

4. Rekombinationsfluoreszenz des PSII – Theoretische Grundlagen und ein neues Experiment

Alle Energie- und Elektronentransferschritte, die nach der Absorption von Licht im PSII stattfinden, sind reversibel. Von jedem ladungsseparierten Zustand aus ist eine Rückreaktion möglich, die zu einer erneuten Besetzung angeregter Zustände der Chlorophylle des Reaktionszentrums und des Antennensystems führt. Auf diese Weise wieder angeregte Chlorophylle können unter Lichtabgabe in den Grundzustand relaxieren. Diese Lichtemission, die bis in den Sekunden- oder sogar Minutenbereich nach der Absorption beobachtet werden kann, wird als verzögerte Fluoreszenz oder Rekombinationsfluoreszenz bezeichnet. Erfolgt die Fluoreszenzemission dagegen direkt nach der Lichtabsorption (im Nanosekundenbereich), ohne dass es zur stabilen Ladungstrennung (unter Bildung des ladungsseparierten Zustandes $P680^+Q_A^-$) kommt, spricht man von prompter Fluoreszenz.

Bevor genauer auf die Rekombinationsfluoreszenz eingegangen wird, soll zunächst kurz die prompte Fluoreszenz erläutert werden, wobei besonders die für diese Arbeit relevante Abhängigkeit der prompten Fluoreszenz vom Oxidationszustand des Q_A berücksichtigt wird. Anschließend wird der Messplatz zur Detektion der Rekombinationsfluoreszenz beschrieben, dessen Erstellung einen wesentlichen Teil der hier vorliegenden Arbeit darstellt. Zum Abschluss wird kurz der Messplatz zur prompten Fluoreszenz vorgestellt.

4.1 Prompte Fluoreszenz

Erste Untersuchungen zur Fluoreszenz grüner Blätter wurden 1874 von N. J. C. Müller durchgeführt. Er beobachtete die wesentlich geringere Intensität im Vergleich zu extrahiertem Chlorophyll, dessen Fluoreszenz 1834 von David Brewster entdeckt wurde. Müller berichtete zudem, dass die Fluoreszenzausbeute variabel ist und von der Dauer und Intensität des Anregungslichtes abhängt. Die ersten systematischen Untersuchungen dieser variablen Fluoreszenz erfolgten 1931 von Kautsky und Hirsch [Kautsky und Hirsch 1931]. Die Fluoreszenz eines dunkeladaptiertes Blattes nimmt mit dem Einsetzen einer kontinuierlichen Belichtung durch Akkumulation von reduziertem Q_A schnell zu und zeigt im weiteren Zeitverlauf ein komplexes Verhalten (Kautsky-Effekt). Dass die Fluoreszenzquantenausbeute vom Oxidationszustand des Q_A abhängt, wurde 1963 von Duysens und Sweers vorgeschlagen [Duysens und Sweers 1963].

Die meisten Untersuchungen zur (prompten) Fluoreszenz fanden an nativen Systemen statt, die sowohl PSII wie auch PSI enthalten. Im Gegensatz zu PSII ist PSI aber nur wenig fluoreszent, d.h. unter physiologischen Bedingungen trägt PSI nur wenige Prozent zur Fluoreszenzemission bei. Des weiteren ist die Quantenausbeute des PSI weit weniger variabel als die von PSII. Fluoreszenzexperimente, die an Proben durchgeführt werden, die beide Photosysteme enthalten, spiegeln somit im Wesentlichen die Eigenschaften des PSII wider.

Außer vom Oxidationszustand des Q_A wird die prompte Fluoreszenz hauptsächlich durch den Oxidationszustand des P680, in geringerem Maße vom S-Zustand des Mangankomplexes sowie durch die Reduktion des Plastochinon-Pools beeinflusst. Die Auswirkung dieser Faktoren auf die prompte Fluoreszenz wird im folgenden beschrieben.

Q_A-Redoxzustand

Abbildung 4.1 zeigt die primären Reaktionen nach der Absorption eines Photons durch das PSII-Antennensystem gemäß dem Reversiblen-Radikalpaar-Modell [Schatz *et al.* 1988]. Nach der Lichtabsorption äquilibriert die Anregungsenergie innerhalb einiger Pikosekunden über die Chlorophylle der Antenne und des Reaktionszentrums einschließlich P680. Von hier aus sind folgende Reaktionen möglich: Relaxation in den Grundzustand unter Emission eines Fluoreszenzphotons (Ratenkonstante k_F), strahlungslose Relaxation zum Grundzustand (Ratenkonstante k_{dec}) und Elektronentransfer zum Pheophytin unter Bildung des primären Radikalpaares $P680^+Phe^-$ (Ratenkonstante k_1). Ausgehend vom $P680^+Phe^-$ -Zustand werden zwei Reaktionswege betrachtet: Erstens die Rückreaktion unter Wiederherstellung des angeregten Antennenzustandes (Ratenkonstante k_{-1}), der dann unter Lichtaussendung zum Grundzustand relaxieren kann, und zweitens der Elektronentransfer vom Phe^- zum Q_A unter Bildung des sekundären Radikalpaares $P680^+Q_A^-$ mit der Ratenkonstanten k_2 . k_2 beinhaltet neben der Bildung von $P680^+Q_A^-$ den Übergang ins Triplettssystem, $[P680^+Phe^-]^3$, sowie die strahlungslose Rekombination zum Grundzustand.

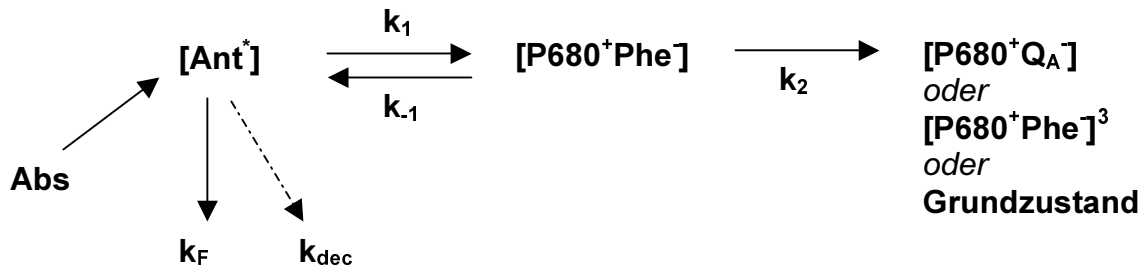


Abbildung 4.1: Modell zur Beschreibung der prompten Fluoreszenz. Details sind im Text erläutert (übernommen aus [Dau 1994]).

Genaugenommen müsste die Wiederherstellung des angeregten Antennenzustandes infolge der Rekombination von $P680^+Phe^-$ und die dadurch verursachte Lichtemission als verzögerte- oder Rekombinationsfluoreszenz bezeichnet werden. Da jedoch sowohl die „echte“ prompte Fluoreszenz (Emission anstelle der $P680^+Phe^-$ -Bildung) wie auch die $P680^+Phe^-$ -Rekombinationsfluoreszenz im Piko- bis Nanosekundenzeitbereich stattfinden und kinetisch nicht unterscheidbar sind, werden beide als prompte Fluoreszenz bezeichnet. Für die Quantenausbeute der Fluoreszenz gilt nach [Dau 1994]:

$$\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{dec} + p_{680} \left(\frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{1}{k_2} \right)^{-1}} \quad (4.1)$$

Dabei ist p_{680} die Wahrscheinlichkeit, dass der angeregte Zustand am P680 lokalisiert ist. Die Ratenkonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 sind vom Oxidationszustand des Q_A abhängig. Vernachlässigt man den Übergang ins Triplettssystem und die strahlungslose Rekombination des $P680^+Phe^-$ -Radikalpaares, so wird die Ratenkonstante k_2 null, wenn Q_A in reduzierter Form vorliegt, da dann kein Elektronentransfer vom Pheophytin zum Q_A möglich ist. In diesem Fall ist die Fluoreszenzquantenausbeute maximal und gegeben durch:

$$\phi_M = \frac{k_F}{k_F + k_{dec}} \quad (4.2)$$

Liegt Q_A in oxidiert Form vor, ist die Quantenausbeute minimal und gegeben durch

$$\phi_0 = \frac{k_F}{k_F + k_{dec} + k_{PC}} \quad (4.3)$$

mit

$$k_{PC} = p_{680} \left(\frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{1}{k_2} \right)^{-1} \quad (4.4)$$

Photosysteme mit reduziertem Q_A bezeichnet man als geschlossen, Photosysteme mit oxidiertem Q_A als offen.

Wird der Anregungsenergietransfer zwischen individuellen Photosystemen (PSII-Konnektivität) vernachlässigt, ergibt sich für die Fluoreszenzquantenausbeute Φ eines Ensembles von Photosystemen mit beliebigem Q_A -Oxidationszustand :

$$\phi \sim \phi_0(1 - [Q_A^-]) + \phi_M [Q_A^-] \quad (4.5)$$

Hier bezeichnet $[Q_A^-]$ den Anteil der Zentren, in denen Q_A reduziert ist. ϕ_0 ist die Quantenausbeute eines offenen, ϕ_M die eines geschlossenen Photosystems. Für die gemessene Fluoreszenz folgt dann aufgrund der Proportionalität zwischen Quantenausbeute und Fluoreszenzintensität:

$$F = F_0 + (F_M - F_0)[Q_A^-] \quad (4.6)$$

F_0 ist die minimale Fluoreszenz, die beobachtet wird wenn in allen Zentren Q_A oxidiert ist, F_M die maximale Fluoreszenz wenn in allen Zentren Q_A reduziert vorliegt. Berücksichtigung man die PSII-Konnektivität ergibt sich folgende Relation zwischen prompter Fluoreszenz und Q_A -Redoxzustand [Joliot und Joliot 1964, Joliot *et al.* 1973, Dau 1994]:

$$F = F_0 + \frac{(1-p)[Q_A^-]}{(1-p[Q_A^-])(F_M - F_0)} \quad (4.7)$$

Der Konnektivitätsparameter p ist dabei ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des Energietransfers zwischen den individuellen Photosystemen. Das Verhältnis von F_M zu F_0 kann Werte von bis zu 5 annehmen.

Messungen der prompten Fluoreszenz sind aufgrund der Abhängigkeit vom Q_A -Redoxzustand eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung der Akzeptorseitenprozesse.

