

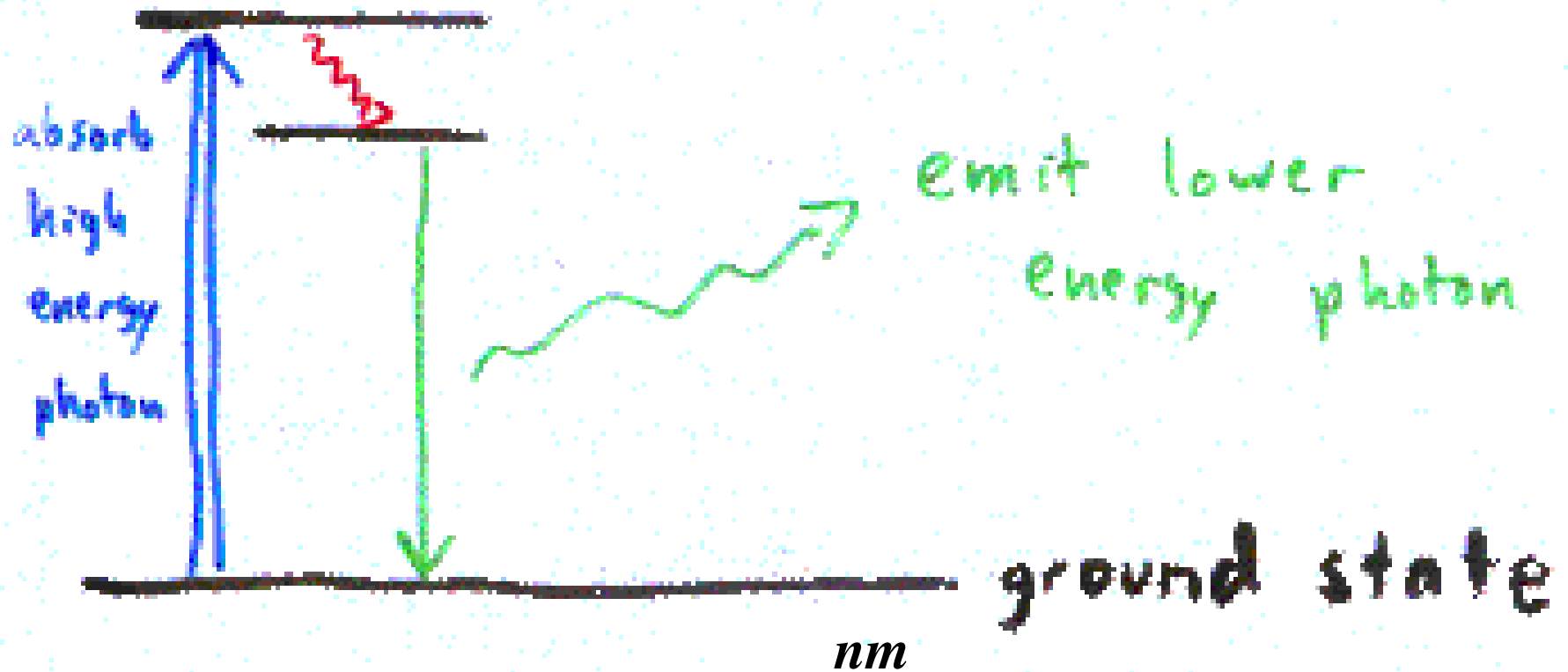


*Σύγχρονα εργαλεία και μεθοδολογίες της
Συνεστιακής Μικροσκοπίας*

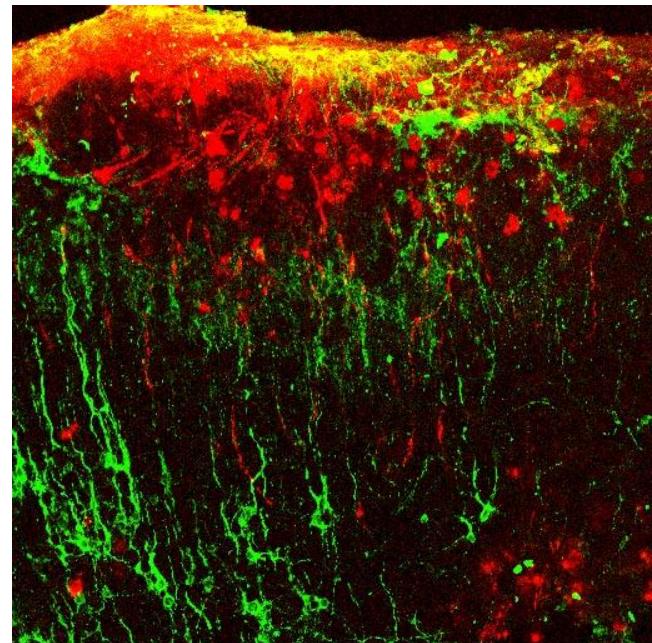
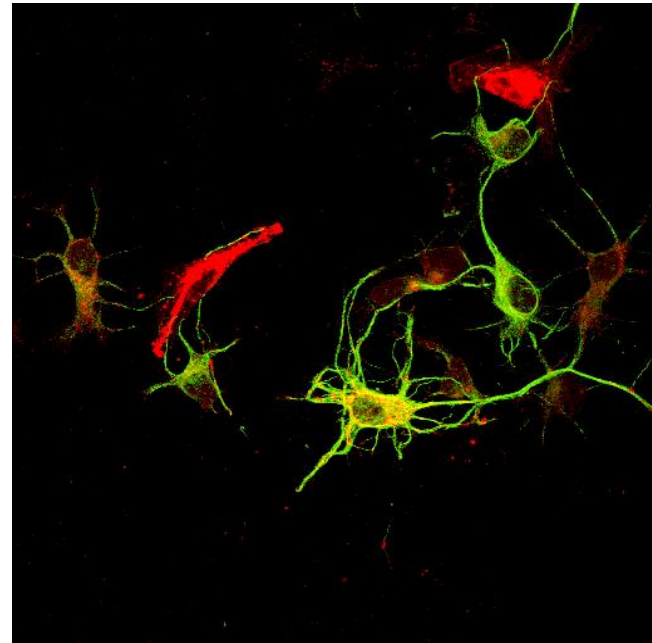
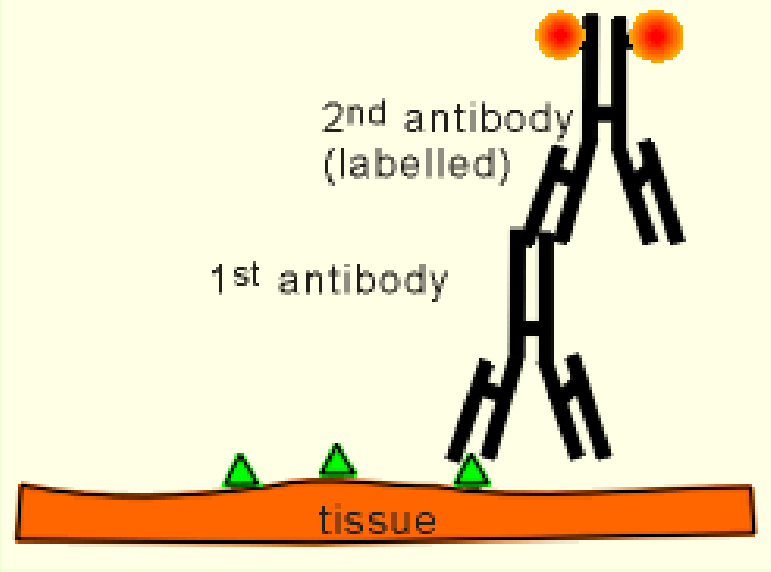
Δήμητρα Θωμαΐδου

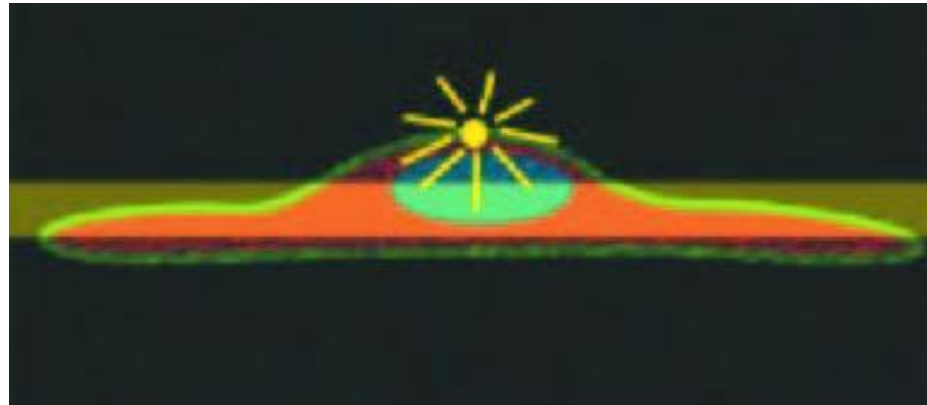
*Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας
& Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας
Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ*

