

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Verbundnamen:

**Lichtquellen für verschränkte Zweiphotonenabsorption zur
Anwendung für quanten-gestützte Fluoreszenzmikroskopie
FKZ: 13N15956**

Akronym: LIVE2QMIC

**Teilvorhaben: Integration der ETPA-Lichtquelle für Messungen am Mikroskop: Theorie und
Anwendung**

Schlagworte zum Verbund: Quantum Imaging, Fluoreszenzmikroskopie, verschränkte
Zweiphotonen-absorption

Teilprojektleiter:

Prof. Christian Eggeling
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Angewandte Optik und Biophysik
Max-Wien-Platz 1
07743 Jena
Tel.: +49 3641 9-47670
Fax: +49 3641 9-47652
E-mail: christian.eggeling@uni-jena.de

Teil I: Kurzbericht

Das Gesamtziel des Forschungsvorhabens LIVE2QMIC war die Bereitstellung von optimierten Lichtquellen für verschränkte Zweiphotonenabsorption (ETPA) in Fluorophoren, mittels derer eine quantengestützte bildgebende Fluoreszenzmikroskopie in den Lebenswissenschaften und in der Medizin erstmals möglich gemacht werden sollte. Um dieses hochgesteckte Ziel zu erreichen waren sowohl Innovationen auf dem Gebiet der Erzeugung der Photonenpaaren als auch auf den dafür notwendigen Laser-Pumpquellen notwendig. Das Teilprojekt der FSU Jena fokussierte dabei auf zwei Teilaspekte, die theoretische Modellierung der Wechselwirkung von Quantenlicht mit Fluorophoren, welche für eine zielgerichtete Optimierung von Photonenpaarquelle und Pumplaser notwendig ist, sowie Anwendungstests von realisierten Photonenpaarquellen in professionellen Mikroskopsystemen sowie Vergleichsmessungen mit klassischer Zweiphotonenfluoreszenz.

Innerhalb des Projekts konnte ein theoretisches Modell entwickelt werden, welches auf Basis der spektralen Verteilung eines anregenden Zweiphotonenzustands die Berechnung der Anregungs- und damit Fluoreszenzwahrscheinlichkeit für verschiedene Farbstoffmoleküle erlaubt. Damit konnte gezeigt werden, dass für verschiedene Molekülklassen, welche sich im Wesentlichen durch die Anordnung ihrer nichtresonanten Zwischenzustände unterscheiden, qualitativ verschiedene Anforderungen für die optimale Anregung bestehen. Kommerziell verbreitete Farbstoffe sind dabei aber zumeist einer Molekülklasse mit einem relativ einfachen Anregungsprofil zugeordnet. Für die organischen Farbstoffe ATTO 430 LS und Nile Red und dem fluoreszierenden Protein eGFP

(enhanced Green Fluorescent Protein) wurden auf der Basis von publizierten Daten die Anregungsprofile berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Moleküle mit den im Projekt zu entwickelnden Anregungslasern bei 405 nm, 488 nm und 532 nm angeregt werden können, allerdings nicht immer mit der optimalen Anregungseffizienz. Für Nile Red wurde dann weiterhin untersucht, wie sich die Eigenschaften der Photonenpaarquelle auf die Anregungseffizienz auswirken. Dabei konnte gezeigt werden, dass für Photonenpaare mit leicht unterschiedlichen Wellenlängen, bei denen das Gesamtspektrum breiter ist als bei degenerierten Paaren, die Anregungseffizienz erhöht ist. Dies konnte auch im Experiment qualitativ nachgewiesen werden.

Für eine experimentelle Realisierung war eine wichtige Fragestellung im Projekt, ob die ETPA-Beleuchtung zu weniger Photobleichen führt. Beim Photobleichen führt die zur Fluoreszenzzeugung eingesetzte Laserlichtbestrahlung zu einer erhöhten Reaktivität der Fluoreszenzfarbstoffe und zu deren meist irreversiblen Zerstörung und damit einem Verlust der Fluoreszenzemission. Daher wurden experimentelle Protokolle für vergleichende Photobleichexperimente aufgestellt und zuerst für konventionelle 1-Photonen-Anregung an Farbstoffen in Lösung und an Zellstrukturen umgesetzt. Diese Experimente beinhalteten wiederholende Bildaufnahmen wie auch Einzelmolekülmessungen, wobei die Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit als Indiz des Photobleichens quantifiziert wurde. Dabei wurde ein relativ neuer Effekt des Photobleichens genauer untersucht, nämlich die Verschiebung der Fluoreszenzemission in den blauen Wellenlängenbereich. Diese Arbeiten wurden in Nature Methods publiziert. Darüber hinaus wurde ein etabliertes konventionelles 2-Photon-Mikroskop verwendet, um vergleichende konventionelle 2-Photonenmessungen und weitere spektroskopische Charakterisierungen an für die ETPA ausgesuchten Farbstoffen durchzuführen. Diese Arbeiten wurden in APL Quantum publiziert und in Methods in Microscopy akzeptiert. Schließlich wurde ein Zellmodell basierend auf die für die ETPA-basierte Fluoreszenzmikroskopie selektierten Farbstoffe etabliert.

Teil II: Eingehende Darstellung

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personal:

- 11.2021 – 03.2023: Agnes Koerfer (65% PhD, AG Eggeling): Experimentelle Arbeiten
- 04.2023 – 06.2024: Aleksa Krstić (100% E13, AG Setzpfandt): Theoretische Arbeiten

Theoretische Arbeiten

Die erste Aufgabe im Projekt war die Erarbeitung eines Modells, welches die Beschreibung der Zweiphotonenabsorption von Photonenpaaren auf Basis der Quantenoptik beschreibt. Dabei wurde zunächst angenommen, dass die im Projekt zu realisierenden Photonenpaarquellen nur Paare erzeugen, die Erzeugung höherer Photonenzahlen wurde vernachlässigt. Der erzeugte Quantenzustand konnte demnach durch eine Superposition von Signal- und Iidlerphotonen unterschiedlicher Frequenz in einer räumlichen Mode beschrieben werden:

$$|\Psi\rangle = \iint d\omega_i d\omega_s A(\omega_i, \omega_s) \hat{a}_i^\dagger \hat{a}_s^\dagger |0\rangle,$$

