

KAPITEL 2

EXPERIMENTELLE METHODEN

2.1 Probenpräparation und -Charakterisierung

Isolation von PS I aus *Synechococcus elongatus*

Die in dieser Arbeit verwendeten PS I Kernantenne-RZ-Komplexe wurden aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* (früher klassifiziert als *Synechococcus sp.*) gewonnen. Die gesamte Zucht, Gewinnung, Reinigung und Präparation erfolgte am Max-Volmer-Institut für Biophysikalische und Physikalische Chemie der TU Berlin unter der Verantwortlichkeit von Dr. Petra Fromme für die trimeren Proben und Dr. Petra Jekow für die monomeren Proben. Herzlichen Dank an sie und ihre Helfer! Die genauen Verfahren können in (Fromme & Witt 1998) und (Jekow et al. 1995) nachgelesen werden, hier seien nur einige Worte zur prinzipiellen Vorgehensweise gesagt.

Die Zellen wachsen in einer Nährlösung in künstlich beleuchteten und mit CO₂ begasten Glaszylindern bei einer Temperatur von ~ 55°C ungefähr vier Tage. In dieser Zeit verfünffacht sich die Biomasse. Die Zellen werden durch Zentrifugieren von der Lösung getrennt, mit Pufferlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Andauung der Zellwand wird Lysozym zugegeben. Beim anschließenden Pressen durch eine enge Kanüle (Yeda-Press, 20 atm, 20°C) brechen die Zellen auf. Erneutes Waschen und Zentrifugieren isoliert die Thylakoid-Fraktion, d.h. das Membransystem, das unter anderem auch den PS I Kernantenne-RZ Pigment-Protein-Komplex enthält. Solubilisierung der membranständigen Proteinkomplexe aus der Thylakoidmembran erfolgt durch Inkubation mit Detergentien. Für die Intaktheit des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes hat es sich als entscheidend erwiesen, hierbei nur β -DM (siehe Tab. [1.2], Seite 26) zu verwenden. Die Abtrennung aller übrigen Eiweiß-Bestandteile erfolgt zunächst wieder durch Waschen/Zentrifugieren. Dabei werden die unterschiedlichen Fraktionen nach ihrem Molekulargewicht geschichtet und können grob getrennt werden. Die endgültige Reinigung erfolgt chromatographisch über verschieden gepackte Säulen. Dabei werden die Bestandteile nach Größe und spezifischen Eigenschaften sehr fein „gesiebt“. Auch das bedeutet mechanischen Streß. Unter entsprechenden Bedingungen (osmotischer Druck, Ionenstärke und Lösungsmittel-Einwirkung: Konzentration von Salzen und Detergentien) kann das zum Aufspalten trimerer Einheiten in monomere Einheiten führen. Ist dies gewünscht, müssen sich weitere Säuberungsschritte anschließen, die die restlichen Trimer-Komplexe entfernen. Der am Ende

dieser Prozedur vorliegende PS I Kernantenne-RZ-Komplex ist so rein, daß er unter entsprechenden Bedingungen kristallisiert. Die Massen-Ausbeute (PS I/Zellmasse) liegt etwas über einem Promille.

Die spektralen Eigenschaften der PS I Teilchen variieren leicht von Präparation zu Präparation. Es können deshalb immer nur Ergebnisse von Proben aus der gleichen Präparation miteinander verglichen werden. Für alle Meßreihen wurden deshalb Proben aus *einem* Ansatz verwendet.

