Im Zentrum des vom ZIF-geförderten Projekts „SIMMO“, welches gemeinschaftlich von der Firma PCO und dem Forschungsinstitut Leibniz-IPHT Jena erfolgreich bearbeitet wurde, stand die Entwicklung, der Aufbau, die Evaluation und Verwertung eines dedizierten Mikroskopie Moduls, welches eine einfache optische Hochauflösung ermöglicht.

Bedingt durch die mit der Coronapandemie verbundenen Lieferschwierigkeiten einiger elementarer Elektronikbauteile, sowie Verzögerungen hinsichtlich der Lieferung der neuen Kamera seitens PCO konnten nicht alle Arbeitspakete vollständig beendet werden, dennoch wurden alle im Vorfeld formulierten Ziele erreicht und eine langfristige Kooperation zwischen der Firma PCO, der Firma Nikon und dem Leibniz-IPHT initiiert. Das eigenständige SIM-Modul, welches mittels Rapid-Prototyping Verfahren (3D Druck, Laserschnitt) als Funktionsmuster derzeit charakterisiert wird, verfügt über zwei verschiedene Laserwellenlängen (488nm, 635nm) und erreicht in Zusammenspiel mit einer eigens co-entwickelten quell-offenen GPU-gestützten Mikroskopie Control- und Prozessierungssoftware („ImSwitch“) eine finale Auflösung von ca. 1.75x bei einem Gesichtsfeld von 500x500µm^2. Bei der Entwicklung des Funktionsmusters wurde, neben dem Preis der verwendeten Komponenten, ein großer Wert auf die Einfachheit eines Nachbaus seitens PCO gelegt, sodass eine effiziente wirtschaftliche Verwertung des Prototyps möglich ist. Die benutzerfreundliche Software übernimmt sowohl die Synchronisation zwischen Kamera und mustererzeugendem Element (DMD), als auch eine automatische Kalibrierung und finale Prozessierung der Daten. Eine erste Charakterisierung hinsichtlich der rekonstruierten Bildqualität von der neuen von PCO entwickelten rauschnormierten Kompression der Bilddaten, lässt eine minimale Beeinträchtigung der optischen Auflösung vermuten. Vorteilhaft hierbei wäre eine erhöhte Geschwindigkeit bei der Bildgebung, um Lebendzellvorgänge noch besser in Echtzeit abbilden zu können.

Add nikon advertisment from pco

Schwierigkeiten:

* DMD Verfügbarkeit
* Verfügbarkeit Elektronike / Chipkrise
* DMD:
  + Ansteuerung/Triggering nicht so schnell wie gedacht
  + RAM für PAtternerzeugung nicht verfügbar
  + Alternative geräte deutlich teurer
  + Pixeladdressierung erhöhte Schwierigkeit
* Laser
  + verfügbarkeit defekt und mangelnder Nachschub,
  + Kostenvergleich:
    - Multimode vs. Singlemode (Speckle, Despeckling, Kollimationsgrad? Vibration, )
    - Günstig vs. Teuer
  + Effizienz:
    - Belelichtungszeit sehr lang durch schlechte Effizienz in der DMD Ebene (Blazed Grating)
    - Laserleistung (50mW) relativ gering
    - Orderstrength:
      * Bedingt durch Pixelgeometrie vom DMD

Technische Umsetzung:

* Funktionsmuster
  + Thorlabskomponentan am Nikon Mikroskop
  + HDMI Ansteuerung
* Prototyp
  + Laserschnitt für Gehäuse
  + Trigger für Kamerasynchronisierung
  + Software: Micromanager
* Software:
  + CPU-gestützte Rekonstruktion mittels fairSIM/
    - Realtime processing nicht möglich da synchronisierung nicht mölgich war, software nicht optimiert
  + Wir haben eine neue GPU-basierte Version in Python implementiert => ImSwitch
* Kamera
  + Geschwindigkeitegewinn durch Kompressionsschritt:
    - Qualitätsgewinn?
  + Großes Gesichtsfeld
    - Pico 26, large-scale SIM bei 20x, NA=0.75, 400x400 µm
  + Multicolour:
    - Edge4, 60x