Die Amplitude $A(\omega_i, \omega_s)$ beschreibt dabei die Stärke der einzelnen Frequenzkomponenten. Eine weitere grundlegende Voraussetzung für die Beschreibung der Zweiphotonenabsorption ist die Modellierung der involvierten Zustände in den Farbstoffmolekülen. Diese wurden vereinfacht durch das in Abbildung 1 dargestellte Schema beschrieben. Die für die Zweiphotonenabsorption unbedingt notwendigen Zustände sind je ein Grund- und angeregter Zustand. Durch Anregung mit den Signal- und Iidlerphotonen können Elektronen vom Grundzustand in den angeregten Zustand angeregt werden, wonach sie Fluoreszenzphotonen geringerer Energie emittieren können. Die Energie die Signal- und Iidlerphotonen zusammengenommen muss dabei ungefähr der Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand entsprechen, so dass ein resonanter Übergang stattfinden kann. Neben den beiden direkt involvierten Zuständen besitzen komplexe Moleküle noch eine Reihe weiterer Zwischenzustände. Die für die Zweiphotonenabsorption wichtigen Zwischenzustände können qualitative in zwei Klassen eingeteilt werden. Einerseits sind dies Zwischenzustände welche eine niedrigere Energie als der angeregte Zustand haben als der angeregte Zustand, also zwischen Grund- und angeregtem Zustand liegen. Andererseits können sich relevante Zwischenzustände auch bei höheren Energien als die des angeregten Zustands befinden.

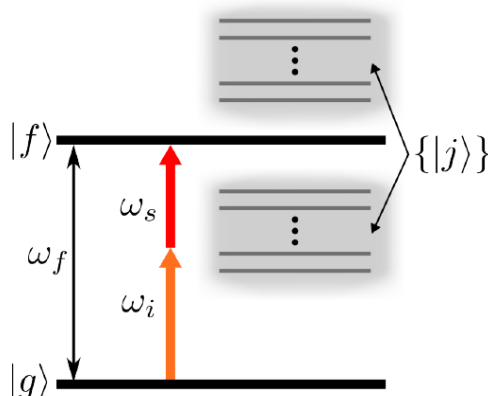


Abbildung 1: Skizze des untersuchten Systems von Grund- und finalelem Zustand sowie Zwischenzuständen welche unter oder über dem finalen Zustand liegen.

Basierend auf diesem Modell der Fluoreszenzmoleküle kann die Anregungswahrscheinlichkeit des

angeregten Zustands durch einen Photonenpaarzustand mit folgender Formel berechnet werden:

$$P_{TPA} \propto \int d\omega_e \left| \int d\omega_i d\omega_s \delta(\omega_e - \omega_i - \omega_s) L(\omega_i, \omega_s) A(\omega_i, \omega_s) \right|^2$$

Die Eigenschaften der Moleküle werden dabei durch eine molekülspezifische Anregungsfunktion $L(\omega_i, \omega_s)$ erfasst. Diese ergibt sich aus:

$$L \propto \sqrt{g(\omega_e)} \sum_j D_j \left(\frac{1}{\Delta_j(\omega_i)} + \frac{1}{\Delta_j(\omega_s)} \right)$$

$g(\omega_e)$ ist dabei die Linienbreite des angeregten Zustands, D_j sind die Übergangsdipolmomente aller beteiligten Zustände und $\Delta_j(\omega_i)$ sowie $\Delta_j(\omega_s)$ sind die Unterschiede zwischen den Energien der Signal- und Iderphotonen und den Energien der Zwischenzustände. Dieses Modell erlaubt eine allgemeine Berechnung der Übergangswahrscheinlichkeit auf der Basis von physikalischen Eigenschaften der Moleküle, insbesondere der Energien, Linienbreiten und Dipolmomente der einzelnen Zustände.

Im Rahmen des Projekts war es nicht geplant, spektroskopische Messungen zur Messung der notwendigen Molekülparameter durchzuführen. Hier wurde auf Werte aus der Literatur zurückgegriffen. Eine breite Literaturstudie führte dabei zunächst zu dem Ergebnis, dass alle Messergebnisse durch Verwendung nur eines Zwischenzustands mit sehr großer Genauigkeit erklärt werden können. Das heißt, dass die entwickelte Berechnungsvorschrift weiter vereinfacht werden kann, und insgesamt nur 3 Zustände in die Analyse einbezogen werden müssen: Grundzustand, angeregter Zustand und ein Zwischenzustand.

Vor der Analyse konkreter Farbstoffmoleküle wurde zunächst qualitativ untersucht, wie sich die Lage des Zwischenzustands auf die Absorptionswahrscheinlichkeit in Farbstoffmolekülen auswirkt. Dazu wurden die spektrale Anregungsfunktion für typische Molekülparameter berechnet, sie ist für die Fälle eines Zwischenzustands über und unter dem angeregten Zustand in Abbildung 2 dargestellt.

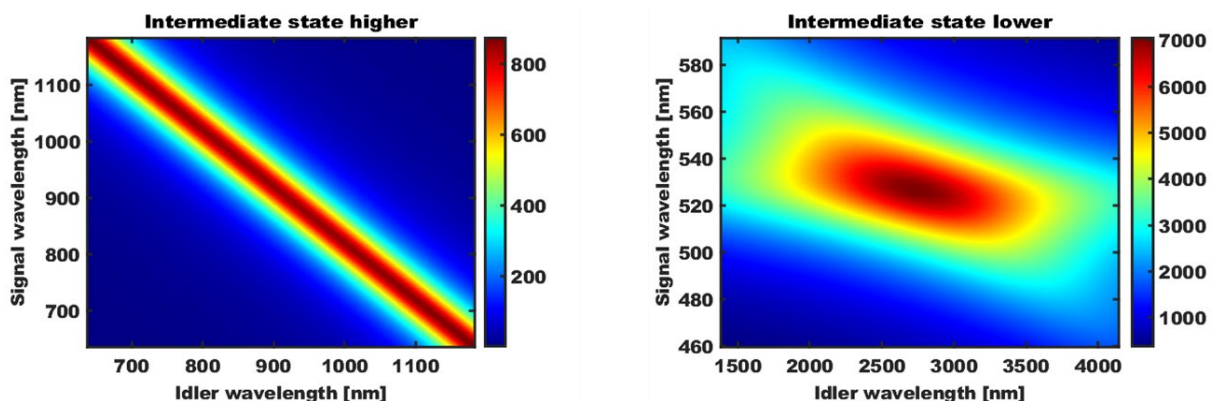


Abbildung 2: Typische spektrale Zweiphotonenresponse für einen Zwischenzustand über (links) und unter (rechts) dem finalen Zustand.