Zusammensetzung der Meßlösungen

Die erhaltene dunkelgrüne Suspension mit einer Chlorophyll-Konzentration von ~ 1 mM kann bei minus 80°C mehrere Monate gelagert werden. Für die Messungen wurde sie aufgetaut und mit Puffer auf die benötigte Konzentration verdünnt. Dabei konnte für die ps-zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bei ZT die Detergens-Konzentration im Puffer unter der kritischen Mizellenkonzentration gehalten werden, da das schnelle Umpumpen der Probe die Aggregation verhinderte. Für Messungen ohne Pumpen/Rühren (Fluoreszenz-Induktion, stationäre Fluoreszenz) muß der Puffer mehr Detergens enthalten. Alle Pufferlösungen enthielten:

20 mM Tricin (N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin, pH = 7.5), 20 mM CaCl₂ und 10 mM MgCl₂ sowie außerdem:

- | | |
|---|-----------------------------------|
| a) für stationäre Fluoreszenzmessungen zum Umgebungseinfluß: | 5 µM Chlorophyll |
| sowie unterschiedliche Anteile Detergens und Glycerol: | 0,00003% - 0,2%) β-DM |
| | 10% - 65% (w/v) Glycerol |
| b) für Fluoreszenz-Induktionsmessungen und stationäre Fluoreszenzmessungen zur Temperaturabhängigkeit: | 5 µM Chlorophyll |
| | 0.02 % β-DM |
| | 5 mM Natriumascorbat |
| | 65% (w/v) Glycerol |
| c) für die ps-zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bei Zimmertemperatur | 8 µM Chlorophyll |
| | 0.002 % β-DM |
| sowie für Messungen an offenem PS I zusätzlich: | 5 mM Natriumascorbat |
| | 150 µM PMS (PhenanzinMethoSulfat) |
| d) für die ps-zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bei Tieftemperatur
(geringere Schichtdicke: 0,1 mm) | 160 µM Chlorophyll |
| | 0.002 % β-DM |
| | 5 mM Natriumascorbat |
| | 65% (w/v) Glycerol |

Um in einer Probe alle Zentren zu schließen, bedarf es keiner weiteren Zusätze zur Pufferlösung, da selbst geringe Lichtmengen ausreichen, den primären Donator zu photo-oxidieren. In nicht entgasten Lösungen steht mit dem gelösten Sauerstoff immer ein terminaler Elektronen-Akzeptor zur Verfügung, während ein Elektronen-Donator zur Nachlieferung fehlt. Umgekehrt ist es möglich, den oxidierten Donator chemisch wieder zu reduzieren durch Zugabe eines Elektronenspenders mit entsprechend niedrigem Redox-Potential (beispielsweise Natriumascorbat mit etwa 60 mV) im Überschuß. Zur Beschleunigung der Re-Reduktion des primären Donators kann außerdem ein kleines „Shuttle“-Molekül benutzt werden, das sich am Ascorbat reduziert und am primären Donator wieder oxidiert, während es ihn reduziert. Dafür findet Phenazin-Metho-Sulfat (PMS) mit einem Redoxpotential von etwa 85 mV Verwendung. Bei einer Konzentration von 150 μM speist es mit einer Halbwertszeit von ~ 2 ms Elektronen ein und öffnet geschlossene Zentren.

Für Tieftemperaturmessungen wurde die Küvette in einem Bad-Kryostaten mit flüssigem Stickstoff (Oxford DN1704) oder in einem Helium-Durchfluß-Kryostaten (Oxford CF1204) eingefroren für offene RZ im Dunkeln oder für geschlossene RZ unter Weißlichtbelichtung.

Charakterisierung durch stationäre Spektroskopie

Für stationäre Fluoreszenzmessungen bei Zimmertemperatur (ZT) und tieferen Temperaturen wurde ein SLM 8000C Photon Counting Spectrofluorometer der Firma AMINCO verwendet. Die mit diesem Gerät gemessenen Emissionsspektren wurden mit der vom Hersteller gelieferten Korrekturkurve spektral korrigiert. Das stationäre Zimmertemperatur-Emissionsspektrum (siehe Abb. [3.2]) zeigt ein Maximum bei 720 nm mit einer deutlich ausgeprägten Schulter bei 680 nm. Es entspricht damit dem publizierten Emissionsspektrum des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes aus *Synechococcus el.* (Pålsson et al. 1998). Diese Form des ZT-Emissionsspektrums weist darauf hin, daß die verwendeten Teilchen den vollen Gehalt an roten Pigmenten aufweisen.

