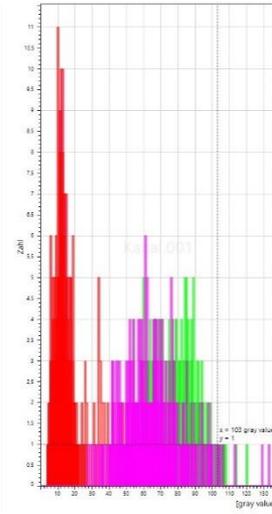
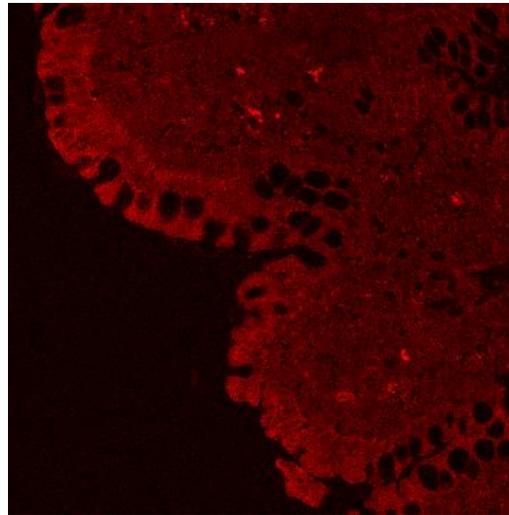
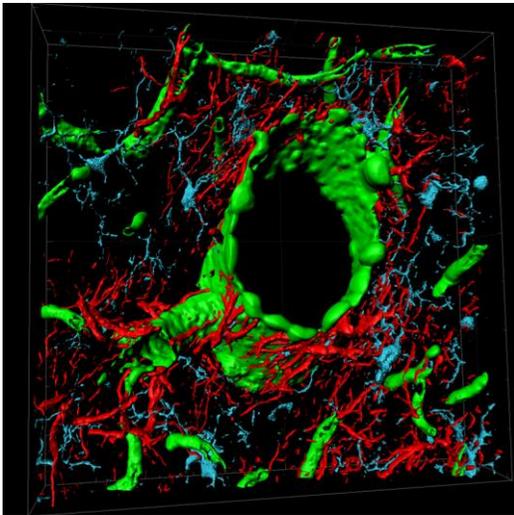


Herausforderungen und Techniken der fluoreszenzmikroskopischen Bildgebung und Analyse

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

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

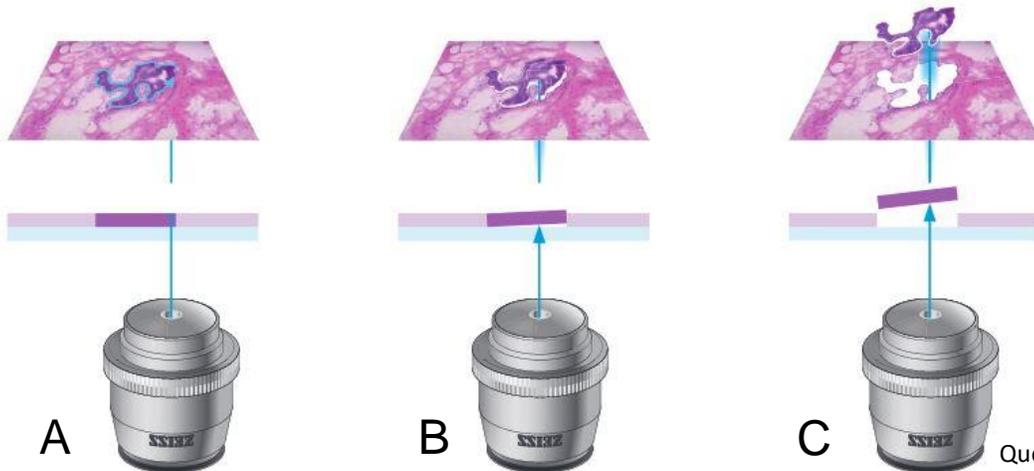
- Incucyte Zoom Life Imaging (Scratch Assays), Cell Capture System, Workstations

