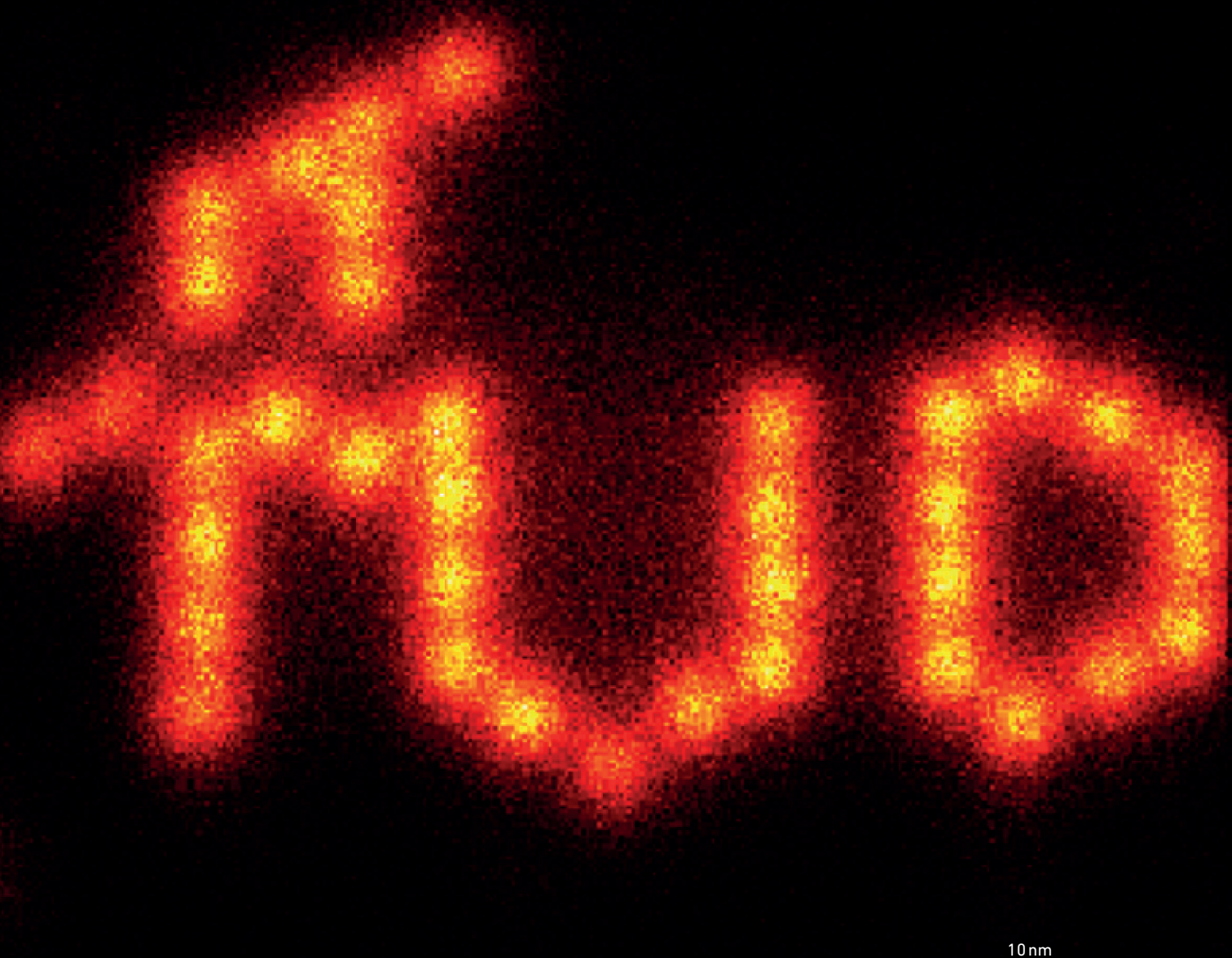


# MICROSCOPIE 300 JAAR NA ANTONI VAN LEEUWENHOEK



10 nm

**Met zijn zelfgebouwde microscopen heeft Antoni van Leeuwenhoek een nieuwe (microscopische) wereld betreden. Hij zag voor het eerst rode bloedcellen, bacteriën en zaadcellen. Sinds zijn tijd is lichtmicroscopie niet meer weg te denken uit de gereedheidskist van de bioloog. In dit artikel gaan we in op de stand van de techniek om zo scherp mogelijk te kijken.**

