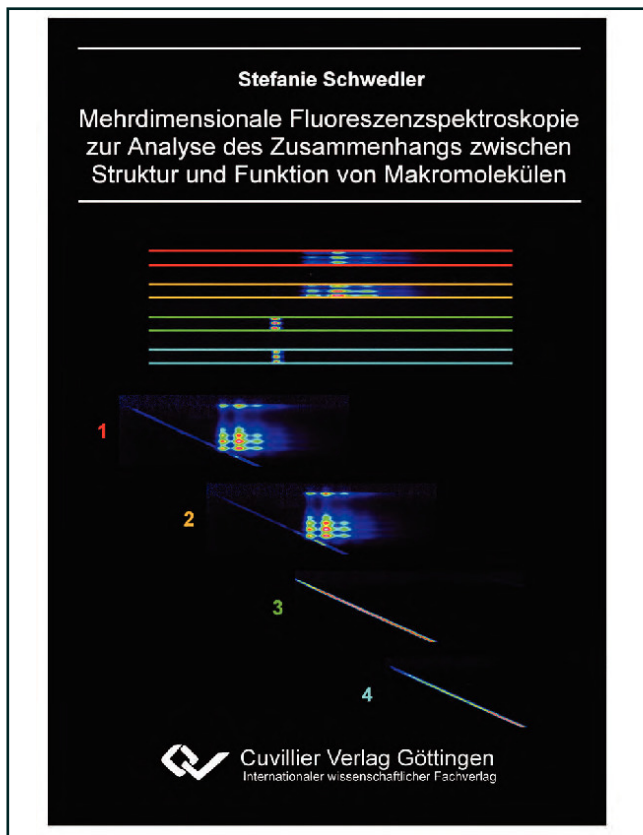




Stefanie Schwedler (Autor)

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, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Spektroskopie in der chemischen Diagnostik	1
1.2	Proteinstruktur und -dynamik	3
1.3	Fluoreszenzfarbstoffe	4
1.4	Zielsetzung	5
2	Theoretischer Hintergrund	9
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
3	Experiment	41
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
4	Datenbearbeitung	61
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
5	Spektrale Relaxation in <i>single tryptophan</i>-Proteinen	81
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
6	hs-FLIM: Optimierung und Anwendung	121
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 α -Synuclein	135
6.5	Zusammenfassung	141
7	Photophysik der Benzodiazaborole	143
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
8	Zusammenfassung	187
A	Anhang	191
A.1	Charakterisierung der Benzodiazaborole	191
A.2	Separation von Fluorophorbeiträgen	194
A.3	Untersuchung verschiedener eYFP-Mutanten	195
	Abkürzungsverzeichnis	197
	Literaturverzeichnis	199

