



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Single-molecule microscopy in zebrafish embryos

Góra, R.J.

### Citation

Góra, R. J. (2022, November 23). *Single-molecule microscopy in zebrafish embryos*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3487015>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3487015>

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

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Single-molecule microscopy (SMM)-technieken zijn effectieve en succesvolle experimentele methodes die het mogelijk maken om individuele moleculen af te beelden en deze in de tijd te volgen. Met behulp van deze technologie is het mogelijk om het dynamisch gedrag van individuele moleculen in verschillende biologische systemen te analyseren, en om het effect van structurele en biochemische componenten van zo'n systeem op de mobiliteit van de moleculen te bestuderen. In het onderzoek dat in dit proefschrift is beschreven hebben we drie geavanceerde fluorescentie-microscopische technieken geoptimaliseerd om SMM toe te passen op het zebravis embryo-model. We hebben twee eiwitten gebruikt om de robuustheid en reproduceerbaarheid te bestuderen van de resultaten die we verkregen met onze *in vivo* SMM aanpak: H-Ras als model voor een eiwit dat in de plasma-membraan zit en de glucocorticoid receptor (GR) als model voor een eiwit dat zich in de kern bevindt.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben we het mobiliteitspatroon van het H-Ras eiwit bestudeerd in de buitenste membraan van de buitenste cellaag van de epidermis van twee dagen oude zebravisembryo's met behulp van total internal reflection fluorescence (TIRF)-microscopie. We vonden dat H-Ras in deze cellen aanwezig is in twee verschillende fracties: één die snel diffundeert en één die langzaam diffundeert door de membraan. Interessant was dat we ontdekten dat beide H-Ras fracties niet vrij door het oppervlak van de plasma-membraan konden bewegen, maar dat hun diffusie begrensd was binnen bepaalde micro-domeinen in de membraan. Door een mutant van het H-Ras eiwit te gebruiken die zich permanent in een geactiveerde toestand bevindt, hebben we laten zien dat activatie van H-Ras het dynamische gedrag van dit eiwit sterk beïnvloedt. In het bijzonder zagen we een verhoogde diffusiecoëfficiënt voor de snel diffunderende fractie, en het microdomein waarin de begrensde diffusie van deze fractie plaatsvindt was groter voor de actieve mutant in vergelijking met wild type H-Ras. Vervolgens hebben we, om een idee te krijgen over de aard van de waargenomen microdomeinen die de diffusie van H-Ras begrenzen, getest of deze gebiedjes wellicht zogenaamde 'lipid rafts' zijn, waarvan bekend is dat hun vorming afhankelijk is van de aanwezigheid van cholesterol en actine-vezels van het cytoskelet. We zagen dat cholesterol-depletie en verstoring van de vorming van het cytoskelet ongeveer dezelfde uitwerking hadden op de mobiliteit van H-Ras als activering van het eiwit (leidend tot

verhoging van de diffusiecoëfficiënt en een vergroting van het microdomein voor de snel diffunderende fractie). Dit suggereert dat de snel-diffunderende fractie van de niet-geactiveerde vorm van H-Ras zich in de lipid rafts bevindt, terwijl deze fractie zich wanneer H-Ras geactiveerd is voornamelijk in grotere domeinen bevindt die onafhankelijk zijn van cholesterol en de actine-vezels van het cytoskelet. Verder hebben we de variatie in de resultaten gedetailleerd bestudeerd. Daarmee hebben we laten zien dat de verschillen tussen individuele cellen binnen een weefsel (in dit geval de epidermis) de belangrijkste bijdrage leveren aan de variatie in de data, en niet de verschillen tussen individuele embryo's.

