Bedingung, zwei Fluorophore simultan in höheren Anregungszuständen zu haben, erfüllen können. Interessanterweise weist der Typ 6, der als Kombination aus 1 und 3 betrachtet werden kann, keinen entsprechenden Trend auf. Bei den langwelliger emittierenden *Nanospheres* ist auffällig, dass die Typen 5, 8 und 9, die das dunkelrote Fluorophor beinhalten, sehr ähnliches Verhalten und Absolutwerte zeigen, während der Typ 7, der ebenfalls dieses Fluorophor aufweist, eine um 0,3 ns kürzere Lebensdauer zeigt.

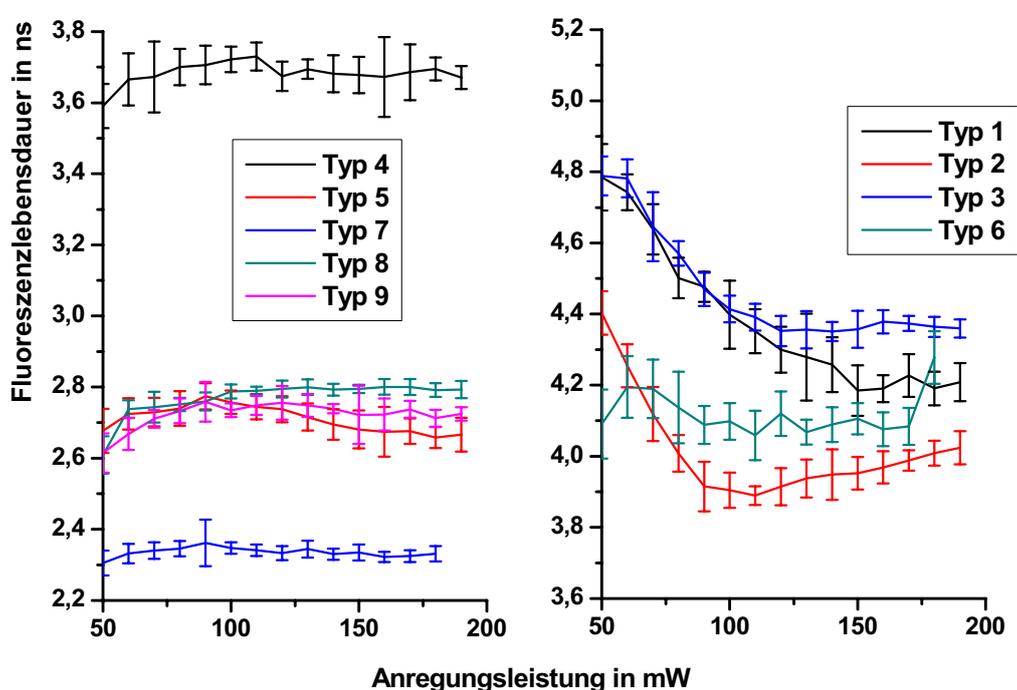


Abbildung 6.8: Fluoreszenzlebensdauern nach monoexponentieller Anpassung der einzelnen Typen im jeweils dominanten Detektor als Funktion der Anregungsleistung. Gezeigt sind jeweils die Mittelung aus 15 Einzelmessungen zusammen mit der daraus ermittelten Standardabweichung als Fehlerbalken.

Da die 20 nm *Nanospheres* eine relativ große Varianz bezüglich der tatsächlichen Partikelgröße aufweisen (Variationskoeffizient CV = 20 %) wurden außerdem noch Vergleichsmessungen mit größeren *Nanospheres* durchgeführt, um mögliche Effekte der Partikelgröße zu quantifizieren. Aus der Tabelle 6.4 geht eine klare Tendenz bezüglich Partikelgröße eines Typs und der resultierenden Fluoreszenzlebensdauer τ_f hervor. Aus den nach (6.1) berechneten Ergebnissen für den durchschnittlichen Fluorophorabstand ist

ersichtlich, dass sich der zu beobachtende Unterschied in den Fluoreszenzlebensdauern nicht mit einem besseren Energietransfer aufgrund von kleineren Fluorophorabständen erklären lässt, da für alle *Nanosphere*-Größen ähnliche Werte berechnet wurden und die geringen vorhandenen Unterschiede nicht mit den Trends der Lebensdauern korrelieren.

Der biexponentielle Abfall der Fluoreszenzabklingkurven weist jedoch auf zwei Subpopulationen an Fluorophoren hin. In der Tat liegt es nahe, zwei Arten von Fluorophoren zu postulieren. Zum einen solche, die am Rand der Kugel liegen und somit durchschnittlich weniger RET Partner in ihrer Nähe haben, aber in Kontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel sein können. Zum anderen solche, die im Inneren der Kugel liegen, daher von anderen Fluorophoren eingeschlossen sind und stärker gequenchet werden, siehe Abbildung 6.9.

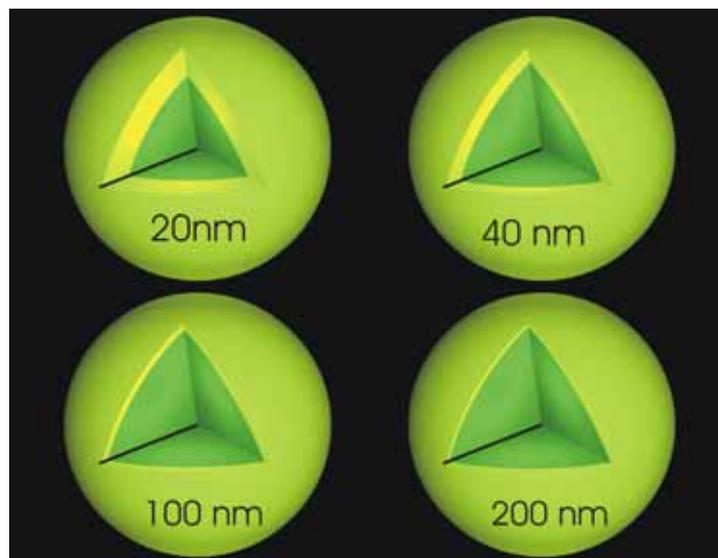


Abbildung 6.9: Schematische Darstellung der untersuchten Typ 1 *Nanospheres* der Größen 20, 40, 100 und 200 nm mit Kugelnkern und Kugelschale, die die Aufenthaltsvolumina der zwei Subpopulationen zeigen.

Über den berechneten durchschnittlichen Fluorophorabstand lassen sich die entsprechenden Aufenthaltsvolumina der Populationen V_{Schale} und V_{Kern} berechnen (6.2). Anschließend lassen sich sowohl für die Kugelschale als auch für das Innere der Kugel absolute Anzahlen für die jeweiligen Fluorophore berechnen sowie direkt der Quotient R_{AI} gebildet werden (6.3).

$$V_{Schale} = V_{Kugel} - V_{Kern} = \frac{4}{3}\pi \left(r_{Kugel}^3 - \left(r_{Kugel} - \varphi_{Fl} \right)^3 \right) \quad (6.2)$$

$$R_{A/I} = \frac{V_{Schale}}{V_{Kern}} \quad (6.3)$$

Die hierbei erhaltenen Verhältnisse korrelieren linear mit den kleiner werdenden Fluoreszenzlebensdauern der monoexponentiellen Anpassung für die *Nanospheres* der Größen 20, 40 und 100 nm. Für die 200 nm Partikel wird dann abweichend hiervon ein noch stärkerer Abfall beobachtet.

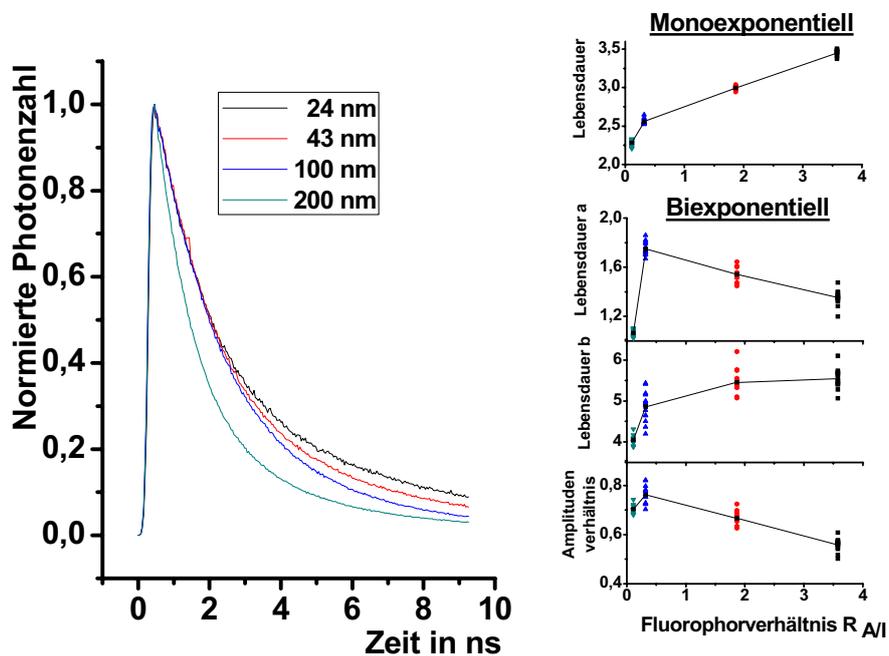


Abbildung 6.10: Links, normierte Fluoreszenzabklingkurven der vier Typ 1 *Nanospheres* bei 170 mW Anregungsleistung, 1:1000 Verdünnungen und starker Signal-schwächung durch Graufilter. Rechts, mono- und biexponentielle Anpassungsergebnisse als Funktion des Fluorophorverhältnisses Schale zu Kern.

Durch eine genaue Betrachtung der Abklingkurven in Abbildung 6.10 und dem Vergleich insbesondere der Resultate für die exaktere biexponentielle Anpassung, fällt auf, dass sich, zumindest für die *Nanospheres* der Größen 20, 40 und 100 nm, klare Tendenzen ergeben.

Partikel (\varnothing in nm)	$N_{\text{Fluo.}}$	$\tau_{f \text{ mono}}$ [ns]	V [1000nm ³]	ϕ_{Fl} [nm]	$R_{\text{A/I}}$
1a (24 nm)	180	3,45	4,2	3,98	3,58
1b (43 nm)	350	2,99	33,5	5,92	1,87
1c (100 nm)	7400	2,56	503,6	4,52	0,32
1d (200 nm)	110000	2,27	4186,6	3,45	0,11
3 (20 nm)	180	4,4	4,2	3,98	3,58
3b (43 nm)	350	4,0	33,5	5,92	1,87
5 (20 nm)	180	2,8	4,2	3,98	3,58
5b (43 nm)	350	2,2	33,5	5,92	1,87

Tabelle 6.4 : Fluoreszenzlebensdauern der monoexponentiellen Anpassungen als Funktion der Partikelgrößen (24, 43, 100, 200 nm). Berechnete Partikelvolumina, Fluorophorabstände und Fluorophorverhältnisse.

Aufgrund der höheren Anzahl benachbarter RET Partner ist anzunehmen, dass die Population mit der kürzeren Lebensdauer im Kugelkern vorliegt. Das erklärt auch die Zunahme der Amplitude dieser Lebensdauerkomponente mit zunehmender Kugelgröße. Die Population mit der längeren Lebensdauer ist demnach in der äußeren Kugelschale zu finden.

Die Verkürzung der Lebensdauer der Schalenpopulation kann durch geometrische Betrachtung erklärt werden. Der innersphärische Einflussbereich zu den jeweils nächsten RET Partnern eines sich auf der Kugeloberfläche befindenden Fluorophors ist ein Kugelsektor. Hierbei stellt das Fluorophor selber den Mittelpunkt dar, der durchschnittliche Fluorophorabstand den Radius des Einflusskugelsektors und der Radius des Nanopartikels bedingt den maximalen Öffnungswinkel. Mit zunehmendem Partikelradius nähert sich dieser Kugelsektor einer Halbkugel an. Die Argumentation bezüglich der Lebensdauer ist hierbei, dass ein größeres Einflussvolumen wiederum mit einer Zunahme potentieller RET Partner einhergeht, was wiederum die Lebensdauer verkürzt.

Die sich im Kugelkern befindenden Fluorophore erfahren bezüglich des Einflussvolumens der Fluorophore keinerlei Veränderungen. Daher sollte diese Lebensdauerkomponente im Prinzip konstant bleiben. Wie lässt sich also die Zunahme der Lebensdauer erklären? Die genaue Untersuchung der Amplitudenverhältnisse der Einzelkomponenten zeigt, dass sie zwar dem durch geometrische Schlussfolgerungen rationalisiertem Trend folgen, dies aber in einem wesentlich geringeren Maße tun, als durch die tatsächlichen Volumenverhältnisse von Kugelkern zu Kugelschale zu vermuten ist. Eine Erklärung diesbezüglich ist, dass bevorzugt über die Fluorophore der Kugelschale emittiert wird. Im Kugelkern angeregte Fluorophore würden

demnach über multiples *Energy Hopping* ihre Energie an die äußeren Fluorophore abgeben, welche dann die Energie als Photonen emittieren. Die zuvor bestimmten Fluorophorabstände und die in Abbildung 6.4 dargestellten Spektralüberlappungen machen einen sehr effizienten Homotransfer wahrscheinlich. Da die Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses direkt mit der Anzahl potentieller RET-Partner innerhalb eines bestimmten Abstands zusammenhängt, wird auch klar, warum bevorzugt von der Kugelschale emittiert wird. Da sich durch die FRET-Prozesse ein Zeitversatz proportional zur Anzahl der Transfere ergibt, kann vermutet werden, dass die Erhöhung der Lebensdauerkomponente der Kernpopulation hierdurch verursacht ist. Die Daten der 200 nm *Nanospheres* sind mit den zuvor beschriebenen Schlussfolgerungen nicht ohne weiteres zu erklären. In einer Veröffentlichung von Schniepp et al. wurden starke Verhaltensunterschiede aufgrund des Übergangs der Partikelgröße vom Überwellenlängenregime der Mie-Resonatoren zum Unterwellenlängenbereich gezeigt. Der Durchmesser von 200 nm bei einer Anregungswellenlänge von 830 nm macht diese Erklärung aber unwahrscheinlich [115]. Eine weitere mögliche Rationalisierung wäre, dass in häufig nur Teile der relativ großen Nanopartikel in das Fokalvolumen eindringen und ein Großteil der Energie aus diesem illuminierten Bereich in die Partikelvolumina die sich nicht im Fokalvolumen befinden transferiert wird aus welchem dann die abgegebene Fluoreszenz nicht mehr detektiert wird. Dieser Begründung entsprechend müsste eine Antiproportionalität zwischen maximaler Bursthöhe und BIFL bestehen, die Daten der Fluoreszenzbursts der 200 nm *Nanospheres* zeigen allerdings keine Korrelationen von Größe oder Bursthöhe mit den Einzelburstfluoreszenzlebensdauern.

Der Vergleich der „Typ 1a“, 20 nm großen *Nanospheres* mit jenen aus dem *Multiplexing-Set* (Typ 1), zeigt, dass sie eine kürzere Fluoreszenzlebensdauer und zugleich eine höhere Partikelhelligkeit (15000 Cpp / 10000 Cpp; bei 100 mW Anregungsleistung, ohne Filterabschwächung) aufweisen. Die Schlussfolgerung ist, dass bei den helleren Partikeln eine höhere Fluorophorkonzentration und demnach auch ein kleinerer durchschnittlicher Fluorophorabstand vorliegt, was zu verbessertem *Quenching* und kürzeren Lebensdauern führt.

6.1.4 FCS-Messungen

Über die FCS-Messungen lassen sich sowohl die durchschnittliche Teilchenzahl im Fokalvolumen als auch die charakteristischen Diffusionszeiten der fluoreszierenden Partikel mit der Gleichung (3.23) berechnen. Ersteres ermöglicht es, akkurat die Proben so zu verdünnen, dass sie einheitliche Konzentrationen aufweisen und zugleich einzelne Diffusionsereignisse in den Zeitspuren zu beobachten sind. Über die Diffusionszeiten wiederum lässt sich eine Aussage über die durchschnittliche Teilchengröße treffen. Somit kann überprüft werden, ob die Proben monodispers vorliegen und in der weiteren Anwendung können Aussagen über die Partikelgröße bei Aggregationen getroffen werden.

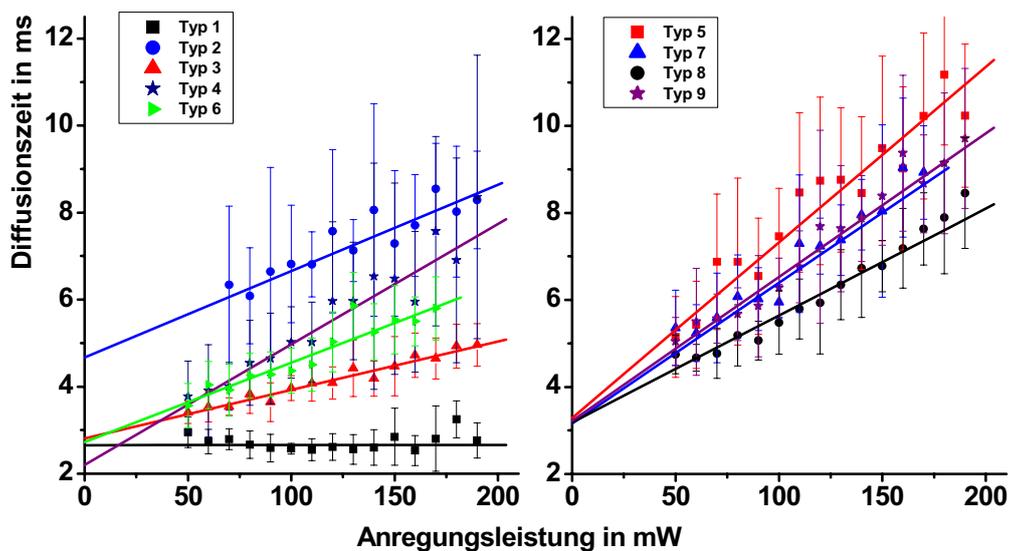


Abbildung 6.11 : Abhängigkeit der nach Gleichung (3.23) angepassten Diffusionszeiten von der Anregungsleistung für alle neun verschiedenen angefärbten *Nanospheres*. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus 15 Messungen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Im rechten Graphen sind alle Typen gezeigt, die einen dunkelroten Farbstoff inkorporiert haben und im linken Graphen alle anderen Typen. Den Mittelwerten wurde eine Gerade angepasst und diese zum Y-Achsenabschnitt verlängert.

Im Theoriekapitel 3.6.1 zu FCS wurden die Diffusionszeiten für 24 nm Partikel mit 2,2 ms und für 43 nm Partikel mit 4,0 ms über die Stokes-Einstein-Gleichung abgeschätzt (siehe Abbildung 3.7). Es fiel auf, dass insbesondere bei hohen Anregungsleistungen die Abweichungen von diesen Schätzwerten mit den

langwelliger emittierenden *Nanospheres* systematisch zunehmen. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurden Messungen mit allen verschiedenen angefärbten *Nanospheres* unter variierender Anregungsleistung gemacht. Über die Y-Achsenabschnitte der Anpassungsgraden in Abbildung 6.11 bei einer theoretischen Anregungsleistung von 0 mW lässt sich die Partikelgröße abschätzen, ohne dass Effekte wie eine optische Falle oder Sättigung der Fluorophore eine Rolle spielen.

Die Y-Achsenabschnitte zeigen diesbezüglich einige Auffälligkeiten. Wie erwartet weicht der Typ 2 in seinem Absolutwert von allen anderen signifikant ab, da es sich hierbei um ein 40 nm Partikel handelt. Sämtliche Typen aus dem *Multiplexing* Set (Typen 1,3,5,6,7,8 und 9) weisen vergleichbare Diffusionszeiten auf, wobei jene Typen, die den dunkelroten Farbstoff enthalten, geringfügig größere Werte liefern. Da es sich hierbei wahrscheinlich um Partikel einer Charge handelt, die alle dieselben durchschnittliche Partikelgröße aufweisen sollten, kann dieser Unterschied z.B. dadurch begründen werden, dass der relevante Detektor besser justiert war. Die 20 nm großen Typ 4 *Nanospheres*, die aus einer anderen Charge stammen, weisen einen etwas kleineren Wert auf.

Typ	Größe [nm]	$\tau_{diff(0)}$ [ms]	λ_{max} [nm]	Steigung [ms/W]
1	20	2,65 +/- 0,24	503	0,04 +/- 2,2
2	40	4,67 +/- 1,30	540	19,8 +/- 9,6
3	20	3,16 +/- 0,75	577	22,4 +/- 6,2
4	20	2,37 +/- 0,62	620	27,7 +/- 8,7
5	20	3,29 +/- 0,94	660	40,3 +/- 8,4
6	20	2,73 +/- 0,49	504 + 578	18,2 +/- 4,5
7	20	3,16 +/- 0,75	504 + 658	32,3 +/- 7,1
8	20	3,18 +/- 0,40	580 + 660	24,6 +/- 4,0
9	20	3,22 +/- 0,62	504 + 580 + 660	33,0 +/- 6,0

Tabelle 6.5 : Zusammenfassung der Resultate aus den Linearanpassungen der Diffusionszeiten in Abhängigkeit von der Anregungsintensität. Zu beachten ist die Korrelation von Größe und extrapolierten Diffusionszeiten sowie der Zusammenhang von langwelligstem Absorptionsmaximums mit der Steigung der Anpassungsgerade.

In Tabelle 6.5 ist auffällig, dass die Steigungen der Linearanpassungen der einfach angefärbten Typen 1 bis 5, offensichtlich mit langwelligerem Absorptionsmaxima der Fluorophore ansteigen. Insofern korreliert der Effekt der Anregungsleistung auf die Diffusionszeiten für diese Typen sehr gut mit den in Kapitel 6.1.1 ermittelten Anregbarkeiten der Fluorophore unter Zweiphotonen-Anregung. Dies weist auf eine Vergrößerung des Fokaltvolumens für das

jeweilige Fluorophor hin, wie z.B. in [90, 100, 101] beschrieben. Abbildung 6.12 zeigt beispielhaft für den Typ 5 die FCS-Kurven bei variierender Anregungsleistung. Die Amplituden der FCS-Kurven nehmen mit zunehmender Leistung ab, während die angepassten Diffusionszeiten ansteigen. Nimmt die Diffusionszeit linear mit der Steigung S zu, so bedeutet dies für den Fokalradius r_0 eine Zunahme nach Gleichung (3.21) mit $S^{1/2}$. Da die Amplitude antiproportional zum Fokalvolumen sein muss und dieses wiederum proportional zum Wachstum der Halbachsen des Ellipsoiden, muss die Amplitude folglich mit $S^{3/2}$ sinken. Eben diese Verhaltensweisen finden sich in den beiden unteren Graphen der Abbildung 6.12 wieder.

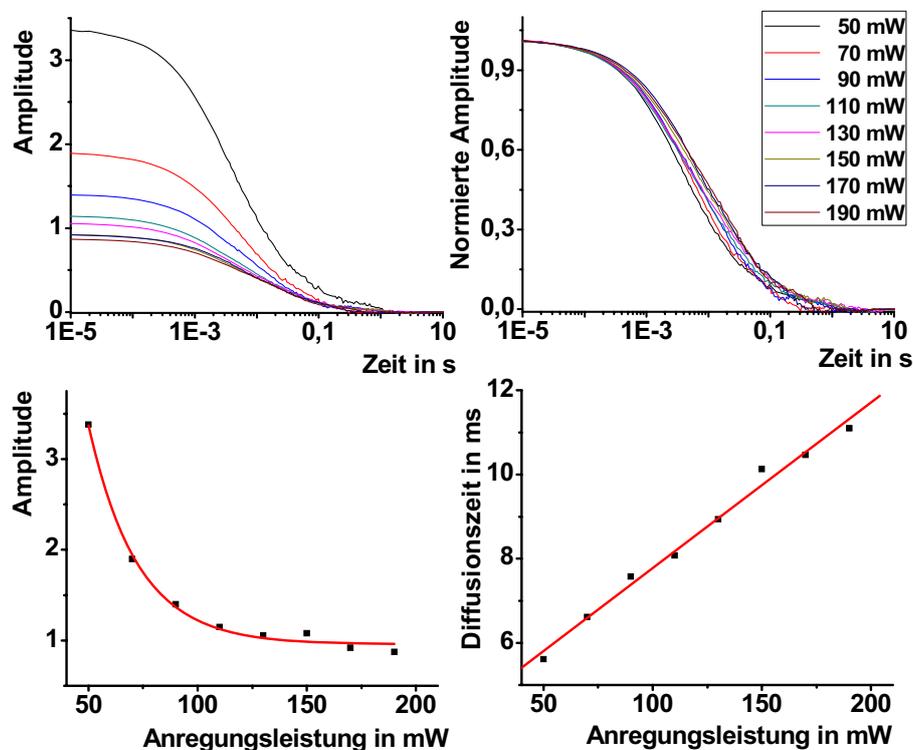


Abbildung 6.12: FCS Kurven der dunkelrot einfach angefärbten Typ 5 (20 nm) *Nanospheres* im dunkelroten Detektor bei variierender Anregungsleistung. Links oben, unnormierte Kurven zeigen den Effekt auf die mittlere Teilchenzahl im Fokalvolumen. Rechts oben, normierte Kurven verdeutlichen die Abhängigkeit des Parameters Diffusionszeit. Die unteren Graphen zeigen die Abhängigkeiten der angepassten Parameter Diffusionszeit und Amplitude (inverse Teilchenzahl) von der Anregungsleistung.

Weiterhin lässt sich in Tabelle 6.5 für die mehrfach angefärbten Typen sehen, dass die Steigungen ihrer Linearanpassungen jeweils zwischen den Werten der

einfach angefärbten Typen liegen, deren Farbstoffe sie enthalten. Die Begründung hierfür findet sich darin, dass die Anregung von peripher passierenden Fluorophoren nicht nur von Anregungsleistung und Anregbarkeit des Typs abhängt, sondern ebenfalls von der lokalen Konzentration des Fluorophors. Des Weiteren sollten sich für die mehrfach angefärbten *Nanospheres* zwei Intensitätsniveaus ergeben, da die verschiedenen Fluorophore ineinander verschachtelte verschieden große Fokalvolumina aufweisen. Zuerst trägt nur das leichter anzuregende Fluorophor zur Intensität bei. Dringt das Partikel weiter in Richtung des Zentrums des Fokalvolumens ein, so passiert es die Anregungsgrenze des schwerer anzuregenden Fluorophors, welches dann über FRET zur Intensität des ersten Fluorophors beiträgt. Sind die Unterschiede der Fokalvolumina sehr groß, so kann es dazu kommen, dass zur Auswertung hauptsächlich Passagen des leichter anzuregenden Fluorophors beitragen, welche nicht in das spezifische Fokalvolumen des schwerer anzuregenden eindringen.

Es ergeben sich aus diesen Gründen Zwischenwerte der Steigungen der Linearanpassungen der einfach angefärbten *Nanospheres*, wobei die Tendenz zu einem der beiden Werte von den Fluorophorverhältnissen und den Unterschieden der involvierten Fokalvolumina der beteiligten Spezies abhängt.

6.1.5 Auswahl der Typen für die Burstidentifikationsanalyse

Aus den zuvor dargestellten Charakterisierungen der einzelnen Typen geht klar hervor, dass mit dem momentanen System die Partikel jeweils nur anhand des am langwelligsten emittierenden Fluorophors zu identifizieren sind. RET-Prozesse und die jeweils schwächere Anregbarkeit der kurzweiliger emittierenden Fluorophore führen dazu, dass die mehrfach angefärbten Typen dasselbe Emissionsmuster wie die einfach angefärbten Typen aufweisen. Daher können sie nicht von den jeweils einfach angefärbten Typen anhand ihrer Detektierbarkeit in den Detektoren unterschieden werden. Die Fluoreszenzlebensdauer scheidet als Differenzierungswerkzeug ebenfalls aus, da nur die Akzeptorfluoreszenz in den mehrfach angefärbten Partikeln beobachtet werden kann und diese kaum durch den Donor beeinflusst wird. Die Auswahl der Typen für die parallelisierte Detektion ist somit auf die fünf einfach angefärbten *Nanospheres* beschränkt.

6.2 Charakterisierung der Filterverteilungen

6.2.1 Charakteristika der Lebensdauerfilter

Der Lebensdauerfilter versucht mittels der typenspezifischen Photonenburst-Fluoreszenzlebensdauer nach der in Kapitel 5.7.1 beschriebenen Methodik den detektierten und validierten Bursts Identitäten zuzuweisen. Um Aussagen bezüglich der Effizienz der Filterfunktion basierend auf den BIFL-Verteilungen der einzelnen Typen zu machen, muss zunächst von jedem Typ eine statistisch aussagekräftige Anzahl Bursts untersucht und die BIFL-Werte in Histogrammen kumuliert werden. Dann lässt sich anhand der Streuung und der Überschneidung der resultierenden Verteilungen sehen, ob hierüber effektiv zwischen den Typen unterschieden werden kann.

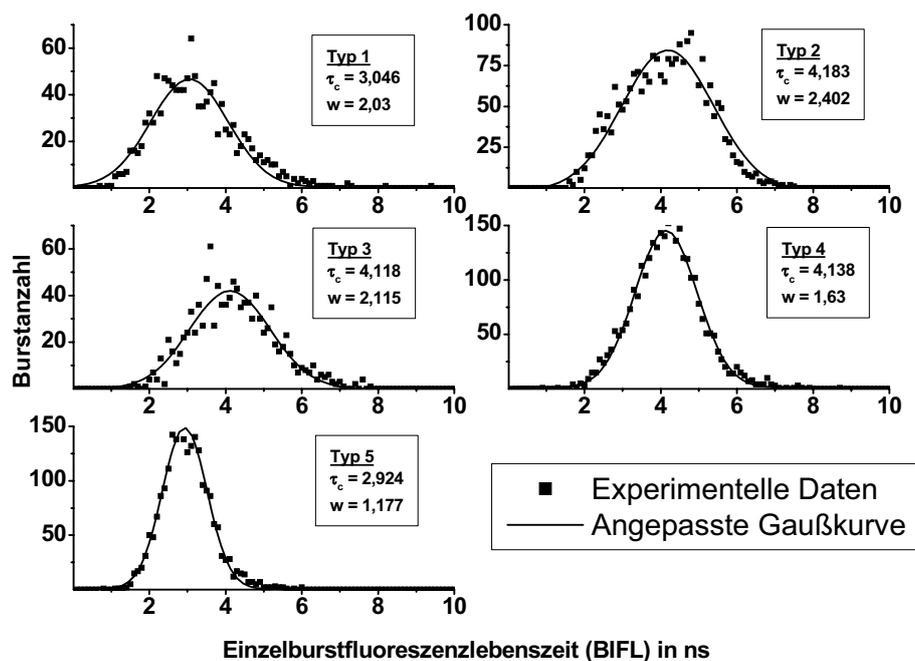


Abbildung 6.13: Histogramme der Einzelburst-Fluoreszenzlebensdauern BIFL der fünf ausgewählten Typen mit einer Mindesthöhe von 20 Photonen und einer Mindestgröße von 150 Photonen und die berechnete Gauß-Verteilungen.