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

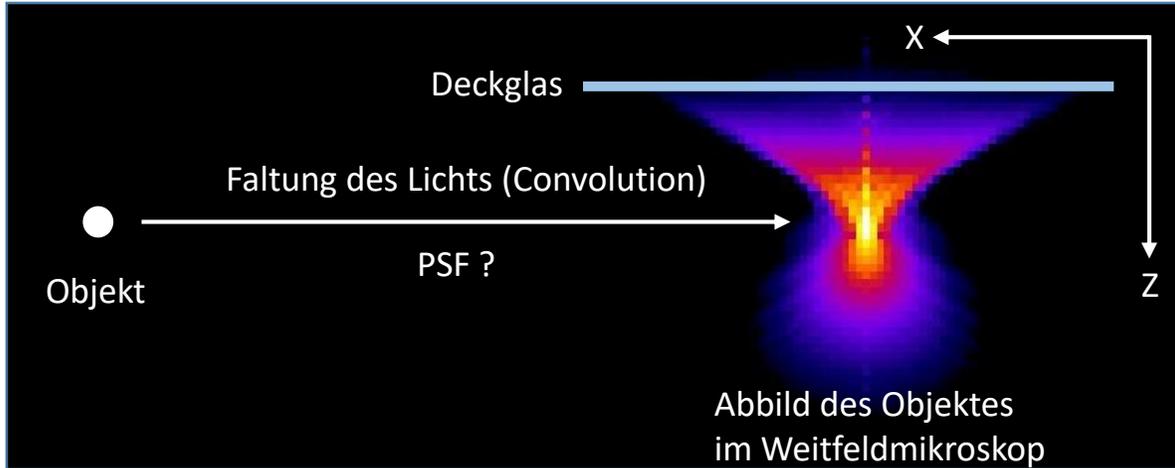


- A** Markieren und Ausschneiden des gewünschten Schnittareals mit Laser
- B** Abtrennen der ausgeschnittenen Probe vom Objektträger durch Laserpuls
- C** Auffangen der durch Laser bewegten Probe in Probengefäß

Quelle: Carl Zeiss

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

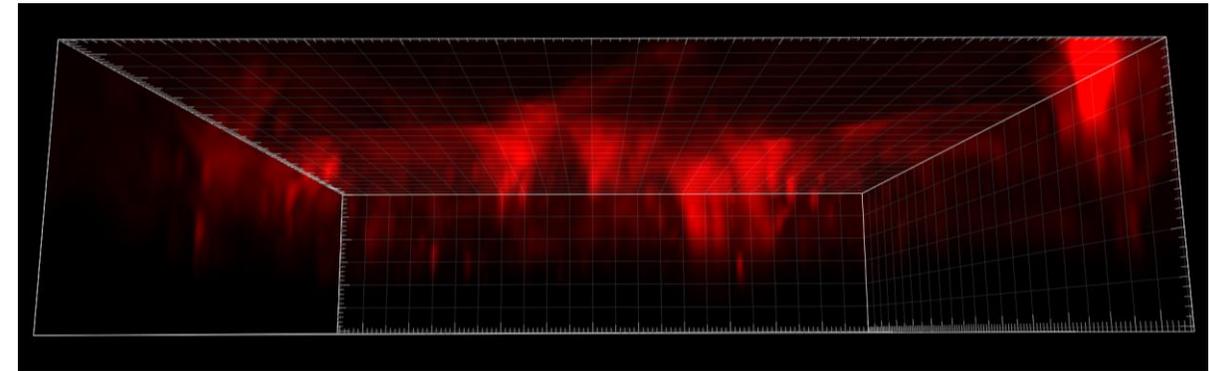
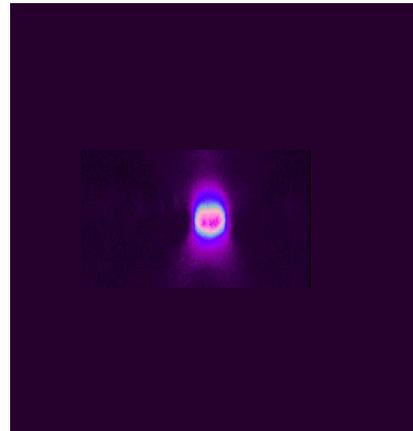
Warum Konfokalmikroskopie anstelle von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie?



