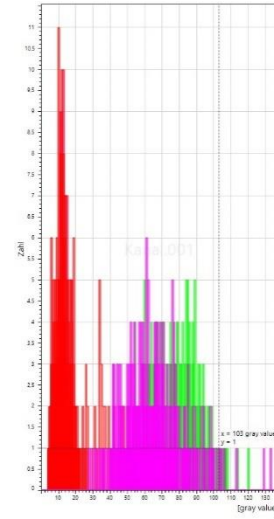
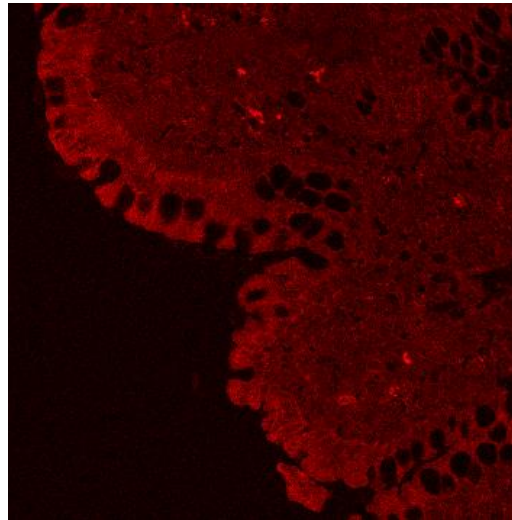
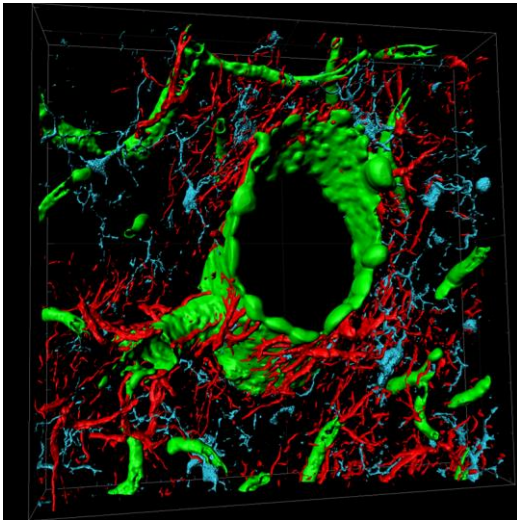


## Herausforderungen und Techniken der fluoreszenzmikroskopischen Bildgebung und Analyse

Online-Seminar – 8. Juni 2021



**PD Dr. Johannes Kacza**  
Bioluminescence Core Facility  
Sächsischer Inkubator für klinische Translation / SIKT  
Veterinärmedizinische Fakultät / VMF  
Philipp-Rosenthal-Straße 55  
04103 Leipzig  
Tel.: 49 341 97-39475  
E-Mail: [kacza@vetmed.uni-leipzig.de](mailto:kacza@vetmed.uni-leipzig.de)

[https://bioimaging.uni-leipzig.de/home\\_en.html](https://bioimaging.uni-leipzig.de/home_en.html)

## Struktur

- Virtuelle Core Facility der Fakultät für Lebenswissenschaften und der Veterinärmedizinischen Fakultät

## Anwendungen und Ziele

- Mikroskope für fluoreszenzmikroskopische 3D/4D-Bildgebung, Live Cell Imaging und spezielle Messtechniken
- High-End-Software für Abbildungsfehlerkorrektur (Deconvolution), 3D/4D-Visualisierung und Auswertung
- Multidiziplinäre und geräteübergreifende Expertise für Anwendungen fluoreszenzmikroskopischer Bildgebung
- Beratung, Auswertungskonzeption, Geräteeinweisungen

## Fluoreszenzmikroskope

- Confocal Laser-Scanning-Microscopy (CLSM), Spinning Disk, Structured-Illumination Microscopy (SIM), STED

