

DISS. ETH NO. 26425

***INORGANIC NANOPARTICLES FOR CORRELATIVE
CATHODOLUMINESCENCE ELECTRON MICROSCOPY
BIOIMAGING***

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

presented by
Kerda Keevend
MSc, University of Tartu

born on 23.09.1991
citizen of Republic of Estonia

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Inge Katrin Herrmann, examiner
Prof. Dr. Rachel Grange, co-examiner

2019

Zusammenfassung

In der biomedizinischen Forschung spielt die Mikroskopie eine wichtige Rolle, beispielsweise in der Darstellung von Feinstrukturen von Geweben, Zellen, Organellen und Makromolekülen. Während die Fluoreszenzmikroskopie (FM) die Lokalisierung spezifischer Proteine und die Untersuchung ihrer Funktionen ermöglicht, bleibt die überwiegende Mehrheit der Bestandteile in einer Probe unmarkiert, sodass der grössere Kontext unbekannt bleibt. Darüber hinaus ist die räumliche Auflösung der konventionellen FM nicht ausreichend, um einzelne Proteine zu lokalisieren. Die Elektronenmikroskopie (EM) hingegen ermöglicht eine ganzheitliche Betrachtung der zellulären Ultrastruktur mit nanometergenauer Auflösung, allerdings ist die Lokalisierung von Biomolekülen in den Graustufenbildern schwierig. Während die Immunogoldmarkierung auf der Basis kleiner Goldnanopartikel eine weit verbreitete Methode zur Epitoperkennung in der EM ist, sind Co-Lokalisierungsstudien und die Unterscheidung von anderen elektronendichten Granula nicht einfach. Die Variabilität in der Diffusivität der unterschiedlich grossen Goldpartikel erschwert zusätzlich die gleichzeitige Identifizierung verschiedener Epitope. Anstatt Markierungen nach Grösse und Elektronendichte zu unterscheiden, können Nanopartikel so synthetisiert werden, dass sie charakteristische Lumineszenzeigenschaften aufweisen. Die Wechselwirkung eines fokussierten Elektronenstrahls mit der nanopartikelmarkierten Probe stimuliert dann die Photonenemission aus der Probe; ein Phänomen, das als Kathodolumineszenz (CL) bekannt ist und das für die Mehrfarben-Elektronenmikroskopie genutzt werden kann.

Kapitel 1 gibt einen Überblick über den Stand der Technik und stellt die Perspektiven der korrelativen Kathodolumineszenzelektronenmikroskopie (CCLEM) für den biomedizinischen Bereich dar. In diesem Kapitel werden die Prinzipien der Kathodolumineszenzmikroskopie vorgestellt, einschliesslich der Proben- und Messparameter, die für die Erstellung hochauflösender CCLEM-Bilder biologischer Proben erforderlich sind. Zudem beinhaltet das einleitende Kapitel eine umfassende Analyse potenzieller Immunolabels, die für kathodolumineszenzbasierte funktionelle Mikroskopie Studien geeignet sind. Nach einer ausführlichen Diskussion und Gegenüberstellung der potenziellen Vor- und Nachteile der Kathodolumineszenzmikroskopie biologischer Proben gegenüber der Elementkartierung mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDXS) und Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS), schliesst eine Analyse möglicher Herausforderungen und Zukunftschancen, welche die

Perspektiven der volumetrischen mehrfarbigen Einzelmolekülmarkierung einschliesst, das erste Kapitel ab.