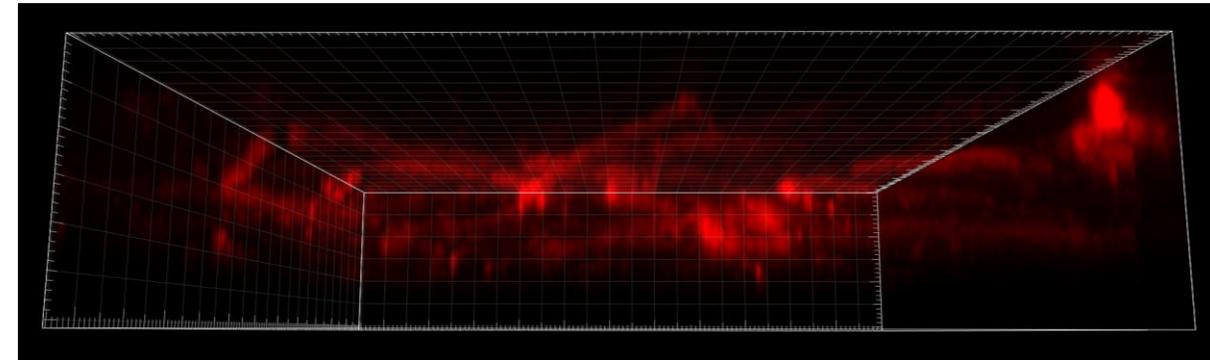
Die Optik des Mikroskops* ändert jede Punktquelle der Probe entsprechend einer „Punktspreizfunktion“ / Point Spread Function (PSF)

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

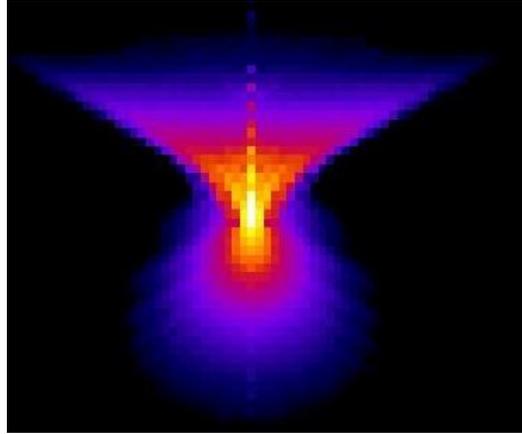
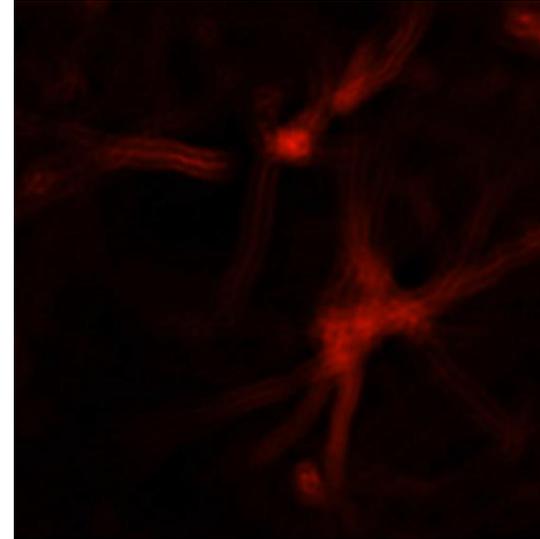
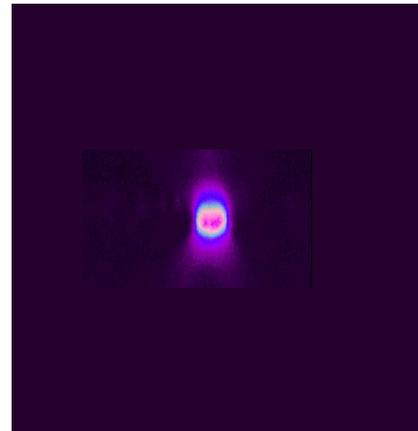