Dabei ist klar erkennbar, dass für den ersten Fall die Anregungsfunktion im Wesentlichen auf einer Diagonale durch den Raum der Signal- und Iidlerwellenlängen verläuft. Das Maximum der Anregungswahrscheinlichkeit entspricht dabei jeweils der Energie, welche in Summe von Signal- und Iidlerphotonen genau der Übergangsenergie vom Grund- zum angeregten Zustand entspricht. Damit können derartige Übergänge stark von den Korrelationen im Zweiphotonenzustand profitieren, welche für eine feste Pumpwellenlänge die Signal- und Iidlerwellenlängen genau entlang dieser Diagonale ausrichten. Für Zwischenzustände zwischen dem Grund- und angeregten Zustand ist die spektrale Anregungsfunktion wesentlich komplexer. Insbesondere ist das Maximum nicht mehr entlang der Diagonalen ausgerichtet und wird entsprechend nicht vollumfänglich von den

Korrelationen zwischen Signal- und Idlerphotonen profitieren. Die erhöhte Komplexität ergibt sich daraus, dass für derartige Zwischenzustände die Signal- und Idlerphotonen auch jeweils einzeln Übergänge in die Zwischenzustände anregen können, die dann zu resonanten Effekten führen.

Die resonante Natur auch der Einzelphotonenwechselwirkung führt ebenfalls dazu, dass die Anregungsfunktion in diesem Fall komplexwertig ist. In Abbildung 3 sind Real- und Imaginärteil der oben diskutierten Anregungsfunktion dargestellt.

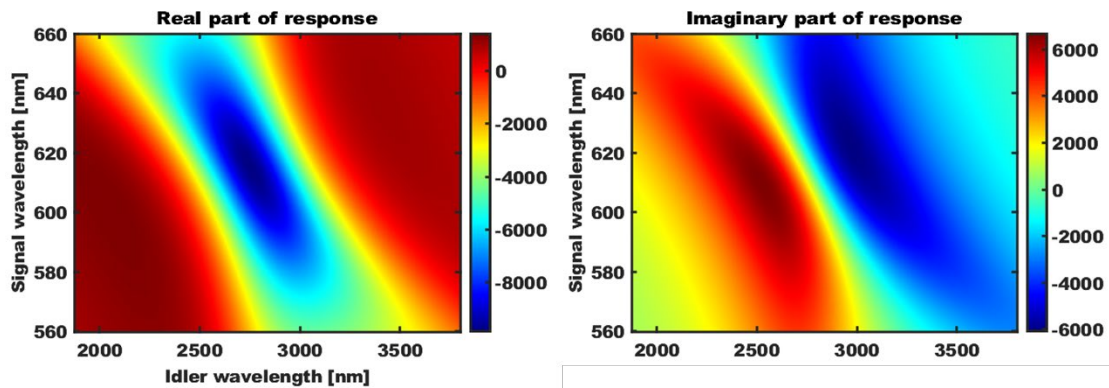


Abbildung 3: Real- und Imaginärteil der typischen spektralen Zweiphotonenresponse für einen Zwischenzustand unter dem finalen Zustand.

Die Wahrscheinlichkeit der Zweiphotonenfluoreszenz ergibt sich im Wesentlichen aus dem Überlapp der Anregungsfunktion mit der spektralen Funktion des Zweiphotonenzustands. Spektrale Verteilungen, welche ähnliche Charakteristika aufweisen wie die spektralen Anregungsfunktionen führen dabei zu einer höheren Zweiphotonenfluoreszenz. Aufgrund der starken Korrelationen in den Zweiphotonenzuständen sind deshalb Moleküle mit Zwischenzuständen über dem finalen Zustand für die Zweiphotonenanregung mit verschränkten Photonen besser geeignet. Die wesentlichen kommerziellen Farbstoffe, für die Daten zu den spektralen Eigenschaften vorhanden waren, gehören auch zu dieser Klasse von Molekülen. In den folgenden Arbeiten wurde sich deshalb auf die Untersuchung dieser Moleküle beschränkt, was aber keine wesentliche Einschränkung darstellt.

In Übereinstimmung mit den im Projekt untersuchten Pump Laserwellenlängen bei 405 nm, 488 nm und 532 nm wurden drei Farbstoffe für die weiteren Untersuchungen ausgewählt, deren Absorptionswellenlängen jeweils in der Nähe dieser Pumpwellenlängen liegen. Damit liegen die notwendigen Photonenenergien für die Anregung auch nahe an den mit den entsprechenden Pump Lasern erreichbaren kombinierten Energien von Signal- und Idlerphotonen. Für die gewählten organischen Farbstoffe ATTO 430 LS und Nile Red und das fluoreszierende Protein eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) konnten auf der Basis von publizierten Daten die Anregungsprofile berechnet werden.

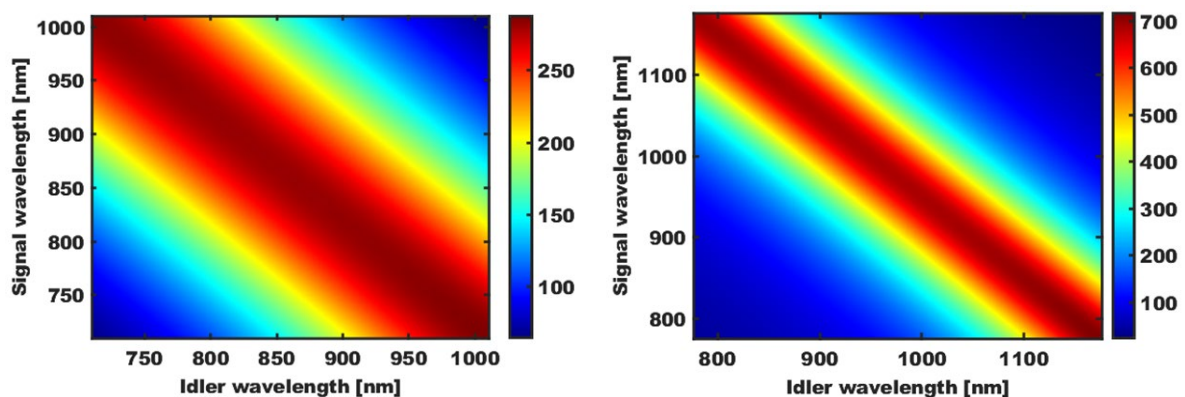


Abbildung 4: Spektrale Zweiphotonenresponse von ATTO 430 LS (links) und eGFP (rechts).

