

## **3 Experimentelle Methoden**

Dieses Kapitel enthält die Beschreibung der verwendeten Experimente und Proben. Im ersten Kapitel 3.1 wird der neue Meßaufbau zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung detailliert beschrieben. Im Unterkapitel 3.1.1 wird dazu das Meßprinzip in Verbindung mit schematischen Darstellungen erläutert. Die Abschnitte 3.1.2 bis 3.1.5 enthalten Beschreibungen der elektronischen Komponenten, der optischen Komponenten, der Steuerungssoftware sowie der Datenanalyse. Im Kapitel 3.2 sind die Beschreibung der Apparatur sowie die Meßbedingungen der Gleichlichtexperimente aufgeführt. Im darauffolgenden Kapitel 3.3 sind neben den Angaben zu den Standardmeßbedingungen Erläuterungen zu den Präparationen enthalten. Das abschließende Kapitel 3.4 stellt die verwendeten extrinsischen Fluoreszenzmarker vor. Neben den Strukturen und spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenzmarker sind auch die reaktiven Gruppen der Proteine Bacteriorhodopsin und Rhodopsin angegeben, an welche die Fluorophore gekoppelt wurden.

### **3.1 Die neue Apparatur zur Detektion zeitaufgelöster Fluoreszenz unter Anregung mittels Synchrotronstrahlung**

#### **3.1.1 Das Meßprinzip des neuen Aufbaus**

Zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie wurde ein apparativer Aufbau entwickelt, der auf dem Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beruht [O'Connor und Phillips, 1984; Lakowicz, 1983]. Die Konzeption erfolgte speziell zur Anwendung an Synchrotronstrahlungsquellen, was aufgrund der zeitlich instabilen Anregungsimpulse zu einem erhöhten Aufwand führte [siehe auch Kelly et al. 1997]. Der optische Aufbau wurde in eine lichtundurchlässige transportable Systembox integriert, die über Umlenkspiegel mit dem Lichtaustritt der Synchrotron Speicherringe der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H. (BESSY 1) oder des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB) verbunden war. Das im Speicherring der Synchrotronanlage erzeugte Licht ist im Zentrum des Strahlquerschnitts linear polarisiert (parallel zur Ringebene) und besitzt am oberen und unteren Randbereich zirkular polarisierte Komponenten. Die Monochromatoren der Strahlrohre wurden auf die nullte Ordnung eingestellt und dann die Anregungswellenlängen mit dem Monochromator des eigenen Meßaufbaus selektiert. Gemessen wurde im Einzelpaketmodus der Synchrotronanlagen bei einer Impulsrate von 5 MHz, was einem Abstand von 200 ns zwischen den Anregungsimpulsen entsprach. Der Mehrpaketmodus hatte im Gegensatz dazu eine Wiederholrate von 500 MHz, also einen Impulsabstand von 2 ns. Die Totzeit der Elektronik würde in diesem Fall zu einem hohen Verhältnis der Anregungsimpulse zu den registrierten Photonen von ca.  $10^4:1$  führen, was bei den lichtempfindlichen Proben ein zu starkes Ausbleichen während der Messung zur Folge hätte.

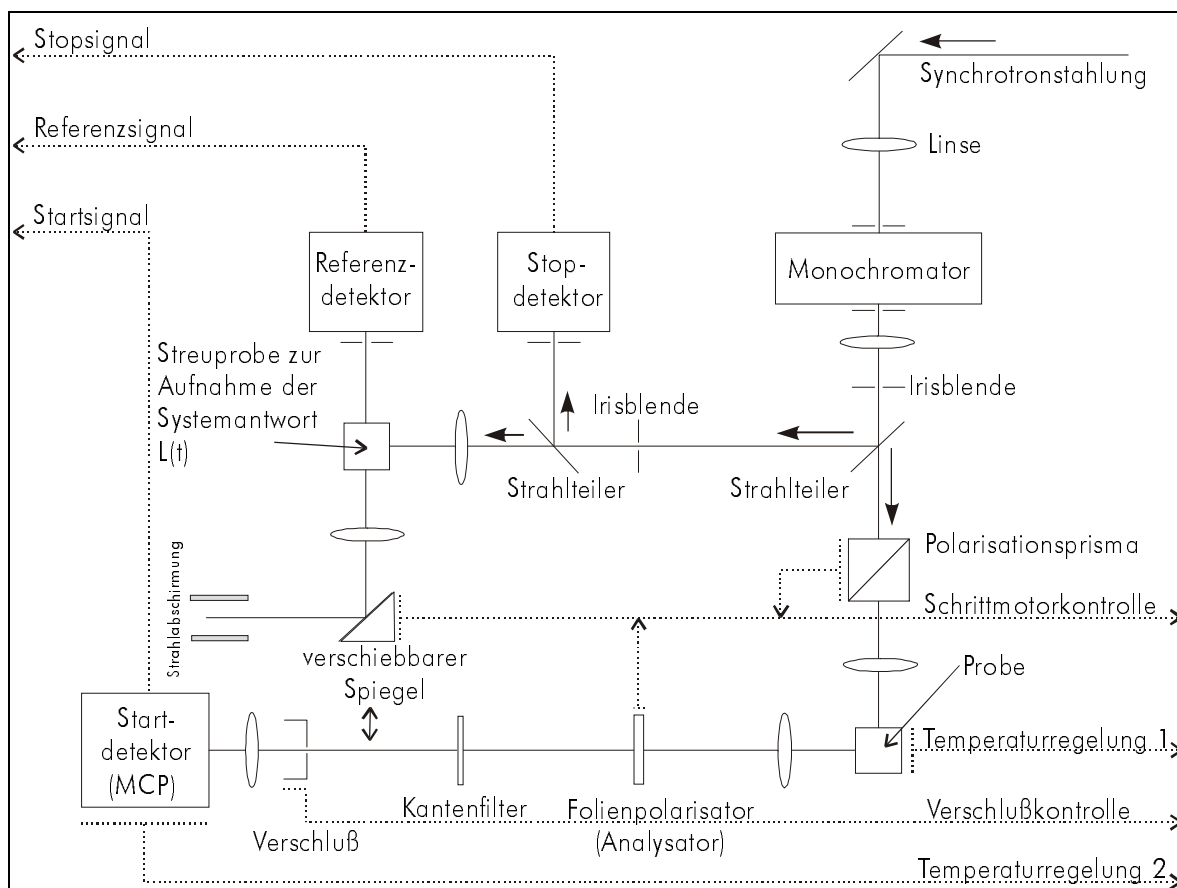
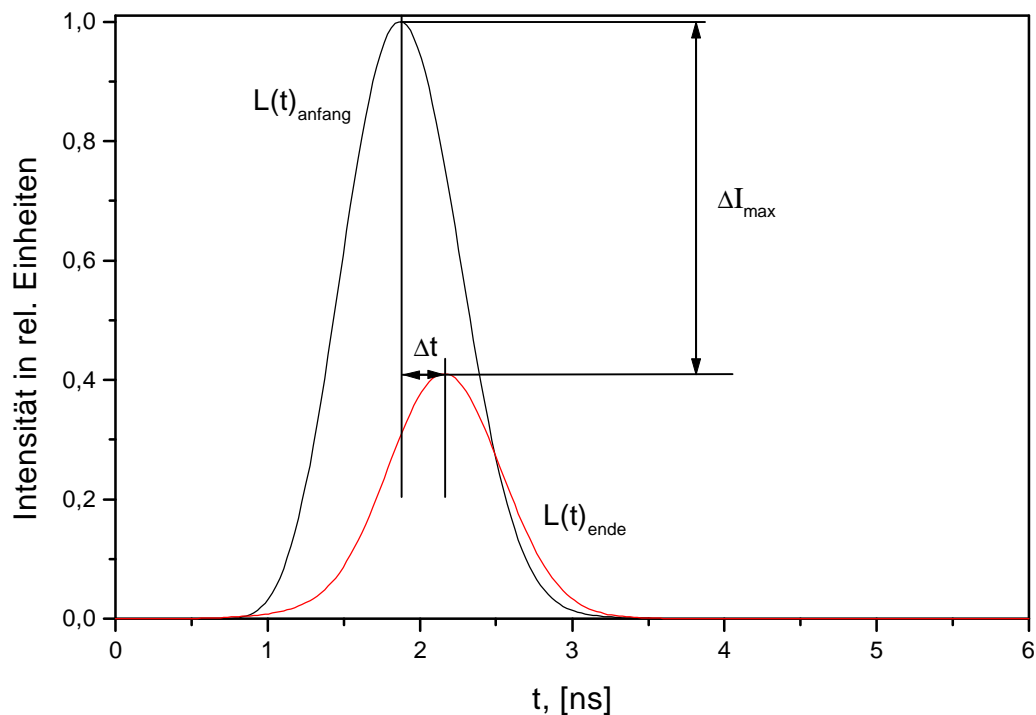