Φθορισμός

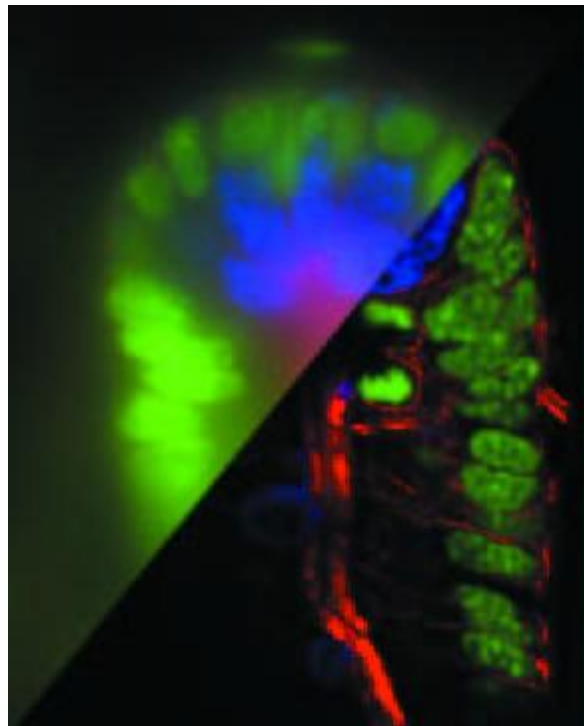


Immunocytochemistry

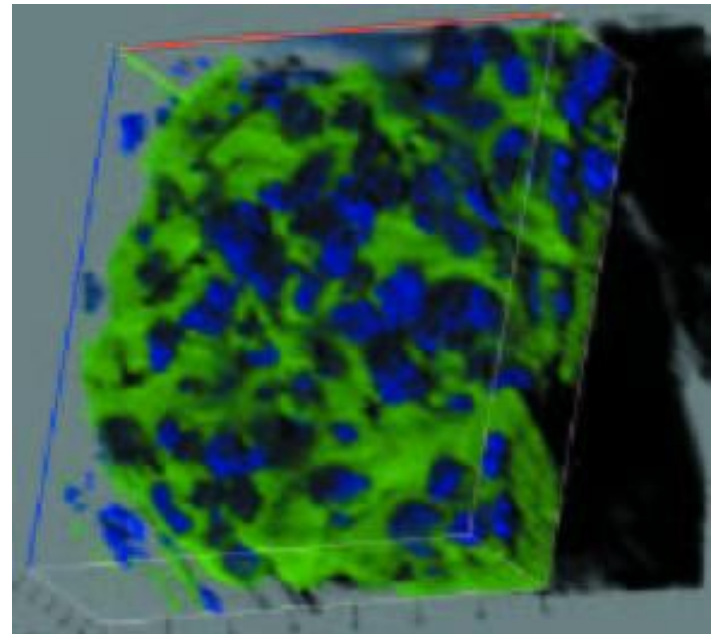




βάθος πεδίου 63X
φακού κλασικού
μικροσκοπίου



κλασικό οπτικό/συνεστικό
μικροσκόπιο

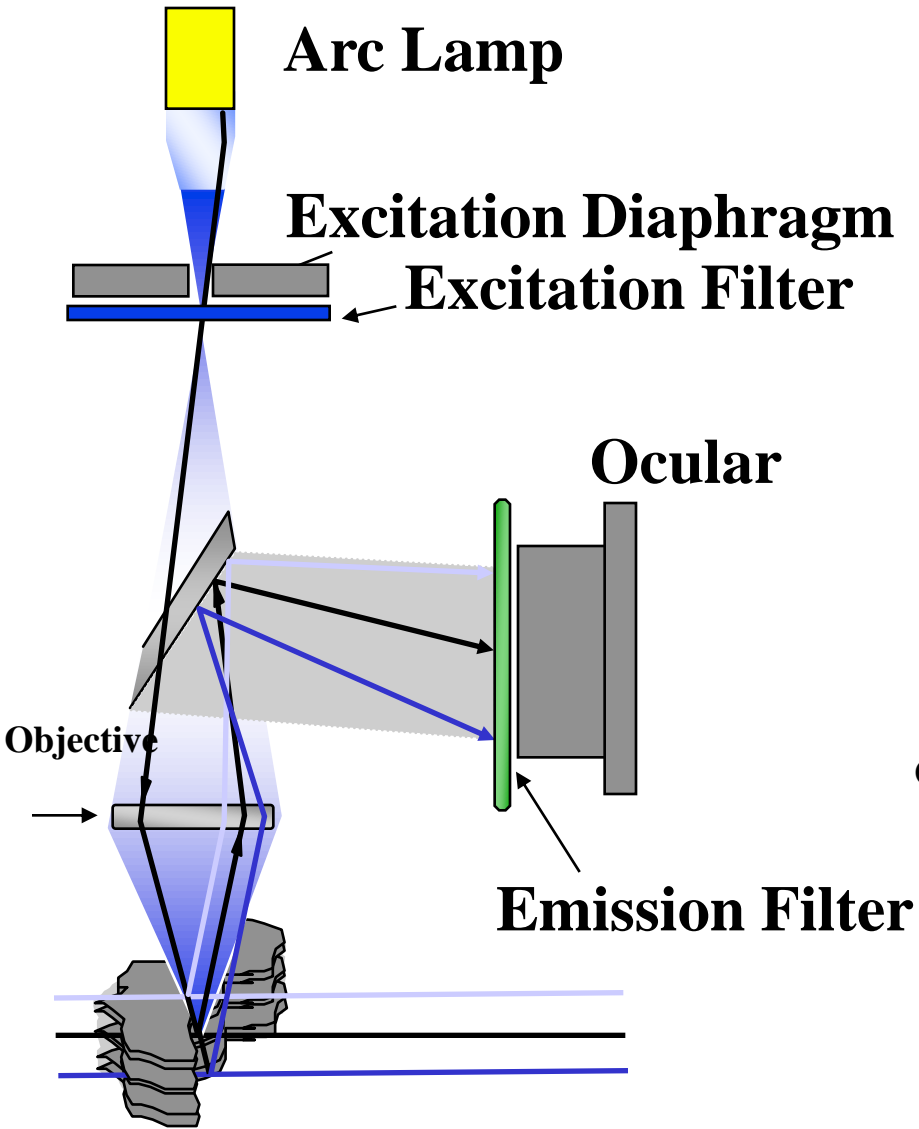


3D-ανασύσταση εικόνας

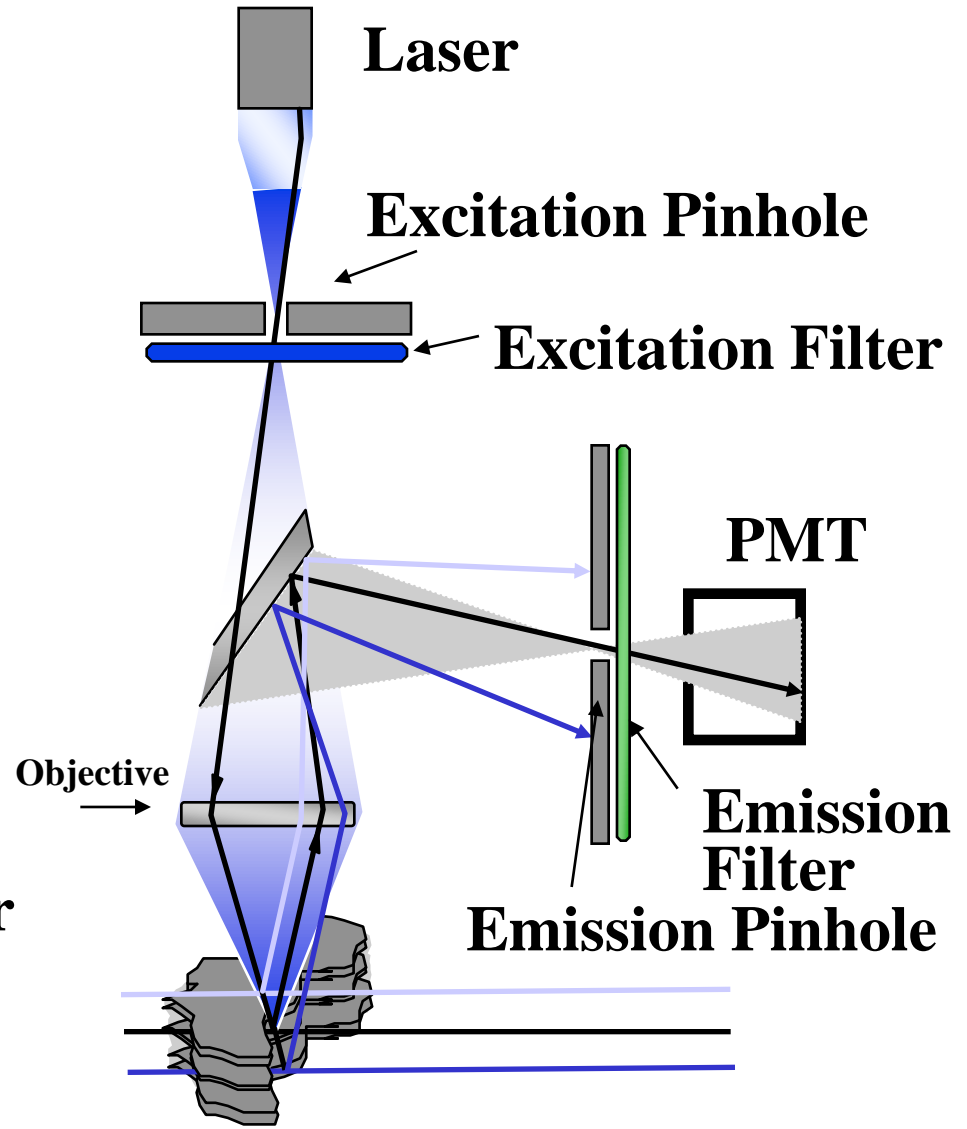
Συνεστιακό Μικροσκόπιο



Fluorescent Microscope

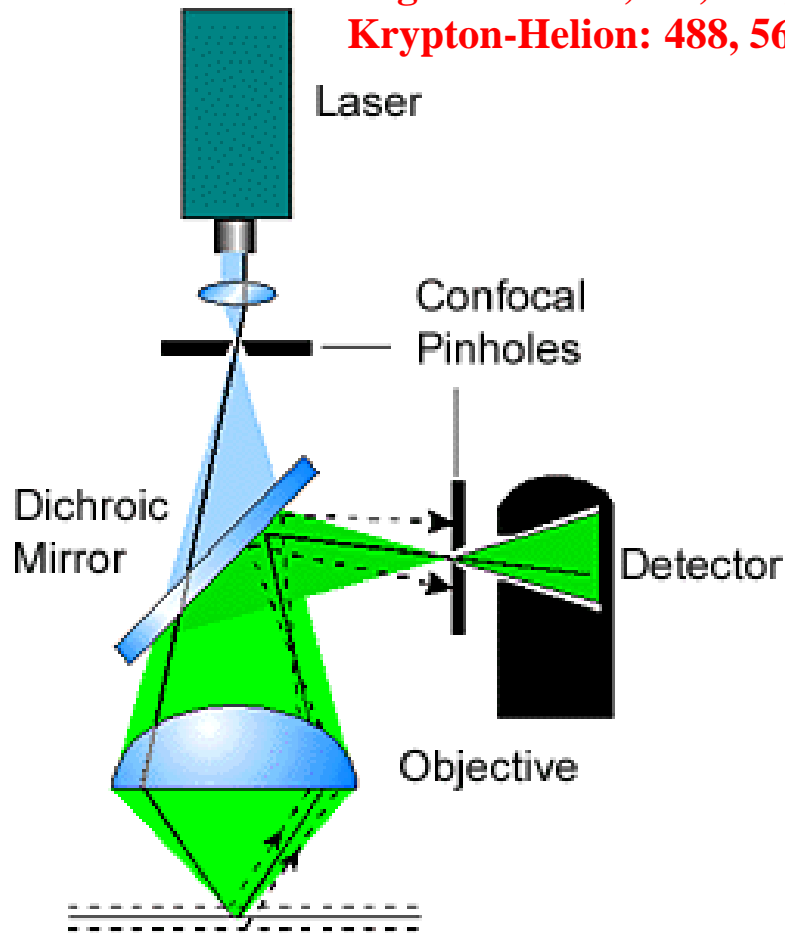


Confocal Microscope



Αρχή λειτουργίας

Argon-ion: 458,476, 418, 514
Krypton-Helion: 488, 568, 647

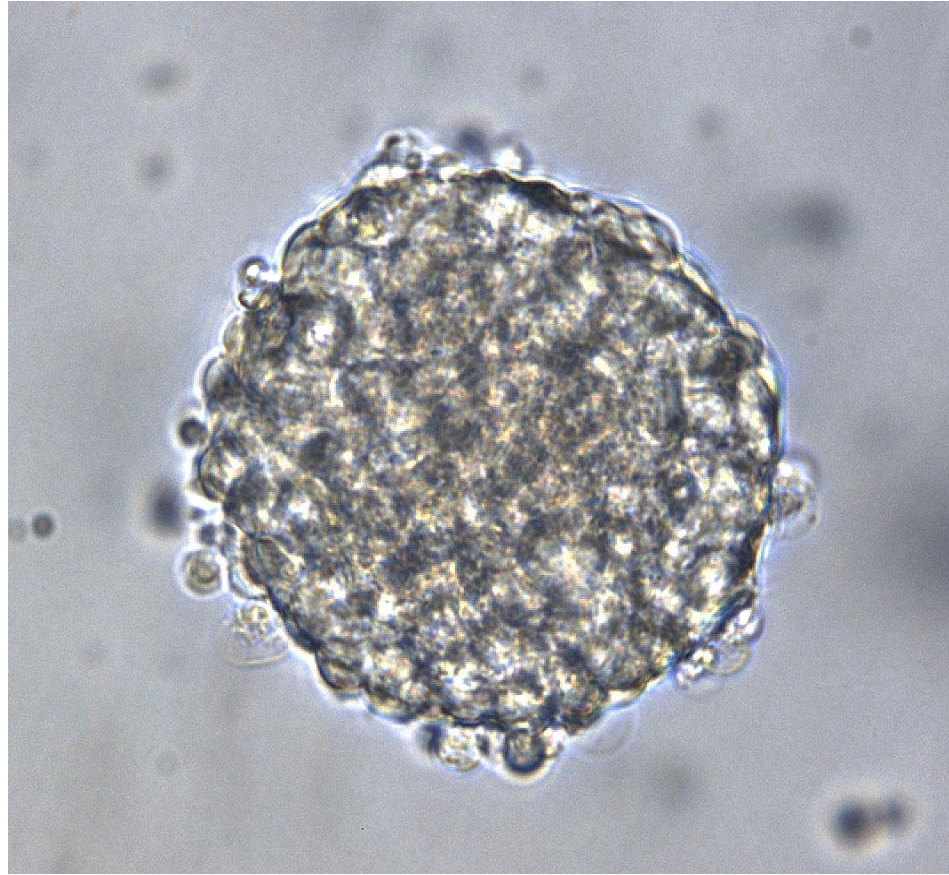
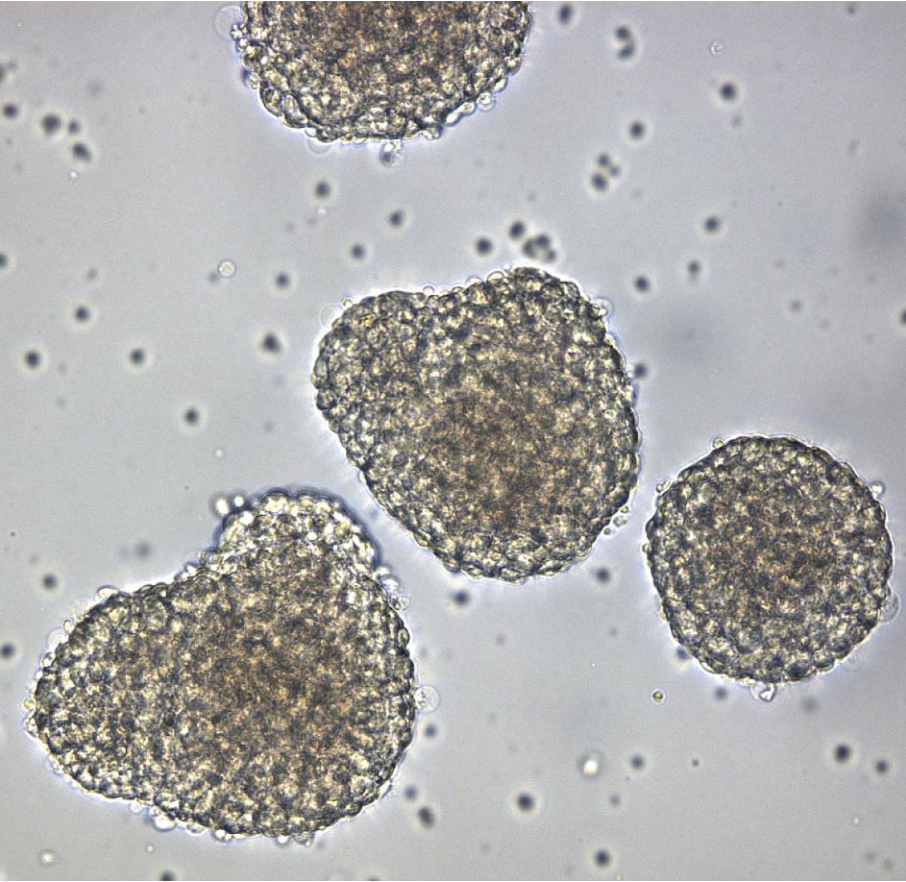


----- Not In Focal Plane
————— In Focal Plane
----- Not In Focal Plane

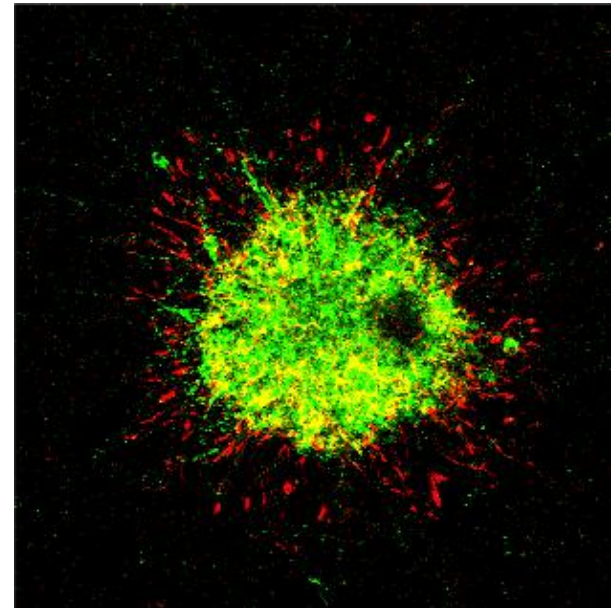
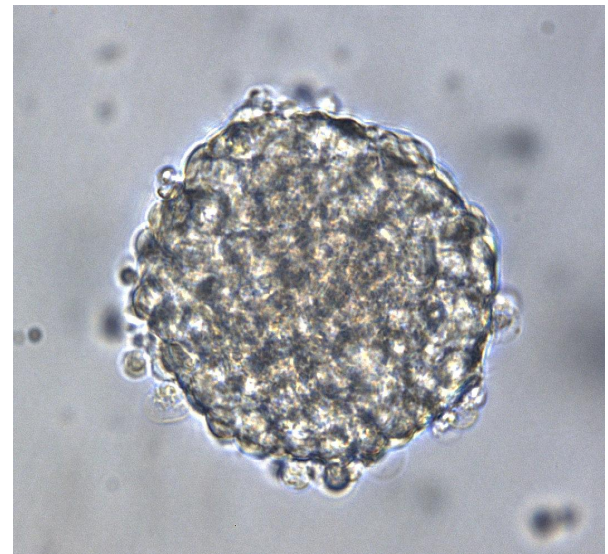
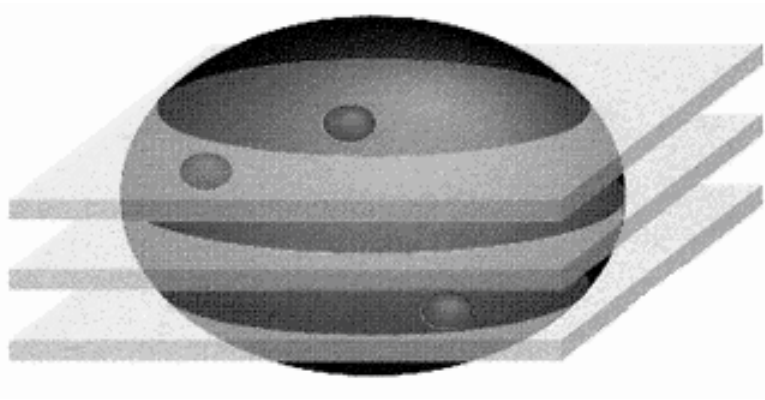
Πλεονεκτήματα Χρήσης Συνεστιακού Μικροσκοπίου:

- Μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα λόγω απόρριψης μη ειδικών σημάτων
- Λήψη πολλών διαδοχικών τομών μέσα σε ένα παρασκεύασμα
- Παράλληλη ανίχνευση μέχρι και 4 διαφορετικών χρωμοφόρων μέσα σε ένα δείγμα

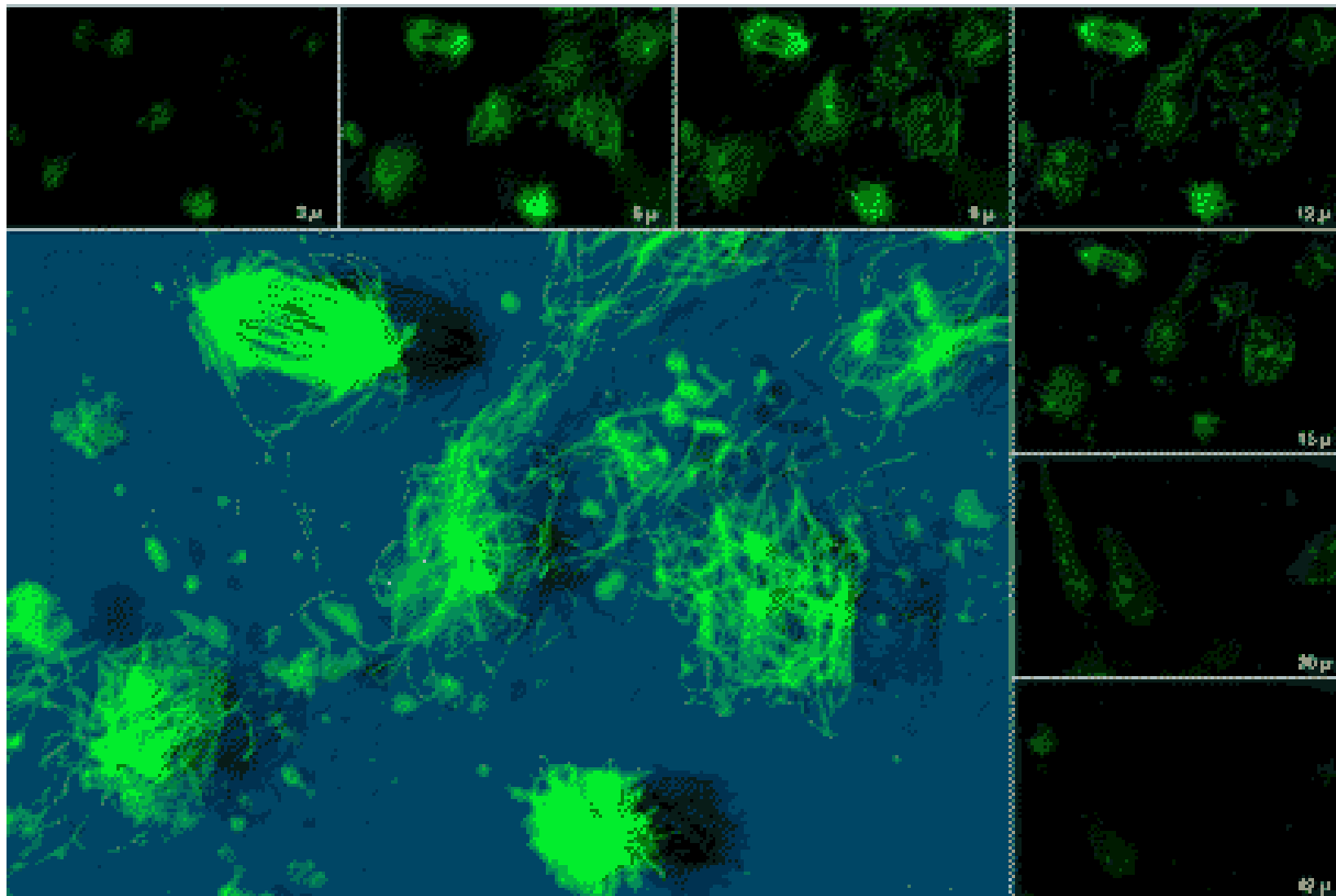
Proliferating neurospheres

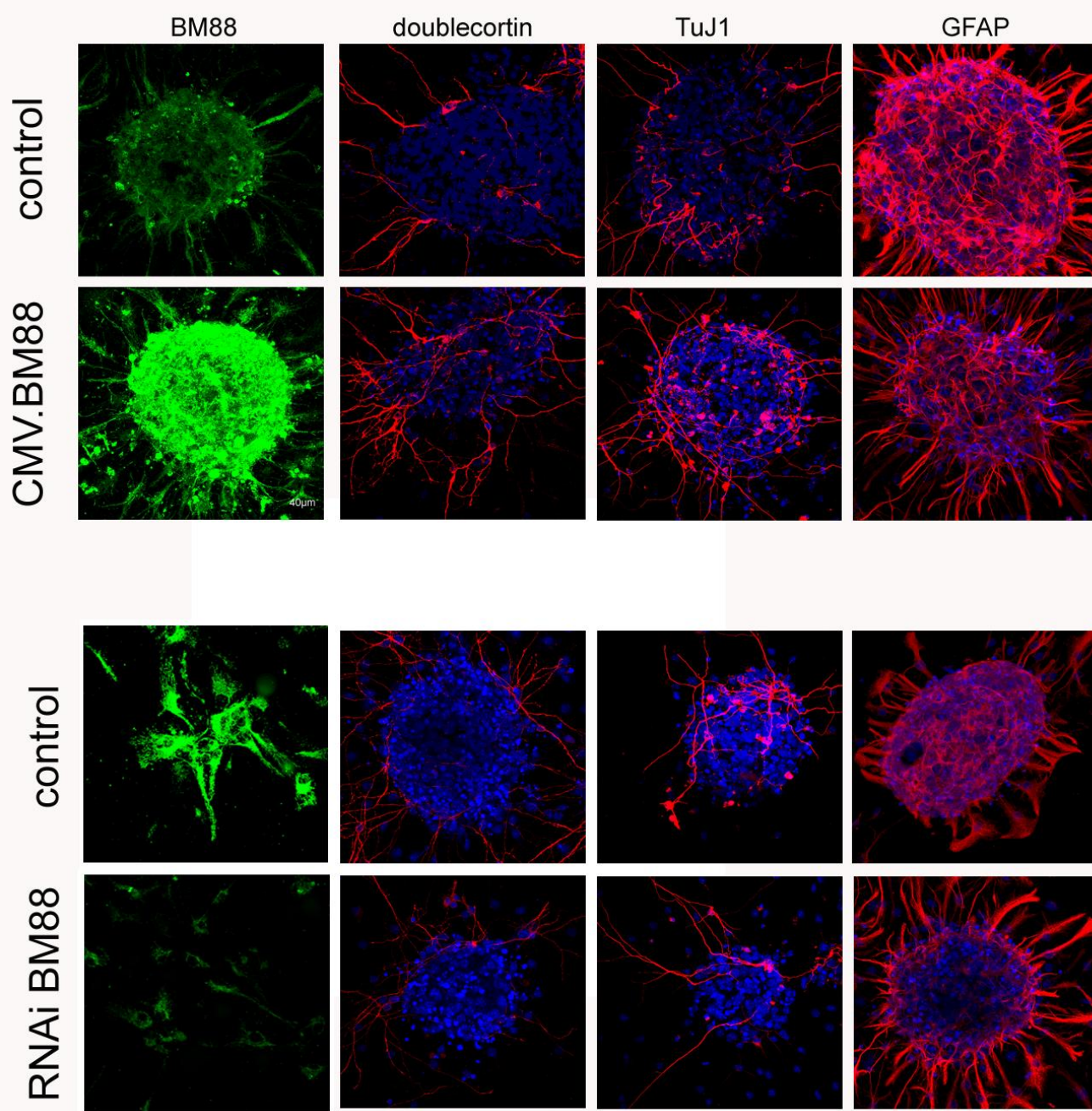


Οπτικές τομές



Επιλεγμένες οπτικές σειριακές τομές επιθηλικών κυττάρων και συνολική αναδόμηση των πολλαπλών εικόνων





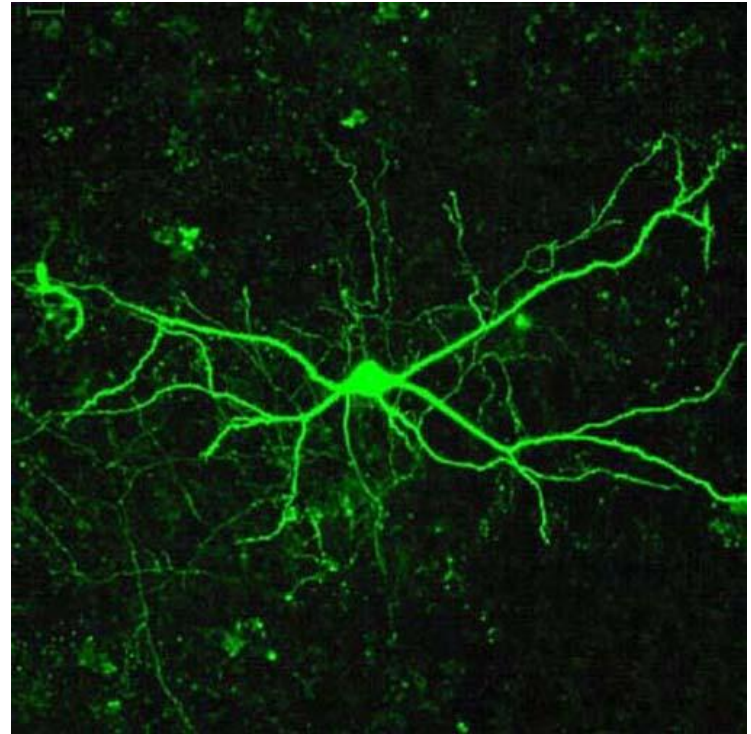
*Εφαρμογές της Συνεστιακής Μικροσκοπίας
στην απεικόνιση ζωντανών κυττάρων
(Live cells imaging)*

Τεχνολογίες ζωντανής απεικόνισης

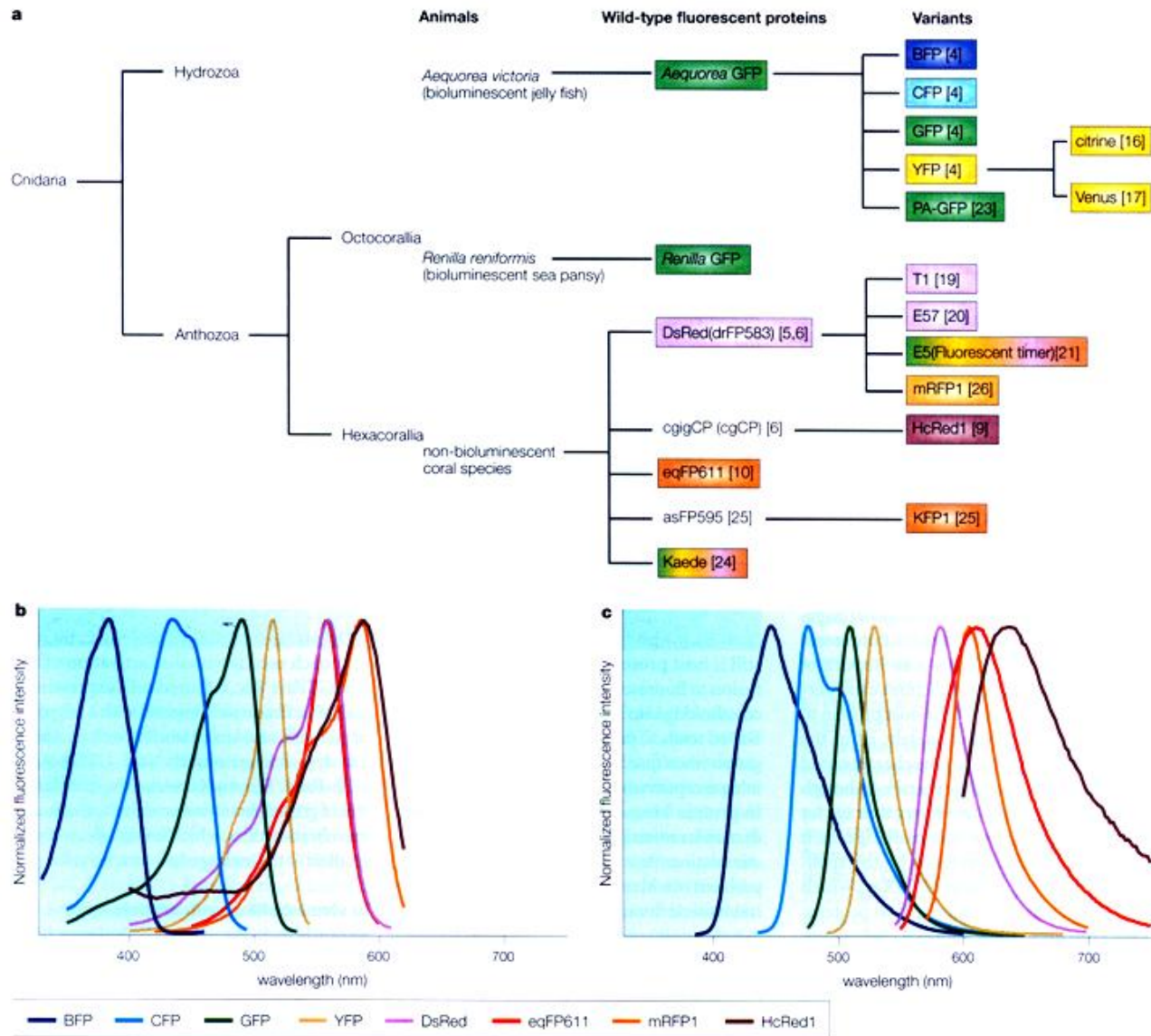
*Παρατήρηση δειγμάτων μεγάλου πάχους,
πολλές φορές και ολόκληρων
εμβρύων ή οργανισμών*

