

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 Analysetechnik „*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.

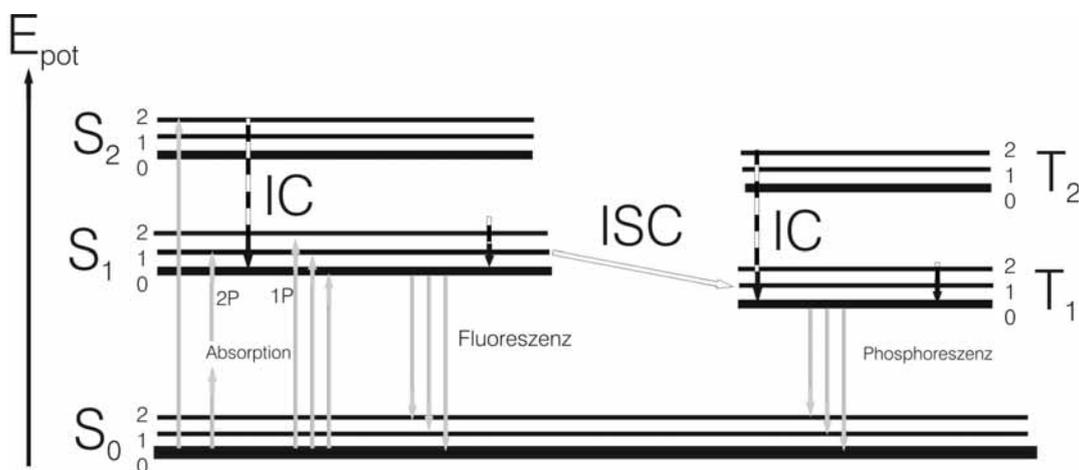


Abbildung 3.1: Darstellung der Singulett- und Triplett-Zustände mit den dazugehörigen Vibrationszuständen im Jablonski-Diagramm. Weiterhin sind die Zustandsübergänge durch Lichtanregung mit einem und zwei Photonen, Relaxation unter Fluoreszenz und Phosphoreszenz sowie *Internal-Conversion* (IC) und *Inter-System-Crossing*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