Bei der Begutachtung der Verteilungen in Abbildung 6.13, fällt sofort auf, dass die Verteilungen eine große Varianz aufweisen. Bezüglich des Herstellers ist die Streuung der Partikelgröße der 20 nm Partikel mit einem Variationskoeffizienten von 20 % angegeben. Dieser ist als Verhältnis der Standardabweichung zum

Erwartungswert definiert. Wie bereits in Kapitel 6.1.3 gezeigt, ist die Fluoreszenzlebensdauer abhängig von der Partikelgröße und daher ist von dieser Seite her bereits mit einer Streuung der BIFL-Werte zu rechnen. Des Weiteren hat sich in den Ensemble-Messungen gezeigt, dass bei den Typen 1 bis 3 die Fluoreszenzlebensdauer bei niedrigen Anregungsleistungen abhängig von der Anregungsleistung ist. Daher werden Fluoreszenzbursts, die aus peripheren Passagen herrühren und daher eine geringere Anregungsleistung erfahren haben, eine andere Fluoreszenzlebensdauer zeigen, als Fluoreszenzburst die durch Passagen durch das Zentrum des Fokalvolumens entstanden sind.

Aus dieser Argumentation folgt, dass die Streuung der BIFL-Werte bei den leichter anzuregenden Typen 4 und 5 kleiner sein sollte als bei den schwerer anzuregenden Partikeln 1 bis 3. Die Halbwertsbreiten der Gauß-Anpassungen in Abbildung 6.13 korrelieren gut mit den in 6.1.3 beobachteten Abhängigkeiten von der Anregungsleistung der Typen 1 bis 3. Die Typen 4 und 5 folgen trotz nicht zu beobachtender Abhängigkeiten in den Ensemble-Messungen ebenfalls dem Trend der Halbwertsbreiten.

Werden die Gesamtlebensdauern τ_{ges} der Messserien, die zu den Histogrammen geführt haben, mit den Zentralwerten τ_c der Gauß-Anpassungen (4,21; 3,96; 4,36; 3,64; 2,68 ns) verglichen, so fällt auf, dass die Zentralwerte generell etwas niedriger liegen. Da der Hauptunterschied in der Bestimmung dieser zwei Lebenszeiten in der Selektion von bestimmten Photonen liegt ist anzunehmen, dass die Abweichungen durch den Burstselektionsprozess bedingt sind. Daher wurden weitere Auswertungen durchgeführt, bei denen eben diese Auswahlkriterien variiert wurden.

Parameter, die die Fluoreszenzlebensdauer einzelner Photonenbursts beeinflussen, sind die Fluorophorkonzentration, die Partikelgröße und die Partikeltrajektorie. Alle diese beeinflussenden Parameter spiegeln sich ebenfalls in der maximalen Bursthöhe wieder.

Abbildung 6.14 zeigt wie eine zunehmend strengere Auswahl der Bursts mittels des Kriteriums „Mindestbursthöhe“ zu einer Verschiebung der Zentrallebensdauer in den Histogrammen führt. Dieser Effekt kann für alle Typen beobachtet werden, was bedeutet, dass die Abhängigkeit von der Anregungsleistung in den Ensemble-Messungen für die Typen 4 und 5 wahrscheinlich nur durch die stärkeren Emissionen der Bursts, die aus zentralen Passagen resultieren, überdeckt wurde.

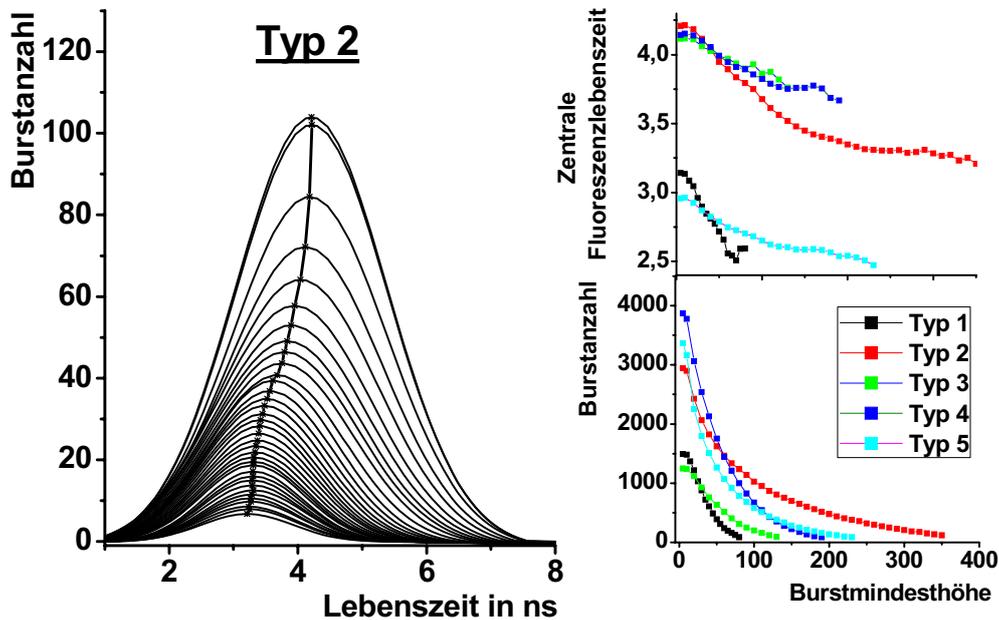


Abbildung 6.14: Links, Gauß-Anpassungen der BIFL Verteilungen von Typ 2 *Nanospheres* bei Burstmindesthöhen von 10 bis 350 Photonen in Schritten von jeweils 10 Photonen. Die Zentralwerte der Anpassungen sind als Ortlinie miteinander verbunden. Rechts, zentrale Fluoreszenzlebensdauern und Burstanzahlen als Funktion der Burstmindesthöhe für alle fünf Typen.

Weiterhin zeigt Abbildung 6.14 wie die strengere Auswahl der Photonenbursts zu kleineren Maximalwerten und Halbwertsbreiten der Gauß-Anpassungen führt. Im Graphen der Abhängigkeit der Burstanzahl von der Burstmindestgröße lässt sich anhand der X-Achsenabschnitte sehen, dass die Helligkeit der Partikel mit längerwelliger Emission größer ist. Zur Vergleichbarkeit muss der Typ 2 hierbei mit dem Faktor 0,5 korrigiert werden, da es sich um ein 40 nm Partikel mit der doppelten Fluorophorbeschickung handelt.

Durch die ähnlichen Ensemble-Fluoreszenzlebensdauern und die durch Varianz der Partikelgröße sowie Abhängigkeit von der Anregungsleistung verursachten Streuung der BIFL-Werte ergeben sich breite Verteilungen, die eine große Überschneidung aufweisen. Daher eignet sich der Lebensdauerfilter nicht zur alleinigen Identifikation der Photonenbursts, kann aber als unterstützender Filter mit den anderen Filtern kombiniert werden.

6.2.2 Charakteristika der Verhältnisfilter

Der Verhältnisfilter versucht mittels der typenspezifischen Photonenemissionen in die drei Detektoren nach der in Kapitel 5.7.1 beschriebenen Methodik über die Verhältnisse der detektierten Photonen (BICR, Burst Integrated Count Ratio), den Bursts Identitäten zuzuweisen. Auch für die Verhältnisfilter resultieren durch die Auswertung einer statistisch aussagekräftigen Anzahl Bursts in Proben eines Typs charakteristische BICR-Verteilungen, welche es ermöglichen, Aussagen bezüglich der Anwendbarkeit und Effizienz der Filter zu treffen.

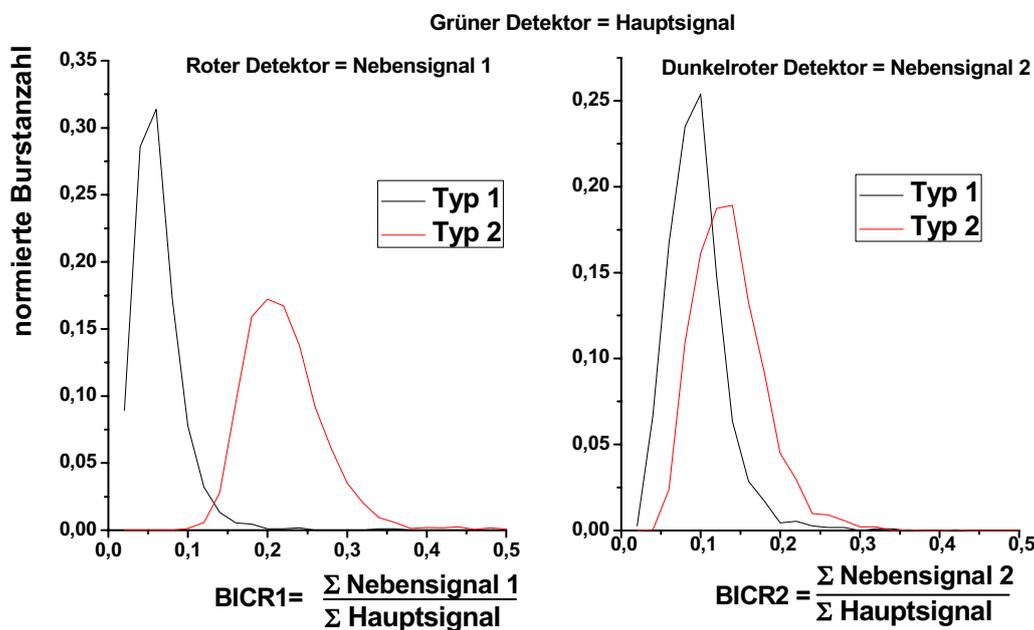


Abbildung 6.15: Histogramme der beiden Einzelburstphotonenverhältnisse „BICR“ der im grünen Kanal detektierbaren Typen 1 und 2.

In Abbildung 6.15 sind die Verteilungen der im grünen Detektor evaluierten Photonenbursts der Typen 1 und 2 dargestellt. Die BICR1-Verteilungen mit dem Nebensignal 1 des roten Kanals zeigen nahezu keine Überschneidungen. Die BICR2-Verteilungen des dunkelroten Kanals hingegen weisen signifikante Überschneidungen auf. In den meisten Fällen wird es möglich sein, über die Kombination der beiden Filterverteilungen die Identifikation eines Photonenbursts durchzuführen.

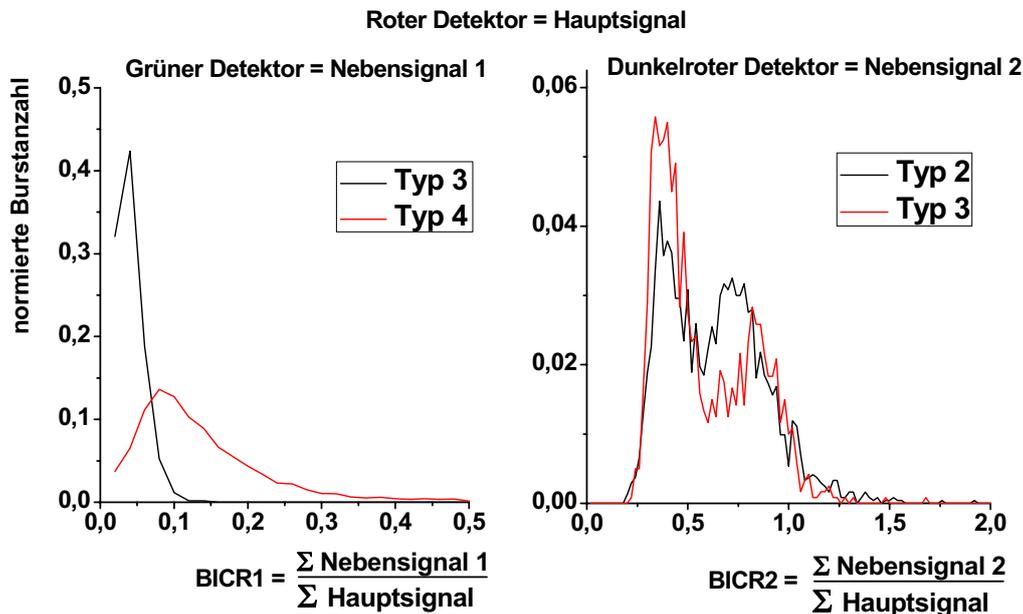


Abbildung 6.16: Histogramme der beiden Einzelburstphotonenverteilungen „BICR“ der im roten Kanal detektierten Bursts.

Bei den in Abbildung 6.16 dargestellten BICR-Verteilungen der drei im roten Kanal detektierbaren Photonentypen fällt als erstes das Fehlen des Typs 2 im linken Teil und des Typs 4 im rechten Teil auf. Dies liegt daran, dass es sich hierbei um sekundäre Bursts handelt, die in den entsprechenden Verteilungen eine wesentlich stärkere Zählrate im Nebensignal aufweisen und daher BICR-Werte von über 2 generieren. Tritt im Burstidentifikationsprozess ein solcher BICR-Wert auf, so wird er invertiert und die jeweils relevanten Filter der primären Bursts angewendet.

Die BICR2-Verteilungen der Typen 2 und 3 mit dem Nebensignal 2 im dunkelroten Kanal weisen eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung auf, jedoch lassen sich die beiden Typen effektiv über die BICR1-Verteilungen differenzieren. Für die Unterscheidung der Typen 3 und 4 ermöglichen die BICR1-Verteilungen bereits eine relativ gute Differenzierung. Über die BICR2-Verteilungen können die beiden Typen dann eindeutig unterschieden werden. Das Auftreten zweier Maxima für die Typen 2 und 3 im rechten Graphen der Abbildung 6.16 kann so erklärt werden, dass die Detektorflächen der involvierten APDs jeweils leicht seitenversetzt zum Abbildungsquerschnitt der detektierbaren Fluoreszenz justiert waren und somit abhängig vom Weg des Partikels durch das

Fokalvolumen verschieden starke Nebensignale detektierbar waren. Da jedoch in keiner weiteren Detektorkombination mehr als eine Maximum für einen Typen nachzuweisen war, ist diese Erklärung fraglich.

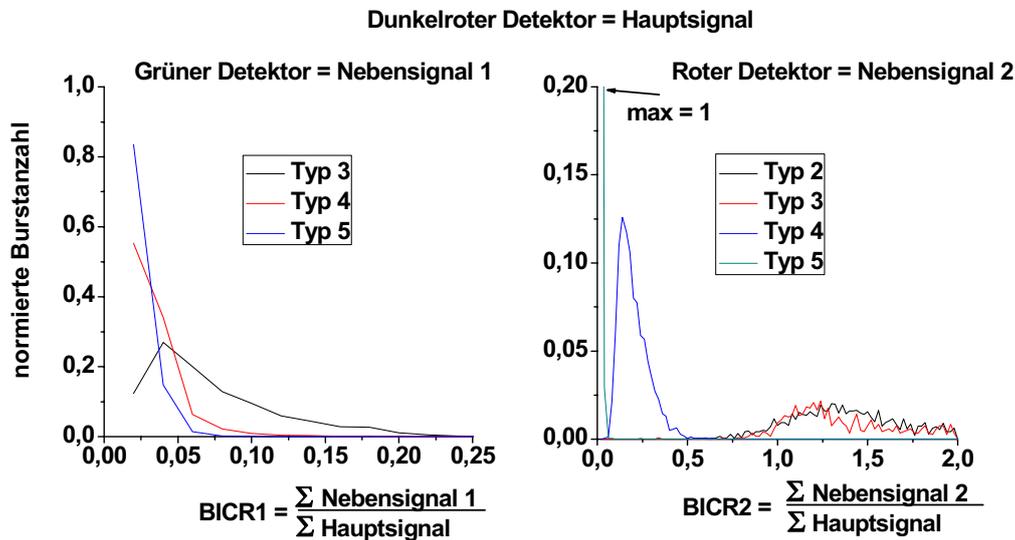


Abbildung 6.17: Histogramme der beiden Einzelburstphotonenverteilungen „BICR“ der im dunkelroten Kanal detektierten Bursts.

In den BICR1-Verteilungen mit dem Nebensignal 1 im grünen Kanal zeigen sich nur sehr geringe Unterschiede für die Typen 3 bis 5, da sie aufgrund ihrer Emissionsspektren und des gewählten Filtersystems nicht in den grünen Detektor emittieren. Der Typ 2 taucht hier nicht auf, da es sich um tertiäre Bursts mit höheren Zählraten im Nebensignal handelt. Die Typ 2 Bursts können daher über die BICR1-Verteilungen sehr gut von den anderen drei Typen unterschieden werden, was insbesondere vom Typ 3 mit den BICR2-Verteilungen sonst nicht möglich wäre. Die Differenzierung der Typen 3 bis 5 untereinander gelingt dann mit den BICR2-Verteilungen mit dem Nebensignal 2 im roten Detektor, welche nahezu keine Überschneidungen untereinander aufweisen.

Zusammenfassend zeigen die BICR-Verteilungen der unterschiedlichen *Nanosphere*-Typen in den Detektoren, dass mit den Verhältnisfiltern eine effektive Identifikation einzelner Photonenbursts möglich ist. Hierbei kann aber noch keine Aussage bezüglich möglicher Störeinflüsse in den parallelisierten Messungen getroffen werden.

6.2.3 Charakteristika der Segmentfilter

Der Segmentfilter versucht mittels der typenspezifischen Photonenemissionen in die drei Detektoren nach der in Kapitel 5.7.2 beschriebenen Methodik den Bursts Identitäten zuzuweisen. Hierbei werden die Bursts in 1 ms Segmente unterteilt und die einzelnen Segmente eines Bursts hinsichtlich der Nebensignale untersucht.

Aus der Auftragung der für die Segmentfilter ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen für die beiden Nebensignale, lässt sich abschätzen inwiefern die Verteilungen streuen und sich überschneiden. Dann können Aussagen getroffen werden, ob die Filter zur Burstdifferenzierung geeignet sind. Weiterhin können mit den aus Linearanpassung ermittelten Parametern idealisierte Bursts des jeweiligen Detektors zusammen mit den Konfidenzbereichen für die beiden Nebensignale visualisiert werden.

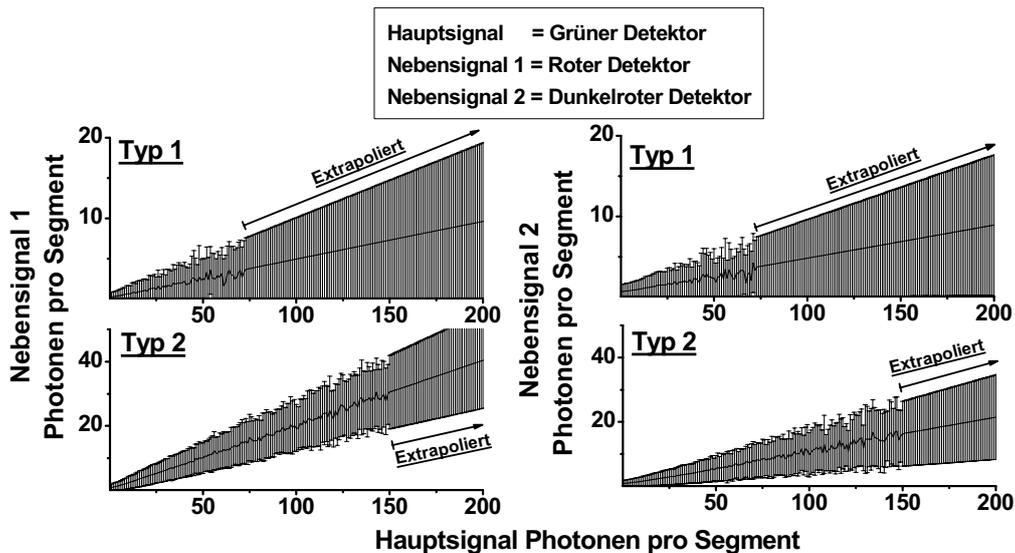


Abbildung 6.18: Ausschnitte aus den beiden Verteilungen der Segmentfilter für die Typen 1 und 2. Die Hauptsignal-Photonen pro Segment im grünen Burstdetektor sind gegen die Nebensignale pro Segment im roten und dunkelroten Detektor aufgetragen. Die Graphen bestehen jeweils aus den Mittelwerten des Nebensignals und den ermittelten Standardabweichungen.

Im grünen Detektor treten nur Bursts der Typen 1 und 2 auf, wobei sich die beiden Typen primär über das Nebensignal 1 im roten Kanal differenzieren lassen. Das Nebensignal 2 im dunkelroten Kanal der beiden Typen weist eine

relativ hohe Überlappung auf, ist aber dennoch nicht gänzlich ungeeignet für die Differenzierung. In Tabelle 6.6 sind die Parameter aus den Linearanpassungen der relevanten Segmentfilter dargestellt, welche zur Extrapolation der Daten für höhere Zählraten verwendet werden. Diese resultieren bei den Typ 1 Bursts aus der Anpassung der Werte von 0 bis 75 Photonen pro Segment und bei den Typ 2 Bursts aus einer Anpassung der Werte von 0 bis 150 Photonen pro Segment (siehe Abbildung 6.18).

Filter	Wert	Nebensignal 1 (Rot)		Nebensignal 2 (Dunkelrot)	
		Steigung 1	Y1(0)	Steigung 2	Y2(0)
1-G	\bar{X}	0,047	0,28	0,041	0,76
	σ	0,046	0,55	0,04	0,86
2-G	\bar{X}	0,20	0,80	0,10	0,87
	σ	0,07	0,94	0,06	0,94

Tabelle 6.6: Parameter der Linearanpassungen von Mittelwert und Standardabweichung der beiden Nebensignale im roten und dunkelroten Detektor für die im grünen Detektor detektierbaren Typen 1 und 2.

Die Anwendung der so gefundenen Parameter auf einen idealisierten gaußförmigen Photonenburst im grünen Detektor resultiert in den in Abbildung 6.19 dargestellten Photonenbursts. Es lässt sich hierbei erkennen, dass die Typen zwar relativ unterschiedlich sind, es aber bei schlechter Datenqualität im Grenzbereich zwischen den beiden Typen zu Identifikationsproblemen kommen kann.

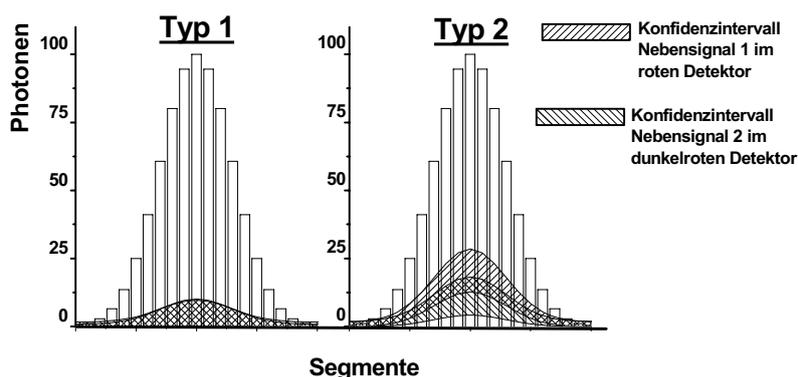


Abbildung 6.19: Aus den Parametern der Linearanpassungen der Segmentfilter berechnete, normierte Photonenbursts in den drei Detektoren für die im grünen Detektor detektierbaren Typen 1 und 2. Die Balken stellen das normierte Hauptsignal dar und für die beiden Nebensignale ist jeweils das Konfidenzintervall von einer Standardabweichung angegeben.

Im Detektor des roten Spektralbereichs treten drei verschiedene Bursttypen auf. Die Photonenbursts des Typs 2 sind hierbei sekundäre Bursts. Sie werden generell von einem stärkeren, korreliert detektierten Burst im grünen Detektor begleitet und zeichnen sich daher durch ein starkes Nebensignal im grünen Kanal aus. Ein weiterer auftretender sekundärer Burst ist durch den Typ 4 verursacht. Hier können die primären Bursts im dunkelroten Kanal detektiert werden und es liegt folglich ein starkes Nebensignal im dunkelroten Detektor vor. Der dritte detektierbare Bursttyp im roten Detektor ist ein primärer Photonenburst des Typs 3, welcher ein moderates Nebensignal im dunkelroten Kanal aufweist. Die Photonenbursts der Typen 3 und 4 weisen weiterhin nahezu kein Nebensignal im grünen Kanal auf, was sich durch die scharf abfallenden grünen Flanken der jeweiligen Emissionsspektren erklärt.

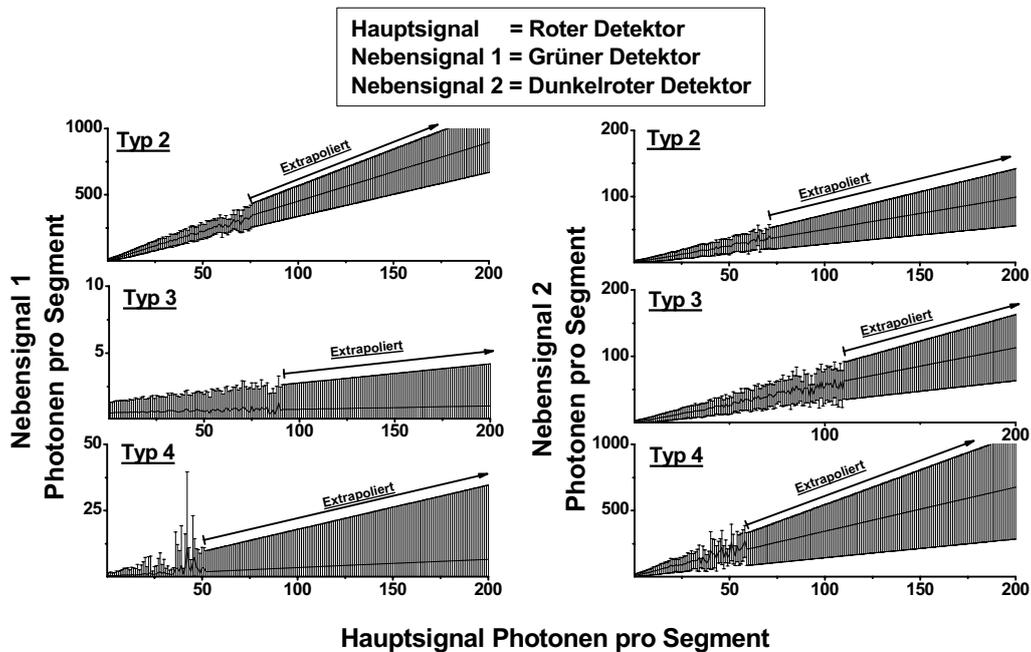


Abbildung 6.20: Ausschnitte aus den beiden Verteilungen der Segmentfilter für die Typen 2, 3 und 4. Die Hauptsignal-Photonen pro Segment im roten Burstdetektor sind gegen die Nebensignale pro Segment im grünen und dunkelroten Detektor aufgetragen. Die Graphen bestehen jeweils aus den Mittelwerten des Nebensignals und den ermittelten Standardabweichungen.

Auch in Abbildung 6.20 lässt sich durch den Übergang von experimentellen zu glatten Daten sehen, aus welchem Datenbereich die in Tabelle 6.7 aufgelisteten

Anpassungsparameter resultieren und ab wo die Daten in Abbildung 6.20 extrapoliert wurden.

Filter	Wert	Nebensignal 1 (Grün)		Nebensignal 2 (Dunkelrot)	
		Steigung	Y(0)	Steigung	Y(0)
2-R	\bar{X}	4,43	9,41	0,49	1,51
	σ	1,096	6,62	0,21	1,41
3-R	\bar{X}	0,003	0,55	0,56	1,58
	σ	0,012	0,79	0,24	1,53
4-R	\bar{X}	0,031	0,45	3,33	10,92
	σ	0,14	0,84	1,91	9,70

Tabelle 6.7: Parameter der Linearanpassungen von Mittelwert und Standardabweichung der beiden Nebensignale im grünen und dunkelroten Detektor für die im roten Detektor detektierbaren Typen 2, 3 und 4.

In der folgenden Darstellung der idealisierten resultierenden Bursts ist gut zu erkennen, dass sich hier für die Differenzierung der drei Typen keine Probleme ergeben sollten. Die sekundären Typ 2 und Typ 4 Bursts zeigen jeweils ein Nebensignal, welches stärker als das Hauptsignal ist.

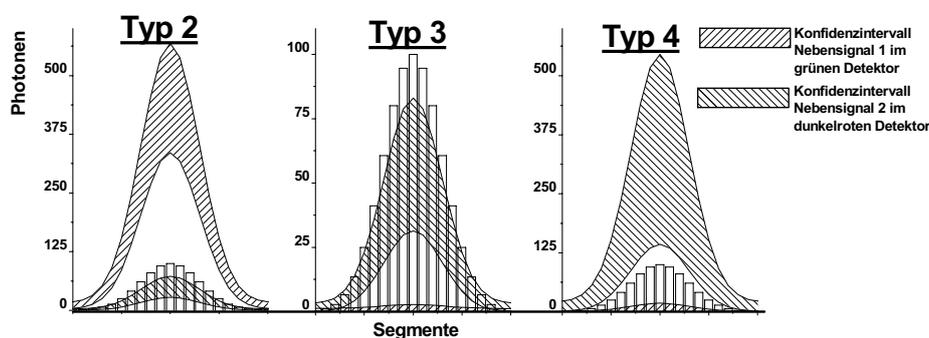


Abbildung 6.21: Aus den Parametern der Linearanpassungen der Segmentfilter berechnete, normierte Photonenbursts in den drei Detektoren für die im roten Detektor detektierbaren Typen 2, 3 und 4. Die Balken stellen das normierte Hauptsignal dar und für die beiden Nebensignale ist jeweils das Konfidenzintervall von einer Standardabweichung angegeben.

Es treten Überlappungen zwischen Typ 2 und Typ 3 im Nebensignal des dunkelroten Detektors sowie zwischen den Typen 3 und 4 im Nebensignal des grünen Detektors auf. Diese werden aber durch den jeweils anderen Segmentfilter, der sich sehr deutlich unterscheidet, kompensiert.

