

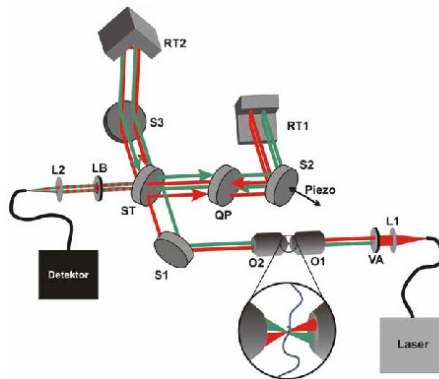


Michael Hilbert (Autor)

# Markierungsfreie Detektion von Nanopartikeln und Proteinen in wässriger Lösung

Michael Hilbert

## Markierungsfreie Detektion von Nanopartikeln und Proteinen in wässriger Lösung



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2107>

Copyright:  
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Signale, die von einzelnen Molekülen mit spektroskopischen Methoden detektiert werden können, weisen oft nur sehr geringe Intensitäten auf. Deshalb wird häufig eine Mittelung über ein ganzes Ensemble von Teilchen verwendet [1,2]. Vor allem in biologischen Systemen, die sich aufgrund von Mutationen oder kleinsten Abweichungen in der Sekundärstruktur unterscheiden können, ist die Zusammenfassung der Messergebnisse mehrerer individueller Proteine nicht möglich oder führt zumindest zu einem unvollständigen Bild des untersuchten Systems [3,4]. Aus diesem Grund sind einzelmolekülspektroskopische Methoden wie die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) heutzutage sehr beliebt und werden auf eine Vielzahl von biochemischen Fragestellungen angewandt [5]. Mittels der FCS ist es zum Beispiel möglich, die Diffusionszeit und damit, bei bekannter Viskosität der meist wässrigen Umgebung, die Größe einzelner Makromoleküle zu bestimmen. Bei einer gut charakterisierten Messanordnung lässt sich außerdem sehr leicht die makroskopische Konzentration der untersuchten Lösung herausfinden. Die gesammelten Daten aus einer solchen Messung lassen sich aber auch anderen statistischen Auswertungen unterwerfen, so können zum Beispiel mithilfe der Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilung (Fluorescence Intensity Distribution Analysis, FIDA) [6,7] sehr gut Aggregationsprozesse verfolgt werden.

Allerdings haben die fluoreszenzbasierten Verfahren einen entscheidenden Nachteil. Die wenigsten Moleküle bzw. Partikel sind in der Lage, von sich aus zu fluoreszieren, weshalb in der Regel eine aufwändige Markierungsprozedur

notwendig ist. Die Schwierigkeiten bei einem solchen Prozess beginnen bereits bei der meist chemischen Bindung der Fluoreszenzmarkierung (Label) an das zu untersuchende Objekt. Speziell bei komplexen Biomolekülen müssen Verknüpfungsreaktionen gefunden werden, die mit den enthaltenen funktionellen Gruppen verträglich sind. Eine beliebte Lösung dieses Problems ist die spezifische Markierung des Schwefels von Cystein in der Peptidsequenz des Proteins über eine Michael-Addition mit Maleimid [8, 9].

Tritt diese Aminosäure mehrfach auf, kommt es schnell zu einer Vielzahl von verschiedenen Produkten. Je nachdem, welche Problemstellung untersucht werden soll, muss darauf geachtet werden, dass jedes Molekül nur einfach markiert ist. In einigen Fällen ist es sogar notwendig, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff an einer genau definierten Stelle der Biomoleküle befindet. Nur so können zum Beispiel genaue dynamischen Vorgänge oder Distanzen in Biomolekülen mittels einer Förster-Resonanz-Energie-Transfer Analyse (FRET) untersucht werden [10, 11].