Errungenschaften:

* DMD:
  + Theoretische Modellierung von DMD Adressierung
  + Effizienzsteigerung von Mustererzeugung mittels neuer numerischer Verfahren (Brown et al. )
  + Multicolour mit ienem DMD nicht mit mehreen Modulen, kosteneffizient!
* Publikation:
  + Präsentation, SIMPosium
  + Publikation: Wang et al. 2022
* Nikon:
  + Interessensbekundung
  + Unterstützung mittels Stativ
  + Kooperationspartner
  + Sampling problem mit Tubuslinse, Verzögerung in der Lieferung

3

**1. Beabsichtigte technologische Entwicklung von Produkten, Verfahren oder Dienstleistungen**

**Ziel des Projektes**

Aufbau eines DMD-basierten (Digital Mirror Device) SIM (Structured Illumination Microscopy) Modules mit wissenschaftlicher Kamera, welches kompakt und kostengünstig ist. Es soll flexibel als Subsystem an kommerziell verfügbaren inversen Mikroskopen (Zeiss, Olympus, Leica und Nikon) eingesetzt werden können.

**Abb. 1:** Kooperations-/Arbeitsplan des geplanten Konsortiums.

Hierbei wird die einzusetzende Kamera im Hinblick auf die Synchronisation der Bildaufnahme, Geschwindigkeit der Datenübertragung und eine mögliche Kamera spezifische Datenkompression speziell auf das SIM System abgestimmt, so dass eine Auswertung in Echtzeit auf einem Computer durchgeführt werden kann und dem Anwender die resultierenden Bilder mit minimaler

**Abb. 2:** Prinzipaufbau des DMD basierten SIMMO-Systems mit der SIM-Modul Einkopplung der Fluroeszenzanregung in die Probe und der Detektion der Fluoreszenzemission über eine wissenschaftliche Kamera als Bestandteil des SIMMO-Systems

Verzögerung sofort zur Verfügung stehen. Zudem sollen für das SIMMO System mit Hilfe von geeigneter Software Benutzerschnittstellen für frei verfügbare Software Pakete wie Micromanager, FairSIM oder Fiji erstellt werden, um eine weiten und einfachen Einsatz zu ermöglichen.

**2. Angestrebte technische Funktionalitäten und relevante Parameter**

Folgende Eigenschaften der zu entwickelnden Methodik werden dabei angestrebt:

1. Innovative Kernelemente des SIM basieren auf preiswerten DMD‘s und Lichtquellen.

2. Erhöhung des Auflösungsvermögens gegenüber Abbe - auflösungsbegrenzten Mikroskopie Verfahren um den Faktor 1.8.

3. kompaktes Design des SIM Modules.

4. Untersuchung und Erstellung einer universellen, flexibel anzupassenden opto-mechanischen Kopplung des SIM-Lichts in die Stative der verschiedenen Mikroskop-Hersteller.

5. Einsatz eines neuartigen, schnellen, hochauflösenden (10 MPixel) und rückwärtig beleuchteten sCMOS Bildsensors.

6. Untersuchung der Möglichkeit von Bilddaten-Kompressionsverfahren und ihres Einflusses auf die SIM

7. Untersuchung der möglichen Bilddatenvorverarbeitung und – kompression mit Hilfe von Kamera spezifischen Parametern (wie z.B. Rauschverhalten) zur Beschleunigung der SIM-Bilddatenverarbeitung.

8. Anpassung des Kamera Software Development Kits (SDK) im Hinblick auf einer Beschleunigung der Bilddatenverarbeitung.

9. Nutzung von GPU im Computer für die parallele sehr schnelle Auswertung und Darstellung der hochaufgelösten Bilder.

10. Anpassung der Auswertesoftware an Änderungen relevanter Systemparameter, wie Dejustage und Berücksichtigung nicht-optimaler Optiken mit adaptiven Entfaltungsalgorithmen (z.B. automatische Parameterabschätzung, Blind-Deconvolution)

11. Integration der SIM Auswertesoftware in Open-Source GUI’s für die Steuerung des SIM Modules und die Darstellung der hochaufgelösten Bilder.