P680-Redoxzustand

Auf einer Nanosekunden- bis Mikrosekunden-Zeitskala ist ein Anstieg der prompten Fluoreszenz nach Anregung mit einem kurzen (ns-) Laserpuls zu beobachten (entdeckt von [Mauzerall 1972]). Ursache ist die Rereduktion des infolge der Ladungstrennung gebildeten $P680^+$ durch Elektronentransfer vom Y_Z . $P680^+$ wirkt im oxidierten Zustand als Fluoreszenzlöcher und führt zu einer strahlungslosen Deaktivierung des angeregten Antennenzustandes [Buttler 1972]. Effizienter Anregungsenergietransfer vom Antennensystem zum $P680^+$ und die schnelle, strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustandes wird als Ursache der Fluoreszenzlöschung von $P680^+$ angenommen. Die Fluoreszenzausbeute in Photosystemen mit oxidiertem $P680$ scheint identisch oder etwas geringer als die Ausbeute in offenen Zentren zu sein [Mauzerall 1972, Deprez *et al.* 1983, Sonneveld *et al.* 1979], was darauf hindeutet, dass die fluoreszenzlöschende Wirkung von

$P680^+$ ähnlich groß ist wie die der photochemischen Ladungstrennung. (Neuere Untersuchungen geben jedoch Hinweise darauf, dass die Fluoreszenzlöschung durch $P680^+$ um etwa einen Faktor 2 effektiver ist als die der Ladungstrennung [Steffen *et al.* 2005].) Durch zeitaufgelöste Messungen des Anstiegs der prompten Fluoreszenz nach der Anregung mit einem kurzen Lichtblitz lässt sich daher die Rereduktionskinetik von $P680^+$ untersuchen. Zu berücksichtigen ist dabei die Fluoreszenzlöschung durch Karotinoid-Triplettzustände, deren Bildung bei Verwendung sättigender Blitzintensitäten nicht zu vermeiden ist. Karotinoid-Triplets führen ebenfalls zu einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute. Allerdings beträgt die Lebensdauer dieser Triplets nur einige μs [Schödel *et al.* 1998, Schödel *et al.* 1999]. Da die Detektion der Fluoreszenz im Rahmen dieser Arbeit frühestens 10 μs nach dem sättigenden Blitz erfolgt, braucht dieser Mechanismus der Fluoreszenzlöschung nicht berücksichtigt zu werden.

Durch Messung der prompten Fluoreszenz ist es daher im Prinzip möglich, die zeitabhängige Konzentration des durch Lichtanregung gebildeten $P680^+$ zu bestimmen (siehe z.B. [Steffen *et al.* 2001, de Wijn und van Gorkom 2002b]). In Kapitel 8 wird der Zusammenhang zwischen dem $P680$ -Redoxzustand und der prompten Fluoreszenz genutzt, um die Kinetiken von prompter und Rekombinationsfluoreszenz zu vergleichen.

S-Zustand des Mangankomplexes

Die Quantenausbeute der prompten Fluoreszenz zeigt eine Abhängigkeit vom S-Zustand des Mangankomplexes. Misst man die prompte Fluoreszenz in einem sogenannten *pump-probe*-Experiment jeweils kurz nach der Applikation eines sättigenden Blitzes, zeigt sich eine Oszillation mit der Periode 4, deren Ursache die Abhängigkeit der Rereduktionskinetik des $P680^+$ vom S-Zustand ist. Für Zeiten, in denen $P680$ vollständig rereduziert ist und daher als Fluoreszenzlöcher nicht in Frage kommt, beobachtet man ebenfalls eine S-Zustandsabhängigkeit. Dabei ist die Fluoreszenzintensität in den Zuständen S_2 und S_3 größer als in S_0 und S_1 . Verantwortlich hierfür ist vermutlich eine zusätzliche positive Ladung am Mangankomplex im S_2 - und S_3 -Zustand [Saygin und Witt 1985, Haumann *et al.* 1994, Kretschmann *et al.* 1996, Haumann und Junge 1996], die infolge elektrostatischer Wechselwirkung zu einer Verringerung der Effizienz der Ladungstrennung führt [Joliot *et al.* 1971, Delosme und Joliot 2002, Putrenko *et al.* 1999].

Plastochinon-Pool

Kommt es unter Lichteinwirkung zu einer Reduktion des Plastochinon-Pools, was z.B. in PSII-Membranfragmenten ohne künstlichen Elektronenakzeptor der Fall ist, beobachtet man einen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Ursache ist die fluoreszenzlöschende Wirkung von Plastochinon in seiner oxidierten Form. Mit zunehmender Reduktion des Plastochinon-Pools nimmt die Zahl der fluoreszenzlöschenden, oxidierten Plastochinone ab, was zu einer Zunahme der Fluoreszenz führt [Vernotte *et al.* 1979].

- Emissionsdauer der prompten Fluoreszenz nach Blitzanregung -

Die Emission der prompten Fluoreszenz erfolgt innerhalb weniger Nanosekunden nach der Anregung. Ist nur ein Exziton durch Lichtabsorption im Antennensystem generiert worden, wird die Anregung innerhalb einiger hundert ps unter Bildung des ladungsseparierten $P680^+Q_A^-$ -Zustandes deaktiviert. Diese Deaktivierung zeigt, aufgrund der Reversibilität der primären Ladungstrennung ($P680^+Phe^-$ -Bildung) eine zweifach-exponentielle Kinetik [Dau und Sauer 1996]. Die mittlere Fluoreszenzabklingzeit entspricht dabei in etwa der Rate des Elektronentransfers vom Phe^- zum Q_A (~300 ps). Für Anregungsintensitäten, bei denen

mehrere Exzitonen im Antennensystem erzeugt werden, erwartet man keine wesentliche Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer. Das durch die Deaktivierung eines Exzitons infolge der Ladungstrennung gebildete $P680^+$ ist ein effizienter Fluoreszenzlöcher, der zu einem schnellen, strahlungslosen Abbau der verbliebenen Anregungszustände im Antennensystem führt. Die Effizienz der Fluoreszenzlöschung durch $P680^+$ ist vergleichbar mit der der stabilen Ladungstrennung, weshalb die Deaktivierung der Antennenanregung durch $P680^+$, wie die Deaktivierung durch Ladungstrennung, im Sub-Nanosekundenbereich stattfinden sollte. Eine Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer ist durch eine Rekombination des primären ladungsseparierten Zustandes $P680^+Phe^-$ möglich, infolge derer es zu einer Regenerierung des angeregten Antennenzustandes kommt. Die Zeitkonstante für den rückgerichteten Elektronentransfer vom Phe^- zum $P680^+$ beträgt etwa 1-3 ns [Leibl *et al.* 1989, Dau und Sauer 1996]. Die Emission der prompten Fluoreszenz bleibt daher auf den Zeitbereich einiger Nanosekunden beschränkt.

4.2 Theoretische Grundlagen der Rekombinationsfluoreszenz

Dass photosynthetische Organismen auch wesentlich länger als innerhalb einiger Nanosekunden nach der Anregung Fluoreszenz emittieren, wurde 1951 von Strehler und Arnold in Experimenten mit Algen entdeckt [Strehler und Arnold 1951], die schon damals als Ursache eine Umkehr des photosynthetischen Prozesses vermuteten. Verschiedene Experimente mit PSII- bzw. PSI-selektiver Anregung sowie mit PSI- bzw. PSII-freien Mutanten zeigten, dass die verzögerte Fluoreszenz, wie die prompte Fluoreszenz, hauptsächlich von PSII stammt. Weitgehende Übereinstimmung zwischen den Spektren der prompten und verzögerten Fluoreszenz zeigte sich in Photosystemen, in denen sich die Energie der angeregten Chromophore von Reaktionszentrum und Antennensystem nur wenig unterscheiden, während bei größeren energetischen Differenzen Unterschiede in den Spektren gefunden werden [Zankel 1969]. Beispielsweise zeigte das Spektrum der prompten Fluoreszenz von Cyanobakterien einen signifikanten Beitrag von Phycobillinen, offenkettigen Tetrapyrrolen, deren Anregungszustand energetisch über dem des Chlorophyll-a liegt, während diese Pigmente zum Spektrum der verzögerten Fluoreszenz kaum beitragen [Azzi 1966]. Durch die chemisch Oxidation des primären Donors und Reduktion des Akzeptors lässt sich eine Fluoreszenzemission im Dunkeln induzieren [Etienne und Lavorel 1975, Fleischman 1969]. An Spinatchloroplasten wurde bei pH 4 verzögerte Fluoreszenz beobachtet, die eine ähnliche Kinetik zeigt wie die bei diesem pH-Wert stattfindende Ladungsrekombination des $P680^+Q_A^-$ -Zustandes [van Gorkom und Donze 1973]. Diese und ähnliche Experimente zeigten, dass die Ursache der verzögerten Fluoreszenz die Rekombination des ladungsseparierten Zustandes $P680^+Q_A^-$ ist, die zu einer Wiederanregung der Chlorophylle des Reaktionszentrums bzw. des Antennensystems führt.

Mechanismus der Rekombinationsfluoreszenz

In Abbildung 4.2 sind die energetischen Zustände des PSII-Reaktionszentrums, die sich nach Photonenabsorption infolge der Energie- und Ladungstransferprozesse einstellen, in einem (qualitativen) Energiediagramm dargestellt. Angegeben sind dabei die Ratenkonstanten der einzelnen Reaktionen und die freien Energiedifferenzen zwischen den verschiedenen ladungsseparierten bzw. angeregten Zuständen des PSII.