Neben diesen Problemen des gezielten Markierens ist der Einfluss des Farbstoffs auf die elektronischen und sterischen Eigenschaften des Moleküls nur schwer abzuschätzen. Bei hochspezifischen Wechselwirkungen, wie sie in vielen Proteinen oder enzymatisch katalysierten Reaktionen auftreten, können solche Einflüsse zu dramatischen Änderungen im Verhalten führen. Ein Beispiel dafür stellt die Glutathion-*S*-Transferase dar. Ihre biologische Aktivität schwankt in Abhängigkeit von der Position der Fluoreszenzmarkierung zwischen 92% und 14% im Vergleich zum unmarkierten Protein [12]. Bei der Beobachtung von Aggregationsvorgängen können die Farbstoffe eine noch drastischere Rolle spielen. Der Fluoreszenzmarker Cy2 besitzt unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung und verhindert damit vollständig die Multimerisierung von Prion-Proteinen [13, 14].

Die verschiedenen Probleme des Markierens sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die schwerwiegenden Nachteile der Fluoreszenzmarkierung durch die Verwendung eines tiefauslöschenden Interferometers umgangen, indem kleinste Veränderungen in der Kohärenz des Lichts, die ein Teilchen bei der Diffusion durch den Mikroskopfokus verursacht, detektiert werden [15].

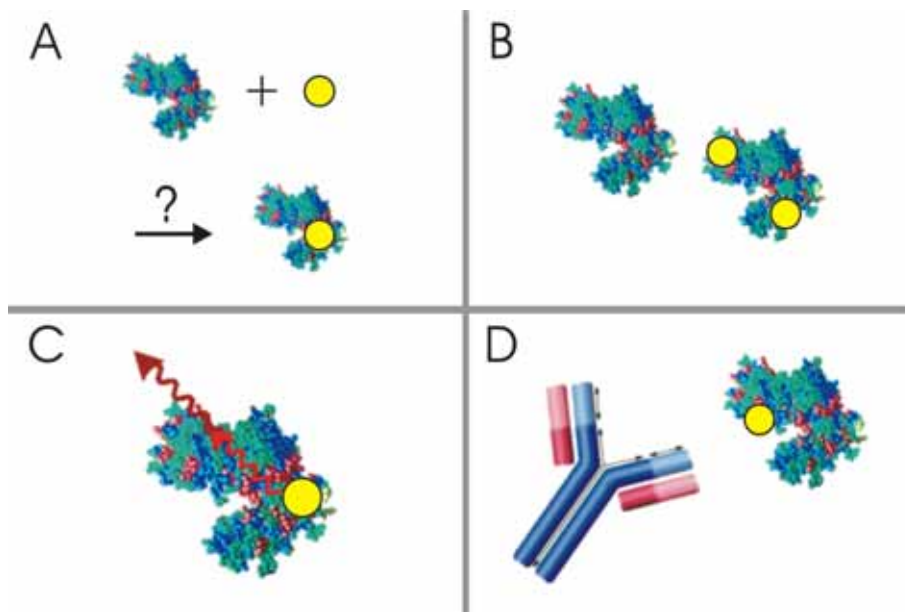


Abbildung 1.1: Nachteile der Markierung eines Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff (heller Kreis). A: Bei der Kupplung handelt es sich meistens um komplexe chemische Reaktionen, die erst optimiert werden müssen; B: Oft kommt es zu einer statistischen Verteilung der Marker über die Partikel; C: Die Umgebung des Farbstoffes kann zu intramolekularem Quenchen der Fluoreszenz führen; D: Markierungen, vor allem im aktiven Zentrum eines Proteins, können dessen Verhalten stark beeinflussen.

Bei der vorgestellten Messmethode handelt es sich um eine grundlegende Neuentwicklung. Daher steht an dieser Stelle die Beschreibung des experimentellen Aufbaus im Vordergrund. Die Besonderheiten des verwendeten modifizierten Twyman-Green-Interferometers werden dabei ebenso betrachtet wie einige vielversprechende Variationen des Aufbaus. Außerdem zeigen theoretische Betrachtungen das Potential des Verfahrens auf. Hierzu zählen die genauere Beschreibung des Detektionsvolumens, die Abschätzung der von der Partikelgröße abhängigen Signalintensität sowie die Berechnung des erwarteten Signal-zu-Rausch Verhältnisses.



