



Katrin G. Heinze (Autor)

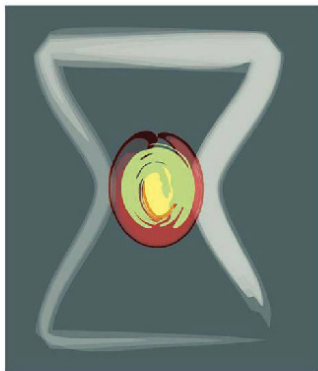
# **Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Zweiphotonenanregung in der biomolekularen Analytik**

Katrin G. Heinze

---

**Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie  
und Zweiphotonenanregung in der  
biomolekularen Analytik**

---



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3643>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-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>

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Stand der Forschung.....	1
1.2	Ziele dieser Arbeit.....	4
<b>2</b>	<b>ZWEIPHOTONENANREGUNG.....</b>	<b>7</b>
2.1	Resonante Absorption.....	7
2.2	Auswahlregeln.....	11
<b>3</b>	<b>GRUNDLAGEN UND KONZEPTE DER FCS.....</b>	<b>15</b>
3.1	Korrelationsanalyse von Diffusionssystemen .....	16
3.2	Die Korrelationsfunktion im Fall konfokaler Analyse .....	18
3.3	Photodynamik .....	24
3.4	Zweifarbigen-Kreuzkorrelationsanalyse .....	28
3.5	Auflösungsvermögen und Grenzen des realen konfokalen Messsystems .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND AUSWERTUNG .....</b>	<b>37</b>
4.1	Die FCS-Apparatur .....	37
4.2	Detektoren .....	39
4.3	Spiegel und Filter .....	40
4.4	Laser und Farbstoffe .....	41
4.6	Auswertung der Daten .....	42
<b>5</b>	<b>AUSWAHL UND CHARAKTERISIERUNG VON FLUOROPHORKOMBINATIONEN FÜR MEHRFARBIGE FCS-KONZEPTE UNTER ZWEIPHOTONEN-ANREGUNG .....</b>	<b>45</b>
5.1	Synthetische Farbstoffe .....	45
5.2	Fluoreszierende Proteine .....	48
5.3	Einfluss der Anregungsintensität .....	50
5.4	Farbstoffsysteme für zwei- und dreifarbig Kreuzkorrelationsanalysen in Lösung und in lebenden Zellen.....	52
<b>6</b>	<b>ZWEIFARBEN-KREUZKORRELATIONSANALYSE IN KOMBINATION MIT ZWEIPHOTONENANREGUNG: EXPERIMENTELLE REALISIERUNG AN EINEM BIOCHEMISCHEN TESTSYSTEM .....</b>	<b>67</b>
6.1	Biochemisches Assay, Probenpräparation und Messungen .....	68
6.1	Experimenteller Aufbau für die zweifarbig Detektion .....	71
6.3	Kalibration .....	72
6.5	Test-Experimente und Messung des enzymatischen Verdaus .....	74

<b>7</b>	<b>ZWEI-PHOTONEN KOINZIDENZANALYSE: SCHNELLE MESSUNGEN VON ENZYMKINETIKEN</b>	<b>77</b>
7.1	Konzept	78
7.2	Erweiterter experimenteller Aufbau	80
7.3	Biochemisches Assay und Farbstoffsystem	81
7.4	Relevante Messparameter	82
7.5	Einfluss des ‚Beamscanning‘	82
7.6	Einfluss der Intervallzeit	83
7.7	Verteilung des Koinzidenzfaktors für verschiedene Messzeiten	84
7.8	Vergleich geeigneter Farbstoffpaare für TPCCS	85
7.9	Zusammenfassung	86
<b>8</b>	<b>KOMBINIERTE TPCCS- UND FRET-ANALYSE AN EINEM AUTOFLUORESZIERENDEM PROTEASE-ASSAY</b>	<b>89</b>
8.1	Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)	90
8.2	Einfluss von FRET auf die Korrelationsfunktionen	91
8.3	Probenpräparation, Aufbau und Durchführung	92
8.4	Spektrale Analyse des Assays	93
8.5	Echtzeit-Analyse des Protease-Verdaus auf Einzelmolekülebene	94
8.6	Zusammenfassung	100
<b>9</b>	<b>ANALYSE INTRAZELLULÄRER PROTEIN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN MITTELS TPCCS</b>	<b>101</b>
9.1	Biologische Relevanz der CaM/CaM-Kinase-II-Wechselwirkung	103
9.2	Zellkultur, Methoden und experimenteller Aufbau	106
9.3	Extrazelluläre Kontrollmessungen	108
9.4	Intrazelluläre Kontrollmessungen	109
9.5	Untersuchung der CaM-CaMKII-Wechselwirkung unter physiologischen Bedingungen	113
9.6	Zusammenfassung	118
<b>10</b>	<b>DREIFARBIGE TPCCS: KONZEPTE UND ANWENDUNGEN</b>	<b>121</b>
10.1	Experimenteller Aufbau	121
10.2	Konzepte und Auswertung	123
10.3	Biochemisches Assay	124
10.4	Kalibration	125
10.5	Charakterisierung und dynamischer Bereich des biochemischen Assays	127
10.6	Maximierung des dynamischen Bereichs und Vereinfachung der Datenauswertung durch Koinzidenzanalyse	130
10.7	Kinetik der Hybridisierung dreier gelabelter Oligonukleotide an einen gemeinsamen DNA-Gegenstrang	132
10.8	Zusammenfassung	137
<b>11</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>139</b>