



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Two-photon luminescence of gold nanorods: applications to single-particle tracking and spectroscopy

Carozza, S.

Citation

Carozza, S. (2017, July 4). *Two-photon luminescence of gold nanorods: applications to single-particle tracking and spectroscopy*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/50407>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/50407>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/50407> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Carozza, S.

Title: Two-photon luminescence of gold nanorods: applications to single-particle tracking and spectroscopy

Issue Date: 2017-07-04

SAMENVATTING

Aan de basis van het leven van elk organisme staan biomoleculaire processen die groei, ziekte en dood reguleren. De belangrijkste spelers in deze processen zijn eiwitten en nucleïnezuren. Met de uitvinding van microscopie-technieken die het mogelijk maken om individuele biomoleculen tijdens cellulaire processen te volgen, zijn vele biologische inzichten verworven die verscholen gaan in bulkmetingen. Om individuele biomoleculen, zoals eiwitten, te kunnen volgen, moeten ze worden gefunctionaliseerd met een geschikt optisch label. Metalen nanodeeltjes zijn veelbelovende labels, omdat hun helderheid en fotostabiliteit aanzienlijk beter zijn dan die van traditionele fluorescente eiwitten en labels. Gouden nanostaafjes zijn extra aantrekkelijk, omdat ze gemakkelijk kunnen worden gefunctionaliseerd. Daarnaast hangt de spectrale respons van gouden nanostaafjes af van de elektrische permittiviteit van hun omgeving. Deze eigenschap maakt ze nuttig als sensoren: door de spectra van gouden nanostaafjes te meten kunnen interacties met biomoleculen worden gedetecteerd.

In dit proefschrift hebben we de bruikbaarheid van gouden nanostaafjes onderzocht als labels voor het volgen van individuele deeltjes in levende cellen, en van hun spectra voor toepassing van de staafjes als sensoren. We hebben gebruik gemaakt van de twee-foton-excitatie van gouden nanostaafjes: deze niet-lineaire excitatie biedt een hoger contrast en daarmee een grotere driedimensionale nauwkeurigheid, alsmede de mogelijkheid om laag-energetisch licht te gebruiken, hetgeen minder schade aan de cellen oplevert. Bovendien zijn twee-fotonspectra minder breed dan één-fotonspectra, en bieden ze dus een gevoeliger spectrale respons. We hebben gebruik gemaakt van een multifocale scanning microscoop om in 3D, tot op nanometer nauwkeurig, afbeeldingen van cellen te maken.

Bij het volgen van individuele deeltjes is de meestgebruikte methode om mobiliteitsinformatie, zoals diffusiecoëfficiënten, uit de trajecten van deeltjes af te leiden, een analyse van de gemiddelde gekwadraterde verplaatsing. De precisie waarmee de diffusiecoëfficiënt kan worden bepaald stelt een limiet aan het vermogen om veranderingen in mobiliteit, als gevolg van biologische gebeurtenissen, te onderscheiden van de statistische fluctuaties inherent aan diffusie. Deze precisie is daarom van groot belang in experimenten die dynamische biologische processen kwantificeren. In **Hoofdstuk 2** presenteren we simulaties en in vitro experimenten aan gouden nanostaafjes die vrij konden diffunderen in een glycerol-oplossing. Hiermee hebben we de meest gunstige analyse-parameters vastgesteld voor het meten van de diffusiecoëfficiënt. Deze hebben we toegepast om tijdelijke veranderingen in de diffusiesnelheid te detecteren, welke bijvoorbeeld plaatsvinden wanneer eiwitten zich tijdelijk binden aan een onbeweeglijke structuur in een cel. De simulaties lieten zien dat de nauwkeurigheid die we kunnen bereiken bij het volgen van deeltjes over het algemeen niet beperkend is voor het detecteren van dergelijke gebeurtenissen. Veranderingen in mobiliteit kunnen echter alleen worden gedetecteerd als hun tijdsduur een voldoende aantal opvolgende afbeeldingen bestrijkt.

