

University of Groningen

Correlative microscopy reveals abnormalities in type 1 diabetes

de Boer, Pascal

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

de Boer, P. (2018). *Correlative microscopy reveals abnormalities in type 1 diabetes*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendix

Nederlandse samenvatting

Het toepassen van verschillende microscopische technieken is al vele jaren essentieel om de regulatie van het leven en ziektes te bestuderen. Constante ontwikkeling op het gebied van hardware, software, moleculaire targeting, enzovoorts, maakt het mogelijk om in toenemend mate meer moleculaire patronen te zien op hoge resolutie. Gecorreleerde licht (LM) en elektronenmicroscopie (EM; CLEM) maakt gebruik de sterke kanten van beide microscopische technieken om vervolgens elkaars zwaktes aan te vullen. Fluorescentie LM wordt gebruikt om moleculen specifiek en efficiënt aan te tonen, mogelijk in levende cellen, en kan kleur aanbrengen in grijze EM data. Vervolgens kan met EM op hoge resolutie context worden gegeven aan de data die zijn opgenomen met LM. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van recente ontwikkeling op het gebied van CLEM met betrekking tot sample voorbereiding, het opnemen en correleren van data, speciale probes en geeft toekomst perspectieven¹. Verder is er voor nieuwe gebruikers een handleiding met verschillende tips, inclusief een literatuuroverzicht met eerder toegepaste CLEM strategieën. Aangezien er meerdere manieren zijn om CLEM uit te voeren hangt de strategie voornamelijk af van het soort en grootte van het materiaal in combinatie met de specifieke vraagstelling. Verder hangt het er nog van af of pre- of post-inbedding kleuring van toepassing is, de mogelijkheid bestaat om genetisch gecodeerde labels te gebruiken, in hoeverre epitopen nog herkend kunnen worden en wat voor microscopen beschikbaar zijn. Er bestaan veel gespecialiseerde en dure apparaten zoals geïntegreerde microscopen, gespecialiseerde sample houders, 3D EM microscopen enzovoorts, waardoor het voor nieuwe gebruikers met een gecompliceerde vraagstelling wordt aangeraden om samen te werken met meer ervaren laboratoria. Echter, voor eenvoudigere vraagstellingen volstaat het vaak om gebruik te maken van een standaard confocaal microscoop en minder gecompliceerde elektronenmicroscopen die voor handen zijn op de meeste onderzoeksinstellingen, in combinatie met reguliere labeling strategieën en sample bereiding.

Lange tijd bestond er een leemte in de opnameafmetingen tussen LM en EM. Met de ontwikkeling van superresolutie fluorescentie microscopie benadert de LM schaal die van EM^{2,3}. Aan de andere kant worden de afmetingen van LM en EM dicht bij elkaar gebracht door recente ontwikkelingen in 3D- en grote oppervlakte 2D EM technieken^{4,5}. Klassieke transmissie EM (TEM) op ultradunne coupes op hoge resolutie is beperkt tot een beeld van slechts een paar micrometer, waardoor de complete cellulaire en weefsel context niet zichtbaar is. Door middel van scanning transmissie EM (STEM) op grote schaal kunnen complete weefsel doorsnedes worden opgenomen om vervolgens te analyseren op een 'google-earth'-achtige manier. Deze data worden publiekelijk toegankelijk na publicatie en de methode wordt nanotomie, oftewel nano-anatomie, genoemd^{6,7}. Echter, de grote hoeveelheid grijze data die met nanotomie opgenomen kunnen worden zijn moeilijk te analyseren. Het doel in dit proefschrift was om kleur te introduceren in deze datasets met behulp van affiniteit gebaseerde labels tegen endogene moleculen in (humaan) weefsel, wat niet mogelijk is met genetisch gecodeerde labels.