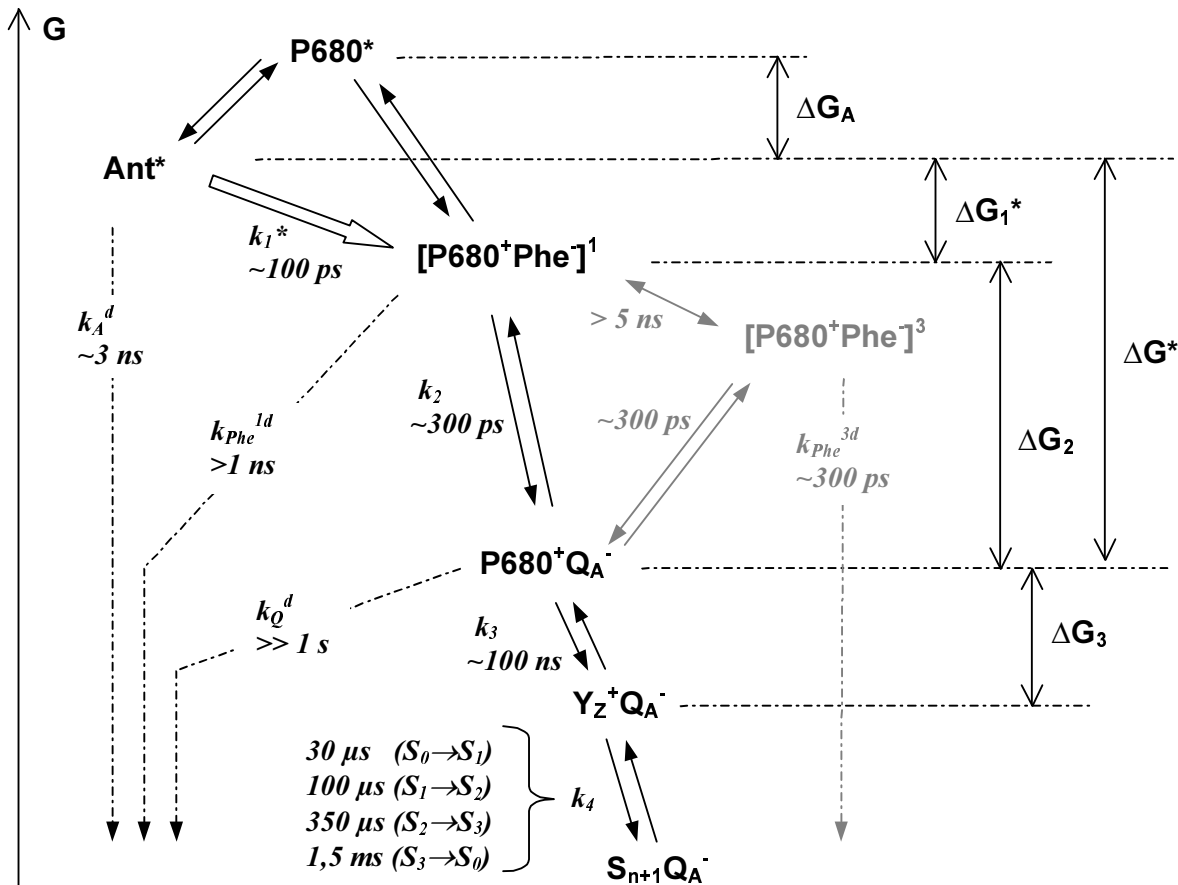


Abbildung 4.2: Energetik und Kinetik der Radikalpaarzustände im PSII. Angeben sind die den Ratenkonstanten k entsprechenden Zeitkonstanten für die Übergänge zwischen den Radikalpaarzuständen. Die gestrichelten Pfeile geben Übergänge zum Grundzustand an. k_1^* ist die Ratenkonstante für den Abbau des angeregten Antennenzustandes (Ant^*) infolge der primären Ladungstrennung, k_1^* hängt vom Antennensystem ab und unterscheidet sich von der intrinsischen Ratenkonstante der primären Ladungstrennung ($\text{P680}^* \rightarrow \text{Phe}$ -Elektronentransfer) [Dau und Sauer 1996]. Die Bedeutung der anderen Ratenkonstanten ist: k_2 – Elektronentransfer von Phe^- zu Q_A , k_3 – Elektronentransfer von Y_Z zu P680^+ , k_A^d – Abbau des angeregten Antennenzustandes (Ant^*) durch Fluoreszenz und thermische Deaktivierung, k_{Phe}^{1d} und k_{Phe}^{3d} – Zerfall des Singulett-Zustandes $[\text{P680}^+, \text{Phe}]^1$ bzw. des Triplett-Zustandes $[\text{P680}^+, \text{Phe}]^3$ durch andere Mechanismen als die Q_A -Reduktion oder die Rekombination unter Wiederanregung der Antenne (Ant^*), k_Q^d – Zerfall des $\text{P680}^+\text{Q}_A^-$ -Radikalpaars auf anderem Weg als dem vorwärtsgerichteten Elektronentransfer von Y_Z zu P680^+ oder dem rückgerichteten Elektronentransfer von Q_A^- zu Phe , k_4 – Elektronentransfer vom Mn-Komplex zum Y_Z^+ (S-Übergang). Für die Ratenkonstanten siehe (z.B.): k_1^* und k_2 [Dau und Sauer 1996], k_3 [Christen und Renger 1999], k_4 [Rappaport *et al.* 1994] k_A^d [Leibl *et al.* 1989], k_{Phe}^{3d} [Volk *et al.* 1993] und k_Q^d [Rappaport *et al.* 2002]. Für k_{Phe}^{1d} liegen keine Daten vor, aber die Annahme einer photochemischen Quantenausbeute nahe 1 erfordert einen Wert wesentlich kleiner als 1 ns^{-1} .

Der mit Ant^* bezeichnete angeregte Antennenzustand ist gegenüber dem P680^* -Zustand energetisch abgesenkt: Die Delokalisierung der Anregungsenergie über die etwa 200 Chlorophyll-Moleküle des Antennensystems (Exzitonenäquilibrium), einschließlich des P680 ,

führt zu einer (hauptsächlich entropischen) Verringerung der freien Energie (ΔG_A in Abb. 4.2) gegenüber der freien Energie des am P680 lokalisierten Exzitons.

Nach der Absorption und der Anregungsäquibrierung über die Chlorophylle erfolgt die primäre Ladungstrennung durch Elektronentransfer vom P680* zum Pheophytin. Dabei ist die beobachtete Ratenkonstante der primären Ladungstrennung, k_1^* , um den Faktor der Besetzungswahrscheinlichkeit des P680*-Zustandes geringer als die Rate des Elektronentransfers vom P680* zum Pheophytin, k_1 . Vernachlässigt man, dass sich die Energieniveaus der verschiedenen Chlorophylle leicht unterscheiden, gilt näherungsweise $k_1^* = k_1 \times (\text{Zahl der Chlorophylle})^{-1}$. Die Ladungstransferschritte, die nach der primären Ladungstrennung stattfinden, sind in Abschnitt 1.2 im einzelnen beschrieben.

Infolge der Reversibilität der Energie- und Ladungstransferschritte, die der Photonenabsorption folgen, kommt es in einem Teil der Photosysteme zu einer Repopulation des angeregten Antennenzustandes, der unter Emission eines Photons in den Grundzustand relaxieren kann. Diese Lichtemission, die bis in den Bereich von Minuten nach der Anregung nachweisbar ist, bezeichnet man als verzögerte Fluoreszenz oder Rekombinationsfluoreszenz. Der rückgerichtete Elektronentransfer ist dabei von jedem ladungsseparierten Zustand aus möglich, der sich nach der Lichtabsorption einstellt. Erfolgt die Rekombination direkt nach der Bildung des $P680^+Phe^-$ -Zustandes spricht man aber von prompter Fluoreszenz., obwohl die Lichtemission als Folge einer Ladungsrekombination erfolgt, da sowohl diese „Rekombinations“-Fluoreszenz wie auch die „echte“ prompte Fluoreszenz innerhalb einiger Nanosekunden emittiert werden und kinetisch nicht zu unterscheiden sind. (Als Unterscheidungskriterium kann auch die Fluoreszenzlebensdauer von gelöstem Chlorophyll dienen, die etwa 5 ns beträgt.)

Rekombinationsfluoreszenz und Gleichgewichtsverteilung

Im folgenden wird angenommen, dass sich nach Erreichen eines ladungsseparierten Zustandes aufgrund der Reversibilität der Prozesse annähernd eine Gleichgewichtsverteilung zwischen diesem Zustand und den energetisch höherliegenden Zuständen einstellt. Diese Annahme ist nur gültig, wenn Verlustprozesse die Populationen der betrachteten Zustände nicht signifikant beeinflussen, d.h. wenn $k_1^* \gg k_A^d$, $k_2 \gg k_{Phe}^{1d}$, $k_3 \gg k_Q^d$. k_{Phe}^{1d} ist nicht bekannt, aber die Annahme, dass die Quantenausbeute der Ladungstrennung nahe 1 ist, erzwingt, dass alle Verlustprozesse von geringer Bedeutung sind.

In Abbildung 4.2 wird ebenfalls der Triplettzustand des primären Radikalpaares berücksichtigt. Die primäre Ladungstrennung selbst führt zur Bildung des Singulettzustandes und der Übergang zwischen Singulett- und Triplettzustand (Intersystem-Crossing) ist langsam (> 5 ns) im Vergleich zum sekundären Elektronentransfer [Volk *et al.* 1993]. Es wird angenommen, dass die Rekombination des $P680^+Q_A^-$ -Zustandes hauptsächlich über den Triplettzustand $[P680^+Phe^-]^3$ erfolgt [van Gorkom 1985, Rappaport *et al.* 2002]. Die geschätzte Rate des Triplettzerfalls, der teilweise zur Besetzung von Chlorophyll-Triplettzuständen führt, ist vergleichsweise hoch, so dass die Population des $[P680^+Phe^-]^3$ -Zustandes unter dem Gleichgewichtswert liegen kann. Aufgrund des langsamen Intersystem-Crossing hat der schnelle Triplettzerfall allerdings keine Auswirkung auf die Population des $[P680^+Phe^-]^1$ -Zustandes, so dass die Betrachtungen zur Gleichgewichtsverteilung gültig bleiben.

Aufgrund der Gleichgewichtsverteilung ergibt sich die Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Antennenzustandes aus der Besetzung des zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Photonenabsorption erreichten ladungsseparierten Zustandes und der freien

4. Rekombinationsfluoreszenz des PSII – Grundlagen und Experiment

Energiedifferenz zum Antennenzustand. Betrachtet man den $P680^+Q_A^-$ -Zustand, der nach etwa 300 ps erreicht ist, dann gilt für die Besetzungswahrscheinlichkeiten:

$$\frac{[Ant^*]}{[P680^+Q_A^-]} = e^{\Delta G^*/kT} \quad (4.8)$$

Die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz ist dann (siehe auch [McPherson *et al.* 1990, Turzo *et al.* 1998]):

$$F_D \sim [P680^+Q_A^-] \cdot e^{\Delta G^*/kT} \quad (4.9)$$

Unter der Annahme, dass die $P680^+$ -Reduktion der Donorseite und der $Q_A \rightarrow Q_B$ -Elektronentransfer der Akzeptorseite voneinander unabhängige Prozesse sind sowie unter Vernachlässigung des Energietransfers zwischen den Photosystemen (PSII-Konnektivität) gilt:

$$F_D \sim [P680^+][Q_A^-] \cdot e^{\Delta G^*/kT} \quad (4.10)$$

Die generelle Annahme, die hinsichtlich der energetischen Betrachtung gemacht wird, ist, dass der durch die Rückreaktion repopulierte angeregte Zustand identisch mit dem angeregten Antennenzustand ist, der durch die Absorption eines Photons entsteht und von dem aus die prompte Fluoreszenz erfolgt. Diese Annahme wird durch Vergleich der Spektren der Rekombinationsfluoreszenz und der prompten Fluoreszenz bestätigt [Tsamaloukas 2001]. Die in Abbildung 4.3 dargestellten Spektren der Rekombinationsfluoreszenz und der prompten Fluoreszenz sind weitgehend identisch, was zeigt, dass die Fluoreszenzemissionen vom gleichen äquilibrierten Antennenzustand ausgehen.

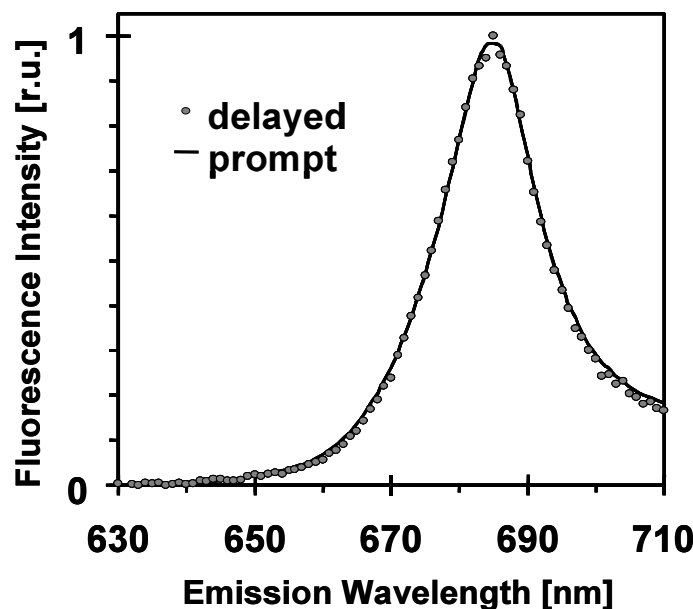


Abbildung 4.3: Vergleich der Spektren der prompten (Linie) und der Rekombinationsfluoreszenz (Punkte) von PSII-Membranpartikeln. (Anregung bei 435 nm, $T = 0^\circ\text{C}$, Chlorophyll-Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$; übernommen aus [Tsamaloukas 2001]).