## Weitere Geräte

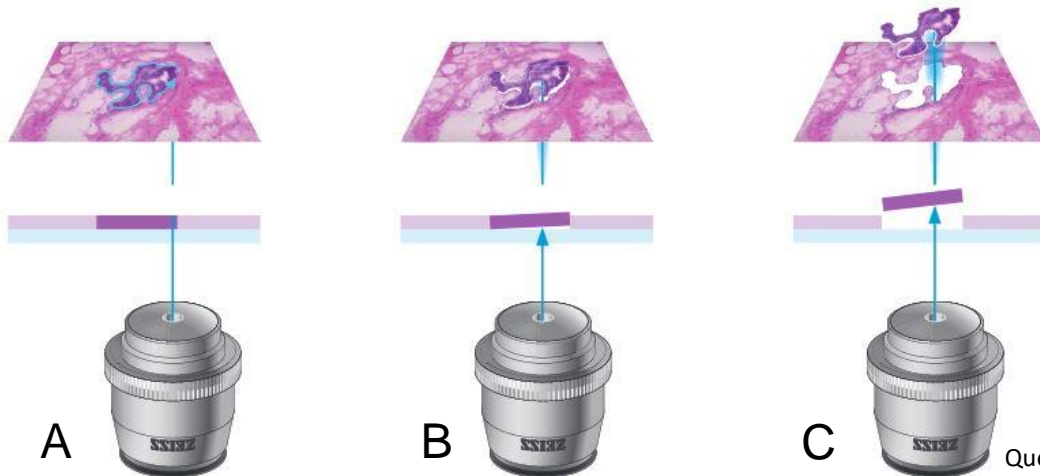
- Incucyte Zoom Life Imaging (Scratch Assays), Cell Capture System, Workstations

Mikroskope für 3D/4D	Merkmale	Anwendungen	Standort
<b>Leica SP8</b> <i>inverses Stativ</i>	Zusätzl. Stage für <b>xz-Scans</b> , <b>8 kHz-Scanner</b> , hochempfindliche <b>Hybrid-Detektoren</b> , Virtual Slide Operation, 2 Top-Stage-Inkubatoren (schnelle z-Scans beim LCI)	<b>LCI mit infektiösem Material (S2)</b> , Zeitserien, <b>Photon Counting</b> , Focus Map, <b>Calcium Imaging</b>	VMF / Veterinär-Anatomisches Institut
<b>Leica SP8 FALCON</b> <i>inverses Stativ</i>	Zusätzl. Stage für xz-Scans, 8 kHz-Scanner, hochempfindliche Hybrid-Detektoren, Virtual Slide Operation, Top-Stage-Inkubator, <b>gepulster 470 nm Laser</b> (FLIM)	LCI, Zeitserien, Photon Counting, Focus Map, <b>FLIM, FRET, FRAP</b>	Lebenswissenschaften / Institut für Biochemie
<b>Zeiss LSM 780 AiryScan</b> <i>inverses Stativ</i>	<b>AiryScan-Modul</b> für höhere Auflösung, <b>100x/1.57 Oil-Objektiv</b>	<b>Super Resolution Microscopy</b> , Zeitserien, Photon Counting, FRAP	SIKT
<b>Zeiss LSM 800</b> <i>aufrechtes Stativ</i>	<b>16x Oil Objektiv</b> , Inkubationssystem	LCI, Zeitserien	Lebenswissenschaften / Institut für Biologie
<b>Zeiss Spinning Disc</b> <i>inverses Stativ</i>	Disc Speed 1.500 – 5.000 U/min, <b>Abgedunkeltes Inkubationssystem</b>	<b>Schnelle Mosaik-Scans</b> mit fester Auflösung, LCI, Zeitserien, FRAP	SIKT
<b>Zeiss Apotome</b> <i>aufrechtes Stativ</i>	<b>Structured Illumination Microscope</b> , RGB- und SW-Kamera, 100x/1.46 Oil-Objektiv	<b>schnelle Aufnahmen, Z-Stacks</b> mit fester Auflösung	SIKT
<b>Zeiss Axioplan Imaging</b> <i>aufrechtes Stativ</i>	Structured Illumination Microscope, RGB- und SW-Kamera, <b>programmierbare Tisch- und Kamerasteuerung</b>	<b>individuell programmierte Aufnahmeroutinen</b> für Weitfeldmikroskopie (Hellfeld, Fluoreszenz)	SIKT

LCI: Live Cell Imaging  
Photon Counting: Intensitätsmessungen durch Photonen-zählung

FLIM: Fluorescence Life Time Microscopy (Unterscheidung verschiedener Fluorophore)  
FRET: Förster Resonance Energy Transfer Microscopy (molekulare Abstandmessungen)  
FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching (Abbildung von Diffusionsprozessen)

Spezielle Systeme	Merkmale	Anwendungen	Standort
<b>IncuCyte Zoom</b> <i>inverses Stativ</i>	Epilfluoreszenzmikroskop, LCI, automatisierter Inkubator mit Bildaufzeichnung für Multiwell-Plates	<b>Cell Migration, Scratch</b> and <b>Wound Assays</b>	SIKT
<b>Zeiss PALM Microbeam</b> <i>inverses Stativ</i>	<b>Laser Microdissection System</b>	<b>Visuell kontrolliertes Laser-Schneiden</b> von Gewebeschnitten für weitere Untersuchungen	SIKT