*Παρατήρηση ζωντανών δειγμάτων
για μεγάλα χρονικά διαστήματα
με ελαχιστοποίηση της θερμικής
καταστροφής του ιστού*

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)



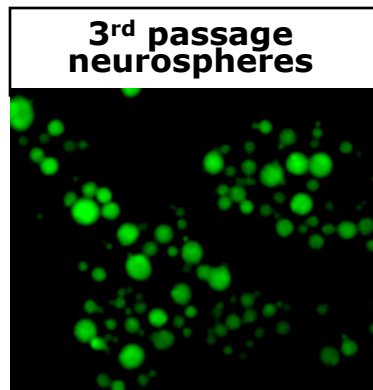
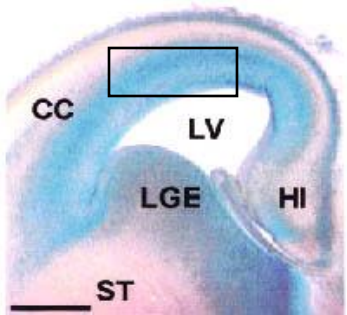
Φθορίζοντες ιχνηθέτες νέας γενιάς για τη σήμανση ζωντανών κυττάρων



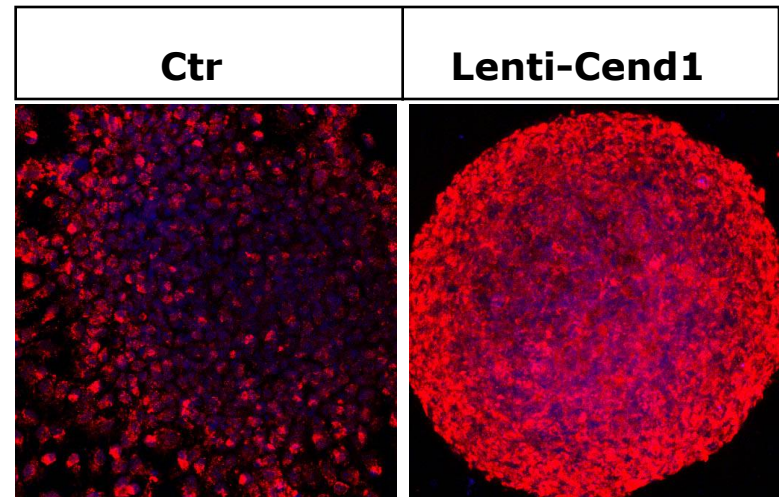
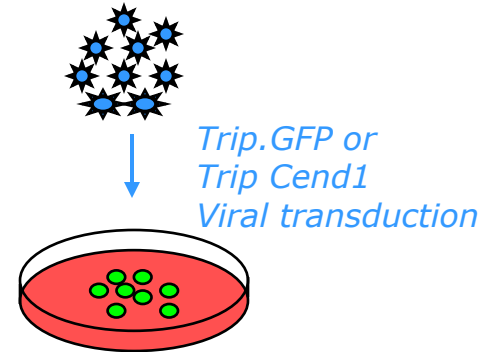
actin-GFP mice



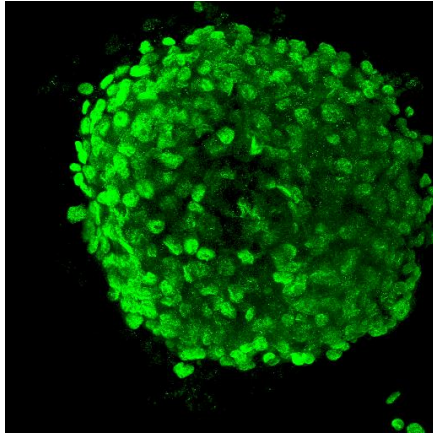
E14.5 mouse brain cortex



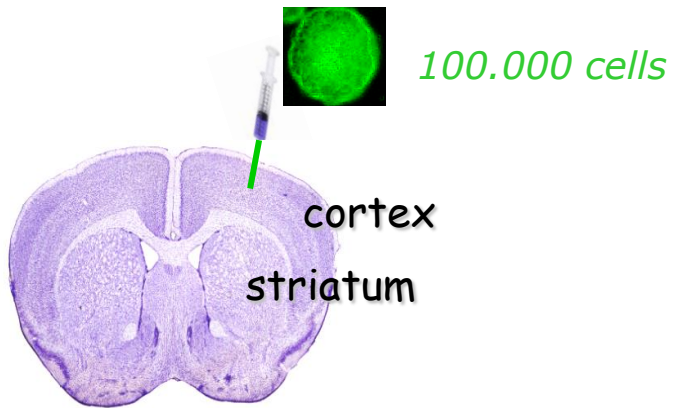
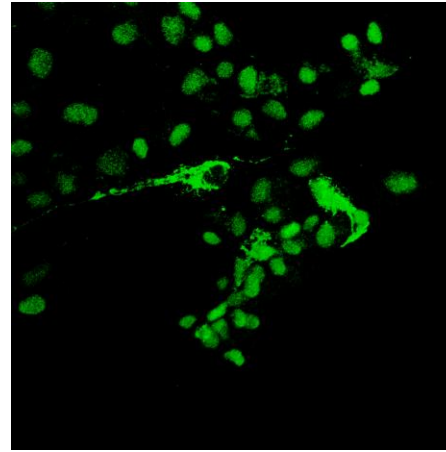
Cend1 transduction



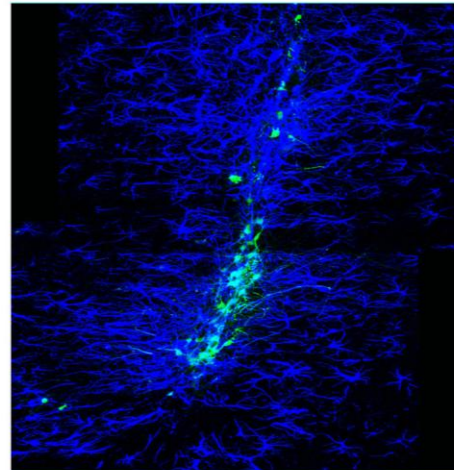
**wholmount neurospheres
over-expressing Cend1**



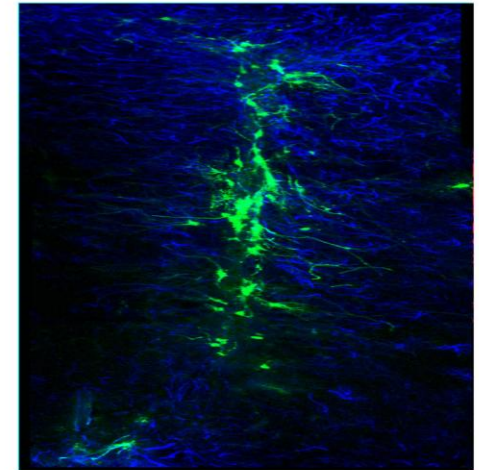
**dissociated neurospheres
over-expressing Cend1**



ctr

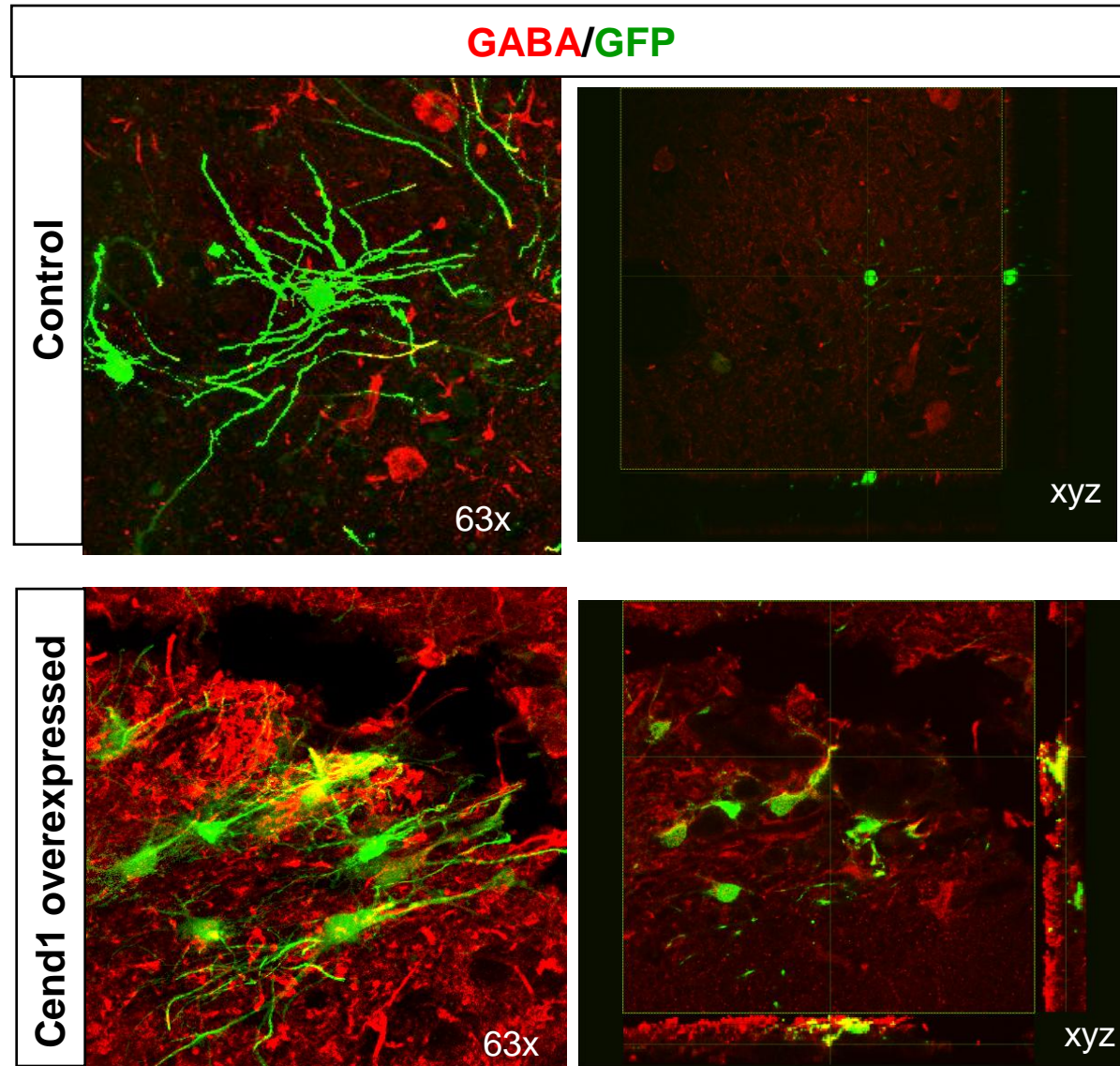


Lenti Cend1



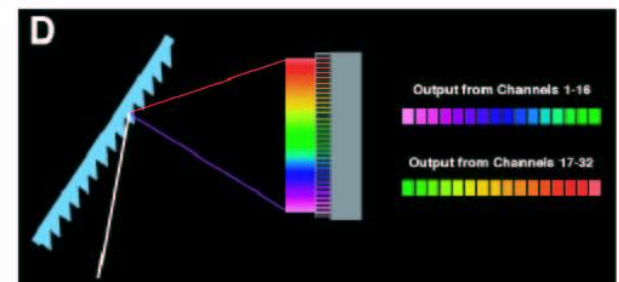
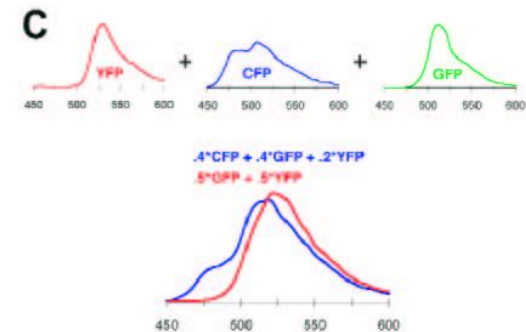
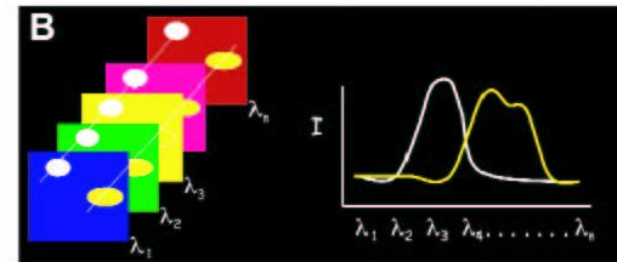
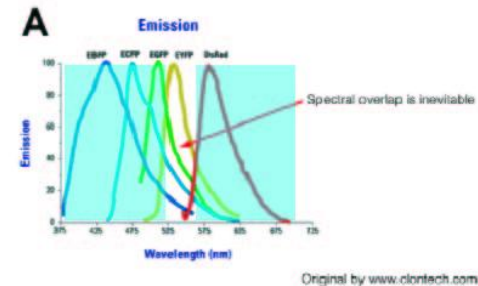
AP:+1, Lat:1.75, D:1.0

4 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση: εμφάνιση διαμέσων νευρώνων
στα ζώα όπου υπερ-εκφράζεται η *BM88/Cend1*

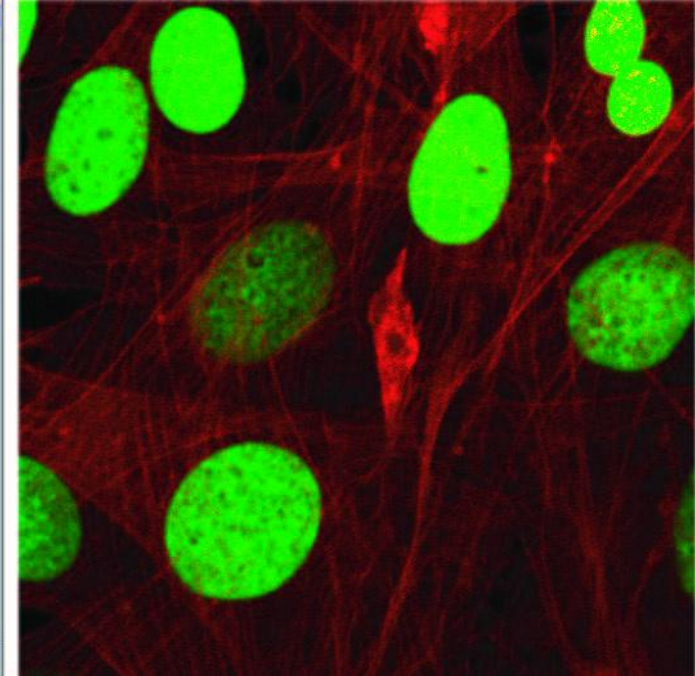
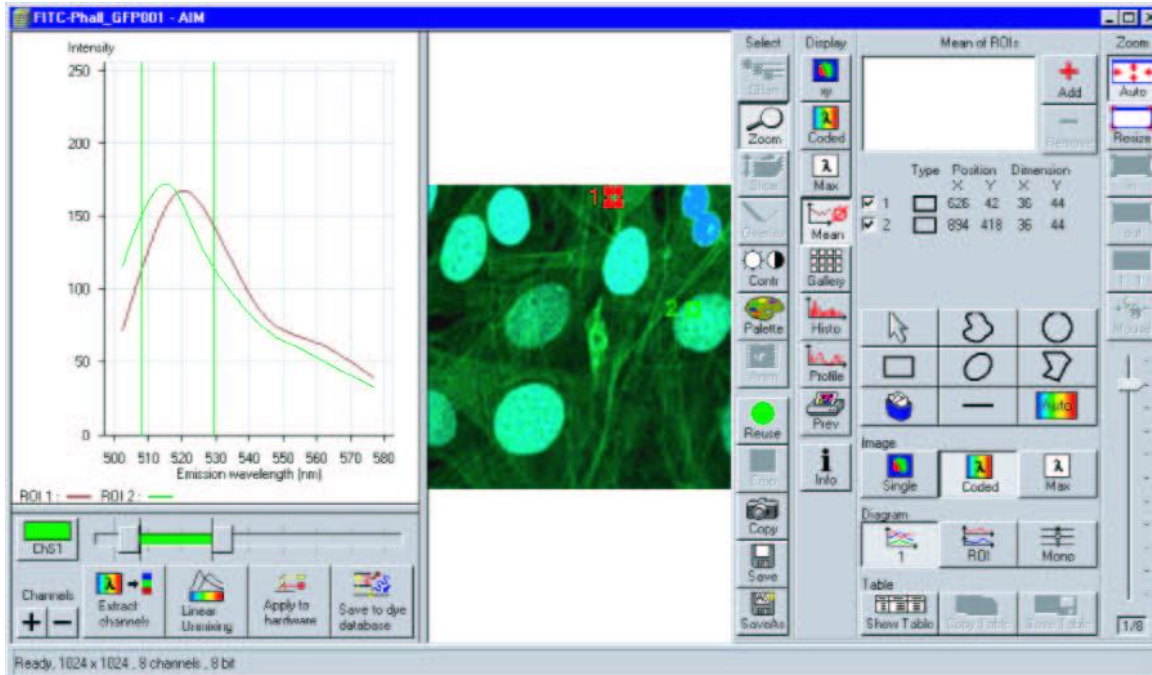


Διαχωρισμός φασμάτων (Spectral unmixing)

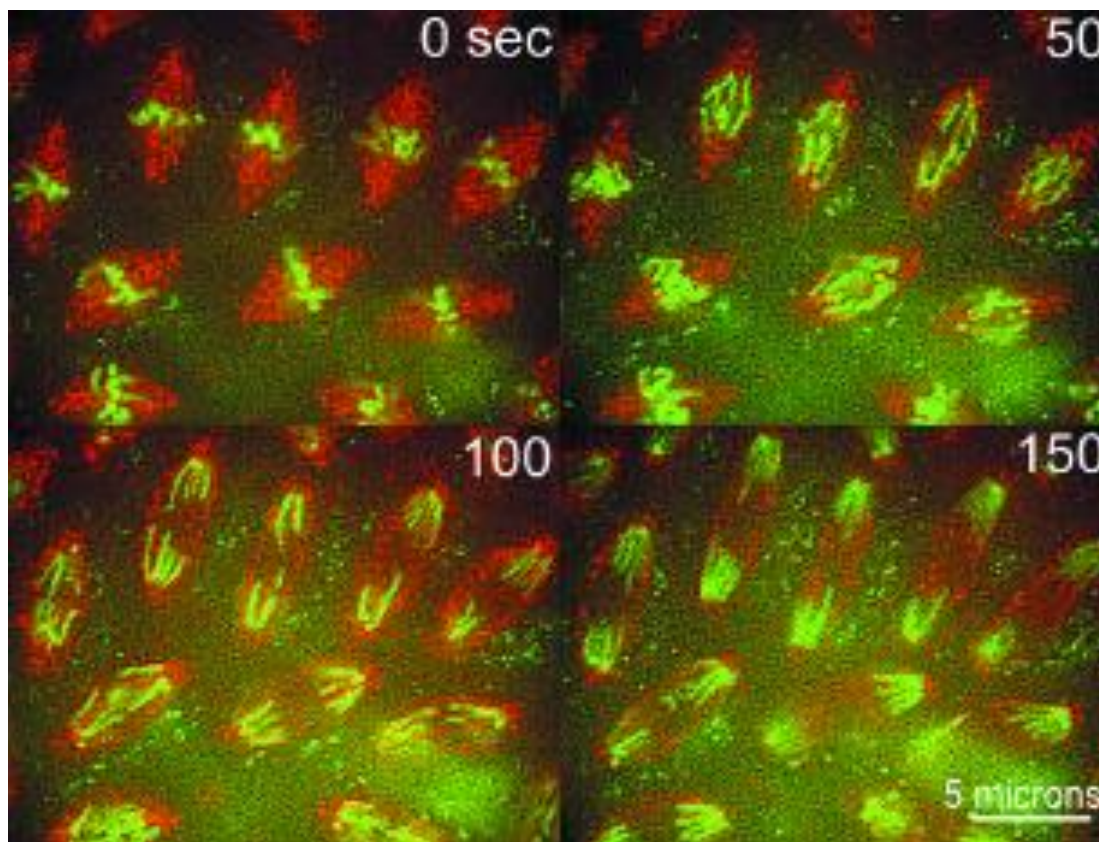
An advanced fluorescence technique that utilizes hardware (usually incorporated into a confocal detector unit) to separate the emitted light from multiple fluorophores into separate spectral components. **Linear unmixing** is the accompanying computational process, related to **deconvolution**, which uses the spectra from each fluorophore as though it were a point-spread function of fixed location to separate or **unmix** the component signals. The technique is a powerful analytical tool that can be used to discriminate distinct fluorophores with highly overlapping spectral profiles.