Untersuchung der Donorseite

Die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz ist bestimmt sowohl von den Konzentrationen von $P680^+$ und Q_A^- als auch von der freien Energiedifferenz zum angeregten Antennenzustand (Gl. 4.10). Bevor die Rekombinationsfluoreszenz zur Untersuchung der Donorseitenprozesse verwendet werden kann, ist es daher nötig, für die Abhängigkeit von der Q_A^- -Konzentration zu korrigieren.

Diese Korrektur ist durch die Messung des Zeitverlaufes der prompten Fluoreszenz möglich, der durch die zeitabhängige Q_A^- -Konzentration bestimmt ist. Wie im Anhang (A.2) gezeigt wird, gilt für die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz

$$F_D \sim \Phi_{rec} \frac{F - F_0}{F_M - F_0} \quad (4.11)$$

mit

$$\Phi_{rec} \sim [P680^+] e^{\Delta G^*/kT} \quad (4.12)$$

Die Abhängigkeit von der Q_A^- -Konzentration ist durch den Quotienten $(F-F_0)/(F_M-F_0)$ beschrieben, der durch die Messung der prompten Fluoreszenz nach einem sättigenden Laserblitz bestimmt werden muss. Die Messung der prompten Fluoreszenz erfolgt hierzu jeweils unter denselben Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, u.a.) wie die Messung der Rekombinationsfluoreszenz.

Die $[Q_A^-]$ -korrigierte Rekombinationsfluoreszenz ergibt sich dann einfach durch die Division der gemessenen Rekombinationsfluoreszenz durch $(F-F_0)/(F_M-F_0)$. Also:

$$F_D^{korr} \sim F_D \cdot \left(\frac{F - F_0}{F_M - F_0} \right)^{-1} \quad (4.13)$$

Zur Bezeichnung der $[Q_A^-]$ -korrigierten Rekombinationsfluoreszenz wird der Kürze wegen im folgenden ebenfalls die Bezeichnung F_D verwendet. In dem Fall, dass es sich um nichtkorrigierte Daten handelt, wird dies explizit erwähnt.

4.3 Erstellung des Messplatz zur Detektion der Rekombinationsfluoreszenz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Messplatz zur Detektion Rekombinationsfluoreszenz erstellt. Das Prinzip der Messung besteht darin, die dunkeladaptierte Probe mit einer Serie sättigender ns-Laserpulsen anzuregen, damit durch den S-Zyklus zu schalten und nach jedem Blitz zeitaufgelöst die Fluoreszenzemission zu detektieren. Zwei prinzipielle experimentelle Besonderheiten sind dabei zu berücksichtigen: Die, im Vergleich zur Rekombinationsfluoreszenz, sehr starke prompte Fluoreszenzemission, die ohne geeignete Maßnahmen zu einer Übersteuerung des Detektorsystems führen würde sowie der starke Intensitätsabfall der Rekombinationsfluoreszenz, der im erfassten Zeitbereich mehr als vier Größenordnungen beträgt.

In Abbildung 4.4 ist schematisch der Messaufbau dargestellt, Abbildung 4.5 zeigt den zeitlichen Ablauf der Komponentensteuerung und der Datenerfassung. Die Details zu den verwendeten Geräten und Einstellungen finden sich im Anhang.

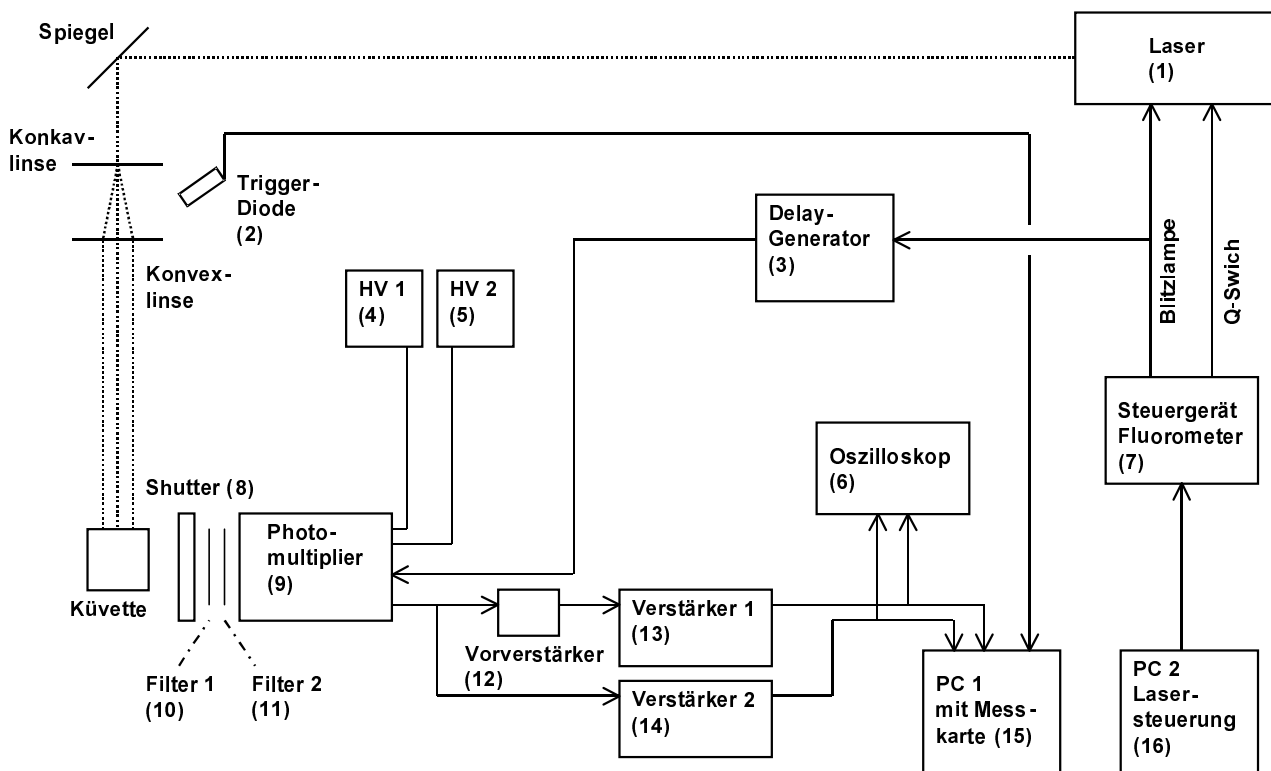


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Detektion der Rekombinationsfluoreszenz. Details zu den Geräten und Einstellungen befinden sich im Anhang.

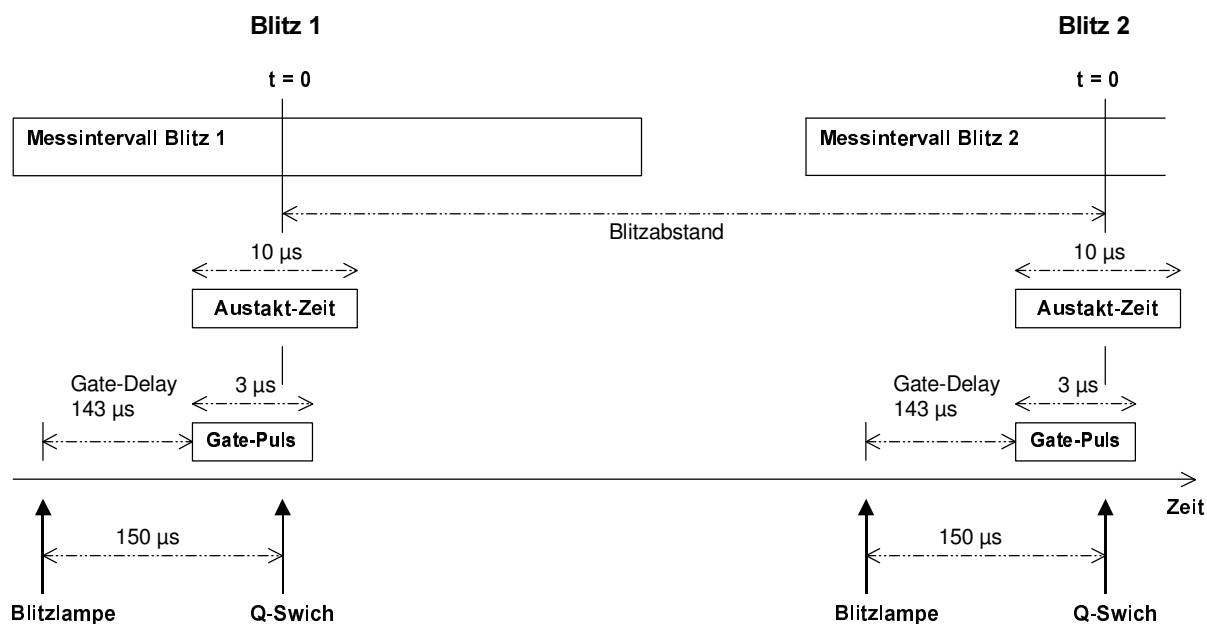


Abbildung 4.5: Zeit-Ablauf-Diagramm für die Messung der Rekombinationsfluoreszenz. Die Blitzlampe zum Pumpen des Lasers wird zeitgleich mit dem Verzögerungsgenerator gestartet. 143 µs nach dem Start der Blitzlampe, d. h. 7 µs vor dem Q-Switch-Trigger und dem Auskoppeln des Laserpulses, wird ein Triggerpuls von 3 µs Dauer zum Austakten des Photomultipliers gegeben. Hierdurch wird der Photomultiplier für 10 µs unempfindlich geschaltet. Die Datenaufnahme erfolgt im Zeitintervall von 50-200 ms vor bis maximal 60 ms nach dem jeweiligen Laserblitz.

Anregungslaser und -optik

Die Probenanregung erfolgte mit einem gütegeschalteten (*Q-switched*), frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Minilite II, Continuum) bei einer Wellenlänge von 532 nm (Tabelle 4.1).

Die Anregung in der Absorptionslücke des Photosystems hat den Vorteil, dass der Intensitätsgradient in der Probe gering ist, wodurch sich auch für größere Schichtdicken bzw. höhere Probenkonzentrationen leichter Sättigung erreichen lässt. Über einen eingebauten Abschwächer ließ sich die Pulsenergie stufenlos einstellen. Die Puls-zu-Puls-Schwankungen lagen über dem vom Hersteller angegebenen Wert und betrugen 6-7 %. (Messung der Laserpuls-Intensität: Nova-Laser-Power/Energy-Monitor, Messkopf: pyroelektrischer Absorber Typ PE10; Ophir Optronics.) Die Ansteuerung des Lasers erfolgte extern über die TTL-Ausgänge der Steuereinheit des Fluorometers für die prompte Fluoreszenz

Der Laserstrahl wurde durch eine Konkavlinse auf ca. 3 cm Durchmesser aufgeweitet und anschließend mittels einer Konvexlinse wieder parallelisiert. Zur Probenanregung genutzt wurde eine quadratische Querschnittsfläche von 1 cm². Die Intensitätsverringerng zum Rand der ausgeleuchteten Fläche aufgrund des Gauß-ähnlichen Querschnittsprofils des Laserstrahls betrug maximal 30 %. (Steuerprotokoll siehe Anhang).

