

Kaltes Licht

Cryo-Fluoreszenzanalytik – Eine innovative Technik für die Wissenschaft

Ein spektroskopischer Tieftemperaturmessplatz weist am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf schnell und sensitiv Schwermetalle in diversen Umweltproben nach.

Dieser Beitrag beruht auf einem Vortrag der Autoren bei der ProcessNet-Jahrestagung 2014 in Aachen.



Fluoreszenzmikroskopische und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen finden in der Chemie, Biochemie, Biologie, Medizin, Materialprüfung sowie in den Geowissenschaften eine breite Anwendung. Dabei spielt die chemische Charakterisierung und die Lokalisierung der verschiedensten Analyte/Fluorophore (Schwermetalle, Biomarker) mittels analytischer und bildgebender Verfahren eine wichtige Rolle. Im Rahmen ihrer Promotionsarbeiten etablierten die beiden Rossendorfer Wissenschaftler Dr. Robin Steudtner und Dr. Kay Großmann die Fluoreszenzspektroskopie bei tiefen Temperaturen am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR). Heute, fünf Jahre später, betreut Steudtner am

HZDR einen dauerhaften spektroskopischen Tieftemperaturmessplatz zum schnellen und sensitiven Nachweis von Schwermetallen in diversen Umweltproben (Wasser- und Bodenproben). Großmann leitet das Ausgründungsprojekt NanoscopyX am Life Science Inkubator Sachsen.

Reaktionspfade erforschen

Untersuchungen bei tiefen Temperaturen finden breite Anwendung bei elektronenmikroskopischen Methoden, aber auch für fluoreszenzspektroskopische und -mikroskopische Fragestellungen ergeben sich interessante



Dr. Robin Steudtner, Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf

Einsatzgebiete. Die Fluoreszenzausbeute und Fluoreszenzlebensdauer der meisten Fluorophore sind stark temperaturabhängig. Vereinfacht betrachtet, bewirkt das Gefrieren der meist wässrigen Proben, dass die in der Lö-

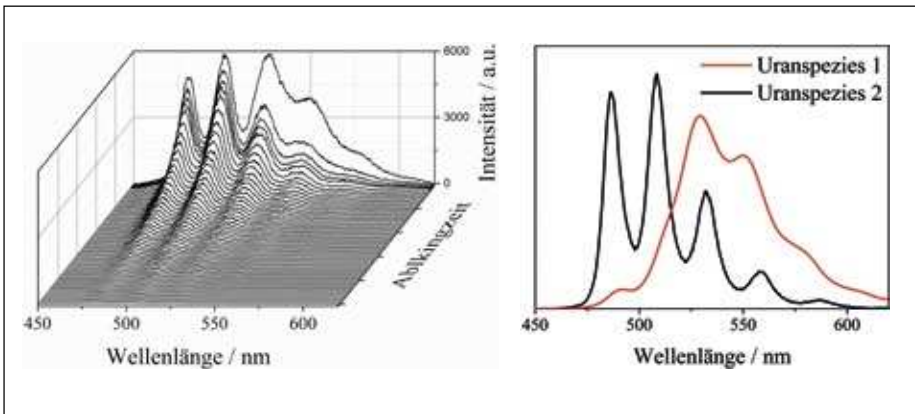


Abbildung 1: Beispielhaftes zeitaufgelöstes Laser-induziertes Fluoreszenzspektrum einer Mehrkomponentenprobe (links) Einzelkomponentenspektren der Uranspezies (rechts)

sung enthaltenen Ionen und Moleküle relativ feste Gitterpositionen in dem gebildeten Wasserkristallgitter einnehmen. Dies reduziert Fluoreszenzlöscheffekte, welche normalerweise bei Raumtemperatur zum Tragen kommen und die Fluoreszenz verringern.

Im Fokus der ersten Arbeiten stand die Erforschung von Reaktionspfaden radioaktiver Schwermetalle in verschiedenen geologischen und biologischen Systemen. Nur aufgrund genauer Kenntnis der Reaktionsmechanismen und der Reaktionspartner der Schwermetallionen lassen sich geeignete Strategien zur Vermeidung gesundheitlicher Risiken und Umweltrisiken entwickeln. Durch den Einsatz der Tieftemperaturtechnik konnte die fluoreszenzspektroskopische Nachweisgrenze für Uran(VI) dabei um mehrere Größenordnungen auf 10^{-10} M gesenkt werden. Zudem gelang es, die chemische Bindungsform des Urans in verschiedenen natürlichen Medien (Gruben- und Flutungswässer, Mineralwasser und Urin) direkt spektroskopisch zu bestimmen.

