

## Microbiome Imaging

An Innovative Fluorescence and Chemical Imaging Platform for Microbiome Research

<b>Programm / Ausschreibung</b>	F&E Infrastruktur, F&E Infrastruktur, F&E Infrastrukturförderung 4. Ausschreibung 2022/01	<b>Status</b>	laufend
<b>Projektstart</b>	01.10.2023	<b>Projektende</b>	30.09.2027
<b>Zeitraum</b>	2023 - 2027	<b>Projektlaufzeit</b>	48 Monate
<b>Keywords</b>	Microbial Ecology; Microbiome Research; Single-Cell Functional Analysis; Super-Resolution Confocal Microscopy; Mid-infrared Photothermal Imaging		

### Projektbeschreibung

Mikrobiome sind für die Gesundheit des Planeten und des Menschen von entscheidender Bedeutung. Bildgebende Verfahren sind ein wichtiger Ansatz in der mikrobiellen Ökologie zum Verständnis dieser komplexen mikrobiellen Gemeinschaften, ihrer Funktionen und ihrer Interaktionen untereinander sowie mit ihrer Umwelt und ihren menschlichen, tierischen und pflanzlichen Wirten. Zur Identifizierung und Visualisierung von Mikroorganismen, zur Expressionsanalyse spezifischer Gene und Proteine sowie zum Nachweis allgemeiner Stoffwechselaktivitäten auf der Ebene einzelner mikrobieller Zellen steht eine Vielzahl von Fluoreszenzmarkierungstechniken zur Verfügung. In Kombination mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und digitaler Bildanalyse liefern diese Methoden Einblicke in die Zusammensetzung, räumliche Struktur, und spezifische funktionelle Merkmale mikrobieller Gemeinschaften in ihrer natürlichen Umgebung. In den letzten Jahren wurden fluoreszenzbasierte Mikroskopieverfahren durch chemische Bildgebungsverfahren (NanoSIMS, konventionelle Raman-Mikrospektroskopie, stimulierte Raman-Streuung) ergänzt, welche die chemische und Isotopen-Zusammensetzung mikrobieller Zellen mit hoher Auflösung darstellen und eine detaillierte, funktionelle Untersuchung der Mitglieder eines Mikrobioms ermöglichen.

Das Zentrum für Mikrobiologie und Umweltsystemwissenschaft ist international führend in der Entwicklung und Anwendung von Fluoreszenz- und chemischen Bildgebungsverfahren (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, Fluoreszenz-Protein-Tagging, CLSM, NanoSIMS, Raman-Mikrospektroskopie) zur Analyse komplexer Mikrobiome. Während mit diesen Methoden in den letzten Jahren große Durchbrüche erzielt wurden, kann das volle Potenzial der Fluoreszenz- und chemischen Bildgebung aufgrund technischer Beschränkungen des derzeitigen Aufbaus noch nicht ausgeschöpft werden. Die räumliche Auflösung des herkömmlichen CLSM ist durch die Lichtbeugung begrenzt, so dass wichtige biologische Merkmale unterhalb dieser Grenze nicht mit ausreichender Detailgenauigkeit abgebildet werden können. Immer mehr Anwendungen in unserem Zentrum erreichen diese physikalischen Auflösungsgrenzen des CLSM, wodurch der Fortschritt zahlreicher Studien in der mikrobiellen Ökologie und der Mikrobiomforschung behindert wird. Diese Einschränkung würde durch die hochmoderne supraauflösende Mikroskopie überwunden, welche die konfokale Fluoreszenzmikroskopie auf die nächste Stufe hebt und eine Bildgebung im Nanometerbereich ermöglicht. Die chemische Bildgebung wird durch sehr hohe Kosten und einen geringen

Durchsatz (NanoSIMS), eine geringe Sensitivität (spontane Raman-Mikrospektroskopie) oder limitierte Möglichkeiten zur Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie (stimulierte Raman-Streuung) eingeschränkt. Kürzlich wurden höchst innovative Verfahren der chemischen Bildgebung durch photothermische Mikroskopie im mittleren Infrarotbereich (MIP) für die Mikrobiomforschung angepasst. Mit dieser Technik haben wir gezeigt, dass die Visualisierung funktioneller Merkmale mikrobieller Zellen nicht mehr Stunden (spontanes Raman) oder Tage (NanoSIMS) dauert, sondern nahezu in Echtzeit erfolgen kann. Die revolutionäre MIP-Technologie bietet eine vielfach höhere Empfindlichkeit als die Raman-Mikrospektroskopie, um seltene Verbindungen in Zellen zu visualisieren und die chemische Zusammensetzung und die Aufnahme stabiler Isotope von mikrobiellen Zellen im Submikrometerbereich zu untersuchen. Da MIP auf elegante Weise mit der Fluoreszenzbildgebung gekoppelt werden kann, sind Kombinationen von MIP mit fluoreszenzbasierten Techniken sehr attraktive Erweiterungen.