Für stationäre Absorptionsmessungen bei Zimmertemperatur und tieferen Temperaturen wurde ein Cary 5 Spectralphotometer der Firma CARY verwendet. Das Tieftemperatur-Absorptionsspektrum des PS I-Kernantenne-RZ-Komplexes (Abb. [1.4]) zeigt eine fast unstrukturierte Bande mit einem Maximum um 630 nm. Es wurde deshalb angenommen, daß Anregung in das Maximum dieser Bande alle Chlorophyll-Moleküle gleichermaßen erreicht, unabhängig davon, wo genau ihr individuelles $Q_Y(0-0)$ Absorptionsmaximum liegt. Damit wurde sowohl für die Fluoreszenz-Induktions-Messungen als auch für die ps-zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen eine unspezifische stöchiometrische Anregung angestrebt.

2.2 Fluoreszenz-Induktion

Begriff

Unter Fluoreszenzinduktion versteht man die Veränderung der Fluoreszenzausbeute eines Photosystems durch die Veränderung seines Redoxzustandes (Übergang vom „offenen“ RZ zum „geschlossenen“ RZ, siehe Abschnitt 1.5 Redox-Bedingungen). Von einem Fluoreszenz-Induktions-Transienten spricht man, wenn diese Veränderung auf der Zeitskala des Schließens (\sim ms, abhängig von der Lichtintensität) detektiert wird. Dabei dient das Fluoreszenz-Anregungslicht gleichzeitig als „aktinisches“ Licht, das die RZ schließt.

Anlage

Die Versuchsanordnung zur Messung des Fluoreszenzinduktions-Effektes ist in Abb. [2.1] schematisch dargestellt.

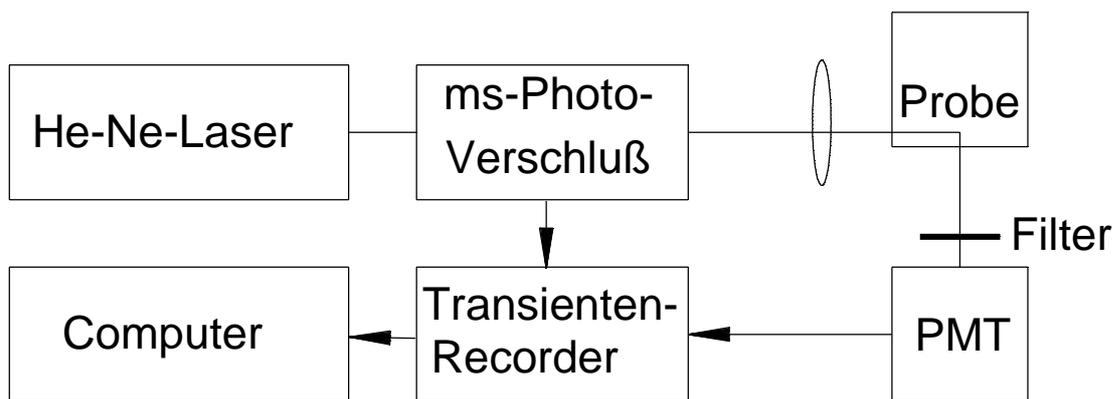


Abb. [2.1]

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung des Fluoreszenzinduktions-Effektes. Erklärung siehe Text

Die Fluoreszenz wurde mit einem He-Ne-Laser bei 631 nm angeregt. Ein elektronisch angesteuerter mechanischer Photoverschluß mit einer 10 %-bis-90 % Anstiegszeit von etwa einer Millisekunde erlaubte es, die Probe für eine kurze Zeit dem Anregungsstrahl auszusetzen. Die in einer 10 mm x 10 mm Küvette enthaltene Probe wurde zur Vermeidung von Reabsorption am vorderen Küvettenrand belichtet. Die Fluoreszenz wurde unter rechtem Winkel zum Anregungsstrahl detektiert mit einem Photomultiplier (EMI 9668-BQ). Ein 665 nm Langpaß-Filter schützte den Detektor vor gestreutem Anregungslicht. Das Signal vom Ausgang des Photomultipliers wurde auf einen Transientenrecorder (Tektronix TDS 540) gegeben, der durch die Verschluß-Steuerelektronik getriggert wurde.