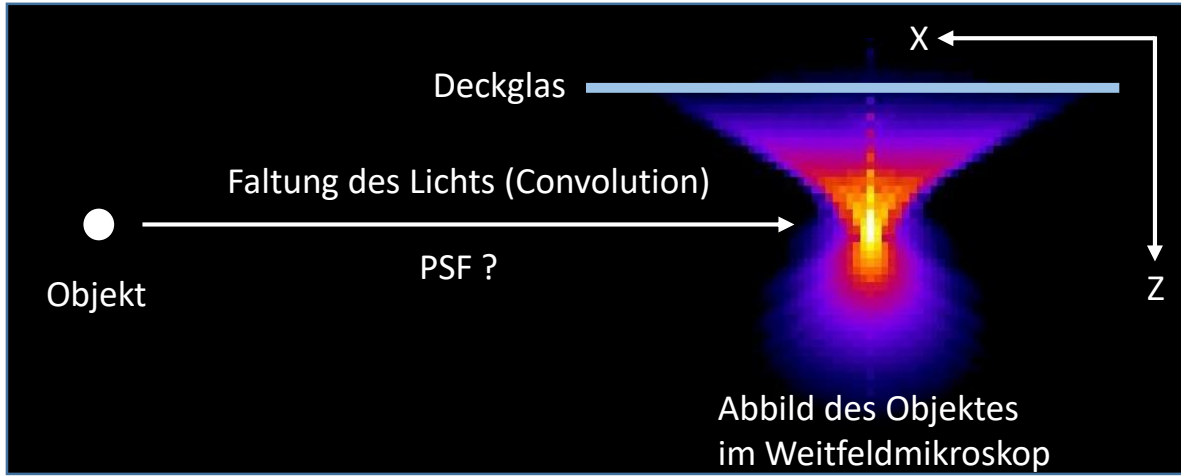


- A** Markieren und Ausschneiden des gewünschten Schnittareals mit Laser
- B** Abtrennen der ausgeschnittenen Probe vom Objektträger durch Laserpuls
- C** Auffangen der durch Laser bewegten Probe in Probengefäß

Quelle: Carl Zeiss

Workstations	Merkmale	Anwendungen	Standort
<b>Terra Workstation</b>	Software: LAS-X, <b>Huygens</b> Professional 21.04, <b>Imaris</b> 9.7.2	<b>Deconvolution</b> , Object Analyzer, PSF Destiller, <b>3D/4D-Visualisierung und Bildanalyse</b>	VMF / früheres Institut für Immunologie
<b>HP Z28 Workstation</b>	Software: ZEN, <b>Huygens</b> Professional 21.04, <b>Imaris</b> 9.7.2	<b>Deconvolution</b> , Object Analyzer, <b>PSF Destiller</b> , <b>3D/4D-Visualisierung und Bildanalyse</b>	SIKT

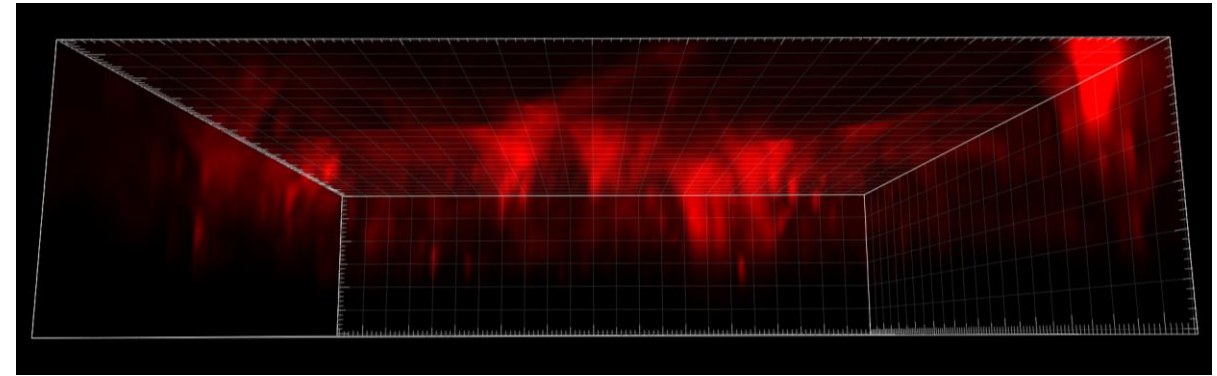
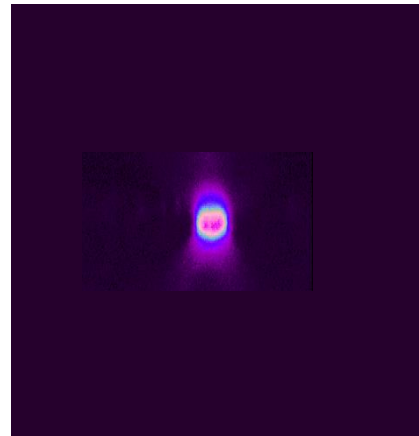
# Warum Konfokalmikroskopie anstelle von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie?