Wellenlänge	532 nm
Energie / Puls	25 mJ
mittlere Leistung	375 mW
Pulsbreite (FWHM)	3-5 ns
Polarisation	vertikal
Strahldurchmesser	< 3 mm
Wiederholungsrate	1-15 Hz

Tabelle 4.1: Spezifikation des Lasers zur Anregung der Rekombinationsfluoreszenz.

Probe

Als Messküvetten fanden quadratische PMMA (Polymethylmethacrylat)- und PS (Polystyren)-Kunststoff-Fluoreszenzküvetten mit einer Kantenlänge von 1 cm Verwendung (Makro-Küvette PMMA bzw. PS, 4,5 ml, 300-900 nm; BRAND). Die Küvette befand sich in einem temperierbaren Durchfluss-Küvettenhalter (Kupfer, Anfertigung der hauseigenen Werkstatt), der in Kombination mit einem Wasserbad-Thermostaten (Thermostat DC50, Badgefäß K40, HAAKE) eine Temperierung der Probe mit einer Genauigkeit von $\pm 0,2$ K gestattete. Die Chlorophyll-Konzentration betrug bei allen Messungen 10 $\mu\text{g/ml}$. Der Intensitätsabfall des Anregungslichtes beim Durchlaufen der Schichtdicke von 1 cm betrug ca. 15 %.

Fluoreszenz-Detektion

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte senkrecht zum Anregungslicht, durch einen Photomultiplier mit erhöhter Empfindlichkeit im roten Spektralbereich (R2066, HAMAMATSU, siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.6). (Die spektrale Verteilung der Fluoreszenzstrahlung spielte im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle, d. h. das Signal wurde über den gesamten erfassbaren Wellenlängenbereich integriert.)

Aktive Fläche Durchmesser	34 mm
Kathodenempfindlichkeit	40 mA/W
Fenster	Borosilicat
Kathodentyp	Erweiterte Rotempfindlichkeit Multialkali
Verhältnis rot/weiß	0,3
Anodenempfindlichkeit	50 A/lm
Verstärkung	$2,5 \times 10^5$
Dunkelstrom	8 nA
Anstiegszeit	2.8 ns
Transitzeit	40 ns
Anzahl Dynoden	10
Betriebsspannung	-1000 V

Tabelle 4.2: Spezifikationen des Photomultipliers zur Detektion der Rekombinationsfluoreszenz.

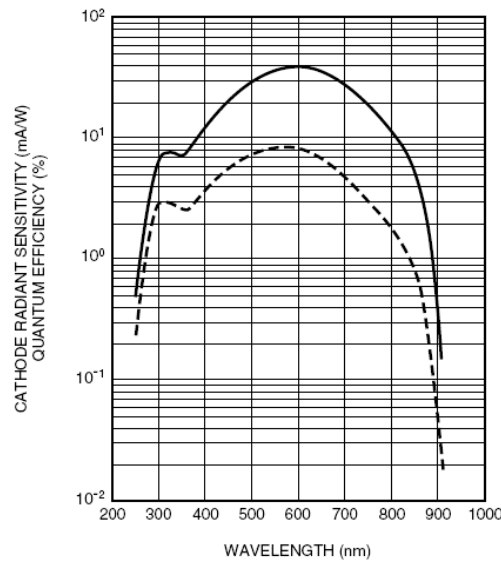


Abbildung 4.6: Empfindlichkeitskurve des Photomultipliers zur Detektion der Rekombinationsfluoreszenz. Durchgezogene Linie: Kathodenempfindlichkeit, gestrichelte Linie: Quantenausbeute.

Zur Blockung des gestreuten Anregungslichtes sowie zur Reduktion von Rest-Raumlicht wurde eine Kombination aus zwei Interferenzfiltern (DT-Red, DT-Magenta, Linos Photonics) verwendet, durch die gleichzeitig die Filter-Eigenfluoreszenzen in Richtung Photomultiplier minimiert wurde (Reihenfolge: Probe \rightarrow DT-Red \rightarrow DT-Magenta \rightarrow Photomultiplier). Die Transmissionsspektren der Filter sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

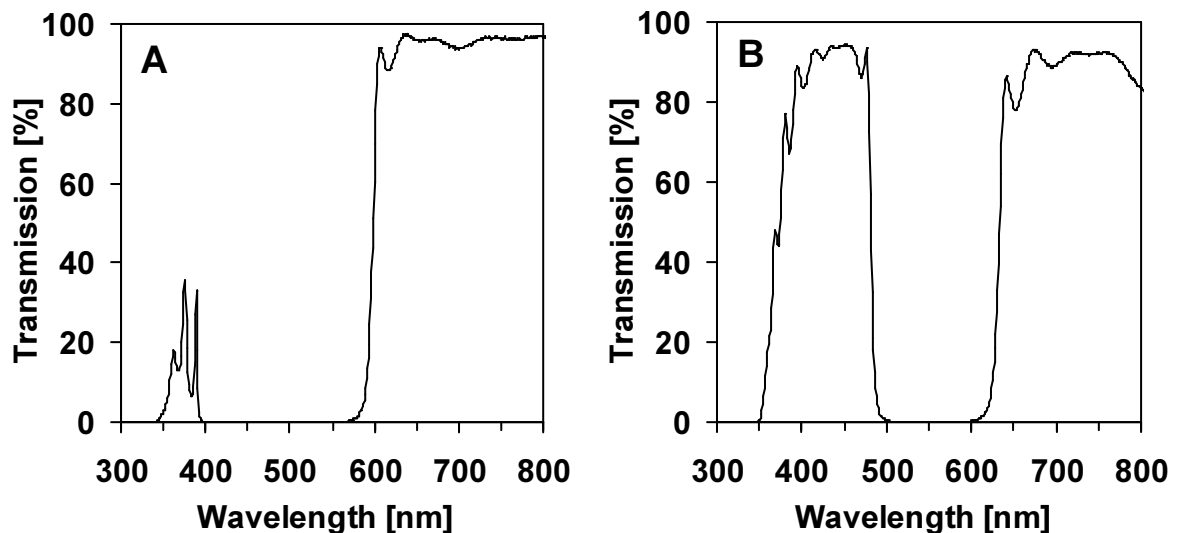


Abbildung 4.7: Transmissionsspektren der Detektionsfilter, A: DT-Red B: DT-Magenta.

Der Abstand zwischen der Probenküvette und dem Fenster des Photomultipliers betrug ca. 3 cm. Zwecks Verringerung magnetischer Störungen aufgrund äußerer Störfelder wurde eine entsprechende Photomultiplier-Abschirmung verwendet (Magnetic Shield Case E989-04, HAMAMATSU).

Das Hauptproblem bei Messungen der Rekombinationsfluoreszenz stellt die um Größenordnungen intensivere prompte Fluoreszenz dar. (Eine Abschätzung ergibt ein Verhältnis von prompter zu Rekombinationsfluoreszenz von $1:10^7$, siehe Kapitel 7). Die intensive prompte Fluoreszenz würde ohne geeignete Maßnahmen zu einer drastischen Übersteuerung des Detektorsystems führen. Da die Spektren von Rekombinations- und prompter Fluoreszenz identisch sind, ist eine Trennung durch optische Filter nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Empfindlichkeit des Photomultipliers während der Probenanregung durch Anlegen einer geeigneten Gegenspannung herabgesetzt (*gating*). (Die Emission der prompten Fluoreszenz erfolgt, für die in dieser Arbeit relevanten Zeiten, praktisch zeitgleich zum anregenden Laserpuls.) Dieses Austakten des Multipliers wurde über einen speziellen Schaltsockel (PMT Gated Socket Assembly C1392-55, HAMAMATSU) realisiert. Die Ansteuerung erfolgte über einen Verzögerungs-Generator, der über den Blitzlampen-Trigger des Lasers gestartet wurde. Über die Dauer des Austaktimpulses ließ sich die Länge der Austaktzeit regeln. Infolge von Störimpulsen, die durch das Austakten des Photomultipliers verursacht wurden, betrug die minimale Zeit zwischen dem Laserblitz und dem ersten ungestörten Datenpunkt 10 μ s.

Signalverstärkung und Datenerfassung

Die Datenaufzeichnung erfolgte mit einer PC-Messkarte (PCI 9812, 20 MHz, 12 Bit, Input Impedance 1.25 k Ω Input Range ± 5 V; ADLINK). Das Photomultiplier-Signal wurde zwei getrennten Kanälen zugeführt, verstärkt und jeder Kanal separat aufgezeichnet. Der Grund hierfür liegt in dem großen Dynamikbereich der Rekombinationsfluoreszenz (mehr als vier Größenordnungen), der sich mit der verwendeten Messkarte (Auflösung 12 Bit) bei Nutzung von nur einem Signalweg nicht ohne merklichen Informationsverlust (Bit-Rauschen) abdecken lässt. Der Signalabgriff am Photomultiplier erfolgte über einen 2,2 k Ω -Widerstand. Anschließend erfolgte die Aufspaltung des Signals. Kanal 1 wurde 2- bis 5fach verstärkt (Grenzfrequenz 300 kHz) und deckte den Zeitbereich von 10 μ s bis etwa 500 μ s ab. Kanal 2 wurde 150fach verstärkt (Grenzfrequenz 100 kHz) und lieferte das Signal für Zeiten größer als 500 μ s (für Zeiten < 500 μ s wurde Kanal 2 übersteuert). Der vollständige Zeitverlauf ergab sich dann durch „Verknüpfen“ der Signale beider Kanäle unter Berücksichtigung der jeweiligen Verstärkungsfaktoren, und wird in nächsten Abschnitt beschrieben. Als Verstärker dienten zwei AM 502 (mit Power Module TM 501, Tektronix). Im Signalweg von Kanal 2 wurde zur Reduzierung von elektrischen Störungen ein zusätzlicher Vorverstärker verwendet (Verstärkung 30, Bandbreite 2 Mhz, Eingangswiderstand 1 M Ω ; Anfertigung der hauseigenen Elektronikwerkstatt). Die Triggerung der Datenaufzeichnung erfolgte für jeden Laserpuls separat mit Hilfe einer Fotodiode. Für jeden Puls wurde zur Bestimmung des Nullpegels das Signal vor Triggerung mit aufgezeichnet. Als Abtastfrequenz der Messkarte wurde 1 MHz gewählt. Aufgrund der kartenbedingten Begrenzung der Datenpunkte auf 64000 für das Zeitintervall nach der Triggerung betrug die maximale Messzeit nach dem Laserpuls 60 ms, was ausreichend war, da aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses eine größere Messzeit ohnehin nicht sinnvoll gewesen wäre.