Abbildung 3-1 Meßaufbau der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung zum Einsatz an Synchrotronanlagen. Die elektronischen Steuerungs- und Signalverbindungen sind durch gepunktete Linien dargestellt. Die nach außen weisenden Pfeile an den gepunkteten Linien kennzeichnen eine weitere Verarbeitung der Signale. Nach dem Eingangsmonochromator ist der Strahlengang geteilt. Ein Anteil des Anregungslichtes wird über eine Streuprobe und einen verschiebbaren Spiegel auf den MCP-Detektor gelenkt und mit dem anderen Anteil wird die Probe linear polarisiert zur Fluoreszenz angeregt.

Die in Abbildung 3-1 gezeigte Konfiguration diente der periodischen Akkumulation der Probenfluoreszenz sowie der Systemantwort<sup>23</sup>  $L(t)$ . Diese Addition aufeinander folgender kurzer Meßzyklen war notwendig, da sich das Intensitätsprofil sowie dessen Position auf der Zeitskala während der Messung änderte (Abbildung 3-2). Das aus dem Eingangsmonochromator austretende Anregungslicht wurde nach Parallelisierung mittels Linse zu einem geringen Teil durch eine eingefügte Quarzplatte in den Referenzstrahlengang reflektiert. Innerhalb dieses Strahlengangs lenkte eine weitere Quarzplatte einen Anteil des Lichtes auf einen Detektor, dessen diskriminiertes Ausgangssignal das Stopsignal an einem Zeit-Amplituden-Konverter (TAC)<sup>24</sup> bildete. Das Signal wurde anstelle der Paketmarkierung verwendet. Dieser Spannungsimpuls, der mit den im Speicherring umlaufenden Elektronenpaketen zeitlich korreliert ist, besaß eine Instabilität von bis zu 150 ps.

<sup>23</sup> impuls response function, IRF

<sup>24</sup> time to amplitude converter

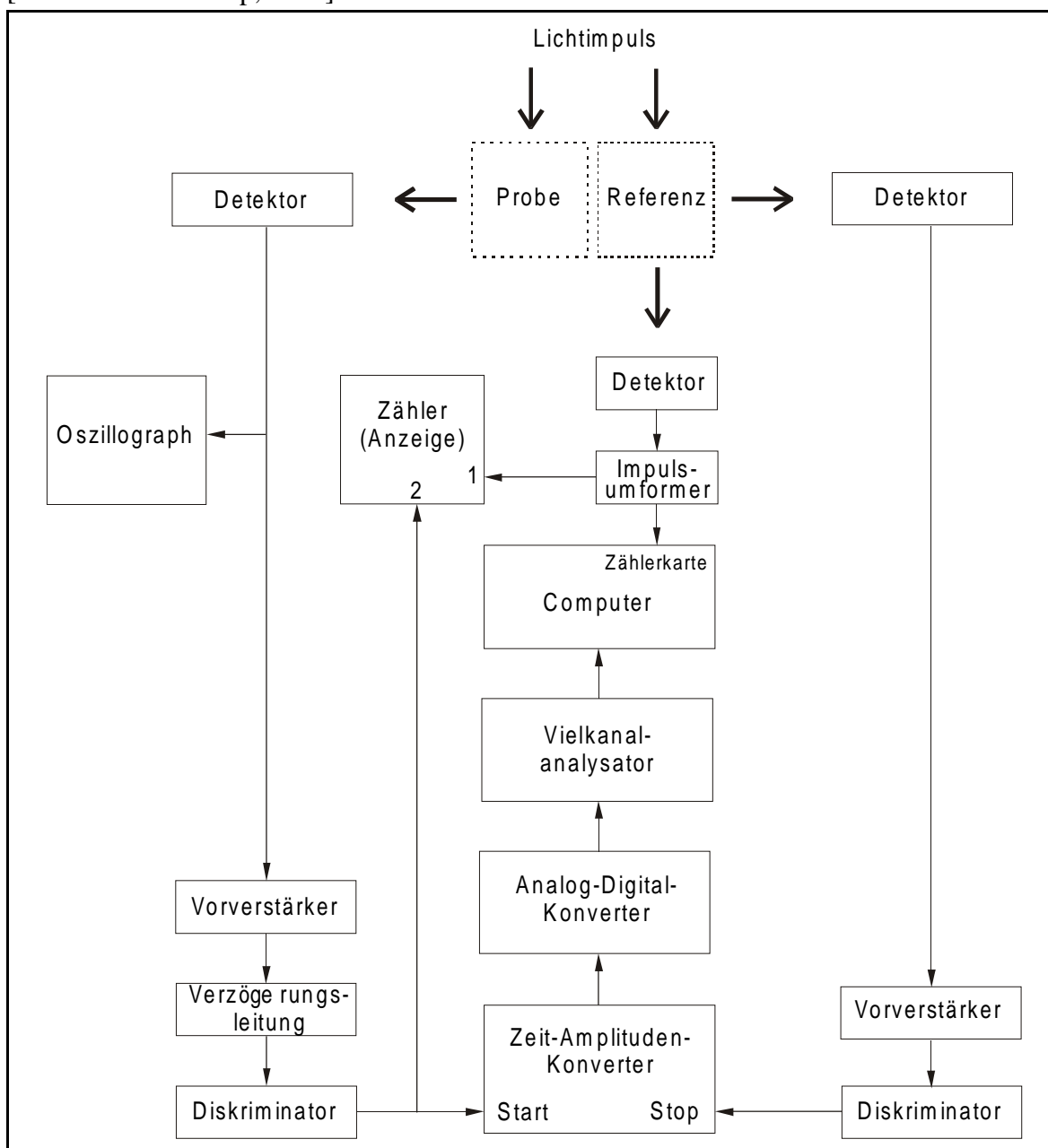


**Abbildung 3-2** Systemantworten der Synchrotronanregungsimpulse zu Beginn  $L_{\text{anfang}}(t)$  und am Ende  $L_{\text{ende}}(t)$  eines Nutzungszyklus der Berliner Synchrotronanlage BESSY 1. Die Nutzungszyklen sind durch Injektionen neuer Elektronenpakete in den Speicherring bedingt. Die Intensität fiel bei der dargestellten Messung um 59 % und das Impulsmaximum verschob sich um 290 ps während einer Zyklusdauer von 3 Stunden.