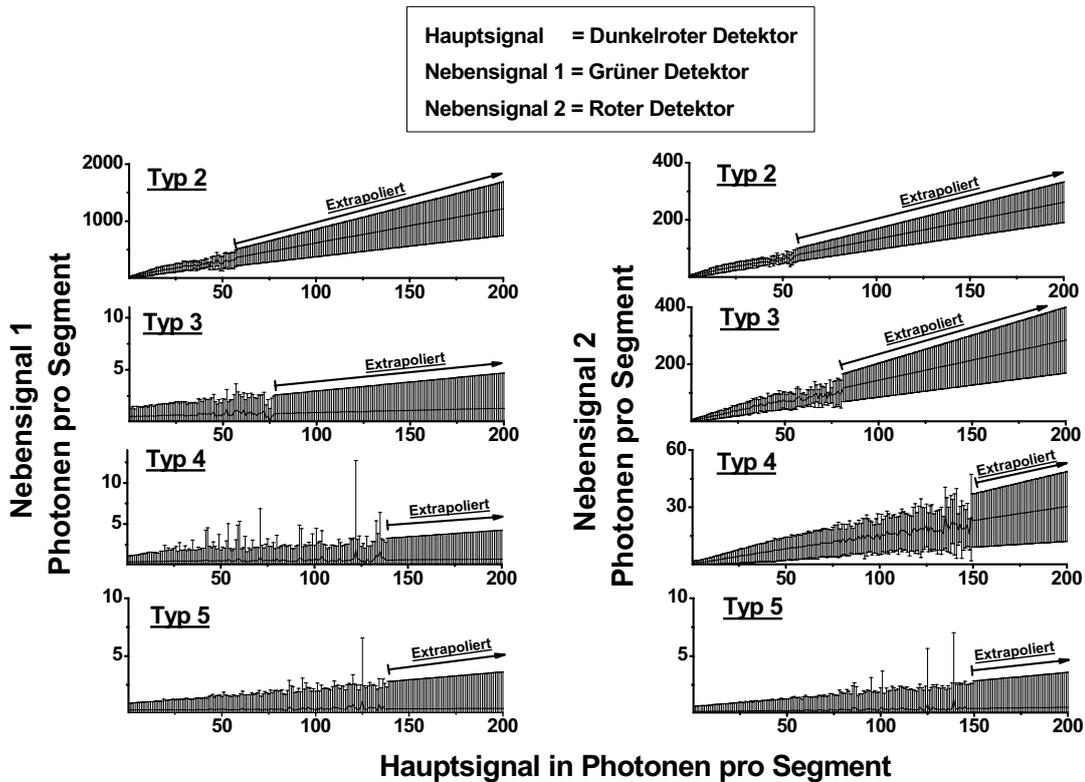


Abbildung 6.22: Ausschnitte aus den beiden Verteilungen der Segmentfilter für die Typen 2, 3, 4 und 5. Die Hauptsignal-Photonen pro Segment im dunkelroten Burstdetektor sind gegen die Nebensignale pro Segment im grünen und roten Detektor aufgetragen. Die Graphen bestehen jeweils aus den Mittelwerten des Nebensignals und den ermittelten Standardabweichungen.

Im dunkelroten Kanal können vier verschiedene Bursttypen detektiert werden. Hierbei handelt es sich um die primären Bursts der Typen 4 und 5 sowie um die sekundären Bursts des Typs 3 und die tertiären Bursts des Typs 2. Die Typen 3 bis 5 weisen aufgrund ihrer Emissionsspektren nahezu kein Nebensignal im grünen Kanal auf. Das Nebensignal 1 wird daher nur zur Differenzierung des Typs 2 von den anderen Typen angewendet. Bezüglich des Nebensignals 2 im roten Kanal unterscheiden sich alle Typen außer Typ 2 und 3 stark voneinander. Diese Überlappung kann aber effektiv durch das Nebensignal 1 kompensiert werden.

Aus der Darstellung der resultierenden Photonenbursts zeigt sich erneut, dass sich die Bursttypen fundamental voneinander unterscheiden und eine problemlose Differenzierung gewährleistet ist.

Filter	Wert	Nebensignal 1 (Grün)		Nebensignal 2 (Rot)	
		Steigung	Y(0)	Steigung	Y(0)
2-DR	\bar{X}	6,00	15,05	1,29	3,01
	σ	2,29	14,08	0,34	2,68
3-DR	\bar{X}	0,004	0,52	1,40	3,50
	σ	0,013	0,76	0,56	3,53
4-DR	\bar{X}	0,002	0,39	0,15	0,83
	σ	0,014	0,667	0,087	0,99
5-DR	\bar{X}	0,0008	0,316	0,002	0,196
	σ	0,013	0,58	0,013	0,43

Tabelle 6.8: Parameter der Linearanpassungen von Mittelwert und Standardabweichung der beiden Nebensignale im grünen und roten Detektor für die im dunkelroten Detektor detektierbaren Typen 2, 3, 4 und 5.

Die tertiären Typ 2 Bursts zeichnen sich dadurch aus, dass beide Nebensignale stärker als das Hauptsignal sind. Bei den sekundären Typ 3 Bursts ist nur ein Nebensignal größer als das Hauptsignal.

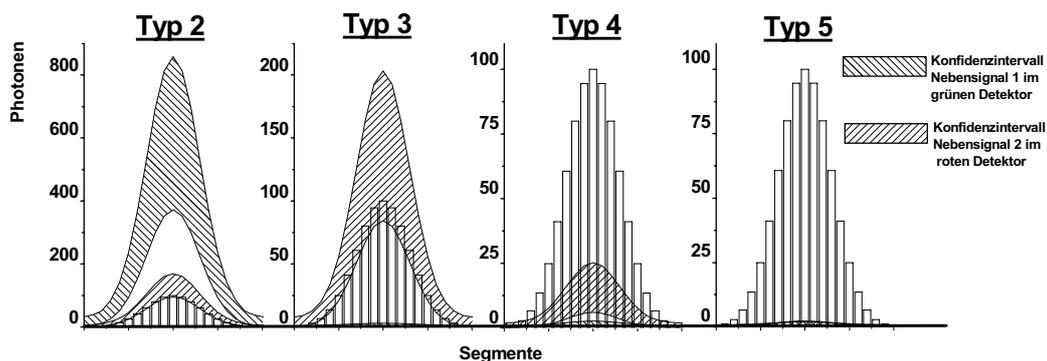


Abbildung 6.23: Aus den Parametern der Linearanpassungen der Segmentfilter berechnete, normierte Photonenbursts in den drei Detektoren für die im dunkelroten Detektor detektierbaren Typen 2, 3, 4 und 5. Die Balken stellen das normierte Hauptsignal dar und für die beiden Nebensignale ist jeweils das Konfidenzintervall von einer Standardabweichung angegeben.

Zusammenfassend zeigen die Verteilungen der Segmentfilter der unterschiedlichen *Nanosphere*-Typen, dass in den Detektoren eine effektive Identifikation einzelner Photonenbursts möglich sein sollte. Über die Zusatzbedingungen Mindestbestimmbarkeit und Mindestwahrscheinlichkeit (Kapitel 5.7.2) sollte es weiterhin möglich sein, auftretende Störeinflüsse zu kompensieren.

6.3 Anwendungen der Filterfunktionen

6.3.1 Simulation von Burstüberlappungen

Um aussagekräftige Resultate bezüglich der Filterperformance in nicht idealen Fällen wie partiellen Burstüberlappungen oder simultanen peripheren Passagen bekommen und vergleichen zu können, wurde eine Simulation programmiert, die idealisierte Bursts verschiedener Typen und Größen schrittweise miteinander überlappen lässt [Anhang J].

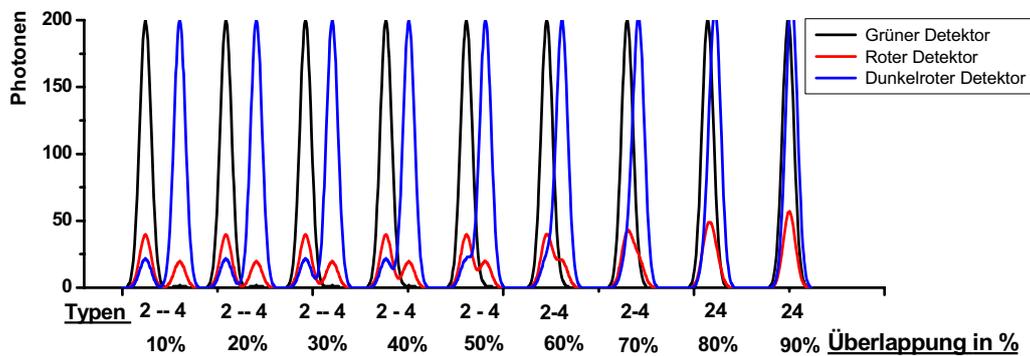


Abbildung 6.24: Schrittweise Überlappung von idealisierten Typ 2 Bursts mit idealisierten Typ 4 Bursts.

Hierzu wurden zunächst idealisierte Bursts für alle Typen berechnet, indem ein gaußförmiges Burstprofil angenommen wurde und für das Hauptsignal über die Gleichung 6.4 die Photonen P pro Segment berechnet wurden. Hierbei wurde für den Maximalwert $w = 200$ Photonen, für den Erwartungswert $\varphi = 50$ und für die Standardabweichung $\sigma = 15$ Photonen gewählt. Für die Evaluation simultaner peripherer Passagen wurde einer der Bursts zusätzlich mit dem Skalierungsfaktor S verkleinert. Die beiden Nebensignale wurden dann mit den aus den Segmentfiltern ermittelten Steigungen berechnet.

$$P_{(i)} = (S w) e^{\left[(-0.5) \left(\frac{(i - (S \varphi))}{(S \sigma)} \right)^2 \right]} \quad [i = 0 - 100] \quad (6.4)$$

Aus den so berechneten, aus 100 Segmenten bestehenden Bursts wurde dann eine Zeitspur generiert, in welcher zwei ausgewählte Typen in 100 Schritten

miteinander zum Überlappen gebracht werden (siehe Abbildung 6.24). Im Idealfall sollte es eine Filterfunktion schaffen, jeweils 100 primäre Bursts pro Typ in dieser Zeitspur korrekt zu identifizieren. Des Weiteren gilt bei starken Nebensignalen, dass potentiell auch je 100 sekundäre und tertiäre Bursts erkannt werden können. Dieser Idealfall kann natürlich nicht erreicht werden, da es durch die Burstüberlappung dazu kommt, dass Bursts nicht mehr separat, sondern als geschlossene Einheit erkannt werden (*Gap Bridging*). Dies geschieht, sobald sich zwei Bursts in einer Zeitspur soweit nähern, dass die Lücke zwischen ihnen auf ein Niveau oberhalb des Erkennungsgrenzwertes gehoben wird. Dadurch verringert sich die Gesamtanzahl erkennbarer Bursts. Hierbei ist von Interesse, ob dem fusionierten Burst keine, eine falsche oder eine richtige Identität zugeordnet wird. Idealerweise sollte, wenn ein Teil des fusionierten Bursts qualitativ näher am Ideal eines Typs liegt, dem Gesamtburst die dem Teil entsprechende Identität zugewiesen werden. Kann auf diese Weise keine korrekte Identität zugewiesen werden, so ist es auf jeden Fall die Zuweisung keiner Identität vorzuziehen.

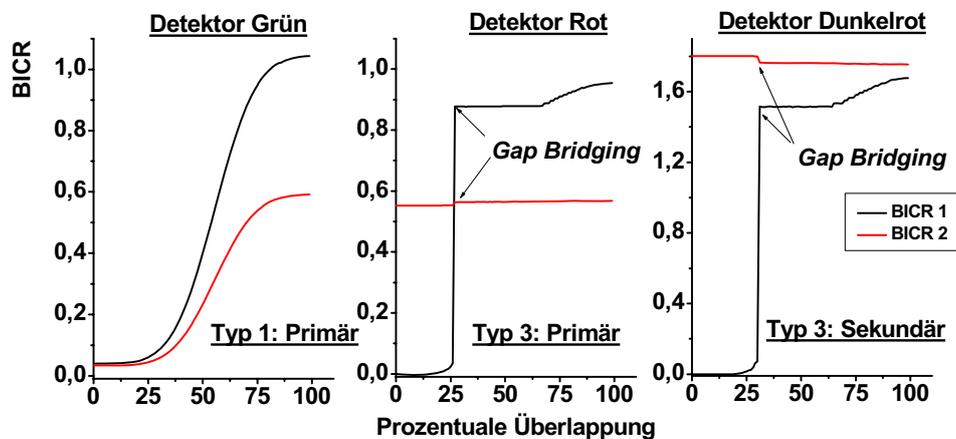


Abbildung 6.25: Entwicklung der BICR-Werte innerhalb der drei Detektoren mit zunehmender Überlagerung der Bursts bei der Überlappungssimulation von einem Typ 3 Burst mit einem Typ 1 Burst.

In Abbildung 6.25 lässt sich für den roten und den dunkelroten Detektor gut erkennen wie bei etwa 27 % das *Gap Bridging* eintritt. Durch den Zusammenschluss nehmen die relevanten BICR-Werte instantan einen neuen Wert an, der im günstigsten Fall außerhalb der Bereiche anderer Typen liegt. Da

sich beide BICR-Werte zugleich verändern, ist zumindest bei den idealisierten Fällen die Wahrscheinlichkeit, dass beide veränderten Größen simultan in die Konfidenzintervalle eines anderen Typs fallen, relativ gering. Sind sich die beiden überlappenden Typen von ihrem Emissionsmuster sehr ähnlich, wie z.B. die Typen 1 und 2, so sind die Chancen groß, dass die durch die Mittelung resultierenden Zählratenverhältnisse noch im Bereich eines dieser Typen liegen.

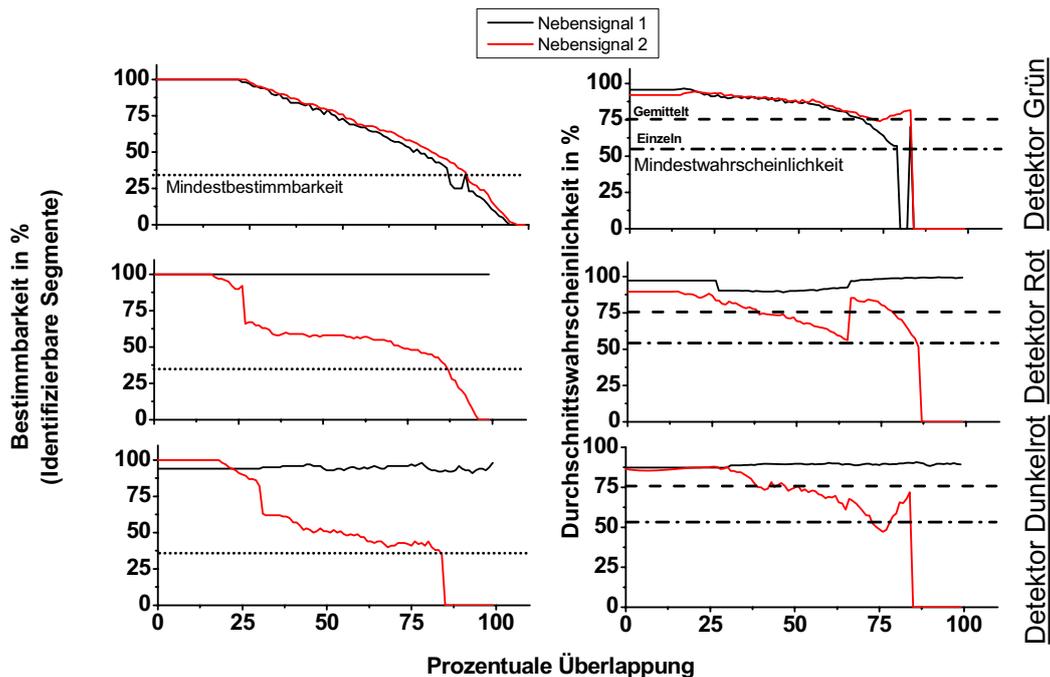


Abbildung 6.26: Links, Entwicklung der prozentualen Bestimmbarkeit des Bursts und rechts die Entwicklung der Durchschnittswahrscheinlichkeit der bestimmbar Segmente jeweils innerhalb der drei Detektoren bei der Überlappungssimulation von einem Typ 3 Burst mit einem Typ 1 Burst.

Eine Fehlidentifikation kann nur dann zustande kommen, wenn durch die Überlappung simultan beide Identifikationsparameter der Verhältnis- oder Segmentfilter so beeinflusst werden, dass sie im Bereich eines anderen Typen liegen. Bei genauer Betrachtung der Zählratenverhältnisse der einzelnen Typen wird klar, dass bei idealisierten Bursts im Prinzip nur die Überlappungen von Typ 1 mit Typ 3 sowie von Typ 3 mit Typ 5 diese Bedingung erfüllen. In allen anderen Fällen führt das *Gap Bridging* dazu, dass nur einer oder aber keiner der Parameter in den Bereich eines anderen Typen fällt und der fusionierte Burst nicht identifiziert werden kann. Da in der Realität die Zählratenverhältnisse

einzelner Bursts mit großen Streuungen behaftet sind (siehe Kapitel 6.2.2), können durchaus auch andere Kombinationen zu Problemen führen.

Auch bei der Benutzung des Segmentfilters zeigen sich die Auswirkungen des *Gap Bridgings* in den Detektoren Rot und Dunkelrot. Dadurch, dass der so vereinte Burst im Prinzip aus zwei Teilen unterschiedlicher Typen besteht, reduziert sich für den Fall, dass gleich große Bursts überlagert werden, die prozentuale Bestimmbarkeit sofort auf ca. 50 %. Im Normalfall führt die Kombination zweier Segmente unterschiedlicher Bursts dazu, dass das entstehende Segment als Ausreißer gewertet wird. Dadurch verringert sich die prozentuale Bestimmbarkeit. Dies lässt sich in Abbildung 6.26 für den grünen Detektor gut beobachten. Sinkt nun durch Ausreißer oder durch anderweitige Beeinflussungen die Bestimmbarkeit eines Bursts unter den durch die gepunktete Linie dargestellten Mindestwert, so wird automatisch keine Identität aufgrund mangelhafter Datenqualität zugewiesen. Gleiches gilt für die Grenzwerte der Durchschnittswahrscheinlichkeit der bestimmbar Segmenten.

Die Simulationen der Burstüberlappungen führen bei Segment- und Verhältnisfilter für nahezu alle Typen zu ähnlichen Resultaten. Allerdings muss bedacht werden, dass die Verwendung idealisierter Bursts dem Verhältnisfilter zugute kommt, da es nahezu unmöglich ist, durch Überlappung idealisierter Bursts beide BICR-Verhältnisse simultan in den Bereich eines anderen Typen zu bringen. Im Realfall steigt diese Wahrscheinlichkeit sicherlich an. Die Burstkombinationen, die Fehlidentifikationen aufgrund ihrer Emissionsspektren vermuten lassen, zeigen in den Simulationen tatsächlich erhöhte Fehlerraten.

Zum einen trifft dies für die Überlappung von Typ 1 Bursts mit Typ 3 Bursts zu, welche zu Fehlidentifikation als Typ 2 Bursts führen kann. Zum anderen kann die Überlappung von Typ 3 Bursts mit Typ 5 Bursts, zu fehlerhaft identifizierten Typ 4 Bursts führen.

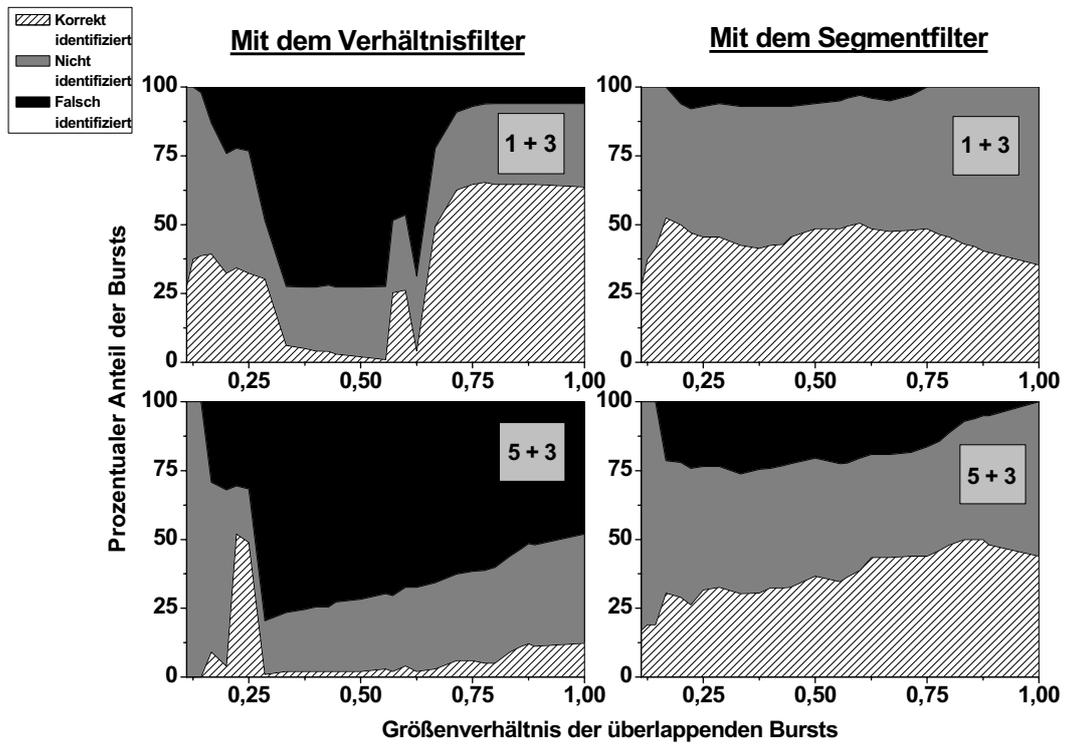


Abbildung 6.27: Filterperformance der Verhältnis- und Segmentfilter der beiden kritischen Kombinationen Typ 3 mit 1 und Typ 5 mit 3 bei variierendem Größenverhältnis der überlappenden Bursts zueinander. Die schwarze Fläche stellt Fehlidentifikationen, die graue Fläche nicht identifizierte Bursts und die schraffierte Fläche korrekt identifizierte Bursts dar.

Der Vergleich der Performance für die beiden problematischen Kombinationen in Abbildung 6.27 zeigt, wie der Prozentsatz der Fehlerkennungen bei dem Segmentfilter durchgehend niedriger als bei den Verhältnisfiltern ist. Insbesondere bei einem ungünstigen Größenverhältnis der Bursts zueinander, kann es zum totalen Versagen des Verhältnisfilters kommen. Generell lässt sich hierbei sehen, wie in unklaren Fällen der Segmentfilter eher eine Nichtidentifizierbarkeit wählt, während der Verhältnisfilter eher zu Fehlentscheidungen tendiert.

6.3.2 Identifikationsresultate bei typenreinen Proben

Eine erste Einschätzung der Güte der einzelnen Filterfunktionen kann über ihre Anwendung auf die typenreinen Proben erhalten werden. Hierbei sollte es zu möglichst vielen korrekten Identifikationen kommen. Für den Fall, dass keine positive Identifikation mit dem Filter möglich ist, sollte es vorzugsweise zu einer Nichtidentifikation (identifizierter Typ = 0) kommen.

		<u>Typ 1</u>	<u>Typ 2</u>	<u>Typ 3</u>	<u>Typ 4</u>	<u>Typ 5</u>
Lebensdauerfilter	Pos.=	4,5	0,5	0,6	0,7	1,6
	N.I.=	95,0	99,3	99,3	99,2	98,4
	Neg.=	0,5	0,2	0,1	0,1	0,0
Verhältnisfilter	Pos.=	95,0	96,5	99,6	98,6	99,7
	N.I.=	3,0	3,4	0,3	1,4	0,2
	Neg.=	1,3	0,1	0,1	0,0	0,1
Verhältnisfilter + Lebensdauerfilter	Pos.=	95,6	96,8	99,4	98,3	99,7
	N.I.=	2,8	3,1	0,5	1,7	0,2
	Neg.=	1,6	0,1	0,1	0,0	0,1
Segmentfilter	Pos.=	96,0	93,3	99,6	96,9	99,9
	N.I.=	2,6	4,0	0,3	0,8	0,0
	Neg.=	1,4	2,7	0,1	2,3	0,1
Segmentfilter + Zusatzbed.	Pos.=	84,4	90,5	92,6	96,0	99,8
	N.I.=	14,5	9,0	7,3	3,5	0,1
	Neg.=	1,1	0,5	0,1	0,5	0,1
Segmentfilter + Zusatzbed. + Lebensdauerfilter	Pos.=	84,4	90,9	92,6	95,9	99,8
	N.I.=	14,5	8,6	7,2	3,6	0,1
	Neg.=	1,1	0,5	0,2	0,5	0,1

Tabelle 6.9: Effizienz der verschiedenen Filterarten bei der Anwendung auf Proben mit nur einem Typ. Angegeben sind jeweils die Prozentsätze richtig, falsch und nicht identifizierter Photonenbursts.

Wie bereits aus den Verteilungen der Filter zu erwarten war, eignet sich der Lebensdauerfilter nicht zur alleinigen Identifikation. Nahezu alle Bursts waren bei seiner Verwendung nicht identifizierbar. Der Verhältnisfilter hingegen funktioniert für alle fünf Typen mit Fehlerquoten von unter 1,3 % sehr gut. Die Quote der nicht identifizierbaren Bursts liegt bei weniger als 3,5 %. Die zusätzliche Verwendung des Lebensdauerfilters führt hierbei nur zu geringfügige Veränderungen. Die Verwendung des Segmentfilters ohne Zusatzbedingungen weist insbesondere für die Typen 2 und 4 erhöhte Fehlerquoten von 2,7 % und 2,3 % auf. Durch die Verwendung der Zusatzbedingungen lässt sich die Fehlerquote für diese beiden Typen auf 0,5 % senken. Die strengeren

Bedingungen führen jedoch dazu, dass ein erhöhter Prozentsatz der Bursts aufgrund schlechter Datenqualität von der Identifikation ausgeschlossen wird. Dieser Prozentsatz liegt im Allgemeinen unter 15 %, wobei der Anteil der durch die Zusatzbedingungen eliminierten Bursts mit der Helligkeit der *Nanospheres* korreliert. Dies macht durchaus Sinn, da die Datenqualität im hohen Maße von der Anzahl der detektierten Photonen eines Bursts abhängt, welche wiederum direkt von der Partikeltrajektorie sowie der spezifischen Helligkeit des Typs abhängt.

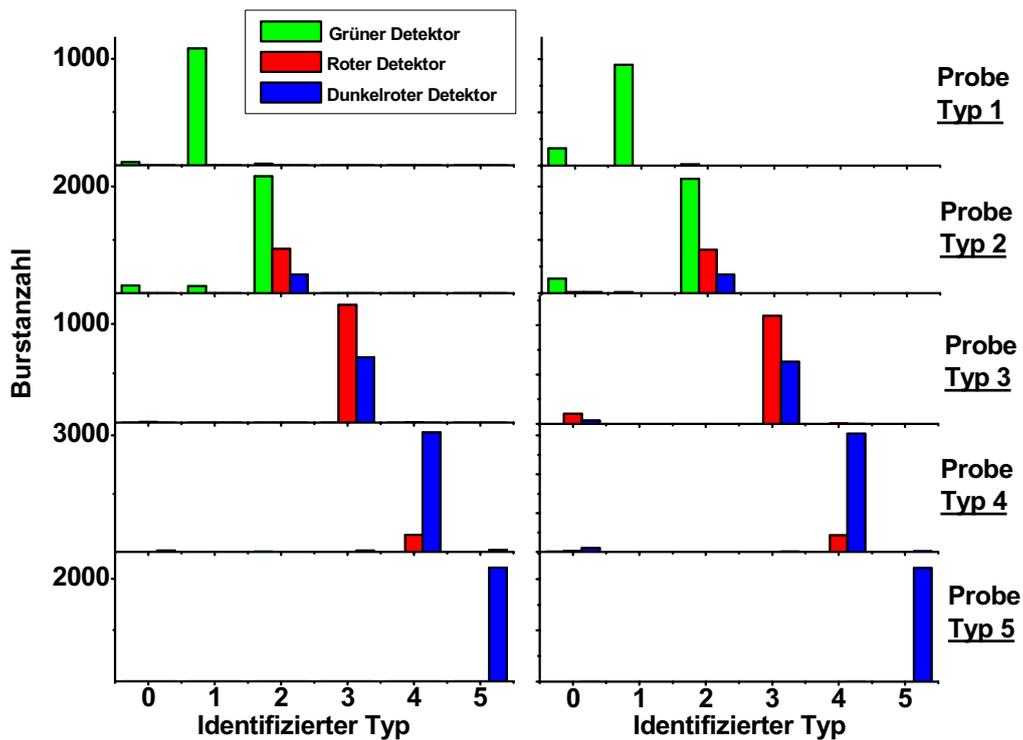


Abbildung 6.28: Identifikationsergebnisse des Segmentfilters. Links, nur Segmentfilter. Rechts, Segmentfilter mit den Zusatzbedingungen Mindestbestimmbarkeit und Mindestwahrscheinlichkeit.

Aus der Darstellung der identifizierten Bursts innerhalb der verschiedenen Detektoren in Abbildung 6.28 lässt sich sehen, wie die Verteilung primärer, sekundärer und tertiärer Bursts mit der Zählratenverteilung der Typen in die verschiedenen Detektoren zusammenhängt. Des Weiteren lässt sich hieraus erkennen, welche Typen zu welchen Fehlidentifikationen führen können. Durch Einsatz der Zusatzbedingungen können diese verhindert werden, wobei die Anzahl nicht identifizierter Bursts ansteigt.

Eine alternative Möglichkeit, Bursts mit schlechter Datenqualität auszuschließen, ist eine strengere Auswahl anhand der Burstvalidierungskriterien Mindestgröße und Mindesthöhe. Wie bereits in Abbildung 6.14 gezeigt, bewirkt dies jedoch eine signifikante Verringerung der Anzahl der validierten Bursts, so dass abgewägt werden muss, wo der Schwerpunkt der Untersuchung liegen soll. Eine Verbesserung des Prozentsatzes korrekt indentifizierter Bursts geht demnach immer einher mit einer Verringerung der Gesamtanzahl identifizierter Bursts.

6.3.3 Identifikationsresultate bei Mischungen mehrerer Typen

Bei der Untersuchung von Mischungen mehrerer Typen tritt die zusätzliche Problematik auf, dass Bursts eines Typs durch periphere Passagen anderer Typen gestört werden können bzw. dass sich die Bursts zweier Typen gegenseitig überlappen. Um diese Faktoren zu minimieren, wurden die gemischten Proben im Vergleich zu den reinen Proben nochmals um den Faktor 10 verdünnt.

Für die Mischungen wurden die beiden, zuvor bestimmten, effektivsten Filtersysteme evaluiert. Zum einen wurde der Verhältnisfilter in Kombination mit dem Lebensdauerfilter, der bei den reinen Proben sehr gut abgeschnitten hat, bewertet. Hier ist zu erwarten, dass sich eventuelle Störbedingungen negativ auswirken und zu Fehlidentifikationen führen. Weiterhin wird der Segmentfilter mit Zusatzbedingungen in Kombination mit dem Lebensdauerfilter angewendet. Dieser hat bei den reinen Proben die kleinsten Fehlerraten aufgezeigt. Allerdings ist zu erwarten, dass ein signifikanter Anteil an Bursts aufgrund minderer Datenqualität als nicht identifizierbar klassifiziert wird.