De identificatie van cellen en structuren kan worden bereikt door middel van post-inbedding immuunlabeling met behulp van quantum dots (QDs) zoals beschreven in **hoofdstuk 3**⁸. Ten opzichte van pre-inbedding immuunlabeling is het behoud van de ultrastructuur tijdens post-inbedding labeling superieur, aangezien voor pre-inbedding labeling de ultrastructuur sterk wordt aangetast door een benodigde permeabilisatie stap⁹. Bovendien hebben nanodeeltjes die zichtbaar

zijn met EM een lage penetratie diepte in intacte cellen en weefsel¹⁰. Echter, in de meeste gevallen is post-inbedding labeling, zoals uitgevoerd in hoofdstuk 3, niet succesvol omdat epitopen gemaskeerd kunnen worden door sterke fixatie en de inbeddingshars. Slechts ongeveer 10% van de geteste doelen konden succesvol worden gelabeld (data niet weergegeven). Het succes van post-inbedding labeling is waarschijnlijk deels afhankelijk van concentratie van de target moleculen, insuline en amylase worden bijvoorbeeld succesvol gelabeld en komen in hoge concentraties voor in hun respectievelijke secretoire granules. Aanpassingen aan de sample preparatie protocollen zou de labeling efficiëntie kunnen verhogen, zoals osmium-vrije inbedding, sterk etsen, of inbedden in een licht hydrofiele hars¹¹⁻¹³. Deze aanpassingen kunnen echter weer een negatief effect hebben op het behoud van de ultrastructuur. Daarom is het kiezen van een immuunEM methode vaak een balans tussen efficiëntie en structuur behoud. De gouden standaard voor immunoEM is de Tokuyasu methode door middel van ontgooien van cryocoupes¹⁴. Echter, een homogene cryofixatie, nodig voor Tokuyasu, is vaak niet mogelijk met relatief grote stukken weefsel.

Geïntegreerde licht microscopen in een EM, zoals de SECOM (Delmic, Delft, Nederland), zijn ontwikkeld voor hoge precisie CLEM correlatie en ter voorkoming van eventuele schade aan samples tijdens overdracht tussen de verschillende microscopen¹⁵. Een vereiste voor geïntegreerde CLEM is dat de samples zowel fluorescent als geschikt voor EM zijn. Fluorescentie wordt normaal gesproken uitgedoofd door osmium tijdens reguliere EM sample preparatie. Speciale protocollen zijn ontwikkeld om fluorescentie van fluorescente eiwitten te behouden in gekweekte cellen^{16,17}. Maar weefsel samples na post-inbedding immuunlabeling, zoals geoptimaliseerd is in hoofdstuk 3, met fluorescente markers kunnen ook gebruikt worden¹⁸.

Post-inbedding immuunlabeling met QDs geeft een tienvoud hogere labeling efficiëntie ten opzichte van het meer klassieke immunogoud (**hoofdstuk 3**)⁸. Mogelijk komt dit door een sterkere sterische hinder van de goud deeltjes¹⁹. Bovendien zijn QDs zowel fluorescent als elektronen dicht, waardoor ze zeer geschikt zijn voor CLEM toepassingen (hoofdstuk 2, figuur 2a)¹. Het contrast van QDs is minder vergeleken met immunogoud waardoor QDs vaak gemaskeerd worden door het contrast van het weefsel als het met zware metalen gekleurd is. Wanneer uranylacetaat en loodcitraat contrastering achterwege wordt gelaten worden QDs beter zichtbaar. Echter, voor goed contrast in TEM is uranyl en lood kleuring noodzakelijk. Met STEM, aan de andere kant, is het contrast van de opnames voldoende als deze zware metalen niet worden toegepast en is het dus mogelijk om QDs goed zichtbaar te maken ten opzichte van de ultrastructuur.

De beschikbaarheid van speciale CLEM probes zoals QDs is redelijk zeldzaam aangezien de meeste microscopische probes ofwel fluorescent ofwel elektronendicht, of de deeltjes zijn te groot voor precieze lokalisatie. De noodzaak voor elektronen dichtheid kan omzeild worden door fotonen emissie vanaf specifieke probes te induceren door middel van elektronen bundel aanstraling, genaamd cathodoluminescentie (CL). Die fotonen kunnen dan gedecteerd worden met de SECOM. Vervolgens kan de lokalisatie waar de fotonen afkomstig zijn op nanometer precisie bepaald worden. Fluorescente nanodiamantjes (FNDs) hebben CL mogelijkheden. In **hoofdstuk 4a** werden FNDs, ter grootte van 40 tot 70 nm, op hoge resolutie door middel van CL gelokaliseerd in ultradunne coupes na zowel fagocytose als immuunlabeling met streptavidine-geconjugeerde deeltjes²⁰. Tot dan toe werden de meeste CL experimenten voor biologische toepassing uitgevoerd met grote deeltjes van 100 tot 150 nm en gelimiteerd tot cel-opname analyses^{21,22}. Alhoewel FNDs potentie hebben als CLEM probe zijn ze met een grootte van 40 tot 70 nm nog aan de grote kant, bijvoorbeeld vergeleken met QDs van 10 tot 15 nm, en zijn ze erg polydispers. Bovendien is de labeling efficiëntie met streptavidine-geconjugeerde FNDs laag ten opzichte van QDs. Deze eerste resultaten maken echter de weg vrij voor verdere optimalisatie van FNDs voor verdere CLEM toepassingen.