Die chemische Bindungsform von Uran kann unter gegebenen chemischen, physikochemischen und physikalischen Parametern

mit Hilfe thermodynamischer Berechnungen bestimmt und anschließend mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden. Für die spektroskopische Analyse können die zu untersuchenden Proben ohne weitere Vorbereitung in Plastikküvetten mittels Flüssigstickstoff schockgefroren werden. Nach Überführung der Probe in den Kryostaten wird die spezifische Fluoreszenz des Urans mit einem gepulsten Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) angeregt. Die detektierte Fluoreszenz zeigt im Bereich von 450 nm bis 650 nm das typische Fingerprintspektrum des Uran(VI)-Ions. Die erhaltenen Peakpositionen und die Fluoreszenzlebensdauern sind zwei speziesspezifische Parameter, welche zur Auswertung der Probe genutzt werden. Durch die unterschiedlichen Peaklagen und die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Uranspezies ist unter Einbeziehung der Zeitauflösung eine Analyse von Mehrkomponentensystemen und deren Auftrennung in die Einzelkomponenten möglich (s. Abb. 1).

Je nach Herkunft des einzelnen Probenwassers kann sich die auftretende Uran-Speziation stark unterscheiden. Zum Beispiel

zeigt die Speziesverteilung eines realen Grubenwassers aus Königstein (Sachsen), dass in Abhängigkeit vom pH-Wert, fünf chemisch unterschiedliche Uranspezies zum Teil gleichzeitig vorliegen können. In enger Zusammenarbeit zwischen Forschung und Industrie können die so gewonnenen chemischen Erkenntnisse dann anwendungsorientiert der Bewertung und Entwicklung von Sanierungsverfahren für Altlasten des Uranerzbergbaus dienen.

Fluoreszenzmikroskopische Wirkstoffuntersuchungen

Durch die Weiterentwicklung der Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie bei tiefen Temperaturen werden heute am HZDR nicht nur umweltanalytisch relevante Fragestellungen im Bereich der Radiochemie und Ressourcenökologie sondern auch pharmakologische Fragestellungen im Rahmen der präklinischen Krebsforschung bearbeitet. So werden in enger Zusammenarbeit mit den Doktoranden Christin Wimmer und Christoph Tondera sowie mit Prof. Jens Pietzsch in der Abteilung Radiopharmazeutische und Chemische Biologie am Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung des HZDR fluoreszenzmikroskopische Wirkstoffuntersuchungen an Krebszellen ohne eine spezifische Anfärbung neuer Wirkstoffe durchgeführt.

Durch gezielte Strukturveränderungen, z.B. die Derivatisierung mit einem Fluorophor, wird das Verhalten eines Wirkstoffs in einer Zelle oder im Organismus oft maßgeblich beeinflusst. Die Folge einer derartigen chemischen Modifizierung kann unter anderem ein verändertes Bindungsverhalten des Wirkstoffs an seine Zielmoleküle oder seine veränderte zelluläre Aufnahme sein. Deshalb geht ein Trend hin zur Entwicklung markierungsfreier Analysemethoden.