Zuerst wurde geprüft, inwiefern Fehlidentifikationen bei allen Mischungen aus zwei Typen eine Rolle spielen. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten und um Partikelpassagen nicht mehrfach zu zählen, werden hierbei stets nur die primären Photonenbursts ausgewertet. Sind mehrere Typen vorhanden, die in demselben Detektor ihren primären Burst haben, so kann hier natürlich nur gemutmaßt werden, dass die jeweils korrekte Identität zugewiesen wurde.

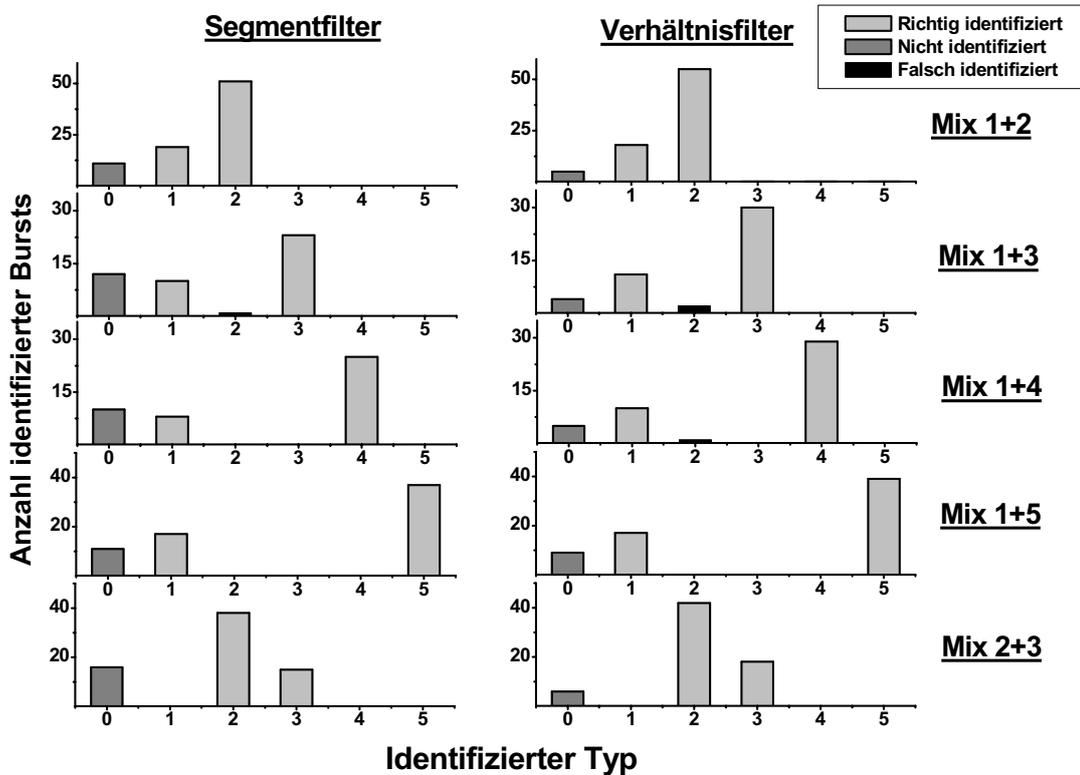


Abbildung 6.29: Identifikationsresultate von fünf Mischungen aus je zwei verschiedenen Typen mit den beiden effizientesten Filtersystemen. Fehlidentifikationen sind schwarz, korrekte Identifikationen hellgrau und nicht identifizierbare dunkelgrau dargestellt. Links, Identifikationsergebnisse mit dem Segmentfilter + Zusatzbedingungen. Rechts, Identifikationsergebnisse mit dem Verhältnisfilter.

Abbildung 6.29 zeigt die Identifikationsresultate der effizientesten Filtersysteme auf fünf Mischungen zweier *Nanosphere*-Typen. Der Segmentfilter weist stets eine höhere Rate an nicht identifizierten Bursts auf, was auf den Ausschluss von Bursts mit unzureichender Datenqualität zurückzuführen ist. Die Mischung von Typ 1 mit Typ 3 weist Fehlidentifikationen von Typ 2 Bursts auf, wobei der Segmentfilter im direkten Vergleich weniger Fehlidentifikationen aufweist. Sowohl das Auftreten wie auch das bessere Abschneiden des Segmentfilters wurden bereits zuvor über die Überlappungssimulation dieser Kombination prognostiziert. In der Mischung von Typ 1 mit Typ 4 tritt bei dem Verhältnisfilter zusätzlich noch eine Fehlidentifikation eines Typ 2 auf. Bei allen anderen Kombinationen sind bei beiden Systemen keine weiteren Fehler aufgetreten.

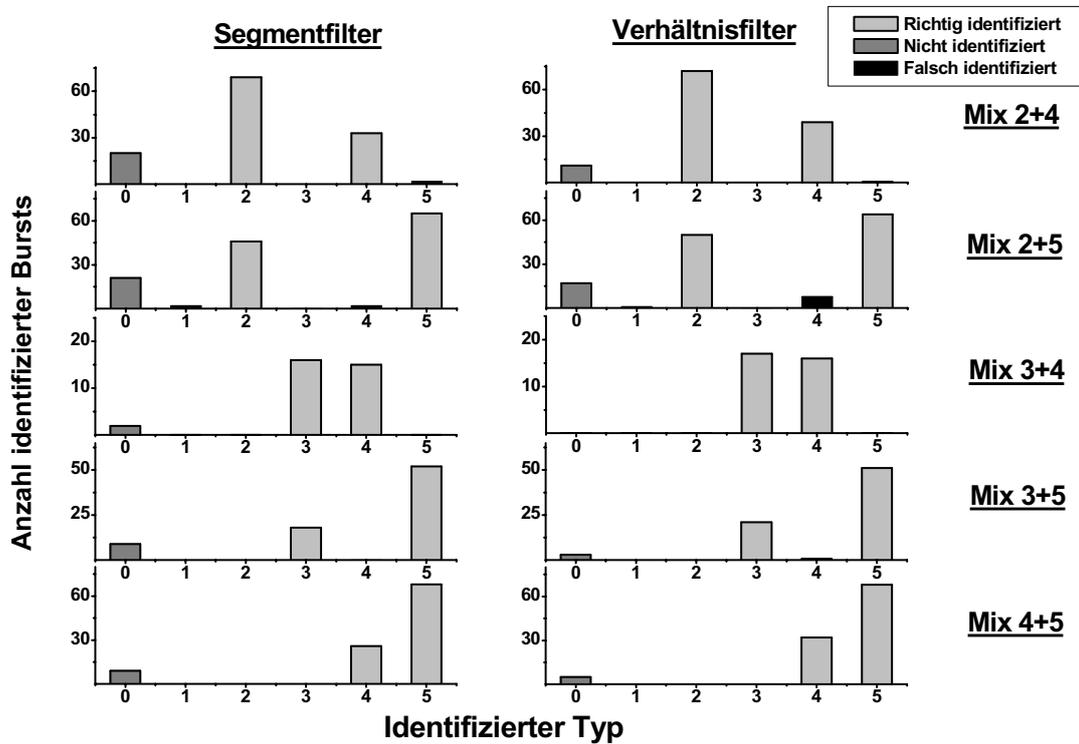


Abbildung 6.30: Identifikationsresultate von fünf Mischungen aus je zwei verschiedenen Typen mit den beiden effizientesten Filtersystemen. Fehlidentifikationen sind schwarz, korrekte Identifikationen hellgrau und nicht identifizierbare dunkelgrau dargestellt. Links, Identifikationsergebnisse mit dem Segmentfilter + Zusatzbedingungen. Rechts, Identifikationsergebnisse mit dem Verhältnisfilter.

Die Identifikationsresultate der übrigen fünf Permutationen an Mischungssystemen zweier *Nanosphere*-Typen sind in Abbildung 6.30 dargestellt. Auch hier zeigt der Segmentfilter kontinuierlich höhere Ausschlussraten. Die Kombination der Typen 3 und 5, welche ebenfalls in der Überlappungssimulation zu Fehlidentifikationen führte, ist hier unauffällig. Allerdings fällt die Kombination von Typ 2 mit Typ 5 durch falsch identifizierte Typ 4 Bursts auf, wobei erneut der Segmentfilter eine kleinere Fehlerrate aufweist. In der Kombination Typ 3 mit Typ 5 tritt der gleiche Fehler auf, wobei hierbei nur der Verhältnisfilter betroffen ist.

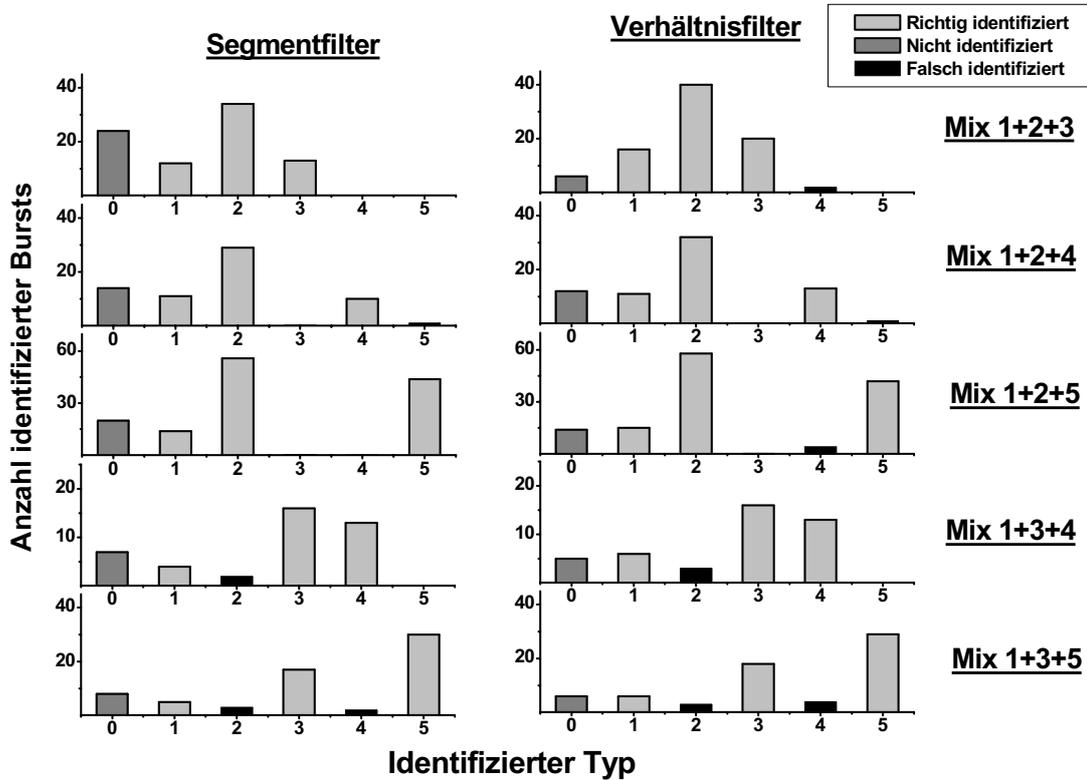


Abbildung 6.31: Identifikationsresultate von fünf Mischungen aus je drei verschiedenen Typen mit den beiden effizientesten Filtersystemen. Fehlidentifikationen sind schwarz, korrekte Identifikationen hellgrau und nicht identifizierbare dunkelgrau dargestellt. Links, Identifikationsergebnisse mit dem Segmentfilter + Zusatzbedingungen. Rechts, Identifikationsergebnisse mit dem Verhältnisfilter.

In Abbildung 6.31 sind die Identifikationsresultate von fünf verschiedenen Mischungen aus je drei Typen *Nanospheres* dargestellt. Wie in den vorherigen Mischungen zweier Typen fällt auch hierbei die höhere Ausschlussrate des Segmentfilters auf. Typische Fehlidentifikationen treten wieder in den Kombinationen auf, in denen entweder Typ 1 und Typ 3 simultan vorliegen bzw. wo Typ 3 mit Typ 5 vorliegt. Der Verhältnisfilter zeigt zudem noch die Tendenz falsche Typ 4 Bursts bei anderen Kombinationen zu identifizieren.

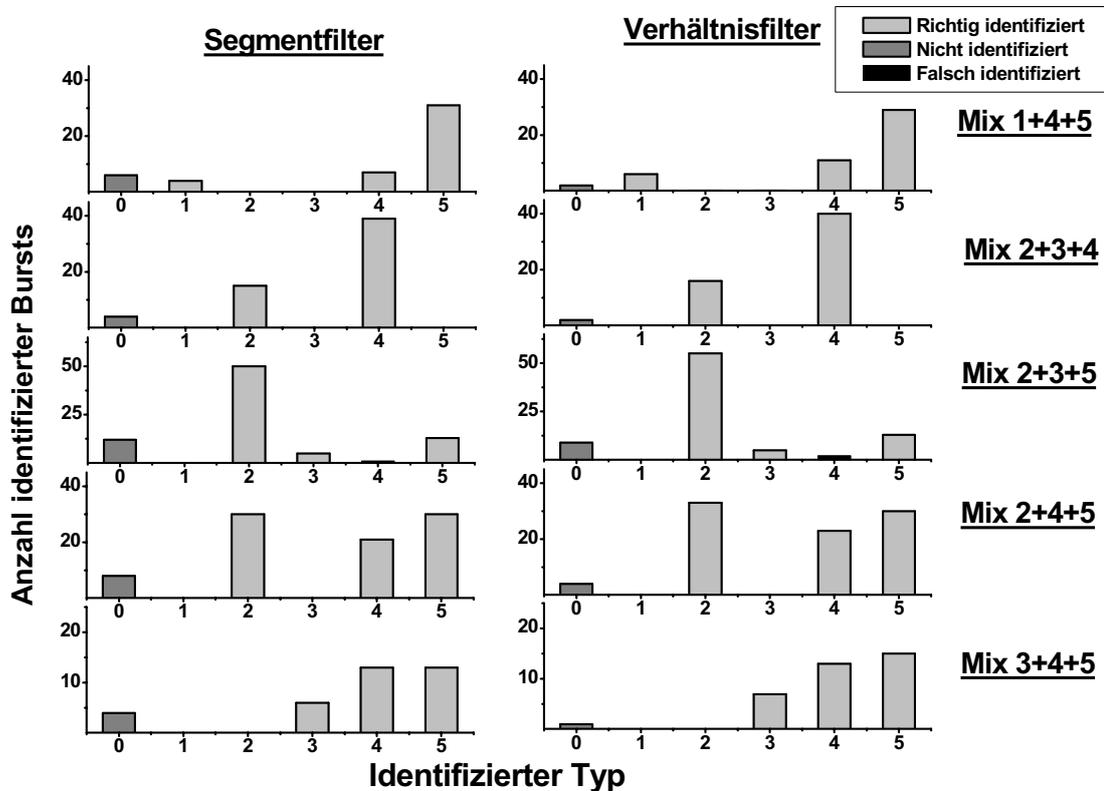


Abbildung 6.32: Identifikationsresultate von fünf Mischungen aus je drei verschiedenen Typen mit den beiden effizientesten Filtersystemen. Fehlidentifikationen sind schwarz, korrekte Identifikationen hellgrau und nicht identifizierbare dunkelgrau dargestellt. Links, Identifikationsergebnisse mit dem Segmentfilter + Zusatzbedingungen. Rechts, Identifikationsergebnisse mit dem Verhältnisfilter.

Die weiteren Kombinationen dreier *Nanosphere*-Typen, die in Abbildung 6.32 dargestellt sind, zeigen dieselben Tendenzen bezüglich Fehleridentifikationen und nicht identifizierten Bursts wie sie schon für die zuvor beschriebenen Kombinationen erläutert wurden. Bei der Kombination 2+3+4 könnte aufgrund der nicht vorhandenen Typ 3 Bursts ein Pipetierfehler aufgetreten sein. Im direkten Vergleich hat auch bei den Mischungen aus drei Typen der Segmentfilter kontinuierlich kleinere Fehlerraten.

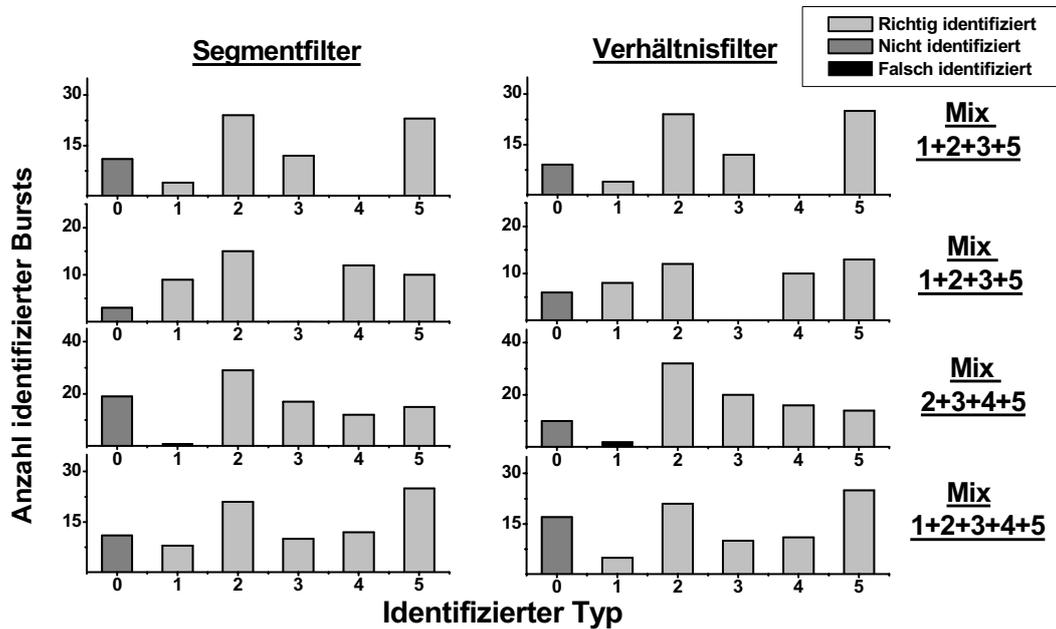


Abbildung 6.33: Identifikationsresultate von drei Mischungen aus je vier verschiedenen Typen sowie einer Mischung aus fünf verschiedenen Typen mit den beiden effizientesten Filtersystemen. Fehlidentifikationen sind schwarz, korrekte Identifikationen hellgrau und nicht identifizierbare dunkelgrau dargestellt. Links, Identifikationsergebnisse mit dem Segmentfilter + Zusatzbedingungen. Rechts, Identifikationsergebnisse mit dem Verhältnisfilter.

In Abbildung 6.33 sind noch einige Mischungen mit vier bzw. eine Mischung, die alle fünf *Nanosphere*-Typen enthält, dargestellt.

Die variierenden Anzahlen identifizierter Bursts bei den verschiedenen Typen sind dadurch begründet, dass zwar annähernd äquivalente Konzentrationen über die FCS-Messungen eingestellt wurden, die Burstvalidierung aber auch zusätzlich von der Partikelhelligkeit abhängt. Dementsprechend wurden die längerwellig emittierenden *Nanospheres* öfter identifiziert und die mit 40 nm doppelt so großen Typ 2 *Nanospheres*, welche die doppelte Menge an Fluorophoren enthalten, ebenfalls öfter nachgewiesen.

Zusammenfassend haben beide Filtersysteme bei Mischungen von *Nanosphere*-Typen gute Resultate erzielt. Generell zeichnet sich der Segmentfilter durch kleinere Fehlerraten aus. Auf der anderen Seite treten bei dem Verhältnisfilter kleinere Raten an nicht identifizierten Bursts auf.

7 Ausblick

Eine erste praktische Anwendung der in dieser Arbeit entwickelten Identifikationsalgorithmen ist die Bestückung der fluoreszenz-kodierten *Nanospheres* mit biologisch relevanten Liganden, um diese auf Wechselwirkungen mit konkreten Zielmolekülen zu untersuchen. Hierbei müssen die Algorithmen, je nachdem ob das Zielmolekül über eine oder mehrere aktive Bindungsstellen verfügt, um die Erkennung der Wechselwirkung mit dem jeweiligen Zielmolekül erweitert werden.

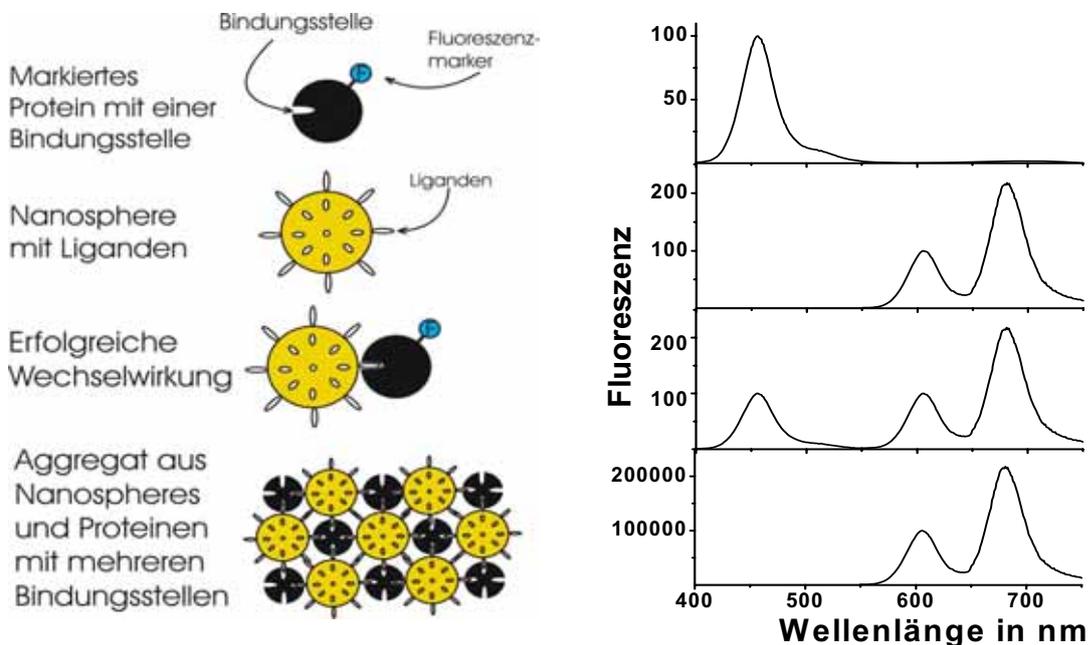


Abbildung 7.1: Schema der Protein-Nanosphere-Wechselwirkung für Proteine mit einer Bindungsstelle sowie Proteinen mit mehreren Bindungsstellen. Des Weiteren sind die Emissionsspektren der Einzelkomponenten sowie der gebildeten Aggregate gezeigt.

Steht nur eine Bindungsstelle zur Verfügung, so muss das Zielmolekül zusätzlich mit einem Marker versehen werden, dessen simultane Fluoreszenz die relative Wechselwirkung mit dem jeweiligen Nanopartikel anzeigt. Dies bedeutet detektionsseitig eine Erweiterung auf vier APDs, siehe Abbildung 7.1. Stehen jedoch mehrere Bindungsstellen zur Verfügung, wie z.B. bei den Lektinen, so führt eine passende Ligand-Protein-Kombination zur Aggregation der

Nanopartikel [12]. Hier kann eine erfolgte Wechselwirkung der Ligand-Protein-Kombination über die Photonenbursthöhe nachgewiesen werden, wobei über den absoluten Wert Aussagen über die Bindungsaffinitäten der Kombinationen getroffen werden können. Des Weiteren kann es, wenn mehr als eine spezifische Wechselwirkung vorliegt, zur Bildung von Mischaggregaten kommen. Hier erlaubt die Untersuchung des Emissionsmusters des Aggregats direkte Aussagen zu den relativen Bindungsaffinitäten der involvierten Liganden zu treffen, es kann jedoch zu zwei Problemen kommen. Zum einen können unspezifische Aggregationen nur bedingt von tatsächlichen Wechselwirkungen unterschieden werden. Zum anderen werden peripher passierende Aggregate aufgrund der geringeren Fluoreszenz in ihrer Größe unterschätzt. Eine zusätzliche Markierung der Proteine kann hierbei zumindest eine Unterscheidung von unspezifischen Aggregationen ermöglichen.

Da bei sehr großen Aggregaten die Gefahr des „*optical trapping*“ besteht, muss durch Einsatz eines *Choppers* gewährleistet werden, dass die Aggregate wieder aus dem Fokallvolumen herausdiffundieren können.

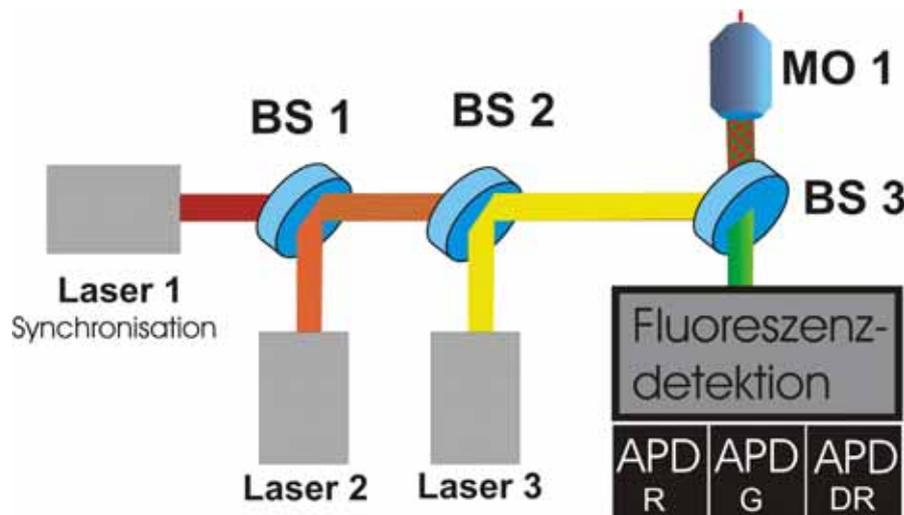


Abbildung 7.2: Schema des konfokalen Mikroskopaufbaus mit Absorptionsbandenspezifischer Anregung durch drei gepulste Laser mit zeitlichem Versatz zur effektiven Identifikation beliebig vieler verschiedener Nanopartikel.

Bei dem aktuellen Messsystem ist es aufgrund von äußerst effektiven FRET-Prozessen schwierig die mehrfach angefärbten Nanopartikel von den einfach angefärbten zu unterscheiden.

Diese Problematik ließe sich mit drei gepulsten Laserdioden deren Wellenlängen den Absorptionsmaxima der mehrfach angefärbten *Nanospheres* entsprechen, umgehen (siehe Abbildung 7.2). Die Pulsfolgen der drei Laserdioden werden mit einem zeitlichen Versatz von z.B. 22 ns aneinander gekoppelt wobei einer der Laser als Synchronisationssignal für die TCSPC-Karte verwendet wird. Wichtig hierbei ist, das der Zeitversatz genügend groß gewählt ist, so dass die einzelnen Fluoreszenzdynamiken komplett abgeklungen sind.

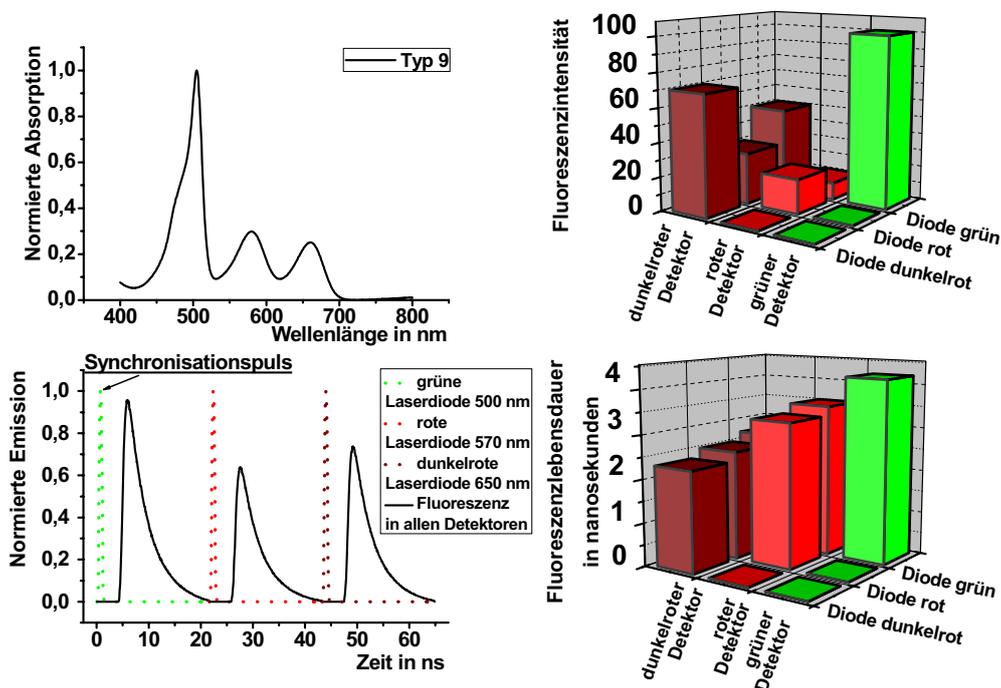


Abbildung 7.3: Oben links, Absorptionsspektrum des dreifach angefärbten Typs 9. Unten links, schematische Darstellung der resultierenden drei Abklingdynamiken in einem 66 ns Zeitfenster bei einem zeitlichen Versatz der Diodenpulse von 22 ns. Rechts, aus Kombination der mikroskopischen Zeit- und Detektorinformation aufschlüsselbare Parameter Lebensdauer und Intensität einer Typ 9 Messung.

Es entsteht ein Zeitfenster von 66 ns, in welchem je nach den in den *Nanospheres* vorhandenen Fluorophoren bis zu 3 Abklingdynamiken zu beobachten sind. Über die verschiedenen Farbkombinationen sind dann bis zu 9 charakteristische Nanopartikel unterscheidbar (siehe Abbildung 7.3). Auf diese Weise kann somit unterschieden werden, ob die jeweilige Fluoreszenz in einem Detektor direkt oder über FRET-Prozesse verursacht wurde und dadurch trotz

nicht unterscheidbarer Emissionsspektren einfach von mehrfach angefärbten *Nanospheres* differenziert werden.

Aufgrund des zeitlichen Versatzes der Farbstofffluoreszenzen ist es bei Beschränkung auf die drei Farbstoffe grün, rot und dunkelrot zudem möglich, mit nur einem Fluoreszenzdetektor zu messen.

Sind die drei kodierenden Farbstoffe weiterhin in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden, werden sich mit diesem Verfahren sogar beliebig viele unterschiedliche Nanopartikel unterscheiden lassen.

A Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Jablonski Diagramm.....	11
Abbildung 3.2:	Visualisierung von FRET-Wegen anhand von Jablonski-Diagrammen.....	20
Abbildung 3.3:	Schematische Darstellung des <i>Photonantibunchings</i>	22
Abbildung 3.4:	Flussdiagramm des TCSPC im umgekehrten Start-Stop-Modus.....	28
Abbildung 3.5:	Startzeitvarianz bei Grenzwert- und <i>Constant-Fraction-Discriminator</i>	28
Abbildung 3.6:	Arbeitsprinzip des CFD.....	29
Abbildung 3.7:	Einfluss von Partikelgröße und –konzentration auf die FCS-Kurven.....	34
Abbildung 3.8:	Radiales Anregungsprofil unter zunehmender Laserleistung....	38
Abbildung 3.9:	Einfluss der Partikelgröße auf die minimale Diffusionsstrecke durch den Fokalvolumenmittelpunkt.....	39
Abbildung 4.1:	Aufbau des Ti:Sa Oszillators.....	41
Abbildung 4.2:	Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops.....	43
Abbildung 4.3:	Filtertransmissionsspektren und Ti:Sa Emissionsspektren.....	44
Abbildung 4.4:	Detektionseffizienz der APDs.....	45
Abbildung 4.5:	Kernkörper und Farbstoffbeispiel der BODIPY Farbstoffgruppe.....	47
Abbildung 5.1:	Schema der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer anhand der TCSPC-Informationen.....	51
Abbildung 5.2:	Zählratenhistogramm zur Bestimmung des Bursterkennungsgrenzwertes.....	54
Abbildung 5.3:	Schema der Bursterkennung und Burstvalidierung anhand der verschiedenen Grenzwerte.....	55
Abbildung 5.4:	Zeitspur einer Typ 2 Messung mit erkannten primären Photonenbursts.....	56
Abbildung 5.5:	Schema der Parameterbestimmung für den Segmentfilter.....	59
Abbildung 5.6:	Ermittlung eines Sicherheitsfaktors aus BICR-Verteilungen mit dem Verhältnisfilter.....	61
Abbildung 5.7:	Ermittlung eines Sicherheitsfaktors aus Nebensignal-Verteilungen mit dem Segmentfilter.....	63

Abbildung 6.1: Absorptionsspektren aller neun verschieden angefärbten <i>Nanospheres</i>	64
Abbildung 6.2: Einphotonen- und Zweiphotonen-Emissionsspektren aller neun verschieden angefärbten <i>Nanospheres</i>	65
Abbildung 6.3: Spektrale Überlappung der Farbstoffe der mehrfach angefärbten <i>Nanospheres</i> zur Abschätzung von hetero-FRET.....	67
Abbildung 6.4: Spektrale Eingenüberlappung aller einfach gefärbten <i>Nanospheres</i> zur Abschätzung von homo-FRET.....	69
Abbildung 6.5: Zeitspuren der nicht separierbaren Typen 3 und 6.....	70
Abbildung 6.6: Zeitspuren der nicht separierbaren Typen 5, 7, 8 und 9.....	71
Abbildung 6.7: Fluoreszenzabklingkurven der Typen 1, 4 und 5.....	73
Abbildung 6.8: Abhängigkeit der Anpassungsparameter der Fluoreszenzlebensdauer von der Anregungsleistung für alle neun verschieden angefärbten <i>Nanospheres</i>	75
Abbildung 6.9: Kugelschale und Kugelkern verschieden großer <i>Nanospheres</i> zur Darstellung der Aufenthaltsräume der zwei unterschiedlichen Fluorophorpopulationen.....	76
Abbildung 6.10: Fluoreszenzabklingkurven und Anpassungsparameter von Typ 1 <i>Nanospheres</i> verschiedener Größe.....	77
Abbildung 6.11: Abhängigkeit des FCS-Anpassungsparameters Diffusionszeit von der Anregungsleistung für alle neun verschieden angefärbten <i>Nanospheres</i>	80
Abbildung 6.12: FCS-Kurven der Typ 5 <i>Nanospheres</i> unter variierender Anregungsleistung.....	82
Abbildung 6.13: BIFL-Verteilungen der fünf ausgewählten <i>Nanospheres</i>	84
Abbildung 6.14: BIFL-Verteilung in Abhängigkeit des Burstvalidierungsparameters Mindesthöhe.....	86
Abbildung 6.15: BICR-Verteilungen der im grünen Detektor auftretenden Photonenbursts.....	87
Abbildung 6.16: BICR-Verteilungen der im roten Detektor auftretenden Photonenbursts.....	88
Abbildung 6.17: BICR-Verteilungen der im dunkelroten Detektor auftretenden Photonenbursts.....	89
Abbildung 6.18: Nebensignal-Verteilungen der im grünen Detektor auftretenden Photonenbursts.....	90

Abbildung 6.19: Idealisierte Photonenbursts des grünen Detektors mit Konfidenzintervallen für die Nebensignale.....	91
Abbildung 6.20: Nebensignal-Verteilungen der im roten Detektor auftretenden Photonenbursts.....	92
Abbildung 6.21: Idealisierte Photonenbursts des roten Detektors mit Konfidenzintervallen für die Nebensignale.....	93
Abbildung 6.22: Nebensignal-Verteilungen der im dunkelroten Detektor auftretenden Photonenbursts.....	94
Abbildung 6.23: Idealisierte Photonenbursts des dunkelroten Detektors mit Konfidenzintervallen für die Nebensignale.....	95
Abbildung 6.24: Schrittweise Überlappung der Photonenbursts zweier Typen...	96
Abbildung 6.25: Verhalten des Parameters BICR bei der Simulation einer Burstüberlappung.....	97
Abbildung 6.26: Verhalten der Parameter Bestimmbarkeit und Durchschnittswahrscheinlichkeit bei der Simulation einer Burstüberlappung.....	98
Abbildung 6.27: Identifikationsresultate bei der Simulation einer Burstüberlappung für kritische Typenkombinationen.....	100
Abbildung 6.28: Identifikationsresultate bei der Filteranwendung auf reine Proben.....	102
Abbildung 6.29: Identifikationsresultate bei der Filteranwendung auf fünf Mischproben mit zwei Typen <i>Nanospheres</i>	104
Abbildung 6.30: Identifikationsresultate bei der Filteranwendung auf fünf Mischproben mit zwei Typen <i>Nanospheres</i>	105
Abbildung 6.31: Identifikationsresultate bei der Filteranwendung auf fünf Mischproben mit drei Typen <i>Nanospheres</i>	106
Abbildung 6.32: Identifikationsresultate bei der Filteranwendung auf fünf Mischproben mit drei Typen <i>Nanospheres</i>	107
Abbildung 6.33: Identifikationsresultate bei der Filteranwendung Mischproben mit mehreren Typen <i>Nanospheres</i>	108
Abbildung 7.1 : Schema der Wechselwirkungsdetektion mit den fluoreszenz-kodierten <i>Nanospheres</i>	109
Abbildung 7.2 : Aufbau des konfokalen Mikroskops unter Einphotonen-Anregung.....	110
Abbildung 7.3 : Resultierende Parameter aus der gepulsten Einphotonen-Anregung mit drei zeitversetzten Laserdioden.....	109

B Abkürzungsverzeichnis

ADC	= Analogue Digital Converter
APD	= Avalanche Photo Diode
BICR	= Burst Integrated Count Ratio
BIFL	= Burst Integrated Fluorescence Lifetime
CFD	= Constant Fraction Discriminator
CW	= Continuous Wave
FCS	= Fluorescence Correlation Spectroscopy
FCCS	= Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy
FLIM	= Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FILDA	= Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis
FRAP	= Fluorescence Recovery after Photobleaching
FRET	= Förster Resonance Energy Transfer
HTS	= High Throughput Screening
IC	= Internal Conversion
IRF	= Instrument Response Function
ISC	= Inter System Crossing
LMA	= Levenberg Marquardt Algorithmus
NA	= Numerische Apertur
PMT	= Photomultiplier Tube
SSA	= Singulett-Singulett-Auslöschung
STA	= Singulett-Triplett-Auslöschung
STED	= Stimulated Emission Depletion
TAC	= Time to Amplitude Converter
TCSPC	= Time Correlated Single Photon Counting
TTL	= Transistor Transistor Logic
TTTR	= Time Tagged Time Resolved


```

Traces *Trace_D1=0,*Trace_D2=0,*Trace_D3=0;
FC *FC_D1=0,*FC_D2=0,*FC_D3=0;
Burst **BAD1=0,**BAD2=0,**BAD3=0;
Burst *BL1stD1=0,*BL1stD2=0,*BL1stD3=0;
Burst *BLAD1=0,*BLAD2=0,*BLAD3=0;
Burstliste *BurstL1stD1=0,*BurstL1stD2=0,*BurstL1stD3=0;
Liefhistogramme *HistogrammD1=0,*HistogrammD2=0,*HistogrammD3=0;
Umlint **BHD1D2=0,**BHD2D3=0,**BHD3D2=0, **BHD1D3=0,**BHD3D1=0;
double **BTyp1=0,**BTyp2=0,**BTyp3=0,**BTyp4=0,**BTyp5=0;
Alig = new Aligemein; Wertinitialisierung(Alig);

if ((Einlesemodus==2)&&(Einlesemodus==6)&&(Einlesemodus==7))
{
    Ushort a=0,b=0,c=0,d=0;
    char Stelle[25]="01234567890123456789";
    d=((start1)+(10*start2)+(100*start3)+1);
    if (d<1000)
    {
        a=(Ushort)(d+1)/100;b=(Ushort)(d/10)%10;c=(Ushort)(d)%10;
        in[laenge-7]=Stelle[a];in[laenge-6]=Stelle[b];in[laenge-5]=Stelle[c];
    }
}
if (Einlesemodus==7)
{
    if ((i)%25==0)
    {
        if (Pow1==1)&&(Pow2==1)){break; Pow2--;}
        if (Pow2==0)&&(Pow1==2);{Pow1--;Pow2=(Pow1-1);}
        if (Pow2==0)&&(Pow1==2);{Pow1--;Pow2=1;}
        if (Pow1%2==0)&&(Pow2%2==0);{Pow2--;}
        if (Pow1%3==0)&&(Pow2%3==0);{Pow2--;}
        if ((Pow1%Pow2==0)&&(Pow2!=1)&&(Pow2!=0));{Pow2--;}
        Simtype1--;Simtype2=1;
    }
    else {if ((i)%5==0){Simtype1++;Simtype2=1;}else {Simtype2++;}
        if ((i)%25==0){staerke++;}
        SimresNM[i][i%25+2] =Simtype1 ;SimresNM[i][i%25+2] =Simtype2;
        SimresRM[i][i%25+2] =Simtype1 ;SimresRM[i][i%25+2] =Simtype2;
        SimresWM[i][i%25+2] =Simtype1 ;SimresWM[i][i%25+2] =Simtype2;
        SimresNM[staerke+2][i]=Pow1 ;SimresNM[staerke+2][i]=Pow2;
        SimresRM[staerke+2][i]=Pow1 ;SimresRM[staerke+2][i]=Pow2;
        SimresWM[staerke+2][i]=Pow1 ;SimresWM[staerke+2][i]=Pow2;
        if (Simtype1==Simtype2){continue;}
    }
}
modus=Alig->getmyModus();
Bursthoehe=Alig->getmyBurstminHoehc();
for (i=0;i<200;i++){out[i]= in[i];}
for (i=0;i<(strlen(txt)+1);i++){out[laenge-4+i]= txt[i];}
fpin=fopen(in,"rb");
if (fpin==NULL){printf("cannot open input file\n");}
if (ausgelasseneDateien<20)
{
    printf("Ausgelassene Dateien=%d\n",ausgelasseneDateien);
    printf("ueberspringe Datei\n");
    ausgelasseneDateien++;continue;
}
else {printf("beende den Lauf\n");break;}
}
else{ausgelasseneDateien=0;}

Alig->setmyAufloesungKarte(BoardHdr.Resolution);
Alig->setmyNrRecords(TTRHdr.NoOfRecords);
Umlint NrRecords=Alig->getmyNrRecords();
Umlint clock=Alig->getmyGlobClock();

see=(Umlint)((TxFtdr.FileTime[16]-48)+((TxFtdr.FileTime[15]-48)*10));

```

```

BurstsizeDist[i][aa]=0;}}
Aligemein *DummyAligemein=0;
DummyAligemein =new Aligemein;
Wertinitialisierung(DummyAligemein);
Umlint Bminhoehe=0;
if (Einlesemodus==7)
{
    BHD1D2MW=new double[500];BHD2D1MW=new double[500];
    BHD2D3MW=new double[500];
    BHD3D2MW=new double[500];BHD1D3MW=new double[500];
    BHD3D1MW=new double[500];
    BHD1D2Stabw=new double[500];BHD2D1Stabw=new double[500];
    BHD2D3Stabw=new double[500];BHD3D2Stabw=new double[500];
    BHD1D3Stabw=new double[500];BHD3D1Stabw=new double[500];
    BHD1D2ZF=new Umlint* [500]; BHD2D1ZF=new Umlint* [500];
    BHD2D3ZF=new Umlint* [500]; BHD1D3ZF=new Umlint* [500];
    BHD3D1ZF=new Umlint* [500];
    for (int i=0;i<500;i++)
    {
        BHD1D2ZF[i]=new Umlint[500];BHD2D1ZF[i]=new Umlint[500];
        BHD2D3ZF[i]=new Umlint[500];BHD3D1ZF[i]=new Umlint[500];
        BHD1D2MW[i]=0;BHD2D1MW[i]=0;BHD3D1MW[i]=0;
        BHD1D2Stabw[i]=0;BHD2D1Stabw[i]=0;BHD3D2Stabw[i]=0;
        BHD2D3MW[i]=0;BHD1D3Stabw[i]=0;BHD3D1MW[i]=0;BHD3D2Stabw[i]=0;
        BHD1D3MW[i]=0;BHD2D3Stabw[i]=0;BHD3D1MW[i]=0;BHD3D2Stabw[i]=0;
        for (int aa=0;aa<500;aa++)
        {BHD1D2ZF[i][aa]=0;BHD2D1ZF[i][aa]=0; BHD2D3ZF[i][aa]=0;
            BHD3D1ZF[i][aa]=0;BHD1D3ZF[i][aa]=0;BHD3D1ZF[i][aa]=0;}}
        Datailed1 =new Dateizusammenfassung [Konstitutivfiles+Add1];
        HistogrammD1_ZF =new Liefhistogramme(H_min,H_max,b_a,b_b_c,DummyAligemein);
        /*Analog für die anderen Detektoren*/;
        else
        {
            SimresNM=new Umlint * [30];SimresWM=new Umlint * [30];SimresRM=new Umlint * [30];
            for (int i=0;i<30;i++)
            {SimresNM[i]=new Umlint[27];SimresWM[i]=new Umlint[27];SimresRM[i]=new Umlint[27];
                for (int kk=0;kk<27;kk++)
                {SimresNM[i][kk]=0;SimresWM[i][kk]=0;SimresRM[i][kk]=0;}}
            }
        Life_D1_ZF =new Umlint[1010];Life_D2_ZF=new Umlint[1010]; Life_D3_ZF=new Umlint[1010];
        if ((Einlesemodus==5)||((Einlesemodus==6)||((Einlesemodus==7))
        {FiltersetD1=new FiltersatzEInlesen (DummyAligemein);
            FiltersetD1->FiltersatzEInlesen (fpin,laenge,in,1);
            /*Analog für die anderen beiden Detektoren*/;
        }
        for (j=0; j<konstitutivfiles; j++)
        {
            Umlint see=0, min=0, stu=0, ll=0, mode=0,Ergarraysize=0, Binarraysize=0;
            Umlint countsD1=0, countsD2=0, countsD3=0,counts=0, overflows=0,cc=0,result=0;
            Ushort CminD1=4096,CminD2=4096,CminD3=4096,Cminab=4096;
            Ushort channelmaxD1=0,channelmaxD2=0,channelmaxD3=0,error=0,i=0;
            Ushort Detektor1=0,Detektor2=0,Detektor3=0,AuszPk=0,Detektorinfo=0;
            double offtime=0, truetime=0,msesszeit=0;
            Aligemein *Alig=0;
            *EinD1=0,*EinD2=0,*EinD3=0;
            *TagD1=0,*TagD2=0,*TagD3=0;
            *Life_D1=0,*Life_D2=0,*Life_D3=0;
            *FCS_D1=0,*FCS_D2=0,*FCS_D3=0,*FCS_D3=0,*FCS_D3=0,*FCS_D3=0,*FCS_D3=0;
            Correlation

```


D Quellcode der Zeitspuren

```

/* Libraries siehe main */
void AuswertungTraces
(Allgemein *AlgTr,const double* EinD1Tr,const double* EinD2Tr,
const double* EinD3Tr,Traces * &Trace_D1,Traces * &Trace_D2,Traces * &Trace_D3)
{
    {
        Ushort d =AlgTr->getmyDetektorInfo();
        Uint a = (Uint)AlgTr->getmyCountsD1();
        Uint b = (Uint)AlgTr->getmyCountsD2();
        Uint c = (Uint)AlgTr->getmyCountsD3();
        Uint BinSize =AlgTr->getmyBinarraySize();
        Ushort LeeParM =AlgTr->getmyLeeParM(), LeeParK =AlgTr->getmyLeeParK();
        int error;
        if ((d==1)|(d==3)|(d==5)|(d==7))
        {
            Trace_D1=new Traces(BinSize);
            Trace_D1->Binning(a,EinD1Tr);
            Trace_D1->glaetten(LeeParM, LeeParK);
        } /*Ebenso für die anderen Detektoren */
    }
    /*Ausnahmen abfangen */
}

Traces::Traces (const Uint BinGroesse)
{
    myBinGroesse=BinGroesse;
    myThreshold=0;mymaxcount=0;mymincount=0;mycounts=0;error=0;setup();
}

Traces::~Traces () {Dynamische Speicherlösungen*/}

void Traces::setup ()
{
    Uint i;
    int Size =myBinGroesse;
    mySmoothed =new double[Size+10];
    myIdentity =new double[Size+10];
    myBinnedTrace =new Uint[Size+10];
    myBurstTrace =new Uint[Size+10];
    for (i=0; i<Size+9; i++)
        {myBinnedTrace[i]=0;mySmoothed[i]=0;myBurstTrace[i]=0;myIdentity[i]=0;}
}

/*Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen*/
void Traces::Binning(const Uint counts,const double *Daten)
{
    mycounts=counts;
    double tauf1=1e-6, bin=(tauf1*1000.0);
    Uint Size=myBinGroesse,a=0,b=0,f=0,mincount=1000000,maxcount=0;
    for (i=0; i<counts; i++)
        {
            b=(Uint)(Daten[i]/bin);
            if (b>myBinGroesse){printf("Binarrayueberschreitung");cin>>error;}
            myBinnedTrace[b]=myBinnedTrace[b]+1;
        }
    for (i=0; i<Size; i++)

```

```

        {
            a=myBinnedTrace[i];
            if (a>maxcount){maxcount=a;}if (a<mincount){mincount=a;}
        }
        mymincount=mincount; mymaxcount=maxcount;
    }

void Traces::Binning(const double *Daten)
{
    Uint a=0,b=0,f=0,mincount=1000000,maxcount=0;
    for (i=0; i<20000; i++)
        {
            myBinnedTrace[i]= (int)Daten[i];
            a=myBinnedTrace[i];
            if (a>maxcount){maxcount=a;}if (a<mincount){mincount=a;}
        }
        mymincount=mincount; mymaxcount=maxcount;
    }

void Traces::glaetten(const Ushort m,const Ushort fconst)
{
    Uint summe=0,ij=0,j=0,BinarraySize=myBinGroesse;
    float mean=0,var=0,varianz=0,fak=(1.0/((2*m)+1));
    for (i=0; i<m; i++) {mySmoothed[i]=(double)(myBinnedTrace[i]);}
    for (i= m; i<(BinarraySize-m) ; i++)
        {
            for (j=(i-m) ; j<(i+m); j++){summe+=myBinnedTrace[j];}
            mean=(fak)*(summe);
            for (j=(i-m) ; j<(i+m); j++)
                {var+=((myBinnedTrace[j]-mean)*(myBinnedTrace[j]-mean));}
            varianz=(fak)*(var);
            mySmoothed[i]=mean+((myBinnedTrace[i]-mean)*(varianz/(varianz+fconst)));
            mean=0;var=0;varianz=0;summe=0;
        }
    for (i=(BinarraySize-m); i<BinarraySize; i++)
        {mySmoothed[i]=(double)(myBinnedTrace[i]);}
    }
}

```

E Quellcode der Ensemble-fluoreszenzlebensdauern

```

/* Libraries siehe main */
void Auswertung_Lifetimes
(const Ushort* TagD3LLifetime * &Life_D1, Lifetime * &Life_D2, Lifetime * &Life_D3)
{
    {
        Ushort d = AllgLt->getmyDetektorInfo();
        Uint a = AllgLt->getmyPufferspD1();
        Uint b = AllgLt->getmyPufferspD2();
        Uint c = AllgLt->getmyPufferspD3();
        Ushort F = AllgLt->getmyFitstop();
        Ushort F1 = AllgLt->getmyFitstartD1();
        Ushort F2 = AllgLt->getmyFitstartD2();
        Ushort F3 = AllgLt->getmyFitstartD3();
        double mZ = AllgLt->getmyMesszeit();
        Uint countsD1 = (Uint)AllgLt->getmyCountsD1();
        Uint countsD2 = (Uint)AllgLt->getmyCountsD2();
        Uint countsD3 = (Uint)AllgLt->getmyCountsD3();
        Uint BackgrD1 = (int)mZ*a;
        Uint BackgrD2 = (int)mZ*b;
        Uint BackgrD3 = (int)mZ*c;
        int error = 0;
        Uint start = 0;
        if ((d==1)||(d==3)||(d==5)||(d==7))
        {
            Life_D1=new Lifetime(F1,countsD1,TagD1LL,start);
            Life_D1->setmyOffset((d*mZ)/500.0);
            Life_D1->setmyResolution (AllgLt->getmyAufloesungKarte());
            Life_D1->setmyChannelMin (AllgLt->getmyChannelMinD1());
            Life_D1->LifeFitscheck();
            AllgLt->setmyFitscheck();
            if (countsD1>(2*BackgrD1)) {Life_D1->Lifetimefitmono(); Life_D1->Lifetimefitbi();}
        }
        /* Analog für die anderen beiden Detektoren */
        /* Dynamische Speicherüberschreibungen */
    }
}

Lifetime::Lifetime
(const Ushort FitstartLt,const Ushort FitstopLt,
const Uint countsLt,const Ushort* Daten,const Uint startLt)
{
    myFitstart =FitstartLt; myFitstop =FitstopLt;
    myAnzahlPunkte =(FitstartLt-FitstopLt)+1;
    myCounts =countsLt;
    mystart =startLt;
    myLife =new Uint[1010];
    myDaten =new Ushort[myCounts+10];
    myY_fitmono =new double[myAnzahlPunkte+10];
    myY_fibri =new double[myAnzahlPunkte+10];
    myWichtung =new double[myAnzahlPunkte+10]; Setup(Daten);
}

Lifetime::Lifetime

```

```

(const Ushort FitstartLt,const Ushort FitstopLt,Uint *Life,const Uint startLt)
{
    myFitstart =FitstartLt; myFitstop =FitstopLt;
    myAnzahlPunkte =(FitstartLt-FitstopLt)+1;
    mystart =startLt;
    myLife =new Uint[1010];
    myY_fitmono =new double[myAnzahlPunkte+10];
    myY_fibri =new double[myAnzahlPunkte+10];
    myWichtung =new double[myAnzahlPunkte+10]; Setup2(Life);
}

Lifetime::~Lifetime () /* Dynamische Speicherüberschreibungen */
/* Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen */
void Lifetime::Setup (const Ushort* Daten)
{
    /* Variablen initialisierung */
    for (j=0;j<myFitstop;j++)myFitstop-1 ;j)--(wicht[myLife[j]],myWichtung[j]); i++;};
}

void Lifetime::Setup2 (const Uint* Life)
{
    /* Variablen initialisierung */
    for (j=0;j<myFitstart;j++)myFitstop-1 ;j)--(wicht[myLife[j]],myWichtung[j]); i++;};
}

void Lifetime::LifeFitscheck()
{
    Uint SlopePos=0,Punkt_a,Punkt_b,i=0;
    int Slope=0,Auswahl=0;
    myMaximum=999;
    for (i=0;i<myFitstart;i++)myFitstop+40;i--);
    {
        Uint V=i-40;
        Punkt_a=myLife[i]; Punkt_b=myLife[V];
        if ((i<(myFitstop))||(V<(myFitstop)))
        {
            printf("myFitstart=%i,myFitstop=%i\n", myFitstart,myFitstop);
            printf("Fitscheck array underrun i=%i,V=%i",i,V);cin>>i;
        }
        if ((i>(myFitstart))||(V>(myFitstart)))
        {printf("Fitscheck array overrun");cin>>i;
        Slope=Punkt_a-Punkt_b;
        if (Slope<=2){SlopePos++;}
        }
        for (i=999;i>myChannelMin;i--)
        {if (myLife[i]>myLife[myMaximum]) {myMaximum=i;}}
    }
    if (SlopePos>20)&&(myMaximum<(myFitstart-20)) {myFitscheck=false;}
    else
    {if (SlopePos>5)&&(myMaximum<myFitstart)
    {Auswahl=2;if (Auswahl==2){myFitscheck=true;}}
    else {myFitscheck=true;}}
}

void Lifetime::Lifetimefitmono ()
{
    if(myFitscheck==true)
    {
        Uint AnzPar=2,laufvar=0,i=0,j=0;
        double *t=0,*y=0,*parameters=0,*squarebin=0;
        t = new double[myAnzahlPunkte+10];
        y = new double[myAnzahlPunkte+10];
    }
}

```

```

squarebin = new double[myAnzahlPunkte+10];
parameters = new double[AnzPar+1];

myChisquaremono=0;
lm_control_type control; lm_data_type data; lm_initialize_control( &control );
parameters[0]=(double)myLife[myFitstart]; parameters[1]=4.0;
for (j=myFitstart; j>=myFitstop-1 ;j--)
{
y[laufvar]=(double) (myLife[j]-myOffset);
t[laufvar]=(double) ((myFitstart-j)*myResolution);
laufvar++;
}

data.user_func = my_fit_function1; data.user_t = t; data.user_y = y;
lm_minimize ( myAnzahlPunkte, AnzPar, parameters, lm_evaluate_default,
lm_print_default, &data, &control);

chi_square
(squarebin, myAnzahlPunkte, AnzPar, myY_fitbi, myWichtung, myChisquarebb);
CoefOfDetermination
(squarebin, myAnzahlPunkte, myY_fitbi, myCoefOfDeterminationbb);

myAmplitude_a=parameters[0]; myAmplitude_b=parameters[2];
myLifetime_a=parameters[1]; myLifetime_b=parameters[3];

double diffllfe=sqrt((parameters[3]-parameters[1])*(parameters[3]-parameters[1]));
if (myChisquarebi<myChisquaremono)&&(diffllfe<0.5){myFitmodel=2;}
else myFitmodel=1;
if(t) delete [] t; t=0; if(y) delete [] y; y=0;
if(parameters) delete [] parameters; parameters=0;
if(squarebin) delete [] squarebin; squarebin=0;
}

void Lifetime::Lifetimefibi ()
{
if(myFitcheck==true)
{
uint AnzPar=4, laufvar=0, jt=0, jf=0;
double *t=0, *y=0, *parameters=0, *squarebin=0;
t = new double[myAnzahlPunkte+10];
y = new double[myAnzahlPunkte+10];
squarebin = new double[myAnzahlPunkte+10];
parameters = new double[AnzPar+1];
myChisquarebi=0;

lm_control_type control; lm_data_type data; lm_initialize_control( &control );
parameters[0]=(double)myLife[myFitstart];
parameters[2]=(double)myLife[myFitstart];
parameters[1]=2.0; parameters[3]=6.0;
for (j=myFitstart; j>=myFitstop-1 ;j--)
{
y[laufvar]=(double) (myLife[j]-myOffset);
}
}
}

```

F Quellcode der FCS und FCCS Bestimmung

```

/* Libraries siehe main */
void AuswertungTraces
(Allgemein *AllgTr,const double* EinD1Tr,const double* EinD2Tr,
const double* EinD3Tr,Traces *a&Trace_D1,Traces *a&Trace_D2,Traces *a&Trace_D3)
{
  {
    Ushort d =AllgTr->getmyDetektorInfo();
    Uint a = (Uint)AllgTr->getmyCountsD1();
    Uint b = (Uint)AllgTr->getmyCountsD2();
    Uint c = (Uint)AllgTr->getmyCountsD3();
    Uint Binsize =AllgTr->getmyBinarraysize();
    Ushort LeeParM =AllgTr->getmyLeeParM(), LeeParK =AllgTr->getmyLeeParK();
    int error;
    if ((d==3)||(d==5)||(d==7))
    {
      Trace_D1=new Traces(Binsize);
      Trace_D1->Binning(a,EinD1Tr);
      Trace_D1->glaetten(LeeParM, LeeParK);
    } /*Ebenso für die anderen Detektoren */
  }
  /*Ausnahmen abfangen */
}

Traces::Traces (const Uint BinGroesse)
{
  myBinGroesse=BinGroesse;
  myThreshold=0;mymaxcount=0;mymincount=0;mycounts=0;error=0;setup();
}

Traces::~Traces () /*Dynamische Speichertöschungen*/
{
  void Traces::setup ()
  {
    Uint i;
    int Size =myBinGroesse;
    mySmoothed =new double[Size+10];
    myIdentity =new double[Size+10];
    myBinnedTrace =new Uint[Size+10];
    myBurstTrace =new Uint[Size+10];
    for (i=0; i<Size+9; i++)
    { myBinnedTrace[i]=0;mySmoothed[i]=0;myBurstTrace[i]=0;myIdentity[i]=9;}
  }
}

/*Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen */
void Traces::Binning(const Uint counts,const double *Daten)
{
  mycounts=counts;
  double tauf1=1e-6, bin=(tauf1*1000.0);
  Uint Size=myBinGroesse,a=0,b=0,f=0,mincount=1000000,maxcount=0;
  for (i=0; i<counts; i++)
  {
    b=(Uint)(Daten[i]/bin);
    if(b>myBinGroesse){printf("Binarrayueberschreitung");cin>>error;}
    myBinnedTrace[b]=myBinnedTrace[b]+1;
  }
  for (i=0; i<Size; i++)

```

```

    a=myBinnedTrace[i];
    if (a>maxcount){maxcount=a;}if (a<mincount){mincount=a;}
  }
  mymincount=mincount; mymaxcount=maxcount;
}

void Traces::Binning(const double *Daten)
{
  Uint a=0,b=0,f=0,mincount=1000000,maxcount=0;
  for (i=0; i<20000; i++)
  {
    myBinnedTrace[i]= (int)Daten[i];
    a=myBinnedTrace[i];
    if (a>maxcount){maxcount=a;}if (a<mincount){mincount=a;}
  }
  mymincount=mincount; mymaxcount=maxcount;
}

void Traces::glaetten(const Ushort m,const Ushort fconst)
{
  Uint summe=0,i,j=0,jj=0,Binarraysize=myBinGroesse;
  float mean=0,var=0,varianz=0,fak=(1.0/((2*m)+1));
  for (i=0; i<m; i++){mySmoothed[i]=(double)(myBinnedTrace[i]);}
  for (i= m; i<(Binarraysize-m); i++)
  {
    for (jj=(i-m); jj<(i+m); jj++){summe+=myBinnedTrace[jj];}
    mean=(fak)*(summe);
    for (jj=(i-m); jj<(i+m); jj++)
    {var+=(myBinnedTrace[jj]-mean)*(myBinnedTrace[jj]-mean);}
    varianz=(fak)*(var);
    mySmoothed[i]=mean+(myBinnedTrace[i]-mean)*(varianz/(varianz+fconst));
    mean=0;var=0;varianz=0;summe=0;
  }
  for (i=(Binarraysize-m); i<Binarraysize; i++)
  { mySmoothed[i]=(double)(myBinnedTrace[i]);}
}