In **hoofdstuk 4b** werd een andere manier beschreven om kleur te introduceren met behulp van de primaire elektronen bundel, genaamd *electron dispersive X-ray spectroscopy* (EDX)²³. Als een elektronen bundel interacties aan gaat met een sample kunnen de elektronen die in een binnenschil van de aanwezige atomen verkeren worden uitgestoten wat resulteert in een elektronen leemte. Vervolgens vult een elektron vanuit een verder naar buiten liggende schil met een hogere energie deze leemte en het verschil in energie wordt vrijgelaten in de vorm van röntgenstraling, met een spectrum dat specifiek is voor elk element. Door een speciale EDX detector toe te voegen aan een SEM kan per pixel in een sample de verhouding aan elementen worden gekarakteriseerd en worden geconverteerd naar kleuren plaatjes met EM resolutie ('kleurenEM'). De toepassing van EDX in levenswetenschappen is gelimiteerd omdat EDX detectoren veelal niet gevoelig genoeg zijn om elementen te onderscheiden en te karakteriseren in biologisch materiaal, dat voornamelijk uit koolstof bestaat. Door gebruik te maken van een sterk gevoelige *silicon drift detector* (SDD)²⁴ met *high current* op een hoge resolutie SEM is het nu mogelijk om subcellulaire variaties in elementaire samenstelling op de nanometer schaal in ultradunne coupes van biologische materiaal te bepalen. Nanodeeltjes met een verschillende elementen samenstelling, immunogoud alsook cadmium bevattende QDs, konden worden onderscheiden na post-inbedding immuunlabeling. Verder konden subcellulaire structuren worden herkend door middel van lokale verrijking van endogene elementen zoals zwavel in insuline granules, aangezien insuline peptiden een relatief hoog gehalte aan cysteïnes hebben. Bovendien konden verschillende celtypes in de eilandjes van Langerhans van een rat worden gediscrimineerd op basis van verrijking van hoge gehalten aan specifieke elementen in de secretoire granules. KleurenEM werd gepioneerd in eilandjes van Langerhans van een diabetisch gevoelige *BioBreeding* (BB) rat, wat een model is voor type 1 diabetes (T1D), met nog een normaal bloed glucose gehalte. Onverwacht werden door een combinatie van kleurenEM en post-inbedding immuunlabeling endocriene cellen aan de rand van een eilandje geïdentificeerd die ook granules bevatten van exocriene pancreas cellen, samen met een aangetaste ultrastructuur. Deze intermediaire cellen werden enkel geobserveerd in eilandjes van diabetisch gevoelige- en niet in controle diabetisch resistente ratten (ongepubliceerde data), wat kan wijzen op een schadelijke interactie tussen exocriene en endocriene cellen aan het begin van diabetes in BB ratten.