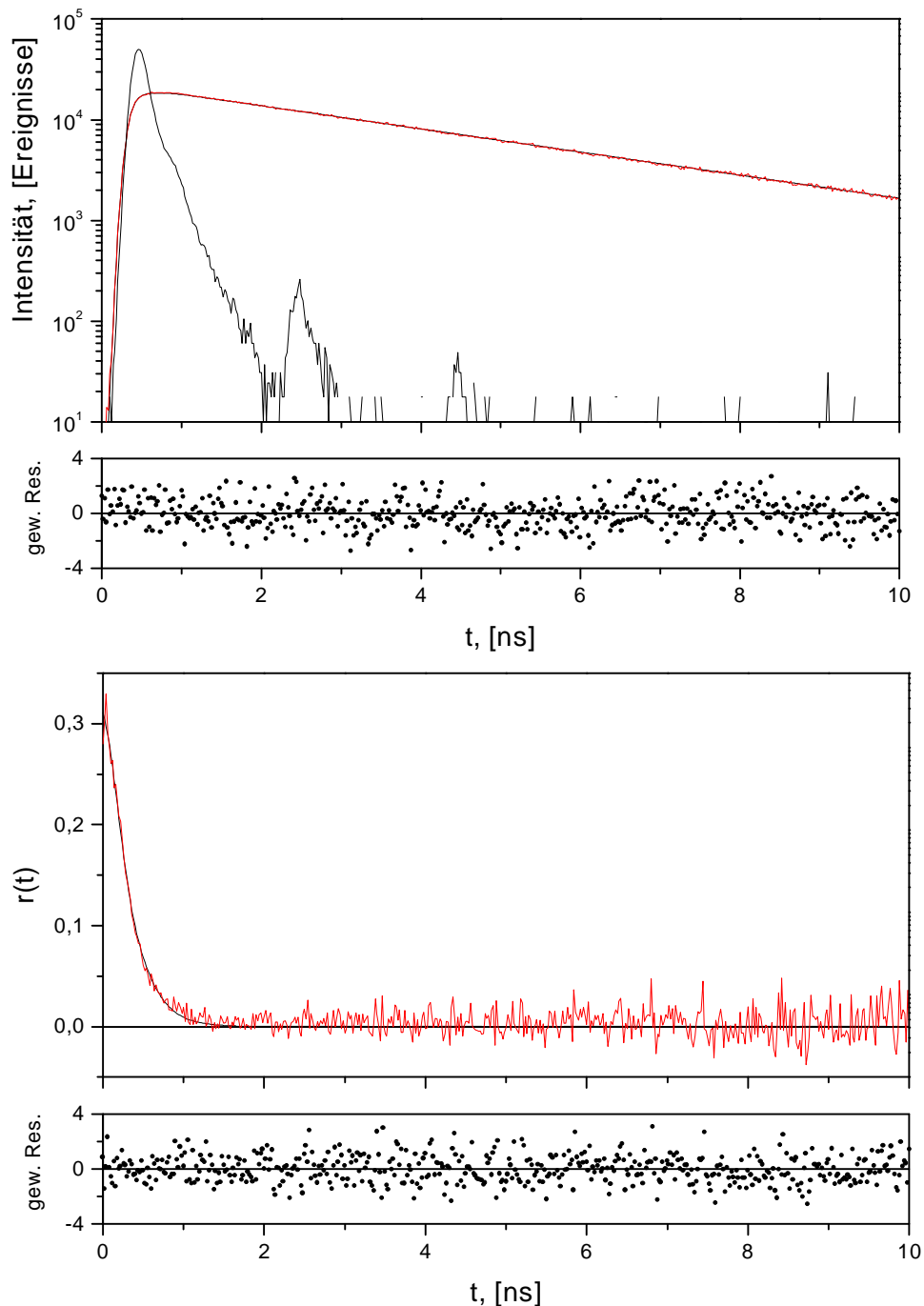
Die Verwendung eines eigenen stabileren Stoppsignals verbesserte die Zeitauflösung. Der Rest des Referenzlichtes gelangte auf eine Streuküvette (Ludox, DuPont Co.). Ein Teil des Streulichtes wurde von einem dritten Detektor, dessen Signal auf einer Zählerkarte registriert wurde, zur Normierung der Intensität benutzt. Über einen verschiebbaren Spiegel gelangte der verbleibende Anteil des Streulichtes auf den Hauptdetektor. Bei der Messung der Systemantwort  $L(t)$  war der zweite Lichtweg, der des Fluoreszenzstrahlengangs, durch eine Abdeckung hinter dem verschiebbaren Spiegel blockiert. Die mittleren Halbwertsbreiten von  $L(t)$  lagen bei der BESSY-Anlage zwischen 600 und 900 ps<sup>25</sup> und am HASYLAB bei 200 ps. Sie wurden hauptsächlich durch die Synchrotronimpulsbreiten bestimmt. Im Fluoreszenzstrahlengang wurde das Anregungslicht durch ein Polarisationsprisma senkrecht zur Tischebene linear polarisiert und danach mit einer Linse auf die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht der Probe gelangte durch einen Folienpolarisator (Analysator) und einen Kantenfilter auf den Hauptdetektor. Ein einzelner Meßzyklus bestand aus der Aufnahme von  $I_{\parallel}(t)$ ,  $I_{\perp}(t)$  und  $L(t)$ , wobei  $I_{\parallel}(t)$  und  $I_{\perp}(t)$  die Fluoreszenzintensitäten bei Stellung des Analysators parallel beziehungsweise senkrecht in bezug auf die vertikale Stellung des Eingangspolarisators bedeutet.

<sup>25</sup> Ein Vergleich findet sich in [Seifert und Rettig, 1994].

Mehrere Zyklen, deren Gesamtzahl durch die Zählrate der Probe bestimmt wurde, ergaben dann eine akkumulierte Zeitspur der Fluoreszenzanisotropie  $r(t)$ . Die Drehung der Polarisatoren sowie die Verschiebung des Spiegels wurde mit Hilfe von Schrittmotoren automatisiert. Den Messungen vorangehend wurde ein Korrekturparameter, der G-Faktor, bestimmt (Gleichung (2.10)). Dieser Faktor korrigierte die polarisationsabhängigen Einflüsse der Apparatur. Dessen Wert ergab sich bei horizontalem Eingangspolarisator aus dem Verhältnis von  $I_{\parallel}(t)$  und  $I_{\perp}(t)$ . In dieser Anregungsgeometrie gilt theoretisch  $I_{\parallel} = I_{\perp}$  [Michl und Thulstrup, 1995].



**Abbildung 3-3** Blockschaltbild der elektronischen Signalverarbeitung der Einzelphotonenzählung. Die Anlage wurde im invertierten Modus betrieben: ein von der Probe emittiertes Photon erzeugte das Startsignal und der Anregungsimpuls das Stoppsignal. Die Zähleranzeige und der Oszillograph wurden zur Überprüfung der Zählraten und der Impulsform verwendet.



**Abbildung 3-4** Zeitaufgelöste Fluoreszenz und Fluoreszenzanisotropie von ungebundenem IAF in 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 7, bei 15 °C. Unter den Kurven sind die den Anpassungen zugehörigen gewichteten Residuen dargestellt.

Das Ausgangssignal des Hauptdetektors wurde im weiteren nach einer Verzögerungsleitung durch einen Vorverstärker vergrößert, mit Hilfe eines Diskriminators normiert und auf den Starteingang des Zeit-Amplituden-Konverters (TAC) gegeben (Abbildung 3-3). Dieser wandelte die zeitliche Differenz zwischen dem Start- und Stoppsignal in einen Spannungswert um.

Dieses Spannungssignal wurde anschließend mittels eines schnellen Analog-Digital-Konverters (ADC)<sup>26</sup> digitalisiert und von einem Vielkanalanalysator (MCA)<sup>27</sup> registriert. Der Anteil des Streulichts am Signal betrug 1- 4 %. Die Zählraten lagen dem Einzelphotonenmodus entsprechend im Bereich von einigen  $10^3$ - $10^4$  eps (Ereignisse pro Sekunde), wobei  $10^5$ - $10^6$  Ereignisse im Maximum akkumuliert wurden. Die bei den Experimenten verwendete Zeitauflösung betrug 20-25 ps pro Kanal. Das gesamte Zeitfenster umfaßte 0- 20 ns. Mit den vorhandenen optischen Komponenten und der benutzten Strahlgeometrie wurde unter Verwendung von Diphenylhexatrien (DPH) in Glyzerin bei  $-5$  °C eine Anfangsanisotropie  $r_0$  von  $0,390 \pm 0,003$  gemessen. Ein Vergleich findet sich bei Heyn [Heyn, 1989] mit einem Wert von  $r_0 = 0,394$  und bei Kawato et al. [Kawato et al., 1977] mit  $r_0 = 0,395$ . Die Abweichung von dem theoretischen Wert von 0,4 (Gleichung (2.25)) kann aus einer geringen unterschiedlichen Orientierung der Lage der Übergangsdipolmomente von Absorption und Emission, einer unaufgelösten schnellen Bewegung, einem unzureichendem Lösungsverhältnis der Polarisatoren oder mangelnder paralleler Kollimierung des Strahlenganges resultieren. Der Standardtest zur Funktionstüchtigkeit der Anlage bestand in der Messung des ungebundenen Fluorescein-Derivates IAF in wäßriger Lösung (Abbildung 3-4). Fluoreszenz und Anisotropie mußten einer monoexponentiellen Anpassung ( $\chi^2_{\max} = 1,2$ ) genügen.