Die spektralen Anregungsprofile für ATTO 430 LS und eGFP sind in Abbildung 4 dargestellt. Sie zeigen beide das typische Bild eines diagonalen Anregungsmaximums. Für die verfolgten Pumpplaserwellenlängen liegen die spektralen Verteilungen der Photonenpaare dabei jeweils nicht genau im Maximum der Anregungsprofile, sondern bei etwas geringeren Wellenlängen. Die Berechnungen zeigen aber, dass die Anregung dieser Moleküle möglich sein sollte.

Im Laufe des Projekts wurden die Entwicklungen der Photonenpaarquelle und der Experimente zur Zweiphotonenabsorption mehr auf die Pumpwellenlänge von 532 nm fokussiert. Deshalb wurden entsprechend auch die theoretischen Untersuchungen und insbesondere die Optimierung der Quellenparameter auf diese Wellenlänge und den dabei genutzten Fluoreszenzfarbstoff Nile Red konzentriert.

Abbildung 5 (links) zeigt die spektrale Anregungswahrscheinlichkeit für diesen Farbstoff. Das Maximum der Anregung wäre für eine Pumpplaserwellenlänge von 548 nm erreichbar. Da die genutzten Energieniveaus des Moleküls allerdings eine relativ große Linienbreite aufweisen, ist die Anregungswahrscheinlichkeit für die genutzte Wellenlänge von 532 nm nur ca. 20 % geringer. Die komplette Bandbreite der Absorptionsresonanz ist dabei ca. 50 nm.

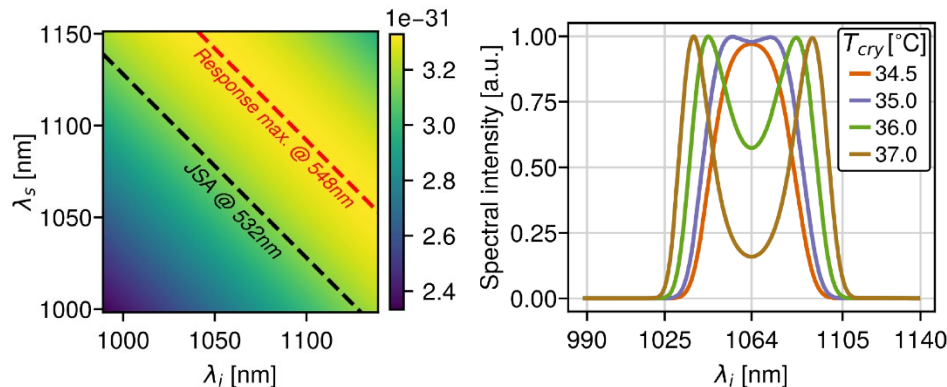


Abbildung 5: (Links) Spektrale Zweiphotonenresponse von Nile Red. Die Linien zeigen das Maximum der Response sowie den durch den im Projekt hauptsächlich entwickelten Pumpplaser adressierten Spektralbereich. (Rechts) Simulierte SPDC-Spektren der durch den Partner IOF entwickelten Photonenpaarquelle für verschiedene Kristalltemperaturen.

Nach der Berechnung der spektralen Eigenschaften der Moleküle wurden Untersuchungen zum Einfluss der Pumpimpulslänge bzw. der spektralen Breite durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese innerhalb der im Projekt verfügbaren Parameterbereiche keinen wesentlichen Einfluss auf die Absorptionswahrscheinlichkeit hat. Dies liegt daran, dass eine Verbreiterung des Pumpspektrums (also eine Verkürzung der Pulslänge) eine Verbreiterung des Zweiphotonenspektrums senkrecht zu den in Abbildung 5 eingezeichneten Linien nach sich ziehen würde. Die Korrelation zwischen den Wellenlängen von Signal- und Iderphotonen würde dadurch geschwächt. Für eine Zentralwellenlänge von 532 nm könnte dabei auf der einen Seite des Zweiphotonenspektrums die höhere Absorptionseffizienz im Maximum der Anregungsfunktion genutzt werden. Da die Verbreiterung allerdings symmetrisch erfolgt, sind andererseits aber auch wesentliche Teile des Zweiphotonenspektrums weniger effizient. Der Gesamteffekt auf die Absorptionswahrscheinlichkeit ist deshalb für moderate spektrale Breiten vernachlässigbar. Für sehr breite Pumpspektren, die über die Linienbreite der Absorption hinausgehen, wird diese dann aber wesentlich weniger effizient. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Weiteren die von den experimentellen Partnern anfangs vorgegebene spektrale Breite des Pumpasers ca. 0.1 nm für die weitere Optimierung genutzt, welche sich dann auf die Eigenschaften der Photonenpaarquelle bezog.

Der experimentell einfach einstellbare Kontrollparameter für die Photonenpaarquelle ist die

Temperatur, welche die Phasen Anpassung steuert. Damit kann das Spektrum der Signal- und Idlerphotonen kontrolliert werden. In Abbildung 5 (rechts) sind Photonenpaarspektren für die beim Partner IOF unter Nutzung von Lithiumniobat entwickelten Photonenpaarquelle für unterschiedliche Temperaturen des nichtlinearen Kristalls dargestellt. Diese sind Projektionen der zweidimensionalen Zweiphotonenspektren auf eine der beiden Frequenzachsen. Da aufgrund der geringen spektralen Breite des Anregungslasers die Zweiphotonenspektren im Wesentlichen entlang der in Abbildung 5 eingezeichneten Diagonale liegen, enthält diese Darstellung alle Informationen. Abbildung 5 (rechts) zeigt, dass, ausgehend von der Phasen anpasstemperatur für degenerierte Photonenpaare von 34.5 °C, die Spektren für steigende Temperatur zunächst breiter werden und dann in zwei Maxima aufspalten. Dies hat einen profunden Einfluss auf die erreichbare Absorptions- und Emissionswahrscheinlichkeit.

