

## Projektplan

### ***NanoSpeck3D: Nanoskopie mit wiederholbaren Speckle-Mustern zur 3D-Rekonstruktion (22462 BR)***

#### **Forschungsziel**

Eine schnelle und nanometergenaue 3D-Darstellung lebender Zellen oder größerer Organismen ist derzeit mit keiner fluoreszenzbasierten hochauflösenden Mikroskopietechnik möglich. In NanoSpeck3D soll ein kompaktes und kostengünstiges Mikroskopiemodul entwickelt werden, das Intravitalmikroskopie mit  $< 50$  nm lateraler und  $< 100$  nm axialer, sowie einer Sekunde zeitlicher Auflösung in einem ausgedehnten Volumen und ohne chemisch-toxische Vorbereitung der Probe ermöglicht. Methodische Grundlage soll die strukturierte Beleuchtung der Probe mit mehreren und wiederholbaren überlagerten statistischen Mustern (Speckles) verschiedener Wellenlänge sowie die nichtlineare Antwort der Fluorophore sein.

Durch das hier vorgeschlagene Verfahren käme es zu keiner Überabtastung und somit zu einer signifikanten Reduktion der Phototoxizität, was insbesondere für Lebendzell-Mikroskopie bzw. Intravitalmikroskopie essenziell ist. Somit könnten biologische Signalprozesse und dynamische Zellorganellen in Echtzeit über lange Beobachtungsdauern dreidimensional-hochaufgelöst dargestellt werden. Als Beispiel können hier Plastizitätsprozesse in Neuronen angeführt werden, bei denen eine hochaufgelöste Darstellung synaptischer Membranen und Proteine und deren Lokalisationsänderungen über mehrere Stunden erfolgen muss. Auch die unmittelbaren Auswirkungen von z.B. pharmakologischen Interventionen solcher Signalwege würden untersuchbar werden, was direkte Implikationen für die Erforschung verbesserter Therapieansätze hätte [Par21], beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen des Gehirns.

Alle genannten Anwendungen sind sowohl für die mikroskopische Grundlagenforschung, in der Applikation insbesondere für die Lebenswissenschaften, als auch translational für die Entwicklung von Diagnose- und Therapieverfahren relevant. Damit können sowohl Komponenten- und Mikroskop-Hersteller an einer kommerziellen Nutzung des zu entwickelnden Moduls interessiert sein, wie auch Biotechnologie- und Pharmaunternehmen an der Anwendung der Methode [Par21]. Besonders interessant ist das hier vorgestellte Konzept für Anwender von Mikroskopen, die ein vorhandenes System durch ein derartiges Modul aufwerten wollen, was das Verwertungspotential nochmals erhöhen dürfte. Perspektivisch ist ein Ausbau der Technologie in Richtung des FLIN-Prinzips (fluorescence lifetime imaging nanoscopy) möglich.

## Arbeitsdiagramm

Arbeitspaket	Zeitraum																								
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
AP1 – Definition und Beschaffung der Komponenten	■	■	■	■	■																				
AP2 – Entwicklung des Kalibrierkonzeptes der 3D-Messung für die Mikroskopie		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					■	■								
AP3 – Entwicklung des Beleuchtungsmoduls				■	■	■	■	■	■	■	■														
AP4 – Integration des Beleuchtungsmoduls in ein Mikroskopsystems											■	■	■	■	■	■	■	■							
AP5 – Charakterisierung des mikroskopischen Systems																		■	■	■	■	■	■	■	■
Meilensteine																									

**MS 1** = Beschaffung der Komponenten, welche das projektspezifischen Anforderungsprofils an die Parameter des Beleuchtungsmoduls erfüllen

**MS 2** = Die Anpassung und die Implementierung des makroskopischen 3D Rekonstruktionsprozesses für die nanoskopische 3D Erfassung und die Entwicklung des Beleuchtungsmoduls wurde erfolgreich durchgeführt.

**MS3** = Das Beleuchtungsmodul konnte erfolgreich in ein Mikroskopiesystem integriert werden. Die Überlegungen zur Reduktion der effektiven Beleuchtungsfläche wurden gezeigt.

### Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

Im Projekt NanoSpeck3D soll ein kosteneffizientes Mikroskop auf Basis einer Speckle-Beleuchtung im Bereich der super-resolution Mikroskopie für die 2D als auch 3D Vermessung von biologischen Proben entwickelt werden. Als Basis zur Realisierung dient eine im Vorfeld angefertigte Anforderungsanalyse (AP1) an die verschiedenen Parameter des Systems. Auf Grundlage der Anforderungsanalyse wird das Beleuchtungsmodul (AP3), welches aus einem Lasermodul und einer Strahlformungseinheit besteht konzeptioniert und konstruiert. Für das Lasermodul werden einerseits konventionelle Festkörperlaser (DPPS)-Systeme und andererseits kosteneffiziente Diodenlaser-Systeme verwendet. Hierbei werden folgende Ziele verfolgt:

- Erreichung einer hohen Ausgangsleistung (> 400mW)
- Homogenes Strahlprofil.

Für die Konstruktion der Einheit zur Erzeugung der Beleuchtungsstruktur (z.B.: Speckle) werden folgende Parameter berücksichtigt:

- Schaltgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Beleuchtungsstrukturen
- Leistungsverlust des Laserstrahls durch die Erzeugung der Beleuchtungsstruktur

- Wiederholbarkeit der Beleuchtungsstrukturen.

