

# Samenvatting

In de afgelopen decennia is biologisch onderzoek zich steeds meer gaan richten op processen die zich afspelen op de micrometer - en zelfs nanometerschaal. Dit heeft ervoor gezorgd dat moleculaire interacties zichtbaar kunnen worden gemaakt, krachtinteracties van moleculaire motoren kunnen worden gemeten, moleculaire bewegingen kunnen worden gevolgd in tijd en ruimte, en moleculaire structuren kunnen worden ontrafeld. Tegelijkertijd volgen de hiervoor benodigde technologieën eenzelfde miniaturisatietrend, die het mogelijk heeft gemaakt om individuele moleculen afzonderlijk te adresseren, te visualiseren en te analyseren. Om individuele moleculen te onderzoeken onder normale omgevingscondities zijn een hoge resolutie, moleculaire specificiteit en een hoge gevoeligheid van de meetmethode noodzakelijk. Nabije-veld optica heeft de potentie om aan deze voorwaarden te voldoen. In het hier gepresenteerde onderzoek is een nabije-veld scannende optische microscoop (NSOM) ontwikkeld voor moleculair biologisch onderzoek. Met deze microscoop is de ruimtelijke organisatie van (fluorescent gemarkeerde) proteïnes aan het celoppervlak onderzocht. Voor de allereerste keer zijn met behulp van een optische methode proteïneclusters en afzonderlijke moleculen op het celoppervlak met nanometer resolutie zichtbaar gemaakt.

Hoofdstuk 1 beschrijft in het kort de geschiedenis van de microscopie en het belang van deze onderzoeksmethode voor de celbiologie. Verscheidene vormen van fluorescentiemicroscopie worden beschreven evenals hun toepassingsmogelijkheden voor onderzoek aan biologische preparaten. Tevens wordt een overzicht gegeven van beschikbare optische methoden voor het detecteren van individuele moleculen. Het oplossend vermogen van conventionele optische microscopie is diffractie gelimiteerd, waardoor detectie van individuele moleculen alleen mogelijk is op een dunbevolkt gebied met een dichtheid van slechts enkele moleculen per vierkante micrometer. Daarnaast zorgt de relatief grote optische indringdiepte (honderden nanometers) voor een hoge achtergrond bij het bestuderen van cellen. Deze problemen zijn oplosbaar door nabije-veld optische technieken te gebruiken, waarbij een exponentieel afnemend optisch veld het preparaat belicht tot een diepte van minder dan honderd nanometer. In NSOM wordt een kleine opening aan het uiteinde van een scherpe glasvezeltip als lichtbron gebruikt. Hierdoor is

het belichtingsvolume in drie dimensies begrensd en tevens het kleinst haalbare in optische microscopie. Het hoofdstuk eindigt met een overzicht van het menselijke immuunsysteem, waarbij in het bijzonder aandacht gegeven wordt aan het functioneren van dendritische- en T cellen, om op die manier de hier onderzochte proteïnesystemen in een breder perspectief te plaatsen.

Hoofdstuk 2 geeft de technische beschrijving van de ontwikkelde nabije-veld - confocaal scannende optische microscoop. Met de microscoop kan het preparaat zowel in het nabije-veld als confocaal worden belicht. Er is één gezamenlijk detectiekanaal waarmee de fluorescentie van een individueel molecuul zowel polarisatie - als golflengtegevoelig gemeten kan worden. Met behulp van confocale microscopie kan een snel vooronderzoek van het preparaat gedaan worden en een gebied voor verder diepgaand nabije-veld onderzoek worden geselecteerd. In dit hoofdstuk wordt de prestatie van de microscoop beschreven aan de hand van metingen aan fluorescent gemarkeerde moleculen die zich op het oppervlak van een cel bevinden. Hieruit volgen drie belangrijke voordelen van NSOM ten opzichte van confocale microscopie bij cel onderzoek: 1) NSOM heeft een hoge lokalisatienauwkeurigheid en optische resolutie, waarmee het mogelijk wordt om moleculen in dichtbevolkte systemen te onderscheiden; 2) NSOM heeft een kleine indringdiepte, waardoor intracellulaire autofluorescentie wordt geminimaliseerd; 3) NSOM geeft tegelijkertijd optische - en topografische informatie. In de volgende hoofdstukken worden deze voordelen benut voor het bestuderen van verschillende membraanproteïnes op het niveau van individuele moleculen.