### De diffractielimiet en Antonie van Leeuwenhoek

In elk vakgebied zijn er in steen gebeitelde formules. Iedereen in het veld weet “hiermee moeten we het doen, wen er maar aan!”. Zo ook in de microscopie waar Ernst Abbe (Eisenach, 1840-1905) formule voor de diffractielimiet in Jena in een monument gehouwen is (zie figuur 1). Die wet – algemeen geldig voor (optische) afbeeldende systemen – legt een ondergrens vast voor de detailgrootte van wat je met een microscoop zichtbaar kunt maken. Abbe maakte gebruik van de golfeigenschappen van licht om te onderzoeken hoe nauw je licht kan focuseren. De interferentie van alle (bij goede benadering) vlakke golven die door de lenzen lopen geeft in het beeldvlak een onscherp stipje van ordegrootte  $\lambda/\sin \alpha$ , met  $\lambda$  de golflengte van het licht en  $\alpha$  de hoek van de marginale straal door de lens en de optische as. Volgens Abbe is het kleinste detail dat afgebeeld wordt groter dan:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha},$$

waarbij  $n$  de brekingsindex is van het objectmedium. Een lensstelsel werkt eigenlijk als een laagdoorlaatfilter voor spatiale frequenties. Frequenties hoger dan  $(2n \sin \alpha)/\lambda$  worden niet doorgelaten. Antoni van Leeuwenhoek (Delft, 1632-1723) maakte in zijn tijd al lenzen die zo goed waren dat de afbeeldingen die gemaakt konden worden ‘diffractie-gelimiteerd’ waren, dat wil zeggen dat de scherpte van de afbeelding alleen door diffractie werd begrensd en niet door bijvoorbeeld een slecht uitgevalen lenskromming. Zijn microscopen bestaan maar uit een enkele lens en die moet je ook nog eens heel dicht bij je oog houden – niet praktisch om naar het voorwerp te kijken dus. Maar door de korte afstand tussen lens en oog kon Van

Leeuwenhoek een grote hoek  $\alpha$  verkrijgen en over een redelijk groot gezichtsveld (voor die tijd) een scherpe afbeelding maken met een resolutie van onder de micrometer (golflengte van zichtbaar licht van 500-600 nm,  $n=1$  van lucht en openingshoek van hooguit enkele tientallen graden). Hij was de eerste die bacteriën zag en tal van ander klein leven. Er ging letterlijk een nieuwe wereld open met zijn microscopen. De resolutie zou driehonderd jaar niet fundamenteel verbeteren en door Abbe wisten we ook waarom. Er was een omweg nodig omdat Abbe met zijn diffractielimiet maar in de weg bleef staan.

### Lokalisatiemicroscopie

Binnen het veld van de superresolutiemicroscopie wordt 2006 gezien als een sleuteljaar, waarin verschillende ontwikkelingen in een stroomversnelling kwamen. In het decennium daarvoor had Stefan Hell al laten zien dat de diffractielimiet omzeild kon worden door slim gebruik te maken van ruimtelijk selectieve de-excitatie van fluorescentie, om zodoende een scherper gebied te kunnen maken van waar het te meten fluorescentiesignaal vandaan komt [1]. Daarnaast bleek het mogelijk om individuele fluorescente moleculen zichtbaar te maken op een camera, en die te volgen in hun pad door een cel. Daarbovenop was ook al bekend dat de fluorescentie van bepaalde moleculen aan en uit te schakelen was. In 2006 werden deze ontwikkelingen samengebracht met de techniek die we nu (enkelmolecuul-)lokalisatiemicroscopie noemen [2]. Voor hun baanbrekende bijdragen aan de totstandkoming van superresolutiemicroscopie hebben Hell, Moerner en Betzig in 2014 de Nobelprijs voor de Chemie ontvangen [3]. Vanaf 2006 is de techniek een stuk verder gebracht en zijn er ontdekkingen in de



