



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Probing spatial heterogeneity in supercooled glycerol and temporal heterogeneity with single-molecule FRET in polyprolines

Xia, T.

Citation

Xia, T. (2010, March 25). *Probing spatial heterogeneity in supercooled glycerol and temporal heterogeneity with single-molecule FRET in polyprolines*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15122>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15122>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

In dit proefschrift komen twee verschillende onderwerpen aan bod. Het eerste onderwerp is de structuur van de glasvormer glycerol bij temperaturen boven het glaspunt. In hoofdstuk 2-5 onderzochten we deze structuur met verschillende methoden en keken in het bijzonder naar de heterogeniteit van structuren die op grote schaal blijkt te bestaan. Een tweede onderwerp van studie is de dynamica van enkele moleculen. In hoofdstuk 6 bestudeerden we de dynamica van conformaties van enkele polyproline moleculen in een dunne glycerol film met onze recent voorgestelde temperatuurcycli microscopie. In deze studie konden de conformaties van het polyproline bekeken worden via de fluorescentie van twee fluorescerende moleculen (fluoroforen) die aan de uiteinden van het polyproline bevestigd waren.

Heterogeniteit in onderkoelde vloeistoffen

Begrijpen hoe een vloeistof een glas wordt is het centrale onderwerp in de studie van glasvormers. In oudere modellen van glasvorming wordt het bestaan van gebieden die zich al samenwerkend herordenen (cooperatively rearranging regions) gepostuleerd. Gedacht wordt dat deze gebieden in nauw verband staan met de heterogeniteit en het karakter van de glasovergang. Het begrijpen van heterogeniteit is daarom een essentiële stap naar een volledige structurele beschrijving van de glasovergang. Gemotiveerd door eerdere enkele molecuul studies naar onderkoeld glycerol, die ontdekten dat bij temperaturen ruim boven het glas punt heterogene structuren ontstaan die verrassend lang kunnen blijven bestaan, bestudeerden we de heterogeniteit in glycerol met rheometrie, fluorescentie microscopie en verstrooiing experimenten met neutronen.

In hoofdstuk 2 beschreven we onze eerste rheologische metingen aan glycerol and *ortho*-terphenyl, respectievelijk. De experimentele opstelling was een zelfgemaakte rheometer gebaseerd op een Couette cell. Deze opstelling stelde ons in staat om kleine en constante schuifkrachten (rond de 100 Pa) op het sample aan te brengen en de mechanische respons te bekijken als functie van de tijd. We hebben in beide materialen een gedrag gevonden als van een vaste stof, bij temperaturen ruim boven hun respectievelijke glas punten, waar de materialen zich volgens het huidige begrip van glasvormers als vloeistoffen

zouden moeten gedragen. We vonden dat een bepaalde thermische behandeling noodzakelijk was om zulk gedrag waar te nemen. Deze thermische behandeling bestond onder meer uit een initiële afkoeling tot een temperatuur slechts een paar graden boven het glas punt, gevolgd door een annealing van enkele uren bij deze temperatuur, en een verharding bij een hogere temperatuur. We realiseerden ons dat de thermische behandeling die gebruikt werd in de rheologische metingen zeer vergelijkbaar was met de thermische behandeling in eerdere studies aan enkele moleculen, waar de rotaties van de moleculen in hun omgeving van glycerol werden gevolgd als functie van de temperatuur. Net als in de eerdere studies met de enkele moleculen in glycerol concluderen we uit de macroscopische rheologie metingen dat in het ondergekoelde glycerol de vloeistof fase wordt doordrenkt met een netwerk van een vaste fase, en dat dit vaste netwerk blijft bestaan tot temperaturen ruim boven het glas punt. Dit netwerk wordt met de tijd stijver, reageert elastisch op kleine schuifkrachten en breekt bij grote schuifkrachten, wat laat zien dat het glycerol geen eenvoudige vloeistof meer is, maar zich goed laat beschrijven met alle bekende eigenschappen van de rheologie van zachte glasvormers, zoals aging, yield-stress, and shear thinning.