De mechanismen die aanleiding geven tot de auto-immuun destructie van insuline producerende bètacellen in de eilandjes van Langerhans resulterend in T1D worden nog slecht begrepen waardoor alternatieven voor insuline therapie uitgesloten worden. Kennis van cellulaire compositie en de micro-omgeving van zowel T1D-onderhevige als controle niet-diabetische eilandjes is essentieel voor het begrijpen van de etiologie van T1D. Nanotomie is gepioneerd in het BB rat model met als doel om T1D pathologie op nanometer schaal gedurende verschillende stadia van de ziekte onbevooroordeeld te onderzoeken⁵. Alhoewel verschillende diermodellen voor T1D inzichten hebben verschaft die van onschatbare waarde zijn met betrekking tot auto-immuun gemedieerde bètacel dood, zijn er belangrijke discrepanties tussen de diermodellen en humane T1D pathogenese^{25, 26}. Derhalve is een online nanotomie database gecreëerd met humaan T1D pancreas weefsel afkomstig van het *network of pancreatic organ donors* (nPOD), zoals beschreven in **hoofdstuk 5a**. De database, met de data gekoppeld aan specifieke donor nummers, wordt openbaar gemaakt na publicatie. Hoewel door een beperkt aantal eilandjes per donor de database minder geschikt is voor kwantitatieve analyse, kan een meer kwalitatieve inspectie naar specifieke subcellulaire veranderingen van grote toegevoegde waarde zijn voor andere analyses uitgevoerd door andere nPOD onderzoekers op pancreas weefsel van de zelfde donor.

T1D wordt gezien als een auto-immuun ziekte aangedreven door T cellen²⁷. Na een eerste analyse van de nPOD nanotomie database werden onverwachte immuuncellen geobserveerd, inclusief een bepaald mast cel subtype specifiek in T1D donor weefsel. Verder werden in combinatie met EDX

analyse endocriene en exocriene intermediaire cellen geïdentificeerd in eilandjes van twee van de acht T1D donoren en niet in de niet-diabetische donoren. Aangezien intermediaire cellen werden geobserveerd in zowel vroegtijdige humane T1D donoren als 'pre-diabetische' ratten, stellen wij als hypothese dat exocriene cel schade bètacel stress in gang zet bij de aanvang van T1D. Dit gaat hand in hand met het huidige idee dat naast de eilandjes van Langerhans ook de exocriene pancreas is aangetast tijdens T1D²⁸. Terwijl de pancreas maar voor een paar procent bestaat uit eilandjes hebben T1D patiënten een significant verkleinde pancreas^{29, 30}. Daarnaast wordt in patiënten ook een inadequate exocriene werking gerapporteerd³¹. Bovendien werd in auto-antilichaam positieve nPOD donoren zonder T1D al een verlaagd pancreas gewicht geobserveerd, wat een indicatie geeft dat verandering van de exocriene pancreas al gaande zijn voor verandering aan de eilandjes zoals te zien is in T1D³². In **hoofdstuk 5** werd een functionele vervolgstudie beschreven, aanvullend aan de tot dusver statische EM data. Hierin werd een pro-inflammatoire respons van bètacellen na stimulatie door beschadigde exocriene cellen gesuggereerd. Insuline producerende cel lijnen hadden een verhoogde *C-X-C motif chemokine ligand 10* (CXCL10) mRNA expressie na stimulatie door exocriene cel lijn lysaten vergeleken met een negatieve controle en bètacel lysaten behandeling. CXCL10 is een potente chemoattractant voor T cellen³³ en de expressie is sterk geassocieerd met vroegtijdige T1D³⁴. Bovendien werden bètacellen geïdentificeerd als een mogelijke bron voor CXCL10 tijdens T1D^{35, 36}. In vervolg proeven zullen meerdere genen die rol spelen bij bètacel stress worden onderzocht.

Samenvattend geeft dit proefschrift ten eerste een overzicht van recente CLEM ontwikkelingen inclusief een praktische handleiding. Daarnaast werd een efficiënte labeling op EM materiaal geoptimaliseerd in combinatie met verbeterde detectie methodes, wat vervolgens tot nieuwe inzichten in de T1D pathogenese heeft geleid.