Hierfür werden verschiedene Einheiten entwickelt und im Labormaßstab aufgebaut. Mit Hilfe dieser Aufbauten werden dann die oben genannten Parameter verglichen, um eine Finale-Variante der Einheit zur Erzeugung der Beleuchtungsstrukturen zu konstruieren. Die verwendeten Ansätze sind zum Beispiel die rotatorische oder translatorische Bewegung eines phasenschiebenden Elements, die Nutzung von Scan-Spiegeln zum Abrastern eines phasenschiebenden Elements oder die Verwendung von *Spatial Light* Modulatoren (SLM).

Für die 3D Rekonstruktion wird ein im makroskopischen Raum angewendeter Algorithmus in den nanoskopischen Raum übertragen und für die Auswertung von mikroskopischen Bildern angepasst. Hierfür wird eine exakte Abtastung der Beleuchtungsmuster entlang seiner z-Koordinate durchgeführt. Für diese Abtastung wird ein Piezotisch mit einer Genauigkeit von ~ 1nm benötigt.

In einem vorletzten Schritt werden alle Module und Software-Anwendungen in ein mikroskopisches System implementiert. Die Parameter werden anhand von definierten Proben mit den vorher festgelegten Zielparametern verglichen und somit die Funktionsfähigkeit des Demonstrators überprüft. Mit Erreichen der Funktionsfähigkeit wird der Demonstrator im letzten Schritt an verschiedenen biologischen Proben aus verschiedenen Anwendungsbereichen getestet.

### **Nutzen und wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas**

Das Projekt beinhaltet die Konstruktion von Komponenten für den Aufbau eines neuartigen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskops für den geplanten Einsatz im lebenswissenschaftlichen Bereich und ist somit der Optik und der Medizintechnik zuzuordnen. Im Erfolgsfall wäre eine dreidimensional höchstauflösende Fluoreszenzrekonstruktion innerhalb kurzer Aufnahmezeiten mit geringem technischem Aufwand und ohne chemisch-toxische Vorbereitung der Proben im Nanometerbereich an lebenden Zellen möglich. Darüber hinaus wird eine deutlich gesteigerte axiale Auflösung angestrebt, die diese Technik zusätzlich von Verfahren wie (3D)-SIM und (3D)-SOFI abheben würde. Ferner wäre durch die wiederholbaren statistischen Muster perspektivisch ein Ausbau der Technologie in weitere Untersuchungsbereiche wie zum Beispiel die FLIN Nanoskopie möglich, was das Anwendungsspektrum noch einmal enorm erweitern würde. Durch die erfolgreiche Realisierung des hier vorgeschlagenen Verfahrens käme es zu keiner Überabtastung des Probenvolumens und somit zur signifikanten Reduktion der Phototoxizität, was insbesondere für Lebendzell-Mikroskopie bzw. Intravitalmikroskopie erforderlich ist. Somit könnten eine breite Spanne von dynamischen biologischen Prozesse in Echtzeit über lange Beobachtungsdauern dreidimensional und nanometergenau dargestellt werden. Insbesondere diagnostische Anwendungen auf der Nano-Ebene, z.B. pharmakologische Interventionen in Modellsystemen oder in ex-vivo Präparationen von Versuchstieren, mit direkten Implikationen für die Erforschung verbesserter Therapieansätze, bieten ein diverses und umfassendes Anwendungsspektrum. Mögliche Anwendungen sind somit sowohl für die mikroskopische Grundlagenforschung, in der Applikation insbesondere für die Lebenswissenschaften, als auch translational für die Entwicklung von Diagnose- und Therapieverfahren relevant. Damit können sowohl Mikroskop- sowie Komponenten-Hersteller an einer kommerziellen Nutzung des zu entwickelnden Moduls interessiert sein, als auch Biotechnologie- und Pharmaunternehmen an der Anwendung der

Methode. Insbesondere für Anwender von Mikroskopen, die ein vorhandenes System durch ein derartiges Modul aufwerten wollen, ist das hier vorgestellte Konzept interessant und birgt so ein hohes Verwertungspotential. Unterstützt wird dies insbesondere durch die Kompaktheit des Moduls, sowie die um mindestens eine Größenordnung reduzierten Kosten zur Erstellung des Moduls, verglichen mit existierenden Systemen des kommerziellen SRM Spektrums.

### Projektbegleitender Ausschuss

Unternehmen
ALS Automated Lab Solutions GmbH <small>KMU</small>
Aspericon GmbH <small>KMU</small>
ATTO-TEC GmbH <small>KMU</small>
Carl Zeiss AG & Carl zeiss Microscopy GmbH
GATTAquant GmbH <small>KMU</small>
Grintech GmbH <small>KMU</small>
Holoeye Photonics AG
Jenoptik Optical Systems GmbH
Lasertack GmbH <small>KMU</small>
Layertec GmbH <small>KMU</small>
Optics Balzers Jena GmbH
Piezosystem Jena GmbH <small>KMU</small>
POG Präzisionsoptik Gera GmbH <small>KMU</small>
Wienecke & Sinske GmbH <small>KMU</small>

*Das IGF-Vorhaben Nr. 22462 BR der Forschungsvereinigung Feinmechanik, Optik und Medizintechnik wird über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.*