Die Anisotropiekurve war ein zusätzlicher Beleg für die Richtigkeit des G-Faktors, der vor der jeweiligen Messung bestimmt wurde und 1,00 - 1,05 betrug. Bei richtiger Bestimmung dieses Korrekturfaktors sollte die Kurve  $r(t)$  bei ungehinderter Rotationsdiffusion des Fluorophors auf  $r_\infty = 0$  abklingen. Der Fehler von G betrug  $\pm 0,003$ .

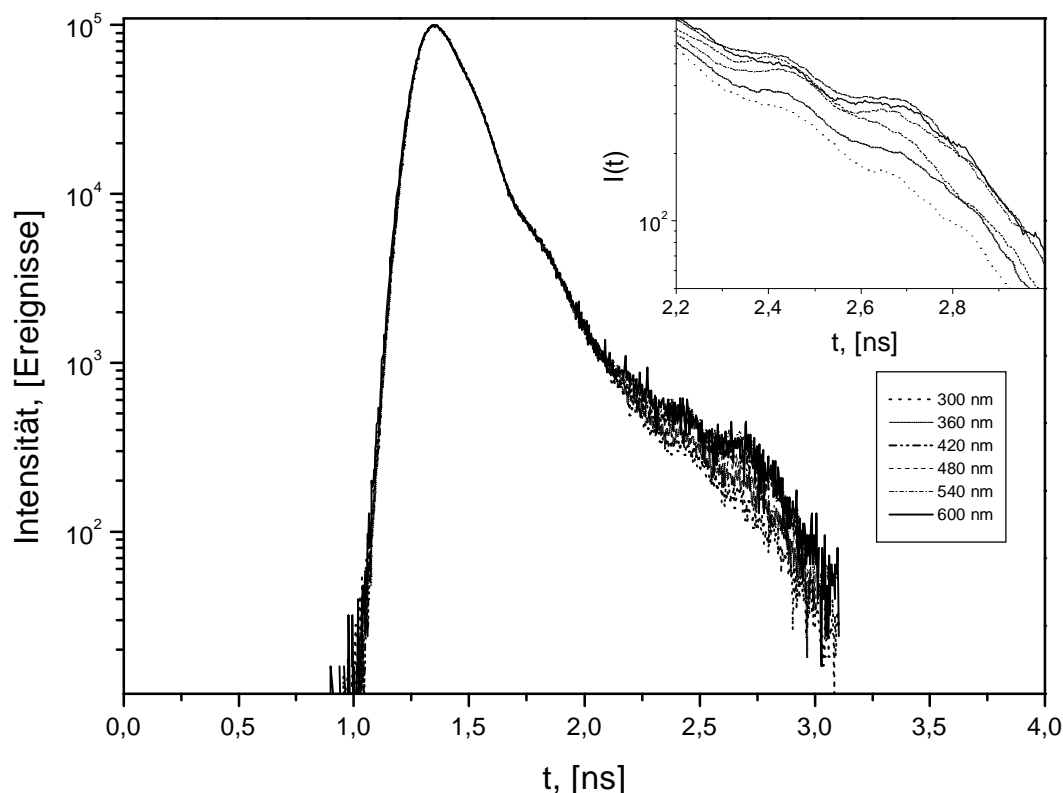
### 3.1.2 Die elektronischen Komponenten

Ein Blockschaltbild der elektronischen Komponenten ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Den Hauptdetektor bildete eine kompakte Mikrokanalplatte (Microchannel Plate Photomultiplier Tube, MCP-PMT, HAMAMATSU R3809U). Der Verstärkungseffekt dieser neuen Detektorgeneration basierte auf der Erzeugung von Sekundärelektronen innerhalb von kleinsten mit Aluminium beschichteten Glaskapillaren. Die Kapillaren des angegebenen MCP hatten einen Durchmesser von  $6 \mu\text{m}$  und waren zur Unterdrückung von Folgeimpulsen in zwei Bündeln hintereinander geneigt in dem evakuierten Photodetektor angeordnet (Chevron-Konfiguration). Die kurze Vervielfältigungsstrecke von ca. 4 cm ermöglichte eine kurze Impulsanstiegszeit, definiert als diejenige Zeit, die der Impuls zum Anstieg zwischen 10 % und 90 % seines Maximums benötigt. Nach Herstellerangaben betrug dieser Wert 160 ps bei dem verwendeten Detektor. Ebenso konnten konstruktionsbedingt die Laufzeitunterschiede der Elektronen auf ihrem Weg von der Kathode zur Anode gering gehalten werden. Die Laufzeitfluktuation, definiert als die Halbwertsbreite des auf ein Einzelphotoelektronenereignis folgenden Ausgangsimpulses, betrug 24,5 ps.

---

<sup>26</sup> analog to digital converter

<sup>27</sup> multi channel analyzer



**Abbildung 3-5** Die Impulsantwort  $L(t)$  der Meßapparatur bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Im Innenfenster sind die Kurven der Langzeitschulter vergrößert abgebildet. Die Messungen wurden am Hamburger Synchrotron HASYLAB durchgeführt. Die Halbwertsbreite von  $L(t)$  betrug 230 ps.

Das Multialkali-Kathodenmaterial (HAMAMATSU S-20) wies eine spektrale Empfindlichkeit zwischen 160 und 850 nm auf. Der Stromverstärkungsfaktor betrug  $3 \cdot 10^5$ , bei einer Versorgungsspannung von -3000 V. Das Kühlsystem des Detektors bestand aus einem temperierbaren Wasserkreislauf sowie einem in das Kühlgehäuse integrierten Peltier-Element. Der Wasserkreislauf wurde auf 0 °C geregelt. Bei einer Betriebstemperatur des Detektors von -30 °C betrug die mittlere Dunkelzählrate 10 eps (Ereignisse pro Sekunde). Die Eigenschaften des Ausgangssignals waren bis zu einem Wert von  $3 \cdot 10^6$  eps unabhängig von der Zählrate. Die Quantenausbeute variierte in dem verwendeten Spektralbereich zwischen 4 und 20 %. Die Versorgungsspannung von -3000 V lieferte ein Hochspannungs-NIM<sup>28</sup>-Modul mit separater Stromzuführung (EG&G ORTEC 456).

Es wurde eine Meßreihe zur Bestimmung der Farbabhängigkeit des Hauptdetektors durchgeführt. Dazu wurde die Systemantwort  $L(t)$  mit einer Streuprobe bei verschiedenen Anregungswellenlängen in dem Spektralbereich von 300 - 600 nm, in äquidistanten Abständen gemessen. Abbildung 3-5 zeigt die Meßkurven in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Die Wellenlängenselektion erfolgte durch den Eingangsmo-  
 chromator bei einer spektralen Spaltbreite von 6 nm.

<sup>28</sup> Nuclear Instrument Module

Die Darstellung zeigt einen geringen Effekt in der Langzeitschulter der Kurven. Zur Verdeutlichung dieses Effektes ist ein vergrößerter Ausschnitt abgebildet, bei dem die Kurven zusätzlich geglättet wurden. Das für die Entfaltung der Anisotropiekurven wesentliche Hauptprofil von  $L(t)$  blieb über dem gesamten Spektralbereich erhalten. Aufgrund der statistischen Geringfügigkeit des Effektes wurde auf die Verschiebung der Wellenlängen zu den jeweiligen Emissionswellenlängen der Proben, bei der Aufnahme von  $L(t)$  verzichtet.

Für die Generierung des Stoppsignals wurde ein Kopfensterdetektor (HAMAMATSU R5600P-01) verwendet. Dieser Metaldynodendetektor ist in seiner Funktionsweise ein klassischer Sekundärelektronenvervielfacher, der sich durch seine extrem kleine Bauweise auszeichnet. Die Neuerung in der Konstruktion bestand in der Anwendung spezieller Metallkanaldynoden, die sich in 8 Einzelsegmente untergliedern. Dieser Detektor stellte eine preiswerte Alternative zum MCP-PMT dar. Das gewählte Kathodenmaterial war in einem Bereich von 290-820 nm sensitiv. Die Impulsanstiegszeit betrug 0,65 ns, bei einer Versorgungsspannung von 750 V (NIM-Modul EG&G ORTEC 478) und einem Stromverstärkungsfaktor von  $7 \cdot 10^5$ . Der Detektor wurde ohne Kühlung betrieben, da dessen Rauschen keinen Einfluß auf die Signalkette hatte.