Redoxtitration

Beim primären Ladungstrennungsprozeß gibt der angeregte primäre Donator P700* ein Elektron ab und reduziert den primären Akzeptor A₀. Der nicht-angeregte primäre Donator P700 kann chemisch oxidiert werden. Dazu bedarf es entsprechender oxidierender Umgebungsbedingungen. Bei einem Potential von ~ 450 mV liegen die Moleküle des primären Donators zu gleichen Teilen in oxidiertem Zustand und in reduziertem Zustand vor (Webber et al. 1996). Dieses Potential wird als Mittelpunkt-Potential E_m des Redox-Paares P700/P700⁺ bezeichnet.

Es ist also möglich, den primären Donator durch Einstellung eines hohen Redox-Potentials in der Lösung chemisch in den oxidierten Zustand zu überführen, beispielsweise durch Zugabe eines Elektronenakzeptors im Überschuß. Durch wohldosierte Zugabe von oxidiertem und reduziertem Zustand eines geeigneten Redox-Paares können in einer Lösung auch gewünschte Zwischenwerte des Redox-Potentials E eingestellt werden. Mittels des Redox-Paares Ferrocyanid/Ferricyanid mit einem Mittelpunktpotential von 430 mV kann gemäß der Nernstgleichung durch entsprechende Konzentrationen der gesamte Redox-Bereich des Redox-Paares P700/P700⁺ abgedeckt werden:

$$E = E_m + \frac{RT}{F} \cdot \ln\left\{\frac{[\text{Ferricyanid}]}{[\text{Ferrocyanid}]}\right\} \quad R\text{-Gaskonstante, } F\text{-Faradaykonstante}$$

$$= 0,43 \text{ V} + 0,059 \text{ V} \cdot \log\left\{\frac{[\text{Ferricyanid}]}{[\text{Ferrocyanid}]}\right\}$$

ergibt etwa 300 mV für 400 mM Ferrocyanid und etwa 600 mV für 400 mM Ferricyanid.

Damit ist es möglich, gezielt nicht nur die Grenzzustände „alle P700 reduziert“, also vollständig offene RZ und „alle P700⁺ oxidiert“, also vollständig geschlossene RZ zu erzeugen, sondern auch Proben mit „teilweise geschlossenen RZ“, wobei der primäre Donator in einigen Zentren oxidiert ist und in anderen nicht. Das erlaubt es, den Fluoreszenz-Induktions-Effekt chemisch zu titrieren.

2.3 ps-zeitaufgelöste Fluoreszenz

Prinzip

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen im ps-Bereich wurden mittels zeitkorrelierter Einzel-Photonen-Zählung („Time-Correlated Single Photon Counting“, TCSPC) durchgeführt. Die Grundlagen und Feinheiten dieser Technik findet man in (O'Connor & Phillips 1984). Das Prinzip beruht auf der Ergoden-Annahme über die Gleichheit von zeitlicher Mittelung und Ensemble-Mittelung. Man nimmt also an, daß sich viele von einem System gleichzeitig ausgesandte Photonen statistisch genau so verhalten wie die von sehr vielen identischen

Systemen nacheinander ausgesandten einzelnen Photonen. Diese Annahme gestattet es, sehr schnelle Prozesse durch Aufakkumulieren vieler Einzelereignisse sehr genau zu beschreiben.