# Kapitel 2

## Theoretische Grundlagen

### 2.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) [16–18] kann zur Bestimmung der Konzentration einer Lösung [19] und zur Ermittlung des hydrodynamischen Radius [20] eingesetzt werden. Hierzu wird die zeitabhängige Fluoreszenzintensität  $F(t)$  detektiert. Die Fluoreszenz wird dabei durch einen an das Zielmolekül gebundenen Farbstoff verursacht (siehe Abbildung 2.1). Initiiert wird dieser Prozess durch die Absorption eines Photons des Anregungsstrahls. Dabei wird der Farbstoff nach dem Franck-Condon-

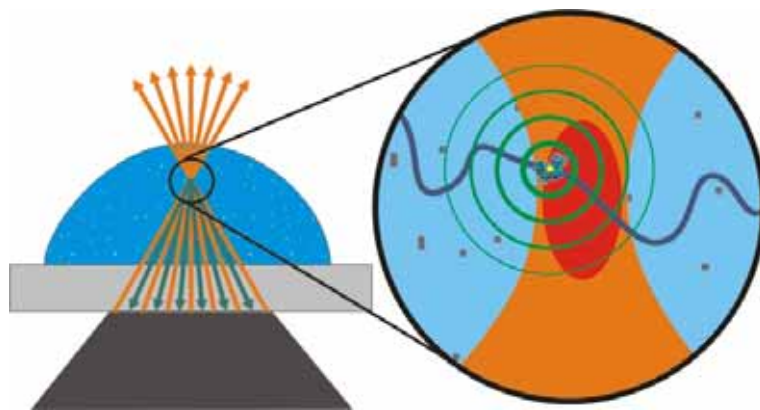


Abbildung 2.1: Fluoreszenz eines Partikels bei der Diffusion durch den Mikroskopfokus.

Prinzip in ein breites Spektrum von Schwingungszuständen im ersten elektronisch angeregten Zustand überführt [21]. Die anschließende Relaxation in den  $S_1$ -Schwingungsgrundzustand erfolgt sehr schnell durch Stöße mit den Lösungsmittelmolekülen der Umgebung. Die Farbstoffe sind so gewählt, dass ein Übergang in den elektronischen Grundzustand aufgrund der großen Energiedifferenz in der Regel nicht nach einem Stoßmechanismus erfolgen kann [22]. Stattdessen kommt es auf einer Nanosekundenzeitskala zu einem radiativen Übergang, der als Fluoreszenz bezeichnet wird. Abbildung 2.2 veranschaulicht diesen Prozess und verdeutlicht gleichzeitig die Verschiebung des Fluoreszenzspektrums im Vergleich zum Anregungsspektrum durch die oben erwähnte Stoßrelaxation [23].

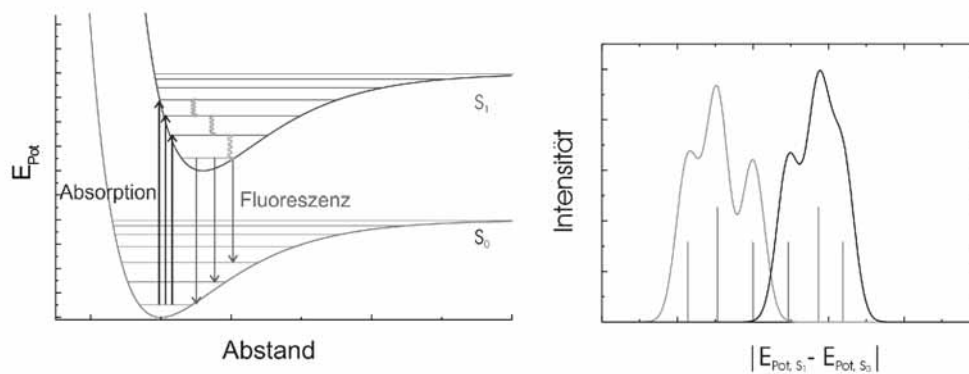


Abbildung 2.2: Rotverschiebung der Fluoreszenz (grau) nach Einphotonenanregung (schwarz). Gewellte Linien zeigen den strahlungslosen Prozess der Stoßrelaxation.