In dem Meßaufbau wurde ein weiterer Detektor benötigt (HAMAMATSU R2949), der die für die Normierung der Kurven erforderlichen Referenzereignisse registrierte (siehe Funktionsbeschreibung). Dieser einfache Seitenfensterdetektor besaß eine hohe Stromverstärkung von  $10^7$ , wodurch auf eine anschließende Verstärkung des Signals verzichtet werden konnte. Es ergaben sich keine Ansprüche an die Zeitparameter dieses Gerätes, so daß eine Impulsanstiegszeit von 2,2 ns und Laufzeitunterschiede von 1,2 ns seiner Funktion als Referenzzähler genügten. Die Ausgangssignale wurden ohne Kühlung bei einer Betriebsspannung von -950 V (EG&G ORTEC 456) aufgenommen. Der R2949 besaß eine spektrale Empfindlichkeit im Bereich von 200 - 900 nm und wurde bei Zählraten von  $10^4$  eps betrieben.

Der zur Verstärkung der Signale der Start- und Stop-PMT's eingesetzte Vorverstärker (EG&G ORTEC 9306, 1-GHz) war vom Hersteller auf den Anschluß an ultra schnelle Detektoren optimiert. Der Eingang akzeptierte Spannungsimpulse bis zu einem Wert von  $\pm 1$  V. Der Ausgang lieferte einen an den Bedarf des in der Signalkette folgenden Zeit-Amplituden-Konverters (TAC) angepaßten Spannungsbereich von 0 V bis 1,75 V, bei einer Impedanz von 50  $\Omega$ .

Unter dem angewendeten Prinzip der Zeitmessung war eine Diskriminierung der Impulse erforderlich. Es handelte sich dabei um eine Impulsumwandlung im Sinne einer Standardisierung auf der Zeitachse. Die elektronische Einheit lieferte zu einem in seiner Amplitude fluktuierenden Eingangspuls einen in seiner Form und Spannungshöhe definierten Ausgangspuls. Das schnelle Modul (EG&G ORTEC pico-Timing™ Discriminator 9307) wurde in die Signalverarbeitung hinter dem Hauptdetektor integriert. Unter optimalen Bedingungen ergab dieses Gerät in Verbindung mit dem Vorverstärker 9306 Breiten der Systemantwort  $L(t)$  von 30 - 60 ps (FWHM). Der minimale Input betrug -25 mV.



Die Schwankungen der Eingangsspannungsamplituden wurden noch bis zu einem Verhältnis von 100:1 ohne meßbare Schwankung des Ausgangssignals auf der Zeitachse ausgeglichen. Den Ausgang bildete ein 2,5 ns breiter -800 mV-Impuls (50  $\Omega$  Impedanz). Das verstärkte Stoppsignal wurde ebenfalls mit einem Diskriminator (Oxford Instruments Inc. CFD TC 453) verarbeitet. Der minimale Input betrug bei diesem NIM-Modul -5 mV, die Input-Rate maximal 100 MHz. Die weiteren Parameter lagen im Bereich der Werte des obigen Moduls. Die zeitliche Verschiebung des Ausgangssignals durch eine unterschiedlich hohe Eingangsspannung betrug  $\pm 50$  ps, bei Eingangssignalen zwischen -50 mV und -5 V.

Start- und Stoppsignale wurden vom Zeit-Amplituden-Konverter (TAC, ORTEC 566) registriert und die Eingangszeitdifferenz proportional in eine Ausgangsspannung vom maximal 10 V umgewandelt. Der wählbare Zeitbereich lag zwischen 10 ns und 20 ms. Die Zeitauflösung betrug 0,01 % der vollen Skala plus einem konstanten Wert von 5 ps. Bei niedrigen Spannungen zeigte das Gerät nichtlineare Konvertierungen. Für die Messungen wurde deshalb der Bereich oberhalb von 5 V verwendet.

Der ADC (Canberra 8715), ein schneller Wandler mit einer konstanten Totzeit von 800 ns, war für hohe Zählraten ausgelegt. Er besaß eine gute integrale und differentiale Linearität von  $\pm 0,025$  % beziehungsweise  $\pm 0,9$  % über 99,5 % des Zeitbereiches. Die Umwandlung erfolgte hauptsächlich zwischen 4-9 V. Die maximale Zeitauflösung betrug 5 Pikosekunden pro Kanal (ps/ch). Für die Messungen wurde im allgemeinen eine Auflösung von 20 ps/ch verwendet, bei einer Gesamtbreite von 1024 Kanälen, also einem Zeitfenster von 20 ns. Ein zusätzliches Modul war erforderlich, um die Ausgangsimpulse des Referenzdetektors an die Eingangsnorm der Zählereinschubkarte (Meilhaus ME-15) anzupassen. Dazu wurde ein 'Gate und Delay Generator' (EG&G ORTEC 416A) verwendet, dessen Ausgangssignal der erforderlichen TTL<sup>29</sup>-Norm entsprach. Weiterhin wurde eine 'Delay Box' (EG&G ORTEC DB 463) zur Verzögerung des Startsignals benutzt, um die notwendige Positionierung des TAC-Signals auf der Zeitachse zu realisieren. Zur ständigen Kontrolle und Optimierung des Aufbaus wurde ein Zähler-Einschub (Tennelec/Nucleus, Inc. Dual Counter/Timer TC 512) eingebaut, der die aktuellen Zählraten des Haupt- und des Referenzdetektors wiedergab. Die für die Signalverarbeitung bisher erwähnten elektronischen Einheiten entsprachen dem NIM-Standard und wurden, insofern keine separate Stromzuführung vorhanden war, in einem Versorgungsrahmen (EG&G ORTEC 4001C BIN) integriert. Der als Computereinschubkarte ausgelegte Vielkanalanalysator (MCA, CANBERRA Accuspec B) besaß eine Datenaufnahmebreite von bis zu 8192 Kanälen, bei 31 Bit pro Kanal. Seine maximale analoge Eingangsrate betrug 1 MHz. Die für die Automatisierung notwendigen Schrittmotoren wurden mit einem externen Modul (Conrad SMC 800) gesteuert, dessen Programmierung über die parallele Schnittstelle des Computers erfolgte. Die speziell angefertigte Probenhalterung war an einen Kühlkreislauf angeschlossen, dessen Temperatur ein Umwälzthermostat (Julabo F25) regelte. Das mit einem Peltier-Element versehene Kühlgehäuse des Haupt-Photomultipliers (Products for Research Inc. Refrigerated Chamber TE 104 RF) temperierte ein zweites Kühlaggregat (Julabo F 20).

---

<sup>29</sup> Transistor-Transistor-Logic

### 3.1.3 Die optischen Komponenten

Das Anregungslicht der nullten Ordnung des dem Strahlrohr zugeordneten Synchrotron-monochromators wurde nach Umlenkung mittels speziell justierter Spiegel und einer abbildenden Linse auf den Eingangsspalt des eigenen Monochromators (JOBIN YVON H.10 U.V.) fokussiert. Alle in der Apparatur verwendeten Linsen bestanden aus Quarzglas und waren somit auch für den nahen UV-Bereich durchlässig. Die spektrale Empfindlichkeit des Gittermonochromators reichte unter Einsatz eines holographischen Gitters mit 1200 Linien/mm von 200 bis 800 nm. Die Dispersion in Höhe der Spalte betrug 8 nm/mm, wobei die Spaltbreiten fest, aber austauschbar waren. Die häufigste Anwendung fanden Spaltbreiten von 0,5 und 1mm. Das Monochromatorstreulicht betrug im höherenergetischen Spektralbereich maximal 5 % und verringerte sich entsprechend bei Vergrößerung der gewählten Wellenlänge. Zur Unterdrückung des Streulichtes wurden folgende Interferenz- beziehungsweise Bandenfilter in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge eingesetzt (Firma Schott): IF 580, IF 484, IF 548, BF 380.

