

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1 Absorption.....	5
2.2 Zerfallsprozesse eines angeregten Farbstoffmoleküls	6
2.3 Fluoreszenz.....	8
2.3.1 Eigenschaften der Fluoreszenz	8
2.3.1.1 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer	8
2.3.1.2 Polarisierung.....	10
Das <i>wobbling-in-a-cone</i> -Modell	12
2.3.2 Fluoreszenzlöschung.....	13
2.3.2.1 Dynamische Fluoreszenzlöschung	13
2.3.2.2 Statische Fluoreszenzlöschung	14
2.3.2.3 Quantenausbeuten der Löschung	14
2.3.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nach Förster	15
Bedingungen für Energietransfer.....	16
2.4 Fluoreszenzspektroskopie.....	19
2.4.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	19
2.4.2 Einzelmolekülspektroskopie.....	25
2.4.2.1 Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD)	25
Zwei verschiedene Auswerteprozessoren	25
Bestimmung der verschiedenen Fluoreszenzparameter	26
2.4.2.2 Selektive Spektroskopie.....	29
2.4.2.3 Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers.....	30
3 MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1 Spektroskopische Methoden.....	33
3.1.1 Absorptionsspektroskopie.....	33
3.1.2 Fluoreszenzspektroskopie	33
3.1.2.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie	33
3.1.2.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	34
3.1.2.3 Einzelmolekülspektroskopie mit Multiparameter-Fluoreszenzdetektion	34
Lichtquellen.....	34
Detektion der Photonen.....	35
Datenaufnahme.....	36
Auswahl eines Einzelmolekülereignisses.....	37
Bestimmung der Fluoreszenzparameter	38
2D-Darstellung.....	40
Vergleich der Signalspitzen-orientierten und der gleitenden Auswertung am Beispiel der Fluoreszenzlebensdauer.....	42

3.1.3 Software für Messungen und Auswertung.....	43
3.2 Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers.....	44
3.2.1 Allgemeine Grundlagen.....	44
3.2.2 Eigenschaften der Donor- und Akzeptorfarbstoffe.....	44
3.2.3 Bestimmung der Energietransfer-Parameter.....	45
3.2.3.1 Bestimmung des Überlappungsintegrals.....	46
3.2.3.2 Bestimmung des Försterabstands.....	46
3.2.3.3 Bestimmung der Transfereffizienz und des Fluorophorabstands im Molekül-ensemble.....	47
mit Hilfe der Donorfluoreszenz.....	48
- Fluoreszenzquantenausbeute.....	48
- Fluoreszenzlebensdauer.....	48
- über (ratio) _D	48
mit Hilfe der Akzeptorfluoreszenz.....	49
- über (ratio) _A	50
- über Ratiofunktion R _A	51
Weitere Methoden.....	52
3.2.3.4 Bestimmung der Transfereffizienz und des Fluorophorabstands mittels Multiparameter-Fluoreszenzdetektion.....	53
3.3 Chemikalien.....	54
3.4 Lösungsmittel und Puffer.....	55
3.5 Proben und Probenvorbereitung.....	55
3.5.1 Farbstoffe.....	55
3.5.2 Oligonukleotide.....	55
3.5.3 Mutanten der Reversen Transkriptase.....	56
4 EXPERIMENTELLER TEIL.....	59
4.1 Wechselwirkung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Nukleinsäuren.....	59
4.1.1 Farbstoffe und Nukleobasen frei in Lösung.....	59
4.1.2 Farbstoff gekoppelt mit Nukleobase.....	61
4.1.2.1 Untersuchungen von Rh6G-markierten Nukleotiden.....	63
4.1.2.2 Untersuchungen von JF4-markierten Nukleotiden.....	64
Spektren, FCS und MFD von konzentrierten Lösungen.....	64
Einzelmolekülmessungen.....	69
Zugabe von Triplettlöschern.....	71
4.1.3 Farbstoff am Oligonukleotid.....	80
4.1.3.1 „Grüne“ Fluoreszenzfarbstoffe.....	80
Rh6G am Oligonukleotid KFO.....	81
- Einzelmolekülmessungen.....	84
- Einschub: Selektive Spektroskopie.....	84
TMR am Oligonukleotid KFO.....	90

