

University of Groningen

## Intracellular molecular diffusion probed with nonlinear optical microscopy

Potma, Eric Olaf

**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:*

2001

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

*Citation for published version (APA):*

Potma, E. O. (2001). *Intracellular molecular diffusion probed with nonlinear optical microscopy*. s.n.

### 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.

**Intracellular Molecular Diffusion  
Probed with  
Nonlinear Optical Microscopy**

**Printed by**

PrintPartners Ipskamp, Enschede

**Back cover**

“Antonie van Leeuwenhoek unmasked”, painting by the author



RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN

**Intracellular Molecular Diffusion  
Probed with  
Nonlinear Optical Microscopy**

**PROEFSCHRIFT**

ter verkrijging van het doctoraat in de  
Wiskunde en Natuurwetenschappen  
aan de Rijksuniversiteit Groningen  
op gezag van de  
Rector Magnificus, dr. D. F. J. Bosscher,  
in het openbaar te verdedigen  
op vrijdag 19 oktober 2001  
om 14.15 uur

door

**Eric Olaf Potma**

geboren op 7 februari 1974  
te Sneek

Promotor: Prof. dr. D. A. Wiersma  
Referent: Dr. W. P. de Boeij

Beoordelingscommissie:  
Prof. dr. K. Duppen  
Prof. dr. P. J. M. van Haastert  
Prof. dr. H. J. C. Berendsen

## Dankwoord

Een proefschrift is de kroon op het werk van de promovendus. Maar voordat deze persoon zichzelf al te hard op de borst slaat is het goed om stil te staan bij al die mensen die een onmisbare rol hebben gespeeld gedurende de vier jaar waarin het promotieonderzoek heeft plaatsgevonden. Op deze plaats wil ik een aantal van hen expliciet bedanken.

Mijn promotor, Douwe Wiersma, stond aan de basis van dit onderzoek. Ondanks zijn functie als decaan is hij toch in staat gebleken de bijzondere condities te creëren voor het opzetten van een geheel nieuwe onderzoeksrichting. De vrijheid van experimenteren en het vertrouwen dat Douwe in mij stelde hebben zich direct vertaald in het welslagen van het project.

Erg veel dank ben ik verschuldigd aan Wim de Boeij, die voor het grootste deel van het onderzoek mijn dagelijks begeleider was. Zonder zijn grondige kennis, slimme ideeën en handige handjes zou dit proefschrift aanzienlijk minder pagina's tellen. Eigenlijk zou de naam van Wim ook op de voorkant van dit werk moeten staan want zijn inbreng is van onschatbare waarde geweest.

Als leek op het gebied van de biochemie heb ik veel gehad aan de discussies met Peter van Haastert. Met een scherpe blik en met gevoel voor detail heeft Peter menigmaal richting aan het onderzoek gegeven. Voorts is de input die hij gaf bepalend geweest voor de studies die zijn beschreven in het laatste hoofdstuk van dit proefschrift.

In het laatste stadium van het onderzoek kwam Maxim Pshenichnikov regelmatig poolshoogte nemen. Maxim wist met groot enthousiasme zijn omvangrijke wetenschappelijke kennis op mij over te brengen, iets dat mijn plezier in het werk sterk heeft vergroot. Ook wil ik hem bedanken voor zijn bruikbare op- en aanmerkingen na het doorlezen van het manuscript.

Een belangrijk onderdeel van het AIO-schap is het geven van onderwijs. Als werkcollegedocent van het college atoomstructuur en chemische binding heb ik erg prettig samengewerkt met Koos Duppen, Kees Lazonder en Ben Hesp. Koos verdient bovendien een extra pluim voor het kritisch en zorgvuldig lezen van dit proefschrift.

Nicoletta Kahya is jarenlang mijn collega geweest in het microscopielaboratorium. Dankzij haar geduld en interesse hebben onze overlappende belangen met betrekking tot de meetapparatuur nooit tot problemen geleid.

Iemand die veel lof verdient is Foppe de Haan. Deze 'wizard' van het ultrafast laboratory heeft geruisloos en snel alle computerklussen die zich voordeden tijdens dit onderzoek vakkundig geklaard.

Als student heeft Steven Hoekstra een belangrijke bijdrage geleverd met het construeren van de apparatuur voor levensduurgevoelige fluorescentie microscopie.

Jeroen Roelofs en Leonard Bosgraaf hebben veel tijd besteed aan het transformeren en opkweken van de cellen die zijn bestudeerd in dit onderzoek. Marten Postma kwam regelmatig op de proppen met goede ideeën en slimme antwoorden op moeilijke vragen.

Naast Peter van Haastert en Koos Duppen heeft ook Herman Berendsen, als lid van de leescommissie, het manuscript doorgenomen en bruikbare suggesties van de hand gedaan.

Het voltooien van een vier jaar durend project zou een onaangename onderneming zijn als je niet werd omgeven door goede collega's. Gelukkig heb ik niets te klagen

gehad want de vele collega-promovendi en medewerkers op de werkvloer stonden allen borg voor een prima sfeer. Een dikke duim voor Frank, Michel, Daan, Thomas, Mirjam, Alessandro, Stephania, Harald, Yoram, Zhiyi, Andreas, Andrius, Audrius, Sergei, Ralph, Nicole, Dorien en Sybrand.

Tenslotte bedank ik Hanneke. Mijn vocabulaire schiet schromelijk te kort om aan te kunnen geven wat haar liefde voor mij heeft betekend. Door haar ben ik weer in sprookjes gaan geloven, wat het einde van het verhaal ook moge zijn.