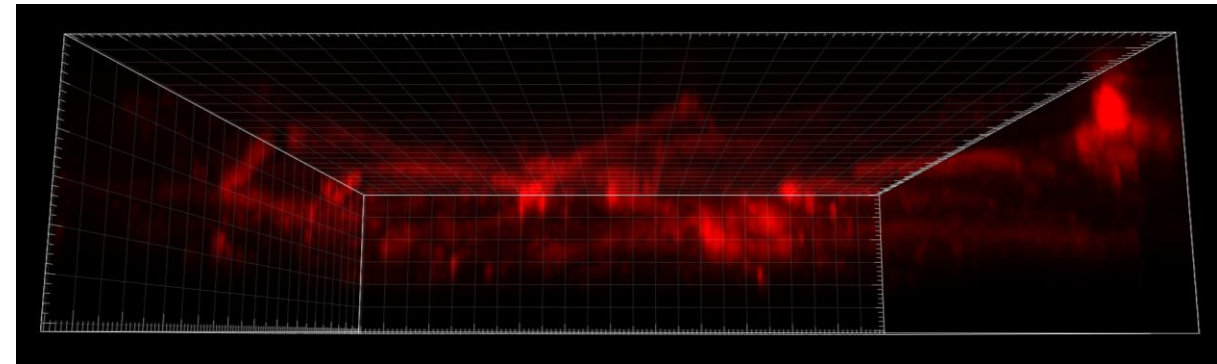
Die Optik des Mikroskops\* ändert jede Punktquelle der Probe entsprechend einer „Punktspreizfunktion“ / Point Spread Function (PSF)

Abbild eines sphärischen Objekts nach CLSM und rechnerischer Entfaltung (Deconvolution) mit einer theoretischen PSF

Eine PSF ist **Mikroskop-spezifisch** und verändert sich über längere Zeit am gleichen Mikroskop!



Astroglia, Cy3-Markierung, Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie:  
Darstellung der Objekte **weitet sich bis zum Deckglas**



Astroglia, Cy3-Markierung, Konfokalmikroskopie nach Deconvolution:  
Darstellung der Objekte **bleibt innerhalb des aufgezeichneten Volumens**

# Warum Konfokalmikroskopie anstelle von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie?

Weitfeldmikroskopie

PSF – x/z-Ansicht

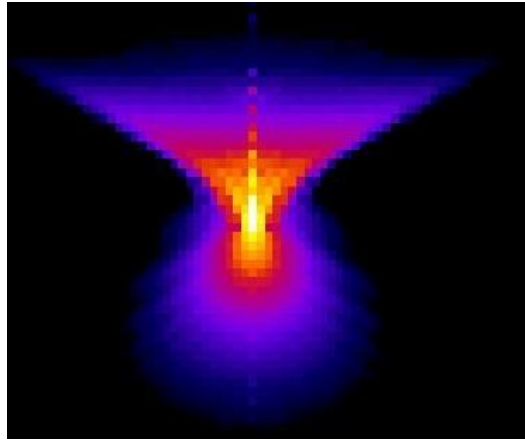
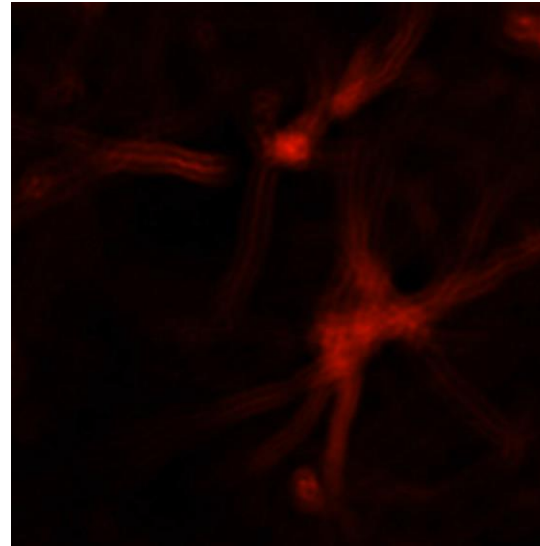
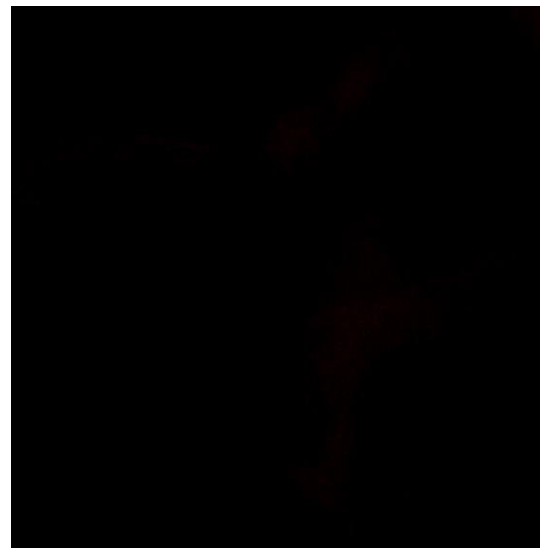
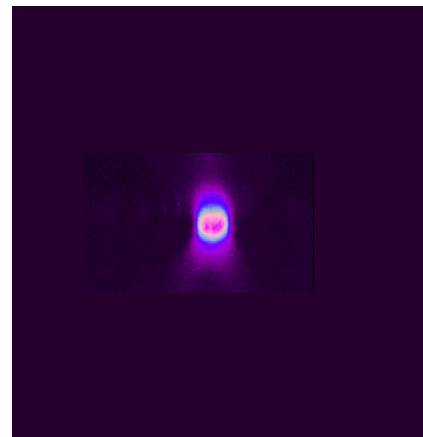