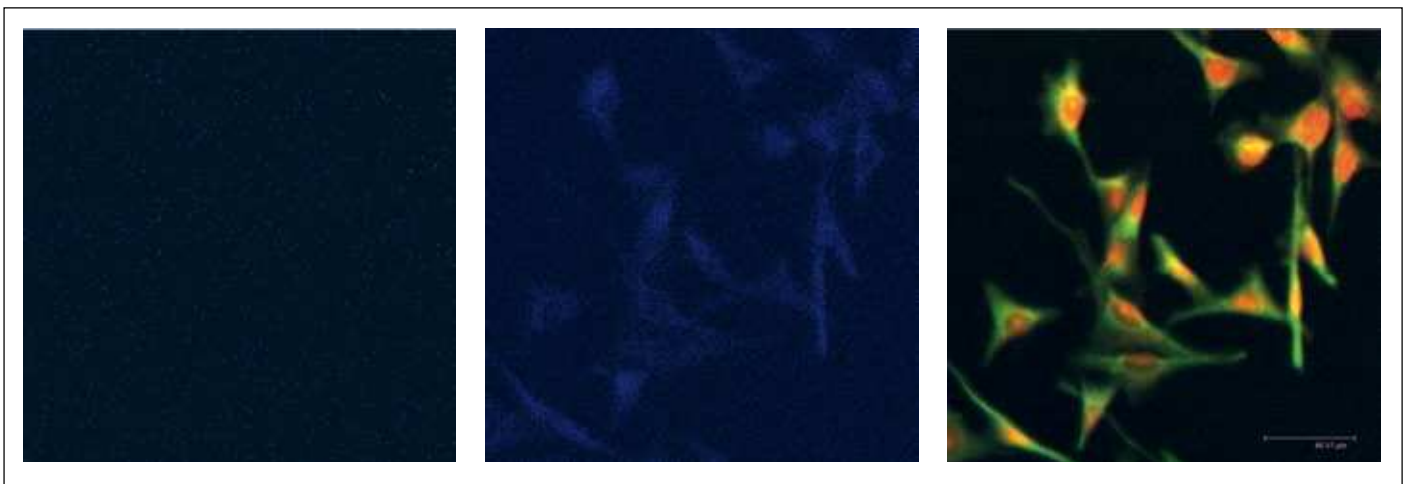


Abbildung 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen A2058-Melanomzellen nach Inkubation mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmer C1 bei Raumtemperaturbedingungen (RT; links) und Tieftemperaturbedingungen (20 K; ohne (Mitte) und mit (rechts) Referenzfärbung der Zellkerne (rot) und -membranen (grün)).

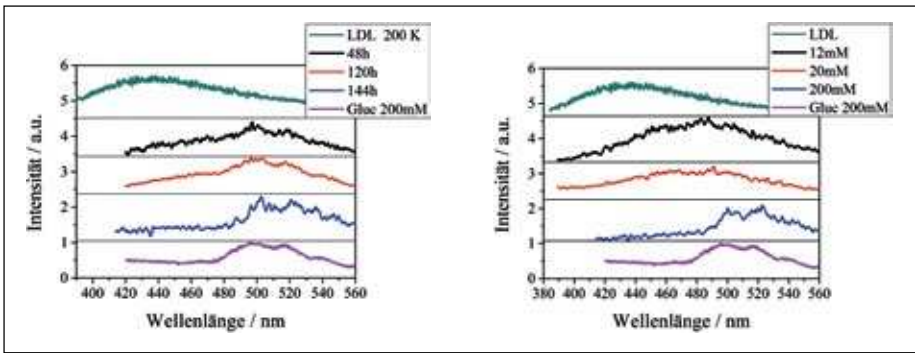


Abbildung 3: Laserinduzierte Fluoreszenzspektren von glykatierten Lipoproteinen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (links) und der Konzentration an Glukose (rechts). Alle Spektren wurden unter kryogenen Temperaturen bei 100 K aufgenommen.

In einer jüngst veröffentlichten Untersuchung konnte die Eigenfluoreszenz eines, auf der Basis von 2,3-Diaryl-substituierten Indolen neu entwickelten selektiven Cyclooxygenase-2-(COX-2)-Hemmers unter kryogenen Bedingungen genutzt werden, um dessen spezifische Anreicherung direkt an seinem Wirkort auf zellulärer Ebene mikroskopisch und spektroskopisch nachzuweisen (Abb. 2). Das Enzym COX-2 spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen. Eine erhöhte Expression und Aktivität dieses Enzyms führt zu einer krebsfördernden entzündlichen Mikroumgebung, die das Wachstum der Krebszellen verstärkt, ihre Aggressivität erhöht, ihre Immunüberwachung und ihren kontrollierten Zelltod minimiert sowie zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber verschiedenen therapeutischen Ansätzen führt.

Zielmolekül adressieren

Das hier beschriebene methodische Herangehen gestattet neben einer pharmakologischen Charakterisierung neuer Wirkstoffe auch Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung dieses Enzyms bei verschiedenen Krebszellen. Beides stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um neue Wirkstoffe, die das Enzym COX-2 sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Anwendungen als Zielmolekül adressieren sollen, zu entwickeln.

Zum Nachweis verschiedener Stoffwechselprodukte sowie stoffwechselbedingter, chemischer Veränderungen konnte die Methode ebenfalls bereits erfolgreich verwendet werden. So zeigten zum Beispiel spektroskopische Untersuchungen an Laktat, Zitronensäure, Glukose, und Pyruvat Fluoreszenzmissionen bei tiefen Temperaturen, welche bei Raumtemperatur in deutlich geringerem Maße bzw. nicht beobachtet werden konnten. Das untersuchte L-Lactat spielt beispielsweise eine wichtige Rolle als Produkt des anaeroben Abbaus von Pyruvat nach der Glycolyse. Laktat wurde in dieser Studie bei Raumtempera-

tur, 200 K, 100 K und 10 K untersucht. Dabei konnte bei Raumtemperatur keine Emission beobachtet werden, wohingegen bei 200 K ein auswertbares Spektrum detektiert wurde. Beim weiteren Verringern der Proben temperatur auf 100 K verdoppelte sich die Intensität des Fluoreszenzsignals.