Zur Erzeugung der linearen Polarisation des Anregungslichtes in definierter Lage wurde ein UV-Glan-Taylor Polarisationsprisma (Spindler & Hoyer) verwendet. Dieses Prisma besaß für 2/3 der Apertur ein Lösungsverhältnis von  $5 \cdot 10^{-6}$ . Der Transmissionsbereich des Prismas betrug 214 - 2300 nm. Auf der Fluoreszenzseite wurde ein Folienpolarisator (Spindler & Hoyer) als 'Analysator' eingesetzt. Dessen spektraler Öffnungsbereich lag zwischen 280 und 800 nm mit einem Lösungsverhältnis von  $1 \cdot 10^{-4}$ . Um gestreutes Anregungslicht im Emissionsstrahlengang auszuschließen, wurden Kantenfilter (Firma Schott: KV 380, GG 455, OG 475, OG 515, RG 610) in Abhängigkeit vom Emissionsbereich des jeweiligen Fluoreszenzlabels eingebracht. Diese Form der Wellenlängenselektion wurde gegenüber einem Monochromators bevorzugt, um den Transmissionsgrad und somit das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Zusammenfassend ergab sich unter Einbeziehung aller Komponenten, die Empfindlichkeiten der Detektoren mit eingeschlossen, ein spektraler Funktionsbereich der neuen Meßapparatur von 290-800 nm.

### 3.1.4 Die Steuerungssoftware

Die Hauptsteuerroutine wurde in der Makrosprache des Vielkanalanalysators (MCA) entwickelt. Der Programmablauf enthielt Unterprogramme, die auf der Hochsprache 'C' basierten und an dem Suffix ".exe" zu erkennen sind. Diese Programme befanden sich als kompilierte Dateien im Makroablauf und vollzogen die Kommunikation zwischen der MCA-Steuerung und der DOS-Ebene des Computers. Das Hauptanliegen war eine vollständige Automatisierung der Meßwertaufnahme, was im Hauptprogramm eine Schleifenprogrammierung bedingte. Per Tastatur konnte die Messung in einfacher Weise unterbrochen (mit der Option sie später fortzusetzen) oder bei ausreichender Statistik beendet werden. Ein einzelner Meßdurchlauf dauerte ca. drei Minuten.

Zu Beginn der Hauptroutine wurde das Programm "null" aufgerufen. Dieses Unterprogramm legte die ASCII-Auslagerungsdateien "monpara" und "monsenk" an, in denen später die Referenzzählungen abgelegt wurden, die der Normierung der Fluoreszenzmessungen dienen. Die danach erzeugten virtuellen MCA-Konfigurationen bestimmten die Aufnahmen von  $I_{\parallel}(t)$ ,  $I_{\perp}(t)$  und  $L(t)$ .

Nach jedem Zyklus wurden die Inhalte dieser Konfigurationen ebenfalls in Auslagerungsdateien kopiert. Vor der jeweiligen Messung der Probenfluoreszenz wurden die Adressen- und Datenleitungen der im PC integrierten Zählerkarte mit "ini" eingerichtet. Die Puffer dieser Einschubkarte wurden nach Ablauf jeder einzelnen Fluoreszenzmessung mit "blickp(s)" ausgelesen und zu den in den Dateien "monpara" und "monsenk" befindlichen aktuellen Zählerwerten addiert.

In Abhängigkeit der zu messenden Funktion ( $I_{\parallel}(t)$ ,  $I_{\perp}(t)$  oder  $L(t)$ ) wurden die Programme "tischrau", "tischrei" und "analyza" gestartet. Die ersten beiden verschoben den undurchlässigen Spiegel parallel zum Hauptdetektor. Die Steuerung "tischrei" bewirkte dabei eine Verschiebung des Spiegels in den Strahlengang, die Voraussetzung für die Messung der Systemantwort  $L(t)$ . Das Aufrufen von "analyza" drehte den Analysators um  $90^\circ$ , unterschied somit zwischen  $I_{\parallel}(t)$  und  $I_{\perp}(t)$ . Bevor der Sprungbefehl am Ende der Programmschleife erschien wurde die C-Routine "darst" aufgerufen. Sie verarbeitete die Inhalte der Referenzdateien zu einem Normierungsfaktor und stellte dann die gemessene Funktion  $r(t)$  grafisch dar. Die Qualität der Messung konnte somit schnell überprüft werden. Eine Voraussetzung für die Messungen bestand in der vorherigen Bestimmung des G-Faktors. Dazu mußte das Programm "gfaktor" aus der Kommandozeile des MCA aufgerufen werden. Der Inhalt dieses Quelltextes wich durch zwei Veränderungen von der Hauptsteuerroutine ab. Zum einen mußte das Eingangspolarisationsprisma um  $90^\circ$  gedreht werden, denn die Funktionen  $I_{\parallel}(t)$  und  $I_{\perp}(t)$  wurden beim G-Faktor entsprechend seiner Definition unter parallel zur Tischebene polarisierter Anregung gemessen ("polari2") und zum anderen gab die Routine zum Ende jedes Zykluses nicht die Anisotropie, sondern den Wert des G-Faktors auf dem Bildschirm aus. Nach Abschluß einer vollständigen Messung wurden die binären Daten mit der Canberra Software "lotcnv" in ASCII-Formate konvertiert.

### 3.1.5 Datenanalyse

Zur Datenanalyse standen zwei Algorithmen zur Verfügung: Ein Fortran-Quelltext, der auf der Levenberg-Marquardt-Methode [Johnson, 1994] basierte und eine Anpassung der Fluoreszenz sowie der Fluoreszenzanisotropie mit maximal fünf Exponentialfunktionen erlaubte sowie eine C-Routine deren Parameteroptimierung auf einer Evolutionsstrategie beruhte [Rosenhagen, 1994]. Das C-Programm bot die Möglichkeit der Modellanpassung mittels einer Summe von drei Exponentialfunktionen und zusätzlichem gleichzeitigen oder einzelnen Fixieren der Anfangs- oder Endanisotropie. Die Evolutionsstrategie wies eine hervorragende Stabilität auf, benötigte jedoch durch das Zufallsprinzip einen erhöhten Rechenaufwand. Dieses C-Programm wurde im Rahmen dieser Arbeit stark modifiziert.

Das Einlesen der Meßdaten wurde mit dem Datenausgangsformat des MCA abgeglichen, eine Untergrundkorrektur eingebracht und die Fensterbreite von 256 bis 8192 Kanälen variabel gestaltet.

Die Anpassung der Meßdaten erfolgte als iterative Faltung der Modellfunktion (einer Summe von Exponentialfunktionen) mit dem Anregungsprofil  $L(t)$ <sup>30</sup>.

Die Änderung der Modellparameter wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt [Grinvald und Steinberg, 1974], bei der die Anpassungsqualität durch die Minimierung des Parameters

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_{fit}(t_k)]^2 \quad (3.1)$$

verbessert wird [Straume et al., 1991; Johnson, 1994]. Summiert wird über  $n$  Datenpunkte, die bei der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung durch die Meßkanäle des MCA gegeben sind. Die Größen  $N(t_k)$  und  $N_{fit}(t_k)$  geben die Anzahl der gemessenen Ereignisse im  $k$ -ten Kanal beziehungsweise deren berechneter Wert an. Für die Poission-Statistik der Ereignisse ist die Standardabweichung durch die Quadratwurzel aus der Anzahl,  $\sigma_k = [N(t_k)]^{1/2}$ , gegeben, so daß Gleichung (3.1) formuliert werden kann als:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_{fit}(t_k)]^2}{N(t_k)}. \quad (3.2)$$

Im allgemeinen ist die Abhängigkeit von der Zahl der Datenpunkte nicht erwünscht und anstelle von Gleichung (3.2) wird die reduzierte Größe

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n - p - 1} \quad (3.3)$$

verwendet. Der Nenner beschreibt dabei die Anzahl der Freiheitsgrade, zusammengesetzt aus  $n$  Datenpunkten sowie  $p$  freien Anpassungsparametern. Als weiteres Kriterium der Anpassungsgüte wurden die gewichteten Residuen  $R(t_k)_{gew}$  verwendet:

$$R(t_k)_{(gew)} = \frac{N(t_k) - N_{fit}(t_k)}{\sqrt{N(t_k)}} \quad (3.4)$$

Werden die Abweichungen ausschließlich durch zufällige Fehler verursacht, kommt es zu einer gleichförmig streuenden Verteilung der gewichteten Residuen über den Datenpunkten.

