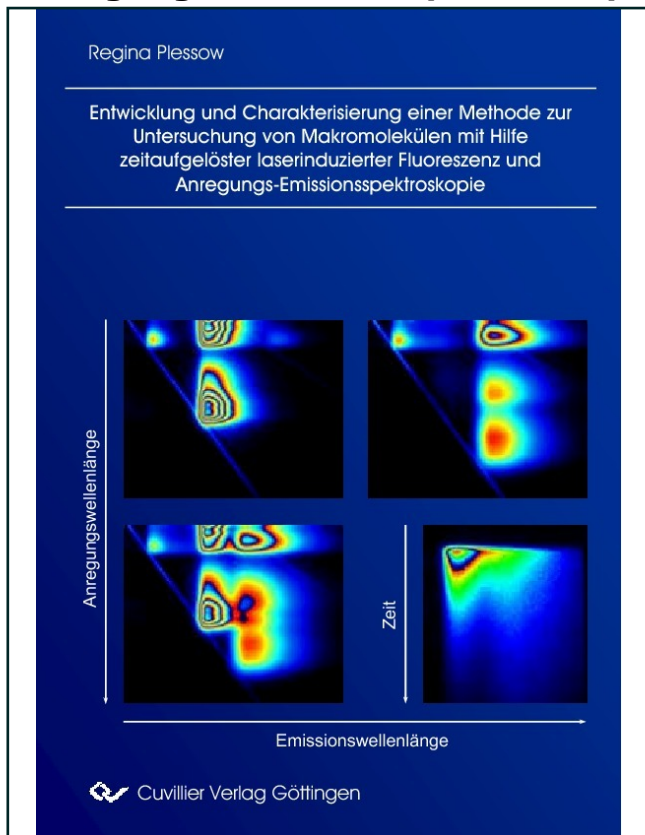




Regina Plessow (Autor)

Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2979>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.2	Fragestellung	4
2	Theoretische Grundlagen	7
2.1	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	7
2.1.1	Absorption	7
2.1.2	Lumineszenz	7
2.1.3	Stokes Shift und Lösungsmittelrelaxation	8
2.1.4	Fluoreszenzlebenszeit und -quantenausbeute	10
2.1.5	Fluoreszenzlöschung (Quenching)	11
2.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	12
2.2.1	Quantifizierung des FRET	12
2.3	Fluoreszenzanisotropie	14
2.3.1	Definition der Fluoreszenzanisotropie	14
2.3.2	Magischer Winkel	15
2.3.3	Analyse der zeitaufgelösten Daten	16
2.3.4	Anfangsanisotropie	16
2.3.5	Hydrodynamik starrer Makromoleküle	18
2.3.6	Segmentäre und Domänen-Bewegung	20
2.3.7	Interpretation des zeitlichen Anisotropieverlaufs	22
2.4	Biochemische Fluorophore	23
2.4.1	Proteinfluoreszenz	23
2.4.2	Extrinsische Fluorophore	27
3	Experimenteller Aufbau und Datenanalyse	31
3.1	Aufbau für Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES)	31
3.1.1	Anregungslicht	33
3.1.2	Probehalterung	33
3.1.3	Detektion	34
3.1.4	Spektrenaufnahme	35
3.1.5	Spektrenbearbeitung	36
3.1.6	Quantenausbeute	39
3.2	Aufbau für Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)	39
3.2.1	Der Titan-Saphir-Laser	39