12. Integration der SIM-Modul Ansteuerung und der Kamera-Ansteuerung in ein Gesamtsystemkonzept, welches einen möglichst einfachen Einsatz des SIMMO-Systems in der Anwendung ermöglichen soll.

13. Ein hochauflösendes SIM-System als neues, kostengünstiges Add-On-Werkzeug für biologische Fragestellungen in bestehenden inversen Mikroskop-Systemen

**3. Führende Konkurrenzprodukte/-verfahren, internationaler Stand der Technik unter**

**. Erhebliche technische Risiken des FuE-Projektes**

• Das universelle opto-mechanische Design hängt auch von der Verfügbarkeit der Informationen über Abmessungen und Optik der verschiedenen Mikroskop-Hersteller ab. Von daher kann es sein, dass die Auswahlmöglichkeiten möglicherweise am Ende des Projekts erst einmal geringer sind.

• Einfach für die Benutzerin/den Benutzer zu verwendende Einrichtung des Systems für eine konstant hohe Bildqualtität ist schwer zu erreichen/Nutzerfreundlichkeit

• Echtzeit-kompatible Ansteuerung der einzelnen Elemente wie Kamera und Display, sowie Synchronisation der Rekonstruktionssoftware

• Es ist unbekannt, ob die Vorabkompression der Bilddaten die SIM Bilddatenverarbeitung negativ beeinflusst oder nicht. Davon wird es abhängen, ob eine Beschleunigung der SIM Bilddatenverarbeitung mit Hilfe einer Kompression zu erreichen ist oder nicht.

• Es ist unbekannt ob der neuartige hochauflösende Bildsensor empfindlich und schnell genug

für den geplanten Einsatz im SIMMO System ist und ob die Kamera kostengünstig genug hergestellt werden kann. Von daher sollen auch existierende kostengünstige sCMOS Kameras eingesetzt werden.

• robuster und für den Nutzer/die Nutzerin intuitiver Algorithmus der adaptiv auf etwaige Abbildungsfehler eingeht und diese korrigiert

• Kompakteres optisches Design (Verwendung 20cm Linsen statt 50cm Linsen) kann Aberrationen erzeugen, welche nicht mehr tolerabel sind

• Klärung der Lizenzierung/Patentierung anderer Projekte

• Die Patentlage in Bezug auf SIM-Muster, SIM-Algorithmen und deren Einsatz muss untersucht werden.

7

**5. Wirtschaftliche Risiken des FuE-Projektes**

Die wirtschaftlichen Risiken für das IPHT sind gering. Sie beschränken sich darauf, dass bei Ausbleiben eines kompletten Erfolges die Mittel, die zur Entwicklung des SIM Modules + Software verwendet wurden, keine spätere Verwertung in Form von Anschlussprojekten und -Entwicklungsaufträgen generieren werden.

Für PCO gibt es zum einen ein wirtschaftliches Risiko, dass das geplante SIM-Modul mit Kamera sich nicht so günstig produzieren lässt wie beabsichtigt. Dies würde eine im Anschluss an das Projekt stattfindende Verwertung beeinträchtigen, so dass die beabsichtigten Einsatzgebiete überdacht werden müssten. Ein zweites Risiko besteht darin, dass die geplante Flexibilität im Hinblick auf den Anschluss an die Mikroskop-Stative verschiedener Hersteller nicht erreicht wird. Dies würde für die im Anschluss an das Projekt geplante Verwertung bedeuten, dass zu Beginn der erreichbare Absatzmarkt eingeschränkt würde.