Abbildung – x/y-Ansicht



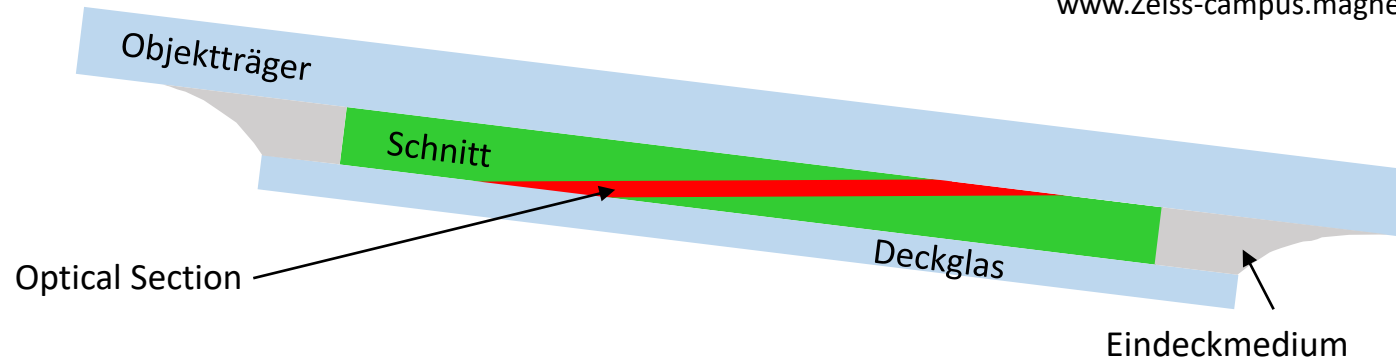
CLSM nach Deconvolution



# Warum Konfokalmikroskopie anstelle von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie?

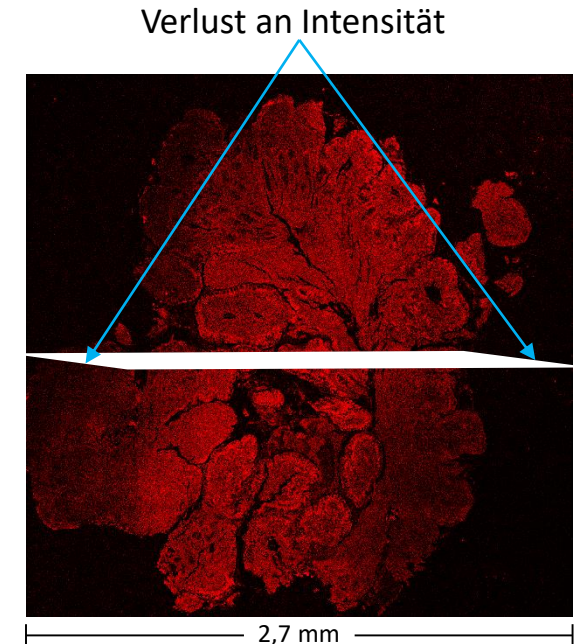
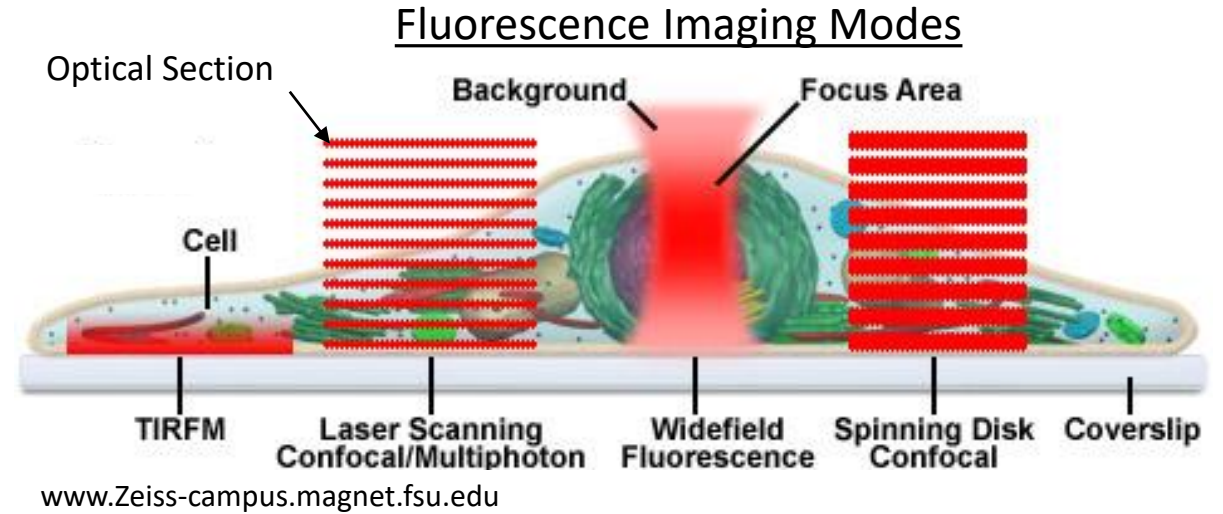
## Optical section

- Konfokalmikroskopie erfolgt durch Aufnahmen von **Optical Sections**
- Dicke der Optical Section abhängig von **numerischer Appertur** des Objektivs (NA) und Durchmesser des Pinhole des CLSM