References

1. de Boer, P., Hoogenboom, J. P. & Giepmans, B. N. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! *Nat. Methods* **12**, 503-513 (2015).
2. Deschout, H. *et al.* Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **11**, 253-266 (2014).
3. Schermelleh, L., Heintzmann, R. & Leonhardt, H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **190**, 165-175 (2010).
4. Peddie, C. J. & Collinson, L. M. Exploring the third dimension: volume electron microscopy comes of age. *Micron* **61**, 9-19 (2014).
5. Ravelli, R. B. *et al.* Destruction of tissue, cells and organelles in type 1 diabetic rats presented at macromolecular resolution. *Sci. Rep.* **3**, 1804 (2013).
6. Sokol, E. *et al.* Large-Scale Electron Microscopy Maps of Patient Skin and Mucosa Provide Insight into Pathogenesis of Blistering Diseases. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1763-1770 (2015).
7. Kuipers, J., Kalicharan, R. D., Wolters, A. H., van Ham, T. J. & Giepmans, B. N. Large-scale Scanning Transmission Electron Microscopy (Nanotomy) of Healthy and Injured Zebrafish Brain. *J. Vis. Exp.* **(111)**. doi, 10.3791/53635 (2016).
8. Kuipers, J., de Boer, P. & Giepmans, B. N. Scanning EM of non-heavy metal stained biosamples: Large-field of view, high contrast and highly efficient immunolabeling. *Exp. Cell Res.* **337**, 202-207 (2015).
9. Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. A. & Giepmans, B. N. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat. Methods* **9**, 152-158 (2012).
10. Giepmans, B. N., Deerinck, T. J., Smarr, B. L., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. *Nat Methods* **2**, 743-9 (2005).
11. Killingsworth, M. C., Lai, K., Wu, X., Yong, J. L. & Lee, C. S. Quantum dot immunocytochemical localization of somatostatin in somatostatinoma by Widefield Epifluorescence, super-resolution light, and immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 832-843 (2012).
12. Heinrich, U., Maurer, J., Koesling, D., Mann, W. & Forstermann, U. Immuno-electron microscopic localization of the alpha(1) and beta(1)-subunits of soluble guanylyl cyclase in the guinea pig organ of corti. *Brain Res.* **885**, 6-13 (2000).
13. Phend, K. D., Rustioni, A. & Weinberg, R. J. An osmium-free method of epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 283-292 (1995).
14. van Rijnsoever, C., Oorschot, V. & Klumperman, J. Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nat. Methods* **5**, 973-980 (2008).
15. Liv, N. *et al.* Simultaneous Correlative Scanning Electron and High-NA Fluorescence Microscopy. *PLoS One* **8**, e55707 (2013).
16. Peddie, C. J. *et al.* Correlative and integrated light and electron microscopy of in-resin GFP fluorescence, used to localise diacylglycerol in mammalian cells. *Ultramicroscopy* **143**, 3-14 (2014).
17. Watanabe, S. *et al.* Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat. Methods* **8**, 80-84 (2011).
18. Haring, M. T. *et al.* Automated sub-5 nm image registration in integrated correlative fluorescence and electron microscopy using cathodoluminescence pointers. *Sci. Rep.* **7**, 43621 (2017).
19. Van Elsland, D. M. *et al.* Correlative light and electron microscopy reveals discrepancy between gold and fluorescence labelling. *J. Microsc.* **267**, 309-317 (2017).
20. Hemelaar, S. R. *et al.* Nanodiamonds as multi-purpose labels for microscopy. *Sci. Rep.* **7**, 720-017-00797-2 (2017).
21. Fukushima, S. *et al.* Correlative near-infrared light and cathodoluminescence microscopy using Y2O3:Ln, Yb (Ln = Tm, Er) nanophosphors for multiscale, multicolour bioimaging. *Sci. Rep.* **6**, 25950 (2016).