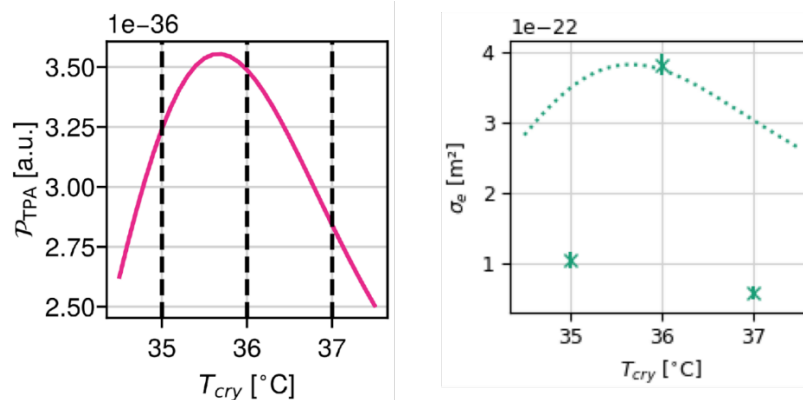


Abbildung 6: (Links) Simulierte Anregungswahrscheinlichkeit für verschiedene Kristalltemperaturen, die senkrechten Linien entsprechen den entsprechenden Spektren im vorherigen Bild. (Rechts) Vergleich des simulierten Zweiphotonenquerschnitts mit gemessenen Werten.

Abbildung 6 zeigt im linken Teil die Wahrscheinlichkeit für die Zweiphotonenabsorption für die verschiedenen Kristalltemperaturen. Diese ist zwischen 35°C und 36°C am höchsten, wo das Spektrum verbreitert ist, aber noch nicht in zwei Maxima aufspaltet. Das Maximum in der Absorptionswahrscheinlichkeit wird genau dann erreicht, wenn das Integral über das gemessene Spektrum maximal wird, da die spektrale Anregungsfunktion von Nile Red für alle Wellenlängen gleich ist. Eine diesbezügliche Optimierung von Photonenpaarquellen erhöht die Absorption und sollte auch einen entsprechenden Effekt auf die erreichbaren Fluoreszenzphotonen haben. Dies wurde durch weitere Simulationen auch für ppKTP nachgewiesen. Der rechte Teil von Abbildung 7 zeigt den Vergleich der berechneten Werte für den Absorptionsquerschnitt, welcher proportional zu Absorptionswahrscheinlichkeit ist, mit den für verschiedene Kristalltemperaturen in ppLN gemessenen Werten. Dabei konnten die berechneten Ergebnisse qualitativ bestätigt werden.

Experimentelle Arbeiten

Die experimentellen Arbeiten waren auf die Charakterisierung der Anwendbarkeit der ETPA für die Fluoreszenzmikroskopie fokussiert. Dabei sollte im ersten Schritt die durch ETPA gegenüber konventioneller Zweiphotonen-Anregung induzierte Fluoreszenzemission verglichen werden. Vor allem wurde dabei das Photobleichen betrachtet, bei welchem die zur Fluoreszenzanregung eingesetzte Laserstrahlung zu einer erhöhten Reaktivität und Zerstörung der Farbstoffe und dabei zu einem Verlust der Fluoreszenzeigenschaften führt. Darüber hinaus wurden Zellmodelle zur prinzipiellen Anwendbarkeit mit für die ETPA ausgesuchten Farbstoffen etabliert und desweiteren spektroskopische Parameter wie Intensität, Wellenlänge und Lebensdauer der Fluoreszenzemission an für die ETPA ausgesuchten Farbstoffen durchgeführt. Weiter originär geplante Realisierungen von ETPA-basierten Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten an Farbstoffen und biologischen Proben wurden aufgrund der Signalschwäche der ETPA-induzierten Fluoreszenzemission nicht weiter fortgeführt. Im Weiteren werden diese Experimente detaillierter dargestellt.

Photobleichexperimente. Da am Anfang des Projektes weder eine ETPA-Laserlichtquelle noch ein konventionelles Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung standen (Letzteres konnte erst in der Mitte der Projektlaufzeit funktionsfähig aufgestellt werden), wurden verschiedenste Photobleichexperimente mit Einphotonen-Fluoreszenzanregung aufgesetzt. Als erstes wurden verschiedene Farbstoffe auf der Oberfläche von Mikroskop-Glasdeckgläsern adsorbiert und immobilisiert und in verschiedenste Medien eingebettet. Dann wurden Fluoreszenzbilder dieser Farbstoffschicht unter Einstrahlung von unterschiedlichen Intensitäten des zur Einphotonen-Anregung verwendeten Laserlichts über die Zeit aufgenommen und die Abnahme des Fluoreszenzsignals über die Zeit als Indikator und Stärke des Photobleichens bestimmt. Abbildung 7 zeigt typische Verläufe solcher Experimente. Interessanterweise konnte dabei eine mit der Abnahme der ursprünglichen Fluoreszenz einhergehende Zunahme von blauverschobener Fluoreszenz beobachtet werden. Dieses sogenannte Photoblauen (engl. Photoblueing) wird durch Fluoreszenzemission eines durch die Photobleichreaktion modifizierten Farbstoffmoleküls mit veränderter Struktur hervorgerufen, wobei die blauverschobene Fluoreszenzemission nur durch Einsatz einer blauverschobenen Laserlichtquelle erzeugt wird.

Wir haben daraufhin verschiedene fluoreszenzspektroskopische Methoden verwendet, um diese blauverschobene Fluoreszenz zu verifizieren und dessen Eigenschaften zu charakterisieren. Vor allem haben wir durch Einsatz von Fluoreszenzlebensdauer-Messungen und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie-Daten dabei die Anzahl der fluoreszierenden Farbstoffe im Beobachtungsraum, die mittlere Helligkeit der Fluoreszenzemission eines jeden einzelnen Farbstoffmoleküls, die Population des Triplettzustands und die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt (Abbildungen 7 und 8 links). Eines der wichtigsten Ergebnisse dabei ist, dass die Helligkeit der erzeugten blauemittierenden Moleküle wesentlich geringer ist als die der originalen Farbstoffe. Diese Arbeit wurde erfolgreich und mit hohem Impact veröffentlicht (A. Dasgupta, A. Koerfer, B. Kokot, I. Urbancic, C. Eggeling, P. Carravilla. 2024. Effects and avoidance of photoconversion-induced artifacts in confocal and STED microscopy. *Nat Methods*. 21:1171–1174) sowie eine begleitende Arbeit zur Optimierung von dabei verwendeten Mikroskopiemethodiken (A. Seltmann, P. Carravilla, K. Reglinski, C. Eggeling, D. Waithe. 2024. Neural network informed photon filtering reduces fluorescence correlation spectroscopy artifacts. *Biophys J*, 123, 745-755). Die beschriebenen Messungen sind direkt auf Photobleichexperimente mit Zweiphotonen-Anregung anwendbar (z.B. mit dem im nächsten Paragraphen beschriebenen Mikroskop).

