

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138674> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Vlieg, R.C.

Title: Two-photon multifocal microscopy for in vivo single-molecule and single-particle imaging

Issue Date: 2020-12-14

Samenvatting

Een van de grote prestaties van de moderne beschaving is ons beter begrip van hoe organismes functioneren. De overvloed aan toepassingen die hieruit zijn voortgekomen heeft een revolutie in de gezondheidszorg – en in menig andere industrie – teweeggebracht. Met het groeiende inzicht in complexe biologische systemen is het onderzoek zich gaan richten op hoe onze cellen en ons lichaam functioneren op een moleculaire schaal. Onderzoek op deze kleinste biologische schaal werd voortgestuwd door recente ontwikkelingen in de microscopie. De toekenning van de Nobelprijs in de natuurkunde in 2014, benadrukte het belang van nieuwe super-resolutie microscopen voor biologisch en natuurkundig onderzoek.

In dit proefschrift hebben we een nieuwe benadering ontwikkeld voor het volgen van individuele deeltjes en moleculen met twee-foton microscopie. Deze techniek wordt normaal geassocieerd met het langzaam maken van afbeeldingen diep in het weefsel, met zeer lage achtergrondfluorescentie en verwaarloosbare verbleking van fluoroforen buiten het brandpunt. De lage achtergrond zou twee-foton microscopie zeer geschikt moeten maken voor het afbeelden van de zwakke signalen afkomstig van individuele moleculen. Echter, het hoge vermogen van de laser dat nodig is voor twee-foton excitatie zorgt ervoor dat fluoroforen zeer snel verbleken, en het langzame scannen van de laserbundel belemmert het volgen van snelle dynamische processen. Twee-foton microscopie wordt daarom over het algemeen gebruikt voor het afbeelden van grote en statische weefsels.

In dit proefschrift splitsten we de laserbundel in meerdere, zwakkere bundeltjes voor snel en zachtaardige excitatie. Het simultaan scannen van enkele honderden laserbundels zorgt voor beperkte fluorofoor-verbleking en hoge scansnelheden, terwijl de nuttige twee-foton eigenschappen van een lage achtergrond fluorescentie en een hoge axiale resolutie behouden blijven. Met deze voordelen, demonstreren we voor de eerste keer dat twee-foton microscopie gebruikt kan worden voor het afbeelden van individuele deeltjes en zelfs individuele moleculen in levende organismen.

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we de mogelijkheid om individuele moleculen te detecteren door gebruik te maken van gouden nanostaafjes. Deze metalen nanodeeltjes worden gebruikt voor het detecteren van (bio)moleculen omdat de gelokaliseerde oppervlakte-plasmon-resonantie zeer gevoelig is voor veranderingen in de omgeving. Het door individuele nanodeeltjes verstrooide licht is voldoende om veranderingen van de plasmon resonantie optisch te kunnen detecteren. De twee-foton luminescentie van individuele gouden nanostaafjes heeft de potentie om de gevoeligheid nog hoger te maken door de grote anti-Stokes verschuiving en het niet-lineaire excitatie mechanisme. Echter, reguliere twee-foton -microscopie en -spectroscopie hebben beperkte bandbreedte en worden gelimiteerd door de geringe thermische stabiliteit van de nanostaafjes. We hebben twee-foton multifocale microscopie gebruikt voor het

gelijktijdig meten van de excitatie spectra van honderden individuele gouden nanostaafjes met sub-nanometer nauwkeurigheid van de golflengtes. Door het excitatievermogen onder de smelt temperatuur te houden, hebben we laten zien dat nanostaafjes stabiel bleven voor meer dan 30 minuten. De spectra hadden een signaal-ruis-verhouding van boven de 10 en de plasmonpiek had een typische breedte van 30 nm. Veranderingen in de brekingsindex van het immersie medium van minder dan 0.04, wat een plasmonverschuiving van 8 nm veroorzaakte, konden gemakkelijk gemeten worden en over lange tijd. We gebruikten de door twee-foton excitatie verbeterde spectrale gevoeligheid om de aanwezigheid van neutravidine te meten, en daarmee de potentie van twee-photon spectroscopie op individuele gouden nanostaafjes voor verbeterde plasmonische sensoren aan te tonen.

