

---

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHER TEIL</b>	
2.1 FLUORESZENZ, FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE UND FLUORESZENZLEBENSDAUER.....	5
2.1.1 <i>Fluoreszenzlebensdauer</i> .....	6
2.1.2 <i>Fluoreszenzanisotropie</i> .....	8
2.2 FLUORESZENZLÖSCHUNG .....	10
2.3 FLUORESZENZ RESONANZ ENERGIE TRANSFER (FRET).....	11
2.4 FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS) .....	16
<b>3 EXPERIMENTELLER TEIL</b>	
3.1 MATERIAL .....	20
3.2 BESTIMMUNG VON FLUORESZENZLEBENSDAUER, ANISOTROPIE UND FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE.....	24
3.2.1 <i>Fluoreszenzlebensdauer</i> .....	26
3.2.2 <i>Zeitaufgelöste und stationäre Anisotropie</i> .....	27
3.2.3 <i>Anpassung der Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie bei     Einzelmolekülmessungen</i> .....	29
3.2.4 <i>Bestimmung der Akzeptorlebensdauer</i> .....	30
3.2.5 <i>Standardabweichungen für <math>\tau</math>, <math>\rho</math> und <math>r</math> im Einzelmolekülexperiment</i> .....	30
3.2.6 <i>Fluoreszenzquantenausbeute</i> .....	31
3.3 MULTI-PARAMETER-FLUORESZENZ-DETEKTION (MFD).....	32
3.3.1 <i>Konfokales Mikroskop</i> .....	32
3.3.2 <i>Durchführung der Messungen</i> .....	34
3.3.3 <i>Datenaufbereitung und Analyse</i> .....	35
3.3.4 <i>Darstellung der Daten</i> .....	38
3.3.5 <i>Speziesslektive Auswertungen</i> .....	40
3.4 FRET-BERECHNUNG BEI EINZELMOLEKÜLEXPERIMENTEN .....	41
3.4.1 <i>Bestimmung des Intensitätsverhältnisses <math>F_D/F_A</math></i> .....	41
3.4.2 <i>Die simultane Verwendung von <math>F_D/F_A</math> und <math>\tau_{D(A)}</math> zur Bestimmung von <math>E_T</math></i> .....	44
3.4.3 <i>Ein neuer Weg zur direkten Berechnung von <math>R_{DA}</math></i> .....	47
3.4.4 <i>Die Bestimmung der Fluorophorbeweglichkeit</i> .....	49

3.4.5 Die Bedeutung des Shot-noise für die Einzelmolekülspektroskopie.....	51
3.5 ANALYSE VON DYNAMISCHEN GLEICHGEWICHTSREAKTIONEN AUF EINZELMOLEKÜLEBENE	
3.5.1 Zeitauflösung im Einzelmolekülexperiment .....	52
3.5.2 Zeitfensteranalyse (Intra-Burst-Analyse) .....	54
3.5.3 Die Korrelationsanalyse .....	56
3.6 DIE KORREKTUR DER FLUORESCENZLEBENSDAUERN .....	59
3.6.1 Erstes Modell: irreversible dynamische Löschung .....	60
3.6.2 Zweites Modell: Reversible Löschung: Exciplex-Gleichgewicht .....	62
3.7 DIE UNTERSUCHTEN BIOMOLEKÜLE.....	68
3.7.1 DNA-Synthese und Sequenzen für die DNA-Strukturuntersuchung.....	68
3.7.2 Die Holliday-Junctions: Synthese der Sequenzen, Hybridisierung und Meßbedingungen.....	70
3.7.3 SNARE.....	72
<b>4 DNA-STRUKTURANALYSE</b>	
4.1 ZIELSETZUNG DER STUDIE.....	75
4.2 DAS KONZEPT .....	75
4.3 DIE ERGEBNISSE.....	78
4.3.1 Die Eigenschaften des Donorfluorophors Alexa 488.....	78
4.3.2 Die Eigenschaften des Akzeptorfluorophors Cy5.....	82
4.3.3.....	85
4.3.4 Die Heterogenität der Proben.....	85
4.3.5 Bestimmung des Försterradius $R_0$ .....	87
4.3.6 Die Bestimmung der FRET-Effizienz .....	89
4.3.7 Bestimmung der Fluorophorposition .....	93
4.4 MACHBARKEITSSTUDIE: ANALYSE EINER HETEROGENEN FRET-PROBE .....	97
4.5 FAZIT DER EINZELMOLEKÜL FRET EXPERIMENTE MIT DNA DOPPELSTRÄNGEN.....	99
<b>5 UNTERSUCHUNG DER KONFORMERVERTEILUNG BEI EINER HOLLIDAY- JUNCTION</b>	
5.1 ALLGEMEINES ZUR HOLLIDAY-JUNCTION.....	100
5.2 ZIELSETZUNG DIESER STUDIE .....	103
5.3 DIE VERWENDETE HOLLIDAY-JUNCTION .....	104
5.4 EIGENSCHAFTEN DER FLUOROPHORE .....	106

---

5.5 ABSTÄNDE IN DER HOLLIDAY-JUNCTION UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN .....	107
5.5.1 Die relativen Anteile der A/D- und A/B-Konformere .....	108
5.5.2 Bestimmung des interhelikalen Winkels .....	109
5.6 MESSUNG DER HOLLIDAY JUNCTION BEI VERSCHIEDENEN $Mg^{2+}$ -KONZENTRATIONEN..	112
5.7 KINETISCHE BETRACHTUNG DES KONFORMEREN-GLEICHGEWICHTS BEI DER HOLLIDAY- JUNCTION .....	116
5.7.1 Die Zeitfensteranalyse .....	116
5.7.2 Die Korrelationsanalyse .....	118
5.7.3 Die Bestimmung der Relaxationszeit der FRET-Dynamik .....	119
5.7.4 Geschwindigkeitskonstanten $k_1$ und $k_{-1}$ für die Umfaltung der Holliday-Junction	121
5.8 FAZIT DER UNTERSUCHUNGEN AN DER HOLLIDAY JUNCTION.....	122
<b>6 STRUKTUR- UND DYNAMIK EINES SNARE-PROTEINS</b>	
6.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN.....	122
6.2 ZIEL DER STUDIE .....	125
6.3 DIE VERSCHIEDENEN MUTANTEN DES SYNTAXINS .....	126
6.4 DIE EIGENSCHAFTEN DES DONORFLUOROPHORS .....	128
6.4.1 Fluoreszenzlebensdauer .....	128
6.4.2 Fluorophorbeweglichkeit .....	129
6.5 DIE BESTIMMUNG DER ABSTÄNDE IM SYNTAXIN .....	131
6.5.1 Das freie Syntaxin .....	132
6.5.2 Syntaxin im Komplex.....	134
6.6 ANALYSE DER KINETIK ZWISCHEN ZWEI KONFORMEREN DES SYNTAXINS.....	137
6.6.1 Schrittweise Zeitfensteranalyse .....	137
6.6.2 Gleitende Zeitfensteranalyse .....	139
6.6.3 Die Fluoreszenz-Korrelations-Analyse .....	140
6.7 DAS STRUKTURMODELL .....	143
6.8 FAZIT.....	146
<b>7 Literatur.....</b>	<b>147</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>153</b>