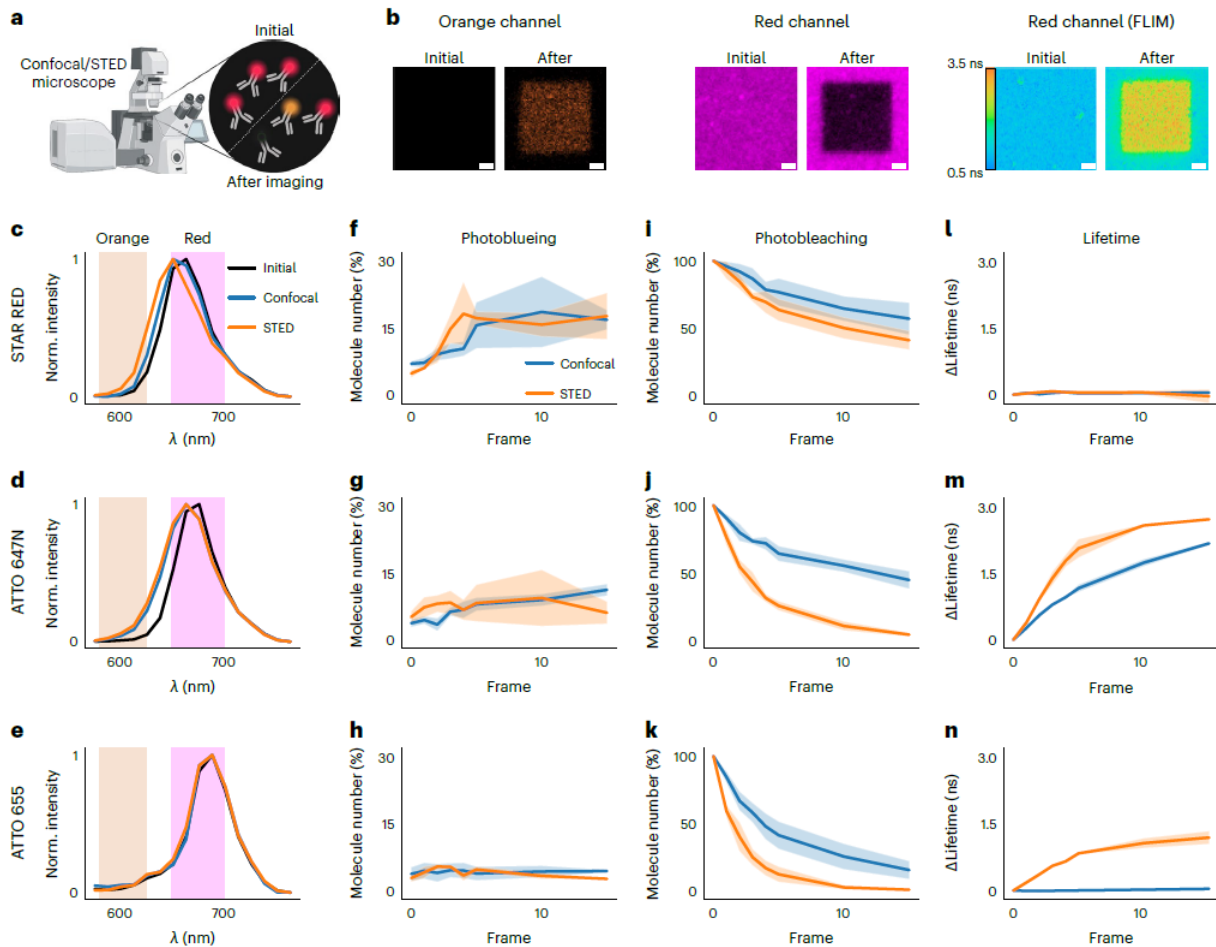


Abbildung 7: Aufgesetzte Photobleichexperimente mit Aufdeckung des Photoblauens. a) Skizzierung des Experiments: Mikroskop mit Laserbeleuchtung und Farbstoffprobe (z.B. farbstoffmarkierte Antikörper) mit Photobleichen und Photoblauen (Einsatz: oben links anfängliche rote Fluoreszenz (initial) und unten rechts gebleichte (schwarz) oder photogeblaute (orange) Fluoreszenz). b) Fluoreszenzmikroskopie-Übersichtsbild ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) einer Farbstoffschicht mit 561 nm Anregung und Detektion im orangen Wellenlängenbereich (links, orange channel) und mit 640 nm Anregung und Detektion im roten Wellenlängenbereich (mittig, Red channel) für den Farbstoff Abberior STAR Red und Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs ATTO 647N mit 640 nm Anregung und Detektion im roten Wellenlängenbereich vor (Initial, linke Fenster) und nach (After, rechte Fenster) kontinuierlicher Beleuchtung im mittleren Quadrat. Die Messung zeigen das Photobleichen (Schwärzung) des originalen rot-emittierenden Farbstoffs und das Aufkommen eines blau-emittierenden Reaktionsprodukts auf sowie eine Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer. c-e) Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe Abberior STAR RED (oben), ATTO 647N (mittig) und ATTO 655 (unten) vor (schwarz, initial) und nach kontinuierlicher Bestrahlung mit nur einem 640 nm Anregungslaser (blau, confocal) und einer kombinierten 640 nm und 775 nm Laserbestrahlung (wie in der supraaufgelösten STED-Mikroskopie üblich; orange, STED) und der Detektionswellenlängenbereich für die orange (Orange) und rote (RED) Fluoreszenzemission. Die Spektren zeigen eine Verschiebung nach orange auf (Photoblauen). f-n) Zugehörige Veränderungen der Molekülanzahlen im orangen (f-h, photogeblaute Moleküle, Photoblueing) und roten Detektionskanal (i-k, photogebleichte Moleküle, Photobleaching) und Fluoreszenzlebensdauer (l-n, Lifetime).

Zellmodelle: Es wurde ein Zellmodell mit für die ETPA-basierte Fluoreszenzmikroskopie mit entsprechend selektierten Farbstoffen etabliert. Im Detail wurden polymerische Nanopartikel (Poly(lactid-co-glycolid), PLGA, ca. 200-300 nm im Durchmesser) mit dem Farbstoff Nile Red markiert und deren Aufnahme und Auflösung in lebenden Makrophagen-Zellen über die Zeit beobachtet. Abbildung 8 (rechts) zeigt repräsentative Aufnahmen des Nile Red Farbstoffs nach Aufnahme der Nanopartikel und deren Auflösung in den Zellen. Prinzipiell wäre dieses Zellmodell ohne Einschränkungen übertragbar für ETPA-basierte Messungen.