## Einfach zu beachten und wichtig!

- Bei inversen Mikroskopen: gekippte Proben durch Deckgläser, die zu nah am Rand der Objektträger liegen
- Paralleles „**Sandwich Design**“: Objektträger – Probe – Deckglas, durch dünne Distanzfolien zwischen Objektträger und Deckglas

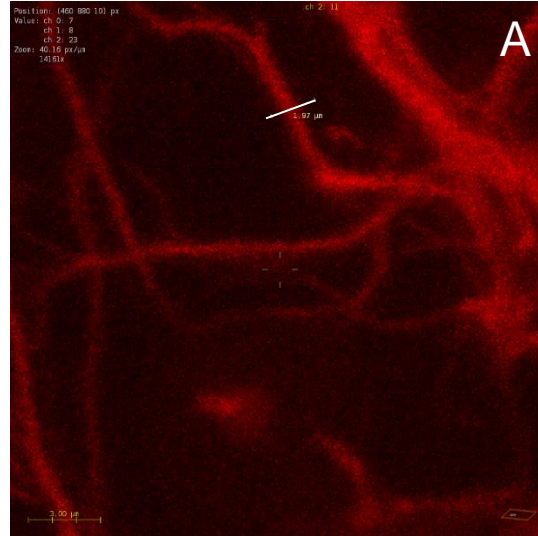


# CLSM und Deconvolution: Auswirkungen auf Visualisierung und Strukturanalyse

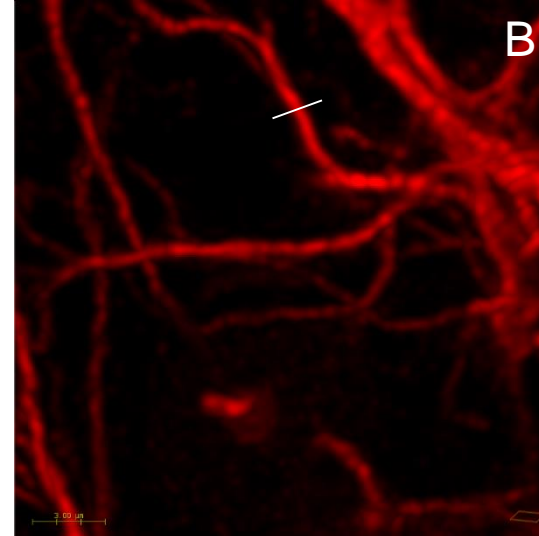
## Astroglia, Cy3, Hirnschnitt Ratte

Neben Astrozytenfortsätzen deutliches Signal (Pfeile) in Originaldaten (A, C). Keine Signale nach Deconvolution (B), Intensität = 0, gepunktete Linie in C.