**Bernd Rieger (1973)** studeerde natuurkunde in Duitsland en Zweden en promoveerde aan de TU Delft op het gebied van beeldbewerking en analyse. Na een postdoc was hij van 2005 tot 2010 in deeltijd werkzaam bij FEI. Sinds 2006 is hij werkzaam aan de TU Delft op het gebied van cryo-elektronenmicroscopie en superresolutie-lichtmicroscopie.

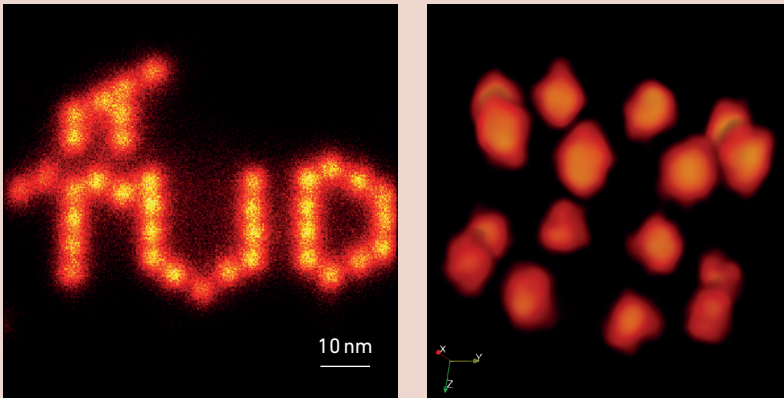


**Sjoerd Stallinga (1970)** studeerde natuurkunde in Nijmegen en promoveerde daar ook op onderzoek naar vloeibare kristallen. Bij Philips Research in Eindhoven werkte hij aan een variëteit van optische onderwerpen en sinds 2009 werkt hij aan de TU Delft, waar hij zich richt op *computational imaging*, in het bijzonder superresolutie-microscopie-technieken. S.Stallinga@tudelft.nl





Figuur 1. Het Abbe-monument in Jena, Duitsland met als inscriptie zijn beroemde formule voor de diffractielimiet. Foto: KaurJmeb.



Figuur 2. Deeltjesmiddeling [5,6]. Links: Een reconstructie van een nanostructuur in de vorm van het TU Delft-logo gemaakt door deeltjesmiddeling van 383 experimentele superresolutiemicroscopie-opnames [5]. Het logo is gemaakt met de zelfassemblerende 'DNA-origami'-techniek. Aan punten in het patroon zijn ankerpunten aangebracht waaraan fluorescente moleculen tijdelijk kunnen binden, en zo door de camera van de microscoop kunnen worden gezien. De kwaliteit, dat wil zeggen de signaal-ruisverhouding van iedere opname, is zeer beperkt en een deel van de ankerpunten ontbreekt, maar door de deeltjesmiddeling maken we deze haarscherpe afbeelding. De afstand tussen twee ankerpunten in het patroon is 5 nm, de dubbele dikte van het DNA. De berekende resolutie is 3,3 nm, oftewel ongeveer 1/175 van de golflengte van de fluorescentie-emissie. Rechts: een driedimensionale reconstructie van 356-beelden van het Nup107-eiwit in het nuclear pore complex (NPC) [6]. Ook hier zijn veel superresolutie-opnames die individueel van geringe kwaliteit zijn gecombineerd tot een veel scherpere reconstructie door deeltjesmiddeling. De diameter van het NPC is ongeveer 100 nm en de hoogte 60 nm. In onze reconstructie is helder de achthoedige symmetrische plaatsing van het eiwit in het NPC te zien. De berekende resolutie voor deze reconstructie is 17 nm.