Datenverarbeitung (Datenreduktion und Verknüpfung der Messkanäle)

Die Daten beider Kanäle wurden separat und für jeden Blitz einzeln gespeichert. Um Speicherplatz zu sparen und die anschließende Auswertung zu vereinfachen, erfolgte eine Mittelung der Daten. Das geschah automatisch, direkt nach der Messung und vor der Speicherung der Messdaten mittels einer in das Messkartenprogramm integrierten Routine. Das Messintervall wurde dazu in drei Bereiche unterteilt: 1. Der Vorlauf – hier wurden die Datenpunkte gleich großer Zeitintervalle zu insgesamt 10 bis 12 Punkten gemittelt. 2. Der „exakte“ Bereich, von ca. 10 μs vor bis 10 μs nach dem Laserpuls – hier wurde nicht gemittelt. 3. Der logarithmische Bereich ab etwa 10 μs – hier wurden die Mittelungsintervalle exponentiell vergrößert, mit etwa 18 resultierenden Datenpunkten pro Dekade. Die neuen Signal-Zeit-Messwertpaare wurden aus den Zeitmittelwerten und den entsprechenden Signalmittelwerten des jeweiligen Mittelungsintervalls gebildet. So ließ sich eine Reduzierung der Datenmenge bis zu einem Faktor von 500 erzielen. In Abbildung 4.8 ist die Aufteilung des Messintervalls in die einzelne Mittelungsbereiche schematisch dargestellt.

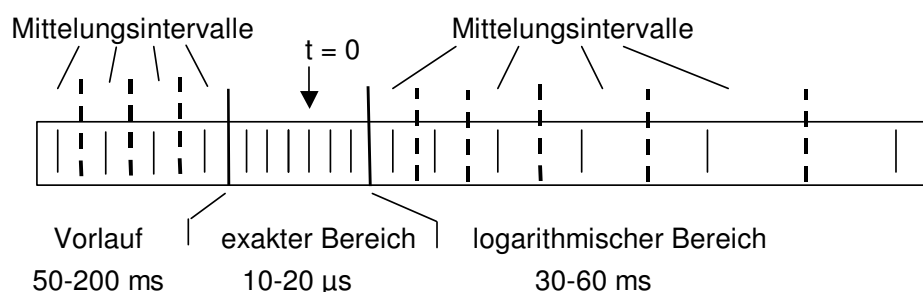


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Mittelungsintervalle (Erläuterungen im Text).

Nach der Datenreduktion erfolgte die Verknüpfung der beiden Kanäle. Dazu wurde für jeden Kanal das Signal im Intervall von 500 μs bis zur maximalen Messzeit gemittelt. Mit dem Quotienten aus den so berechneten Mittelwerten von Kanal 1 und 2 wurde Kanal 2 multipliziert und damit auf die Signalstärke von Kanal 1 skaliert (Diese Methode ermöglichte eine genauere Anpassung als eine Skalierung entsprechend der eingestellten Verstärkungsfaktoren). Anschließend wurden an die Signal-Zeit-Messwertpaare von Kanal 1 (0 bis 500 μs) die Messwertpaare des Kanals 2 (500 μs bis zur maximalen Messzeit) angehängt.

Bestimmung der Anregungsintensität

Vor Beginn der Messungen wurde die Sättigungspulsintensität ermittelt, d. h. die Intensität, bei der alle Photosysteme durch den Laserpuls angeregt werden. Genutzt wurde hierfür die in Kapitel 5 beschriebene S-Zustandsoszillation der Rekombinationsfluoreszenz. Für nichtsättigende Pulsintensitäten erhöht sich die Zahl der Photosysteme, die nicht im S-Zyklus voranschreiten, was zu einer stärkeren Dämpfung der Oszillation führt. Die Stärke der Dämpfung wird durch den *miss*-Parameter beschrieben, der die Wahrscheinlichkeit dafür angibt, dass in einem Photosystem kein S-Zustandsübergang ausgelöst wird. Die Oszillation der Rekombinationsfluoreszenz wurde für Pulsintensitäten von 30 μJ bis 17 mJ pro cm^2 gemessen und der *miss*-Parameter durch Simulation der 2 ms-Oszillationen mit dem im

Kapitel 6 (Abschnitt 2) beschriebenen Kok-Modell bestimmt. Abbildung 4.9 zeigt den so ermittelten *miss*-Parameter in Abhängigkeit von der Blitzintensität. Für die standardmäßig verwendete Probenkonzentration von 10 µg/ml und eine DCBQ-Konzentration von 20 µM ist eine vollständige Sättigung ab einer Intensität von 2 mJ/cm² erreicht.

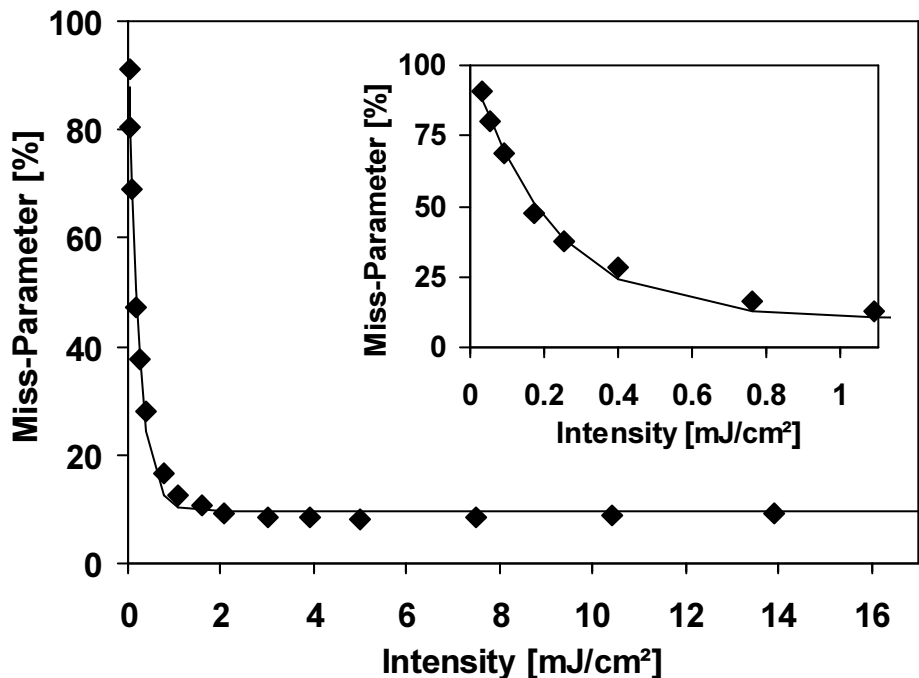


Abbildung 4.9: Bestimmung der Laserpuls-Sättigungsintensität. Dargestellt ist der *miss*-Parameter in Abhängigkeit von der Pulsintensität. Symbole: Ergebnisse der Simulation der S-Zustandsoszillationen, Linie: Einfach-exponentielle Simulation des Sättigungsverlaufs mit $M = (1-b)\exp(-\sigma I)+b$.

Artefakt-Korrektur

Es stellte sich heraus, dass das detektierte Fluoreszenzsignal artefaktbehaftet war. Ursache hierfür war einerseits gestreutes Laser-Anregungslicht, andererseits die starke prompte Fluoreszenz der PSII-Membranfragmente. Verschiedene Streumethoden am Probenort wie auch eine Chlorophyll-Lösung (in einem Aceton-Wasser-Gemisch) zeigten Signale im µs- bis ms-Bereich nach der Laserpulsanregung (siehe Abb. 4.10). Beide Anteile können zu einer Fluoreszenzanregung in den verwendeten Filtern und im Küvettenmaterial führen. Fluoreszenz des Fenstermaterials des Photomultiplier ist ebenfalls eine mögliche Ursache (siehe Abb. 4.11). Entsprechende Prozesse innerhalb des Photomultipliers sind ebenfalls nicht auszuschließen.

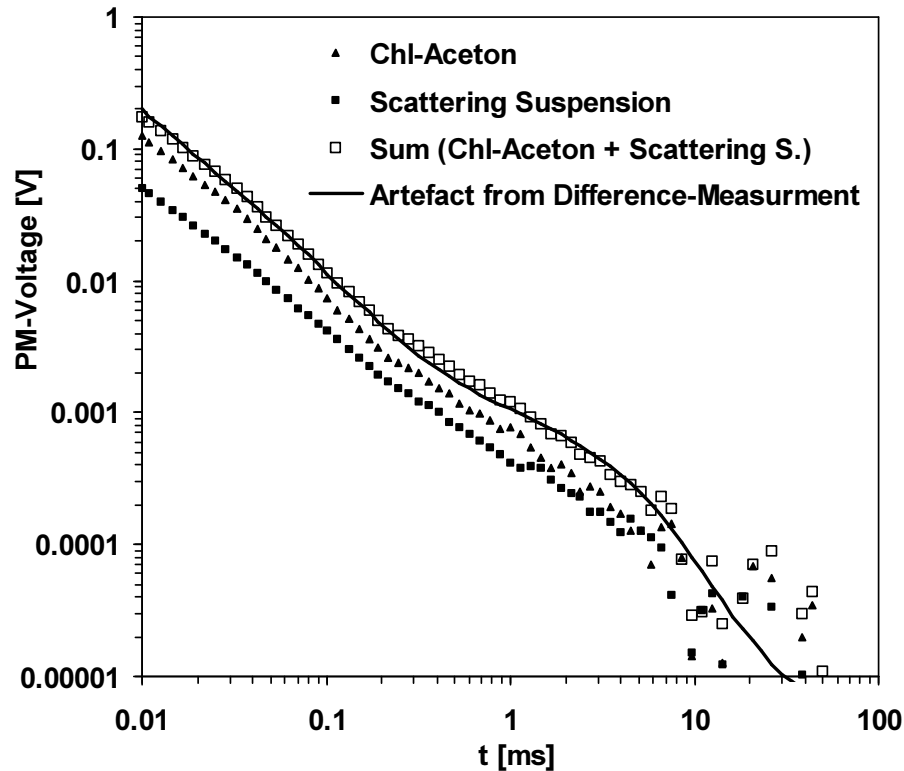


Abbildung 4.10: Photomultiplier-Signal nach einem 532 nm-Laserpuls (2 mJ/cm^2) für eine Chlorophyll-Lösung in Aceton (Konzentration $0,35 \mu\text{g/ml}$) und eine Streulösung (Milch-Wasser-Gemisch). Die Fluoreszenzintensität der Chlorophyll-Lösung und die Streuintensität des Milch-Wasser-Gemisches entsprechen der prompten Fluoreszenz bzw. der Lichtstreuung einer PSII-Suspension mit $10 \mu\text{g Chl / ml}$. Ebenfalls dargestellt sind die Summe beider Anteile sowie das Artefaktsignal, das nach der Differenzmethode (siehe Text) bestimmt wurde.

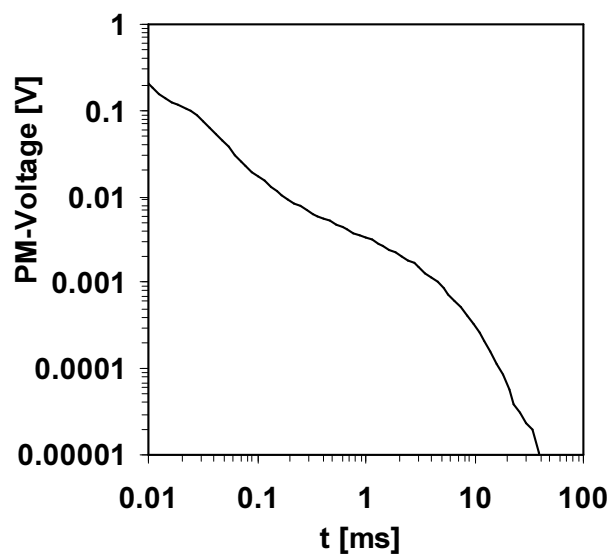


Abbildung 4.11: Photomultiplier-Signal verursacht durch direkte Streuung des (abgeschwächten) Laserpulses in den Photomultiplier ohne Verwendung optischer Filter.