---

<sup>30</sup> siehe auch Gleichung (2.7)

### 3.2 Gleichlichtspektroskopie

Zur Probencharakterisierung wurden Absorptionsspektren mit einem Zweistrahlphotometer (Shimadzu UV-2102PC) aufgenommen. Im Referenzstrahlengang befand sich zur Korrektur der Untergrundextinktion während der Meßwertaufnahme eine Küvette mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Probe.

Die Messungen wurden mit einem vom Hersteller angebotenen Streueinsatz vorgenommen, der die von der Probe gestreuten Photonen sammelte und wieder auf den Detektor lenkte. Die verbleibende Reduzierung der Intensität im Strahlengang der Probe wurde somit nur durch die zu messende Absorption hervorgerufen.

Die Absorptionswerte wurden in der einheitslosen Größe OD (Optische Dichte) angegeben. Für die optische Dichte gilt  $OD = \epsilon cd$ <sup>31</sup>. In dieser Formel bezeichnet  $\epsilon$  den Extinktionskoeffizienten,  $c$  die Konzentration und  $d$  die Dicke der Probe. Die Angaben der Absorptionswerte sind dadurch dimensionslos. Die spektrale Spaltbreite betrug 2 nm, bei einer Scangeschwindigkeit von 200 nm/min und einem Intervallwert von 1 nm. Der verwendete Spektralbereich konnte zwischen 250 und 800 nm gewählt werden und wurde der jeweiligen Probe angepaßt.

Die Gleichlichtfluoreszenzspektren wurden an einer Doppelmonochromator-Apparatur (Kratos Spektrofluorometer RRS 1000) aufgenommen, deren Anregungslichtquelle aus einer Xenon-Bogenlampe bestand. Der Eingangs-Tandem-Gittermonochromator mit einer Czerny-Turner Anordnung besaß eine Dispersion von 1,6 nm/mm am Austrittsspalt, bei einem Transmissionsbereich von 200-800 nm. Die Streulichtunterdrückung dieses Systems betrug  $5 \cdot 10^{-6}$ . Die auch für die Gleichlichtanisotropie konzipierte T-Konfiguration besaß eine temperierbare Probenhalterung in einer abgeschlossenen Probenkammer mit von außen verstellbaren Ein- und Ausgangspolarisatoren. Die Emissionsmonochromatoren besaßen eine Dispersion von 3,3 nm/mm an ihren Austrittspalten. Als Detektoren wurden hochverstärkende Kopffensterausführungen verwendet (RCA Q 4283 b), die sich in thermoelektrischen Kühlgehäusen befanden. Der nutzbare Spektralbereich der Emissionsseite lag zwischen 350 und 750 nm. Die Meßwertaufnahme erfolgte automatisiert. Im allgemeinen wurden Meßgeschwindigkeiten von 50 nm/min bei Spaltenbreiten von 0,5 mm verwendet. Die OD-Werte der Maxima in den untersuchten Spektralbereichen betrugen maximal 0,05, um eine Verfälschung der Emissionsspektren durch einen inneren Filtereffekt zu vermeiden. Die Proben temperatur wurde während der Messung mit einem an den Probenhalter angeschlossenen Thermostaten konstant gehalten. Die Fluoreszenzspektren wurden nach den Messungen bezüglich der Wellenlängenabhängigkeit der Apparatur auf der Emissionsseite korrigiert. Die Spektren der Quenching-Experimente am lichtempfindlichen Rhodopsin wurden mit der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit von 200 nm/min detektiert, um Veränderungen des Meßsignals durch Zustandsänderungen des Proteins zu minimieren. Die Auswahl der Spaltbreiten erfolgte derart, daß bei minimierter Anregungsintensität ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wurde.

---

<sup>31</sup> Nach dem Lambert-Beersche Gesetz gilt  $I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\epsilon cd}$ , wobei  $I_0(\lambda)$  die Intensität vor und  $I(\lambda)$  die Intensität nach der Absorption bezeichnet.

### 3.3 Präparation der Proteinproben und Meßbedingungen

Die umfangreichen Basispräparationen der Proteine Bacteriorhodopsin und Rhodopsin, die Herstellung der Mutanten sowie die kovalente Ankopplung der verschiedenen extrinsischen Fluoreszenzmarker wurden von Frau Dr. U. Alexiev, Herrn T. Mielke sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Khorana (MIT)<sup>32</sup> durchgeführt.

Das Wildtyp Bacteriorhodopsin wurde nach einem Standardverfahren nach Oesterhelt und Stoeckenius aus Halobakterien gewonnen [Oesterhelt und Stoeckenius, 1974]. Das Bacteriorhodopsin enthält keine Cysteine in seiner nativen Polypeptidsequenz. Deshalb wurden Mutanten verwendet, bei denen mittels gezielter Mutagenese ausgewählte Aminosäuren gegen Cystein ausgetauscht wurden. Eine Beschreibung der Expression und Präparation der Bacteriorhodopsin-Mutanten in Halobakterien wurde von Krebs et al. [Krebs et al., 1993] und Alexiev et al. [Alexiev et al., 1995] dokumentiert. Die Solubilisierung der Purpurmembranen und die Regenerierung in CHAPS<sup>33</sup>-Mizellen erfolgte nach dem Verfahren von Liao et al., daß von Scherrer et al. modifiziert wurde [Liao et al., 1983; Scherrer et al., 1994].

Bei einer Reihe von Proben wurde die Schiffische Base des Retinals reduziert [Peters et al., 1976]. Die Reduzierung erfolgte durch Zugabe von 1 % (wt/vol.) NaBH<sub>4</sub> und unter Bestrahlung mit orangem Licht (500-600 nm). Nach einmaligem Waschen mit kaltem Wasser wurden die Proben bei 0 °C unter Stickstoff mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Das charakteristische Absorptionsspektrum einer solchen Probe ist in Abbildung 6-3 dargestellt.

Zur Herstellung der Rhodopsin-Proben wurden Netzhäute der Augen frisch geschlachteter Rinder verwendet. Nach Präparation der Retinae wurden ROS-Membranen bei niedriger Salzkonzentration nach der Methode von McDowell und Kühn [McDowell und Kühn, 1977] isoliert und über einen stufenförmigen Saccharosedichtegradienten gereinigt. Die Membranen wurden in 3 mM Tris, 150 mM NaCl und 1 mM DTT aufgenommen und bei – 80 °C unter Argon gelagert. Für die Fluoreszenzexperimente wurde das Rhodopsin in Analogie zu den Bacteriorhodopsin-Proben in der Form von Membranfragmenten oder als OG<sup>34</sup>-Mizellen verwendet. Zur Herstellung von Rhodopsin-Mizellen wurden ROS-Membranen in Wasser gewaschen und bei einer Rhodopsin-Konzentration von 2 mg/ml in 20 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 100 mM OG 30 min unter Rühren bei 4 °C solubilisiert. Nicht solubilisierte Partikel wurden durch Zentrifugation entfernt und die Rhodopsin-Mizellen nach einer modifizierten Methode von DeGrip [DeGrip, 1982a] mittels ConA-Affinitätschromatographie gereinigt. Eine ausführliche Beschreibung der Rhodopsin-Präparation und Markierung findet sich in [Mielke, 2000].