Die Zeitauflösung ist dabei nur durch die Unsicherheit in der Ansprechzeit der Detektoren und durch die Unterschiede zwischen den einzelnen Anregungspulsen, also die Laser-Stabilität, eingeschränkt. Kontrollmessungen mit instantan erzeugtem Streulicht anstelle des Fluoreszenzlichtes ergeben eine zeitliche Systemantwortfunktion („instrument response function“, IRF) von typischerweise ~ 40 ps Halbwertsbreite („Full Width at Half Maximum“, FWHM). Die Versuchsanordnung für ps-aufgelöste Fluoreszenz-Messungen ist in Abb. [2.2] schematisch dargestellt.

Anregungssystem

Die 631 nm Anregungspulse mit einer Halbwertsbreite von 10 ps wurden von einem mit dem Farbstoff DCM betriebenen Farbstoff-Laser (375/344 Spectra Physics) erzeugt und mittels Cavity-Dumper mit einer Wiederhol-Frequenz von 4 MHz ausgekoppelt. Der Farbstoff-Laser wurde synchron gepumpt von einem Ar-Ionen-Laser (2045-15 Spectra Physics) mit Modelocker. Details zu Aufbau und Funktion des Lasersystems kann man der Dissertation von Rimke (1999) entnehmen. Der Anregungsstrahl wurde schwach fokussiert, durch ein Glan-Thomson-Prisma geleitet, um die vollständige vertikale Polarisierung wiederherzustellen und durch eine Lochblende (\varnothing 1 mm) auf die Mitte des optischen Fensters der 2 x 2 mm Durchflußküvette abgebildet.

Detektionssystem

Das von der Probe emittierte Fluoreszenz-Licht wurde rechtwinklig zur Anregungsrichtung durch eine Irisblende ($\varnothing \sim 1$ mm) ausgewählt und durch eine achromatische Linse auf den Eintrittsspalt eines Doppel-Monochromators (Jobin Yvon DH10-VIS) abgebildet. Dessen spektrale Bandbreite betrug laut Hersteller 4 nm/mm, gemessen wurde jedoch 5 bzw. 10 nm FWHM mit 1 bzw. 2 mm Spalten. Eine Folien-Polarisator im magischen Winkel zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes sorgte für ein zeitlich konstantes Verhältnis von senkrecht und parallel polarisierter Fluoreszenz und verhinderte somit zeitliche Intensitätsänderungen aufgrund von Depolarisierungseffekten. Als Detektor der von der Probe emittierten Fluoreszenz-Photonen diente ein Photomultiplier mit Mikrokanalplatte (Hamamatsu R3809U-01 mit rotsensitiver Multialkali-Photokathode). Eine Temperierung der Kathode mittels Peltierkühlung auf -30°C reduzierte das Dunkelrauschen auf typischerweise ~ 10 Pulse/s.