```

G Quellcode der Burstfindung

```

/* Libraries siehe main */
void AuswertungBursts
(Allgemein *Allgbb,
const Ushort *TagD1bb,const Ushort *TagD2bb,const Ushort *TagD3bb,
Trace *Trace D1bb,Trace *Trace D2bb,Trace *Trace D3bb,
Burst **&BurstarrayD1,Burst **&BurstarrayD2,Burst **&BurstarrayD3,
BurstLife **&BurstLifearrayD1,BurstLife **&BurstLifearrayD2,
BurstLife **&BurstLifearrayD3,Uint ** BurstheightDist,
Uint ** BurstsizeDist, Uint Einsemmodus
){try
{int error;
Ushort d
=Allgbb->getmyDetektorInfo();
Uint Groesse1
=Allgbb->getmyBurstmingroesseD1();
Uint PuffercpD1
=Allgbb->getmyPuffercpD1();
Ushort start1
=Allgbb->getmyFistartD1();
bool check1
=Allgbb->getmyFitchekD1();
/*Analog für die anderen beiden Deckaren*/
Uint Hoehe
=Allgbb->getmyBurstminHoehe(),aa=0,ii=0;
Ushort stop
=Allgbb->getmyFitstop();
float Bedingung_a
=Allgbb->getmyLieberapp_ah();
float Bedingung_b
=Allgbb->getmyUeberlapp_1f();
check1=true; check2=true; check3=true;
float Res
=Allgbb->getmyAufloesungKarte();
Ushort Anzahl1=0, Anzahl2=0, Anzahl3=0;
if ((d==3)||(d==5)||(d==7))
{Ushort Threshold1=Trace_D1bb->getmyThreshold();
Threshold1=3;
findbursts (Hoehe,Groesse1,Trace_D1bb,Anzahl1,Threshold1,PuffercpD1);
if (Groesse1!=Allgbb->getmyBurstmingroesseD1())
{Allgbb->setmyBurstmingroesseD1(Groesse1);
if (Anzahl1>0)
{BurstarrayD1
=new Burst*(Anzahl1);
if(Einsemmodus!=7){BurstLifearrayD1=new BurstLife*(Anzahl1);
for (aa=0;aa<Anzahl1;aa++)
{BurstarrayD1[aa]
=new Burst;
if (Einsemmodus!=7){BurstLifearrayD1[aa]
=new BurstLife; }
savebursts (Hoehe,Groesse1,BurstarrayD1,Trace_D1bb,Anzahl1,Threshold1,
PuffercpD1,BurstheightDist,BurstsizeDist,1);
Allgbb->setmyBurstanzahl1(Anzahl1);
for (aa=0;aa<Anzahl1;aa++)
{if (Einsemmodus!=7)
{BurstLifearrayD1[aa]
->Setup(start1,stop,BurstarrayD1[aa],TagD1bb);
if (check1==true){BurstLifearrayD1[aa]
->Fit(BurstarrayD1[aa],Res);}}
}} } /*Analog für die anderen beiden Deckaren*/
if (((d==3)||(d==7))&&(Anzahl1>0)&&(Anzahl2>0))
{for (aa=0;aa<Anzahl1;aa++)
{for (ii=0;ii<Anzahl2;ii++)
{if (BurstKorr1(BurstarrayD1[aa],BurstarrayD2[ii],
Bedingung_a,Bedingung_b)==1){break;}}}}
} /* Analog für die anderen Deckerkombinationen */
} /* Ausnahmen Abfangen */
Burst::Burst () /* Variablen initialisierung */
Burst::~Burst()
/* Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen Burst */

```

```

void Burst::printLife(FILE* fpout,const
if (myLifetimebursts==0)
{printf(fpout,"%3f%%\n",myLifetimebursts,myKODbursts);}
else {printf(fpout,"n.app(%f)",);}

void Burst::printBurst(FILE* fpout, Uint ELM)const
{
printf(fpout,"%i%\n",myBurstnummer, myBurstgroesse);
printf(fpout,"%i%\n",myBurstdauer, myBurststart, myBurststop);
if (myLifetimebursts==0)
{printf(fpout,"%3f%%\n",myLifetimebursts,myKODbursts);}
else {printf(fpout,"n.app(%f)",);}
if(myKorr1!=1001) {printf(fpout,"%i%\n",myKorr1); }
else {printf(fpout,"n.a.%f",);}
else {printf(fpout,"%i%\n",myKorr2); }
else {printf(fpout,"n.a.%f",);}
printf(fpout,"%i%\n",myBurstmax);
printf(fpout,"%f%%\n",myBurstverh1,myBurstverh2,myBurstverh3);
if ((ELM==5)||(ELM==6)||(ELM==7))
{printf(fpout,"%i%\n",2*ELM);
printf(fpout,"%2E%V%\n",myCF1,myAvProbability1,myGewerteteBins1);
printf(fpout,"%2E%V%\n",myCF2,myAvProbability2,myGewerteteBins2); }
else {printf(fpout,"n",);}
}

void findbursts
(Uint Burstminhoehe,Uint &Burstmingroesse,const Trace *TraceFb,Ushort &Anzahl,
const Ushort Threshold,const Uint Puffercps)
{try{
Uint bb=0,ii=0,Burstmax=0,errormeldung=0,Bin=0,Burstdauer=0,Burstgroesse=0;
double Smooth=0, SmoothPrev=0;
Ushort aa=0;
Ushort Burstart=0, Burstop=0,cstop=0,cnts=0,Burstmaxmin=0;
Ushort Binarraysize=TraceFb->getmyBinGroesse();
Burstmaxmin=Burstminhoehe;
for (ii=0; ii<Binarraysize ;ii++)
{Bin=TraceFb->getmyBinnedTrace(ii);
Smooth=TraceFb->getmySmoothed(ii);
if (ii>0){SmoothPrev=TraceFb->getmySmoothed(ii-1);}
if (Smooth>Threshold && (ii==0 || SmoothPrev<=Threshold))
{Burstart=ii;cstart=cnts;
if (Smooth>Threshold)
{Burstgroesse=Bin;if (Bin>Burstmax){Burstmax=Bin;}}
if (ii>0 && // Burstende erst bei Index > 0
(Smooth>Threshold && Smooth>Threshold))
{Burststop=(ii-1); Burstdauer=(Burststop-Burstart);
cstop=cnts;
if (Burstgroesse>Burstmingroesse)&&(Burstmax>Burstmaxmin){aa++;
Burstart=0;Burststop=0;Burstgroesse=0;Burstmax=0;
Burstdauer=0;cstart=0;cstop=0; cnts+=Bin;
}
Anzahl=aa;
if (Anzahl>500)
{if (redoBursts(Burstmingroesse,Anzahl)!=0)
{findbursts
(Burstminhoehe,Burstmingroesse,TraceFb,Anzahl,Threshold,Puffercps); }
} /*Ausnahmen Abfangen*/
}
redoBursts (Uint &Groesse,const Uint Anzahl)
{int Auswahl=0;

```

```

printf("%i Bursts gefunden mit Burstmingroesse %i\n", Anzahl, Groesse);
printf("Weitermachen mit Eingabe 0\n");
printf("Oder neu berechnen mit Eingabe neue Burstmingroesse\n");
cin >> Auswahl; if (Auswahl == 0) { Groesse = Auswahl; } return (Auswahl);
}

void savebursts
(
    UInt Burstminhoehe,
    const UInt Burstmingroesse, Burst ** Burstarray, UInt Traces * TraceFb,
    const UInt Anzahl, const UInt Short Threshold, const UInt Puffercps,
    UInt ** BurstheightDist, UInt ** BurstsizeDist, UInt Det
)
{
    UInt bb = 0, ii = 0, mm = 0, ss = 0, Burstmax = 0, errormeldung = 0, Bin = 0, aa = 0;
    double Smooth = 0, SmoothPrev = 0;
    UInt Burststart = 0, Burststop = 0, cstart = 0, cstop = 0, cnts = 0, Burstmaxim = 0;
    UInt Binarysize = TraceFb -> getmyBinGroesse(0, Burstdauer = 0, Burstgroesse = 0;
    Burstmaxim = Burstminhoehe;
    for (ii = 0; ii < Binarysize; ii++)
    {
        Bin = TraceFb -> getmyBinnedTrace(ii);
        Smooth = TraceFb -> getmySmoothed(ii);
        if (ii > 0) { SmoothPrev = TraceFb -> getmySmoothed(ii - 1); }
        if (Smooth > Threshold && (ii == 0 || SmoothPrev <= Threshold))
        {
            Burststart = ii; cstart = cnts;
        }
        if (Smooth > Threshold)
        {
            Burstgroesse = Bin; if (Bin > Burstmax) { Burstmax = Bin; }
        }
        if (ii > 0 && // Burstende erst bei Index > 0
            ((ii == Binarysize - 1) && Smooth > Threshold) ||
            (Smooth <= Threshold && SmoothPrev > Threshold))
        {
            Burststop = (ii - 1); Burstdauer = (Burststop - Burststart); cstop = cnts;
            mm = int (Burstmax / 2.0) - 0.49999; ss = int (Burstgroesse / 10.0) - 0.49999;
            if (mm < 200) { BurstheightDist[Def][mm]++; } if (ss < 200) { BurstsizeDist[Def][ss]++; }
            if (Burstgroesse > Burstmingroesse && (Burstmax > Burstmaxim) && (aa < Anzahl))
            {
                double Offset = (double) (Puffercps * Burstdauer) / (30.0 * 1000);
                int Burstpuffercps = (int) (Puffercps * Burstdauer / 1000);
                Burstgroesse = Burstgroesse - Burstpuffercps;
                Burstarray[aa] -> setmyBurststart(Burststart); Burstarray[aa] -> setmyBurststop(Burststop);
                Burstarray[aa] -> setmyBurstdauer(Burstdauer);
                Burstarray[aa] -> setmyBurstgroesse(Burstgroesse);
                Burstarray[aa] -> setmyBurstmax(Burstmax);
                Burstarray[aa] -> setmyEventstart(cstart); Burstarray[aa] -> setmyEventstop(cstop);
                Burstarray[aa] -> setmyBurstnummer(aa); Burstarray[aa] -> setmyOffset(Offset);
            }
            for (bb = Burststart; bb < Burststop + 1; bb++)
            {
                TraceFb -> setmyBurstTrace((Burstmax + 5), bb);
            }
            aa++;
        }
        if (aa > 999) { printf("Maximale Burstanzahl überschritten\n");
            printf("Programm abbrechen mit (strg c)");
            printf(" und höhere Mindestgroesse nehmen"); cin >> errormeldung; }
    }
    Burststart = 0; Burststop = 0; Burstgroesse = 0; Burstmax = 0;
    Burstdauer = 0; cstart = 0; cstop = 0; cnts = Bin;
} // Ausnahmen Abfragen */

int BurstKorri
(
    Burst * &a, Burst * &b, const float Bedingung_a, const float Bedingung_b
)
{
    UInt start_a = a -> getmyBurststart(0), stop_b = b -> getmyBurststart(0);
    UInt stop_a = a -> getmyBurststop(0), stop_b = b -> getmyBurststop(0);
    UInt dauer_a = a -> getmyBurstdauer(0), dauer_b = b -> getmyBurstdauer(0);
    UInt c = a -> getmyBurstnummer(0), d = b -> getmyBurstnummer(0);
    double ueberlapp = 0;
    if ((start_a < start_b) && (stop_a > stop_b)) { return (0); }
}

```

```

if ((start_a < start_b) && (stop_a < stop_b)) { return (1); }
if ((start_a == start_b) || (stop_a == stop_b))
{ ueberlapp = (dauer_a) / (dauer_a + dauer_b * I.0); }
if ((ueberlapp > Bedingung_a) && (ueberlapp < (1 / Bedingung_a)))
{ a -> setmykorri(d); b -> setmykorri(c); return (1); }
else { if ((start_a < start_b) && (stop_a > stop_b))
{ ueberlapp = ((dauer_b) / (dauer_a * I.0)); }
if ((ueberlapp < (1 / Bedingung_a)) { a -> setmykorri(d); b -> setmykorri(c); return (1); }
if (start_a > start_b) && (stop_a < stop_b))
{ ueberlapp = dauer_a / (dauer_b * I.0); }
if (ueberlapp > Bedingung_a) { a -> setmykorri(d); b -> setmykorri(c); return (1); }
if (start_a < start_b) && (start_b < stop_a) && (stop_b > stop_a)
{ ueberlapp = (stop_a - start_b) / dauer_a; }
if ((ueberlapp > Bedingung_b) { a -> setmykorri(d); return (1); }
if (ueberlapp < (stop_a - start_b) / dauer_b;
ueberlapp > (stop_a - start_b) / dauer_b;
if ((ueberlapp > Bedingung_b) { b -> setmykorri(c); return (1); } }
if ((start_a > start_b) && (start_a < stop_b) && (stop_a > stop_b))
{ ueberlapp = (stop_b - start_a) / dauer_a; }
if ((ueberlapp > Bedingung_b) { a -> setmykorri(d); return (1); }
ueberlapp = (stop_b - start_a) / dauer_b;
if ((ueberlapp > Bedingung_b) { b -> setmykorri(c); return (1); } }
return (0);
} // Ausnahmen Abfragen */

```

H Quellcode der Burstcharakterisierung

```

/* Libraries siehe main */
Burstfile::Burstfile()
{
    myLifetime=0; myAmplitude=0; myOffset=0; myCoefOfDetermination=0;
    mystdwLifetime=0; mystdwAmplitude=0; myChisquare=0;
    myResolution=0; myBurstnummer=0; myFitstart=0; myFitstop=0;
    myAnzahlPunkte=0; myAnzahlFitpunkte=0; }

Burstfile::~Burstfile() /*Dynamische Speicherlösungen */
/*Zugriffsfunktionen der Burstfile Klassenvariablen */
void Burstfile::Setup
(const Ushort Fitstart,const Ushort Fitstop,Burst *&a,const Ushort* Daten)
{
    Uint i=0,k=0, start=0;
    Uint eventstart=a->getmyEventstart(); Eventstop=a->getmyEventstop();
    Uint counts=Eventstop-Eventstart+1;
    myFitstart=(Ushort)(Fitstart/10); myFitstop=(Ushort)(Fitstop/10)+1;
    myAnzahlPunkte =myFitstart-myFitstop+1;
    myLife =new Uint[1010], myLifeBinned =new Uint[110];
    myY_fit =new double[myAnzahlPunkte+10];
    myWichtung =new double[myAnzahlPunkte+10];
    myDaten =new Ushort[counts+10];
    for (i=0; i<myAnzahlPunkte+9; i++) {myY_fit[i]=0;myWichtung[i]=0;
    for (i=0; i<109; i++) {myLifeBinned[i]=0;
    for (i=0; i<1009; i++) {myLife[i]=0;
    for (i=0; i<counts+9;i++) {myDaten[i]=0;
    for ((i=Eventstart;i<Eventstop+1);i++) {myDaten[k]=Daten[i];k++;}
    Lifebinned[myDaten.myLife.start;counts];
    ZehnbIn (myLife.myLifeBinned);
    Uint Fitpunkte=0;
    i=0;
    for (int j=myFitstart; j>myFitstop-1 ;j--)
        {wicht[myLifeBinned[j]],myWichtung[j];j++;}
    }

void Burstfile::Fit(Burst *&a,float Res)
{
    Uint laufvar=0,AnzPar=2, Anzdat=0,wichtung=0,b=0,ij=0,if=0;
    double chisquare=0;
    float Lfstart=1.0;
    Anzdat=myAnzahlPunkte;
    myOffset=a->getmyOffset();
    myResolution=10*Res;
    double *parameters = new double[AnzPar+1];
    double *squarebin = new double[myAnzahlPunkte+10];
    double *t = new double[Anzdat+10]; double *xy = new double[Anzdat+10];

    In_control_type control; In_data_type data;
    In_initialize_control (&control);
    parameters[0]=(double)myLifeBinned[myFitstart];
    parameters[1]=(double)Lfstart;
    for (j=myFitstart; j>myFitstop-1 ;j--)
        {
            y[laufvar]=(double) (myLifeBinned[j]-myOffset);
            t[laufvar]=(double) ((myFitstart-j)*myResolution);

```

```

        laufvar++;
        if(laufvar>Anzdat){printf("fitarray burststlife ueberschreitung"),cin->error();
        }
        data.user_func = my_fit_function1;data.user_t = t;data.user_y = y;
    }
    In_minimize(Anzdat,AnzPar,parameters,In_evaluate_default,In_print_default,
    &data,&control);

    laufvar=0;
    a->setmyAmplitudebursts(parameters[0]);
    myAmplitude=parameters[0];
    a->setmyLifetimebursts(parameters[1]);
    myLifetime=parameters[1];
    b=0;
    for (i=0; i<Anzdat; i++)
        {myY_fit[i]=(data.user_func(data.user_t[i],parameters)+myOffset);
        squarebin[i]=(double)myLifeBinned[myFitstart+i]; }

    chi_square(squarebin,myAnzahlPunkte,AnzPar,myY_fit,myWichtung,myChisquare);
    CoefOfDetermination(squarebin,myAnzahlPunkte,myY_fit,myCoefOfDetermination);
    StdwFitparameter(squarebin,myAnzahlPunkte,myY_fit,myWichtung,
    myLifetime,myAmplitude,myResolution,mystdwLifetime,mystdwAmplitude);
    mystdwLifetime=sqrt(mystdwLifetime);
    mystdwAmplitude=sqrt(mystdwAmplitude);
    a->setmyKODbursts(myCoefOfDetermination);
    /*Dynamische Speicherlöschung*/ }

void AuswertungBurststafis
(Allgemein *Algbr, Burst **Burstarray,D1br,Burst **BurstarrayD2br,
Burst **BurstarrayD3br, const Traces *Trace_D1br, const Traces *Trace_D2br,
const Traces *Trace_D3br, Uint **&BinHistogrammeD1D2,
Uint **&BinHistogrammeD2D1,Uint **&BinHistogrammeD1D3,
Uint **&BinHistogrammeD3D2,Uint **&BinHistogrammeD1D3,
Uint **&BinHistogrammeD3D1, Uint Einlesemodus)
{
    try
    {
        Ushort Anzahl1 =Algbr->getmyBurstanzahlD1();
        Ushort Anzahl2 =Algbr->getmyBurstanzahlD2();
        Ushort Anzahl3 =Algbr->getmyBurstanzahlD3();
        Uint size =Algbr->getmyBinarraysize();
        Ushort d =Algbr->getmyDetektortInfo();
        float cross_ab =Algbr->getmyCrosstalk_ab0();
        float cross_ba =Algbr->getmyCrosstalk_ba0();
        float cross_ac =Algbr->getmyCrosstalk_ac0();
        float cross_ca =Algbr->getmyCrosstalk_ca0();
        float cross_bc =Algbr->getmyCrosstalk_bc0();
        float cross_cb =Algbr->getmyCrosstalk_cb0();
        int puff_a =Algbr->getmyPuffercpsD1();
        int puff_b =Algbr->getmyPuffercpsD2();
        int puff_c =Algbr->getmyPuffercpsD3();
        int size1=0,size2=0,size3=0,size4=0,size5=0,size6=0;
        double Burstpuffercps=0, basis=L, none=0;
        double verh_original_groesse_groesse2;
        Uint start_stop_dauer_taa;
        Uint AbsolutmaxD1=0,AbsolutmaxD2=0,AbsolutmaxD3=0,max=0;
        Uint Bin1=0,Bin2=0,Bin3=0;
        for (a=0; a<Anzahl1;a++){max=BurstarrayD1br[ja]->getmyBurstmax();
            if(max>AbsolutmaxD1){AbsolutmaxD1=max;}}
        Algbr->setmyAbsolutmaxD1(AbsolutmaxD1);
    }
}

```

```

/* Analog für die anderen beiden Detektoren */
if (Einlesemodus!=7)
{
if (Anzahl1>0){
if(AbsolutmaxD1>AbsolutmaxD2){size1=AbsolutmaxD1+1;}
else{size1=AbsolutmaxD2+1;}
if(AbsolutmaxD1>AbsolutmaxD3){size6=AbsolutmaxD1+1;}
else{size6=AbsolutmaxD3+1;}
BinHistogrammeD1D2=new Uint* [size1];
BinHistogrammeD1D3=new Uint* [size6];
for (int ii=0;ii<size1;ii++){BinHistogrammeD1D2[ii]=new Uint[size1];}
for (int ii=0;ii<size6;ii++){BinHistogrammeD1D3[ii]=new Uint[size6];}
for (int ii=0;ii<size1;ii++){for (int aa=0; aa<size1;aa++){
{BinHistogrammeD1D2[ii][aa]=0;}
{BinHistogrammeD1D3[ii][aa]=0;}
}
}
}
/* Analog für die anderen beiden Detektoren */
switch (d)
{
/* Analog für die Fälle 1-6 */
case 7:
{
if ((Anzahl1>0)||((Anzahl2>0)||((Anzahl3>0)))
{
for (a=0; a<Anzahl1;a++)
{
groesse=0; groesse2=0;
start =BurstarrayD1[br|a]->getmyBurststart();
stop =BurstarrayD1[br|a]->getmyBurststop();
dauer =(stop-start)+1;
original =BurstarrayD1[br|a]->getmyBurstgroesse();
for (i=start; i<stop+1; i++)
{
Bin3=Trace_D3hr->getmyBinnedTrace(0);
Bin2=Trace_D2hr->getmyBinnedTrace(0);
Bin1=Trace_D1hr->getmyBinnedTrace(0);
groesse=Bin2; groesse2=i-Bin3;
if((Bin2<=size1)&&(Einlesemodus!=7))
{BinHistogrammeD1D2[Bin1][Bin2]++;}
if((Bin3<=size6)&&(Einlesemodus!=7))
{BinHistogrammeD1D3[Bin1][Bin3]++;}
}
}
Burstpufferps=((dauer*puif_b)/1000);
groesse=groesse-Burstpufferps;
if(groesse<0){groesse=0;}
verb=(double)(groesse/original);
BurstarrayD1[br|a]->setmyBurstverb1(basis);
BurstarrayD1[br|a]->setmyBurstverb2(verb);
Burstpufferps=((dauer*puif_c)/1000);
groesse2=groesse2-Burstpufferps;
if(groesse2<0){groesse2=0;}
verb=(double)(groesse2/original);
BurstarrayD1[br|a]->setmyBurstverb3(verb);
}
}
}
/* Analog für die Bursts in Deektor 2 und 3 */
break;
default: { printf("Detektor error");cin>>a; }break;
}
}
}
/* Ausnahmen Abfragen */

```



```

NormWert1=sqrt((FilterWert-VergWert)*(FilterWert-VergWert));
if (FilterStabw1a==0)&&(BinWert<5)
{Res_Aa=(1.0/FilterStabw1a*2.50663)*
exp(-0.5)*((VergWert-FilterWert)/FilterStabw1a)*
(VergWert-FilterWert)/FilterStabw1a); Aa=1; }
else{Res_Aa=0;Aa=0;}
FilterWert=myFilter1]->getmyBincounts1(BinWert);
FilterStabw2a=myFilter1]->getmyBinstabw1(BinWert);
NormWert2a=sqrt((FilterWert-VergWert)*(FilterWert-VergWert));
if (FilterStabw2a==0)&&(BinWert<5)
{Res_Ab=(1.0/FilterStabw2a*2.50663)*exp(-0.5)*
((VergWert-FilterWert)/FilterStabw2a)*
(VergWert-FilterWert)/FilterStabw2a); Ab=1; }
else{Res_Ab=0;Ab=0;}
VergWert=TraceD3->getmyBinnedTrace(xx);
FilterWert=myFilter0]->getmyBincounts2(BinWert);
FilterStabw1b=myFilter0]->getmyBinstabw2(BinWert);
NormWert1b=sqrt((FilterWert-VergWert)*(FilterWert-VergWert));
if (FilterStabw1b==0)&&(BinWert<5)
{Res_Ba=(1.0/FilterStabw1b*2.50663)*
exp(-0.5)*((VergWert-FilterWert)/FilterStabw1b)*
(VergWert-FilterWert)/FilterStabw1b); Ba=1; }
else{Res_Ba=0;Ba=0;}
FilterWert=myFilter1]->getmyBincounts2(BinWert);
FilterStabw2b=myFilter1]->getmyBinstabw2(BinWert);
NormWert2b=sqrt((FilterWert-VergWert)*(FilterWert-VergWert));
if (FilterStabw2b==0)&&(BinWert<5)
{Res_Bb=(1.0/FilterStabw2b*2.50663)*exp(-0.5)*
((VergWert-FilterWert)/FilterStabw2b)*
(VergWert-FilterWert)/FilterStabw2b); Bb=1; }
else{Res_Bb=0;Bb=0;} }
}
if (Aa==1)&&(Ab==1)&&
((NormWert1a<FilterStabw1a)||((NormWert2a<FilterStabw2a)))
{ if (Res_Aa==0)&&(Res_Ab==0){Faktor1=1; }
if ((Res_Ab==0)&&(Res_Aa==0)){Faktor1=100; }
if ((Res_Ab!=0)&&(Res_Aa==0)){Faktor1=0.01; }
if ((Res_Ab!=0)&&(Res_Aa!=0)){Faktor1=Res_Aa/Res_Ab; }
if (Faktor1>100){Faktor1=100; }
if (Faktor1<0.01){Faktor1=0.01; }
GB1++;GB21++;
ProbSum11+=Res_Aa/(1.0/FilterStabw1a*2.50663);
ProbSum21+=Res_Ab/(1.0/FilterStabw2a*2.50663); }
else{Faktor1=1; }
if (Ba==1)&&(Bb==1)&&
((NormWert1b<FilterStabw1b)||((NormWert2b<FilterStabw2b)))
{ if (Res_Ba==0)&&(Res_Bb==0){Faktor2=1; }
if ((Res_Bb==0)&&(Res_Ba==0)){Faktor2=100; }
if ((Res_Bb!=0)&&(Res_Ba==0)){Faktor2=0.01; }
if ((Res_Bb!=0)&&(Res_Ba!=0)){Faktor2=Res_Ba/Res_Bb; }
if (Faktor2>100){Faktor2=100; }
if (Faktor2<0.01){Faktor2=0.01; } GB12++;GB22++;
ProbSum12+=Res_Ba/(1.0/FilterStabw1b*2.50663);
ProbSum22+=Res_Bb/(1.0/FilterStabw2b*2.50663); }
else{Faktor2=1; }
if (BF<1e10)&&(BF>1e-10)
{BF1=BF1*Faktor1;BF2=BF2*Faktor2; BF=BF*Faktor1*Faktor2; }
else {
if (BF>1e10)&&(BF>1e-10)
{BF1=BF1*Faktor1*Faktor2<1.0)
{BF1=BF1*Faktor1;BF2=BF2*Faktor2; BF=BF*Faktor1*Faktor2; }
else {
/*Analog für die anderen beiden Detektoren*/
}
}
}
if (BF<1e-10)&&((Faktor1*Faktor2)>1.0)
{BF1=BF1*Faktor1;BF2=BF2*Faktor2; BF=BF*Faktor1*Faktor2; }
}
Res_Ba=0;Res_Bb=0;
}
GB1=GB1+if(GB21>GB1){GB1=GB21; GB2=GB12;if(GB22>GB2){GB2=GB22; }
if (GB21==0){ProbSum11=ProbSum11/GB1; } else {ProbSum11=0; }
if (GB22==0){ProbSum12=ProbSum12/GB2; } else {ProbSum12=0; }
if (GB1==0){ProbSum21=ProbSum21/GB1; } else {ProbSum21=0; }
if (GB2==0){ProbSum22=ProbSum22/GB2; } else {ProbSum22=0; }
Anteil1=(GB1*100/GB);Anteil2=(GB2*100/GB);
if(Anteil1<Min.Anteil){ProbSum11=0;ProbSum21=0; }
if(Anteil2<Min.Anteil){ProbSum12=0;ProbSum22=0; }
}
else {BF=1;PGE=-1;PGD=-1; }
if ((R_1a==0)||((R_2a==0)||result_10==0;result_01==0; }
else {result_10=(1.0/(BF*R_1a*R_2a))*Faktor_Life_b;
result_01=BF*Faktor_Life_a*R_1a*R_2a; }
if ((result_01>0.0)&&(ProbSum11>ProbSum12/2.0)>(PGD)))
{a->setmyIdentity(1); }
a->setmyCertaintyFactor1(BF1);
a->setmyAvProbability1(ProbSum11);
a->setmyGewerteteBinst(Anteil1);
a->setmyCertaintyFactor2(BF2);
a->setmyAvProbability2(ProbSum12);
a->setmyGewerteteBinst2(Anteil2);
a->setmyOverallCertainty(result_01; ID=1; }
else {
if ((result_10>0.0)&&(ProbSum21>(PGE)
&&(ProbSum22>(PGE)&&(((ProbSum11+ProbSum12)/2.0)>(PGD)))
{a->setmyIdentity(2); }
a->setmyCertaintyFactor1(1.0/BF1);
a->setmyAvProbability1(ProbSum21);
a->setmyGewerteteBinst1(Anteil1);
a->setmyCertaintyFactor2(1.0/BF2);
a->setmyAvProbability2(ProbSum22);
a->setmyGewerteteBinst2(Anteil2);
a->setmyOverallCertainty(result_10; ID=2; }
else{
a->setmyIdentity(0);
if((BF1)>(1.0/BF1)){a->setmyCertaintyFactor1(BF1); }
else{a->setmyCertaintyFactor1(1.0/BF1); }
if(ProbSum11>ProbSum21){ a->setmyAvProbability1(ProbSum11);
a->setmyGewerteteBinst1(Anteil1);
else{ a->setmyAvProbability1(ProbSum21);
a->setmyGewerteteBinst1(GB21); }
if (BF2)>(1.0/BF2){a->setmyCertaintyFactor2(BF2); }
else{a->setmyCertaintyFactor2(1.0/BF2); }
if(ProbSum12>ProbSum22){ a->setmyAvProbability2(ProbSum12);
a->setmyGewerteteBinst2(Anteil2); }
else{a->setmyAvProbability2(ProbSum22);
a->setmyGewerteteBinst2(Anteil2); }
for (xx=start;xx<stop+1;xx++)
{c++;int Mitte=(int)(stop+start)/2; }
if (c==1){TraceD1->setmyIdentity(ID,xx); }
if ((ID==1)&&(c==2)){ TraceD1->setmyIdentity(ProbSum11,xx); }
if ((ID==1)&&(c==3)){ TraceD1->setmyIdentity(ProbSum12,xx); }
if ((ID==5)&&(c==2)){ TraceD1->setmyIdentity(ProbSum21,xx); }
if ((ID==5)&&(c==3)){ TraceD1->setmyIdentity(ProbSum22,xx); }
}
}
}
}