Kapitel 2 zeigt die CCLEM-Analyse von in Epoxidharz eingebetteten Zellen, welche anorganische Nanokristalle enthalten. Unter anderem wird gezeigt, wie 20 nm $Tb^{3+}:LaF_3$ Nanopartikel, welche von menschlichen Zellen endozysiert wurden, mit CCLEM abgebildet werden können. Dieses Kapitel beschreibt die multimodale Bildgebung durch die Erfassung von Sekundärelektronen (SE), rückstreuenden Elektronen (BSE) und CL-Signalen von chemisch fixierten, in Epoxidharz eingebetteten Zellen mit vollständig erhaltener Ultrastruktur. Während die chemische Fixierung und Harzeinbettung kaum Einfluss auf die Kathodolumineszenzemission der Nanokristalle hatte, wurde im Laufe der Zeit eine leichte Abnahme der Emissionsintensität beobachtet, ohne dabei die Datenqualität entscheidend zu beeinträchtigen. Die Proben wurden sowohl im Rastertransmissionselektronenmikroskop (STEM) als auch in der fokussierten Ionenstrahl-Rasterelektronenmikroskopie (FIB/SEM) abgebildet. Im Gegensatz zu den STEM-Bildern, bei denen eine ausgezeichnete Co-Lokalisierung des CL- und des EM-Signals festgestellt wurde, wurde bei den Bildern aus FIB-geschnittenen Blockproben eine leichte, auf die Probenaufladung zurückzuführende Fehlansrichtung beobachtet. Dennoch bildet diese erstmalige Beschreibung von CL in FIB geschnittenen biologischen Proben eine zentrale Grundlage für zukünftige Studien zur Erforschung der dreidimensionalen Analyse biologischer Proben unter Verwendung von CL-Proteinmarkierungen.

Basierend auf der vorangegangenen Beobachtung einer zeitabhängigen Abnahme des CL-Emissionssignals wird in Kapitel 3 die Eignung verschiedenster CL-Labels unter geeigneten Aufnahmebedingungen systematisch untersucht. Die CL-Aufnahmeparameter wurden basierend auf Monte-Carlo-Simulationen von epoxidharzeingebetteten, osmiumgefärbten Zellen sowie experimentellen Daten optimiert. Die optimierten Elektronenstrahlparameter reduzierten die bisher beobachtete Fehlansrichtung zwischen BSE- und CL-Signalen auf ein Minimum. Die CL-Emissionsstabilität von traditionell für die Abbildung biologischer Proben verwendeten Fluorophoren wurde unter Verwendung der für die CCLEM-Darstellung geeigneten Abbildungsparametern untersucht. Diese Untersuchung schloss sowohl organische Farbstoffe (z.B. DAPI) als auch organische und halbleitende Quantenpunkte (QDs) und zwei Arten von mit seltenen Erd-Ionen dotierten Nanokristallen ein. Bei den Untersuchungen zeigten die beiden mit seltenen Erden dotierten Nanokristalle im Vergleich zu konventionellen Fluoreszenzmarkern und Halbleiter-Quantenpunkten eine überlegene Leistung in Bezug auf Emissionshelligkeit und Stabilität. Die vorgestellten $YVO_4:Bi^{3+},Eu^{3+}$ Nanopartikel zeigten eine bemerkenswert helle Emission in CCLEM und können auch in konventionellen Fluoreszenzmikroskopen detektiert und dargestellt werden. Dadurch wird einer der grössten Nachteile von Nanokristallen auf der Basis von seltenen Erden überwunden, welche typischerweise im tiefen UV angeregt werden

müssen. Die CL-Kartierung bietet auch ein leistungsfähiges, hochauflösendes Verfahren um Nanopartikelmarkierungen von endogenen, dichten Granula zu unterscheiden, welche aufgrund ihrer nahezu identischen Morphologie und Elektronendichte sonst nicht ohne weiteres unterschieden werden können. Die im vorliegenden Kapitel beschriebene Arbeit optimiert das CCLEM-Markierungs-Design und die Auswahl der bildgebenden Parameter und ebnet so den Weg für zukünftige Studien zur CL-basierten funktionellen Mikroskopie unter der Voraussetzung, dass geeignete Oberflächenfunktionalisierungsstrategien verfügbar werden.