Es wurden verschiedene Küvettentypen und Filterkombinationen getestet. Das geringste Artefaktsignal wurde mit den oben (siehe Abschnitt „Probe“) beschriebenen Kunststoff-Fluoreszenzküvetten gemessen. Hinsichtlich der Detektionsfilter wurde das beste Ergebnis durch die in Abschnitt „Fluoreszenz-Detektion“ beschriebene Kombination zweier Interferenzfilter erreicht. Es wurde versucht, den Streu- und Fluoreszenzanteil des Artefaktes zu quantifizieren, mit dem Ziel einer Subtraktion beider Anteile vom Gesamtsignal. Allerdings lieferte dieser Ansatz keine hinreichend genau reproduzierbare Korrektur. Gewählt wurde ein anderes Korrekturverfahren, dem folgende Überlegung zugrunde liegt:

Der Anteil der angeregten Photosysteme nimmt für nichtsättigende Pulse mit der Pulsintensität zu. Da die Intensität der Rekombinationsfluoreszenz proportional zur Anzahl der angeregten Systeme ist, nimmt die Fluoreszenz mit steigender Pulsintensität zu und erreicht bei der Sättigungsintensität ihren Maximalwert. Eine weitere Erhöhung der Pulsintensität sollte zu keiner Zunahme des Fluoreszenzsignals mehr führen. Wird trotzdem ein Anstieg des detektierten Signals oberhalb der Sättigungsintensität beobachtet, so kann dessen Ursprung nicht die Rekombinationsfluoreszenz sein. Die Ursache eines weiteren Anstieges muss ein Artefakt, ausgelöst durch Streuung und/oder prompte Fluoreszenz, sein. Abbildung 4.12 und 4.13 zeigen das gemessene Signal einer PSII-Suspension in Abhängigkeit von der Pulsintensität für verschiedene Blitzzahlen bzw. Detektionszeiten.

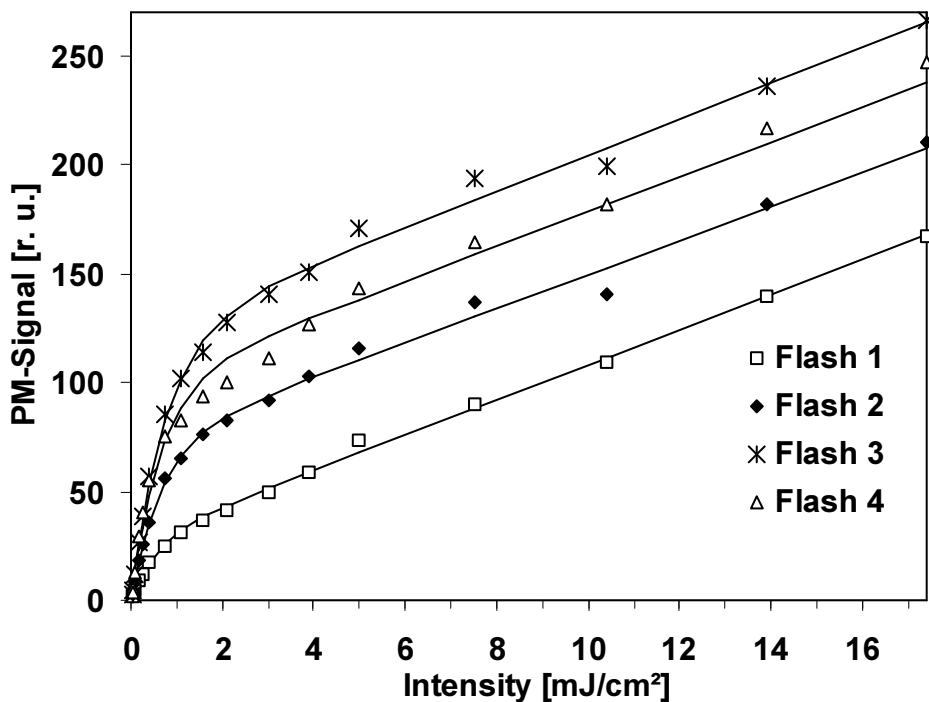


Abbildung 4.12: Photomultiplier-Signal einer PSII-Suspension detektiert 10 μ s nach Anregung in Abhängigkeit von der Pulsintensität für die Blitze 1 bis 4.

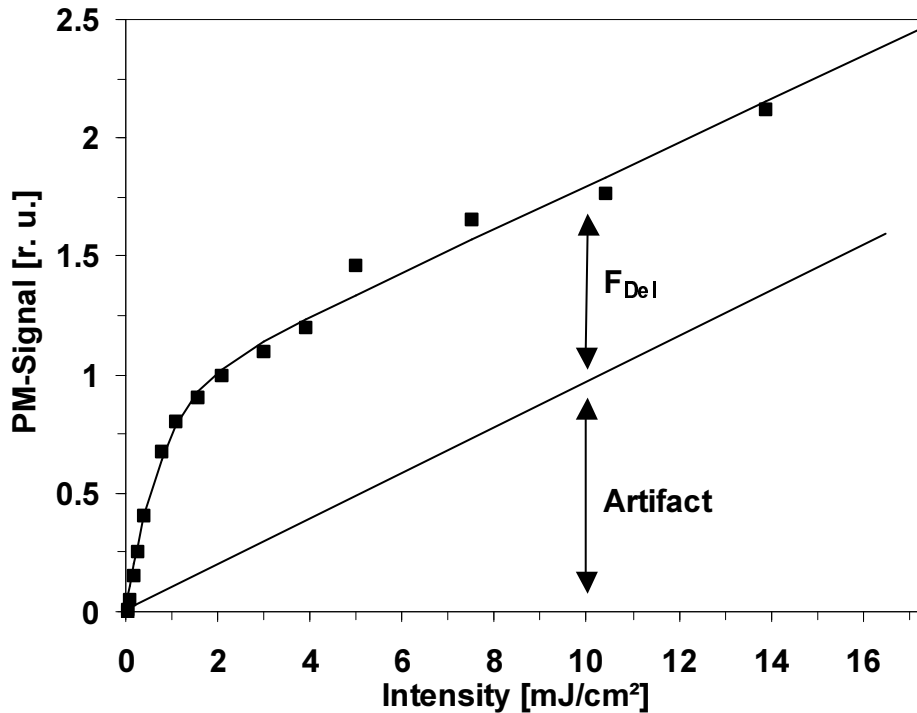


Abbildung 4.13: Photomultiplier-Signal einer PSII-Suspension detektiert 2 ms nach Anregung in Abhängigkeit von der Pulsintensität für den dritten Blitz.

Wenn man zwei Messungen bei verschiedenen Pulsintensitäten oberhalb der Sättigungsintensität unter sonst identischen Bedingungen durchführt, ist der Beitrag der Rekombinationsfluoreszenz zum Gesamtsignal der gleiche. Bildet man die Differenz beider Zeitverläufe, bleibt folglich nur das reine Artefaktsignal übrig. Dabei entspricht die Größe des so ermittelten Artefaktes dem Artefakt, der durch die Anregung der Probe mit einer Pulsenergie, die gleich der Differenzenergie ist, ausgelöst werden würde:

$$\begin{aligned}
 A(t) \cdot (I_2 - I_1) &= F(t)_{I_2} - F(t)_{I_1} \\
 A(t) &= \frac{F(t)_{I_2} - F(t)_{I_1}}{I_2 - I_1} \\
 F_D(t) &= F(t)_I - I \cdot A(t)
 \end{aligned}
 \tag{4.14}$$

$F(t)_I$ ist das gemessene Gesamt-Signal, $F_D(t)$ das Signal infolge der Rekombinationsfluoreszenz, I_1 , I_2 und I die jeweiligen, sättigenden Laserpuls-Pulsintensitäten mit $I_2 > I_1$.

Der Artefakt kann nun, nach Skalierung mit der Pulsintensität der Messung, vom gemessenen Signal subtrahiert werden. Abbildung 4.14 zeigt die Artefaktkorrektur für den dritten Blitz.

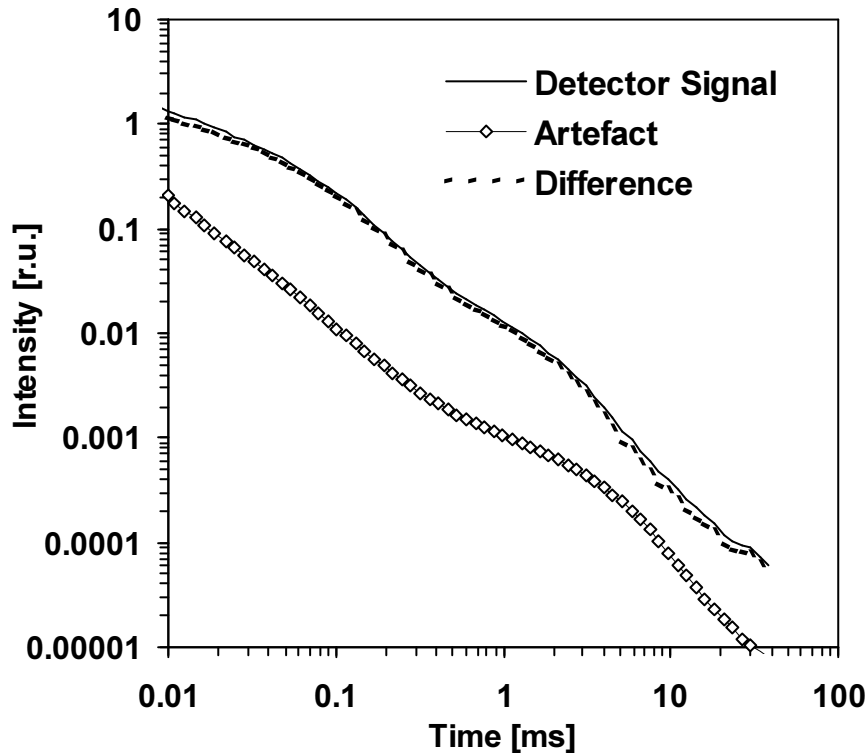


Abbildung 4.14: Beispiel für die Artefaktkorrektur des dritten Blitzes. Dargestellt ist das gemessene Signal einer PSII-Suspension ($10 \mu\text{g Chl} / \text{ml}$, Anregungsenergie $2 \text{ mJ}/\text{cm}^2$), der Artefakt sowie der durch Artefaktsubtraktion korrigierte Signalverlauf.

4.4 Messplatz der prompten Fluoreszenz

Die Messungen der prompten Fluoreszenz erfolgten nach dem sogenannten *pump-probe*-Verfahren. Dabei wird die Probe mit einer Serie sättigender Lichtblitze durch den S-Zustandszyklus geschaltet und zwischen den Blitzen die prompte Fluoreszenz mittels schwacher Testlichtpulse abgefragt. In Abbildung 4.15 ist eine typische Messkurve eines solchen *pump-probe*-Experiments dargestellt.