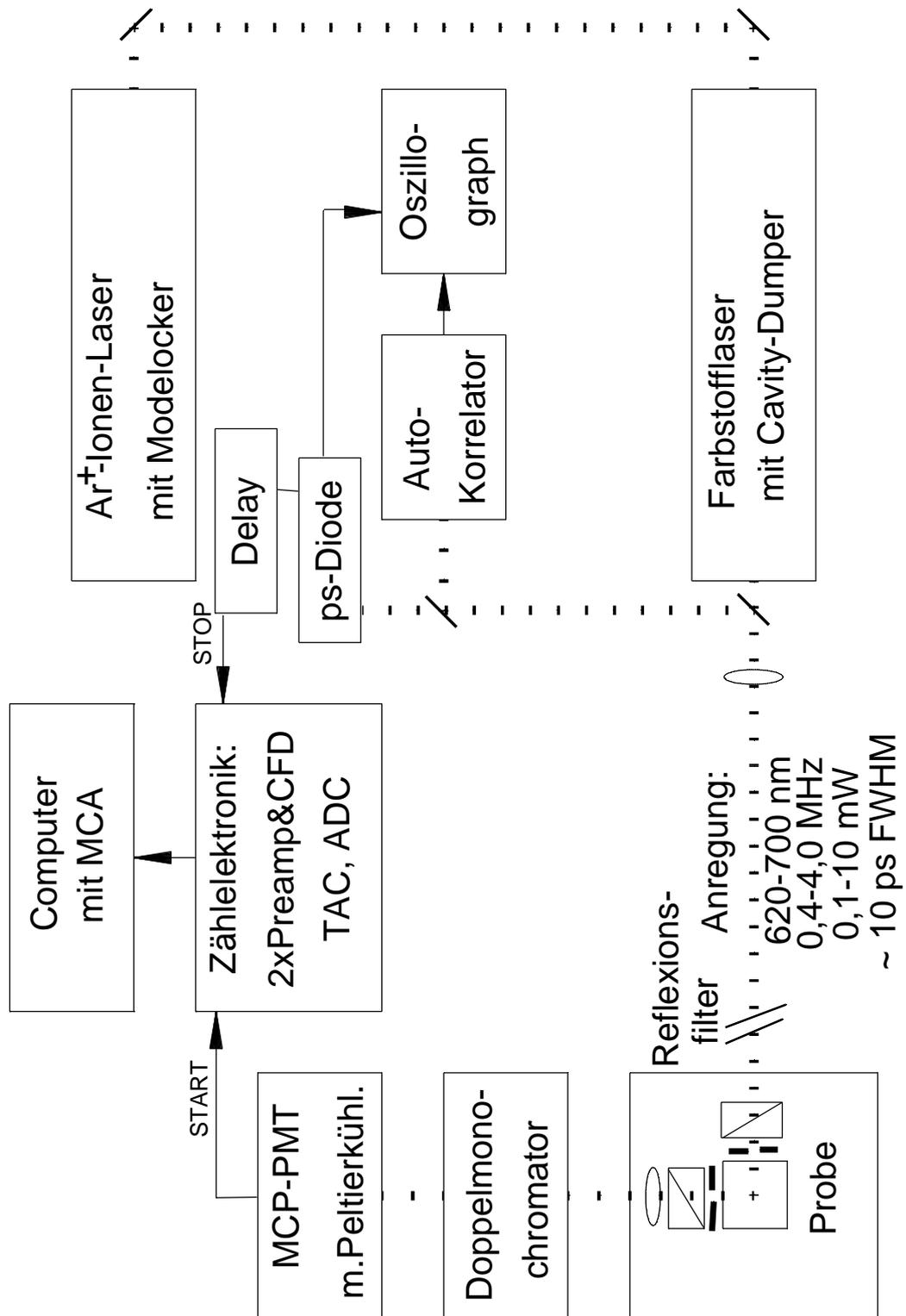


Abb. [2.2]

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für ps-aufgelöste Fluoreszenz-Messungen bei Zimmertemperatur. Erklärungen siehe Text.