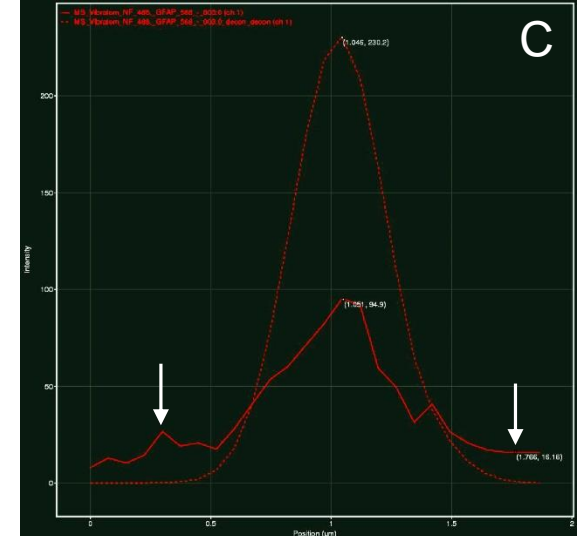
CLSM - Originaldaten



CLSM - nach Deconvolution

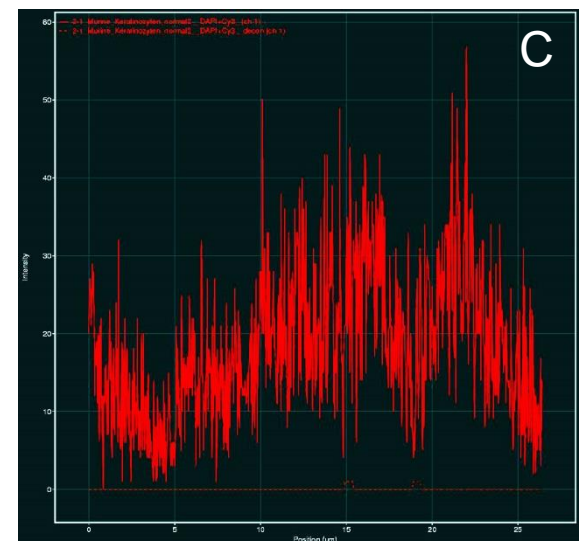
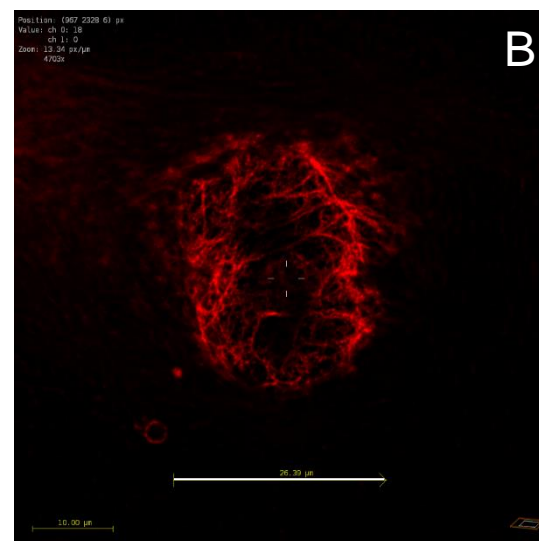
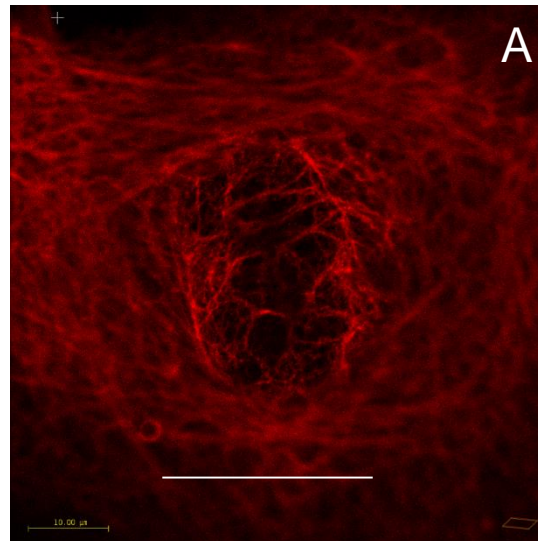


Intensitätsprofile



## Keratin, Cy3, Keratinozyten Maus

Optical Section der CLSM-Originaldaten enthält auch Signale von darüber- und darunterliegenden Ebenen (A, C). Durch Deconvolution werden diese Signale zurück an ihren „Ursprungsort“ gesetzt (B, C).