Eric

Groningen, september 2001

# Contents

## Chapter 1

<i>Introduction</i>	1
1.1 Diffusion of molecules in cells	2
1.2 The intracellular environment: a complex space for molecular diffusion	3
1.3 Cell liquid versus mechanical obstructions	5
1.4 Probing with a microscopic eye	7
1.5 Fluorescence microscopy: benefits and shortcomings	9
1.6 Nonlinear optics: a novel look on the microscopic world	10
1.7 Outline of this thesis	12
References	14

## Chapter 2

<i>Cavity-dumped optical parametric oscillator</i>	19
2.1 Introduction	21
2.2 Visible optical parametric light generation	22
2.2.1 Principles of optical parametric amplification	22
2.2.2 Noncollinear parametric generation in $\beta$ -barium borate	24
2.2.3 BBO-based visible optical parametric oscillator	26
2.3 Cavity-dumped OPO	
2.3.1 Cavity dumping of the parametric oscillator	29
2.3.2 Dispersion and pulse duration	33
2.4 The OPO as a multicolor lightsource	36
2.5 Conclusions	38
References	41

## Chapter 3

<i>Spatial and temporal resolution in optical microscopy</i>	45
3.1 Introduction	46
3.2 Optical microscopy using high NA objectives	47
3.2.1 Focusing of light with high NA objectives	47
3.2.2 Image formation in the laser-scanning microscope	51
3.3 Characterization of focal volumes using spatial autoconvolution	52
3.3.1 Introduction	52
3.3.2 Theoretical considerations	53
3.3.3 Experimental section	56
3.3.4 Results	57
3.3.5 Merits of the autoconvolution method	61
3.4 Nonlinear fluorescence microscopy under ultrashort Pulse illumination	62
3.4.1 Multiphoton excited fluorescence	62
3.4.2 Dispersion in imaging systems	63
3.4.3 Spatial resolution in the TPE microscope system	64



3.5	Fluorescence lifetime microscopy	68
	3.5.1 Imaging with lifetime contrast	68
	3.5.2 Instrumentation and performance	69
	3.5.3 Case study: Two-photon lifetime imaging of tryptophan in living cells	71
3.6	Summary	74
	References	75

## Chapter 4

	<i>Nonlinear coherent four-wave-mixing in optical microscopy</i>	81
4.1	Introduction	82
4.2	Theory of coherent signal accumulation under tight focusing conditions	83
	4.2.1 The optical wave equation	83
	4.2.2 The slowly varying envelope approximation	87
	4.2.3 Connection with experiment	88
4.3	Numerical simulations	89
	4.3.1 Computational details	89
	4.3.2 Phasematching in confined focal volumes	90
	4.3.3 Focal signal intensity	91
	4.3.4 Axial edge scan	93
	4.3.5 Effect of wavefront aberrations	96
	4.3.6 Validity of deconvolution procedures in nonlinear coherent imaging	97
4.4	Comparison with experiment	98
	4.4.1 Microscope instrument and experimental details	98
	4.4.2 Resolution in coherent nonlinear microscopy	101
	4.4.3 Nonlinear coherent imaging in highly scattering media	103
4.5	Conclusions	106
	References and Notes	107

## Chapter 5

	<i>Real-time visualization of intracellular hydrodynamics</i>	109
5.1	Introduction	110
5.2	Experimental section	112
	5.2.1 Instrumental details	112
	5.2.2 Cell culturing and handling	114
5.3	Results and discussion	114
	5.3.1 Imaging of water in single cells	114
	5.3.2 Monitoring intracellular H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O exchange	116
	5.3.3 Intracellular water diffusion	117
	5.3.4 Membrane permeability	119
	5.3.5 Comparison with fluorescence methods	121
5.4	Concluding remarks	123
	Appendix I	125
	References	127

## **Chapter 6**

<i>Restricted dynamics of intracellular water at ultrashort timescales</i>	131
6.1 Introduction	132
6.2 Microscopic probing of water with OKE sensitivity	134
6.2.1 Optically heterodyne detected OKE microspectroscopy	134
6.2.2 Origin of the OKE water response	136
6.3 Experimental layout	138
6.3.1 Essentials of the OKE microscope	138
6.3.2 Microscope configuration	139
6.3.3 Setting of the excitation wavelength	140
6.3.4 Intracellular OKE microspectroscopy	142
6.3.5 Chemicals and materials	142
6.4 Results and discussion	142
6.4.1 Power dependence of the OKE microscopic signal	142
6.4.2 Resolution in the OKE microscope	143
6.4.3 Ultrafast motions of intracellular water	145
6.5 Summary and prospects	149
References	151

## **Chapter 7**

<i>Actin cytoskeleton as a molecular sieve</i>	155
7.1 Introduction	156
7.2 Theoretical background	158
7.2.1 Fluorescence recovery after photobleaching	158
7.2.2 Influence of focusing conditions	160
7.2.3 FRAP with confocal detection	162
7.2.4 Modeling of intracellular viscosity	164
7.3 Experimental	166
7.3.1 Set-up configuration	166
7.3.2 Fluorescence recovery after photobleaching experiments	167
7.3.3 Cell culturing and handling	168
7.4 Results and discussion	169
7.4.1 FRAP with confocal detection	169
7.4.2 Translational diffusion of GFP in vegetative Dictyostelium cells	170
7.4.3 GFP diffusion under different osmotic conditions	172
7.4.4 GFP translational diffusion in polarized cells	173
7.4.5 Filamentous actin constitutes a primary barrier for protein diffusion	176
7.4.6 Contribution of actin and non-actin barriers to reduced GFP diffusion	177
7.5 Conclusions	179
References	181

<b>Summary</b>	185
<b>Samenvatting</b>	189
<b>List of Abbreviations</b>	193
<b>List of Symbols</b>	194