



Doctoral Thesis

## Development and application of quantitative in situ imaging techniques

**Author(s):**

Kunz, Leo

**Publication Date:**

2019

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000366084> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 26188

# Development and application of quantitative in situ imaging techniques

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
LEO FREDERIK KUNZ

MSc. Biomedical Engineering ETH Zurich

born on 18.11.1989

citizen of Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Timm Schroeder  
Prof. Dr. Radek Skoda  
Prof. Dr. Sai Reddy

2019

## **Abstract**

Multicolour 3D quantitative imaging of large tissue volumes is pivotal to understand the development and organization of tissues as well as interactions of cells and the distribution of secreted molecules in situ. However, in situ imaging is technically challenging. In particular, the preparation and imaging of large bone and marrow sections, as well as faithful imaging and quantification of individual secreted molecules is not straightforward or possible with current techniques. The localization of most molecules in situ therefore remains unknown.

In the work presented in this thesis, I developed together with my colleagues an integrated pipeline to generate reproducible high-dimensional quantitative data from bone marrow and any other tissue. Further, I present my efforts in adapting the Proximity Ligation Assay for large volume in situ imaging of individual molecules, including new 3D quantification strategies and software.

Using these approaches, we measured the spatial relationship between hematopoietic cells, bone surfaces and Schwann cells within bone marrow. We further created an atlas of nonhematopoietic cells in the bone marrow and I investigated the process of metastatic colonialization of the bone marrow. I then looked into the distribution of individual C-X-C motif ligand 12 (CXCL12) molecules and found broad CXCL12 distribution with local enrichment at bone surfaces, but no long-range intra-marrow CXCL12 gradients, correcting current assumptions about migration control of hematopoietic stem cells in bone marrow.

Overall the here presented technique developments and adaptations will enable new discoveries down to the molecular level in situ. While the biological findings answer some of the current questions in bone marrow biology, the questions raised by my findings represent the basis for more research in this new branch of quantitative molecular in situ research.



## Zusammenfassung

Dreidimensionale Vielfarben-Bildgebung großer Volumina in Geweben ist entscheidend, um die Entwicklung und Organisation von Geweben sowie die Interaktionen von Zellen und die Verteilung sekretierter Moleküle in situ zu verstehen. Bildgebung in situ ist jedoch technisch sehr anspruchsvoll. Insbesondere die Präparation und die Aufnahme von Bildern großer Knochen- und Knochenmarksvolumen, sowie die wahrheitsgetreue Abbildung und Quantifizierung einzelner sekretierter Moleküle ist mit derzeitigen Techniken nicht einfach oder nicht möglich, weshalb z.B. die Lokalisation der meisten Moleküle in Geweben nicht bekannt ist.

In der in dieser Dissertation vorgestellten Arbeit zeige ich, wie meine Kollegen und ich eine integrierte Pipeline entwickelt haben, um reproduzierbar hochdimensionale, quantitative Mikroskopiedaten von Knochenmark und anderen Geweben zu generieren. Des Weiteren präsentiere ich meine Arbeit über die Anpassung des Proximity Ligation Assays für die Detektion individueller Proteine in großen Gewebevolumina, einschließlich neuer 3D-Quantifizierungsstrategien und Software.

Mittels dieser neuen Entwicklungen haben wir die räumliche Beziehung zwischen hämatopoetischen Zellen, Knochenoberflächen und Schwann-Zellen im Knochenmark gemessen. Wir haben einen Atlas nicht-hämatopoetischer Zellen im Knochenmark erstellt, und ich habe den Prozess der Krebszellkolonialisierung des Knochenmarks untersucht. Weiterhin, habe ich die Verteilung von C-X-C-motiv ligand 12 (CXCL12) Molekülen untersucht und fand eine homogene CXCL12-Verteilung mit lokaler Anreicherung an Knochenoberflächen, jedoch keine weitreichenden CXCL12-Gradienten, was aktuelle Annahmen über die Migrationskontrolle hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark korrigiert.

Die hier vorgestellten technischen Entwicklungen und Anpassungen werden neue Entdeckungen auf molekularer Ebene in Geweben ermöglichen. Während die biologischen Befunde schon einige der aktuellen Fragen in der Knochenmarkbiologie beantworten, bilden die durch diese Arbeit neu aufgedeckten Fragen die Grundlage für weitere Forschungen in diesem neuen Zweig der molekularen quantitativen Forschung in situ.