Abbildung – x/y-Ansicht



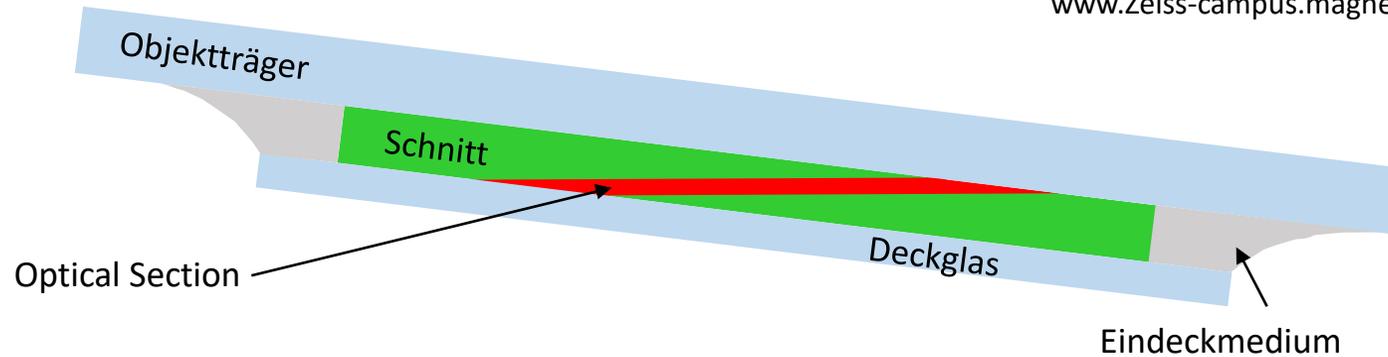
CLSM nach Deconvolution



Warum Konfokalmikroskopie anstelle von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie?

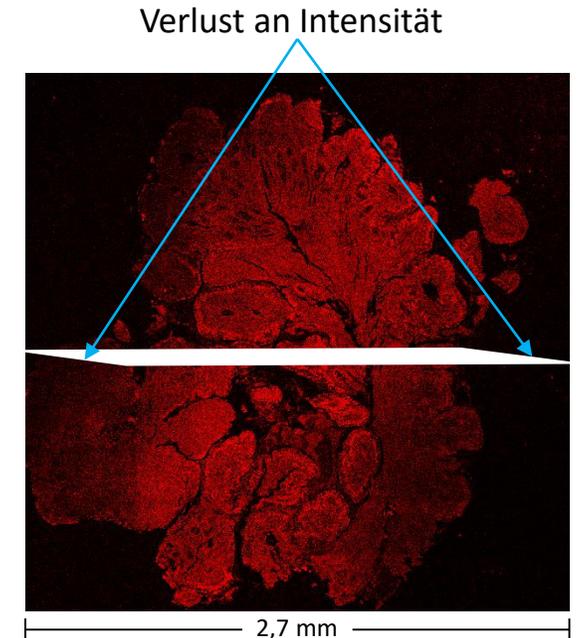
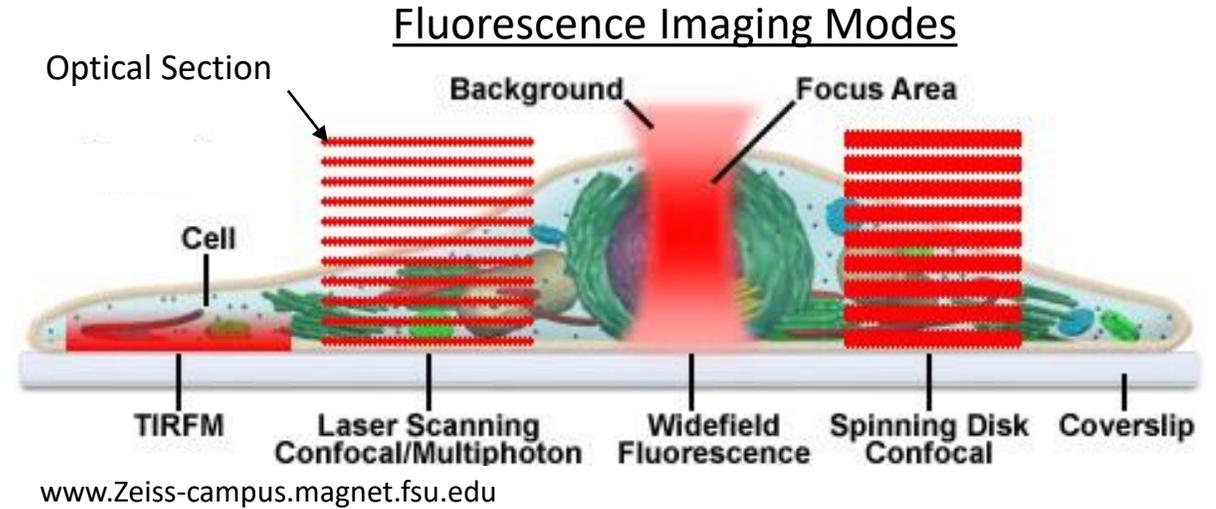
Optical section