```

J Quellcode der Burstsimulation

```

* Libraries siehe main*/
void generateBursttypes
(
    double **&BTYPs, Uint Typea, Uint Typeb, Uint starka, Uint starkb)
{
    BTYP1=new double* [4];BTYP2=new double* [4];BTYP3=new double* [4];
    BTYP4=new double* [4];BTYP5=new double* [4];
    for (int ii=0;ii<4;ii++)
        (BTYP1[ii]=new double[100];BTYP2[ii]=new double[100];
         BTYP3[ii]=new double[100];BTYP4[ii]=new double[100];
         BTYP5[ii]=new double[100];)
    double fak1_12=0.047,fak1_13=0.041,fak2_12=0.22,fak2_13=0.12;
    double fak3_21=0.0025,fak3_23=0.63,fak4_31=0.002,fak4_32=0.24;
    double fak5_31=0.001,fak5_32=0.002,a=0,b=0;
    double MW1=50,w1=200,sigma1=15,MW2=50,w2=200,sigma2=15;
    double verhaeltnis=0;
    verhaeltnis=double(1.0*starka/starkb);
    sigma2=sigma1*verhaeltnis; w2=w1*verhaeltnis; MW2=MW1*verhaeltnis;
    for (int i=0;i<100;iii++)
    {
        a=w1*exp(-0.5)*((i-MW1)/sigma1)*((i-MW1)/sigma1));
        b=w2*exp(-0.5)*((i-MW2)/sigma2)*((i-MW2)/sigma2));
        if (Typea==1)
            {BTYP1[0][i]=a;BTYP1[1][i]=a;BTYP1[2][i]=a*fak1_12;BTYP1[3][i]=a*fak1_13;}
        if (Typeb==1)
            {BTYP1[0][i]=b;BTYP1[1][i]=b;BTYP1[2][i]=b*fak1_12;BTYP1[3][i]=b*fak1_13;}
        if (Typea==2)
            {BTYP2[0][i]=a;BTYP2[1][i]=a;BTYP2[2][i]=a*fak2_12;BTYP2[3][i]=a*fak2_13;}
        if (Typeb==2)
            {BTYP2[0][i]=b;BTYP2[1][i]=b;BTYP2[2][i]=b*fak2_12;BTYP2[3][i]=b*fak2_13;}
        if (Typea==3)
            {BTYP3[0][i]=a;BTYP3[1][i]=a*fak3_21;BTYP3[3][i]=a*fak3_23;}
        if (Typeb==3)
            {BTYP3[0][i]=b;BTYP3[1][i]=b*fak3_21;BTYP3[3][i]=b*fak3_23;}
        if (Typea==4)
            {BTYP4[0][i]=a;BTYP4[1][i]=a*fak4_31;BTYP4[2][i]=a*fak4_32;}
        if (Typeb==4)
            {BTYP4[0][i]=b;BTYP4[1][i]=b*fak4_31;BTYP4[2][i]=b*fak4_32;}
        if (Typea==5)
            {BTYP5[0][i]=a;BTYP5[1][i]=a*fak5_31;BTYP5[2][i]=a*fak5_32;}
        if (Typeb==5)
            {BTYP5[0][i]=b;BTYP5[1][i]=b*fak5_31;BTYP5[2][i]=b*fak5_32;}
    }
}
void generateTraces (double **BTYP1,double **BTYP2,double **BTYP3,
                    double **BTYP4,double **BTYP5,Uint Typea,Uint Typeb,
                    Uint Trace1,Uint Trace2,Uint Trace3,
                    Uint Trace4,Uint Trace5,
                    Uint Trace6,Uint Trace7,
                    Uint Trace8,Uint Trace9,
                    Uint Trace10,
                    Uint Trace11,
                    Uint Trace12,
                    Uint Trace13,
                    Uint Trace14,
                    Uint Trace15,
                    Uint Trace16,
                    Uint Trace17,
                    Uint Trace18,
                    Uint Trace19,
                    Uint Trace20,
                    Uint Trace21,
                    Uint Trace22,
                    Uint Trace23,
                    Uint Trace24,
                    Uint Trace25,
                    Uint Trace26,
                    Uint Trace27,
                    Uint Trace28,
                    Uint Trace29,
                    Uint Trace30,
                    Uint Trace31,
                    Uint Trace32,
                    Uint Trace33,
                    Uint Trace34,
                    Uint Trace35,
                    Uint Trace36,
                    Uint Trace37,
                    Uint Trace38,
                    Uint Trace39,
                    Uint Trace40,
                    Uint Trace41,
                    Uint Trace42,
                    Uint Trace43,
                    Uint Trace44,
                    Uint Trace45,
                    Uint Trace46,
                    Uint Trace47,
                    Uint Trace48,
                    Uint Trace49,
                    Uint Trace50,
                    Uint Trace51,
                    Uint Trace52,
                    Uint Trace53,
                    Uint Trace54,
                    Uint Trace55,
                    Uint Trace56,
                    Uint Trace57,
                    Uint Trace58,
                    Uint Trace59,
                    Uint Trace60,
                    Uint Trace61,
                    Uint Trace62,
                    Uint Trace63,
                    Uint Trace64,
                    Uint Trace65,
                    Uint Trace66,
                    Uint Trace67,
                    Uint Trace68,
                    Uint Trace69,
                    Uint Trace70,
                    Uint Trace71,
                    Uint Trace72,
                    Uint Trace73,
                    Uint Trace74,
                    Uint Trace75,
                    Uint Trace76,
                    Uint Trace77,
                    Uint Trace78,
                    Uint Trace79,
                    Uint Trace80,
                    Uint Trace81,
                    Uint Trace82,
                    Uint Trace83,
                    Uint Trace84,
                    Uint Trace85,
                    Uint Trace86,
                    Uint Trace87,
                    Uint Trace88,
                    Uint Trace89,
                    Uint Trace90,
                    Uint Trace91,
                    Uint Trace92,
                    Uint Trace93,
                    Uint Trace94,
                    Uint Trace95,
                    Uint Trace96,
                    Uint Trace97,
                    Uint Trace98,
                    Uint Trace99,
                    Uint Trace100)
{
    double sum1=0,sum2=0,sum3=0,sum4=0,sum5=0,sum6=0,sum7=0,sum8=0,sum9=0,sum10=0,sum11=0,sum12=0,sum13=0,sum14=0,sum15=0,sum16=0,sum17=0,sum18=0,sum19=0,sum20=0,sum21=0,sum22=0,sum23=0;
    double **sumarray;
    sumarray=new double* [4];
    for (int ii=0;ii<4;ii++){sumarray[ii]=new double[20000];}
    int c=0,d=0;
    for (int i=0;i<100;iii++)
    {
        for (int b=0;b<200;b++)
        {
            sum1+=BTYP1[0][i];sum2+=BTYP1[1][i];sum3+=BTYP1[2][i];sum4+=BTYP1[3][i];
            sum5+=BTYP2[0][i];sum6+=BTYP2[1][i];sum7+=BTYP2[2][i];sum8+=BTYP2[3][i];
            sum9+=BTYP3[0][i];sum10+=BTYP3[1][i];sum11+=BTYP3[2][i];sum12+=BTYP3[3][i];
            sum13+=BTYP4[0][i];sum14+=BTYP4[1][i];sum15+=BTYP4[2][i];sum16+=BTYP4[3][i];
            sum17+=BTYP5[0][i];sum18+=BTYP5[1][i];sum19+=BTYP5[2][i];sum20+=BTYP5[3][i];
            sum21+=BTYP1[0][i];sum22+=BTYP1[1][i];sum23+=BTYP1[2][i];sum24+=BTYP1[3][i];
            sum25+=BTYP2[0][i];sum26+=BTYP2[1][i];sum27+=BTYP2[2][i];sum28+=BTYP2[3][i];
            sum29+=BTYP3[0][i];sum30+=BTYP3[1][i];sum31+=BTYP3[2][i];sum32+=BTYP3[3][i];
            sum33+=BTYP4[0][i];sum34+=BTYP4[1][i];sum35+=BTYP4[2][i];sum36+=BTYP4[3][i];
            sum37+=BTYP5[0][i];sum38+=BTYP5[1][i];sum39+=BTYP5[2][i];sum40+=BTYP5[3][i];
            sum41+=BTYP1[0][i];sum42+=BTYP1[1][i];sum43+=BTYP1[2][i];sum44+=BTYP1[3][i];
            sum45+=BTYP2[0][i];sum46+=BTYP2[1][i];sum47+=BTYP2[2][i];sum48+=BTYP2[3][i];
            sum49+=BTYP3[0][i];sum50+=BTYP3[1][i];sum51+=BTYP3[2][i];sum52+=BTYP3[3][i];
            sum53+=BTYP4[0][i];sum54+=BTYP4[1][i];sum55+=BTYP4[2][i];sum56+=BTYP4[3][i];
            sum57+=BTYP5[0][i];sum58+=BTYP5[1][i];sum59+=BTYP5[2][i];sum60+=BTYP5[3][i];
            sum61+=BTYP1[0][i];sum62+=BTYP1[1][i];sum63+=BTYP1[2][i];sum64+=BTYP1[3][i];
            sum65+=BTYP2[0][i];sum66+=BTYP2[1][i];sum67+=BTYP2[2][i];sum68+=BTYP2[3][i];
            sum69+=BTYP3[0][i];sum70+=BTYP3[1][i];sum71+=BTYP3[2][i];sum72+=BTYP3[3][i];
            sum73+=BTYP4[0][i];sum74+=BTYP4[1][i];sum75+=BTYP4[2][i];sum76+=BTYP4[3][i];
            sum77+=BTYP5[0][i];sum78+=BTYP5[1][i];sum79+=BTYP5[2][i];sum80+=BTYP5[3][i];
            sum81+=BTYP1[0][i];sum82+=BTYP1[1][i];sum83+=BTYP1[2][i];sum84+=BTYP1[3][i];
            sum85+=BTYP2[0][i];sum86+=BTYP2[1][i];sum87+=BTYP2[2][i];sum88+=BTYP2[3][i];
            sum89+=BTYP3[0][i];sum90+=BTYP3[1][i];sum91+=BTYP3[2][i];sum92+=BTYP3[3][i];
            sum93+=BTYP4[0][i];sum94+=BTYP4[1][i];sum95+=BTYP4[2][i];sum96+=BTYP4[3][i];
            sum97+=BTYP5[0][i];sum98+=BTYP5[1][i];sum99+=BTYP5[2][i];sum100+=BTYP5[3][i];
            sumarray[0][i]=sum1;sumarray[1][i]=sum2;sumarray[2][i]=sum3;sumarray[3][i]=sum4;
            delete sumarray;sumarray=0;
        }
    }
}

```

```

else {
    d=b-100;
    if (Typea==1) {sum1=BTYP1[0][i];sum2=BTYP1[1][i];sum3=BTYP1[2][i];sum4=BTYP1[3][i];}
    if (Typea==2) {sum1=BTYP2[0][i];sum2=BTYP2[1][i];sum3=BTYP2[2][i];sum4=BTYP2[3][i];}
    if (Typea==3) {sum1=BTYP3[0][i];sum2=BTYP3[1][i];sum3=BTYP3[2][i];sum4=BTYP3[3][i];}
    if (Typea==4) {sum1=BTYP4[0][i];sum2=BTYP4[1][i];sum3=BTYP4[2][i];sum4=BTYP4[3][i];}
    if (Typea==5) {sum1=BTYP5[0][i];sum2=BTYP5[1][i];sum3=BTYP5[2][i];sum4=BTYP5[3][i];}
}
if ((b<=99)||((b-i)>99)){sum21=0,sum22=0,sum23=0;}
else {
    d=b-i;
    if (Typeb==1) {sum21=BTYP1[0][i];sum22=BTYP1[1][i];sum23=BTYP1[2][i];sum24=BTYP1[3][i];}
    if (Typeb==2) {sum21=BTYP2[0][i];sum22=BTYP2[1][i];sum23=BTYP2[2][i];sum24=BTYP2[3][i];}
    if (Typeb==3) {sum21=BTYP3[0][i];sum22=BTYP3[1][i];sum23=BTYP3[2][i];sum24=BTYP3[3][i];}
    if (Typeb==4) {sum21=BTYP4[0][i];sum22=BTYP4[1][i];sum23=BTYP4[2][i];sum24=BTYP4[3][i];}
    if (Typeb==5) {sum21=BTYP5[0][i];sum22=BTYP5[1][i];sum23=BTYP5[2][i];sum24=BTYP5[3][i];}
}
sumarray[1][i]=sum1+sum21; sumarray[2][i]=sum12+sum22;
sumarray[3][i]=sum13+sum23;
}
Trace_D1=new Traces(20000);
Trace_D1->Binning(sumarray[1]); Trace_D1->ghaetten(7,60);
/* Analog für die anderen beiden Detektoren*/
for (int d=0;d<4;d++){delete [] sumarray[d]; sumarray[d]=0;}
delete sumarray;sumarray=0;
}
}

```

K Quellcode der Burststhistogramme

```

/* Libraries see main */
void AuswertungHistogramme
(Allgemein *AlgHi, Lifehistogramme * &LifhistogrammeD1,
Lifehistogramme * &HistogrammeD2, Lifehistogramme * &HistogrammeD3,
Burstliste * &BurstlisteD1, Burstliste * &BurstlisteD2,
Burstliste * &BurstlisteD3, Burstliste * &Burstlifoisted1,
Burstliste * &Burstlifoisted2, Burstliste * &Burstlifoisted3,
Burst **BurstarrayD1H, Burst **BurstarrayD2H, Burst **BurstarrayD3H,
Burstlife **BurstLifearrayD1H, Burstlife **BurstLifearrayD2H,
Burstlife **BurstLifearrayD3H, UInt Einlesemodus
)
{
    bool check1 = AlgHi->getmyFicheckD1();
    int Anzahl1 = AlgHi->getmyBurstanzahlD1();
    Ushort channelmin1 = AlgHi->getmyChannelminD1();
    float Bedingung_a = AlgHi->getmyCountCorrverb_a();
    float Bedingung_b = AlgHi->getmyCountCorrverb_b();
    float Bedingung_c = AlgHi->getmyCountCorrverb_c();
    float Res = AlgHi->getmyAufloesungKarte();
    if (Anzahl1 > 0)
    {
        {BurstlisteD1 = new Burstliste(BurstarrayD1H, Anzahl1);
        if (Einlesemodus != 7)
        {
            Burstlifoisted1 = new Burstliste
            (BurstLifearrayD1H, Anzahl1, channelmin1, Res);
            HistogrammeD1 = new Lifehistogramme
            (BurstlisteD1->getmyminlifetime(), BurstlisteD1->getmymaxlifetime(),
            Bedingung_a, Bedingung_b, Bedingung_c, AlgHi);
        }
        BurstlisteD1->setmyBurstmingroesse(AlgHi->getmyBurstmingroesseD1());
        if (Einlesemodus != 7) && (check1 == true)
        {
            {BurstlisteD1->Lifetmehistogramme(HistogrammeD1);
            if (Einlesemodus != 7) (BurstlisteD1 ->Ratohistogramme(HistogrammeD1)); }
        }
    }
    /* Analog die anderen zwei Detektoren */
}

Burstliste: Burstliste
(Burstlife **a, const Ushort Anz, const Ushort channelmin, const float Res)
{
    Name=a; myAnzahlBursts =Anz; myChannelmin =channelmin; myResolution =Res;
}

Burstliste: ~Burstliste() {}
Ushort Burstliste: getmyAnzahlBursts ()const {return myAnzahlBursts;}
Ushort Burstliste: getmyChannelmin ()const {return myChannelmin;}

Burstliste: Burstliste (Burst **a, Ushort Anz)
{
    Name=a; myBurstmingroesse =a; my Threshold =0; myAnzahlBursts =Anz;
    mykorranz1 =0; mykorranz2 =0; mykorraanz =0; mygueteanz =0;
    mymaxlifetime =0; myminlifetime =10000; mystdwlifetime =0; myavlifetime =0;
    mymaxdauer =0; mymindauer =100000; mystdwdauer =0; myavdauer =0;
    mymaxgroesse =0; mymingroesse =100000; mystdvgroesse =0; myavgroesse =0;
    mymaxhoehe =0; myminhoehe =100000; mystdvhoehe =0; myavhoehe =0;
    for (int i=0; i<10; i++) {myIdentity[i]=0;}
}
standardabweichungen();
}

Burstliste: ~Burstliste() {}
/* Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen Burstliste */
Lifehistogramme: Lifehistogramme
(const double Lifeminimum, const double Lifemaximum,
float Bed_a, float Bed_b, float Bed_c, Allgemein *AlgHis)
{
    myLifeminimum =Lifeminimum; myLifemaximum =Lifemaximum;
    myAnzahl =0; myLifeBreite =0.1;
    myCountCorrBed_a =Bed_a; myCountCorrBed_b =Bed_b;
    myCountCorrBed_c =Bed_c; setup(AlgHis);
}

Lifehistogramme: ~Lifehistogramme ()/* dynamische Speicherfreesung */
void Lifehistogramme: setup(Allgemein *AlgHis)
{
    try {
        myAnzahl=100; myAnzahlVerb=0;
        mySchrittgroesse=AlgHis->getmySchrittgroesse();
        myMaxCountVerb=AlgHis->getmyMaxCountVerb ();
        myAnzahlVerb = (int) (myMaxCountVerb/mySchrittgroesse);

        myAlle=new UInt(myAnzahl+10);
        mykorrelliert1=new UInt(myAnzahl+10);
        mykorrelliert2=new UInt(myAnzahl+10);
        myunkorrelliert=new UInt(myAnzahl+10);
        myguete=new UInt(myAnzahl+10);
        myCountKorrelliert_a=new UInt(myAnzahl+10);
        myCountKorrelliert_b=new UInt(myAnzahl+10);
        myCountKorrelliert_c=new UInt(myAnzahl+10);
        myverbh_a =new UInt(myAnzahlVerb+10); myverbh_b =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_c =new UInt(myAnzahlVerb+10); myverbh_ab =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_ab =new UInt(myAnzahlVerb+10); myverbh_ac =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_ab =new UInt(myAnzahlVerb+10); myverbh_cb =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_ca =new UInt(myAnzahlVerb+10); myverbh_ab_c =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_cb_a =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_c_ab =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myverbh_a_b =new UInt(myAnzahlVerb+10);
        myGrossenachse =new UInt(myAnzahl+10);
        mygroesse_a =new UInt(myAnzahl+10); mygroesse_b =new UInt(myAnzahl+10);
        mygroesse_c =new UInt(myAnzahl+10); UInt ii=0;
        for (ii=0; ii<myAnzahl+9; ii++) { /* Variablen initialisierung */
            for (i=0; i<myAnzahlVerb+9; i++) { /* Variablen initialisierung */ }
        }
    }
    /* Ausnahmen abfangen */
}

/* Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen Lifehistogramme */
void Burstliste: standardabweichungen()
{
    if (myAnzahlBursts >= 0)
    {
        UInt *groessen =0, *dauer =0, *hoehe =0;
        double *Lifetime =0;
        groessen = new UInt(myAnzahlBursts+10); dauer = new UInt(myAnzahlBursts+10);
        hoehe = new UInt(myAnzahlBursts+10); Lifetime = new double(myAnzahlBursts+10);
        for (UInt i=0; i<myAnzahlBursts; i++)
        {
            {groesse[i] =Name[i]->getmyBurstgroesse(); dauer[i] =Name[i]->getmyBurstdauer();
            Lifetime[i] =Name[i]->getmyLifetimeBursts(); hoehe[i] =Name[i]->getmyBurstmax();
            Stdwin
            (groessen, myAnzahlBursts, myavgroesse, mystdvgroesse, mymaxgroesse, mymingroesse);
            Stdwin(dauer, myAnzahlBursts, myavdauer, mystdwdauer, mymaxdauer, mymindauer);
            standardabweichungen();
        }
    }
}

```

```

void Burstliste::Lifetimehistogramme(Lifetimehistogramme *set_a)
{
    float f=myminlifetime;
    Uint i=0;
    for (if=0; i<myAnzahlBursts; i++)
    {
        float a =Name[i]->getmyLifetimebursts0;
        float b =Name[i]->getmyKODbursts0;
        double verh_a =Name[i]->getmyBurstverh10;
        double verh_b =Name[i]->getmyBurstverh20;
        double verh_c =Name[i]->getmyBurstverh30;
        Ushort d =Name[i]->getmykorrl0;
        Uint grosse =Name[i]->getmyBurstgrosse0;
        float Grenze_a=set_a->getmyCountCorrBed_a0;
        float Grenze_b=set_a->getmyCountCorrBed_b0;
        float Grenze_c=set_a->getmyCountCorrBed_c0;
        Uint e=(int)(a)*10.0;
        set_a->incmyAlle(e,grosse);
        if(c<1001){set_a->incmykorrelliert(c,grosse); mykorranz1++;}
        if(d<1001){set_a->incmykorrelliert2(c,grosse); mykorranz2++;}
        if((e==1001)&&(f==1001)){set_a->incmyunkorrelliert(e,grosse);
            if (b>2.0){set_a->incmyguete(e,grosse); mygueteanz++;}
        }
        */
        if (e<99)
        {
            set_a->incmyAlle(e);
            if(c<1001) {set_a->incmykorrelliert1(e);mykorranz1++;}
            if(d<1001) {set_a->incmykorrelliert2(e);mykorranz2++;}
            if(f<1001) {set_a->incmyCountKorrelliert_a(e);}
            if(verh_a>Grenze_a) {set_a->incmyCountKorrelliert_b(e);}
            if(verh_b>Grenze_b) {set_a->incmyCountKorrelliert_c(e);}
            if((e==1001)&&(f==1001)) {set_a->incmyunkorrelliert(e);}
            if (b>0.5) {set_a->incmyguete(e); mygueteanz++;}
        }
    }
}

void Burstliste::Ratiohistogramme(Lifetimehistogramme *set_a)
{
    Uint i=0;
    double grosse=0,dauer=0,grosse_a=0,grosse_b=0,grosse_c=0;
    double verh_a=0,verh_b=0,verh_c=0;
    double Schrittgrosse=set_a->getmySchrittgrosse0;
    Uint Arraygrosse=set_a->getmyAnzahlVerh0;
    for (if=0; i<myAnzahlBursts; i++)
    {
        grosse=0,grosse_a=0,grosse_b=0,grosse_c=0;
        verh_a=Name[i]->getmyBurstverh10;
        verh_b=Name[i]->getmyBurstverh20;
        verh_c=Name[i]->getmyBurstverh30;
        grosse=Name[i]->getmyBurstgrosse0;
        grosse_a=(double) (grosse*verh_a);
        grosse_b=(double) (grosse*verh_b);
        grosse_c=(double) (grosse*verh_c);
        Uint VH_a=(int)((verh_a)/Schrittgrosse);
        Uint VH_b=(int)((verh_b)/Schrittgrosse);
        Uint VH_c=(int)((verh_c)/Schrittgrosse);
        Uint VH_ba=(int)((grosse_b)/(grosse_a)/Schrittgrosse);
    }
}

Stdwin(t(hoehe,myAnzahlBursts,myAvhoehe,mystdwhoehe,mymaxhoehe,myminhoehe);
Stdwdouble(Lifetime,myAnzahlBursts,myAvlifetime,mystdwlifetime
            ,mymaxlifetime,myminlifetime);
/*Dynamische Speicherfreeschaltungen*/
}

Uint Burstliste::Lifetimehistogramme(Lifetimehistogramme *set_a)
{
    Uint VH_ba=(int)((grosse_b)/(grosse_a)/Schrittgrosse);
    Uint VH_a=(int)((grosse_a)/(grosse_c)/Schrittgrosse);
    Uint VH_ab=(int)((grosse_a)/(grosse_b)/Schrittgrosse);
    Uint VH_cb=(int)((grosse_c)/(grosse_b)/Schrittgrosse);
    Uint VH_ca=(int)((grosse_c)/(grosse_a)/Schrittgrosse);
    Uint VH_bc_a=(int)((grosse_c)/(grosse_a)/(grosse_b)/Schrittgrosse);
    Uint VH_c_a_b=(int)((grosse_c)/(grosse_a)/(grosse_b)/Schrittgrosse);
    if (VH_ba>Arraygrosse-1){VH_ba=Arraygrosse-1;}
    if (VH_a>Arraygrosse-1){VH_a=Arraygrosse-1;}
    if (VH_ab>Arraygrosse-1){VH_ab=Arraygrosse-1;}
    if (VH_cb>Arraygrosse-1){VH_cb=Arraygrosse-1;}
    set_a->incmyverh_a(VH_a); set_a->incmyverh_b(VH_b);
    set_a->incmyverh_c(VH_c);
    if ((VH_ba<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_ba(VH_ba);}
    if ((VH_ab<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_ab(VH_ab);}
    if ((VH_cb<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_cb(VH_cb);}
    if ((VH_ca<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_ca(VH_ca);}
    if ((VH_bc_a<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_bc_a(VH_bc_a);}
    if ((VH_c_a_b<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_c_ab(VH_c_ab);}
    if ((VH_a_ba<Arraygrosse-1)){set_a->incmyverh_a_ba(VH_a_ba);}
}

Uint position=0;
for (if=0; i<myAnzahlBursts; i++)
{
    verh_a=Name[i]->getmyBurstverh10;
    verh_b=Name[i]->getmyBurstverh20;
    verh_c=Name[i]->getmyBurstverh30;
    grosse=Name[i]->getmyBurstgrosse0;
    grosse_a=(double) (grosse*verh_a);
    grosse_b=(double) (grosse*verh_b);
    grosse_c=(double) (grosse*verh_c);
    for (int aa=0;aa<99;aa++)
    {
        int Achse1=set_a->getmyX_Achse(aa);
        int Achse2=set_a->getmyX_Achse(aa+1);
        if (grosse_a<set_a->getmyX_Achse(0)) {set_a->incmygrosse_a(0);break;}
        if (grosse_a>set_a->getmyX_Achse(99)) {set_a->incmygrosse_a(99);break;}
        if ((grosse_a>=Achse1)&&(grosse_a<Achse2))
        {
            set_a->incmygrosse_a(aa);break;
        }
    }
    for (int aa=0;aa<99;aa++)
    {
        int Achse1=set_a->getmyX_Achse(aa);
        int Achse2=set_a->getmyX_Achse(aa+1);
        if (grosse_b<set_a->getmyX_Achse(0)) {set_a->incmygrosse_b(0);break;}
        if (grosse_b>set_a->getmyX_Achse(99))
        {set_a->incmygrosse_b(99);break;}
        if ((grosse_b>=Achse1)&&(grosse_b<Achse2))
        {
            set_a->incmygrosse_b(aa);break;
        }
    }
    for (int aa=0;aa<99;aa++)
    {
        int Achse1=set_a->getmyX_Achse(aa);
        int Achse2=set_a->getmyX_Achse(aa+1);
        if (grosse_c<set_a->getmyX_Achse(0))
        {set_a->incmygrosse_c(0);break;}
    }
}

```

```

    {set_a->incmygrosse_c(0);break;}
    if (grosse_c>set_a->getmyX_Achse(99))
    {set_a->incmygrosse_c(99);break;}
    if ((grosse_c==Achse1)&&(grosse_c<Achse2))
    {set_a->incmygrosse_c(aa);break;}
}

void Bursfiste::Identifyhis togramme()
{for (int ii=0; ii<myAnzahlBursts; ii++)myIdentify[Name][ii]->getmyIdentify(0)++;}

void Lifehistogramme::setmyLifemaximum
(float Lifemaximum){myLifemaximum=Lifemaximum;}

void Lifehistogramme::inemyAlle
( Uint b, Uint grosse){myAlle[b]=grosse;}
void Lifehistogramme::inemykorrelliert
( Uint b, Uint grosse){mykorrelliert[b]=grosse;}
void Lifehistogramme::inemykorrelliert2
( Uint b, Uint grosse){mykorrelliert2[b]=grosse;}
void Lifehistogramme::inemyunkorrelliert
( Uint b, Uint grosse){myunkorrelliert[b]=grosse;}
void Lifehistogramme::inemyguate
( Uint b, Uint grosse){myguate[b]=grosse;}

void Lifehistogramme::inemyAlle
( Uint b){myAlle[b]++;}
void Lifehistogramme::inemykorrelliert
( Uint b){mykorrelliert[b]++;}
void Lifehistogramme::inemykorrelliert2
( Uint b){mykorrelliert2[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyunkorrelliert
( Uint b){myunkorrelliert[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyCountKorrelliert_a
( Uint b){myCountKorrelliert_a[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyCountKorrelliert_b
( Uint b){myCountKorrelliert_b[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyCountKorrelliert_c
( Uint b){myCountKorrelliert_c[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyguate
( Uint b){myguate[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_a
( Uint b){myverh_a[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_b
( Uint b){myverh_b[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_c
( Uint b){myverh_c[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_ba
( Uint b){myverh_ba[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_bc
( Uint b){myverh_bc[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_ac
( Uint b){myverh_ac[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_ab
( Uint b){myverh_ab[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_cb
( Uint b){myverh_cb[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_ca
( Uint b){myverh_ca[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_ab_c
( Uint b){myverh_ab_c[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_bc_a
( Uint b){myverh_bc_a[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_c_ab
( Uint b){myverh_c_ab[b]++;}
void Lifehistogramme::inemyverh_a_be
( Uint b){myverh_a_be[b]++;}
void Lifehistogramme::inemygrosse_a
( Uint b){mygrosse_a[b]++;}
void Lifehistogramme::inemygrosse_b
( Uint b){mygrosse_b[b]++;}
void Lifehistogramme::inemygrosse_c
( Uint b){mygrosse_c[b]++;}

void MergeHistogramme
(Lifehistogramme *&H_D1_ZF, Lifehistogramme *&H_D2_ZF,
Lifehistogramme *&H_D3_ZF,
Allgemein *Alg, Lifehistogramme *H_D1, Lifehistogramme *H_D2,
Lifehistogramme *H_D3, Uint **&BH_D1D2_ZF, Uint **&BH_D2D1_ZF,
 Uint **&BH_D1D3_ZF, Uint **&BH_D3D1_ZF, Uint **&BH_D2D3_ZF,
 Uint **&BH_D3D2_ZF, Uint **&BH_D1D2, Uint **&BH_D2D1, Uint **&BH_D1D3,
 Uint **&BH_D3D1, Uint **&BH_D2D3, Uint **&BH_D3D2)
{
    Uint max1=Alg->getmyAbsolutmaxD1();
    Uint max2=Alg->getmyAbsolutmaxD2();
    Uint max3=Alg->getmyAbsolutmaxD3();
    if (H_D1){H_D1_ZF->mergeHistogramme(H_D1);delete H_D1;H_D1=0;}
}