structuurbiologie mee gedaan, zoals bijvoorbeeld de ontdekking van de eiwitstructuur in zenuwcellen [4]. In het vervolg van dit artikel willen we twee recentere ontwikkelingen beschrijven waar we zelf aan hebben bijgedragen. De eerste is het gebruik van datafusie of 'deeltjesmiddeling', een extra algoritmische laag waarmee de 1 nm resolutieschaal binnen bereik komt. De tweede is het sleutelen aan het optisch systeem van de microscoop zelf, om de vorm van de enkelmolecuullichtvlekken naar wens aan te passen. Hiermee wordt het mogelijk om meer te meten dan alleen de laterale ( $xy$ ) positie van de moleculen.

### Met deeltjesmiddeling op weg naar 1 nm resolutie

Ook al is superresolutiemicroscopie veel scherper dan normale, diffractielimiteerde microscopie, dan nog is de resolutie niet oneindig. Wat zijn de fundamentele limieten die superresolutiemicroscopie begrenzen qua scherpte? Ten eerste is dat de schattingsprecisie, zoals uitgelegd in het kader *Principe van de lokalisatiemicroscopie*, en ten tweede is dat de imperfecte efficiëntie van labels. De kans dat een bindingsplek aan de structuur voor een fluorofoor daadwerkelijk zichtbaar wordt is doorgaans een stuk minder dan 100% omdat de biochemie voor dit hechtingsproces niet altijd werkt en ook omdat niet alle fluoroforen daadwerkelijk licht uitzenden. Dit leidt ertoe dat een flinke portie informatie in het opgenomen beeld zal ontbreken. Deze beperking is dus geen limiet van de microscoop zelf maar juist van het proces van fluorescentielabelen. De oplossing voor het tweede probleem is het combineren van informatie van vele chemisch identieke voorwerpen. Dit is in de celbiologie vaak mogelijk omdat in de cel veel moleculaire machines in veelvoud aanwezig zijn. Deze worden 'deeltje' genoemd maar hebben uiteraard niets van doen met de elementaire deeltjes die we uit de fundamentele natuurkunde kennen. Het 'enige' wat hiervoor gedaan moet worden, is het op de juiste manier combineren van de verschillende opnames van de deeltjes.

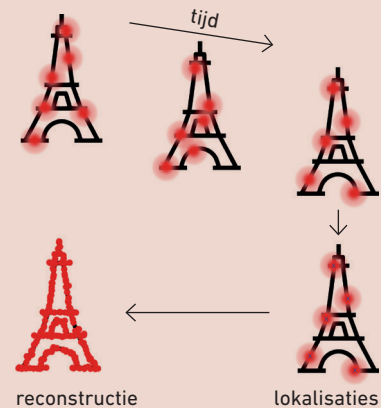
Hier ligt ook direct de crux, omdat je niet a priori weet waar je naar kijkt, en omdat elke individuele opname ontbrekende informatie en een lage signaal-ruisverhouding heeft. De hamvraag is dan ook, hoe je al deze informatie op de correcte wijze kunt combineren. Hiervoor wordt vaak een modelstructuur aangenomen, dat wil zeggen dat alle opnamen van individuele deeltjes verschoven en gedraaid worden om zo goed mogelijk op deze 'mal' te passen. Wij hebben een methode ontwikkeld [5,6] om dit proces uit te kunnen voeren zonder mal. Het centrale idee van onze methode is om voor alle deeltjes paarsgewijs de juiste translatie en rotatie uit te rekenen om ze op elkaar te leggen, waarmee we een overcomplete representatie opbouwen van relatieve transformaties. In een volgende stap combineren we deze op een handige manier.