3.2.2	Verstärkung und Frequenzvervielfachung	41
3.2.3	Die Position der Probe	42
3.2.4	Die Detektionsoptik	42
3.2.5	Aufbereitung der Rohdaten	43
3.2.6	Die Auswertungsroutine WINIMGEVAL	45
3.2.7	Spektrenanalyse	46
3.2.8	Zeitaufgelöste Anisotropiemessungen	50
3.3	Kalibrierung	54
3.3.1	Die spektrale Koordinate	54
3.3.2	Die Detektionseffizienz	55
3.3.3	Kalibrierung des Anregungslichts	56
3.4	Absorption	56
3.5	Probenpräparation	57
3.5.1	Das Proteinsystem Ras	57
3.5.2	Kleine Peptide und Neuropeptid Y	57
3.5.3	DNA-Primer	58
3.5.4	Heparinkofaktor II und Antithrombin III	58
3.5.5	Ruthenium-Terpyridin-Komplexe	58
4	Das Ras Proteinsystem	59
4.1	Einleitung	59
4.2	Fragestellung	64
4.3	Einfluss der Bindung an verschiedene Guanin-Nukleotide	65
4.3.1	Statische Fluoreszenz	65
4.3.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenz	68
4.3.3	Diskussion	70
4.4	Bindungsstudien verschiedener GTP-Analoga	71
4.5	GTPase-Funktion von RasY32W.GTP	72
4.5.1	Darstellung der Messergebnisse	72
4.5.2	Anpassung an eine Reaktion Erster Ordnung	76
4.5.3	Anpassung an eine Folgereaktion	77
4.5.4	Anpassung an eine Gleichgewichtsreaktion	83
4.5.5	Diskussion	85
4.6	Zusammenfassung	87
5	Neuropeptid Y	89
5.1	Einleitung	89
5.2	Fragestellung	91
5.3	Absorption des fluoreszenzmarkierten NPY	92

5.4	Statische Fluoreszenz	93
5.5	Zeitaufgelöste Fluoreszenzlebenszeiten	95
5.6	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	97
5.7	Anisotropieuntersuchungen am NPY	98
5.8	Spektroskopische Untersuchung des NPY Wildtyps	103
5.9	Diskussion	106
5.9.1	Struktur unter physiologischen Bedingungen	106
5.9.2	Aggregationsprozesse	110
5.10	Zusammenfassung	113
6	Spektroskopische Erkennung zellspezifischer RNA	115
6.1	Einleitung	115
6.2	Fragestellung	116
6.3	Auswahl eines geeigneten FRET-Paars	117
6.4	Primerbindung an ein RNA-Transkript	118
6.4.1	AES der <i>in vitro</i> Hybride	118
6.4.2	Quantifizierung der Ergebnisse	121
6.4.3	Identifizierung geeigneter Messpunkte zur kommerziellen Auswertung	122
6.5	Transfektion der Primer in lebende Zellen	126
6.5.1	Untersuchungen von Nabelschnurblut	126
6.5.2	Nachweis von mRNA in K-562-Zellen	129
6.6	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	130
6.6.1	Vergleich zwischen vier unterschiedlichen Akzeptoren	130
6.6.2	FRET-Effizienz als Funktion von Hybridisierungstemperatur und Basenabstand	134
6.6.3	Variation der Primerlängen	137
6.6.4	Diskussion	138
6.7	Zellen im Mikroskop	138
6.8	Zusammenfassung	141
7	Weiterführende spektroskopische Studien	143
7.1	Spektrale Relaxation	144
7.2	Aggregationsverhalten kurzer Peptidketten	147
7.2.1	AE-Spektren verschiedener Peptide und NATA	148
7.2.2	Emissionsspektren der NPY-Peptidsequenzen	149
7.2.3	Konzentrationsabhängigkeit verschiedener Peptide	150
7.2.4	Energietransfer in den YW-Peptiden	153
7.2.5	Berechnung der Dimerisierungskonstanten	156
7.2.6	Zusammenfassung	158

7.3	Heparinkofaktor II	160
7.3.1	Kationenbindung	160
7.3.2	Heparin- und Zinkbindung	161
7.3.3	Zinkbindungskonstante	163
7.3.4	Zusammenfassung	165
7.4	Ru(II)-bisterpyridin-Komplexe	166
7.4.1	Struktur	166
7.4.2	Spektroskopische Messungen	167
7.4.3	Zusammenfassung	173
8	Zusammenfassung und Ausblick	175
9	Anhang	179
9.1	Kalibrierung der Primer-Fluoreszenz	179
9.2	Abkürzungsverzeichnis	181
10	Literatur	183
11	Abstract	193