**6. Anteil des Antragstellers am gesamten Vorhaben, Charakterisierung des innovativen Kerns des Teilprojektes und Abgrenzung zu den anderen Teilprojekten**

Das IPHT stellt mit dem Design des SIM Modules und der Erstellung der Auswerte- und Bedienungssoftware einen wesentlichen Kernpunkt des Gesamtkonzepts. Sowohl die Gittererzeugung und die kompakte Ausfilterung der 1. Beugungsordnungen, als auch die Einkopplung der 1. Beugungsordnungen in die verschiedenen Mikroskope und die Synchronisation der Gitterbilder mit der Kameradetektionszeit sind für die das neue SIM Modul unentbehrlich. Auch die Integration der Auswerte- und Steuerungssoftware in eine GUI Oberfläche erhöhen wesentlich die Bedienerfreundlichkeit des Modules. Deswegen bildet der IPHT Teilvorhaben einen der innovativen Kerne des Gesamtvorhabens.

**Detaillierte Darstellung der Arbeitspakete des IPHT:**

**AP 1: universelles optisches Design des SIM Modules**

Design und Aufbau eines SIM Modules mit Rapid Prototyping:

• Simulation:

8

o Konzept für Optik-Design: Abbildung eines Gitters in die Probenebene bei verschiedenen Objektiv- und Tubus Linsen-konfigurationen

o Abschätzung des Fehlers bei Verwendung von Mikroskopen verschiedener Hersteller

o Auswahl der verwendeten Fluorophore/Laserwellenlänge

• Verifikation o Experimentelle Verifikation der simulierten Ergebnisse:

o Anpassung der vorhandenen Mikroskop-Stative an die Aufgabenstellung

o Aufbau eines ersten optischen Aufbaus (kein Modul)

o Erzeugung von Bildern für die Gitterstrukturen

o Ansteuerung des DMD’s mit einem Rechner, Erzeugung der 1.Ordnungen

o Aufbau der Optik für die Einkopplung der ± 1. Ordnungen in das jeweilige Mikroskop

• Prototyp/Funktionsmuster o Aufbau der Elektronik für die zeitliche Synchronisation von Kameraaufnahme und DMD Gitterstrukturerzeugung

o Anfertigung eines monolithisch 3D gedruckten Moduls, welches sämtliche Komponenten beinhaltet und als Modul an ein Mikroskop angebracht werden soll

• Fertigstellung o Test Funktion des SIM Modules für Zeiss und Olympus Mikroskope

o Funktionstest an biologischen Proben

**AP 4: GPU basierte Auswertung der Rohbilder vom SIM / Open Sourc GUI Integration**

Entwicklung einer geeigneten GPU basierenden Rekonstruktionssoftware:

• Umschreiben / Erweitern des Python-Codes für GPU basierte Rekonstruktion

• Nutzung verschiedener Entfaltungsmethoden der Maximum-Likelihood-Theorie, um das systembedingte gute Signal-Rauschverhältnis für die weitere Verfeinerung der Hochauflösung optimal einzusetzen und gleichzeitig SIM Parameter optimal zu schätzen

• Test der Auflösungsverbesserung an künstlich hergestellten Testproben

Steuerung des SIM Moduls über Open-Source GUI (Micro Manager):

9

• Etablierung einer GUI für Parametereingabe im SIM Mode

• Darstellung der rekonstruierten Bilder in optimierten Open-Source GUI?

• Systemtest der erstellten Software

**7. Möglichkeit und Notwendigkeit des FuE-Projektes für den Antragsteller**

Das IPHT verfügt mit den vorhandenen technischen Herstellungsmöglichkeiten und der Erfahrung auf dem Feld der SIM Mikroskopie über den notwendigen technologischen Background und die entsprechende Infrastruktur. Auf dem Feld der SIM Mikroskopie und der Erstellung der Auswertesoftware blickt die AG Heintzmann auf über 20-jährige Erfahrungen zurück [1]. Unter anderem wurden in der Arbeitsgruppe verschiedene SIM Laboraufbauten (Siehe Abb.3 links), (z.B. [2-5]) und kompakte SIM-Module für Ausbildungszwecke auf Plastestativbasis (Siehe Abb.4) (analog [6]) gebaut und Rekonstruktionssoftware in Matlab und Python implementiert (Ergebnis der Bildrekonstruktion Siehe Abb. 3 rechts).