Onze methode hebben we eerst getest op een gecontroleerde nanostructuur, gemaakt door een samenwerkingspartner op basis van 'DNA-origami' (zie figuur 2). Op het DNA kunnen we vooraf gedefinieerde punten in het patroon ankerpunten voor fluoroforen aangebracht worden. Hier is dat in de vorm van het TU Delft-logo gedaan. De ankerpunten zijn 'zwak', dat wil zeggen dat ze de fluoroforen niet permanent maar tijdelijk binden, gemiddeld een paar honderd milliseconden. Dit tijdelijke karakter van de binding zorgt ervoor dat maar een kleine deelverzameling van alle mogelijke ankerpunten tegelijk bezet is en in beeld komt, wat dan weer de truc van lokalisatiemicroscopie mogelijk maakt. Ondanks de hoge resolutie is een superresolutie-opname van een enkel logo toch nog niet zo nuttig. Er ontbreekt nogal vaak een toevallig ankerpunt en verder is de schattingsprecisie groter dan de afstand tussen de ankerpunten, zodat we ze niet individueel kunnen onderscheiden. Hiervoor gebruiken we dan de deeltjesmiddeling over enkele honderden van dezelfde logo's. Het uiteindelijke resultaat wordt zo goed dat je elk ankerpunt in het logo kan herkennen ondanks de minuscule afstand van vijf nanometer (dubbele

## PRINCIPE VAN DE LOKALISATIEMICROSCOPIE

Het centrale idee is dat niet een beeld maar een hele tijdreeks aan beelden gemaakt wordt van het monster, in dit geval de Eiffeltoren, en dat in elk beeld een willekeurige kleine deelverzameling van de fluoroforen in de 'aan'-stand staat. In alle beelden is dus de overgrote meerderheid van de fluoroforen niet te zien

en het stochastische karakter van het schakelgedrag is nodig om uiteindelijk alle moleculen af te kunnen beelden. Op deze manier worden de omstandigheden gecreëerd dat elk opgenomen beeld bestaat uit een set geïsoleerde lichtvlekken, allemaal ter grootte van de diffractielimiet. De volgende stap is het analyseren van de lichtvlekken met een algoritme dat het meest waarschijnlijke middelpunt van elke lichtvlek vindt als de best mogelijke schatting van de positie van de fluoroforen. De schattingsprecisie schaalst als  $\lambda(n \sin(\alpha)\sqrt{N})$ , met  $N$  het aantal gedetecteerde fotonen per fluorofoor, in de praktijk ligt deze rond de 15 nm.