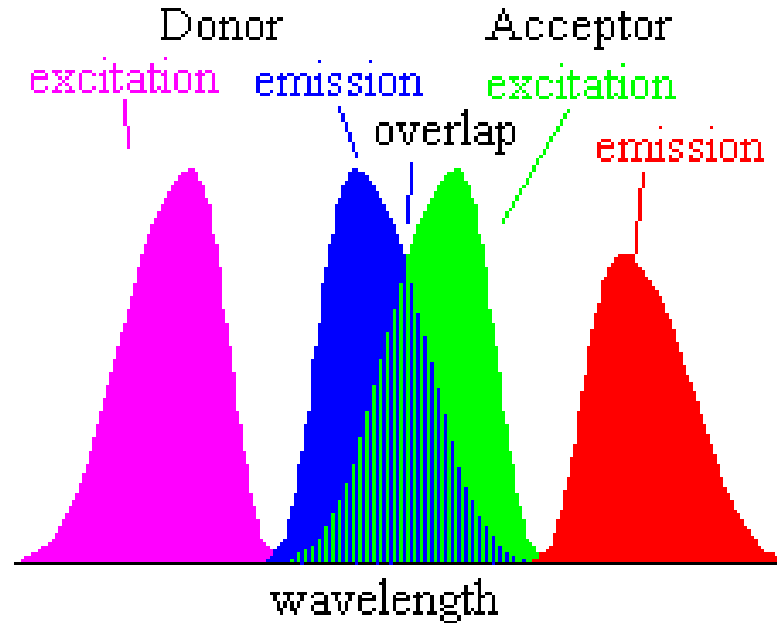
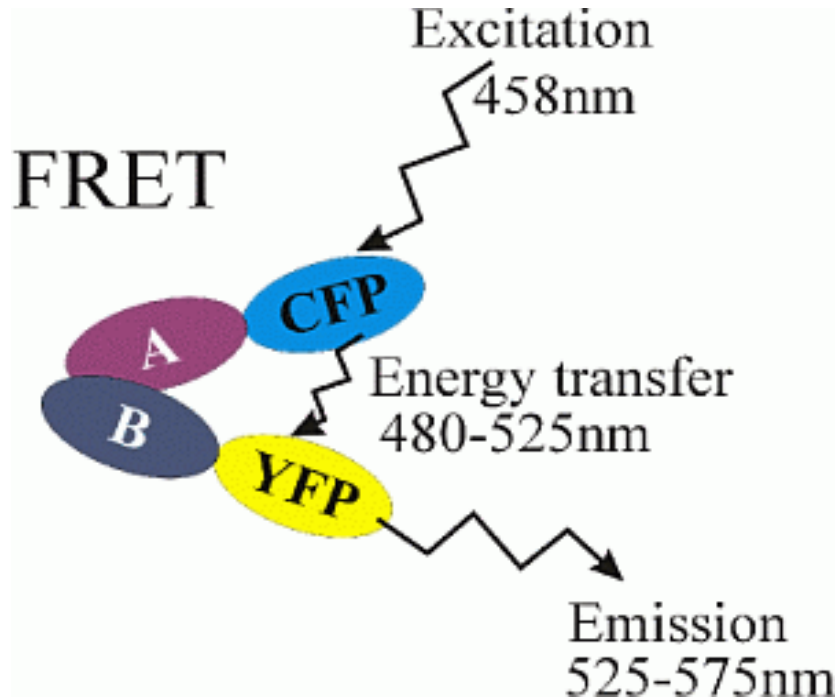
Διαχωρισμός φασμάτων GFP (πυρήνας) και FITC (ινίδια ακτίνης)



**Time-lapse παρατήρηση κυτταρικών διαιρέσεων
συγκυτιακών εμβρύων Δροσόφιλας**



Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού Φθορισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer-FRET)



→ *Ακριβής μέτρηση της απόστασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών (10-100 Å) με τη χρήση 2 φθορίζοντων ιχνηθετών*

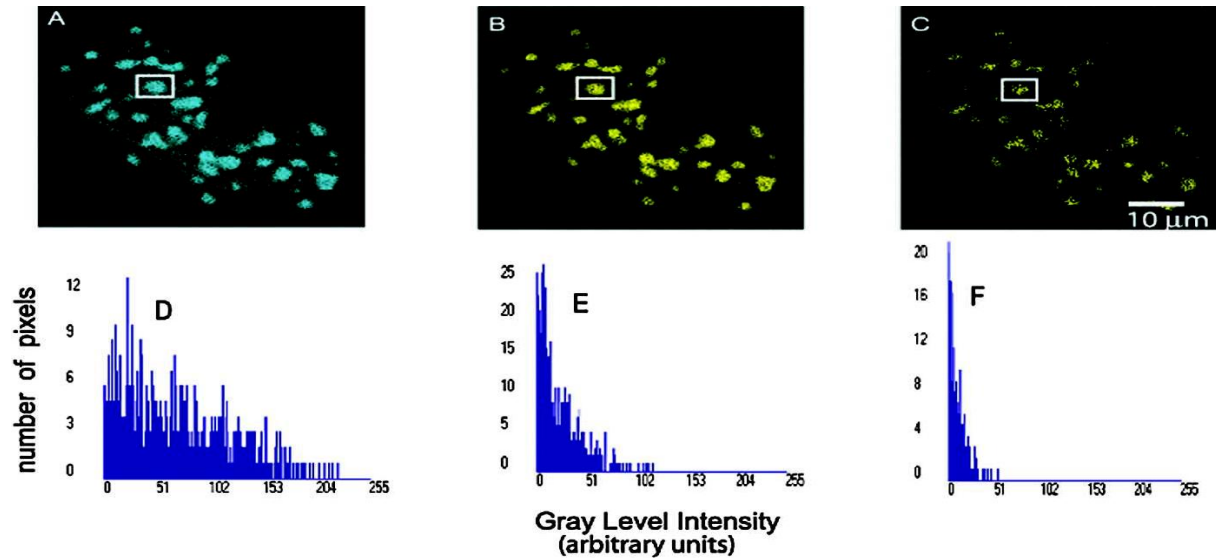
Εφαρμογές FRET:

Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών

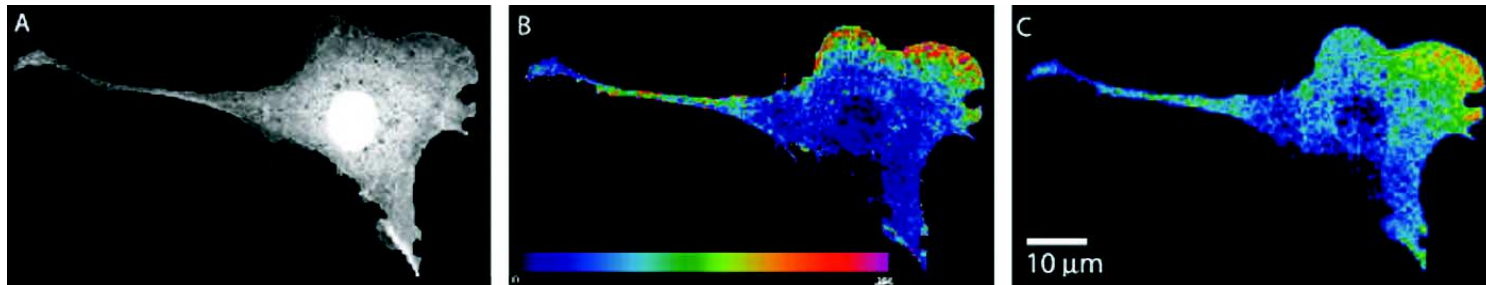
Δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων

Αλληλεπιδράσεις υποδοχέων με τους προσδέτες τους και αντιγόνων/αντισωμάτων

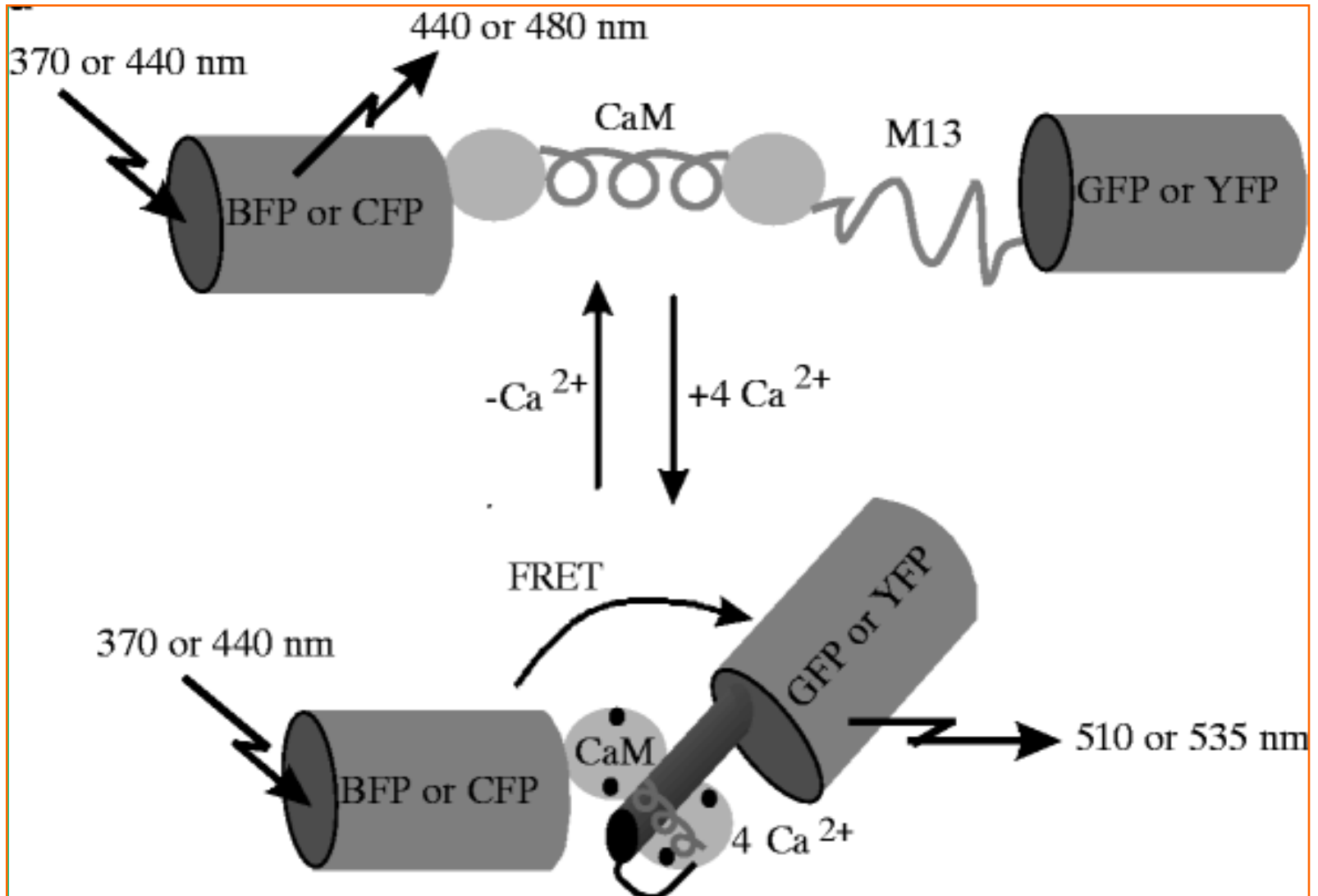
CFP/YFP FRET σε GHFT1-5 ενδοκρινικά κύτταρα



GFP/Alexa FRET σε NIH-3T3 κύτταρα

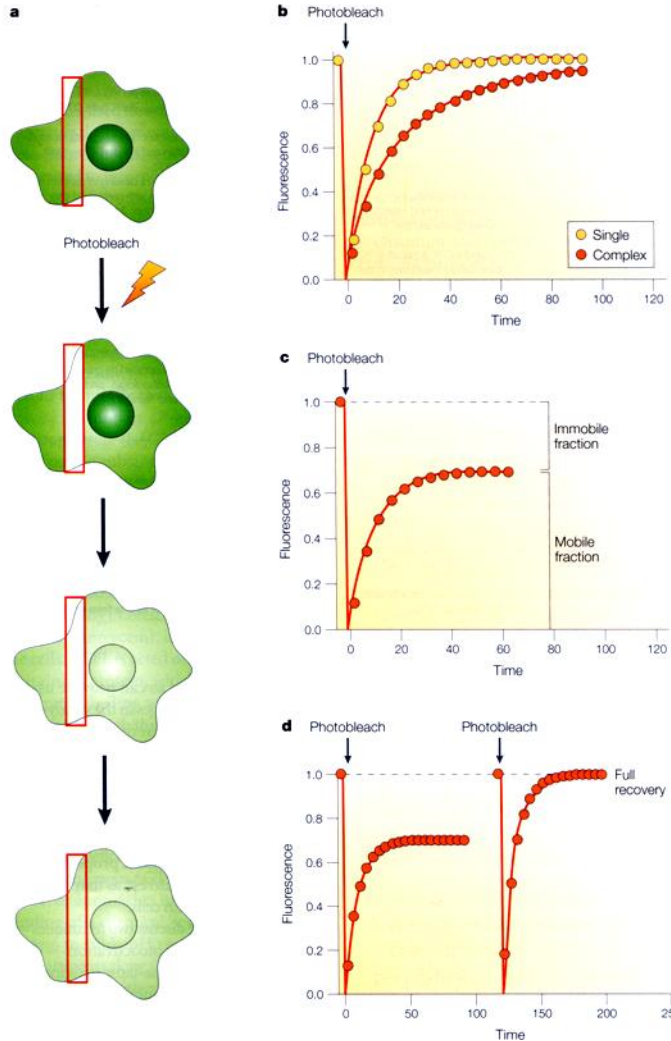


Μέτρηση επιπέδων Ca^{2+} με FRET



FRAP : Fluorescence recovery after photo-bleaching

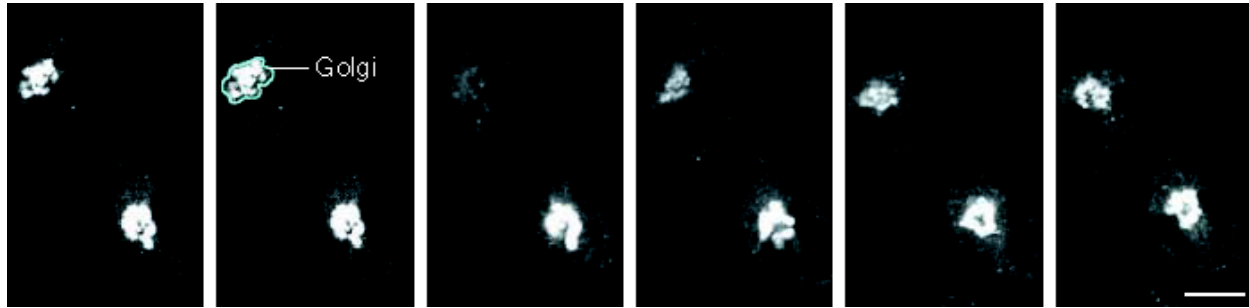
FLIP : Fluorescence loss in photobleaching



→ Παρακολούθηση της δυναμικής πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα

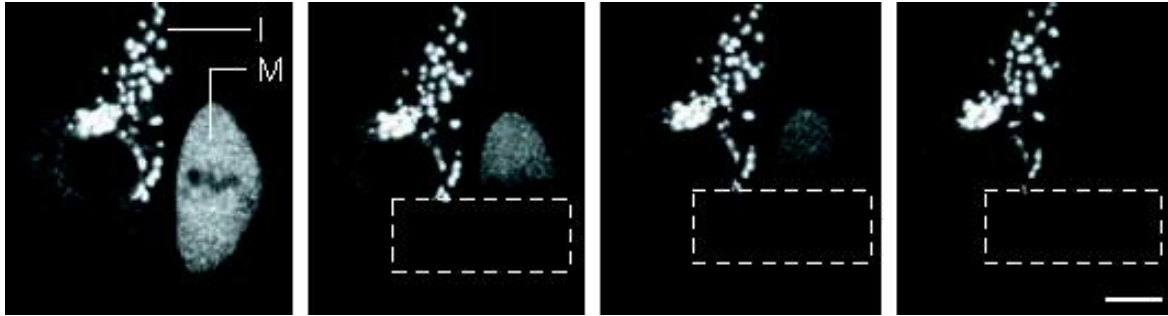
Εφαρμογές:
Εύρεση ενεργητικής μετακίνησης ή παθητικής διάχυσης πρωτεϊνών
Διερεύνηση πρόσδεσης / αποδέσμευσης πρωτεϊνών από ενδοκυτταρικά οργανίδια

FRAP



Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) - Translational mobility (lateral diffusion coefficients) of fluorescently labeled macromolecules and small fluorophores can be determined by photobleaching recovery techniques. In FRAP, a very small, selected region (several micrometers in diameter) is subjected to intense illumination, usually with a laser, to produce complete photobleaching of fluorophores in the region. The result is a dramatic reduction or annihilation of fluorescence. After the photobleaching pulse, the rate and extent of fluorescence intensity recovery in the bleached region is monitored as a function of time to generate information about repopulation by fluorophores and the kinetics of recovery.

FLIP



Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP) - In a technique related to FRAP, a defined region of fluorescence within a living cell is subjected to repeated photobleaching by illumination with intense irradiation. Over a measured time period, this action will result in complete loss of fluorescence signal throughout the cell if all of the fluorophores are able to diffuse into the region that is being photobleached. By calculating the rate at which fluorescence is extinguished from the entire cell, the diffusional mobility of the target fluorophore can be determined.

