

**Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa**

**Doutoramento em Ciências Biomédicas, Especialidade de Ciências Morfológicas**

**Thesis title: “*Beyond Rayleigh’s limit: Achieving real-time super-resolution fluorescence microscopy*”**

**By: *Ricardo Henriques***

## **Resumo**

**Palavras-chave:** nanoscopia, super-resolução, *PALM*, *STORM*, *photo-switchable probes*, *molecular-bleacons*, *blinkons*

O presente trabalho teve por objectivo o desenvolvimento de novas ferramentas e aplicações em microscopia de super-resolução por fluorescência, desbloqueando informações estruturais de alta resolução em moléculas como DNA, RNA e proteínas. Estas moléculas, parte do dogma central da biologia, existem como objectos individuais em escalas de poucos nanómetros, para além do poder de resolução da microscopia de fluorescência clássica. Neste contexto, explorámos neste trabalho técnicas de *single-molecule localization microscopy* (SMLM), que mantêm até hoje o recorde em poder de resolução para microscopia óptica. Estas técnicas, têm a capacidade de experimentalmente identificar e localizar moléculas individuais na escala de sub-nanómetros. Nesta família de métodos, *photo-activated localization microscopy* (PALM), *stochastic optical reconstruction microscopy* (STORM) e suas variantes, têm o potencial para resolver estruturas celulares completas com uma precisão nanométrica através da localização de milhares de milhões de fluoróforos individuais no interior de células marcadas. A implementação e utilização destes novos métodos representam um enorme desafio já que estes ainda se encontram no seu “estádio embrionário”. O meu doutoramento teve como objectivo melhorar estes novos métodos em três áreas diferentes. A primeira área sendo a configuração de

hardware, nomeadamente através do desenvolvimento de um método que permite converter um microscópio *wide-field* de fluorescência ou de *total internal reflection fluorescence* (TIRF) em um sistema de super-resolução capaz de alcançar nanoscopia 3D. A segunda área focou-se em melhorar os métodos de aquisição e análise de imagem em super-resolução, através do desenvolvimento de “QuickPALM” e ferramentas como o “controle do laser para QuickPALM”. Estes quando integrados com outras bibliotecas de software *open-source*, como o ImageJ ou  $\mu$ Manager, constituem um conjunto completo de ferramentas de *software* necessário para controlar o microscópio de super-resolução e analisar em tempo real os dados adquiridos. A terceira área relacionada com o desenvolvimento de novas sondas *photo-switchable* para super-resolução, baseou-se na exploração de interacções transitórias de fluoróforos "clássicos" com supressores de fluorescência de alta eficiência. Estes desenvolvimentos têm sido aplicados para o estudo de processos biológicos ao nível nanométrico ao longo do meu doutoramento. A secção de resultados da presente tese demonstra uma das implementações mais proeminente, em que temos estudado a interacção espacial de proteínas chave na via de sinalização NF- $\kappa$ B activada após estimulação de receptores como TNF- $\alpha$  e IL-1. No global, o trabalho que desenvolvi durante o meu doutoramento constitui uma contribuição científica original e extremamente relevante para o avanço da microscopia de localização molecular. Pouco tempo após a publicação e disponibilização do QuickPALM à comunidade científica, este tornou-se uma das ferramentas mais utilizadas na detecção de partículas e de reconstrução de imagens para a classe de técnicas de SMLM. Adicionalmente, os meus resultados fornecem uma visão nova no estudo de estruturas celulares a nível molecular e das interacções entre os participantes-chave na biologia molecular.

## Summary

**Keywords:** nanoscopy, super-resolution, PALM, STORM, photo-switchable probes, molecular-beacons, blinkons

The present work aimed to develop new tools and applications in super-resolution fluorescence microscopy to unlock high-resolution structural information on DNA, RNA and proteins. These molecules, central to the dogma in biology, exist as single-molecules at scales of few nanometres beyond the resolving power of classical fluorescence microscopy. In this context we have explored single-molecule localization microscopy (SMLM) techniques that hold to date the record in resolving power for optical microscopy. These have both the capacity to identify and localize individual molecules at scales experimentally demonstrated up to sub-nanometre level. In this family of methods, photo-activated localization microscopy (PALM) and stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) variants hold the potential to fully resolve complete cellular structures at the nanoscale by precisely localizing thousands to millions of individual fluorophores within a labelled cell. Tackling these novel methods is highly challenging due to their still embryonic state. My Ph.D. aimed to improve these novel methods in three different areas. First, the hardware configuration, by creating a simple setup method that converts a standard wide-field fluorescence or total-internal reflection fluorescence (TIRF) microscope into a super-resolution system able to achieve 3D nanoscopy. Second, the super-resolution image acquisition and analysis, by developing “QuickPALM” and tools such as the “Laser control for QuickPALM”, which integrated with other open-source libraries such as ImageJ or  $\mu$ Manager provide a complete set of software tools to achieve super-resolution hardware control and real-time analysis of the acquired data. Third, the discovery of new photo-switchable probes for super-resolution, achieved by exploitation of the transient interaction of “classical” fluorophores with high-efficiency quenchers. These developments have been applied on the study of biological processes at the nanometer level throughout my Ph.D. To this matter, the results section of the present thesis demonstrates one of the most prominent implementations, in which we have

studied the spatial interaction of key proteins of the NF- $\kappa$ B pathway upon receptor stimulation by TNF- $\alpha$  or IL-1. Altogether, the work I developed during my Ph.D. has provided important and original scientific contributions for the advancement of single molecule localization microscopy. Shortly after QuickPALM was published and made available to the scientific community it became one of the most used analytical tools at the core of particle detection and reconstruction for the class of SMLM techniques. Moreover, my results provide a novel view into cellular structure at the molecular level and provide a novel framework to study the interplay of key molecular participants in biology.