- 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

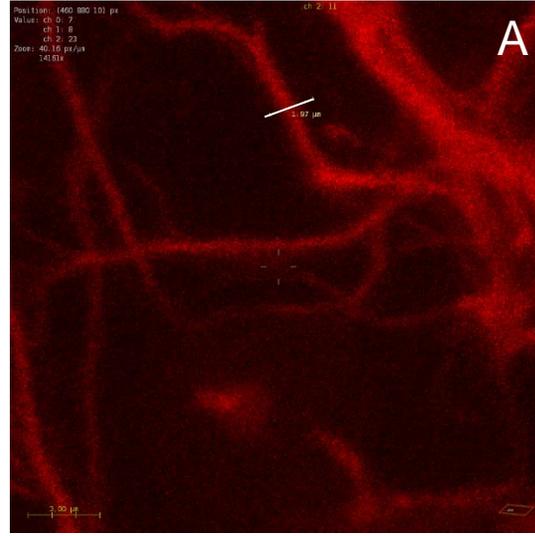


CLSM und Deconvolution: Auswirkungen auf Visualisierung und Strukturanalyse

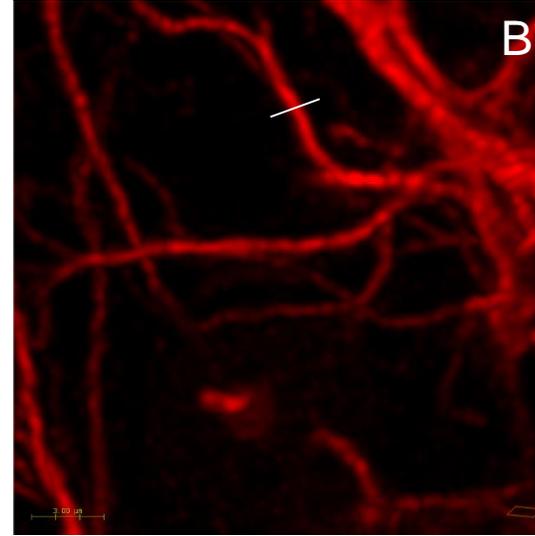
Astroglia, Cy3, Hirnschnitt Ratte

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

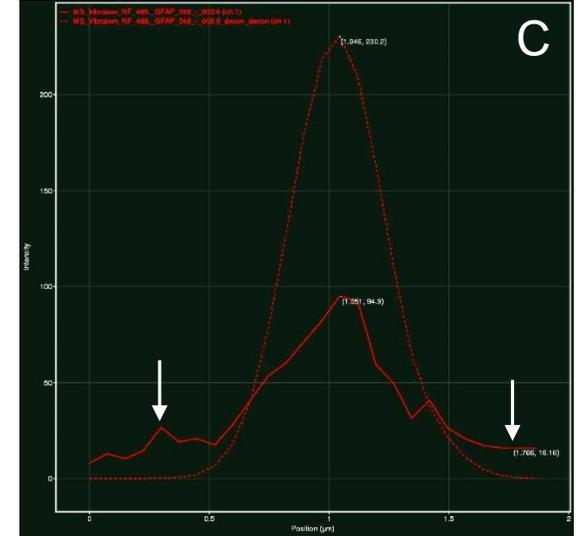
CLSM - Originaldaten



CLSM - nach Deconvolution