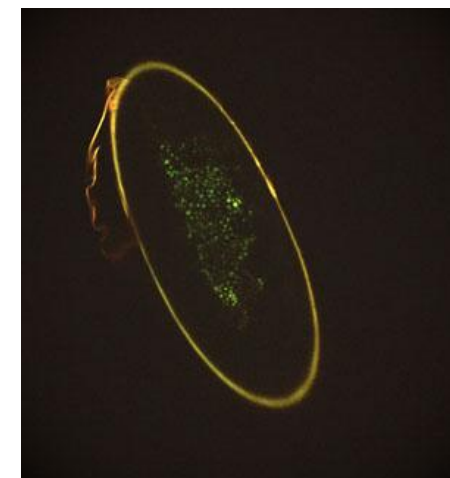
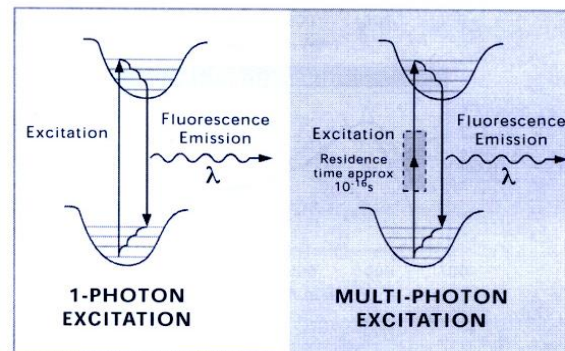
Συνεστιακή Μικροσκοπία 2-φωτονίων

Ανάγκες που δημιουργήθηκαν από τις τεχνολογίες ζωντανής απεικόνισης

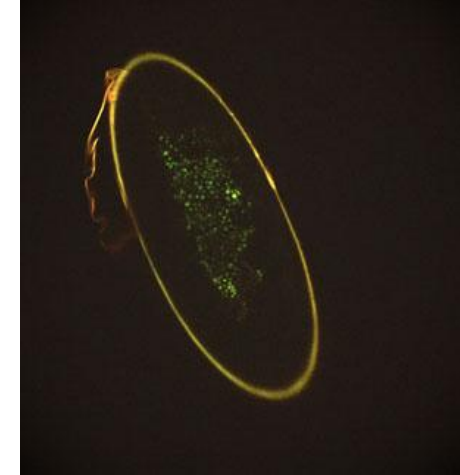
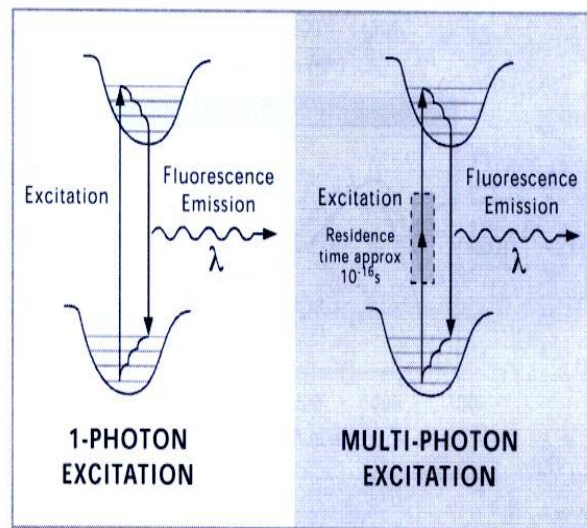


Παρατήρηση χοντρών δειγμάτων, πολλές φορές και ολόκληρων εμβρύων ή οργανισμών

Παρατήρηση ζωντανών δειγμάτων για μεγάλα χρονικά διαστήματα με ελαχιστοποίηση της θερμικής καταστροφής του ιστού

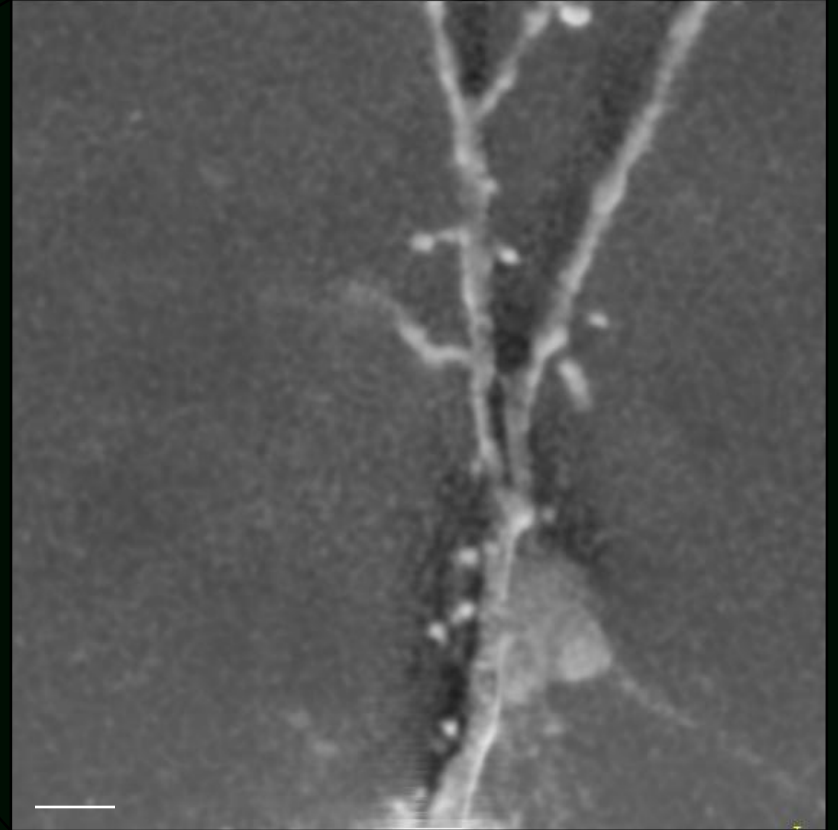
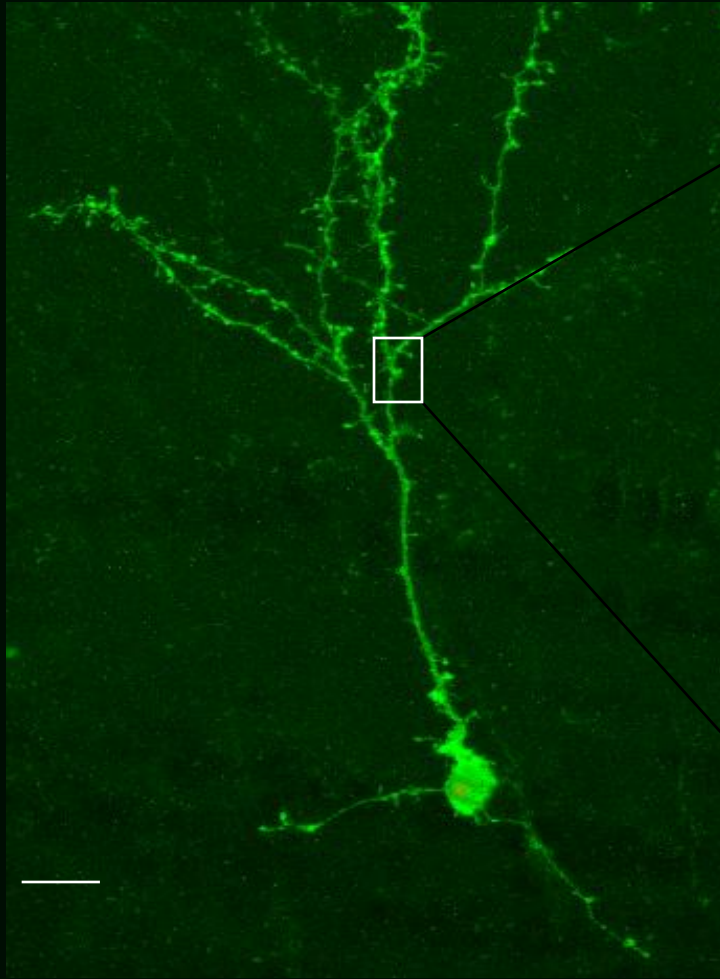


Συνεστιακή Μικροσκοπία 2-φωτονίων



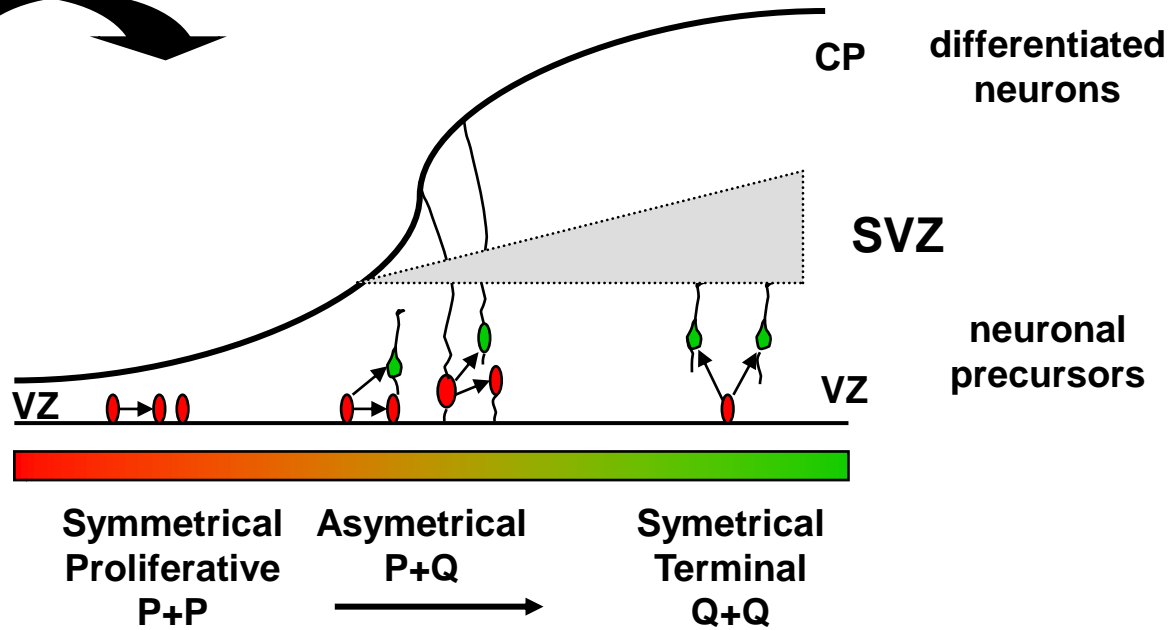
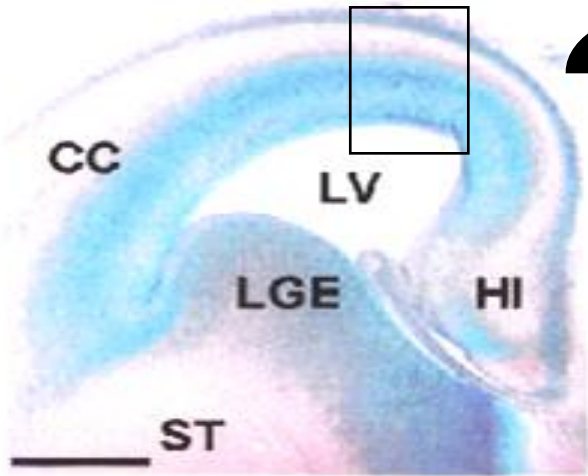
A derivative technique of laser scanning confocal microscopy where fluorochrome excitation is based on an **infrared or long wavelength visible light laser beam** whose energy density is adjusted to allow **frequency doubling or tripling** at the point of beam focus in the **specimen**. Fluorophores in the specimen are simultaneously **excited by two or three photons** to produce excited state transitions that are equivalent to single-photon fluorescence. For example, two and three photon excitation at 900 nanometers is equivalent to excitation by higher energy photons of 450 and 300 nanometers, respectively. Multiphoton microscopy enables deep penetration into thick tissues and eliminates the need for a pinhole aperture because fluorescence emission is restricted to a single focal plane.

Maturation of Class 5 Neurons

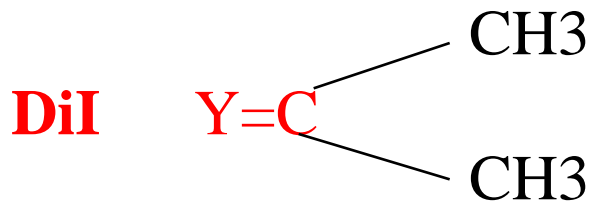
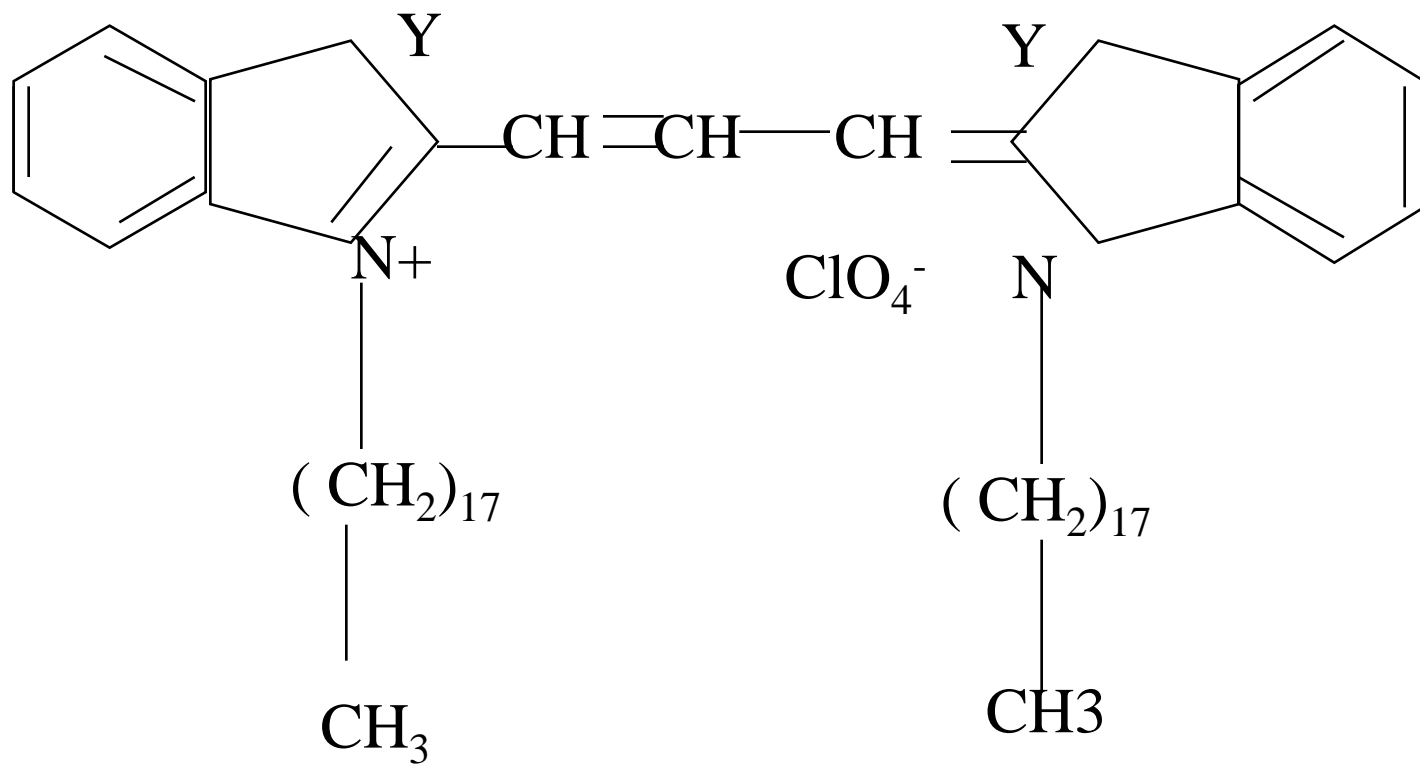


*Εφαρμογές της Συνεστιακής Μικροσκοπίας στη
διαλεύκανση των μηχανισμών
Νευρογένεσης που λαμβάνουν χώρα στον
Αναπτυσσόμενο και Ενήλικο Εγκέφαλο του Ποντικού*

Cortical neurogenesis



CHEMICAL STRUCTURE OF CARBOCYANINE DYES

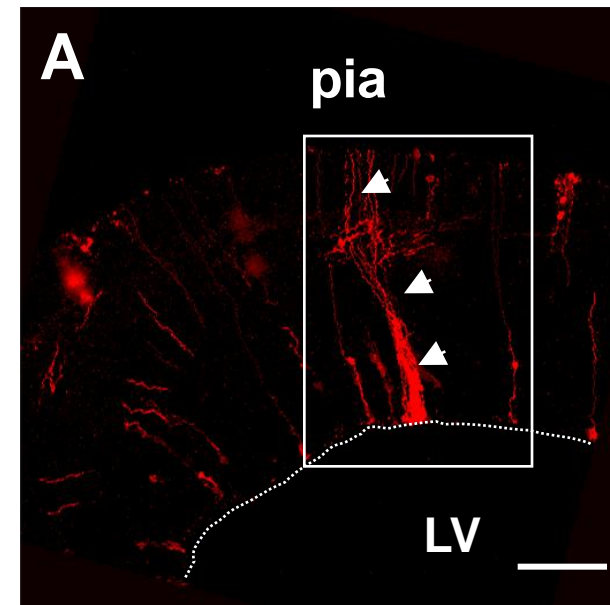
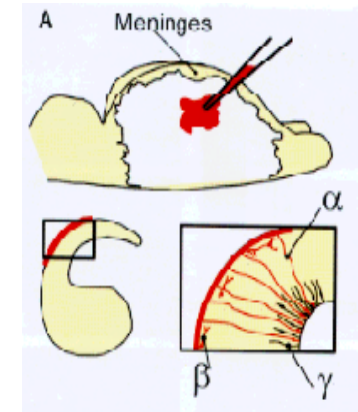
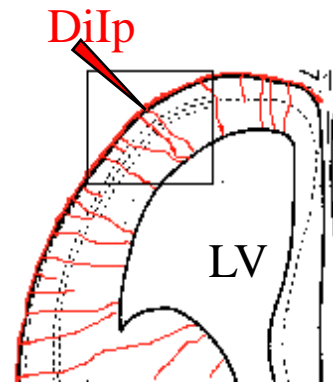


Fluorescent Carbocyanine Dyes

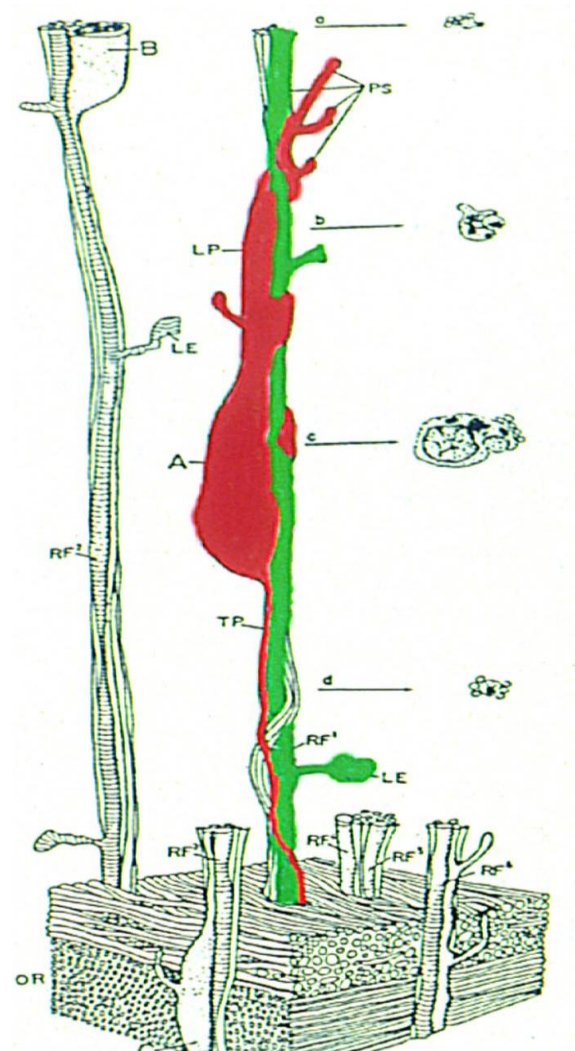
Lipid soluble---Become incorporated into the plasma membrane

Honig and Hume found in 1985 that these dyes are excellent **retrograde and anterograde tracers** in the developing nervous system.

They do not affect the survival, development, or basic physiological properties of neurons and do not spread from labeled to unlabeled neurons. Cells become retrogradely labeled mainly by **lateral diffusion** of dye in the plane of the membrane, rather than fast axonal transport.. An additional feature of carbocyanine labeling is that neuronal processes are brightly fluorescent for the first few days in culture, presumably because dye rapidly diffuses into newly inserted membrane. Godement et al., 1987 showed that these dyes **can be used to label axonal projections in fixed tissues.**



Radial glial guided neuronal migration: an electron microscopic study

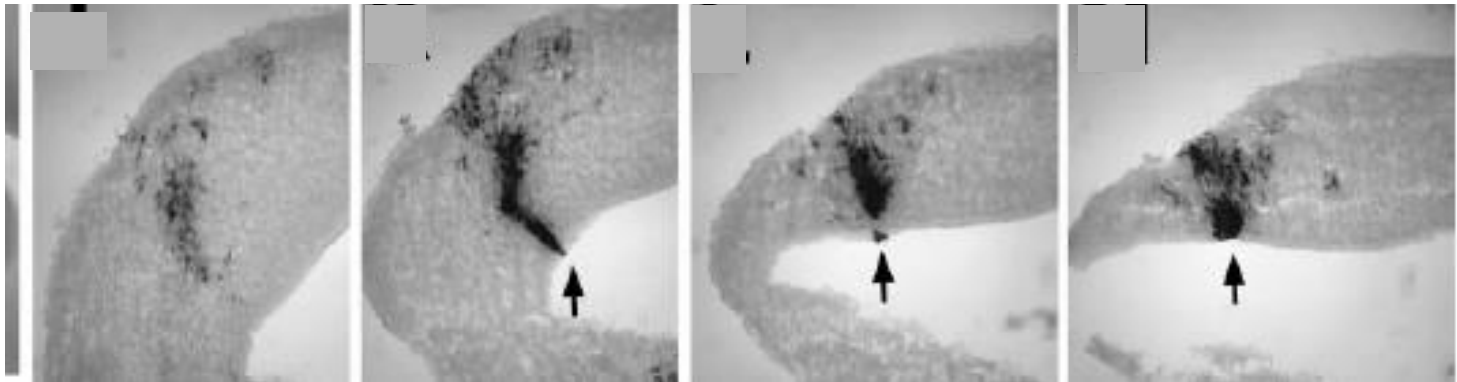


Rakic, 1972

Methods of labelling migrating cells

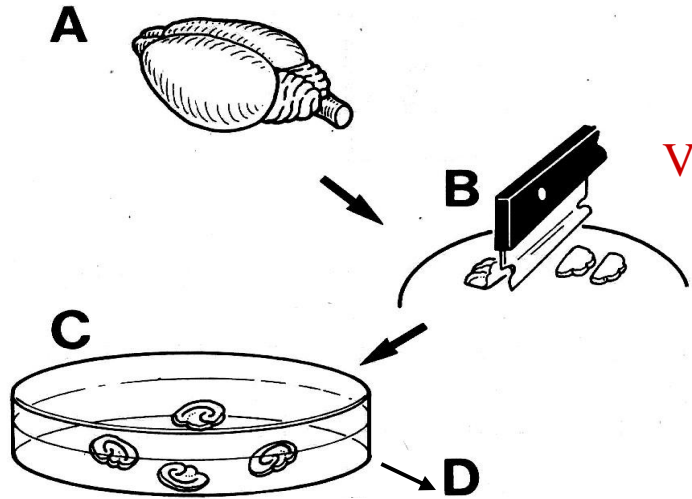
In vivo: morphological studies

Lineage analysis: replication
incompetent retrovirus with
lacZ reporter gene



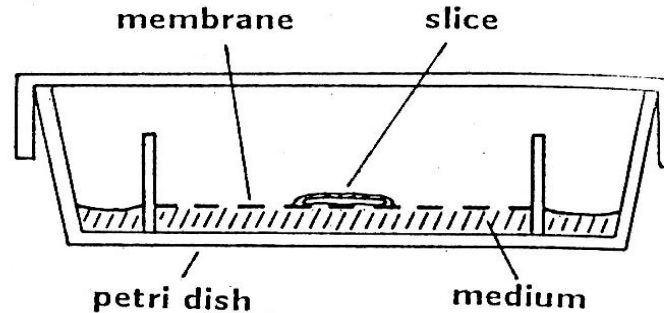
Organotypic ('slice') cultures of the brain