In hoofdstuk 3 breidden we het werk aan supergekoeld glycerol in hoofdstuk 2 uit met het gebruik van een commerciële rheometer. Deze rheometer stelde ons in staat tot het doen van oscillerende metingen met zeer kleine vervormingen. Dit was nodig om tijdens de metingen beschadigingen aan het fragiele vaste netwerk zo veel mogelijk te voorkomen. Eerst reproduceerden we het vast worden van het glycerol in een Couette cell zoals waargenomen in hoofdstuk 2. We vonden dat een initiële langzame koeling (5 K/h) voorafgaand aan de annealing bij hogere temperatuur cruciaal was voor de initiatie van de vaste matrix. De wachttijd nodig voor deze initiatie nam af bij toenemende temperatuur. Het vaste glycerol smolt bij verhitting bij het smeltpunt van kristallijn glycerol. Vanwege de vervorming van het meetapparaat zelf kan de stijfheid van glycerol in de geometrie van de Couette cel slechts gemeten worden tot ongeveer 10^7 Pa, twee ordes van grootte kleiner dan de stijfheid van kristallijn glycerol. Om uit te kunnen sluiten dat het vaste netwerk eenzelfde stijfheid had als kristallijn glycerol veranderden we de geometrie van het experiment naar een plaat-plaat geometrie, waar de grootte van de platen en de afstand ertussen zo gekozen werd dat de vervorming van het meetapparaat verwaarloosbaar was. Een bijkomend voordeel was dat we in deze configuratie het sample met een camera konden bekijken. Tot onze verrassing konden we in de plaat-plaat geometrie de vorming van een vaste fase in het glycerol niet betrouwbaar reproduceren met het thermisch profiel dat we gebruikten in de

Couette cell. We vonden een vaste-stofachtig gedrag van het glycerol slechts in één van de zes uitgevoerde metingen. In deze meting groeide een sponsachtige fase van de bovenste plaat, met de groeisnelheid van de kristallijne fase. De schuif modulus van deze sponsachtige fase was echter twee ordes van grootte kleiner dan de schuif modulus van de kristallijne fase, die we maten in een seeded sample.

In hoofdstuk 4 bestudeerden we een dunne glycerol film met daarin een lage concentratie fluorescerende moleculen met de techniek van fluorescentiemicroscopie. In deze techniek is de intensiteit van fluorescentie op een gegeven plek in het sample een maat voor de lokale concentratie van de fluoroforen en geeft daarmee informatie over de structuur van het sample. We vonden twee verschillende heterogene patronen van fluorescentieintensiteit, afhankelijk van de snelheid van de afkoeling van het sample. Een sample dat langzaam werd afgekoeld liet een patroon zien als een gatenkaas, met donkere gaten van micrometer grootte in een heldere achtergrond. In een sample dat snel afgekoeld werd zagen we een patroon met vele heldere eilanden van micrometer grootte verstrooid in een donkere matrix. Deze twee heterogene patronen, gevormd door een inhomogene verdeling van fluorescerende moleculen in de glycerol film, bleven onveranderd gedurende enkele dagen als het sample niet significant verhit werd. Dit suggereert vorming van stabiele dichtheidsfluctuaties van micrometer grootte in onderkoeld glycerol.

De resultaten uit de hoofdstukken 2 en 3 brengen een belangrijke vraag naar voren: wat is de structuur van de waargenomen vaste-stofachtige toestand van glycerol? Het lijkt erop dat het waargenomen viscoelastische gedrag te maken heeft met de groei van een kristallijne structuur in onderkoeld glycerol. Immers, de vaste structuren groeiden met min of meer dezelfde snelheid als het kristal en smolten bij het smeltpunt van kristallijn glycerol. Daartegenover staat dat de gemeten stijfheid van het vaste glycerol twee ordes van grootte kleiner is dan dat van kristallijn glycerol. Daarnaast leken de metingen in hoofdstuk vier te wijzen op een afwezigheid van grote microkristallen, ongeacht de snelheid van afkoeling van het glycerol.

In hoofdstuk 5 probeerden we meer te leren over de vaste toestand van glycerol door het doen van verstrooiingsexperimenten met neutronen. We voerden metingen uit aan twee samples van glycerol, met thermische preparatie vergelijkbaar met die in hoofdstuk 2. Slechts in een van beide samples zagen we het ontstaan van vaste structuren, waargenomen zowel via de verstrooiingsspectra van de neutronen als via inspectie met het blote oog. Een nieuwe piek in de spectra, gecentreerd rond 0.1 \AA^{-1} , is het teken aan de wand voor deze vaste toestand, aangezien deze piek duidelijk afwezig is bij glycerol in de volledig

vloeibare toestand en bij het kristal bij dezelfde temperatuur. Maar, aangezien het gekozen meetbereik (van 0.008 tot 0.431 Å⁻¹) niet het bereik omvatte waar normaal de Braggpieken van de kristallijne structuur waargenomen worden (van 0.5 tot 5 Å⁻¹), konden we niet bevestigen of de vaste vorm van glycerol kristallijn van nature is. Toekomstige metingen in dit meetbereik zullen meer inzicht geven in de precieze structuur van de vaste toestand van glycerol.