---

<sup>32</sup> Massachusetts Institute of Technology

<sup>33</sup> 3-[(3-Cholamido-propyl)dimethylammonio]-1-propansulfat

<sup>34</sup> n-Octyl-β-D-glucopyranosid

	Bacteriorhodopsin	Rhodopsin
Temperatur	15 °C	15 °C
Salzgehalt	150 mM KCl	150 mM NaCl
Puffer	10 mM Tris <sup>a</sup> , pH 7	10 mM Mes <sup>b</sup> , pH 6
Detergenz der Mizellen-Proben	0,1 % CHAPS	30 mM OG
a = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, b = (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)		

**Tabelle 3-1** Standardmeßbedingungen der Proteinproben. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Messungen unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

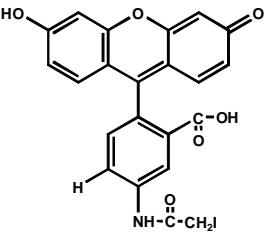
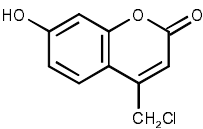
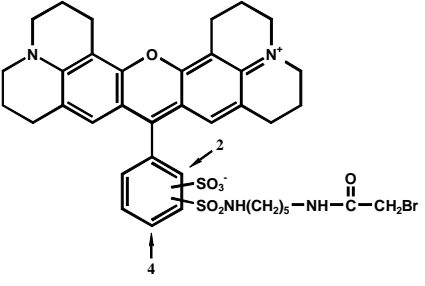
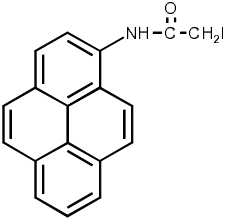
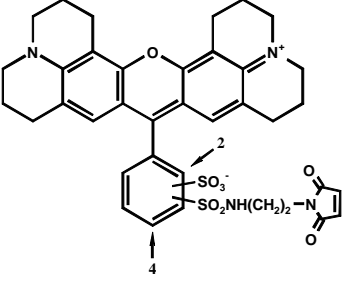
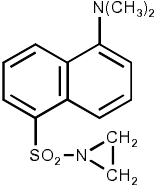
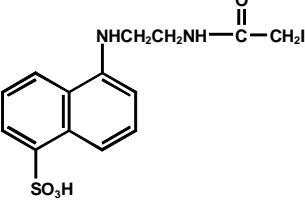
Die Rhodopsin-Mutanten waren eine Leihgabe der Arbeitsgruppe von Prof. Khorana (MIT) und wurden von Frau Dr. Judith Klein-Seetharaman und Frau Dr. Ulrike Alexiev präpariert [Klein-Seetharaman et al., 1999a]. Die Konzentrationen der markierten Proben bei den Experimenten zur zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie betrugen 0,5-4  $\mu$ M, in Abhängigkeit von der Markierungsstöchiometrie und den Quantenausbeuten der Fluoreszenzmarker. Die Standardmeßbedingungen sind aus der folgenden Tabelle 3-1 ersichtlich.

### 3.4 Fluoreszenzmarker und Bindungspositionen

Es wurden sieben verschiedene Fluoreszenzmarker für die Anisotropieexperimente verwendet, die alle von Molecular Probes, Inc., bezogen wurden. Die Bindung dieser thiolreaktiven Fluorophore erfolgte durch eine Reaktion mit der SH-Gruppe des Aminosäurerestes von Cystein.

Für die Experimente mit Bacteriorhodopsin standen folgende Cystein-Mutanten zur Verfügung: in den zytoplasmatischen Loops AB und EF, S35C und A160C sowie im extrazellulären DE-Loop, V130C (Abbildung 1-1). Die Bezeichnungen stehen für die nummerierten Aminosäuren Val130, Ala160 und Ser35, welche gegen Cysteine (C) ausgetauscht wurden. Die Markierung mit 5-(Iodoacetamido)fluorescein (IAF), die Bestimmung der Markierungsstöchiometrie und die Entfernung des C-Terminus durch limitierte Proteolyse mit Papain erfolgte nach Alexiev et al. [Alexiev et al., 1994a, 1995]. Die Markierung mit den anderen Fluoreszenzmarkern wurde in Anlehnung an die Prozedur des IAF sowie nach Angaben der Hersteller durchgeführt [Molecular Probes, 1996].

Das Rhodopsin enthält im Gegensatz zum Bacteriorhodopsin in seiner nativen Form zehn Cysteine (Abbildung 1-4). Vier liegen im  $\alpha$ -helikalen Membranbereich, C110, C167, C222 und C264, wobei das Cystein C110 zusätzlich mit einem weiteren (C187) eine Disulfidbrücke bildet. Die in der C-terminalen Region befindlichen C322 und C323 sind palmitoyliert und an einer teilweisen Fixierung dieses Bereichs beteiligt.

Nr.	Name und Struktur	Nr.	Name und Struktur
1	5-Iodoacetamidofluorescein 	4	4-chloromethyl-7-hydroxycoumarin 
2	Texas Red <sup>®</sup> C <sub>5</sub> bromoacetamido 	5	N-(1-pyrene)iodoacetamide 
3	Texas Red <sup>®</sup> C <sub>2</sub> maleimide 	6	5-dimethylaminonaphtalene-1-sulfonyl-aziridine 
		7	5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid 

**Tabelle 3-2** Strukturen und Herstellerbezeichnungen der thiolreaktiven Fluoreszenzmarker [Molecular Probes, 1996]

Es verbleiben drei Cysteine, die den wasserlöslichen Thiolreagenzien zugänglich sein sollten: im intradiskalen IV/V-Loop das C185 und auf der zytosolischen Seite C140 (III/IV-Loop) sowie C316, daß sich in der Peptidstruktur zwischen Helix G und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen befindet. Eine Reihe von Arbeiten mit thiolreaktiven Reagenzien, die von DeGrip in einer Übersicht zusammengefaßt wurden [DeGrip, 1982b], zeigten, daß nur zwei Cysteine unter milden Reaktionsbedingungen zugänglich sind.



Es handelt sich hierbei um C140 und C316. Diese beiden Aminosäurereste konnten durch jeweils unterschiedliche Reaktionsbedingungen eindeutig mit den Fluorophoren markiert werden [Mielke, 2000]. Der Nachweis erfolgte durch Gelelektrophorese. Die Bindungsstöchiometrie wurde aus der Absorptionsdifferenz zwischen markierten und nichtmarkierten Proben ermittelt.

Die Reduzierung der Schiffischen Base durch  $\text{NaBH}_4$  wurde nach Prozedur von Bownds und Wald vorgenommen [Bownds und Wald, 1965]. Neben dem nativen Rhodopsin wurden sechs Rhodopsin-Mutanten mit Fluoreszenzlabeln markiert. Die Mutationen V63C, Q64C, L68C, R69C und L72C befanden sich im I/II-Loop und die Mutation K245C im V/VI-Loop. Die Positionen dieser Punktmutationen lagen somit alle auf der zytoplasmatischen Seite. Die oben beschriebenen nativen Cysteine waren bei den Mutanten gegen nichtreaktive Aminosäurereste ausgetauscht. Tabelle 3-2 und Tabelle 3-3 zeigen die Bezeichnungen, die Strukturen und die spektroskopischen Eigenschaften der ungebundenen Fluorophore in Lösung nach Herstellerangaben [Molecular Probes, 1996]. Die häufigste Verwendung fanden das Fluoresceinderivat (IAF) und der Marker Texas Red<sup>®</sup> (TR). Mit diesen beiden Fluorophoren wurden ca. 90 % aller Messungen durchgeführt.

Nr.	MW	Abkürzung	$\lambda_{\text{max}}(\text{abs}) / \text{nm}$	$\lambda_{\text{max}}(\text{em}) / \text{nm}$	$\epsilon / 10^3 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$
1	515	IAF	492	515	75
2	812	TR	583	603	113
3	729	TRm	582	600	108
4	211	Cm	372	470	16
5	385	Pyr	339	384	26
6	276	DNZ	340	543	4,1
7	434	IAEDANS	336	490	5,7

**Tabelle 3-3** Spektroskopische Parameter [Molecular Probes, 1996] und die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen der Fluoreszenzmarker. Die Numerierung bezieht sich auf Tabelle 3-2. Die Spaltenbezeichnungen tragen die Bedeutung MW: Molekulargewicht,  $\lambda_{\text{max}}(\text{abs})$ : Absorptionsmaximum,  $\lambda_{\text{max}}(\text{em})$ : Emissionsmaximum,  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient. Die Tabellenwerte beziehen sich auf Messungen in MeOH. Bei den pH-sensitiven Labeln Fluorescein (AF) und Coumarin (Cm) wurde ein pH-Wert von 9 zugrunde gelegt.