**Abb.3 links:** Laboraufbau eines SIM Mikroskopes für Region-of-Interest (ROI) - SIM **rechts:** Oben: 50 μm ROI Bild - Rohdaten (links) und rekonstruiertes Bild (rechts), Mitte: zoom in die Details Unten: Intensität entlang der rechten roten Linie in der Mitte zeigt die Auflösungsverbesserung (2 fluoreszierende 80 nm „Beads“ sind zu erkennen.

10

**Abb.4:** Open-SIM Modul auf Plastikstativbasis und mit preiswerten DMD / Lichtquellen mit begrenzter Auflösungsverbesserung für Ausbildungszwecke, aufgebaut am IPHT.

Die erfolgreiche Bearbeitung des Gesamtvorhabens erweitert das Know-How des IPHT auf dem Feld der SIM Mikroskopie für Standard Mikroskop Nutzer. Dadurch können neue wissenschaftliche Fragestellungen erörtert werden, welche zu neuen zukünftigen Projektanträgen führen.

**8. Fachliche Eignung des eingeplanten Personals**

Die für die Bearbeitung des Teilprojekts beinhaltende Arbeitspakete vorgesehenen Mitarbeiter sind seit 2, bzw. 3 Jahren auf dem Gebiet der Herstellung von Hardware und Software für die SIM Mikroskopie involviert. Deswegen besitzen sie die notwendige Erfahrung und Kompetenz zur erfolgreichen Bearbeitung des IPHT-Teilprojektes und somit auch das Gesamtvorhabens.

11

**Konzept zur Erfolgskontrolle bis zur Markteinführung**

**1. Definition von eindeutigen technischen und wirtschaftlichen Zielkriterien**

Entfällt für das IPHT

**2. Definition von Meilensteinen, wann diese Kriterien erreicht werden sollen**

Entfällt für das IPHT

**3. Beabsichtigte Maßnahmen zur Markteinführung**

Im Rahmen des Vorhabens sind zahlreiche Präsentationen **f**ür Fachpublikum auf Messen, und auf inhaltlich zugeordneten Konferenzen (z.B. SPIE, ISEV…) geplant, die einen Markteinführung aktiv unterstützen. Zusätzlich sollte die Sichtbarkeit der Technologie in der Kooperation mit dem Gerätehersteller an verschiedenen Messen präsentiert werden.

**4. Angezielte Märkte und angestrebte Marktanteile**

Entfällt für das IPHT

**Referenzen**

[a] https://www.genewsroom.com/press-releases/ge-healthcare-launches-super-resolution-microscope

[b] https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/hochaufloesungs-mikroskopie-.html

[c] https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/super-resolution-microscopes/n-sim-s

[d] https://oni.bio/techniques

[e] http://www.aurox.co.uk/

[f] http://www.confocal.nl/

[1] https://sites.google.com/site/heintzmann/publications/2016

[2] R. Heintzmann, T. Huser, Super-Resolution Structured Illumination Microscopy, Chem. Rev. 117, 13890–13908, 2017, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00218

[3] L. Song, H.-W. Lu-Walter, R. Förster, R. Heintzmann, Fast structured illumination microscopy using rolling shutter cameras, *Measurement Science and Technology* **27**(5):055401, 2016

12

[4] Müller, M., Mönkemöller, V., Hennig, S. *et al.* Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ. *Nat Commun* **7,** 10980 (2016) doi:10.1038/ncomms10980

[5] Schermelleh, Lothar, Rainer Heintzmann, and Heinrich Leonhardt. "A guide to super-resolution fluorescence microscopy." The Journal of Cell Biology 190.2 (2010): 165-175. Web. 27 Nov. 2019.

[6] DMD-based super-resolution structured illumination microscopy visualizes live cell dynamics at high speed and low cost, Alice Sandmeyer, Mario Lachetta, Hauke Sandmeyer, Wolfgang Hübner, Thomas Huser, Marcel Müller, bioRxiv