- Einzelmolekülmessungen	90
Rh6G, RhGr und Alexa488 am Oligonukleotid TKFO	91
- Einzelmolekülmessungen	92
4.1.3.2 „Rote“ Fluoreszenzfarbstoffe.....	95
Farbstoffe verschiedener Farbstoffklassen am Oligonukleotid.....	95
- Einzelmolekülmessungen	100
Zweifach-reaktives Cy5 am Oligonukleotid.....	103
- Einzelmolekülmessungen	108
RotS: Eine Alternative zu Cy5?	110
- Einzelmolekülmessungen	111
4.1.4 Zusammenfassung.....	112
4.2 Untersuchungen von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer an fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden	114
4.2.1 Variation des Abstandes von Donor- und Akzeptorfarbstoff	116
4.2.1.1 Einzelmolekülmessungen.....	118
4.2.2 Die Cis-Trans-Isomerisierung von Cy5	123
4.2.3 Verwendung verschiedener Akzeptorfarbstoffe	124
4.2.3.1 Einzelmolekülmessungen.....	126
4.2.4 Vergleich von verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren.....	128
4.2.4.1 Einzelmolekülmessungen.....	129
4.2.5 Zusammenfassung.....	135
4.3 Strukturuntersuchungen und kinetische Studien von HIV-1 Reverser Transkriptase im Komplex mit verschiedenen Nukleinsäuresubstraten.....	136
4.3.1 Einführung	136
4.3.1.1 Das Protein und seine Wirkungsweise.....	136
4.3.1.2 Die reverse Transkription.....	137
4.3.1.3 Enzymkinetik	139
4.3.1.4 Die Struktur der Reversen Transkriptase	140
4.3.2 Experimenteller Teil	142
4.3.2.1 Enzymsubstrate	142
4.3.2.2 Proteinmutanten	143
4.3.2.3 Voruntersuchungen	144
4.3.2.4 Untersuchungen der statischen Komplexe mit MFD	147
4.3.2.5 Untersuchungen der Polymerisation mit MFD	149
4.3.2.6 Modell der Substratbindung.....	151
4.3.2.7 Selektive Spektroskopie.....	154
4.3.3 Zusammenfassung.....	156
5 LITERATURVERZEICHNIS	157

ANHANG	169
<i>A Der Orientierungsfaktor κ^2</i>	169
<i>B Filter für die Spektroskopie</i>	171
<i>C Farbstoffe</i>	173
C1 Strukturen	173
C2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren	175
C3 Weitere spektroskopische Parameter	177
C4 Markierung mit Farbstoff	178
<i>D Sequenzen der Oligonukleotide</i>	180
D1 Bei Farbstoff- und FRET-Untersuchungen	180
D2 Bei FRET-Untersuchungen	181
D3 Bei Untersuchungen der Reversen Transkriptase	182
<i>E Exciton Splitting</i>	183
<i>F Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit zwei Donorpopulationen</i>	184
<i>G Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit verschiedenen Akzeptorfarbstoffen</i>	185
G1 Einfach-markiert mit Alexa488	185
G2 Farbstoffpaar Alexa488-Alexa633	186
G3 Farbstoffpaar Alexa488-Bodipy650	187
G4 Farbstoffpaar Alexa488-Cy5	188
G5 Farbstoffpaar Alexa488-LCR640	189
G6 Farbstoffpaar Alexa488-MR200	190
G7 Farbstoffpaar Alexa488-RotS	191
G8 Farbstoffpaar Alexa488-Sq635	192
<i>H Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren</i>	193
H1 Farbstoffpaar Rh6G-Cy5	193
H2 Farbstoffpaar Rh6G-Bodipy650	194
H3 Farbstoffpaar Cy3-Cy5	195
H4 Farbstoffpaar Cy3-Bodipy650	196
<i>I Ergebnisse der Strukturuntersuchungen der Donor-markierten Mutanten von Reverser Transkriptase mit verschiedenen Akzeptor-markierten Substraten</i>	197
I1 Mutante Q6C(p66)	198
I2 Mutante T27C(p66)	199
I3 Mutante K287C(p66)	201
I4 Mutante Q6C(p51)	203
I5 Mutante K173C(p51)	205
I6 Mutante K281C(p51)	206
<i>J Abkürzungsverzeichnis</i>	208