Verwendet wurde ein kommerzielles Gerät (Double-Modulation Fluorometer FL 3000, Photo Systems Instruments s.r.o. Czech Republic). Das Messlicht lieferten zwei Felder aus je 7 orangenen LEDs ($\lambda_{\text{max}} = 615 \text{ nm}$, HLMP-DH08, Hewlett Packard). Die Messlichtpulsdauer betrug $8 \mu\text{s}$. Als Detektor diente eine PIN Fotodiode mit $2 \mu\text{s}$ Anstiegszeit. Ein Interferenzfilter ($\lambda_{\text{durchlass}} > 685 \text{ nm}$) sowie ein Absorptionsfilter ($\lambda_{\text{durchlass}} > 700 \text{ nm}$) dienten zur Unterdrückung des gestreuten Anregungslichtes, sowie zum Ausblenden von Rest-Raumlicht (Filterspektren siehe Abbildung 4.17). Detektiert wurde rechtwinklig zu den Testpulsen und rechtwinklig zum sättigenden Blitz. Ansteuerung und Datenaufnahme erfolgten mittels mitgelieferter Software über einen Windows-PC, der seriell mit dem Steuergerät verbunden war (Steuerprotokoll siehe Anhang). Das Fluorometer bietet den Vorteil, dass sich die Messlichtpulse nach jedem sättigenden Blitz äquidistant auf einer logarithmischen Zeitskala anordnen lassen. Das reduziert die Zahl der Messlichtpulse zwischen den Blitzen, wodurch der (unerwünschte) aktinische Einfluss des Messlichtes gering gehalten wird (Veränderung der S-Zustandsverteilung zwischen den sättigenden Blitzen).

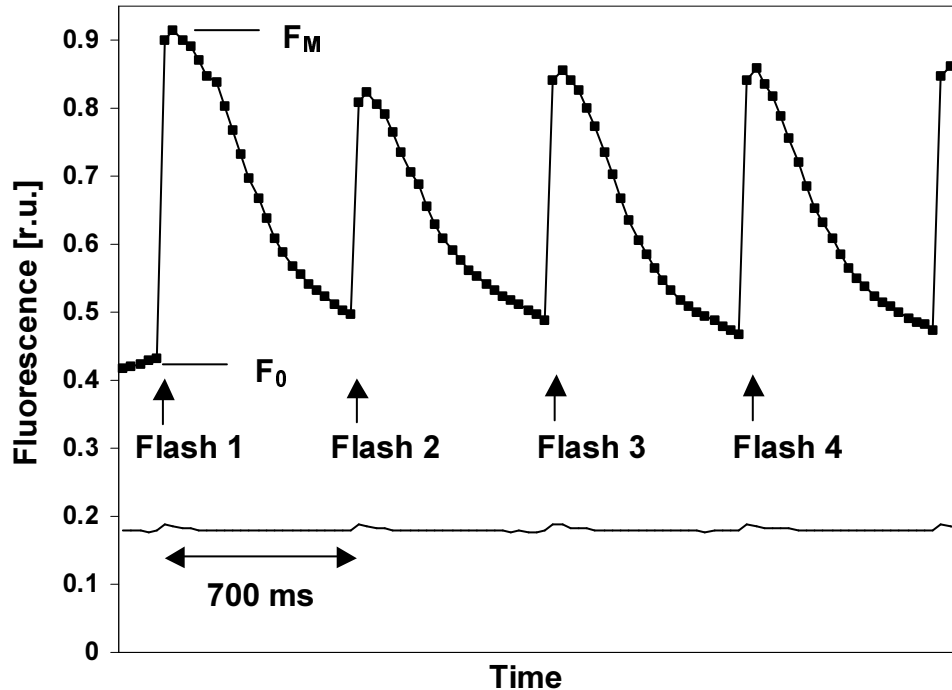


Abbildung 4.15: Typische Messkurve der prompten Fluoreszenz (durch Linie verbundene schwarze Quadrate), Linie: Streuuntergrund. Die Zeitachse zwischen jeweils zwei Blitzen ist logarithmisch geteilt (Datenpunkte nach dem jeweiligen Blitz: 79,3 μ s, 118 μ s, 177 μ s, 267 μ s, 402 μ s, 606 μ s, 916 μ s, 1,38 ms, 2,09 ms, 3,16 ms, 4,79 ms, 7,24 ms, 11 ms, 16,6 ms, 25,1 ms, 37,9 ms, 57,4 ms, 86,9 ms, 131 ms, 199 ms, 301 ms, 455 ms, 689 ms).

Da die standardmäßig zur sättigenden Anregung vorgesehenen LEDs im Fall der hier verwendeten Proben nicht vollständig sättigende Pulse lieferten, wurde stattdessen ein frequenzverdoppelter, gütegeschalteter (Q-switched) Ne:YAG-Laser verwendet (Minilite II, Continuum; max. 25 mJ, 5 ns Pulslänge bei 532 nm, siehe Abschnitt 4.3). Der Laserstrahl wurde dabei aufgeweitet (mit anschließender Parallelisierung), so dass das gesamte Küvettenvolumen ausgeleuchtet wurde. Verwendung fanden klare Kunststoffküvetten (PMMA und PS) mit einer Querschnittsfläche von $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Das Probenvolumen betrug bei allen Messungen 1 ml. Die Temperierung der Probe erfolgte auf dieselbe Weise wie bei den Messungen der Rekombinationsfluoreszenz (siehe Abschnitt 4.3). (Messung der Laserpuls-Intensität: Nova-Laser-Power/Energy-Monitor, Messkopf: pyroelektrischer Absorber Typ PE10, Ophir Optonics.)

Vor dem ersten sättigenden Blitz erfolgte die Bestimmung des F_0 -Pegels durch vier bis fünf Messlichtpulse mit einem Abstand von 200 μ s zwischen den Pulsen sowie zum ersten sättigenden Blitz. Dann wurde eine Folge von sättigenden Blitzen mit jeweils konstantem Blitzabstand innerhalb einer Serie gegeben. Aufgrund von geräteinternen Signalstörungen war die Datenaufnahme frühestens 80 μ s nach dem sättigenden Blitz sinnvoll.

Ein trotz der verwendeten Filter auftretendes Untergrundsignal infolge einer Streuung des LED-Messlichtes wurde mit einer Streususpension vor jeder Messserie ermittelt und anschließend subtrahiert. Dazu diente ein Milch-Wasser-Gemisch, das dieselbe Streuintensität aufwies wie die PSII-Suspension. Das Mischungsverhältnis von Milch zu Wasser wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse Fluorescence, Varian) bestimmt, wobei Anregung und Detektion jeweils bei der Wellenlänge der Testlichtpulse erfolgten.

Vor Beginn der Messungen wurde die minimal notwendige Laserblitz-Intensität ermittelt, oberhalb derer alle Photosysteme angeregt werden (Sättigungsintensität). Als Indikator diente dabei die variable Fluoreszenz $F_M - F_0$, die mit größer werdender Pulsintensität zunimmt und beim Erreichen der Sättigungsintensität maximal wird (siehe Abb. 4.16). Die so ermittelte notwendige Pulsintensität lag bei $1,5 \text{ mJ/cm}^2$ für die standardmäßig verwendeten Proben (Chlorophyll-Konzentration: $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$, DCBQ: $20 \text{ } \mu\text{M}$, Schichtdicke: 1 cm).

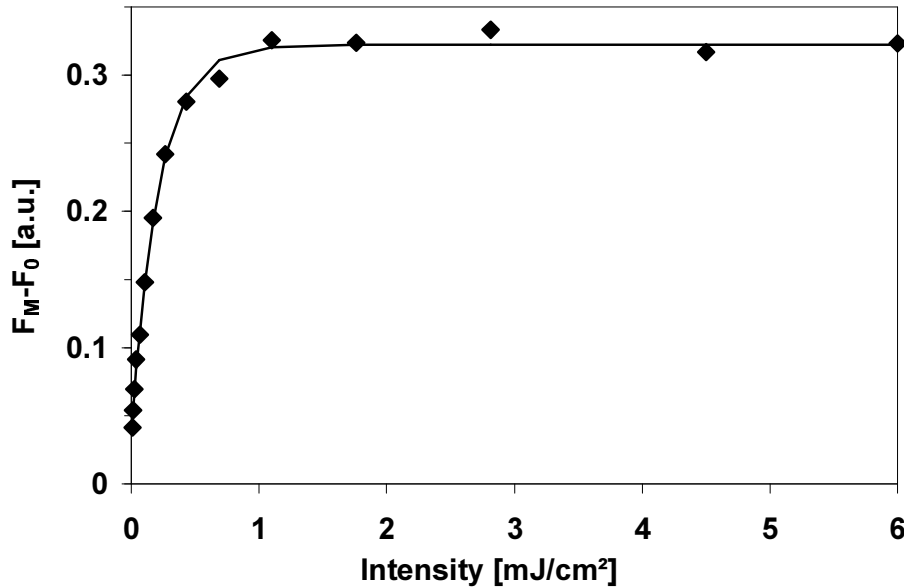


Abbildung 4.16: Sättigungskurve der prompten Fluoreszenz für eine Chlorophyll-Konzentration von $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und eine Schichtdicke von 1 cm . Dargestellt ist die Differenz zwischen maximaler und minimaler Fluoreszenz, $F_M - F_0$. Symbole: Messdaten; Linie: einfach-exponentielle Simulation mit $F = F_{\text{max}}(1 - e^{-\sigma I})$.

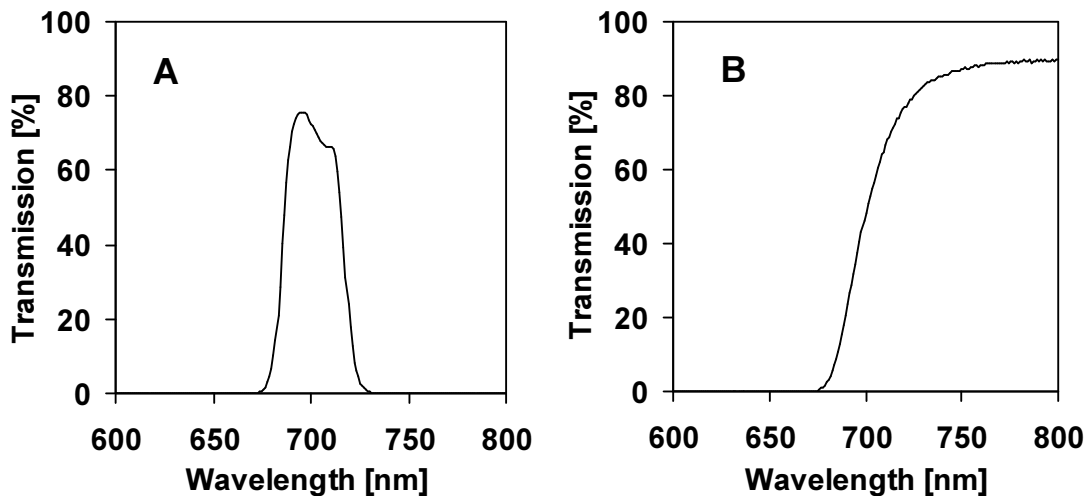


Abbildung 4.17: Transmissions-Spektren der Detektionsfilter der prompten Fluoreszenz. A: Interferenzfilter, B: Absorptionsfilter. (Beide Filter sind Zubehör des Fluorometers.)