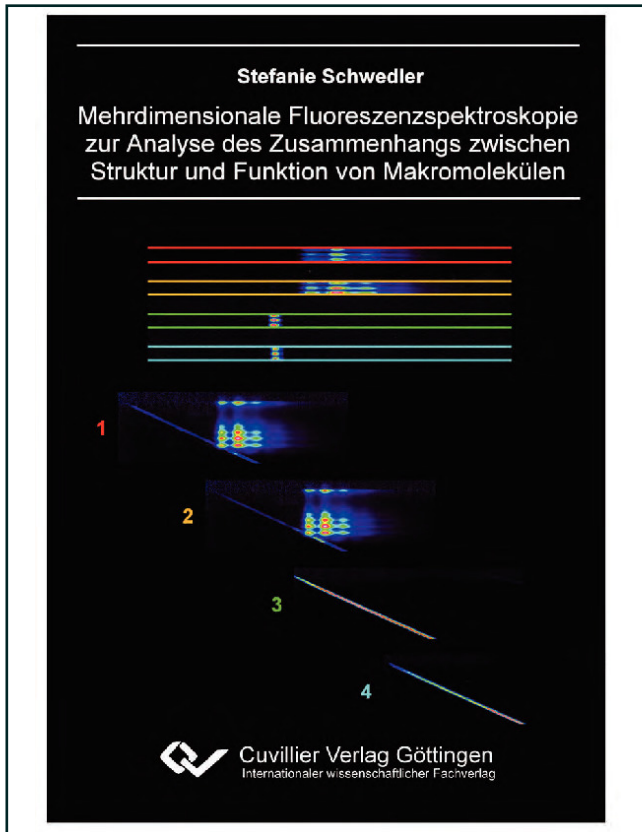




Stefanie Schwedler (Autor)

# Mehrdimensionale Fluoreszenzspektroskopie zur Analyse des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion von Makromolekülen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/827>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-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>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Spektroskopie in der chemischen Diagnostik . . . . .	1
1.2	Proteinstruktur und -dynamik . . . . .	3
1.3	Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	4
1.4	Zielsetzung . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>9</b>
2.1	Spektroskopische Grundlagen . . . . .	9
2.1.1	Absorption . . . . .	9
2.1.2	Energietransferprozesse und Lumineszenz . . . . .	10
2.1.3	Lebenszeit . . . . .	12
2.1.4	Quantenausbeute . . . . .	15
2.1.5	Quenching . . . . .	16
2.1.6	Polarisation und Anisotropie . . . . .	20
2.2	Lösungsmiteinfluss und spektrale Relaxation . . . . .	23
2.2.1	Solvenz- und spektrale Relaxation . . . . .	23
2.2.2	Statischer Solvenzeinfluss . . . . .	30
2.3	Proteinfluoreszenz . . . . .	34
2.3.1	Fluoreszente Aminosäuren . . . . .	34
2.3.2	Einfluss der Proteinstruktur . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Experiment</b>	<b>41</b>
3.1	Anregungs-Emissions-Spektroskopie (AES) . . . . .	41
3.1.1	Aufbau . . . . .	41
3.1.2	Datenaufnahme . . . . .	44