In Kapitel 4 werden CCLEM-basierte Immunolabels für die spezifische Rezeptormarkierung unter Verwendung von Seltenerdelementen dotierten Nanokristallen entwickelt. Dieses Kapitel stellt lichtemittierende Proteinmarkierungen für die Elektronenmikroskopie vor und veranschaulicht die Unterscheidung von Markierungen anhand ihres Emissionsspektrums und nicht anhand von Grösse oder Zusammensetzung (im Gegensatz zu herkömmlichen EM-Immunmarkierungen, wie beispielsweise Immunogold). Monodisperse Tb^{3+} dotierte YPO_4 Nanopartikel wurden durch eine mikrowellenunterstützte hydrothermale Reaktion synthetisiert. Obwohl die Kristallinität relativ gering war, reichte die Emission der Nanopartikel aus, um einzelne Nanopartikel zu identifizieren. Anschliessend wurden die Nanopartikel mit Silanen funktionalisiert, um funktionelle Aminogruppen auf der Partikeloberfläche anzubringen, welche dann an Folsäureeinheiten gekoppelt werden konnten. Die funktionalisierten Nanopartikel wurden eingesetzt, um unter Verwendung eines aus dem Immunogoldfeld angepassten Markierungsprotokolls spezifisch an Folsäure-Rezeptoren auf Krebszellen zu binden. Um die Spezifität zu beurteilen, wurde die Markierungseffizienz mit Zellen verglichen, bei welchen die Rezeptoren zuvor mit überschüssiger freier Folsäure blockiert wurden. Ausserdem wurde die Rezeptormarkierung auch mit der etablierten Immunogoldmethode (Goldstandard) verglichen. Die in diesem Kapitel beschriebende Studie zeigt CCLEM-basierte Immunmarkierung mit Einzel-Nanopartikel-Emission und ist ein Ausgangspunkt für zukünftige Studien, die (Mehr-)Farbbildgebung auch von intrazellulären Bestandteilen ermöglicht.

Die obigen Kapitel sowie die aktuelle Literatur zeigen, dass die Synthese von hochkristallinen, stark-leuchtenden und kolloidstabilen mit Seltenerdelementen dotierten Nanopartikeln eine Herausforderung darstellt. Traditionelle nasschemische Methoden sind oft eine naheliegende Wahl, allerdings erfordert die niedrige Kristallinität von auf diese Weise präparierten Nanopartikeln oft eine Nachbehandlung bei hoher Temperatur, was deren Redispersierbarkeit entscheidend beeinflusst. Die Flamm-aerosoltechnologie ermöglicht nachweislich die skalierbare Synthese einer Vielzahl von CCLEM-tauglichen Nanomaterialien, einschliesslich Seltenerdelementen dotierter Nanopartikel. Insbesondere die hohe Reproduzierbarkeit, Skalierbarkeit und Hochtemperatursynthese bieten potenzielle Vorteile gegenüber alternativen Synthesewegen. Die Nanopartikel werden jedoch im trockenen Zustand gesammelt, was die Re-

Dispergierung und Funktionalisierung erschwert. Kapitel 5 untersucht mögliche Strategien, um Flammnaerosolpartikel durch nachträgliche Modifikation für Immunmarkierungsanwendungen verfügbar zu machen. Da zahlreiche biochemische und biomedizinische Bildgebungsverfahren auf hoher Kolloidstabilität beruhen, ist eine Oberflächenmodifizierung oftmals unvermeidlich. Die Funktionalisierung mit Poly(ethylenglykol)-Ketten (PEGylierung) ist aufgrund des hydrophilen Charakters der PEG-Ketten zu bevorzugen, da sie eine hohe Dispergierbarkeit in wässrigen Medien durch sterische Abstossung ermöglicht. Dieses Kapitel zeigt ein einfaches, einstufiges Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung von flammnaerosol-hergestellten Y_2O_3 -Nanopartikeln. Die Kolloidstabilität wurde deutlich verbessert und legt den Grundstein für eine biomedizinische Nutzung von flammnaerosol-hergestellten Oxid-Nanopartikeln.