In **Hoofdstuk 3** stapten we over naar *in vivo* toepassingen om te zien hoe de lokale excitatie en hoge beeldfrequentie kunnen bijdragen aan het volgen van individuele deeltjes in levend weefsel. Het volgen van deeltjes op de nanoschaal is een krachtige techniek voor het bestuderen van biologische processen op moleculaire schaal. In gecultiveerde cellen heeft het volgen van individuele moleculen spectaculaire resultaten opgeleverd. Echter, hetzelfde verrichten in grotere organismen blijft zeer uitdagend door de toename in verstrooid licht en achtergrondfluorescentie, en door de relatief lage resolutie in de derde dimensie. Door gebruik te maken van twee-foton – in plaats van één-foton – excitatie worden deze problemen verminderd. We hebben laten zien dat de combinatie van een moderne wetenschappelijke CMOS-camera, die een hoge gevoeligheid heeft en lage ruis, een verlaagd excitatievermogen per focus en een verlaagde belichting *duty cycle*, resulteert in uitzonderlijke lange fluorofoor-verblekingstijden, beeldfrequenties van 10 Hz, en een gezichtsveld van honderden micrometers, terwijl de voordelen van twee-foton excitatie behouden blijven. We hebben deze nieuwe microscopie modaliteit toegepast in zebrafish embryo's en koolzaad pollen, en waren in staat om afbeeldingen te maken met meerdere kleuren door het spectraal selecteren van fluoroforen in excitatie of emissie. Bovendien hebben we laten zien dat individuele gouden nanostaafjes in de aderen van zebrafish embryo's gevolgd kunnen worden met nanometer nauwkeurigheid, en daarmee ook fluctuaties van de bloedstroom in kaart gebracht.

De uitzonderlijke fotostabiliteit in combinatie met de lage achtergrondruis suggereert dat het mogelijk zou moeten zijn om individuele fluorescerende eiwitten af te kunnen beelden *in vivo* met twee-foton multifocale microscopie. In **Hoofdstuk 4** hebben we dit onderzocht. Microscopie op individuele moleculen wordt vaak belemmerd door autofluorescentie terwijl *in vivo* in-elastische verstrooiing van licht de zichtbaarheid van het zwakke signaal verder bemoeilijkt. De lagere achtergrond die twee-foton excitatie bewerkstelligt, zorgt voor afbeeldingen met een hoge signaal-ruis-verhouding. Echter, de lage twee-foton absorptiediameter van de meeste fluoroforen vereist een hoge lichtintensiteit. Dit wordt meestal geïmplementeerd door middel van focaal scannen en resulteert in lage beeldfrequenties en snelle verbleking van fluoroforen. Wij gebruiken twee-foton multifocale microscopie om de opnames te versnellen, en vergelijken twee scan-modi die beide een dunne excitatie-plak

realiseren. Achtergrond fluorescentie en het verbleken van fluoroforen is aanzienlijk verlaagd in levende zebrafish embryo's. Dit was voldoende om individuele fluoroforen meer dan 30 seconden te volgen. Bovendien hebben we laten zien dat multifocale excitatie met gestructureerde belichting het achtergrond signaal nog verder kan verlagen in zeer licht-verstrooiende omgevingen. Als laatste hebben we algoritmes geïmplementeerd om het diffuse gedrag van individuele eGFP-HRas moleculen, eiwitten die externe signalen door de cel membraam doorgeven, te kwantificeren. Een verschil in begrenzing van de beweging van deze moleculen suggereerde dat de mobiliteit van HRas varieert tussen verschillende regio's van dezelfde cel. De experimenten hebben voor de eerste keer laten zien dat twee-foton microscopie gebruikt kan worden voor het volgen van individuele moleculen in levende cellen en laten, in tegenstelling tot eerdere bevindingen, een vermindering in het verbleken van fluoroforen zien, terwijl de signaal-ruis-verhouding en axiale resolutie significant verbetert.