Gegenwärtige Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einfluss des reaktiven Zuckers Glukose auf Lipoproteine geringer Dichte (LDL). Erhöhte Glukosekonzentrationen, wie sie z. B. im Blut von Diabetikern auftreten, führen zur sogenannten Glykatisierung von Proteinen und Lipiden (Eiweißen und Fetten). Das sind chemische Veränderungen, die schwerwiegende physiologische Konsequenzen haben können und beispielsweise eng mit den Spät komplikationen beim Diabetes mellitus Typ 2 im Zusammenhang stehen. Die Glykatisierung von LDL steht dabei im Verdacht, bei der Entwicklung atherosklerotischer Blutgefäßveränderungen beteiligt zu sein. LDL und glykatisierte LDL (glycLDL) zeigen bei Raumtemperatur und Anregung mit Laserlicht keine ausgeprägten Fluoreszenzeigenschaften. Mit Verminderung der Temperatur wurden für LDL und glycLDL charakteristische und deutlich voneinander abgrenzbare Spektren gemessen. Konzentrationsabhängig konnte in diesen Untersuchungen zudem mit variiender Glukosekonzentration innerhalb der Reaktionslösung eine Abhängigkeit zur Spektrstruktur festgestellt werden.

Ähnliche Veränderungen in der Spektrstruktur wurden auch in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer zwischen Glukose und LDL beobachtet (s. Abb. 3). Daraus lassen sich Hinweise auf chemische Veränderungen durch Reaktion der Glukose mit verschiedenen Fett- und Eiweißbestandteilen der LDL ableiten.

Transferorientiertes Folgeprojekt

Auf der Grundlage der bisherigen Untersuchungen und Ergebnisse am HZDR wurde erfolgreich das transferorientierte Folgepro-

jekt „NanoscopiX“ am Life Science Inkubator Sachsen initiiert. NanoscopiX beschäftigt sich dabei mit der applikationsbezogenen Weiterentwicklung der Tieftemperaturfluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie. Dabei ist das vorrangige Ziel, ein einfach zu handhabendes, sensitives analytisches Verfahren für chemo-, bioanalytische- und medizinische Anwendungen zu entwickeln.

Die Analyse von Schwermetallen, insbesondere von Radionukliden und seltenen Erden in natürlichen Systemen, soll an Hand einer verbesserten Fluoreszenzanalytik bei tiefen Temperaturen erweitert werden.

Mit Unterstützung der Max-Buchner-Forschungsstiftung konnten drei entscheidende Ergebnisse erzielt werden, welche für zukünftige Projekte die nötige wissenschaftliche Grundlage bieten.

- Aufbau eines dauerhaften spektroskopischen Tieftemperaturmessplatzes zum schnellen und sensitiven Nachweis von Uran in diversen Umweltproben (Wasser- und Bodenproben)
- Unterstützung beim Aufbau eines mikroskopischen Tieftemperaturmessplatzes, der mikroskopische Untersuchungen bei -253 °C mit bis zu 630-facher Vergrößerung erlaubt
- Erste erfolgreiche Untersuchungen am spektroskopischen und mikroskopischen Messplatz im Bereich der Umweltanalytik sowie zu verschiedenen medizinisch relevanten Fragestellungen

Langfristig zielen die Arbeiten auf die direkte Visualisierung der Analyten bei tiefen Temperaturen in biologischen und medizinischen Proben in Kombination mit fluoreszenzspektroskopischen Daten, welche zusätzliche molekulare Informationen über die Mikroumgebung der Fluorophore liefern, ab.

Dr. Robin Steudtner, Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf

Co-Autoren: Christoph Tondera, Christin Wimmer, Jens Pietzsch Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung und Fachbereich Chemie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Dresden sowie Kay Großmann, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V Institut für Ressourcenökologie und Life Science Inkubator Sachsen, Projektgruppe NanoscopiX

Kontakt

Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V.
 Institut für Ressourcenökologie
 Dr. Robin Steudtner
 Tel. : +49 351 260 2895
 r.steudtner@hzdr.de
 www.hzdr.de/FWO