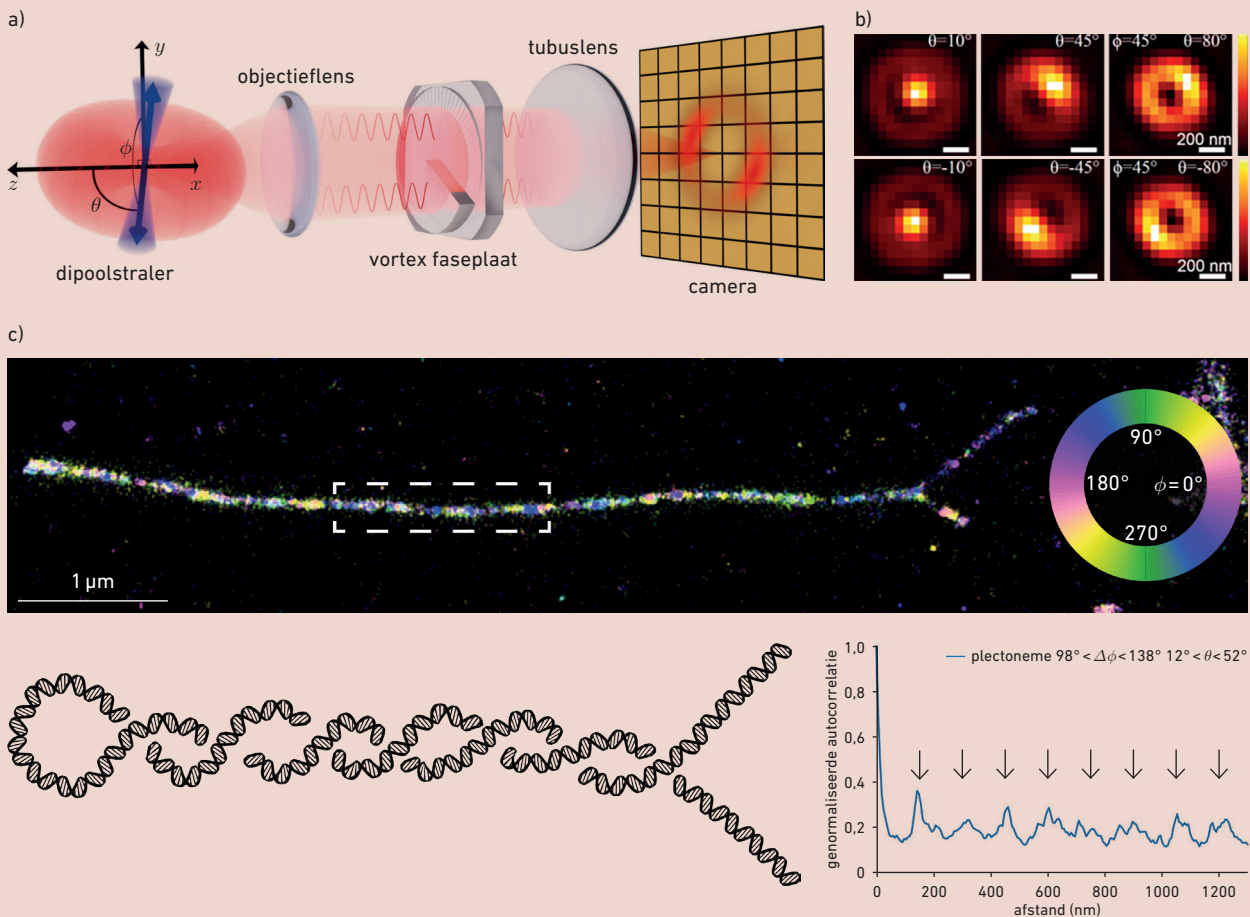


dikte van het DNA). En dit alles zonder dat we de voorkennis van de nanostructuur gebruikt hebben! Nadat we zo onze methode goed getest hadden, hebben we dit op een biologisch monster toegepast en dan direct in drie dimensies en niet meer in twee dimensies [6]. In figuur 2 zien we een reconstructie van het Nup107-eiwit in het nuclear pore complex (NPC). Een NPC heeft de vorm van een tunnel, maar dat is niet goed te zien op enkele opnamen maar omdat een celkern duizenden NPC's heeft, kunnen deze chemisch identieke structuren gemiddeld worden. Het resultaat mag er zijn, je ziet de achthoekige symmetrie van Nup107 en dat het in twee gescheiden ringen in het complex voorkomt. De twee ringen hebben ook een kleine faseverschuiving ten opzichte van elkaar, die we met onze methode konden opmeten.

### Puntspreidingsfunctie naar wens

De Nup107-eiwitten zijn in drie dimensies gemeten, terwijl een standaardlichtmicroscopie langs de optische as eigenlijk helemaal geen onderscheidend vermogen heeft! Binnen de lokalisatiemicroscopie kan dat wel gerealiseerd worden door een cilinderlens voor de camera toe