Appendix

22. Nagarajan, S. *et al.* Simultaneous cathodoluminescence and electron microscopy cytometry of cellular vesicles labeled with fluorescent nanodiamonds. *Nanoscale* **8**, 11588-11594 (2016).
23. Scotuzzi, M. *et al.* Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Sci. Rep.* **7**, 45970 (2017).
24. Falke, M. *et al.* Element Analysis by EDX for Life Science: Light Elements and Bio-Mineralization. *Microscopy and Microanalysis* **19**, 222-223 (2013).
25. Roep, B. O., Atkinson, M. & von Herrath, M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 989-997 (2004).
26. In't Veld, P. Insulitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models. *Semin. Immunopathol.* **36**, 569-579 (2014).
27. Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. & Michels, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet* **383**, 69-82 (2014).
28. Campbell-Thompson, M., Rodriguez-Calvo, T. & Battaglia, M. Abnormalities of the Exocrine Pancreas in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab Rep.* **15**, 79-015-0653-y (2015).
29. Campbell-Thompson, M. L. *et al.* The influence of type 1 diabetes on pancreatic weight. *Diabetologia* **59**, 217-221 (2016).
30. Virostko, J., Hilmes, M., Eitel, K., Moore, D. J. & Powers, A. C. Use of the Electronic Medical Record to Assess Pancreas Size in Type 1 Diabetes. *PLoS One* **11**, e0158825 (2016).
31. Li, X. *et al.* Serum Trypsinogen Levels in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **40**, 577-582 (2017).
32. Campbell-Thompson, M., Wasserfall, C., Montgomery, E. L., Atkinson, M. A. & Kaddis, J. S. Pancreas organ weight in individuals with disease-associated autoantibodies at risk for type 1 diabetes. *JAMA* **308**, 2337-2339 (2012).
33. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 207-215 (2011).
34. Antonelli, A. *et al.* Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **13**, 272-280 (2014).
35. Frigerio, S. *et al.* Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulitis. *Nat. Med.* **8**, 1414-1420 (2002).
36. Uno, S. *et al.* Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocr. J.* **57**, 991-996 (2010).

Dankwoord

Het bedrijven van wetenschap is typisch iets wat niet gedaan wordt door een enkel individu. Wetenschappelijke vooruitgang wordt voornamelijk geboekt door middel van samenwerking tussen mensen in een groepsverband waarin elk individu een schakel vormt van essentieel belang. Daarom wil ik iedereen bedanken die heeft bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift.

Allereerst wil ik mijn groepsgenoten van het Giepmans lab binnen de afdeling celbiologie van het UMCG bedanken. Van **Jeroen Kuipers** kon ik alle kennis en fijne kneepjes van de wondere wereld van de elektronenmicroscopie leren. Daarnaast vond ik het erg fijn om samen te werken aan het beruchte 'Kuipers & de Boer 2015' paper. Ook wil ik mijn overige kantoorgenoten, **Anouk Wolters**, **Marit de Beer** en **Nicole Pirozzi** bedanken voor onze samenwerking en het tot stand komen van een zeer prettige werkomgeving. Onder andere hierdoor ga ik elke dag met veel plezier naar het lab en het heeft absoluut bijgedragen aan mijn beslissing om nog een aantal jaar te blijven plakken voor een postdoctoraal project. Jeroen en Anouk ook bedankt dat jullie mijn paranimfen willen zijn. Naast elektronenmicroscopie is ook fluorescente lichtmicroscopie belangrijk geweest voor dit proefschrift. Daarom wil ik **Klaas Sjollema** bedanken voor het leren te bedienen van de geavanceerde microscopen binnen ons imaging centrum. **Peter Duinkerken** wil ik bedanken voor zijn bijdrage aan het diabetes project. Ik kan niet ontkennen dat dit project tijdens jouw stage een enorme boost heeft gekregen. Het is dan ook prettig samenwerken nu je onze groep als collega bent komen versterken. Veel succes volgend jaar met je Master! Ook wil ik alle studenten bedanken die zich hebben ingezet voor de verschillende projecten binnen mijn promotietraject.

Mijn grote dank gaat ook zeker uit naar **Ben Giepmans** voor de kans die ik heb gekregen om aan dit project te werken en de manier waarop je mijn mentor was gedurende mijn promotietraject. Het was erg fijn om een zekere vrijheid te hebben binnen het project om mijn eigen keuzes te maken en daardoor mijn eigen richting kon kiezen. Daarnaast bleef je me ook altijd uitdagen door kritisch te zijn en door mezelf te leren kritisch te reflecteren. Naast een uitstekende mentor, heb ik jou ook altijd als mijn inspiratiebron gezien voor hoe ik, in mijn ogen, goede wetenschap kon bedrijven.

Naast onze eigen groep wil ik ook mijn dank betuigen aan **Jacob Hoogenboom** en zijn groep aan de TU Delft. Door de jaren heen, gedurende mijn promotietraject, heb ik deze interdisciplinaire en tevens vruchtbare samenwerking tussen onze beide groepen steeds meer zien groeien. Ik kijk dan ook uit naar mijn postdoctoraal project, waarin de samenwerking tussen onze groepen centraal komt te staan en de celbiologie en technische ontwikkelingen op het gebied van geavanceerde microscopie nog dichter bij elkaar komen.