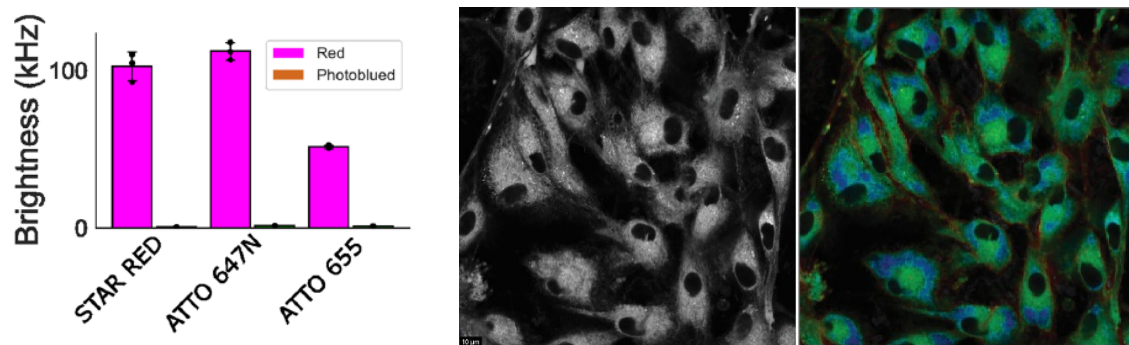


Abbildung 8: (Links) Fluoreszenzhelligkeit pro individuellem Farbstoffmolekül (Brightness in Kilohertz (kHz) Zählrate) des originalen rot-emittierenden (rot, RED) und des photogeblauten blauverschoben-emittierenden (orange, Photoblued) Farbstoffs für Abberior STAR RED, ATTO 647N und ATTO 655 in Wasser bestimmt mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, welches eine wesentlich geringere Fluoreszenzemission der photogeblauten Spezies aufzeigt. (Rechts) Zellmodell für die ETPA-basierte Fluoreszenzmikroskopie. Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von mit Nile Red markierten PLGA-Nanopartikeln nach Aufnahme und Auflösung in lebenden Makrophagen-Zellen ($100 \times 100 \mu\text{m}^2$): Fluoreszenzintensität (links, Grauskala) und Fluoreszenzlebensdauer (rechts, ansteigende Werte von blau nach grün).

Konventionelle Zweiphotonen-Anregung: Ab Ende 2023 wurde im Labor der AG Eggeling ein Zweiphotonen-Mikroskop mit verschiedensten Fluoreszenzauslese-Methoden in Betrieb genommen (Leica STELLARIS). Es wurden dann an dem für die ETPA ausgesuchten Farbstoff Nile Red konventionelle Zweiphotonenanregungs-Experimente durchgeführt. Vor allem wurde die Fluoreszenzausbeute für sehr kleine Anregungslaserleistungen vermessen und somit die Sensitivität abgeschätzt, wie kleine Fluoreszenzemissionsraten noch detektierbar sind (Abbildung 9 links). Dies zeigte auf, dass die zu erwartenden ETPA-basierten Fluoreszenzraten (aus theoretischen Berechnungen, s. oben) unterhalb der Detektionsgrenze liegt und damit die ETPA-basierte Fluoreszenzmikroskopie nicht effizient ist und nicht erfolgreich sein kann. Diese Experimente waren Teil einer projektübergreifenden Veröffentlichung (A. Krstić, T.B. Gäbler, N. Jain, P. Then, V.F. Gili, S. Saravi, F. Setzpfandt, C. Eggeling, and M. Gräfe. 2025. Enhancing entangled two-photon absorption of Nile Red via temperature-controlled SPDC. *APL Quantum*. 2:016108).

Fluoreszenzlebensdauer-Messungen: Zur Unterstützung der von den Projektpartnern M. Gräfe und T. B. Gäbler unter Einsatz von verschränkten Photonen durchgeführten Fluoreszenzlebensdauer-messungen wurde das in dem vorherigen Paragraphen vorgestellte Fluoreszenzmikroskop verwendet, um vergleichende Fluoreszenz-lebensdauer-Messungen an dem ausgewählten Farbstoff IR-140 durchzuführen. Dabei wurde jetzt konventionelle Einphotonenanregung angewendet. Zum einen lagen die ermittelten Werte der Fluoreszenzlebensdauer in einem sehr ähnlichen Bereich wie die durch die verschränkten Photonen bestimmten Werte. Zum anderen konnte für beide Ansätze eine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ausgeschlossen werden (Abbildung 9 rechts). Diese Arbeiten wurden projektübergreifend publiziert (T.B. Gäbler, P. Then, C. Eggeling, M. Gräfe, N. Jain, V. F. Gili. 2025. Benchmarking of fluorescence lifetime measurements using time-frequency correlated photons", *Methods in Microscopy*. doi.org/10.1515/mim-2025-0001).