Nadat we de mogelijkheden en de beperkingen van het volgen van gouden nanostaafjes in vitro hadden vastgesteld, konden we de stap naar in vivo maken. In **Hoofdstuk 3** hebben we het inbrengen van gouden nanostaafjes in levende cellen getest met verschillende methoden: incubatie, electroporatie, cell-squeezing en microinjectie, in HeLa-cellen en COS1-cellen. Ook hebben we injectie getest in de dooierzak van zebravisembryo's. Voor elk van deze technieken hebben we de efficiëntie van het inbrengen van de deeltjes en de kortetermijnconsequenties voor de levensvatbaarheid van de cellen geëvalueerd.

Wanneer het inbrengen van de gouden nanostaafjes succesvol was, hebben we hun mobiliteit gemeten via analyse van de gemiddelde gekwadraterde verplaatsing. We vonden drie populaties van nanostaafjes: onbeweeglijk, vrij diffunderend en diffunderend binnen een beperkt gebied. In de embryonale cellen van zebravissen waren alle diffunderende staafjes vrij. In HeLa-cellen was ongeveer 50% van de diffunderende staafjes vrij, en in COS1-cellen ongeveer 70%. De diffusiecoëfficiënten lagen rond $0.006 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dit is lager dan verwacht voor vrije diffusie,

maar in overeenstemming met onze voorgaande bevindingen. De staafjes die beperkt diffundeerden deden dit in een gebied met een straal van ongeveer $0.3 \mu\text{m}$. De mobiliteitsparameters waren gelijk in het cytoplasma en in de celkern van HeLa-cellen.

Om de gouden nanostaafjes op de juiste plaats te krijgen en om ze als labels te kunnen gebruiken om specifieke eiwitten te volgen, is het nodig om ze te functionaliseren. **Hoofdstuk 4** beschrijft het functionaliseren van gouden nanostaafjes met een nucleair lokalisatiesignaal. Dit is een peptide die aangeeft dat een biomolecuul naar de celkern moet worden getransporteerd. De gouden nanostaafjes werden via microinjectie in levende HeLa-cellen geïnjecteerd. De efficiëntie van de microinjectie vertoonde variabiliteit tussen verschillende experimenten en had invloed op het succes van de nucleaire lokalisatie. We zagen desondanks een significante toename van gouden nanostaafjes in de celkern wanneer deze waren gefunctionaliseerd met een nucleair lokalisatiesignaal. Ongeveer 15% van de deeltjes bereikten de celkern; dit percentage werd waarschijnlijk gelimiteerd door de grootte van de nanostaafjes. Ook zagen we dat de gouden nanostaafjes uit het cytoplasma verdwenen naarmate de tijd verstreek, ongeacht of ze waren gefunctionaliseerd of niet. Tenslotte bleek de mobiliteit van de deeltjes niet af te hangen van de functionalisatie. Samengevat lieten deze experimenten zien dat het functionaliseren van gouden nanostaafjes met een nucleair lokalisatiesignaal kan worden gebruikt om de deeltjes naar de celkern te laten vervoeren, maar slechts met beperkt rendement.

In experimenten waarbij men individuele deeltjes wil volgen, is het erg nuttig om te kunnen verifiëren dat de deeltjes aan de juiste biomoleculen zijn gebonden. Gouden nanostaafjes zijn hiervoor waardevol omdat ze van zichzelf sensoren zijn: hun plasmonspectrum verschuift wanneer de elektrische permittiviteit van de omgeving verandert, bijvoorbeeld vanwege interacties met biomoleculen. De verschuiving in het spectrum van individuele gouden nanostaafjes kan worden gebruikt om lage concentraties van een ligand te detecteren, tot een enkel molecuul aan toe. Twee-fotonspectra hebben smallere resonantiepieken dan één-foton- of verstrooiingsspectra, waardoor een piekverschuiving met grotere nauwkeurigheid kan worden gemeten. In **Hoofdstuk 5** hebben we de mogelijkheid onderzocht om spectroscopie met twee-foton-excitatie uit te

voeren met onze multifocale scanning microscoop, waarbij we verschillende soorten gouden nanostaafjes hebben getest. De spectra vertoonden onverwachte complexiteit, schijnbaar ongerelateerd aan de eigenschappen van de gouden nanostaafjes. Om de oorsprong van deze spectra te achterhalen, hebben we eerst geverifieerd dat de excitatie in de monsters inderdaad ten gevolge van de absorptie van twee fotonen was. Vervolgens hebben we gecontroleerd of de nanostaafjes clusters vormden, door de spectra met elektronenmicroscopische afbeeldingen van de monsters te correleren. Tenslotte hebben we de respons van verschillende elementen in de opstelling op variaties in de excitatiegolflengte gekarakteriseerd. Onze resultaten lieten zien dat het vermogen van de excitatie tijdens het doorlopen van het spectrum sterke correlatie vertoonde met de vorm van het spectrum. We konden de oorsprong van deze modulatie herleiden tot enkele componenten in de opstelling. Door deze componenten te verwijderen konden we uiteindelijk de spectra meten van individuele gouden nanostaafjes.