Brain embedded in agarose



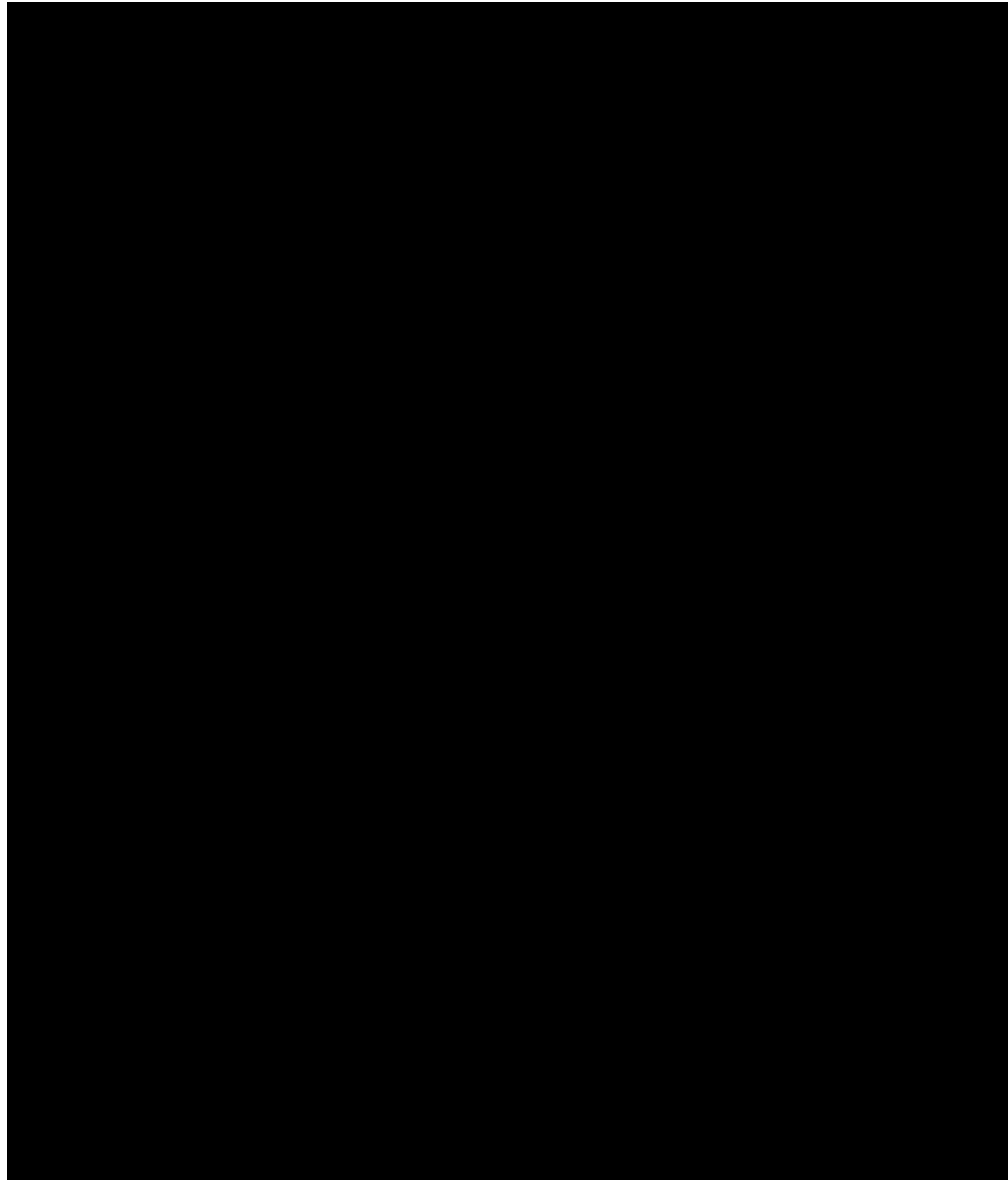
Vibratome sections ~400 μ m

1h incubation in
4°C medium



Culture on millipore
inserts

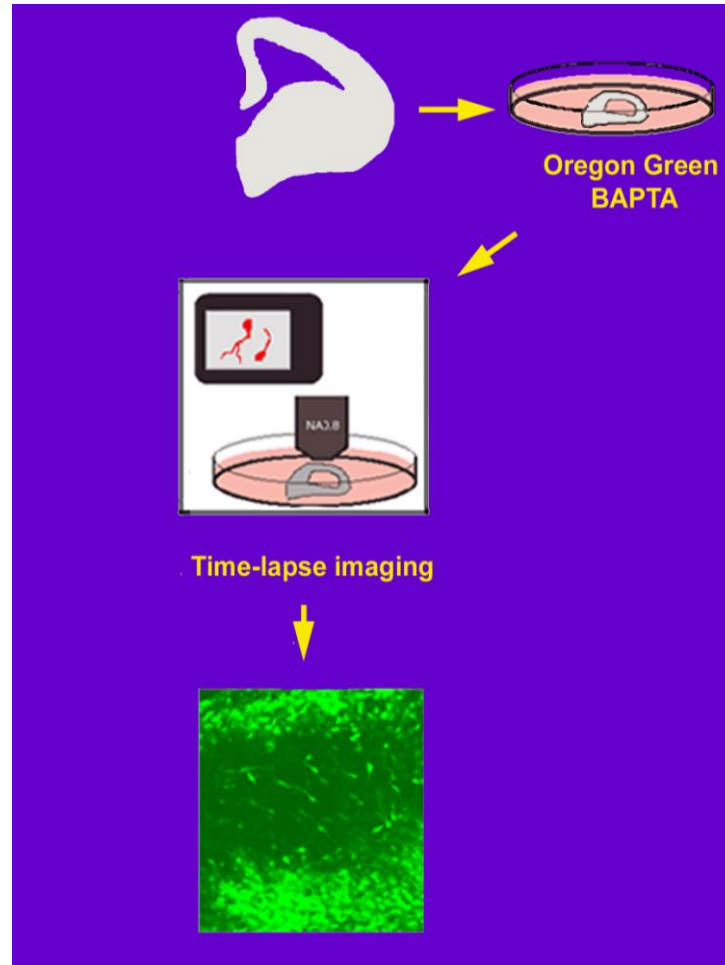
Radial glia proliferation and migration



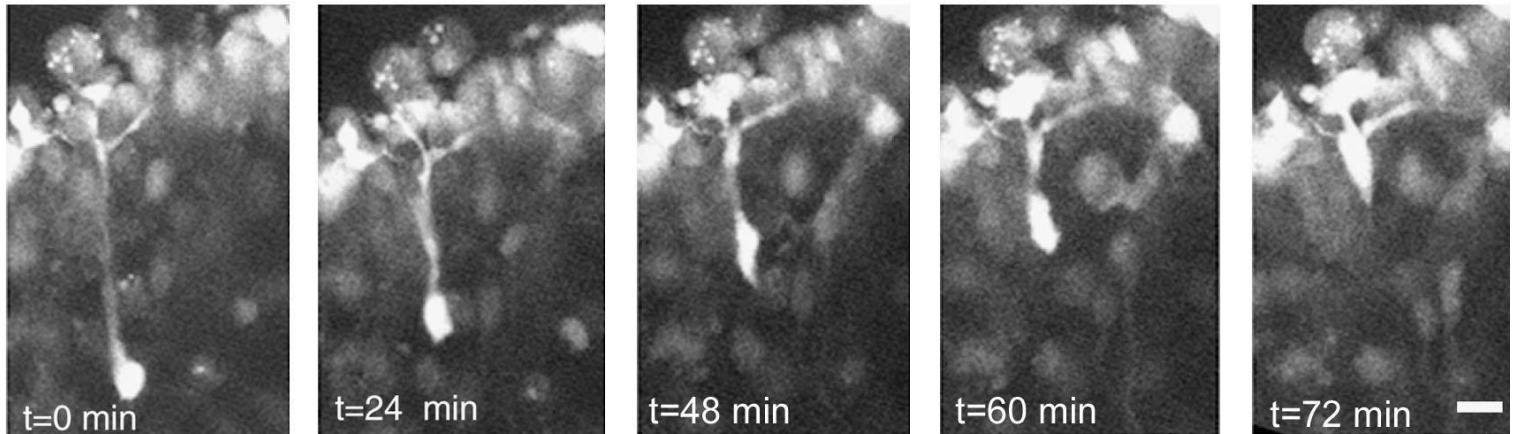
provided by Dr. A. Kriegstein

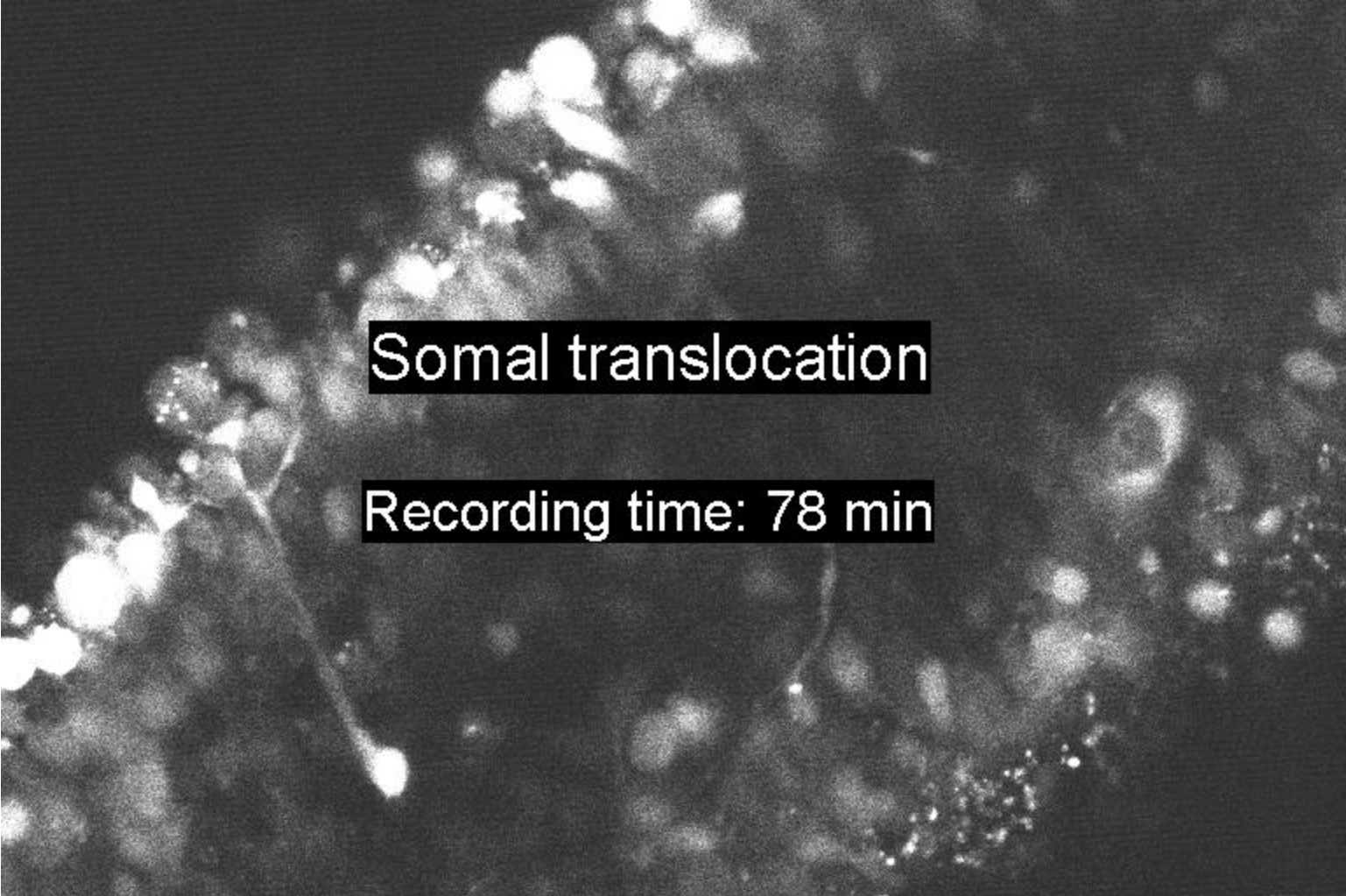


In vitro assay for neuronal migration: labelling with Oregon Green BAPTA



Somal translocation: real-time imaging



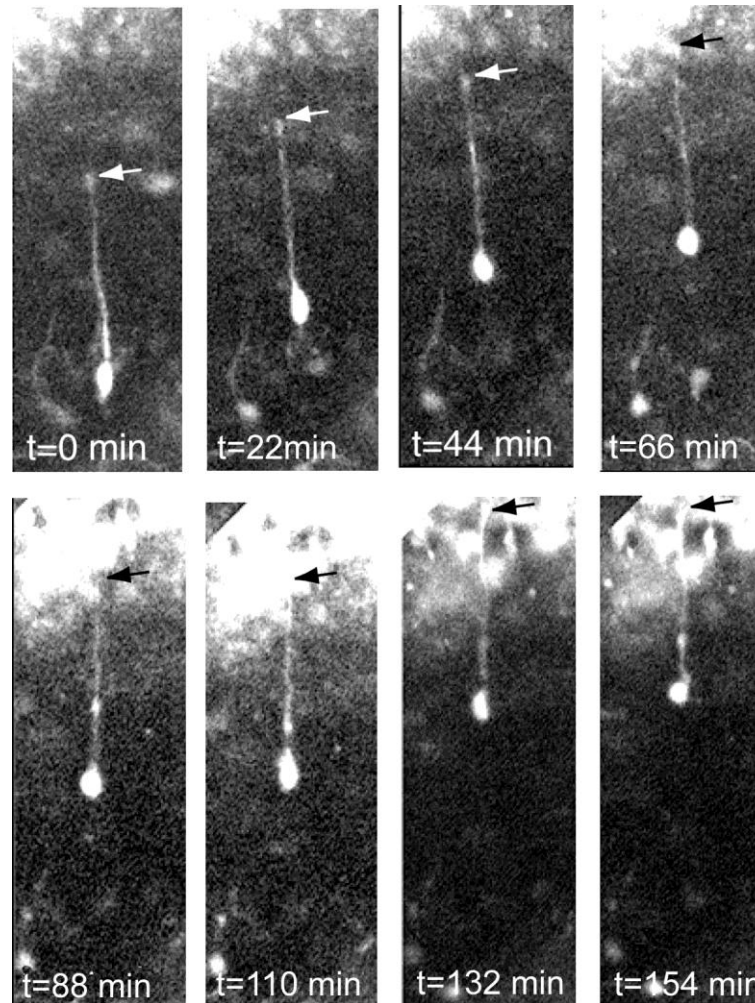


Somal translocation

The image is a grayscale fluorescence micrograph of a neuron. The cell body (soma) is the central, larger structure, and several processes (dendrites and an axon) extend from it. Numerous bright, punctate spots are visible throughout the neuron, representing fluorescently labeled organelles or proteins. The background is dark, highlighting the neuron's structure and the bright spots.

Recording time: 78 min

Glial-guided locomotion: real-time imaging

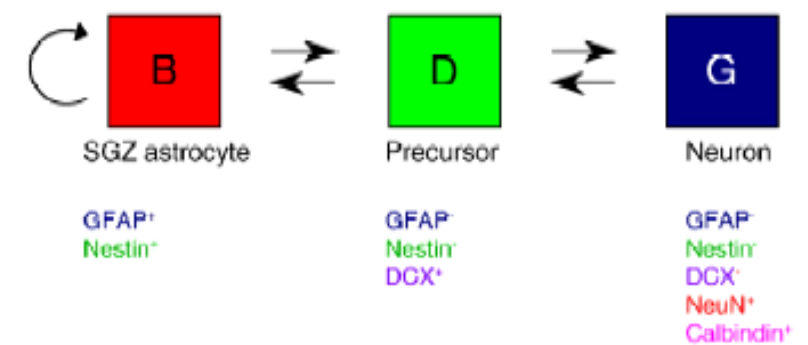
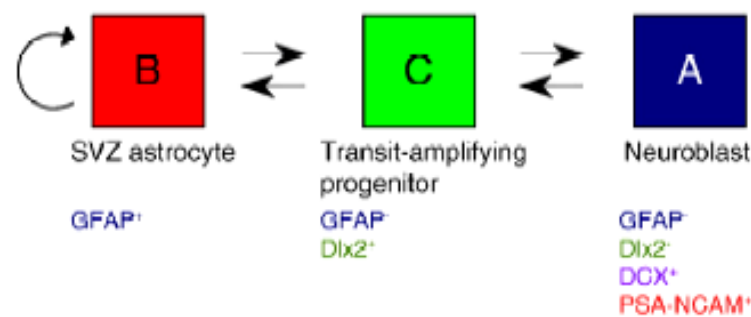
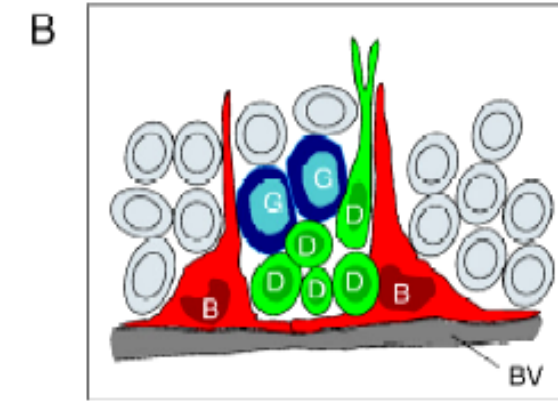
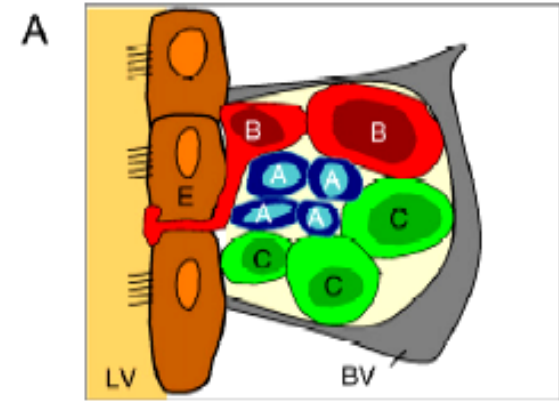
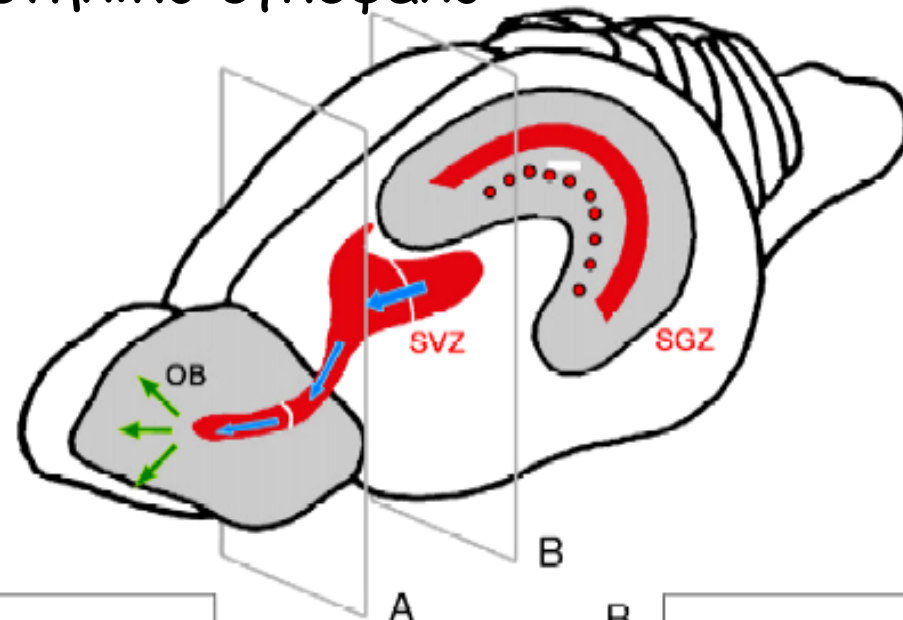


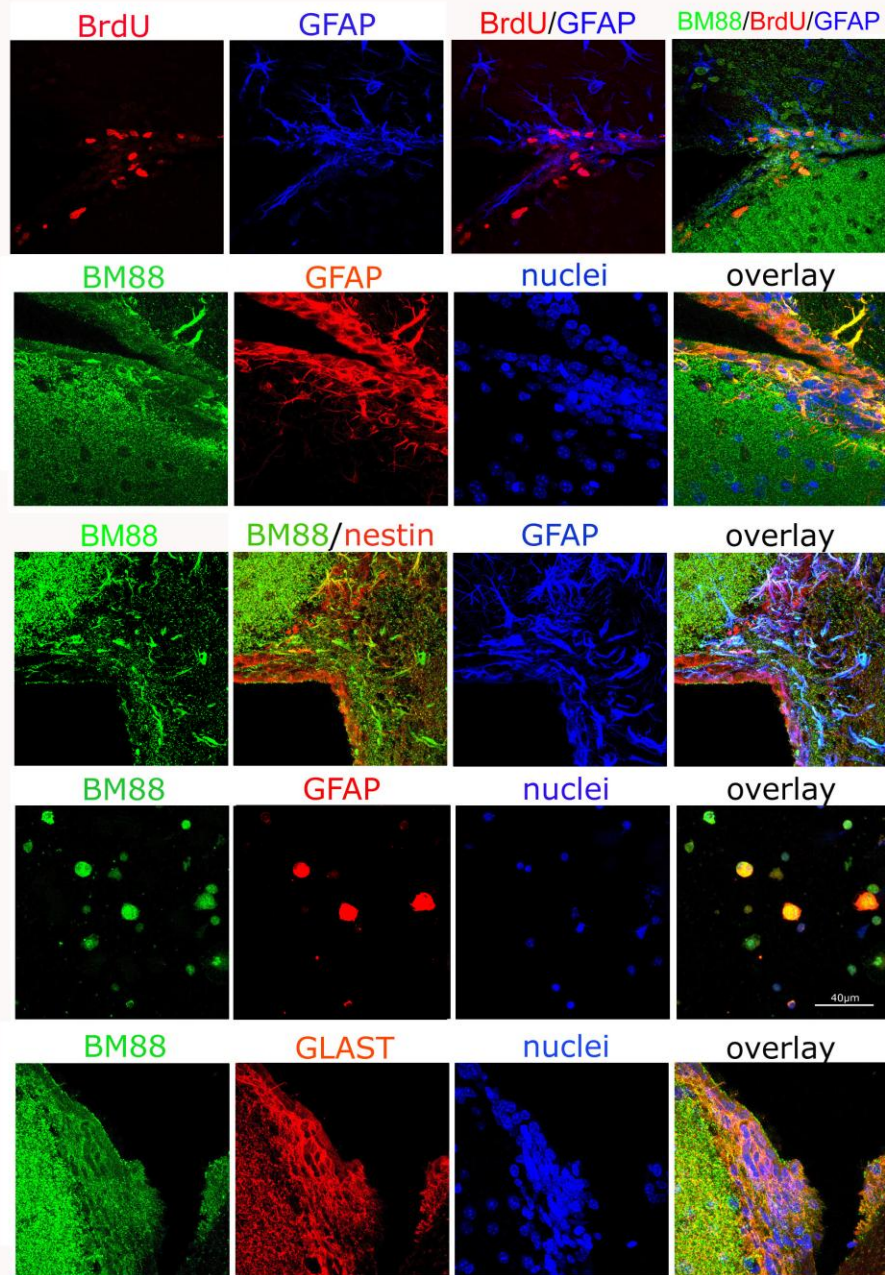
A black and white fluorescence microscopy image showing a cell with a bright, elongated head and a long, thin tail. The cell is positioned in the center of the frame, moving towards the right. The background is dark with numerous bright, irregularly shaped spots and clusters, representing glial cells or other cellular structures. The overall appearance is that of a cell navigating through a complex, textured environment.