# Herausforderungen der Probenpräparation für CLSM und Deconvolution


## Fixierung

- **Alkohol verdrängt Wasser** aus Gewebe → ungleichmäßige und irreversible Schrumpfung (**z stärker als x/y!**) 

## Mikrotomie

- **3D-Strukturdarstellung und Analyse in Paraffinschnitten stark beeinträchtigt** (Alkohol!)  
→ Vibratome-Schnitte in wässrigem Milieu (z.B. Puffer) erhalten 3D-Architektur am besten
- Evtl. Gefrierschneiden, aber Gefrierartefakte (Gewebschädigungen) vermeiden

## Fluorophore

- Abgleich der Exzitationsmaxima mit vorhandenen Laserlinien des CLSM
- Überschneidung von Emissionsspektren (cross talk) minimal halten, **cross talk im SpectraViewer prüfen** 
- **Autofluoreszenz vermeiden** (z.B. nach Aldehydfixierung), kontrollieren und ggf. messen (**Lambda-Scan**)

## Eindecken

- **Brechungsindex (RI) von Eindeck- und Immersionsmedium gleich?**
- Brechungsindex des Eindeckmediums sollte für Deconvolution bekannt sein
- Bester 3D-Strukturerhalt beim Eindecken in wässriger Lösung, **Versiegeln des Deckglases erforderlich!**
- Zur **Messung der PSF\*** sub-resolution beads (z.B. TetraSpeck 0.1  $\mu\text{m}$  microspheres) mit Probe eindecken

\* mit **PSF Destiller / Huygens Professional**: siehe BCF-Homepage / Protocols / TetraSpeck Microspheres - J.Kacza\_BCF+SVI 10.07.2020.pdf

# Herausforderungen der Probenpräparation für CLSM und Deconvolution

## Zellkultursysteme

- Nur **Zellkultursysteme mit Glasboden** (170 µm Borosilikatglas) oder mit für CLSM spezifiziertem Polymerboden z.B. ibidi µ-Slides®, µ-Plates®, µ-Dishes®
- **Stabile Adhärenz der Zellen** im Zellkultursystems prüfen, manche Zellen werden auf Glas schlecht adhären

## Objektive des CLSM

- Hohe numerische Apertur (NA) = bessere PSF und Auflösung der z-Achse
- Wahl des Immersionsobjektivs: **RI Immersionmedium = RI Eindeckmedium**

## Pixelgröße

- Pixel size am CLSM entsprechend **Nyquist-Kriterium** einstellen, Berechnung mit: <https://svi.nl/NyquistCalculator> 

## Fazit

- Parameter von Präparat und Geräteeinstellung sind wesentlich für gute fluoreszenzmikroskopische Bildgebung
- VOR Beginn der Untersuchung / Studie Kompatibilität aller methodischen und technischen Schritte prüfen
- Bei Unklarheiten begrenzte Pilotstudie zur Ermittlung adäquater Parameter, inkl. Auswertung (!) durchführen
- Bei Fragen Beratung mit BCF-Team vereinbaren

[https://bioimaging.uni-leipzig.de/home\\_en.html](https://bioimaging.uni-leipzig.de/home_en.html)

## Nutzung der Geräte der Bioluminescence Core Facility

- Ziele der geplanten Nutzung und Wahl des geeigneten CLSM mit BCF-Team besprechen
- Online-Registrierung bei BCF mit Angabe des Projektverantwortlichen
- BCF-Nutzungsordnung ausdrucken und unterzeichnet an BCF-Team
- Für Nutzer außerhalb der Universität Leipzig ist zusätzlich eine Nutzungsvereinbarung erforderlich (Schlüssel, Transponder, Zugangsberechtigungen, etc.)
- Einweisung am vereinbarten Mikroskop durch BCF-Team
- Für manche Gerätestandorte S1 bzw. S2-Belehrung durch verantwortlichen Projektleiter erforderlich
- Weitere spezifische Besonderheiten im LSM-Labor beachten (eigene Kittel, Laborschuhe, etc.)
- Mikroskopnutzung nach Online-Buchung im BCF-Buchungskalender
- Abrechnung der Gerätenutzung entsprechend Kostentafel für Nutzungsentgelte der BCF-Nutzungsordnung