Die zeitliche Fluktuation der Emissionsintensität ergibt sich im idealisierten Fall (gleicher Absorptionsquerschnitt  $\sigma$  und gleiche Quantenausbeute  $q$  der Fluoreszenzfarbstoffe) ausschließlich aus der tatsächlichen Konzentration an Farbstoffmolekülen im Detektionsbereich. Diese lokale Konzentration kann für große Volumina mit der makroskopischen Konzentration gleichgesetzt werden. Wird jedoch nur ein mikroskopisch kleines Volumen betrachtet, schwankt die lokale Konzentration, da durch die Brownsche Molekularbewegung ständig Teilchen in das bzw. aus dem Beobachtungsvolumen diffundieren. Im Extremfall ist das Detektionsvolumen so klein, dass sich im

statistischen Mittel weniger als ein Teilchen darin aufhält, so dass die normierte Intensität zwischen null und eins schwankt. Um eine solche räumliche Auflösung zu erreichen, gibt es zwei Variationsmöglichkeiten. Einerseits ist es möglich, ein extrem kleines Untersuchungsvolumen zu schaffen, andererseits kann durch eine starke Verdünnung der zu untersuchenden Lösung die Teilchenzahl pro Volumenelement eingestellt werden. Da die Daten der FCS einer statistischen Auswertung unterzogen werden und dabei eine möglichst große Anzahl an Ereignissen benötigt wird, ist die Einschränkung des Detektionsvolumens sehr wichtig. Eine natürliche Grenze des Anregungsvolumens ist dabei nach E. Abbe durch einen beugungsbegrenzten Fokus gegeben. Die üblichen Anregungswellenlängen liegen im sichtbaren Bereich. So kann unter Verwendung eines Mikroskopobjektivs mit hoher numerischer Apertur ein Detektionsvolumen in der Größenordnung von einem Femtoliter erreicht werden [24]. Für eine optimale Statistik sollten bei dieser Technik durchschnittlich ein bis tausend Teilchen im fokalen Volumen vorliegen [25]. Dies entspricht einer makroskopischen Konzentration von wenigen Nanomol pro Liter.

### 2.1.1 Die Autokorrelationsfunktion [26]

Aus der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität  $F(t)$  lässt sich die Fluktuation des Emissionslichts  $\delta F(t)$  folgendermaßen berechnen

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle. \quad (2.1)$$

Dabei ist  $\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t_i) dt_i$  die zeitlich gemittelte Fluoreszenzintensität.

Über einen theoretischen Ansatz lässt sich  $\delta F(t)$  auch wie folgt aus den gerätespezifischen Kenngrößen  $W(r)$ ,  $\kappa$ ,  $\delta C(r, t)$ ,  $\delta q$ ,  $\delta \sigma$  ermitteln.

$$\delta F(t) = \kappa \int_V W(r) \delta(\sigma \cdot q \cdot C(r, t)) dV \quad (2.2)$$

Dabei sind:

$W(r)$  die Intensitätsverteilung des Anregungslichts im Detektionsbereich,

$\kappa$  die Detektionseffizienz,

$C(r, t)$  die lokale Konzentration,

$q$  die Quantenausbeute und

$\sigma$  der Absorptionsquerschnitt.



Die Intensitätsverteilung  $W(r)$  lässt sich durch eine dreidimensionale Gaußfunktion der Form

$$W(r) = e^{-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}}$$

annähern, wobei  $r_0$  und  $z_0$  die Radien in axialer (x, y) bzw. äquatorialer (z) Richtung sind, bei denen die Intensität  $1/e^2$  der maximalen Intensität entspricht. Unter der Annahme eines konstanten Absorptionsquerschnitts und einer konstanten Quantenausbeute über die Messzeit ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\delta F(t) = \kappa \int_V e^{-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} \cdot \delta(C(r, t)) dV \quad (2.3)$$

Mathematisch lässt sich die zeitliche Selbstähnlichkeit der Fluoreszenzfluktuationen durch die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  beschreiben.