3.2	Polarisationsaufgelöste Erweiterung der AES . . . . .	46
3.2.1	Konstruktion . . . . .	46
3.2.2	Datenaufnahme und -bearbeitung . . . . .	47
3.2.3	Testmessungen . . . . .	49
3.2.4	Diskussion . . . . .	51
3.3	Zeitaufgelöste Laserinduzierte Fluoreszenz . . . . .	52
3.3.1	Das Lasersystem . . . . .	52
3.3.2	Probe . . . . .	54
3.3.3	Detektion . . . . .	55
3.4	Absorptionsmessungen . . . . .	57
3.5	Probenpräparation . . . . .	57
3.5.1	Proteine . . . . .	57
3.5.2	Benzodiazaborole . . . . .	58
3.5.3	Referenzfarbstoffe . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Datenbearbeitung</b>	<b>61</b>
4.1	Kalibration . . . . .	61
4.1.1	Zuordnung der Zeit- und Wellenlängenskala . . . . .	62
4.1.2	Kalibration der Anregungseffizienz . . . . .	63
4.1.3	Kalibration der Detektionseffizienz . . . . .	64
4.2	Verbesserung der Kalibrationsroutine . . . . .	66
4.2.1	Zweidimensionale Detektionseffizienz der Streakeinheit . . . . .	66
4.2.2	IR-Korrektur . . . . .	71
4.3	Datenanalyse . . . . .	73
4.3.1	Korrektur der Absorptionsspektren . . . . .	73
4.3.2	Bestimmung von Absorptions- und Fluoreszenzmaxima . . . . .	74
4.3.3	Bestimmung der Lebenszeit . . . . .	74
4.3.4	Anisotropie . . . . .	77
<b>5</b>	<b>Spektrale Relaxation in <i>single tryptophan</i>-Proteinen</b>	<b>81</b>
5.1	Einleitung und Aufgabenstellung . . . . .	81
5.2	Charakterisierung der Proteine und Peptide . . . . .	84

5.2.1	Auswahl geeigneter Proteine und Peptide . . . . .	84
5.2.2	Voruntersuchungen . . . . .	86
5.3	Der <i>red edge</i> -Effekt . . . . .	90
5.4	Analyse der dynamischen Fluoreszenz . . . . .	93
5.4.1	Energieabhängigkeit . . . . .	93
5.4.2	Schnelle Relaxationsprozesse . . . . .	96
5.4.3	Entwicklung eines Modells für die Schwerpunktsverschiebung durch Konformere . . . . .	102
5.4.4	Langsame Relaxationsprozesse . . . . .	107
5.5	Zusammenfassung . . . . .	116
<b>6</b>	<b>hs-FLIM: Optimierung und Anwendung</b>	<b>121</b>
6.1	Einleitung und Aufgabenstellung . . . . .	121
6.1.1	Das Prinzip von FLIM . . . . .	122
6.1.2	hs-FLIM . . . . .	122
6.1.3	Aufgabenstellung . . . . .	124
6.2	Apparative Optimierung . . . . .	125
6.3	Separation von Fluorophorbeiträgen . . . . .	129
6.3.1	Voruntersuchungen mit Farbstoffen . . . . .	130
6.3.2	Fluorophorverteilung in lebenden Zellen . . . . .	132
6.3.3	Diskussion . . . . .	134
6.4	Aggregation von $\alpha$ -Synuclein . . . . .	135
6.5	Zusammenfassung . . . . .	141
<b>7</b>	<b>Photophysik der Benzodiazaborole</b>	<b>143</b>
7.1	Einleitung . . . . .	143
7.2	Aufgabenstellung . . . . .	145
7.3	Fluoreszenzeigenschaften in Lösung . . . . .	149
7.3.1	Absorptions- und Fluoreszenzspektren . . . . .	149
7.3.2	Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute . . . . .	152
7.3.3	Lebenszeiten . . . . .	154
7.3.4	Solvatochromismus . . . . .	155

7.4	Quenching durch Lewisbasen . . . . .	163
7.4.1	Quenching durch Pyridin . . . . .	163
7.4.2	Quenching durch TBAF . . . . .	167
7.5	Fluoreszenz in Festkörpern und Polymeren . . . . .	178
7.5.1	Kristallfluoreszenz . . . . .	179
7.5.2	Fluoreszenz dünner Schichten . . . . .	179
7.5.3	Fluoreszenz in einer Kunststoffmatrix . . . . .	180
7.5.4	Fluoreszenz in Polymeren . . . . .	181
7.6	Zusammenfassung . . . . .	183
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>187</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>191</b>
A.1	Charakterisierung der Benzodiazaborole . . . . .	191
A.2	Separation von Fluorophorbeiträgen . . . . .	194
A.3	Untersuchung verschiedener eYFP-Mutanten . . . . .	195
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>197</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>199</b>