te voegen. Dit verandert de ronde lichtvlek in een langwerpige en de oriëntatie en mate van langwerpigheid is een maat voor de afstand van het molecuul ten opzichte van het brandvlak. De vorm van de lichtvlek ten gevolge van de emissie van een enkel fluorofoor wordt de puntspreidingsfunctie genoemd. De toevoeging van de cilinderlens komt er feitelijk op neer dat een zadelvormig faseprofiel mee wordt gegeven aan de lichtbundel die van het molecuul naar de camera gaat. Door nu te sleutelen aan dit faseprofiel, met speciaal gestempelde of geëtste structuren, of met een adresseerbare gepixelde modulator, kan een brede variatie aan lichtvlekvormen gemaakt worden. Binnen de klasse van puntspreidingsfuncties met singulariteitspunten hebben wij de zogeheten vortex puntspreidingsfunctie voorgesteld [7], zie figuur 3. Hierbij maken we gebruik van een faseprofiel in de vorm van een wenteltrap. Hiermee verandert de standaardlichtvlek in een ringetje met een absoluut donker middelpunt ('donut'). Onze motivatie was het creëren van een puntspreidingsfunctie waarmee we naast de 3D-positie van de fluoroforen ook de 3D-oriëntatie zouden kunnen meten. De fluorescentie wordt beschreven



Figuur 3. Vortex puntspreidingsfunctie [7]. a) Een faseplaat met wenteltrappatroom verandert de puntspreidingsfunctie zodanig dat meting van de 3D-positie en oriëntatie van het fluorofoor mogelijk wordt. b) De vorm van de lichtvlek varieert als functie van de polaire ( $\theta$ ) en azimuth ( $\phi$ ) hoek van de as van de dipoolstraler, hierdoor kan het computeralgoritme een schatting maken van deze hoeken uit het beeld. c) DNA-lussen waarin de lokale oriëntatie van de fluorofoeren met kleurcodering is aangegeven. Een autocorrelatie-analyse langs de draadstructuur geeft een periodiciteit van ongeveer 150 nm, wat consistent is met het superhelixmodel van opgekruld DNA.

als een klassiek elektromagnetisch stralingsproces, waarin het fluorofoor gemodelleerd wordt als een dipoolstraler. Dit heeft tot gevolg dat de emissie anisotroop en gepolariseerd is, en op een wijze die sterk afhangt van de oriëntatie van de dipoolas van het fluorofoor. Echter, doorgaans heeft de biochemische binding van het fluorofoor aan de biologische structuur enige flexibiliteit waardoor tijdens de sluitertijd van de camera verschillende oriëntaties van het fluorofoor voorkomen. De emissie wordt daardoor uitgemiddeld tot de standaard ronde gepiekte lichtvlek. Er zijn ook gevallen waarin de binding een stuk meer rigide is en in die gevallen zou je dipool effecten in

de gemeten lichtvlek moeten kunnen zien. Sterker, door die uit te vergroten of te manipuleren zou je op deze wijze zelfs de oriëntatie van fluorofoeren, en daarmee van de onderliggende structuur, kunnen meten! Dit is nu precies wat we met onze vortex puntspreidingsfunctie hebben kunnen doen. Als toepassingsvoorbeeld hebben we hiermee, samen met de onderzoeksgroep van Cees Dekker, de lokale oriëntatie van opgekrulde DNA-lussen (plectonemen) in beeld kunnen brengen. Wat gaan we met lichtmicroscopie de komende 300 jaar na Van Leeuwenhoek nog ontdekken? We denken dat dit instrument nog een lange en kleurrijke toekomst voor

zich heeft, om steeds grotere volumes scherper en sneller te zien.

REFERENTIES

- 1 T.A. Klar et al., Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8206-8210 (2000).
- 2 E. Betzig et al., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
- 3 B. Rieger en S. Stallinga, Kijken op de nano-schaal met superresolutie-fluorescentiemicroscopie, *NTvN* **81-04**, 166-170 (2015).
- 4 K. Xu et al., Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons, *Science* **339**, 452-456 (2013).
- 5 H. Heydarian et al., Template-free 2D particle fusion in localization microscopy, *Nature Methods* **15**, 781-784 (2018).
- 6 H. Heydarian et al., 3D particle averaging and detection of macromolecular symmetry in localization microscopy, *Nature Communications* **12**, 2847 (2021).
- 7 C.N. Hulleman et al., Simultaneous orientation and 3D localization microscopy with a vortex point spread function, *Nature Communications* **12**, 5934 (2021).