Glial-guided locomotion

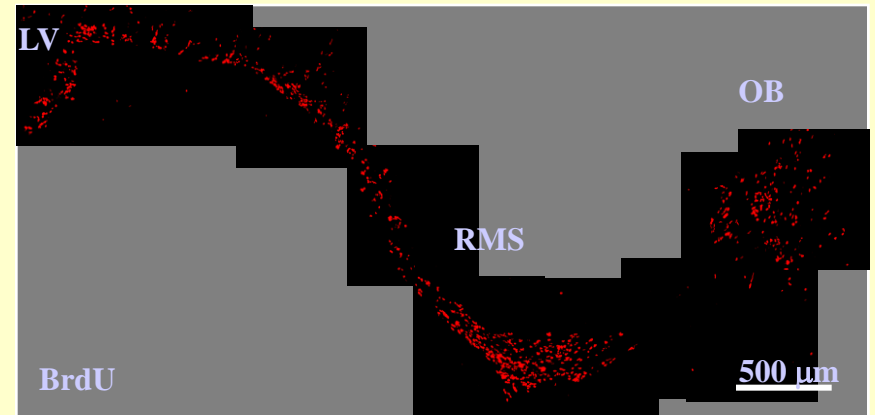
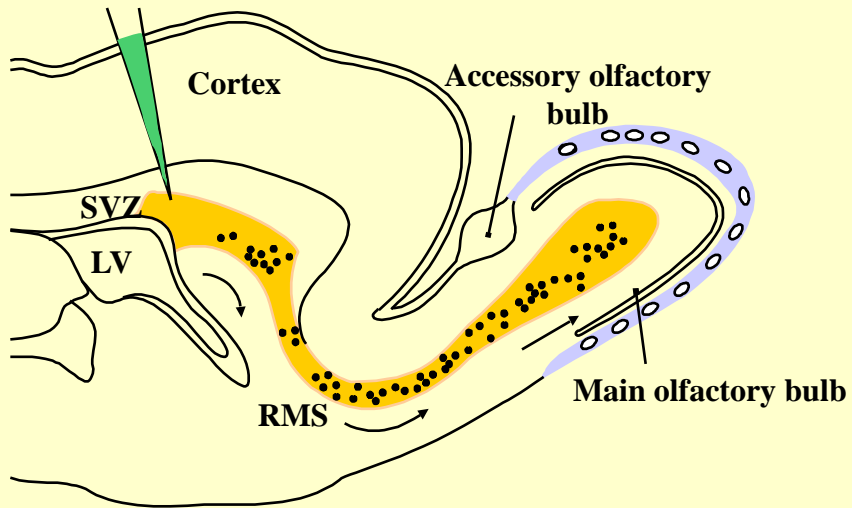
Recording time: 160 min

Νευρογένεση στον ενήλικο εγκέφαλο





II - Maturation and Functional Integration of Newborn Neurons

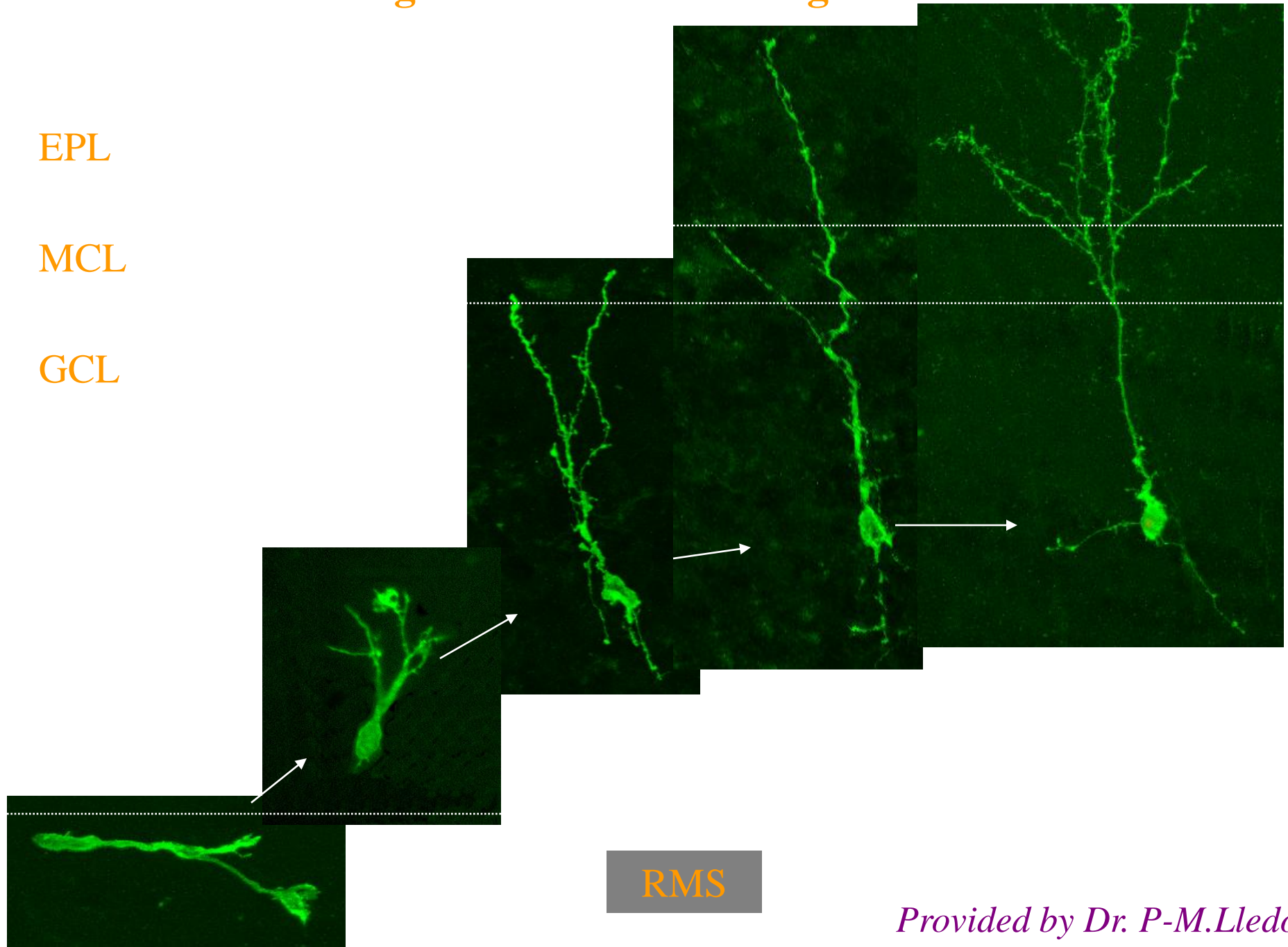


Tangential and Radial Migrations

EPL

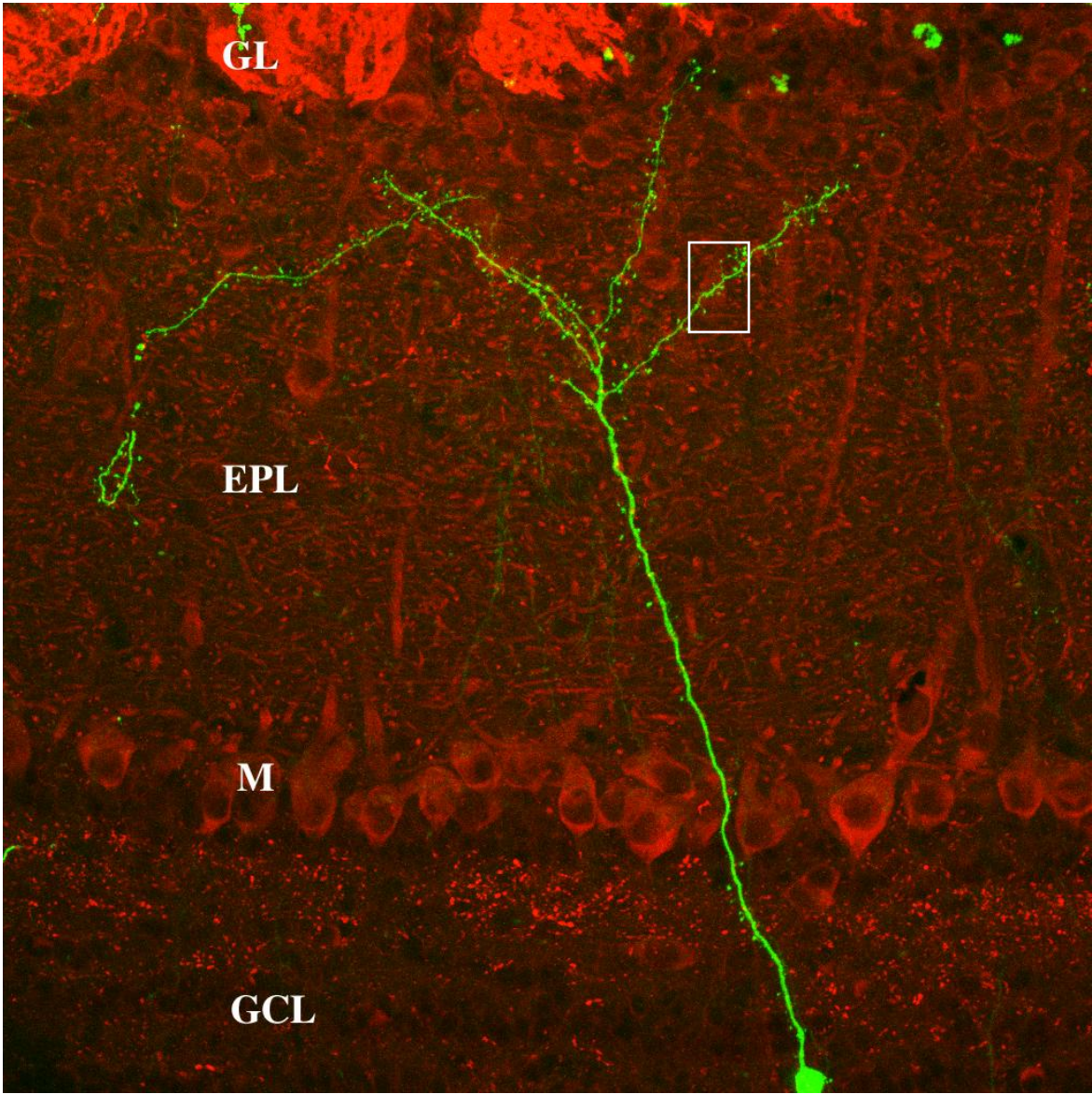
MCL

GCL

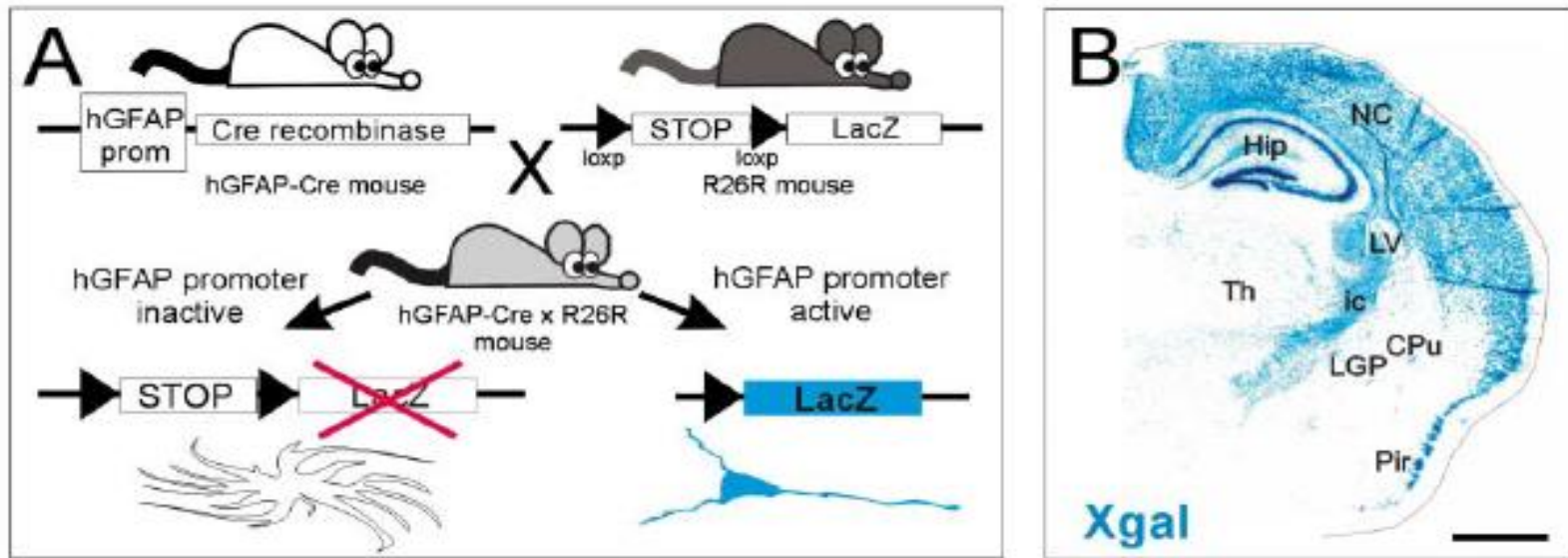


RMS

Provided by Dr. P-M.Lledo



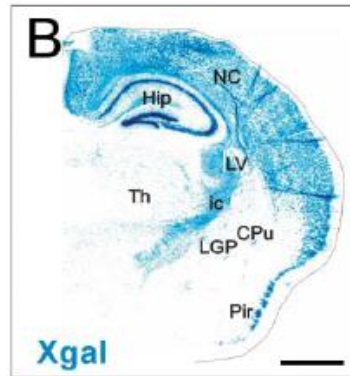
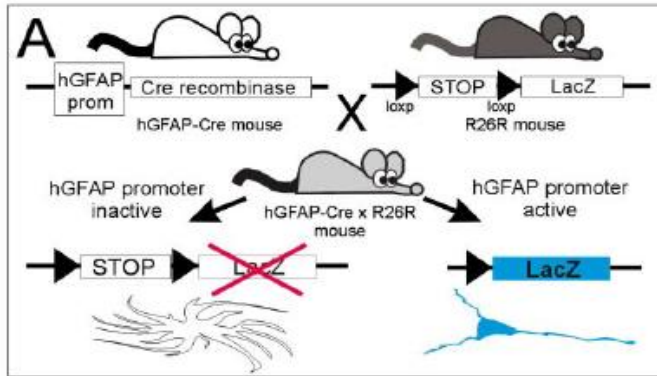
*Μοντέλο επαγόμενης in vivo έκφρασης
συγκεκριμένων πρωτεϊνών μαρτύρων*



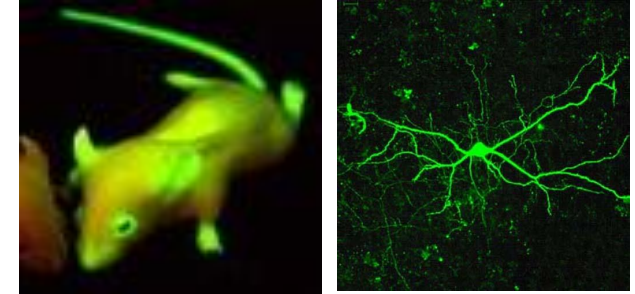
Έκφραση σε πληθυσμούς κυττάρων, όπου είναι ενεργός ο υποκινητής

Υπάρχουσα τεχνογνωσία

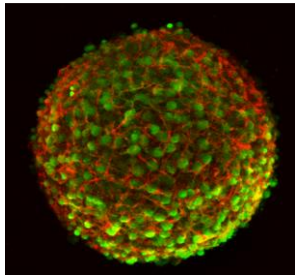
Τεχνολογία Cre-lox



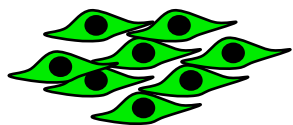
Επαγόμενη ιστοειδική in vivo σήμανση



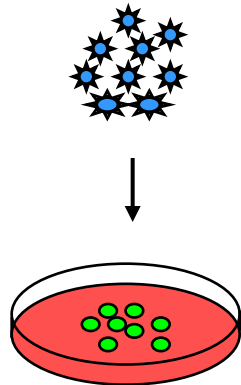
Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα



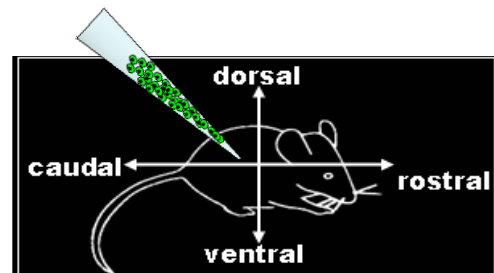
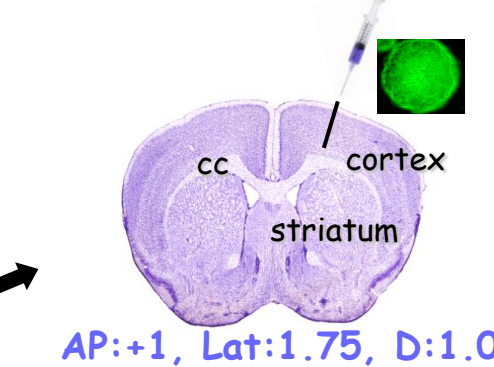
Κύτταρα Schwann



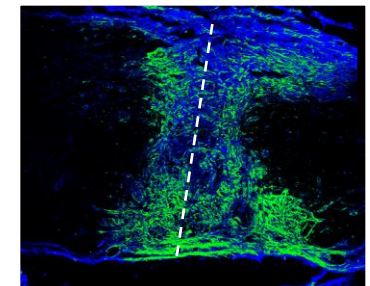
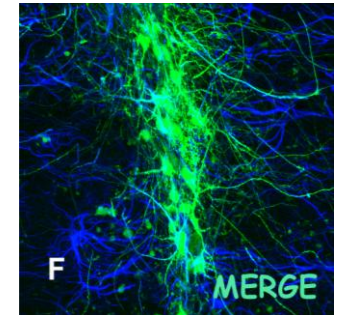
ικη μεταγωγή (έκφραση/ απενεργοποίηση)



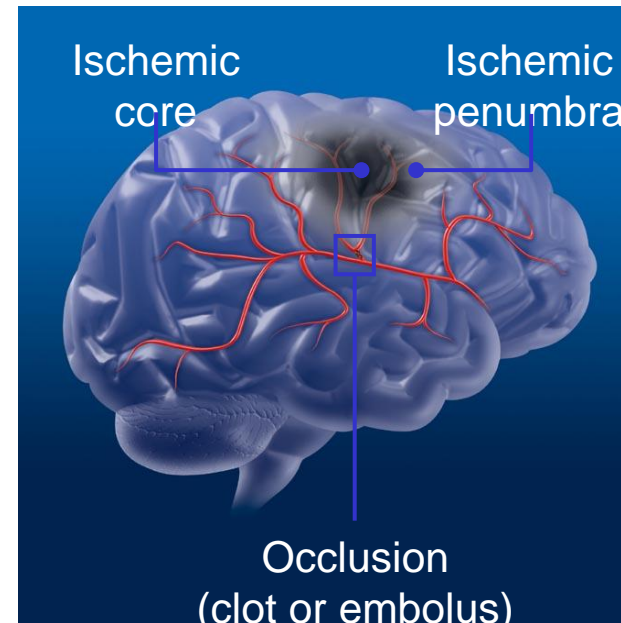
μοντέλα τραυματισμού & στερεοταξικές μεταμοσχεύσεις κυττάρων



Συνεστιακή Απεικόνιση



☀ Απόφραξη της μέσης αρτηρίας του εγκεφαλικού φλοιού: ζωικό μοντέλο εγκεφαλικού επεισοδίου. Το ισχαιμικό κέντρο είναι η περιοχή στην οποία η ροή αίματος μειώνεται στο 15% της φυσιολογικής τιμής, ενώ στην ισχαιμική περιφέρεια η ροή μειώνεται στο 15-40% της φυσιολογικής τιμής.