Het leven bestaat niet alleen uit werken, daarom wil ik mijn familie en vrienden bedanken voor alle steun en vertrouwen in mijn project en voor de nodige ontspanning naast mijn werk. Mijn ouders wil ik bedanken voor de mogelijkheden, ondersteuning, vertrouwen en aanmoediging van mijn studie en werk. Hetzelfde geldt voor mijn broer **Jeroen** en zusje **Joyce**. Ook ben ik blij met mijn schoonfamilie die ik lief heb als ware het mijn directe familie.

Allerlaatst wil ik mijn vriendin en aanstaande vrouw **Danielle** bedanken voor haar steun, aanmoediging en liefde. Ik ben heel blij dat jij in mijn leven bent gekomen en dat ik in jou mijn zielsverwant heb gevonden. Ook heb ik door jou het mooie Makkum leren kennen waar ik naast het werken aan mijn project momenten van rust kon vinden.

Pascal de Boer

About the author

Pascal de Boer was born on the 28th of December 1988 Leeuwarden, The Netherlands. After completing secondary school in 2007 (VWO at Piter Jelles Montessori, Leeuwarden) he went for his Bachelor in biology at the University of Groningen with a major in biomedical sciences and a minor in behavior and neurosciences. Subsequently, from 2011 until 2013, Pascal followed the biomedical sciences Master at the University of Groningen. During his Master's, Pascal worked on two research projects. First at the department of cell biology at the University Medical Center Groningen, he joined the group of Dr. Wia Baron under the supervision of Dr. Eric Sikkema, where he worked on a project elucidating differences in brain white- and grey matter derived astrocytes in the context of remyelination during multiple sclerosis. His final project was performed at the department of experimental hematology at the University Medical Center Groningen in the group of Prof. Dr. J.J. Schuringa under the supervision of Dr. Hein Schepers, where he investigated the role of a transcriptional co-activator, CITED2, in context of chronic myeloid leukemia.

In February 2014 Pascal started his Ph.D. project at the department of cell biology of the University Medical Center Groningen in the group of Dr. Ben N. G. Giepmans. The Ph.D. project was part of a larger project called Microscopy Valley, funded by NWO *Stichting Techniek en Wetenschap* (STW). Within this project Pascal aimed to develop novel probes and labeling approaches for correlated light and electron microscopy with a subsequent implementation in type 1 diabetes research as described in this thesis. After completion of the Ph.D. project in February 2018, Pascal stayed in the Giepmans lab within the department of cell biology at the University Medical Center Groningen to start with a postdoctoral project. The new project aims to develop probes, with a focus on fluorescent proteins, for electron-beam induced super resolution fluorescence microscopy, with implementation in type 1 diabetes research. This project will be in close collaboration with the lab of Dr. Jacob P. Hoogenboom of the Technical University Delft.

List of publications

Garming MWH., Weppelman IGC., **de Boer P**, Martínez FP, Schirhagl R, Hoogenboom JP, Moerland RJ, Nanoparticle discrimination based on wavelength and lifetime-multiplexed cathodoluminescence microscopy. *Nanoscale* **9**, 12727-12734 (2017)

de Boer P[#] / Hemelaar SR[#], Chipaux M, Zuidema W, Hamoh T, Martínez FP, Nagl A, Hoogenboom JP, Giepmans BNG, Schirhagl R, Nanodiamonds as multi-purpose labels for microscopy. *Scientific Reports* **7**, 720-017-00797-2 (2017) - # equal authorship

Scotuzzi M[#] / Kuipers J[#] / Wensveen D[#], **de Boer P**, Hagen CW, Hoogenboom JP[#] / Giepmans BNG[#], Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Scientific Reports* **7**;7:45970. doi: 10.1038/srep45970 (2017) - # equal authorship

de Boer P[#] / Kuipers J[#], Giepmans BNG, Scanning EM of non-heavy metal stained biopsamples: Large-field of view, high contrast and highly efficient immunolabeling. *Experimental Cell Research* **337**(2): 202-207 (2015) - # equal authorship

de Boer P, Hoogenboom JP, Giepmans BNG, Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! *Nature Methods* **22**(6): 503-513 (2015)