In hoofdstuk 3 is de ruimtelijke verdeling van een bindingsproteïne (DC-SIGN) op het celmembraan van onvolgroeide dendritische cellen (imDCs) onderzocht. Deze cellen binden met behulp van dit proteïne aan ziekteverwekkers zoals virussen en bacteriën. Wij hebben de ruimtelijke organisatie van DC-SIGN, die mogelijk verband houdt met de bindingscapaciteit van de cel, onderzocht. De DC-SIGN proteïnes zijn fluorescent gemarkeerd via antilichamen met Cy5. Optisch nabije-veld metingen van DC-SIGN laten afzonderlijke fluorescerende vlekken op het celmembraan zien die variëren in intensiteit. Slechts enkele van de vele fluorescerende vlekken kunnen worden toegekend aan de emissie van een individueel molecuul. De gemeten emissie van een enkel Cy5 molecuul wordt gebruikt om de intensiteit van elke fluorescerende vlek te relateren aan het aantal Cy5 moleculen op die plaats. De vlekken bevatten tussen 1 en 200 Cy5 moleculen en het merendeel (> 80 %) van alle vlekken zijn moleculaire clusters met meer dan tien moleculen. Ondanks de grote verscheidenheid in moleculaire bezetting, is de verdeling van de gemeten cluster groottes redelijk smal met een typische cluster grootte van ongeveer 200 nanometer. Een grote verscheidenheid in moleculaire dichtheid wordt zichtbaar door de cluster grootte en het aantal moleculen binnen

een cluster te correleren. Uitgaande van een gemiddelde markeerefficiëntie van 3.5 Cy5 moleculen per antilichaam wordt aangenomen - wat expliciet gemeten wordt in Hoofdstuk 5 - en een één-op-één verhouding tussen antilichaam en proteïne, wordt de gemiddelde 'naaste - buur' afstand (*nnd*) tussen DC-SIGN proteïnes binnen een cluster geschat op 39 nm. De onderlinge clusterafstanden geven aan dat de clusters willekeurig verdeeld zijn. Hiermee hebben we een hiërarchische structuur met twee lagen in de ruimtelijke verdeling van DC-SIGN ontdekt, waarin DC-SIGN clustert in clusters (laag 1), die willekeurig verdeeld zijn op het cel oppervlak (laag 2). Omdat DC-SIGN met verschillende affiniteit aan verschillende ziekteverwekkers bindt, veronderstellen we dat 1) DC-SIGN gebruik maakt van variërende moleculaire dichtheden binnen de clusters om te kunnen binden met verschillende ziekteverwekkers; 2) DC-SIGN clusters willekeurig verdeeld zijn op het oppervlak om de kans op het raken van een ziekteverwekker, in een toevallige ontmoeting tussen de cel en de ziekteverwekker, te maximaliseren.

Het clusteren van membraanmoleculen, zoals beschreven in Hoofdstuk 3, is een veelvoorkomend verschijnsel in de celbiologie, waarvan het bekend is dat het specifieke celfuncties mogelijk maakt. In Hoofdstuk 4 wordt een eenvoudig tweedimensionaal model geïntroduceerd om de voordelen van clusteren uit te leggen en het belang van clustereigenschappen, zoals clustergrootte en moleculaire dichtheid, voor de bindingseigenschappen van een cel te onderzoeken. Het model beschrijft de kans waarop een object (virus of bacterie) met een gegeven grootte een minimum aantal bindingsreceptoren (membraanmoleculen) raakt in een toevallige ontmoeting tussen object en cel. De bindingssterkte tussen object en cel neemt toe met het aantal receptoren dat geraakt wordt. Wij hebben Monte Carlo simulaties geïntroduceerd, die het mogelijk maken om naast vaste simulatieparameters, zoals clustergrootte en moleculaire dichtheid, ook met verdelingen van clustereigenschappen te simuleren. We hebben simulaties uitgevoerd met realistische, gemeten waarden voor de eigenschappen van DC-SIGN clusters en hebben de bindingscapaciteit van de dendritische cel onderzocht. Simulaties met een constant totaal aantal receptormoleculen en verschillende soorten ruimtelijke verdelingen, laten zien dat 1) clustervorming gunstiger is dan een willekeurige verdeling van individuele moleculen indien er meer dan een bepaald aantal rakende moleculen nodig zijn voor het verkrijgen van een stabiele object-cel verbinding; 2) clustereigenschappen van grote invloed zijn op de raakkans als de grootte van het object vergelijkbaar is met de grootte van de clusters; 3) de manier waarop de cel een bepaalde moleculaire dichtheid creëert, door clustergrootte of clusterinhoud aan te passen, de raakkans beïnvloedt wanneer het object kleiner is dan het domein; 4) er een optimale ruimtelijke verdeling is van receptor moleculen in een cluster om objecten van een specifieke grootte te

binden met een bepaald aantal receptoren in het contact vlak tussen object en cel. Simulaties waarin verdelingen van DC-SIGN clustereigenschappen worden meegenomen, laten zien dat de grote spreiding in receptordichtheid binnen een cluster de cel verzekert van een groot aantal rakende receptoren in vergelijking met een oppervlak dat clusters met een constante grootte en dichtheid bevat. Daarbij lijkt de ruimtelijke verdeling van DC-SIGN geoptimaliseerd voor kleine virusachtige objecten.