Zusammenfassend sind in dieser Arbeit zentrale Fortschritte im Hinblick auf die Entwicklung von immunoCCLEM basierend auf seltenen Erd-dotierten Nanokristallen erzielt worden. Die Stärken von immunoCCLEM liegen in der nanometergenauen Auflösung und Identifizierung von molekularen Markierungssonden mittels optischer Signaturen bei gleichzeitig vollständiger Abbildung der zellulären Ultrastruktur. Die vorliegende Arbeit bildet damit die Grundlage für die Mehrfarben-Elektronenmikroskopie als potentielle unkomplizierte Alternative zur hochauflösenden Mikroskopie.

Summary

In biomedical research, microscopy plays an immensely important role in investigations related to the detailed structure of tissues, cells, organelles, and macromolecules. While fluorescence microscopy (FM) enables localization of specific proteins and the study of their functions, the vast majority of constituents in a sample stay unlabelled and therefore the wider context remains unknown. Moreover, spatial resolution of conventional FM is insufficient to localize single proteins. Electron microscopy (EM) on the other hand allows holistic view of the cellular ultrastructure with nanometre-scale resolution, however, localization of biomolecules on the greyscale images is challenging. While immunogold labelling based on small gold nanoparticles is a widely adopted method for epitope recognition in EM, co-localization studies and distinction of the labels from other electron-dense granules is not straightforward. The different diffusivities of differently-sized gold particles additionally hamper the simultaneous identification of various epitopes. Instead of differentiating labels based on their size and electron density, nanoparticles may be engineered to exhibit characteristic luminescence properties. The interaction of a focused electron beam with the nanoparticle-labelled sample then stimulates photon emission from the sample, a phenomenon known as cathodoluminescence (CL), which may be leveraged to enable multi-colour electron microscopy.

Chapter 1 gives an overview of the state-of-the-art and presents the prospects of correlative cathodoluminescence electron microscopy (CCLEM) for the biomedical field. This chapter introduces the principles of cathodoluminescence microscopy, including the requirements for sample and imaging parameters necessary to achieve high-resolution CCLEM bioimages. More specifically, the introductory chapter includes a comprehensive analysis of potential immunolabels, which are appealing for cathodoluminescence-based functional microscopy studies. Following a detailed discussion of the potential advantages and disadvantages of cathodoluminescence bioimaging compared to elemental mapping using energy dispersive x-ray spectroscopy and electron energy loss spectroscopy, current shortcomings and future opportunities, including the prospects of volumetric multi-colour single molecule labelling, conclude the first chapter.

Chapter 2 reports on CCLEM bioimaging on resin-embedded mammalian cells containing inorganic nanocrystals. It illustrates how 20 nm $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ nanoparticles endocytosed by human

lung cells (A549) can be imaged using CCLEM. This chapter demonstrates multimodal imaging by acquiring secondary electron (SE), backscattering electron (BSE) and CL signals from chemically fixed, epoxy resin embedded mammalian cells with fully preserved ultrastructure. While the chemical fixation and resin embedding had little influence on the cathodoluminescence emission from the nanocrystals, a slight decrease in emission intensity was observed over time without critically affecting the data quality. The samples were imaged in both scanning transmission electron microscope as well as focused ion beam scanning electron microscopy (FIB/SEM) configuration. In contrast to the STEM images where excellent co-localization of the CL and the EM signal was found, a slight misalignment attributed to charging was observed in the images recorded from FIB sectioned bulk samples. Nonetheless, this first illustration of CL in FIB cut biological samples sets groundwork for future studies exploring the three-dimensional imaging biological samples using CL protein labels.