```

```

    if (H_D2){H_D2_ZF->mergeHistogramme(H_D2);delete H_D2;H_D2=0;}
    if (H_D3){H_D3_ZF->mergeHistogramme(H_D3);delete H_D3;H_D3=0;}
    if (BH_D1D2)
    {mergeBinHis togramme(BH_D1D2_ZF, max1, max2);delete BH_D2D1;BH_D2D1=0;}
    if (BH_D2D1)
    {mergeBinHis togramme(BH_D2D1_ZF, max2, max1);delete BH_D2D1;BH_D2D1=0;}
    if (BH_D2D3)
    {mergeBinHis togramme(BH_D2D3_ZF, max3, max2);delete BH_D2D3;BH_D2D3=0;}
    if (BH_D3D2)
    {mergeBinHis togramme(BH_D3D2_ZF, max2, max3);delete BH_D3D2;BH_D3D2=0;}
    if (BH_D1D3)
    {mergeBinHis togramme(BH_D1D3_ZF, max1, max3);delete BH_D1D3;BH_D1D3=0;}
    if (BH_D3D1)
    {mergeBinHis togramme(BH_D3D1_ZF, max3, max1);delete BH_D3D1;BH_D3D1=0;}
}

void Lifehistogramme::mergeHistogramme(const Lifehistogramme *Dateihist)
{
    Uint ii=0;
    int temp_a[100],temp_b[100],temp_c[100];
    for (ii=0;ii<Dateihist->myAnzahl;ii++)
    {
        myAlle[ii] +=Dateihist->myAlle[ii];
        mykorrelliert1[ii] +=Dateihist->mykorrelliert1[ii];
        mykorrelliert2[ii] +=Dateihist->mykorrelliert2[ii];
        myunkorrelliert1[ii] +=Dateihist->myunkorrelliert1[ii];
        myCountKorrelliert_a[ii] +=Dateihist->myCountKorrelliert_a[ii];
        myCountKorrelliert_b[ii] +=Dateihist->myCountKorrelliert_b[ii];
        myCountKorrelliert_c[ii] +=Dateihist->myCountKorrelliert_c[ii];
        myguate[ii] +=Dateihist->myguate[ii];
        mygrosse_a[ii] +=Dateihist->mygrosse_a[ii];
        mygrosse_b[ii] +=Dateihist->mygrosse_b[ii];
        mygrosse_c[ii] +=Dateihist->mygrosse_c[ii];
    }

    for (ii=0;ii<Dateihist->myAnzahl;ii++)
    {
        myverh_a[ii] +=Dateihist->myverh_a[ii]; myverh_b[ii] +=Dateihist->myverh_b[ii];
        myverh_c[ii] +=Dateihist->myverh_c[ii]; myverh_ba[ii] +=Dateihist->myverh_ba[ii];
        myverh_cb[ii] +=Dateihist->myverh_cb[ii]; myverh_ca[ii] +=Dateihist->myverh_ca[ii];
        myverh_ab_c[ii] +=Dateihist->myverh_ab_c[ii];
        myverh_bc_a[ii] +=Dateihist->myverh_bc_a[ii];
        myverh_c_ab[ii] +=Dateihist->myverh_c_ab[ii];
        myverh_a_be[ii] +=Dateihist->myverh_a_be[ii];
    }
}

void mergeBinHis togramme
( Uint **Filearray, Uint **ZFarray, Uint Absolutmax1, Uint Absolutmax2)
{
    Uint ii=0;aa=0;Absolutmax=0;
    if (Absolutmax1>Absolutmax2){Absolutmax=Absolutmax1;}
    else{Absolutmax=Absolutmax2;}
    if (Absolutmax>500){Absolutmax=500;}
    for (ii=0;ii<Absolutmax;ii++)
    {for (aa=0; aa<Absolutmax;aa++){ZFarray[ii][aa]=Filearray[ii][aa];}}
}

```


M Quellcode der Grenzwertfindung

```

/* Libraries siehe main */
void AuswertungFreqCount
(Allgemein *AllgFc, Traces *Trace_FC_aFc, Traces *Trace_FC_bFc,
Traces *Trace_FC_cFc, FC *FC_D1, FC *FC_D2, FC *FC_D3)
{try{ Ushort d=AllgFc->getmyDetektorInfo();
if ((d==3)||(d==5)||(d==7)) {FC_D1=new FC(Trace_FC_aFc);
FC_D1->FreqCount(Trace_FC_aFc);
/*Analog für die anderen beiden Detektoren*/
}/*Ausnahmen abfangen*/
}
FC::FC (Traces *Trace_a)
{
mymaxcount =Trace_a->getmymaxcount();
mymincount =Trace_a->getmymincount();
mySize1 =mymaxcount+1;
mySize10 =(UInt)(mymaxcount/10)+2;
mySize100 =(UInt)(mymaxcount/100)+2;
myFC1 =new UInt(mySize1+10); myFCW1 =new UInt(mySize1+10);
myFC10 =new UInt(mySize10+10); myFCW10 =new UInt(mySize10+10);
myFC100 =new UInt(mySize100+10); myFCW100 =new UInt(mySize100+10);
Setup();
}
FC::~FC ()/*Dynamische Speicherlösungen*/
void FC::Setup ()
{
uint ii =0;mymedian =0; mymquab =0;
myFCmeanCount =0;myFCmeanHaef =0; myThreshold =0;
for (ii=0 ; ii<mySize1+9; ii++){myFC1[ii]=0 ;myFCW1[ii]=0;}
for (ii=0 ; ii<mySize10+9; ii++){myFC10[ii]=0 ;myFCW10[ii]=0;}
for (ii=0 ; ii<mySize100+9; ii++){myFC100[ii]=0 ;myFCW100[ii]=0;}
}
void FC::FreqCount (Traces *Trace)
{
uint FC=0, median=0, X=0, DV=0, x=0, ii=0;
int Diff=0,error=0;
ULint a=0,b,c,d,ji;
float FCV=0, FCDV=0, FCSumme=0;
uint BinarraySize =Trace->getmyBinGrosse(),min=mymincount,max=mymaxcount;
for (ii=0 ; ii<BinarraySize ; ii++){ Berechnet Frequency counts pro 1 count
{
FC=Trace->getmyBinnedTraces(ii);
if ((FC<(max+1)&&(FC>=0))
{myFC1[FC]=myFC1[FC]+1;myFCW1[FC]=myFCW1[FC]+FC;}
else{printf("min=%i max=%i\n",min,max); cin->>error;
printf("Bin%#i FC error 1",ii,FC);}
}
}
for (ii=min ; ii<max ; ii++)
{FCSumme=FCSumme+(myFC1[ii]);
median =(UInt)(FCSumme/2.0);
V =(UInt)(FCSumme/4.0);
DV =(UInt)(FCSumme*3.0/4.0);
FCSumme=0;ii=0;
Diff=median;
while (Diff>0)
{FCSumme=FCSumme+(myFC1[ii]);Diff=(UInt)(V-FCSumme);ii++;
myFMeanCount=(ii-1);myFCmeanHaef=myFC1[ii-1];Diff=V;ii=0;FCSumme=0;
while (Diff>0)
{FCSumme=FCSumme+(myFC1[ii]);Diff=(UInt)(V-FCSumme);ii++;
FCV=(ii-1);Diff=DV;ii=0;FCSumme=0;
while (Diff>0)
{FCSumme=FCSumme+(myFC1[ii]);Diff=(UInt)(DV-FCSumme);ii++;
for (ii=1;ii<max;ii++)
{
if ((ii%10)==0){
if(a>mySize10){printf("FC arrayueberschreitung");cin->>error;}
myFC10[a]=myFC1[ii];myFCW10[a]=myFCW1[ii];
} // Berechnet Frequency counts pro 10 counts
else {
if(a>mySize10){printf("FC arrayueberschreitung");cin->>error;}
myFC10[a]=myFC1[ii];myFCW10[a]=myFCW1[ii];a++;}
}
if ((ii%100)==0){
myFC100[b]=myFC1[ii];myFCW100[b]=myFCW1[ii];cin->>error;}
myFC100[b]=myFC1[ii];myFCW100[b]=myFCW1[ii];b++;}
}
myThreshold=(Ushort)(myFCmeanCount-mymquab);
if(myThreshold==0){myThreshold=1;
Trace->setmyThreshold(myThreshold);
}
}/*Zugriffsfunktionen der Klassenvariablen*/

```

N Literaturverzeichnis

1. Nagel, S., M. Schaeferling, and O.S. Wolbeis, *Fluorescence Analysis in Microarray Technology*. Microchimica Acta, 2005. **151**: p. 1-21.
2. Han, M., et al., *Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules*. Nature, 2001. **19**: p. 631-635.
3. Ihara, T., et al., *Colorimetric multiplexed immunoassay using specific aggregation of antigenic peptide-modified luminous particles*. Analytica Chimica Acta, 2006. **578**: p. 11-18.
4. Xu, H., et al., *Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: A quantum dot-encoded microsphere-based assay*. Nucleic acids Research, 2003. **31**(8): p. e43.
5. Härmä, H., P. Aronkytö, and T. Lövgren, *Multiplex immunoassays on size-categorized individual beads using time-resolved fluorescence*. Analytica Chimica Acta, 2000. **410**: p. 85-96.
6. Iannone, M.A., et al., *Multiplexed molecular interactions of nuclear receptors using fluorescent microspheres*. Cytometry, 2001. **44**: p. 326-337.
7. Hu, L. and R.F. Colman, *Resonance energy transfer between sites in rat liver Glutathione S-Transferase, 1-1, selectivity modified at cystein-17 and cystein-111*. Biochemistry, 1997. **36**: p. 1635-1645.
8. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors: A review*. Sensors and Actuators B, 1999. **54**: p. 3-15.
9. Hellerer, T., et al., *Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) correlation spectroscopy*. ChemPhysChem, 2002. **3**(7): p. 630-633.
10. Hilbert, M., et al., *Correlational analysis of proteins and nonmetallic nanoparticles in a deep nulling microscope*. . j, Phys. Chem. B., 2005. **109**: p. 18162-18170.
11. Boyer, D., et al., *Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers*. Science, 2002. **297**: p. 1160-1163.
12. Pohl, W.H., et al., *A two-photon fluorescence correlation study of lectins interacting with carbohydrate 20 nm beads*. ChemBioChem, 2006. **7**: p. 268-274.
13. Demtröder, W., *Laserspektroskopie, Grundlagen und Techniken*. 5. Auflage ed. 2007, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
14. Kasha, M., *Characterization of electronic transitions in complex molecules*. Disc. Faraday Soc., 1950. **9**: p. 9-14.
15. Chan, W.C.W. and S. Nie, *Quantum Dot Bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection*. Science, 1998. **281**: p. 2016-2018.
16. Göppert-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. Annalen der Physik, 1931. **401**(3): p. 273-294.
17. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. j. Opt. Soc. Am. B, 1996. **163**(3): p. 481-491.

18. Song, J.M., et al., *Determination of two photon absorption cross section of fluorescein using a mode locked titanium sapphire Laser*. Analytical Sciences, 1999. **15**: p. 601-603.
19. Friedrich, D.M. and W.M. McClain, *Two-photon molecular electronic spectroscopy*. Ann. Rev. Phys. Chem., 1980. **31**: p. 559-577.
20. Callis, P.R., *Two-photon-induced fluorescence*. Ann. Rev. Phys. Chem., 1997. **48**: p. 271-297.
21. Kaiser, W. and C.G.B. Garrett, *Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺*. Physical Review Letters, 1961. **7**(6): p. 229-231.
22. Xu, C., et al., *Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy*. PNAS, 1996. **93**: p. 10763-10768.
23. Albota, M.A., C. Xu, and W.W. Webb, *Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm*. Applied Optics, 1998. **37**(31): p. 7352-7356.
24. Schwille, P., et al., *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation*. Biophysical Journal, 1999. **77**: p. 2251-2265.
25. Heinze, K.G., A. Kolterman, and P. Schwille, *Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis*. PNAS, 2000. **97**(19): p. 10377-10382.
26. Kettling, U., et al., *Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Biochemistry, 1998. **95**: p. 1416-1420.
27. Rigler, R., et al., *Fluorescence cross-correlation: A new concept for polymerase chain reaction*. Journal of Biotechnology, 1998. **63**: p. 97-109.
28. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. **248**: p. 73-76.
29. Berland, K.M., P.T.C. So, and E. Gratton, *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: Method and application to the intracellular environment*. Biophysical Journal, 1995. **68**: p. 694-701.
30. Berland, K.M., et al., *Scanning two-photon fluctuation correlation spectroscopy: Particle counting measurements for detection of molecular aggregation*. Biophysical Journal, 1996. **71**: p. 410-420.
31. Wehling, A. and P.J. Walla, *Time-resolved two-photon spectroscopy of photosystem I determines hidden carotenoid dark -state dynamics*. J. Phys. Chem. B, 2005. **109**: p. 24510-24516.
32. Wehling, A. and P.J. Walla, *A two-photon excitation study on the role of carotenoid dark states in the regulation of plant photosynthesis*. Photosynthesis Research, 2006. **90**(2): p. 101-110.
33. Tinnefeld, P. and M. Sauer, *Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: Challenges for chemistry and influence on biology*. Angewandte Chemie Int. Ed., 2005. **44**: p. 2642-2617.
34. Köllner, M. and J. Wolfrum, *How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements?* Chemical Physics Letters, 1992. **200**: p. 199-204.
35. Tinnefeld, P., et al., *Confocal fluorescence lifetime imaging microscopy at the single molecule level*. Single Molecules, 2000. **1**(3): p. 215-223.

36. Palo, K., et al., *Fluorescence intensity and lifetime distribution analysis: Toward higher accuracy in fluorescence fluctuation spectroscopy*. Biophysical Journal, 2002. **83**: p. 605-618.
37. Böhmer, M. and J. Enderlein, *Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: Methodology and technology*. ChemPhysChem, 2003. **4**: p. 792-808.
38. Eggeling, C., et al., *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*. PNAS, 1998. **95**: p. 1556-1561.
39. Dittrich, P.S. and P. Schwille, *Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation*. Appl. Phys. B, 2001. **73**: p. 829-837.
40. Eggeling, C., A. Volkmer, and C.A.M. Seidel, *Molecular photobleaching kinetics of Rhodamin 6G by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy*. ChemPhysChem, 2005. **6**: p. 791-804.
41. Eggeling, C., et al., *Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis*. Anal. Chem., 1998. **70**: p. 2651-2659.
42. Ambrose, W.P., et al., *Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature*. Chemical Reviews, 1999. **99**: p. 2929-2956.
43. Sprague, B.L., et al., *Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching*. Biophysical Journal, 2004. **86**: p. 3473-3495.
44. Stern, O. and M. Volmer, *Über die Abklingzeit der Fluoreszenz*. Physikalische Zeitschrift, 1919. **20**: p. 183-188.
45. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence Spectroscopy*. Second edition ed. 1999, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
46. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **6**: p. 55-75.
47. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. Ann. Rev. Biochem., 1978. **47**: p. 819-846.
48. Zwillig, D., et al., *Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies*. The EMBO Journal, 2007. **26**: p. 9-18.
49. Somsen, O.J.G., et al., *Energy migration and trapping in a spectrally and spatially inhomogeneous light-harvesting antenna*. Biophysical Journal, 1994. **66**: p. 1580-1596.
50. Roberts, D.V., et al., *Efficient excitation energy transfer among multiple dyes in polystyrene microspheres*. Journal of Luminescence, 1998. **79**: p. 225-231.
51. Wittmershaus, B.P., et al., *Excitation energy transfer from polystyrene to dye in 40 nm diameter microspheres*. Journal of Luminescence, 2002. **96**: p. 107-118.
52. Draxler, S., M.E. Lippitsch, and F.R. Aussenegg, *Long-range energy transfer in Langmuir -Blodgett multilayer Systems*. Chem. Phys. Lett., 1989. **159**: p. 231-234.
53. Johnson, I.D., H.C. Kang, and R.P. Haugland, *Fluorescent membrane probes incorporating dipyrromethenedoron difluoride fluorophores*. Analytical Biochemistry, 1991. **198**: p. 228-237.

54. Maus, M., et al., *Intramolecular energy hopping and energy trapping in polyphenylen dendrimers with multiple peryleneimide donor chromophors and a teryleneimide acceptor trap chromophore*. J. Am. Chem. Soc., 2001. **123**: p. 7668-7676.
55. Hofkens, J., et al., *Probing photophysical processes in individual multichromophoric dendrimers by single-molecule spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**: p. 9278-9288.
56. Hofkens, J., et al., *Revealing competitive Förster-type resonance energy-transfer pathways in single molecule bichromophoric molecules*. PNAS, 2003. **100**(23): p. 13146-13151.
57. Vosch, T., et al., *Probing Förster type energy pathways in a first generation rigid dendrimer bearing two perylene imide chromophores*. J. Phys. Chem. A, 2003. **107**: p. 6920-6931.
58. Hübner, C.G., et al., *Photon antibunching and collective effects in the fluorescence of single bichromophoric molecules*. Physical Review Letters, 2003. **91**(9): p. 093903.
59. Hofkens, J., et al., *Triplet states as non-radiative traps in multichromophoric entities: single molecule spectroscopy of an artificial and natural antenna system*. Spectrochimica Acta Part A, 2001. **57**: p. 2093-2107.
60. Bout, D.A.V., et al., *Discrete intensity jumps and intramolecular electronic energy transfer in the spectroscopy of single conjugated polymer molecules*. Science, 1997. **277**: p. 1074-1077.
61. Orrit, M. and J. Bernard, *Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal*. Physical Review Letters, 1990. **65**(21): p. 2716-2719.
62. Shera, E.B., et al., *Detection of single fluorescent molecules*. Chem. Phys. Lett., 1990. **174**(6): p. 553-557.
63. M.Eigen and R.Rigler, *Sorting single molecules application to diagnostics and evolutionary biotechnologie*. Proc.Natl.Acad.Sci, 1994. **91**: p. 5740-5747.
64. Mets, Ü. and R. Rigler, *Submillisecond detection of single rhodamin molecules in water*. Journal of Fluorescence, 1994. **4**(3): p. 259-264.
65. Rigler, R. and Ü. Mets, *Diffusion of single molecules through a gaussian laser beam*. Proc. SPIE, 1992. **1921**: p. 239-248.
66. Abbe, E., *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der Mikroskopischen Wahrnehmung*. Arch. Mikroskop Anat., 1873. **9**: p. 413-468.
67. Westphal, V. and S.W. Hell, *Nanoscale Resolution in the focal plane of an optical microscope*. Physical Review Letters, 2005. **PRL 94**(143903).
68. Xu, C., J.B. Shear, and W.W. Webb, *Hyper-Rayleigh and Hyper-Raman scattering background of liquid water in two-photon excited fluorescence detection*. Anal. Chem., 1997. **69**: p. 1285-1287.
69. Maiman, T.H., *Stimulated optical radiation in ruby*. Nature, 1960. **187**: p. 493-494.
70. Moulton, P.F., *Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃*. J. Opt. Soc. Am. B, 1986. **3**(1): p. 125-133.
71. Brabec, T., et al., *Kerr lens mode locking*. Optics Letters, 1992. **17**(18): p. 1292-1294.

72. Pichè, M. and F. Salin, *Self-mode locking of solid-state lasers without apertures*. Optics Letters, 1993. **18**(13): p. 1041-1043.
73. Fork, R.L., O.E. Martinez, and J.P. Gordon, *Negative dispersion using pairs of prisms*. Optics Letters, 1984. **9**(5): p. 150-152.
74. Heisenberg, W., *Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik*. Zeitschrift für Physik, 1927. **43**(3-4): p. 172-198.
75. Prochazka, I., *Semiconducting single photon detectors; The state of the art*. Phs. stat. sol., 2005. **2**(5): p. 1524-1532.
76. Levenberg, K., *A method for the solution of certain problems in least squares*. Quart. Appl. Math, 1944. **2**: p. 164-168.
77. Marquardt, D., *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. SIAM J. Appl. Math, 1963: p. 431-441.
78. Madge, D., E. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system-Measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Physical Review Letters, 1972. **29**(11): p. 705-708.
79. Elson, E.L. and D. Madge, *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, 1974. **13**: p. 1-27.
80. Madge, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy. II An experimental realisation*. Biopolymers, 1974. **13**: p. 29-61.
81. Aragon, S.R. and R. Pecora, *Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics*. Journal of chemical physics, 1976. **64**(4): p. 1791-1803.
82. Meyer, T. and H. Schindler, *Particle counting by fluorescence correlation spectroscopy-Simultaneous measurement of aggregation and diffusion of molecules in solutions and membranes*. Biophysical Journal, 1988. **54**: p. 983-993.
83. Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: Analysis of translational diffusion*. Eur. Biophys. J., 1993. **22**: p. 169-175.
84. Rigler, R., *Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening applications in biotechnology*. Journal of Biotechnology, 1995. **41**: p. 177-186.
85. Hausteil, E. and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy: Novel variations of an established technique*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc., 2007. **36**: p. 151-169.
86. Aragon, S.R. and R. Pecora, *Fluorescence correlation spectroscopy and brownian rotational diffusion*. Biopolymers, 1975. **14**: p. 119-138.
87. Brown, R., *A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies*. Edinburgh new Philosophical Journal 1828: p. 358-371.
88. Quian, H. and E.L. Elson, *Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy*. Applied Optics, 1991. **30**(10): p. 1185-1195.
89. Hess, S.T. and W.W. Webb, *Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical Journal, 2002. **83**: p. 2300-2317.

90. Nagy, A., J. Wu, and K.M. Berland, *Observation volumes and γ -factors in two-photon fluorescence fluctuation spectroscopy* Biophysical Journal, 2005. **89**: p. 2077-2090.
91. Einstein, A., *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen.* Annalen der Physik, 1905. **17**: p. 549-560.
92. Rigler, R., J. Widengrin, and Ü. Mets, *Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study.* J, Phys. Chem. , 1995. **99**: p. 13368-13379.
93. Palmer, A.G. and N.L. Thompson, *Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy.* Biophysical Journal, 1987. **52**: p. 257-270.
94. Palmer, A.G. and N.L. Thompson, *High-order fluorescence fluctuation analysis of model protein clusters.* PNAS, 1989. **86**: p. 6148-6152.
95. Palmer, A.G. and N.L. Thompson, *Intensity dependence of high-order autocorrelation functions in fluorescence correlation spectroscopy.* Rev. Sci. Instrum., 1988. **60**(4): p. 624-633.
96. Palmer, A.G. and N.L. Thompson, *Fluorescence correlation spectroscopy for detecting submicroscopic clusters of fluorescent molecules in membranes.* Chemistry and physics of lipids, 1989. **50**: p. 253-270.
97. Schwille, P., F.-J. Meyer-Almes, and R. Rigler, *Dual-color fluorescence cross-correlation in spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution.* Biophysical Journal, 1997. **72**: p. 1878-1886.
98. Collini, M., et al., *Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy as a potential tool for high-throughput screening of DNA repair activity.* Nucleic acids Research, 2005. **33**(19): p. e165.
99. Heinze, K.G., M. Jahnz, and P. Schwille, *Triple-color coincidence analysis: One step further in following higher order molecular complex formation.* Biophysical Journal, 2004. **86**: p. 506-516.
100. Berland, K. and G. Shen, *Excitation saturation in two-photon fluorescence spectroscopy.* Applied Optics, 2003. **42**: p. 5566-5576.
101. Cianci, G.C., J. Wu, and K.M. Berland, *Saturation modified point spread functions in two-photon microscopy.* Microscopy Research and Technique, 2004. **64**: p. 135-141.
102. Starchev, K., J. Zhang, and J. Buffle, *Applications of fluorescence correlation spectroscopy - particle size effect.* Journal of Colloidal and Interface Science, 1998. **203**: p. 189-196.
103. Chirico, G., C. Fumagalli, and G. Baldini, *Trapped brownian motion in single- and two-photon fluorescence correlation experiments.* J. Phys. Chem. B, 2002. **106**: p. 2508-2519.
104. Osborne, M.A., et al., *Optically biased diffusion of single molecules studied by confocal fluorescence microscopy.* J, Phys. Chem. B, 1998. **102**: p. 3160-3167.
105. Keller, U., W.H. Knox, and G.W. 'tHooft, *Ultrafast solid-state lasers using resonant nonlinearities.* IEEE J. Quantum Electronics, 1992. **28**(10): p. 2123-2133.

106. Krausz, F., et al., *Femtosecond solid state lasers*. IEEE J. Quantum Electronics, 1992. **28**(10): p. 2097-2122.
107. Wittmershaus, B.P., et al., *Spectral properties of single bodipy dyes in polystyrene microspheres and in solutions*. Journal of Fluorescence, 2001. **11**(2): p. 119-127.
108. Enderlein, J., et al., *Molecular shot noise, burst size distribution, and single-molecule detection in fluid flow: effects of multiple occupancy*. J. Phys. Chem. A, 1998. **102**: p. 6089-6094.
109. Bestvater, F., et al., *Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging*. Journal of Microscopy, 2002. **208**: p. 108-115.
110. Karolin, J., et al., *Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) derivatives in Liquids, Lipid membranes, and proteins*. J. Am. Chem. Soc, 1994. **116**: p. 7801-7806.
111. Loudet, A. and K. Burgess, *BODIPY dyes and their derivatives: Synthesis and spectroscopic properties*. Chemical Reviews, Published on Web 10.09.2007.
112. Marushchak, D., et al., *Pyrromethene dyes (BODIPY) can form ground state homo and hetero dimers: Photophysics and spectral properties*. Spectrochimica Acta Part A, 2006. **65**: p. 113-122.
113. Buschmann, V., K.D. Weston, and M. Sauer, *Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes*. Bioconjugate chemistry, 2003. **14**: p. 195-204.
114. Nunnally, B.K., et al., *Characterization of visible dyes for four-decay fluorescence detection in DNA sequencing*. Anal. Chem., 1997. **69**: p. 2392-2397.
115. Schniepp, H. and V. Sandoghdar, *Spontaneous emission of europium ions embedded in dielectric nanospheres*. Physical Review Letters, 2002. **89**(25): p. 257403.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen und all jenen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. **P. J. Walla** für die interessante Themenstellung und die hervorragende Förderung und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Seine Diskussionsbereitschaft und Anregungen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des weiteren danke ich....

Herrn Prof. Dr. **K. H. Gericke** für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. **Jürgen Troe** für die Ermöglichung dieser Arbeit und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie.

Den Mitarbeitern der Werkstätten unter der Leitung von Herrn **Manfred Schmidt** und Herrn **Bernd Wallmann**, die unsere Wünsche stets schnell und kompetent umgesetzt haben sowie **Martin Fechner** für seine Unterstützung in allen Computerfragen.

Meinen Mitarbeitern in unserer Arbeitsgruppe, **Anna Cypionka**, **Wiebke Pohl** und **Michael Hilbert** sowie meinen Kollegen der anderen Arbeitsgruppen am MPI, **Andreas Bögehold**, **Heiko Frerichs**, **Sebastian Kühn**, **Christian Reichardt**, **Tim Schäfer** und **Duncan Wild**. Sie haben durch ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit zur Entstehung eines angenehmen Arbeitsklimas beigetragen und mir mit Tips, in Diskussionen und durch Korrekturlesen dieser Arbeit weitergeholfen.

Dem Braunschweiger Teil unserer Arbeitsgruppe, **Stefan Bode**, **Jan Främke**, **Axel Wehling**, **Claudia Quentmeier** und **Pen-Nan Xiao** für die vielen interessanten Seminare, Gespräche und Diskussionen.

Joachim Wuttke für die Bereitstellung des LMA source codes LMFit.

Mein besonderer Dank geht an **meine Familie**, die mich in vielerlei Weise stets unterstützt hat und mit ihrem Glauben an mich mir diesen Weg ermöglicht hat. Insbesondere gilt dies **meiner Frau Ruth**, die mir in dieser Zeit zwei wunderbare Söhne **Niklas** und **Mattis** geschenkt hat und trotz beengter Verhältnisse mit ihrem Vertrauen in mich und nicht zuletzt durch ausgiebiges Korrekturlesen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Am 23.11.1974 wurde ich, Hendrik Hippchen, als Sohn von Eva-Maria und Paul Hippchen in Thuine geboren. Ich besitze die deutsche Staatsbürgerschaft. Verheiratet bin ich mit Ruth Hippchen geb. Homeyer und habe zwei Kinder, Niklas und Mattis.

Von 1981 bis 1985 besuchte ich die Grundschule Darne in Lingen (Ems) gefolgt von der Orientierungsstufe Laxten in Lingen (Ems) von 1985 bis 1987. Daraufhin besuchte ich von 1987 bis Ende 1988 das Franziskusgymnasium Lingen (Ems) und wechselte Anfang 1989 zur Marienschule Lingen (Ems), an der ich 1991 den erweiterten Sekundarabschluss I erwarb.

Nach Besuch des BGJ Elektrotechnik an den Berufsbildenden Schulen Lingen absolvierte ich in den Jahren 1992 bis 1995 eine Lehre als Chemielaborant bei der Bayer AG in Leverkusen.

Daraufhin leistete ich, gefolgt an eine Übergangsbeschäftigung als Chemielaborant bei der Kernkraftwerke Lippe-Ems GmbH 09/1995 bis 01/1996, von 02/1996 bis 11/1996 meinen Grundwehrdienst bei der TechnSpezKp 200 in Emden. Nach einer befristeten Einstellung als Laborhelfer bei der Bärlocher GmbH 02/1997 bis 10/1997 sowie einer unbefristeten Einstellung als Laborhelfer bei der Hagedorn AG 11/1997 bis 8/1998 erwarb ich meine Fachhochschulreife im Jahre 1999 nach einjährigem Besuch der Fachoberschule Technik bei den Berufsbildenden Schulen Lingen.

Im Jahre 1999 begann ich das Studium Chemieingenieurwesen mit Schwerpunkt Biotechnologie an der FH Aachen Abteilung Jülich im internationalen Studiengang, welches ich im Jahre 2003 mit dem FH-Diplom erfolgreich abschloss. Meine Diplomarbeit mit dem Thema „Enzymatische Trennung von *cis/trans*-1,2-Cyclopropandicarbonsäurediethylester“ führte ich unter der Leitung von Prof. Dr. Jeromin durch. Im Verlauf des Studiums absolvierte ich zwei Auslandssemester am RMIT in Melbourne/Australien.

Im Anschluss an das Fachhochschulstudium begann ich zum Wintersemester 2003/2004 das Master Studium Chemie an der TU-Braunschweig, in dessen Verlauf ich nach zwei absolvierten Semestern die Zulassung zum Promotionsstudiengang auf Grund der Turbo-Master-Qualifikation erlangte. Seitdem habe ich meine Forschungstätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen fortgesetzt. Die dabei durchgeführten Arbeiten zum Thema der konfokalen Einzelmolekül-Detektion von fluoreszenz-kodierten Nanospheres sind Grundlage für die vorliegende Arbeit.

