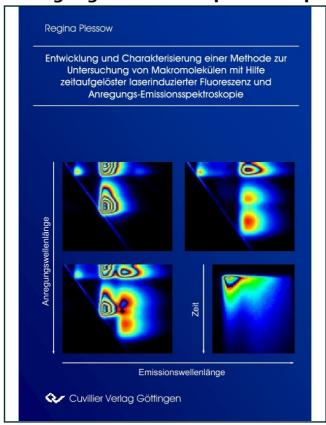


Regina Plessow (Autor)

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 Jentzsch-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	
	1.2	Frage	4	
2	Theoretische Grundlagen			
	2.1	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie		
		2.1.1	Absorption	
		2.1.2		
		2.1.3		
		2.1.4	Fluoreszenzlebenszeit und -quantenausbeute	
		2.1.5	Fluoreszenzlöschung (Quenching)	11
	2.2	Fluore	eszenz-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	
		2.4.2		
3	Exp	erimei	nteller Aufbau und Datenanalyse	31
	3.1	Aufba	au für Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES)	31
		3.1.1	Anregungslicht	33
		3.1.2	Probehalterung	33
		3.1.3	Detektion	
		3.1.4	Spektrenaufnahme	35
		3.1.5	Spektrenbearbeitung	
		3.1.6	Quantenausbeute	
	3.2 Aufbau für Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)			39
		3 2 1	Der Titan-Sanhir-Laser	39

		3.2.2	Verstärkung und Frequenzvervielfachung	41
		3.2.3	Die Position der Probe	42
		3.2.4	Die Detektionsoptik	
		3.2.5	Aufbereitung der Rohdaten	
		3.2.6	Die Auswertungsroutine WINIMGEVAL	
		3.2.7	Spektrenanalyse	
		3.2.8	Zeitaufgelöste Anisotropiemessungen	
	3.3	Kalibr	rierung	54
		3.3.1	Die spektrale Koordinate	
		3.3.2	Die Detektionseffizienz	
		3.3.3	Kalibrierung des Anregungslichts	
	3.4	Absor	ption	56
	3.5	Probenpräparation		
		3.5.1	Das Proteinsystem Ras	
		3.5.2	Kleine Peptide und Neuropeptid Y	
		3.5.3	DNA-Primer	58
		3.5.4	Heparinkofaktor II und Antithrombin III	
		3.5.5	Ruthenium-Terpyridin-Komplexe	58
4	Das	Ras Pi	roteinsystem	59
	4.1		tung	
	4.2		stellung	
	4.3	Einflu	ss der Bindung an verschiedene Guanin-Nukleotide	65
		4.3.1	Statische Fluoreszenz	
		4.3.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenz	68
		4.3.3	Diskussion	
	4.4		ngsstudien verschiedener GTP-Analoga	
	4.5		se-Funktion von RasY32W.GTP	
		4.5.1	Darstellung der Messergebnisse	
		4.5.2	Anpassung an eine Reaktion Erster Ordnung	
		4.5.3	Anpassung an eine Folgereaktion	
		4.5.4	Anpassung an eine Gleichgewichtsreaktion	
		4.5.5	Diskussion	
	4.6	Zusam	nmenfassung	
5	Neuropeptid Y			
	5.1		tung	
	5.2			
	5.3		ption des fluoreszenzmarkierten NPY	91 92

	5.4	Statisc	che Fluoreszenz	93
	5.5	Zeitau	fgelöste Fluoreszenzlebenszeiten	95
	5.6	Fluore	eszenz-Resonanz-Energietransfer	97
	5.7		tropieuntersuchungen am NPY	
	5.8		roskopische Untersuchung des NPY Wildtyps	
	5.9	Disku	ssion	106
		5.9.1	Struktur unter physiologischen Bedingungen	106
		5.9.2	Aggregationsprozesse	110
	5.10	Zusan	nmenfassung	113
6	Spe	ktrosko	opische Erkennung zellspezifischer RNA	115
	6.1		tung	— 115
	6.2		stellung	— 116
	6.3		ahl eines geeigneten FRET-Paars	
	6.4	Primerbindung an ein RNA-Transkript		
		6.4.1	AES der <i>in vitro</i> Hybride	
		6.4.2	Quantifizierung der Ergebnisse	 121
		6.4.3	Identifizierung geeigneter Messpunkte zur kommerziellen Auswertung	122
	6.5	Transf	fektion der Primer in lebende Zellen	126
		6.5.1	Untersuchungen von Nabelschnurblut	126
		6.5.2	Nachweis von mRNA in K-562-Zellen	
	6.6	Optim	ierung der Hybridisierungsbedingungen	
		6.6.1	Vergleich zwischen vier unterschiedlichen Akzeptoren	
		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	Zusan	nmenfassung	_141
7	Wei	iterfüh	rende spektroskopische Studien	143
	7.1		rale Relaxation	
	7.2	2 Aggregationsverhalten kurzer Peptidketten		
		7.2.1	AE-Spektren verschiedener Peptide und NATA	
		7.2.2	Emissionsspektren der NPY-Peptidsequenzen	
		7.2.3	Konzentrationsabhängigkeit verschiedener Peptide	
		7.2.4	Energietransfer in den YW-Peptiden	
		7.2.5	Berechnung der Dimerisierungskonstanten	
		726	Zusammenfassung	

	7.3 Heparinkofaktor II			160	
			Kationenbindung		
			Heparin- und Zinkbindung		
			Zinkbindungskonstante		
		7.3.4	Zusammenfassung	165	
	7.4	Ru(II))-bisterpyridin-Komplexe	166	
		7.4.1	Struktur	166	
			Spektroskopische Messungen		
		7.4.3	Zusammenfassung	173	
8	Zus	ammer	nfassung und Ausblick	175	
9	Anl	nang		179	
	9.1 Kalibrierung der Primer-Fluoreszenz				
	9.2 Abkürzungsverzeichnis				
10	Lite	eratur_	183		
11	Abs	tract		193	