Wir beantragen Geräte zur Etablierung einer Plattform für mehrfarbige konfokale supraauflösende Fluoreszenz- und MIP-Bildgebung an unserem Zentrum, um diese innovativen Techniken an der Universität Wien und in Österreich zugänglich zu machen. Die beantragte Plattform besteht aus einem kommerziell erhältlichen, super-auflösenden konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und einer speziell angefertigten Point-Scan- und Widefield-MIP-Gerätekombination. Wir erwarten von diesen Technologien signifikante Fortschritte in der Forschung zu hochaktuellen Themen wie der Rolle von Viren in Mikrobiomen, den Wechselwirkungen von Mikroben mit ihrer Umwelt und ihren Wirten, den Auswirkungen von Medikamenten und Umwelt-Kontaminationen auf Mikroorganismen, sowie neuartigen mikrobiellen Stoffwechselwegen.

Die Mikrobiologie ist ein Forschungsschwerpunkt an der Universität Wien. In ihrem Entwicklungsplan ist Mikrobiologie als Stärkefeld und Mikrobiom-Forschung als Entwicklungsfeld aufgeführt. Viele der über 120 Forscher/innen unseres Zentrums werden direkt von der beantragten Bildgebungsplattform profitieren. Unser Zentrum betreut auch die „Joint Microbiome Facility“, welche die Mikrobiomforschung an der Schnittstelle zwischen der Medizinischen Universität und der Universität Wien unterstützt. Auch in diesen Kooperationsprojekten wird durch die beantragten Geräte spannende neue Forschung ermöglicht, die dazu beitragen wird, die Universität Wien und Österreich an der Spitze der funktionellen Mikrobiomforschung zu etablieren.

## **Abstract**

Microbiomes are essential for planetary and human health. Imaging is a key approach in microbial ecology to understand these complex microbial communities, their functions, and their interactions with each other, their environment and their human, animal, and plant hosts. A large toolbox of fluorescence labeling techniques exists for the identification and visualization of microorganisms, the expression analysis of specific genes and proteins, and the detection of general metabolic activity at the level of single microbial cells. When used in combination with confocal laser scanning microscopy (CLSM) and digital image analysis, these methods yield insights into the composition, spatial structure, and specific functional features of microbial communities in their natural environments. In recent years, fluorescence-based microscopy methods have been complemented by chemical imaging techniques (NanoSIMS, conventional Raman microspectroscopy, stimulated Raman scattering) that visualize the chemical and isotopic composition of microbial cells with high resolution, enabling a detailed investigation of the function of microbiome members.

The Centre for Microbiology and Environmental Systems Science is an international leader in the development and application of fluorescence and chemical imaging methods (fluorescence in situ hybridization, fluorescence protein tagging,

CLSM, NanoSIMS, Raman microspectroscopy) to explore complex microbiomes. While major breakthroughs were achieved with these methods during the last years, the full potential of fluorescence and chemical imaging cannot be exploited yet due to technical limitations of the present setup. The spatial resolution of conventional CLSM is limited by light diffraction, so that important biological features below this limit cannot be imaged with sufficient detail. A rapidly increasing number of imaging applications at our Centre has reached these physical resolution limits of CLSM. This restriction hampers the progress of numerous studies in microbial ecology and microbiome research, but it could be overcome by cutting-edge super-resolution microscopy, which pushes confocal fluorescence microscopy to the next level and enables imaging at the nanometer scale. Chemical imaging is hampered by very high costs and a low throughput (NanoSIMS), a low sensitivity (spontaneous Raman microspectroscopy), or a requirement for specific sample conditions for combination with fluorescence imaging (stimulated Raman scattering). Recently, highly innovative point-scan and widefield mid-infrared photothermal (MIP) chemical imaging approaches were adapted for microbiome research. Using this technique, we demonstrated that imaging of functional traits of microbial cells does no longer take many hours (spontaneous Raman) or days (NanoSIMS) but can be performed in almost real-time. The revolutionary MIP technology provides a much higher sensitivity than Raman microspectroscopy for imaging low-abundance compounds and for analyzing the chemical composition and stable isotope uptake of microbial cells at a sub-micrometer scale. Since MIP can be elegantly coupled with fluorescence imaging, its combination with fluorescence-based techniques is a very attractive extension.

We propose to establish at our Centre a platform for multicolor confocal super-resolution fluorescence and MIP chemical imaging to make these highly innovative techniques available for researchers at the University of Vienna and the broader Austrian research community. The suggested platform comprises a commercially available super-resolution confocal laser scanning microscope and a custom-made point-scan and widefield MIP instrument combination. We expect these technologies to boost research on cutting-edge topics including the roles of viruses in microbiomes, interactions of microbiome members with their environment and their hosts, effects of drugs and environmental contaminants on microbiome members, and novel microbial metabolisms.

Microbiology is a research focus at the University of Vienna. In its developmental plan, microbiology is considered as a field of burgeoning potential and microbiome research as an emerging field. Many of the over 120 researchers at our recently founded Centre will directly benefit from the proposed imaging platform. Our Centre is also in charge of the Joint Microbiome Facility that supports microbiome research at the interface of the Medical University and the University of Vienna. These collaborative projects will also gain exciting new research opportunities through the proposed imaging platform that will help establishing the University of Vienna and Austria at the top of the field of functional microbiome research.

## **Projektpartner**

- Universität Wien