In hoofdstuk 5 wordt de plotselinge emissiestop van een individueel molecuul, 'discrete fotodissociatie' of 'bleking' genoemd, gebruikt als een tijdafhankelijke eigenschap van individuele moleculen om het aantal fluorescerende moleculen te tellen en hun posities te bepalen. We hebben fotodissociatie gebruikt om de markerings efficiëntie van antilichamen met Cy5 moleculen te bepalen door een tijd-opgeloste fluorescentiemeting te doen en het aantal discrete fotodissociatie stappen te tellen. Vergelijkbare tijdafhankelijke metingen van dichtgepakte moleculaire clusters laten in het begin een exponentiële afname van de fluorescentie zien. Omdat de intensiteitsafname samen gaat met een afname in fotonruis, kunnen discrete fotodissociatie stappen worden geteld zodra de ruis kleiner dan het emissieniveau van een individueel molecuul wordt. Fotodissociatie is verder toegepast bij het tellen en lokaliseren van individuele moleculen in een dichtbevolkt gebied van fluorescerende moleculen. Hiervoor is met behulp van NSOM herhaaldelijke keren over hetzelfde gebied gescand. Terwijl in elk plaatje de dichtheid van fluorescerende moleculen door fotodissociatie afneemt, worden individuele moleculen geleidelijk zichtbaar, zodat ze uiteindelijk afzonderlijk geteld en nauwkeurig ge-lokaliseerd kunnen worden. Deze methode onthult de echte ruimtelijke verdeling van fluorescerende moleculen en ontrafelt de moleculaire samenstelling van clusters.

In hoofdstuk 6 wordt de ruimtelijke organisatie van membraanproteïnes op T cellen onderzocht. De onderzochte proteïnes zijn IL-2R $\alpha$  en IL-15R $\alpha$ , die een onderdeel zijn van de respectievelijke receptoren IL-2R en IL-15R. Deze membraanproteïnes hebben heel andere functies voor de cel dan de DC-SIGN proteïnes uit Hoofdstuk 3. IL-2R en IL-15R binden specifiek aan Interleukin moleculen IL-2 en IL-15. Voor beide receptoren geldt dat bij binding signalen worden afgegeven aan de T cel die celgroei, celdeling maar ook celsterfte kunnen stimuleren. Hoewel beide receptoren wat structuur betreft vergelijkbaar zijn, lijken ze soms een tegengesteld effect te hebben op de levensloop van een T cel. We hebben specifiek de  $\alpha$  proteïnes onderzocht omdat zij een essentiële rol lijken te spelen bij deze effecten. Optische nabije-veld metingen van met Cy5 gemarkeerde IL-2R $\alpha$  en IL-15R $\alpha$  proteïnes laten zowel proteïne clusters als individuele proteïnes op het celoppervlak zien. Ook individuele Cy5 moleculen zijn zichtbaar,

waarmee het typische emissieniveau van een individueel Cy5 molecuul kan worden afgeleid. Dit wordt gebruikt om een gemeten cluster intensiteit te relateren aan het aantal aanwezige Cy5 moleculen. De intensiteitsverdelingen van zowel IL-2R $\alpha$  als IL-15R $\alpha$  laten twee populaties zien; één bestaande uit individuele proteïnes en de andere bestaande uit clusters. Deze kwantitatieve analyse onthult ook het aantal moleculen dat zich binnen en buiten de clusters bevindt. De clusters van IL-2R $\alpha$  en IL-15R $\alpha$  zijn vergelijkbaar in grootte en hebben een redelijk constante diameter van typisch ongeveer 400 nm. Tweekleuren nabije-veld experimenten laten zien dat IL-2R $\alpha$  en IL-15R $\alpha$  clusters colocaliseren op het membraan, wat waarschijnlijk gerelateerd is met hun soms tegengestelde rol in celsignalering. Hoewel IL-2R $\alpha$ /IL-15R $\alpha$  net als DC-SIGN clusters vormen op het celmembraan is er een groot verschil tussen beide vormen van clusters. Dit komt aan het licht bij correlatie van de cluster grootte met het aantal proteïnes in het cluster. Zowel IL-2R $\alpha$  en IL-15R $\alpha$  hebben een constante moleculaire dichtheid voor alle clusters van respectievelijk 1350 IL-2R $\alpha$ /μm<sup>2</sup> en 120 IL-15R $\alpha$ /μm<sup>2</sup>. In tegenstelling daarmee laten DC-SIGN clusters een grote spreiding zien in moleculaire dichtheid. Dit verschil in ruimtelijke verdeling tussen bindings- en signaleringsmoleculen is waarschijnlijk te wijten aan de specifieke functie van beide soorten moleculen.

Dit proefschrift laat de waarde zien van nabije-veld scannende optische microscopie gecombineerd met individuele moleculaire gevoeligheid voor cellulaire en moleculaire biologie. Het geeft bovendien inzage in de mogelijke manieren om deze techniek te benutten voor het onthullen en bestuderen van de ruimtelijke verdeling op nanometerschaal van moleculen op het celoppervlak.