Het is een grote uitdaging gebleken om gouden nanostaafjes te gebruiken om in vivo deeltjes te volgen, voornamelijk vanwege de grootte van de staafjes en hun clustering zowel voor als na het functionaliseren. In onze experimenten hebben we voor nanostaafjes gekozen met afmetingen van 10 nm x 40 nm tot ongeveer 20 nm x 60 nm. Een kleinere omvang gaat ten koste van de helderheid van de deeltjes en de daarvan afhankelijke nauwkeurigheid in het lokaliseren en volgen ervan. Nadelen van deze keuze zijn de lage diffusiesnelheden en een laag rendement van het nucleair lokalisatiesignaal. We zagen echter ook een verhoogde clustering van nanostaafjes met kleinere afmetingen. Om de gouden nanostaafjes optimaal te benutten is een betere balans tussen de grootte van de deeltjes en hun helderheid nodig. Met dit doel voor ogen zou het interessant zijn om te onderzoeken wat er met gouden nanostaafjes in cellen gebeurt als functie van hun afmetingen.

Ondanks de hierboven beschreven uitdagingen, zijn onze resultaten bemoedigend. We hebben gouden nanostaafjes efficiënt in levende cellen kunnen inbrengen via microinjectie, electroporatie en injectie in de dooierzak van het zebrafish-embryo, met beperkt effect op de levensvatbaarheid van de cellen. De mobiliteit van de gouden nanostaafjes was vergelijkbaar in verschillende soorten cellen, maar significant verschillend van het resultaat in glycerol. Ook hebben we het succesvol func-

tionaliseren van gouden nanostaafjes met een nucleair lokalisatiesignaal gedemonstreerd. Bovendien hebben we laten zien dat het mogelijk is om veranderingen in de mobiliteit van gouden nanostaafjes te detecteren, en hebben we de beperkingen van een dergelijke analyse vastgesteld.

Het succesvol inbrengen en functionaliseren van gouden nanostaafjes is de eerste stap om meer geavanceerde experimenten in levende cellen mogelijk te maken. Het op de nanometer nauwkeurig volgen van nanodeeltjes gefunctionaliseerd met eiwitten zou gedetailleerd inzicht in de dynamica van deze eiwitten kunnen geven. Gouden nanostaafjes zouden bijvoorbeeld kunnen worden gefunctionaliseerd om zich te binden aan nucleaire eiwitten of specifieke DNA-sequenties. Zo zouden de interacties tussen eiwitten en DNA in de celkern kunnen worden gevolgd voor een langere tijdsduur en met een grotere ruimtelijke nauwkeurigheid dan mogelijk is met andere labels. Ook zouden met gouden nanostaafjes die zich aan transcriptiefactoren (zoals de glucocorticoid receptor) binden, nieuwe mechanistische details kunnen worden onthuld van transcriptieregulatie, en van wat er na dit proces met de transcriptiefactor gebeurt. Ook zou de mogelijkheid om gouden nanostaafjes te binden aan specifieke DNA-sequenties kunnen worden gebruikt om het condenseren van chromatine te bestuderen.

Het potentieel van twee-fotonmicroscopie met gouden nanostaafjes zal verder moeten worden onderzocht voordat de methode kan worden toegepast bij het gebruik van de staafjes als sensoren. We stuiten bij het meten van de spectra van individuele gouden nanostaafjes op de imperfecte spectrale respons van onze opstelling. Recentelijk hebben we de spectra beter kunnen meten door elementen uit de opstelling te verwijderen. Dit biedt de mogelijkheid de spectra te gebruiken om interacties van de nanostaafjes met moleculen te detecteren. Dit zou nieuwe mogelijkheden aanboren, zoals het detecteren van individuele moleculen in levende cellen.