Na deze TIRF-microscopie studies hebben we in **Hoofdstuk 3** multifocale two-photon excitation fluorescence (2PEF)-microscopie gebruikt. Deze methode wordt gebruikt om de schade die 'out-of-focus' excitatielicht te verminderen, maar 2PEF-microscopie blijkt ook de photobleaching van de fluorescente moleculen enorm te kunnen reduceren. Door deze techniek te gebruiken, slaagden we erin om enkele H-Ras moleculen voor een langere periode te volgen, wat het mogelijk maakte om het exacte traject dat ze in die periode hebben afgelegd te reconstrueren. Hierdoor hoefden we het dynamische gedrag van de moleculen niet meer in termen van verschillende fracties te beschrijven, maar konden we ons richten op het analyseren van de trajecten van individuele moleculen. We gebruikten deze aanpak om de mobiliteit van het membraan-anker van H-Ras (C10H-Ras), dat fluorescent was gelabeld door het te fuseren met green fluorescent protein (GFP), te bestuderen in de membranen van epidermale cellen van zebravisembryo's. Deze methode maakte het mogelijk om uitsluitend de langzaam diffunderende fractie moleculen te detecteren en een gedetailleerde analyse te maken van hun bewegingen. Deze analyse liet zien dat deze langzame fractie van met GFP gefuseerde H-Ras ankers continu wisselen tussen een diffunderende ('diffusing') en een springende ('hopping') toestand. Wat hierbij opviel was dat de tijd die de moleculen doorbrachten in de 'hopping' toestand relatief kort was ten opzichte van de tijd die ze in de 'diffusing' toestand waren. Dit impliceert dat deze eiwitten een zogenaamd 'anomalous' diffusiepatroon vertonen, wat vaak wordt beschreven als 'molecular hopping'.

Tenslotte hebben we in **Hoofdstuk 4** van dit proefschrift getest of het ook mogelijk is om met SMM in zebravisembryo's eiwitten te bestuderen die zich niet in de celmembraan bevinden, maar elders in de cel. Hiervoor hebben we light sheet fluorescence

(LSF)-microscopie gebruikt, waarbij een vlak van licht wordt gecreëerd, de zogenaamde 'light sheet'. Hierdoor worden alleen fluorescente moleculen in dit vlak geëxciteerd. Om met deze techniek embryo's voor langere tijd te kunnen bestuderen, hebben we een speciale 'imaging chamber' ontworpen. Met deze speciaal ontworpen LSF-microscopie-opstelling hebben we in embryo's van één dag oud individuele GRs zichtbaar gemaakt in de kernen van de 'yolk syncytial layer', een laag over de dooierzak van het embryo die een groot aantal kernen bevat. Vervolgens hebben we de mobiliteit van deze GRs in deze kernen geanalyseerd, en de resultaten van deze analyse lieten een snel diffunderende en een langzaam diffunderende fractie zien, zoals al eerder was vastgesteld in vergelijkbare studies aan GR in gekweekte cellen. Behandeling van de embryo's met de GR agonist dexamethason verlaagde de diffusie van de receptoren, en ook dit was in lijn met eerdere resultaten in gekweekte cellen en valideerde daarmee de *in vivo* metingen. Net zoals we bij de analyse van de beweging van H-Ras in zebrafisembryo's zagen, kwam ook in deze studie de meeste variatie in de resultaten doordat we verschillende cellen binnen een embryo bestudeerden, en niet doordat we verschillende embryo's gebruikten.

In conclusie, met behulp van een drietal technieken, TIRF-, 2PEF- en LSF-microscopie, hebben we de mogelijkheden van *in vivo* SMM uitgebreid. Met TIRF-microscopie hebben we individuele membraaneiwitten in de buitenste membraan van de epidermis van zebrafisembryo's zichtbaar kunnen maken en hun beweging kunnen analyseren. Door 2PEF-microscopie konden we deze eiwitten voor een langere periode volgen, wat het mogelijk maakte om het afgelegde traject van individuele eiwitten te reconstrueren. Dit was overigens alleen mogelijk voor een langzaam diffunderende populatie van moleculen. Verder maakt LSF-microscopie het mogelijk om ook eiwitten te bestuderen die zich niet in de membraan bevinden. Met deze technieken hebben we het mogelijk gemaakt om in een intact organisme de dynamiek van H-Ras en de GR te bestuderen en factoren te identificeren die deze dynamiek beïnvloeden. Verdere ontwikkeling van deze technologie zal zich moeten richten op het verbeteren van de fluorescente labels die worden gebruikt, de ontwikkeling van driedimensionale analyse-methodes, en het verbeteren van de temporele resolutie van de gebruikte SMM-opstellingen.