Following up on the previous observation of a time-dependent decrease in the CL emission signal, chapter 3 systematically investigates the performance of potential CL labels under suitable imaging conditions. The CL imaging parameters were optimized based on Monte Carlo simulations on epoxy resin-embedded osmium stained cells as well as experimental data. The optimized electron beam parameters reduced previously observed misalignment between BSE and CL signals to minimum. The CL emission stability of fluorophores traditionally used in bioimaging, including organic dyes (e.g. DAPI), organic and semiconductor quantum dots (QDs), and two types of rare-earth (RE) ion doped nanocrystals was studied using imaging parameters suitable for CCLEM bioimaging. The two investigated rare-earth element doped nanocrystals show superior performance compared to conventional imaging probes and semi-conductor quantum dots in terms of emission brightness and stability. The presented $\text{YVO}_4:\text{Bi}^{3+},\text{Eu}^{3+}$ probe shows remarkably bright emission in CCLEM and can be imaged also in conventional fluorescence microscopes, hence overcoming one of the major shortcoming of rare-earth element-based nanocrystals, which typically require excitation in the deep-UV. Notably, CL mapping also provides a powerful high-resolution method to distinguish nanoparticle labels from endogenous dense granules, which otherwise cannot readily be differentiated because of their near-identical morphology and electron density. This work rationalizes the CCLEM label design and imaging parameter selection and paves the way for future studies investigating CL-based molecular labelling, provided that adequate surface functionalization protocols become available.

Chapter 4 reports the development of CCLEM-based immunolabels for specific receptor labelling using rare-earth element doped nanocrystals. This chapter presents light-emitting protein labels for electron microscopy, and illustrates the distinction of labels based on their emission spectrum rather than size or composition (as opposed to traditional EM immunolabels, such as immunogold). Monodisperse Tb^{3+} doped YPO_4 nanoparticles were synthesized using a

microwave-assisted hydrothermal reaction. While the crystallinity was relatively poor, the emission from the nanoparticles was sufficient to identify single nanoparticles. The nanoparticles were subsequently functionalized with silanes to introduce functional amino groups on the particle surface, which were then coupled to folic acid moieties. The functionalized nanoparticles were applied to specifically bind to folic acid receptors on mammalian cancer cells using a labelling protocol adapted from the immunogold field. In order to assess specificity, the labelling efficiency was compared to cells where the receptors were previously blocked with excess free folic acid or cells where the receptors were labelled using the well-established immunogold method (gold standard). This study demonstrates CCLEM-based immunolabelling using single nanoparticle emission and paves the way for future studies demonstrating (multi-)colour imaging also of intracellular targets enabled by label recognition based on their emission signatures.

The above chapters as well as the current literature show that the synthesis of highly crystalline, bright and colloidally stable rare-earth element doped nanoparticles is challenging. While traditional wet-chemistry based methods are an obvious choice, the limited crystallinity of as-prepared nanoparticles oftentimes requires annealing, which critically affects their re-dispersibility. Flame aerosol technology has been shown to allow the scalable synthesis of a diversity of nanomaterials, including rare-earth element doped nanoparticles with properties suitable for CCLEM. Especially the high reproducibility, scalability and high-temperature synthesis provide potential advantages over alternative synthesis routes. However, the nanoparticles are collected in dry state, which renders re-dispersion and functionalization challenging.

Chapter 5 investigates potential strategies to make flame spray particles available for immunolabelling applications by post-modification. As surface modification of nanoparticles is inevitable for bioimaging applications relying on high colloidal stability, functionalization with poly(ethylene glycol) chains (PEGylation) becomes the primary choice due to the hydrophilic nature of PEG chains, which enables high dispersibility in aqueous media due to achieved steric repulsion. This chapter demonstrates a straight-forward one-pot route to surface functionalization of flame-made Y_2O_3 nanoparticles, which significantly improves their colloidal stability and paves the way for facilitated biomedical use of flame-made oxide nanoparticles.

Taken together, this thesis presents key development of immunoCCLEM based on rare-earth element doped nanocrystals. ImmunoCCLEM capitalizes on the identification of molecular labelling probes based on optical signatures with nanometric resolution along with full imaging of the cellular ultrastructure. The present work sets the groundwork for multi-colour electron microscopy as a straightforward alternative to super-resolution microscopy.