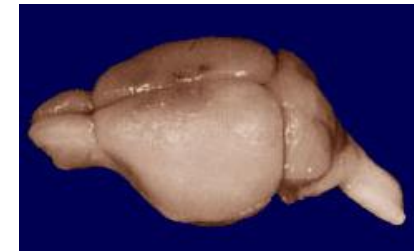
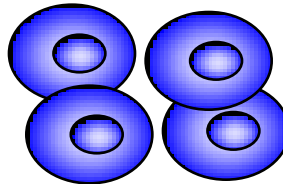


☀ Πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-EAE): ζωικό μοντέλο Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (Multiple Sclerosis-MS)

Ένεση μυελινικών πεπτιδίων



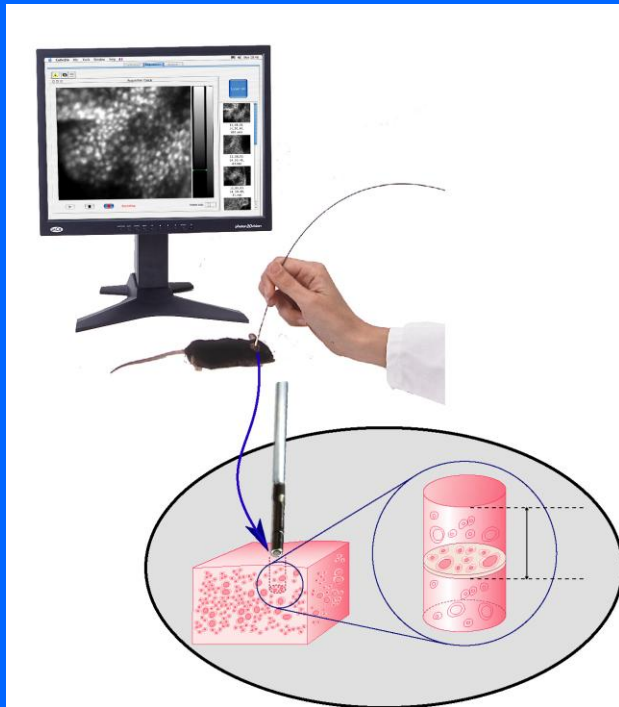
Διαφοροποίηση μυελινο-ειδικών κυττάρων Th1 και Th17 που εισέρχονται στο ΚΝΣ προκαλώντας φλεγμονή και προοδευτική απομυελίνωση



Microscopic *in situ* Imaging with Optical Fibers

The Cell-viZio allows

- *In vivo* and *in situ* small animal imaging with a flexible mini-probe
- **Functional imaging** thanks to a **confocal fluorescence technology**
- **Microscopic** observations with a **lateral resolution** down to **5 μm**
- **Dynamic** observations with **real time** acquisition



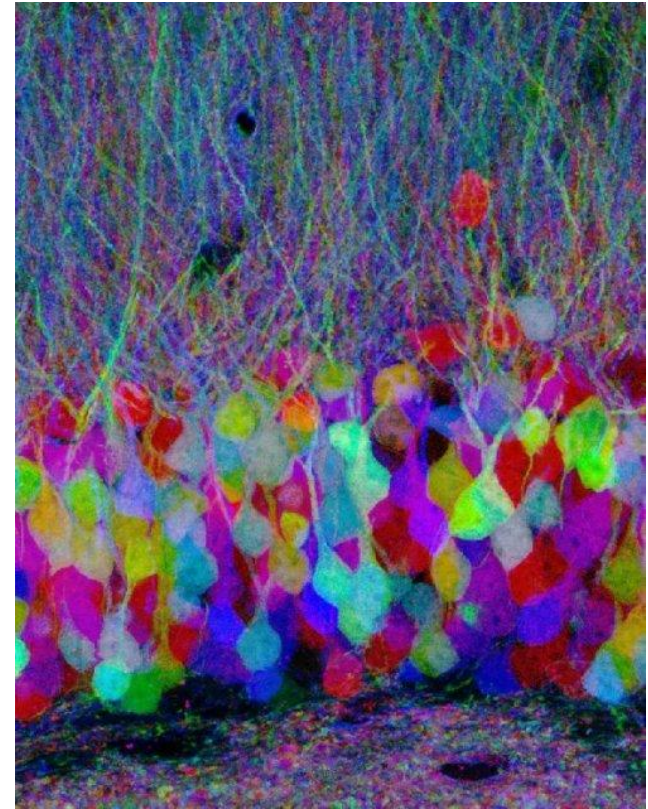
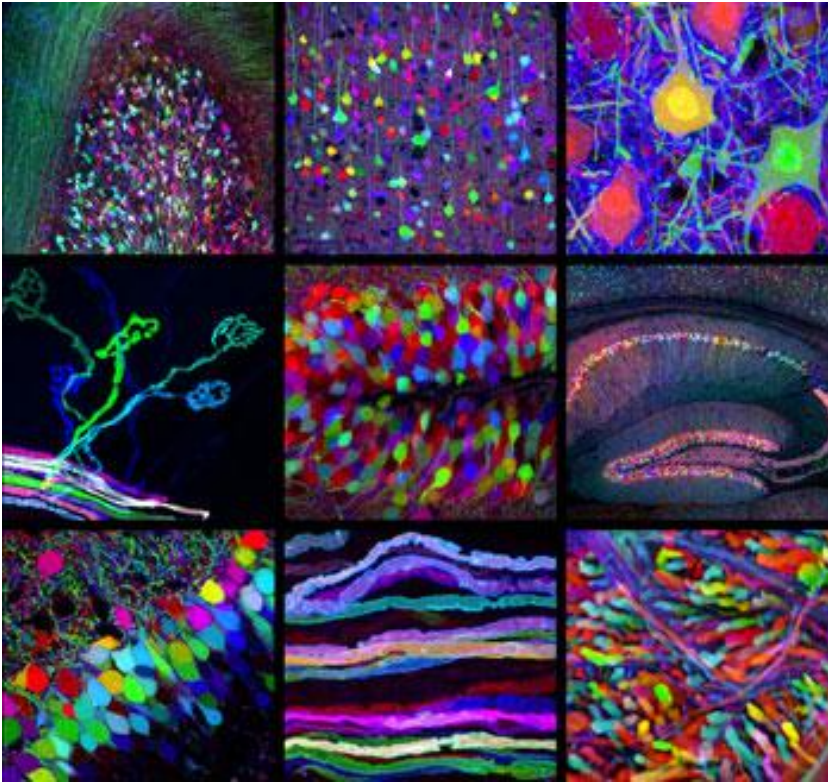
Probes contain a few thousands to a few tens of thousands optical fibers.

Their diameter ranges from 0.35 to 1.8 mm.

Their field of view ranges from 120 x 85 to 400 x 280 μm .

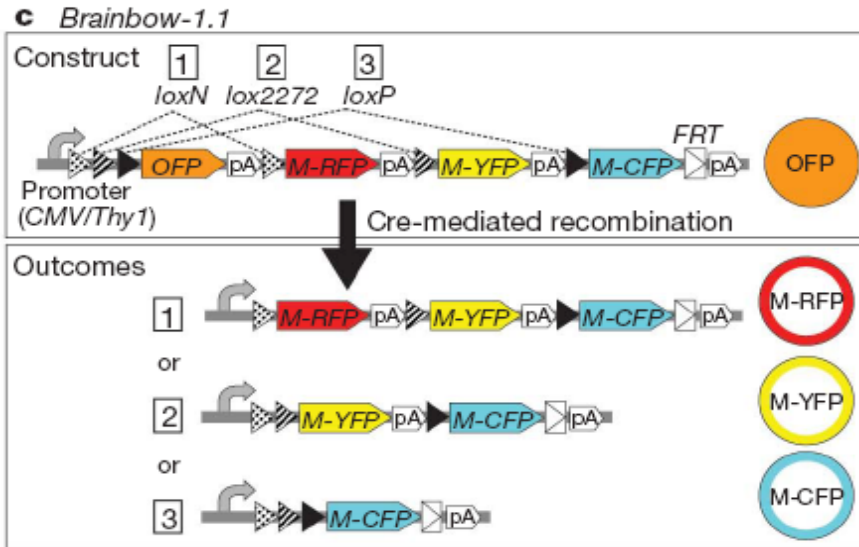


Brainbow



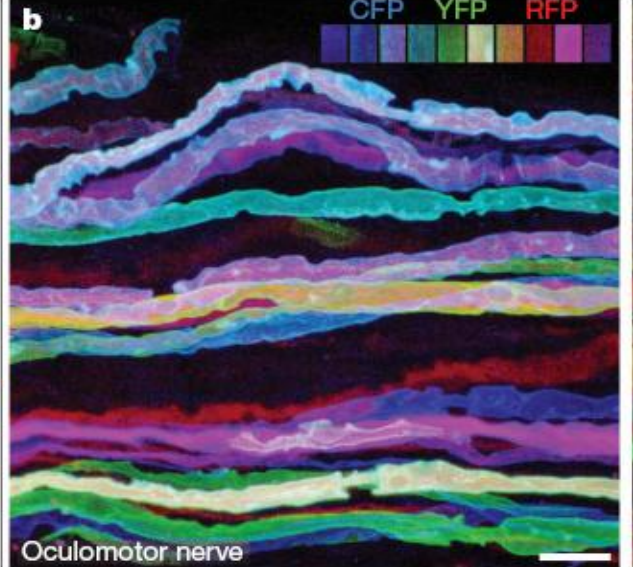
Brainbow is a term coined to describe a process by which individual neurons of the brain are mapped with fluorescent proteins, which allow the neurons to glow with specific colors under a light source. By controlling and varying the amount of red, green, and blue derivatives of GFP expressed in individual neurons, it is possible to map each neuron with a distinctive color.

The technique was developed in the Spring of 2007 by a team led by and Jeff Lichtman and Joshua Sanes both professors in the Department of Molecular and Cellular Biology at Harvard University. While earlier techniques allowed for mapping only a few neurons, the new method allows more than 100 differently mapped neurons can be simultaneously mapped in this manner.



a XFP combinations

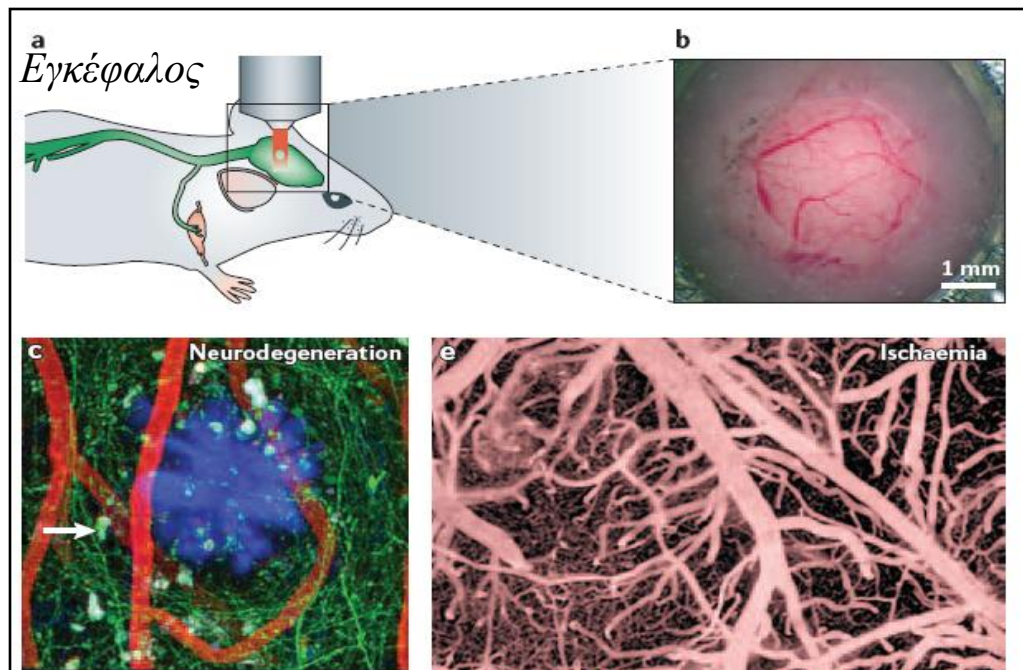
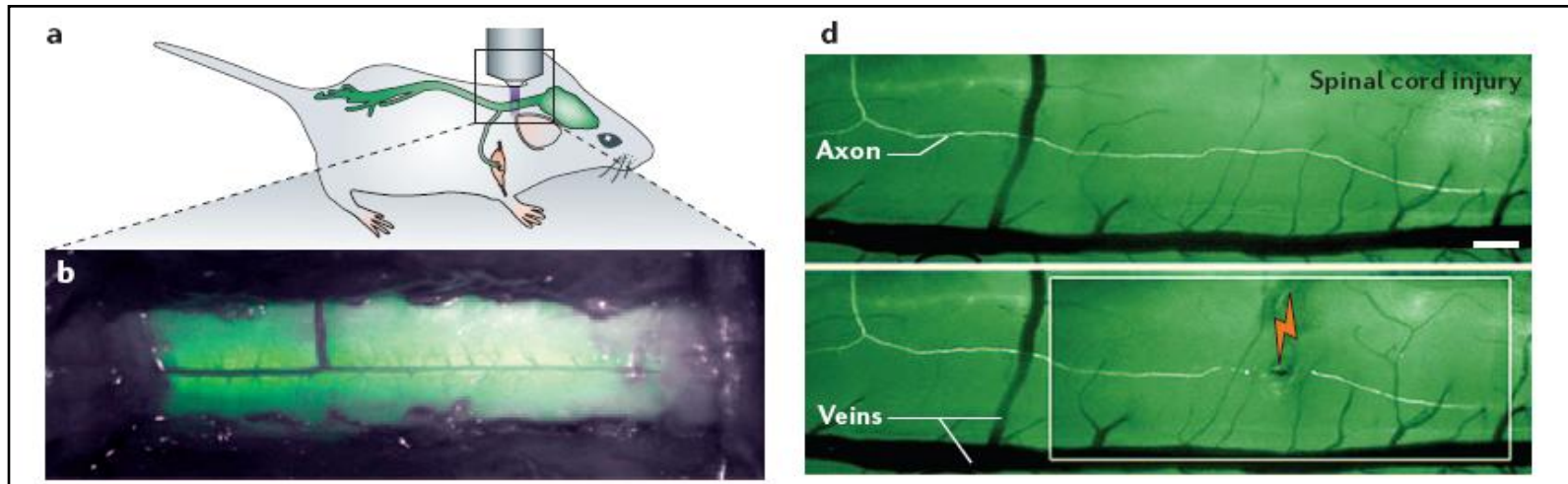
Outcome for each copy			Resulting colour
1	2	3	
C	C	C	Blue
C	C	Y	Light blue
C	Y	Y	Blue-green
Y	Y	Y	Green
Y	Y	R	Light green
Y	R	R	Orange
R	R	R	Red
R	R	C	Magenta
R	C	C	Purple
R	C	Y	Grey



Ιn vivo απεικόνιση του τραυματισμένου ΝΣ

Τεχνική open-frame window

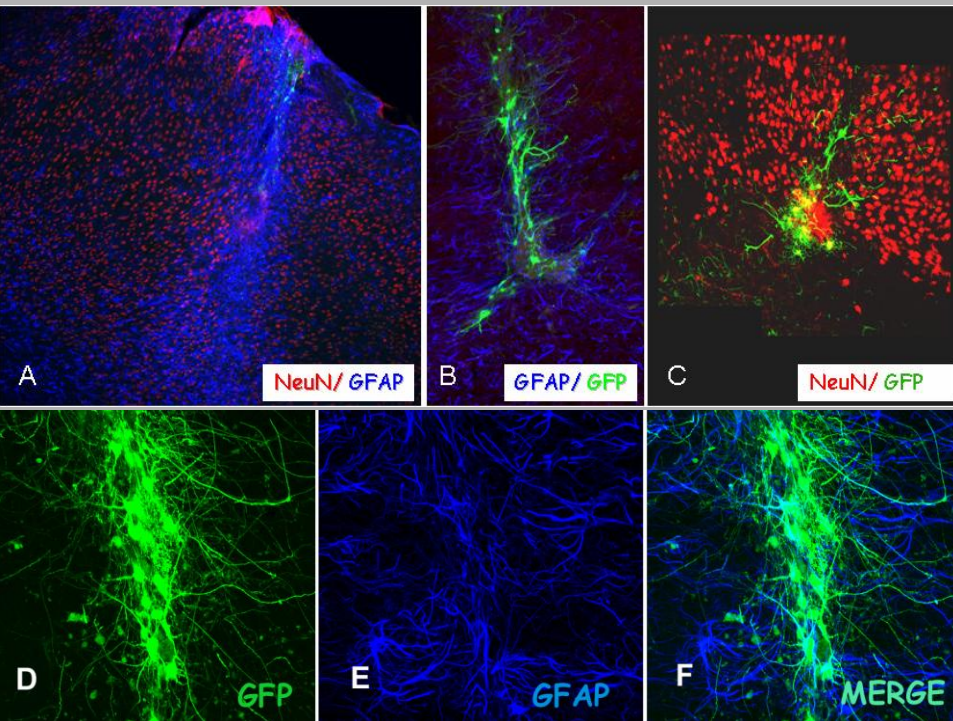
Νωτιαίος μυελός



Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας Pasteur

Η Μονάδα αποτελείται από:

- 1) **Συνεστιακό ορθό μικροσκόπιο** Leica TCS-SP (<http://www.confocal-microscopy.com/>) τεσσάρων καναλιών (3 φθορισμού + 1 διερχόμενου φωτός), εφοδιασμένο με Argon Ion Laser και Helium-Neon Laser, καλύπτοντας έτσι μήκη κύματος από 450-650 nm, συνδεδεμένο με το Leica Confocal Software LCS, με το οποίο είναι δυνατές 2D μετρήσεις και 3D ανασυστάσεις εικόνας.
- 2) **Ανάστροφο μικροσκόπιο** Olympus IX-81 εφοδιασμένο με το σύστημα Time Lapse Olympus Cell R (<http://www.dis-imaging.gr>), με Hamamtsu Orca κρουκάμερα για απεικόνιση ζωντανών κυττάρων και δυνατότητα για τεχνικές **FRET**, **3D-Deconvolution** και **spectral unmixing**, καθώς και τα λογισμικά **Imaris** και **Image-Pro** για ανάλυση εικόνας και ψηφιακών δεδομένων.
- 3) **FACS sorter** για απομόνωση ζωντανών κυττάρων



Εκπαίδευση / Μεταφορά τεχνογνωσίας:

- ★ Στα πλαίσια του προγράμματος της ΓΓΕΤ «Ανθρώπινα Δίκτυα Ε&Τ» και χρησιμοποιώντας τον σύγχρονο εξοπλισμό της μονάδας, το 2004-2005 το ΕΙΠ, πραγματοποίησε επιμορφωτικά σεμινάρια Φωτονικής Μικροσκοπίας σε συνεργασία με το Παν. Κρήτης και το Παν. Ιωαννίνων.
- ★ Εκπαίδευση μεγάλου αριθμού ερευνητών του Ε.Ι.Π, καθώς και επιστημόνων άλλων ερευνητικών ιδρυμάτων / πανεπιστημίων στη χρήση των μικροσκοπίων της Μονάδας.
- ★ Η Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας του ΕΙΠ συνεργάζεται στενά με την **Μονάδα Δυναμικής Απεικόνισης του Ινστιτούτου Παστέρ στο Παρίσι (Plate-forme d'imagerie Dynamique** <http://www.pfid.org/html/pres/fr>) για μεταφορά τεχνογνωσίας και εκπαίδευση των μελών της.