$$G_{\text{FCS}}(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2.4)$$

Kombiniert man nun Gleichung 2.3 mit 2.4, ersetzt das effektive Anregungsvolumen durch  $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} \cdot r_0^2 \cdot z_0$  und definiert die Diffusionszeit  $\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$  mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$ , so ergibt sich folgende Lösung:

$$G_{\text{FCS}}(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (2.5)$$

Eine Anpassung der autokorrelierten Messdaten mit Gleichung 2.5 liefert die Parameter für die Diffusionszeit  $\tau_D$  sowie die makroskopische Konzentration  $\langle C \rangle$ . Dabei entspricht die Diffusionszeit dem Zeitpunkt des Abfalls der Korrelationskurve, während der Kehrwert der Amplitude  $G_{\text{FCS}}(0)$  die Anzahl der Teilchen  $\langle N \rangle$  im Detektionsvolumen angibt (siehe Abbildung 2.3). Des Weiteren lässt sich aus der mittleren Teilchenanzahl  $\langle N \rangle = \langle C \rangle \cdot V_{\text{eff}}$  und der Gesamtzählrate auch die durchschnittliche Signalintensität pro Partikel berechnen.

Bei bekannter Viskosität  $\eta$  des Lösungsmittels kann aus der Diffusionskonstante über die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2.6) der Radius  $r_P$

eines als Kugel angenäherten Teilchens berechnet werden [27]. Dabei zeigt sich, dass der Radius proportional zur Diffusionszeit ist.

$$D = \frac{kT}{6\pi r_P \eta} \quad (2.6)$$

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} = \frac{3r_0^2 \pi \eta}{2kT} \cdot r_P \quad (2.7)$$

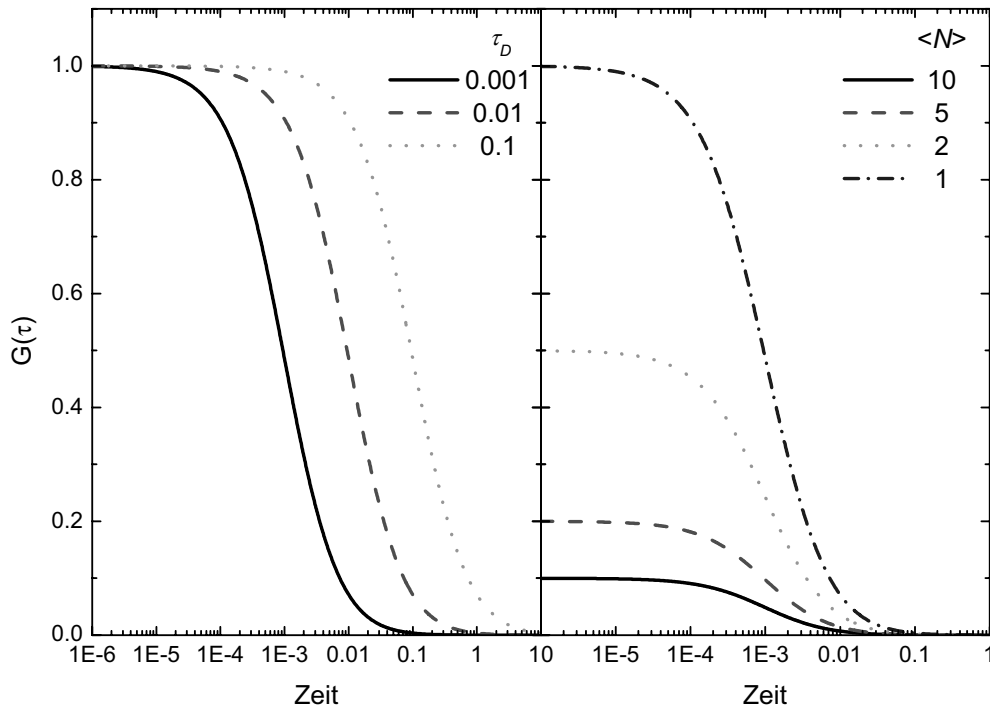


Abbildung 2.3: Abhängigkeit der Korrelationskurve von der Diffusionszeit  $\tau_D$  (links) und der Anzahl an Partikeln im Fokus (rechts). Bei langsamerer Diffusion verzögert sich der Abfall in der Korrelationskurve. Die Amplitude zeigt ein antiproportionales Verhalten zu der mittleren Teilchenanzahl  $\langle N \rangle$  im Fokus.