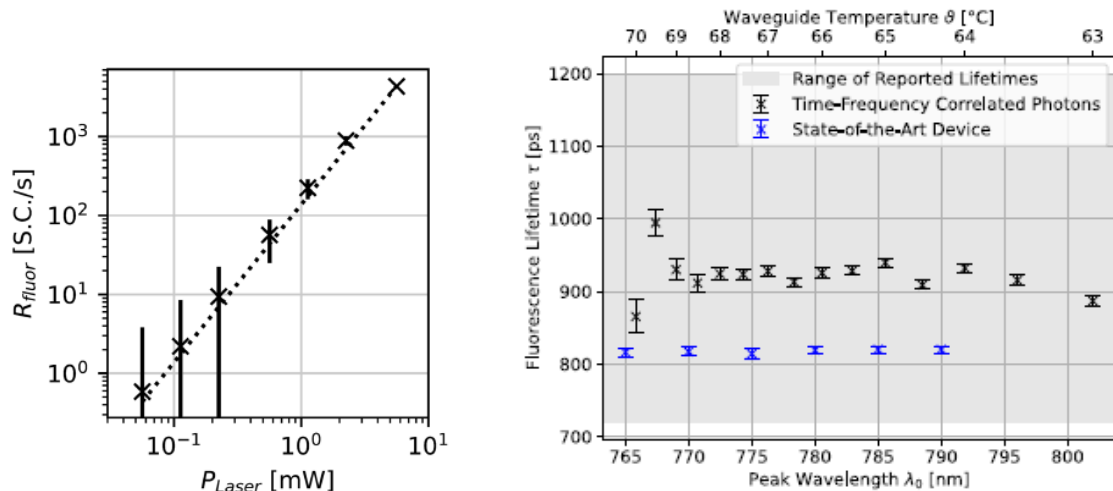


Abbildung 9: (Links) Fluoreszenzzählrate R_{fluor} (in Einzelpulsen pro Sekunde am Detektor, single counts per second, S.C./s) des Farbstoffs Nile Red in Ethanol erzeugt durch konventionelle Zweiphotonen-Anregung für verschiedene durchschnittliche Laserleistungen (P_{Laser} in Milliwatt, mW; gepulste Laseranregung mit ~ 180 fs Pulsbreiten und 80 MHz Repetitionsrate). Die gestrichelte Linie zeigt die erwartete quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von der Anregungsleistung auf. (Rechts) Fluoreszenzlebensdauerwerte (Fluorescence Lifetime; in Pikosekunden, ps) des Farbstoffes IR-140 in Ethanol für die konventionelle Einphotonenanregung (blau, State-of-the-Art Device) und für die Anregung mit verschränkten Photonen (schwarz; Time-Frequency Correlated Photons). Die Werte sind in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (Peak Wavelength, in Nanometer, nm) angegeben, welche bei der Anregung mit der verschränkten Lichtquelle durch die Temperatur des Photonenerzeugenden Kristalls gegeben ist (Waveguide Temperature in °C, obere Achse). Zum Vergleich ist die Spanne an bereits publizierten Werten für IR-140 gegeben.

Teil III: Erfolgskontrollbericht

In **AP 1** sollten zunächst Modelle für die Berechnung der Zweiphotonenabsorption entwickelt und in numerischen Methoden implementiert werden. Diese Modelle sollten nachfolgend angewendet werden, um die optimalen spektralen Parameter für die zu nutzenden Photonenpaarzustände zu finden. Dabei sollte einerseits die verwendete Pulslänge des Pumpasers, andererseits auch das Spektrum der Photonenpaare angepasst werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass zwei qualitativ unterschiedliche Regimes für die spektralen Eigenschaften der Farbstoffmoleküle existieren. Alle relevanten Farbstoffmoleküle haben einen Zwischenzustand bei höherer Energie als der angeregte Zustand, was zu einer sehr einfachen Response führt. Für diese Art von Farbstoffen konnten wir für die drei untersuchten Farbstoffe zeigen, dass die Pulslänge der Pumppulse keinen wesentlichen Einfluss auf die Absorptionswahrscheinlichkeit hat. Das Spektrum der Photonenpaare sollte für diese Moleküle sehr breit sein. Insgesamt wurden die Arbeiten in AP 1 erfolgreich durchgeführt, alle für die experimentellen Arbeiten notwendigen Parameter konnten bestimmt werden.

In **AP 3** wurden weitere theoretische Untersuchungen zur Optimierung des Spektrums der durch den Partner IOF realisierten Photonenpaarquelle durchgeführt. Ausgehend von der in AP 1 gefundenen Optimierungsregel, dass ein möglichst breites Spektrum optimal ist, wurden für die ppLN Photonenpaarquelle eine Temperaturoptimierung durchgeführt, und das für die Experimente optimal Spektrum bestimmt. Die theoretischen Ergebnisse wurden auch im Experiment bestätigt, zusammen mit den theoretischen Ergebnissen von AP 1 konnten diese veröffentlicht werden (Krstić et al 2025 *APL Quantum*. 2:016108).

Der **Halbzeitmeilenstein** nach 18 Monaten konnte erfolgreich erfüllt werden.

In **AP 4** sollte mit Fertigstellung der ersten ETPA-Laserlichtquellen deren Einkopplung und Adaptierung an existierende konfokale Labormikroskope realisiert werden. Dieses wurde erfolgreich im Labor der AG Gräfe umgesetzt und konnte zur Vermessung von ETPA-basierter Absorption und potentieller Fluoreszenzemission eingesetzt werden. Die AG Eggeling unterstützte dieses Vorhaben mit Hilfe ihrer langjährigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie vor allem in Hinblick auf Etablierung und Optimierung des Designs, des Aufbaus und der Deutung der Ergebnisse. Dieses Arbeitspaket war daher erfolgreich.

In AP5 sollten die am Demonstrationsaufbau erfolgreich getesteten ETPA-Laserlichtquellen und der zur Erzeugung von ETPA-basierter Fluoreszenz erfolgreich charakterisierten Farbstoffe und Anregungsprotokolle in Fluoreszenzmikroskope der AG Eggeling eingekoppelt werden und zur Anwendung an verschiedensten Farbstoffproben und biologischen Zellproben verwendet werden. Dabei sollte vor allem ein Vergleich der erzielten Ergebnisse mit denen an einem konventionellen Zweiphotonenmikroskop analog durchgeführten Experimenten durchgeführt werden. Da eine detektierbare ETPA-basierte Fluoreszenzemission nie erreicht wurde, konnte dieses Arbeitspaket nie erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings wurden alle geplanten Experimente zu Photobleich- und Fluoreszenzspektroskopie-Messungen und an Zellproben erfolgreich für konventionelle Fluoreszenzanregung aufgesetzt und umgesetzt und mündeten in mehreren Publikationen (Dasgupta et al 2024 *Nat Methods* 21:1171–1174; Seltmann et al 2024 *Biophys J* 123, 745-755; Krstić et al 2025 *APL Quantum* 2:016108; Gäbler et al 2025 *Methods in Microscopy* doi.org/10.1515/mim-2025-0001). Daher wurde dieses Arbeitspaket zwar erfolgreich aufgesetzt, konnte aber aufgrund der prinzipiellen negativen akkuraten Machbarkeit der ETPA-induzierten Fluoreszenzemission nicht umgesetzt werden.

Die geplanten Ausgaben wurden eingehalten. Während die Zeitplanung bei den theoretischen Arbeiten (AP 1 und 3) eingehalten wurden, war die Zeitplanung bei den experimentellen Arbeiten

aufgrund der eingeschränkten generellen Umsetzbarkeit der ETPA-induzierten Fluoreszenzanregung ausgehebelt. Es sind dennoch wichtige Ergebnisse erzielt worden, die wie angegeben wissenschaftlich publiziert wurden. Unsere Ergebnisse zeigen allerdings, dass es keine lohnenswerten weiteren wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten und keine lohnenswerte wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit gibt.