Temperatuurcycli van polyprolines gelabeld met een enkel paar van fluoroforen

Het is de droom van iedere experimentele natuurkundige die met fluorescentiemicroscopie van enkele moleculen werkt om het signaal van een enkel molecuul oneindig lang te kunnen observeren en de snelle bewegingen van dit molecuul in alle detail te kunnen volgen. Tegenwoordig is het mogelijk om een enkel geïmmobiliseerd fluorescerend molecuul in een oplossing bij kamertemperatuur gedurende enkele minuten te bekijken door het toevoegen van triplet quenchers en zuurstof “scavengers”. De tijdsresolutie van dit soort experimenten is echter nog steeds gelimiteerd tot enkele milliseconden, de tijd die nodig is om uit dit molecuul genoeg fotonen te verzamelen om een redelijke signaal-ruis verhouding te bereiken. Om een langere observatietijd mogelijk te maken zonder moleculen te hoeven immobiliseren en tegelijkertijd snelle bewegingen van de moleculen te kunnen volgen op tijdschalen van enkele microseconden hebben we onlangs een nieuwe methode van temperatuurcycli microscopie voorgesteld.

In hoofdstuk 6 lieten we zien hoe deze methode gebruikt kan worden om de conformatiedynamica van polyprolines te bestuderen. De conformaties van het polyproline kunnen indirect bekeken worden via Förster Resonant Energy Transfer (FRET) tussen twee fluoroforen die bevestigd zijn aan de beide uiteinden van het polyproline molecuul. FRET is een niet radiatieve energie overdracht tussen een donor en een acceptor molecuul. De efficiëntie van de overdracht is een functie van de spectrale overlap tussen het emissiespectrum van de donor en het absorptiespectrum van de acceptor, en de relatieve oriëntatie en afstand tussen beide moleculen. In een experiment kan deze efficiëntie gemeten worden door de fluorescentie van beide fluoroforen te detecteren. Omdat de efficiëntie van de energie overdracht afhangt van de afstand tussen de moleculen, kan FRET worden gebruikt om afstanden te meten op moleculaire schaal, als de eigenschappen van het acceptor en donor molecuul bekend zijn. Eerst maten we de statische FRET efficiency van bevroren polyproline 6 and polyproline 20 bij lage temperatuur in glycerol. Beide metingen lieten een

brede distributie van FRET efficiënties zien. Deze verbreding ontstond door de grote spreiding in de orientatiefactor en de spreiding in de afstand tussen de fluorescerende moleculen. We bestudeerden de mogelijke variaties in signalen van het donor molecuul en het acceptor molecuul in het FRET paar door het fluorescentiesignaal van enkele paren gedurende een langere tijd te meten. We namen drie typen gebeurtenissen waar. (1) Een correlatie tussen de twee signalen, dat wil zeggen een intensiteit van het acceptorsignaal dat positief gecorreleerd is met de intensiteit van de donor, zagen wij als de donor in een donkere toestand verkeerde of gebleekt was. (2) Een afwezigheid van correlatie, dat wil zeggen een intensiteit van de acceptor die onafhankelijk is van de intensiteit van de donor, zagen we als de acceptor in een niet fluorescerende toestand was waarin nog steeds de donor gequenched kan worden. Deze situatie ontstaat waarschijnlijk doordat de acceptor absorptiespectrum niet veranderd is, hoewel zijn fluorescentie uitgeblust is. De energieoverdracht tussen de moleculen blijft dus zo efficiënt als in de fluorescerende toestand van de acceptor. (3) Een anti-correlatie tussen het donor- en het acceptor signaal werd waargenomen als één van de niet fluorescerende vormen van de acceptor de opgenomen energie van de donor niet meer kan ontvangen. Dat kan worden veroorzaakt door een blauwverschuiving van het acceptorabsorptiespectrum na zijn photobleaching.

We voerden onze eerste metingen met temperatuurcycli uit op het polypropylene6 en waren in staat om de reoriëntaties van de labels als gevolg van de temperatuurcycli te detecteren door het meten van de FRET efficiëntie. Deze eerste metingen laten zien dat de door ons voorgestelde methode van temperatuurcycli aan enkele moleculen in combinatie met FRET enkele moleculen mogelijkheden biedt voor het bestuderen van de dynamica van eiwitvouwing op het niveau van een enkel molecuul.