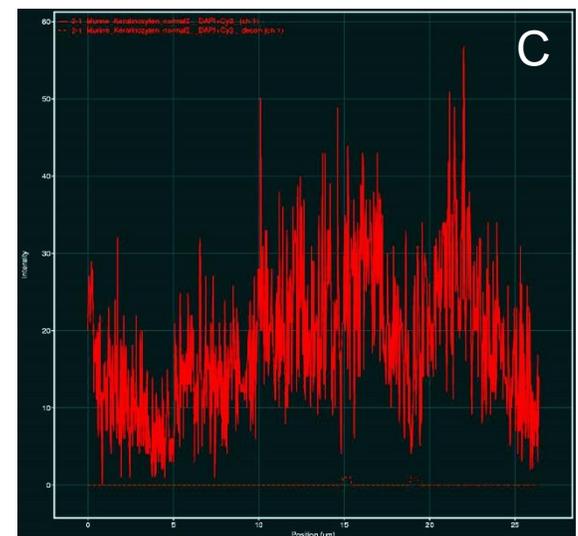
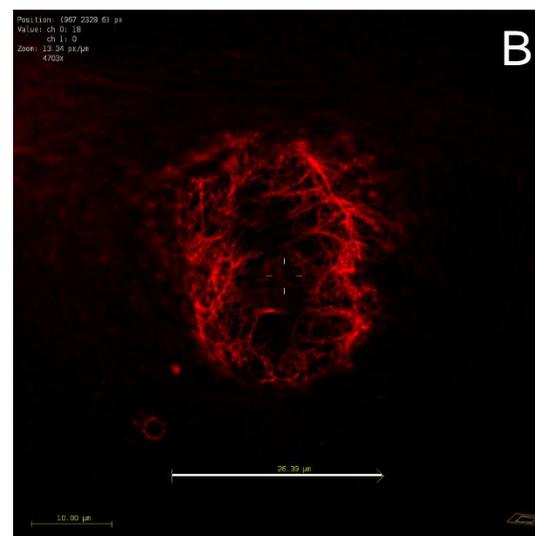
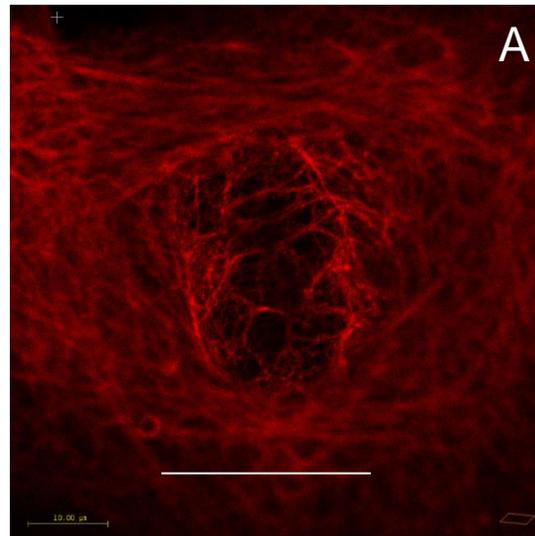


Intensitätsprofile



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 μm 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 adhärent

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

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