Hoofdstuk 5 is een studie die we samen hebben gedaan met wetenschappers uit de chemie en moleculaire biologie. We hebben de transitie van foto-gevoelige liposomen naar een kationische oppervlaktespanning in de aderen van levende zebrafish embryo's gemeten. Oppervlaktespanning speelt een belangrijke rol in het lot van liposomen *in vivo*. Voorafgaand aan licht-activatie circuleerden intraveneuze toegediende liposomen vrij door het bloedvatstelsel en wisten deze de immuno cellen in de vis te ontlopen. Na *in situ* belichting, en de daaropvolgende verandering in oppervlaktespanning, werden de liposomen echter snel geadsorbeerd aan en geëndocyteerd door endotheelcellen. Ook werden ze gefagocyteerd door macrofagen in het bloed. Deze transitie kon worden afgebeeld dankzij de hoge tijdsresolutie van de twee-foton multifocale microscoop, waarbij *in situ* belichting snel kon worden gewisseld met het maken van een microscopie-plaatje. De transitie naar kationische toestand van de liposomen zou normaal verborgen blijven met langzamere confocale microscopen. De externe optische controle maakt het mogelijk om nanodeeltjes met ingekapselde (en membraam-permeabele) farmaceutische stoffen gericht te bezorgen op gewenste locaties in het lichaam van de zebrafish embryo. Deze geavanceerde functies konden gerealiseerd worden met eenvoudige liposomen, en de microscopie geeft een beter begrip van interacties tussen nanodeeltjes en biologisch weefsel. Deze studie illustreert hoe twee-foto multifocale microscopie kan bijdragen aan een beter begrip van chemische en biologische processen die plaatsvinden in levende organismen.

In **Hoofdstuk 6** gebruiken we twee-foton multifocale microscopie om de distributie en immunorespons van verschillende groottes en vormen van gouden nanodeeltjes in zebrafish embryo's in kaart te brengen. De unieke eigenschappen van gouden nanodeeltjes maken ze interessant om mee te werken, maar hun effecten op het milieu en op de gezondheid van organismen zijn nog niet goed begrepen. Confocale microscopie werd eerst gebruikt om fluorescerend-gelabelde macrofagen af te beelden, die een indicatie zijn voor het immuunrespons van het embryo. Echter, om gouden nanodeeltjes direct te kunnen lokaliseren in zebrafish embryo's en om vast te stellen of ze worden opgenomen door macrofagen, hebben we twee-foton multifocale microscopie gebruikt. In de staart van een embryo konden we

individuele gouden nanodeeltjes zien. De hoge temporele resolutie maakte het bovendien mogelijk om een macrofaag af te beelden die meerdere nanodeeltjes had gefagocyteerd terwijl deze langs een aderwand bewoog. Deze resultaten illustreren hoe twee-foton multifocale microscopie een inzicht kan verschaffen in snelle (biologische) processen die normaal verborgen zijn voor detectie. Bovendien laat het zien dat gouden nanodeeltjes uitstekende labels zijn om contrast te verschaffen in twee-foton microscopie.

Samenvattend hebben we laten zien dat deze nieuwe twee-foton methode in staat is om snel plaatjes te kunnen maken met hoge-resolutie, minimale achtergrond en lage -fototoxiciteit en -fotobleking. Het afbeelden van de distributie van enkele deeltjes in levende organismen gaat gemakkelijk in twee-foton multifocale microscopie en kan verder gebruikt worden om het lot van deeltjes te volgen over een langere tijdsperiode. De eigenschap om zelfs individuele fluoroforen te kunnen meten *in vivo* en gedurende lange periodes opent talrijke mogelijkheden om verschillende cellulaire processen te bestuderen. Onze nieuwe microscoop is dus een aantrekkelijke methode voor het bestuderen van individuele moleculen en deeltjes in levende organismen en vormt een nieuwe stap in *single-molecule* biofysica. Twee-foton multifocale microscopie zou nieuwe inzichten kunnen brengen in hoe cellen werken en meehelpen aan het vergroten van ons fundamenteel begrip van biologische processen.