Elektronische Messung kurzer Zeiten

Die Pulse am Ausgang des Photomultipliers wurden durch einen Dämpfer (-14 dB) amplitudenbegrenzt und durch einen anschließenden 2 GHz-Verstärker (+36 dB, Hamamatsu C5594) zeitlich so verbreitert, daß ein Diskriminator („Constant Fraction Discriminator“, CFD, Ortec Picotimer 9307) einen festen Amplitudenwert als „Eintreffzeitpunkt“ definieren konnte (was Unterschiede in Pulsform und -breite ausglich). Zu diesem Eintreffzeitpunkt („START“) wurde ein Zeit-zu-Amplitude-Wandler („Time-to-Amplitude Converter“, TAC, Ortec 457) in Gang gesetzt. Das war ein Kondensator, der so lange mit konstantem Strom geladen wurde, bis das „STOP“-Signal eintraf. Das STOP-Signal wurde von einem abgezweigten und verzögerten Teil des Anregungspulses ausgelöst. Als Detektor für das STOP-Signal diente eine Diode mit einer Anstiegszeit von 65 ps (Antel), die ebenfalls mit Dämpfer (-31 dB), 100 MHz-Verstärker (+21 dB, GPD 461) und Diskriminator (Canberra CM 2128) komplettiert war. Damit entsprach die auf dem Kondensator akkumulierte Ladung der zwischen dem Eintreffen beider Signale vergangenen Zeit, also der Zeit zwischen Fluoreszenz-Anregung und Fluoreszenz-Emission. Ein Analog/Digital-Wandler („Analog-to-Digital Converter“, ADC, Tracor Northern TC 1212A) digitalisierte den Spannungswert des Kondensators und ein Vielkanal-Analysator („multi channel analyzer“, MCA, Target Systemelectronic, Solingen) schrieb diesem Digitalwert einen nominellen Zeitpunkt zu, indem er für den diesem Zeitpunkt entsprechenden Kanal ein Ereignis registrierte. Nach Eichung dieser nominellen Zeitachse durch ein bekanntes Zeitintervall, nämlich $\sim 12,2$ ns zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen des Pumplasers, wurde eine kleinste Zeiteinheit erreicht, die durch die Kanalauflösung der Elektronik bedingt war, in unserem Fall ~ 5 ps/Kanal. Die Amplituden-Genauigkeit wurde durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt und konnte durch längeres Akkumulieren verbessert werden, denn die hier untersuchten seltenen diskreten Ereignisse unterliegen der Poissonstatistik, für die die Streuung nur mit der Wurzel aus der Zahl der registrierten Ereignisse zunimmt. Für die typischerweise gemessenen 40 000 Ereignisse im Kanal mit den meisten Ereignissen ergibt sich damit eine Streuung von $200/40\ 000 = 0,5$ %.

Empfindlichkeit der Detektionsanlage

Die Zerfalls-Kinetik kann durch den sogenannten „pile-up“ Effekt verzerrt werden, der darin besteht, daß spätere Ereignisse seltener registriert werden als frühere. Um das zu vermeiden, sollen die Fluoreszenz-Ereignisse nicht häufiger als in ~ 1 % der Fälle eintreffen. Bei einer Pulsfrequenz von 4 MHz bedeutet das eine Detektionsrate von maximal 4000 Ereignissen pro

Sekunde. Diese Detektionsrate wird für eine Leistung des Anregungsstrahles von ~ 1 mW am Ort der Probe erreicht, was bei 630 nm einer Anregungsrate von $\sim 3 \cdot 10^{15}$ Photonen/s entspricht. Daraus kann man unter Berücksichtigung der Absorptions- und Emissionseigenschaften der Probe eine Empfindlichkeitsabschätzung für die Detektionsanlage ableiten:

$$\text{Detektionsrate (Ereignisse/s)} = \text{Anregungsrate (Photonen/s)} \cdot W \cdot E \cdot F \cdot B \cdot D \quad \text{Gl. [2.1]}$$

Die Buchstaben kennzeichnen dabei die verschiedenen Faktoren, die die ursprüngliche Anregungsrate reduzieren und zwar ist im Einzelnen:

W Absorptionswahrscheinlichkeit, für eine Optische Dichte von $\sim 0,03$ (2 mm Küvette mit

$$8 \mu\text{M Chl in PS I mit } \epsilon = 17000/\text{M}\cdot\text{cm bei 630 nm}) \quad W = 1 - \frac{I}{I_0} = 1 - 10^{-OD} \approx 0,06$$

E Emissionswahrscheinlichkeit,

$$E = \frac{\text{Fluoreszenzlebensdauer mit Ladungstrennung}}{\text{natürliche Chlorophyll - Fluoreszenzlebensdauer}} \approx \frac{40 \text{ ps}}{15 \text{ ns}} \approx 0,0025$$

F Spektraler Anteil der detektierten Fluoreszenz, selektiert durch den Monochromator

$$F \approx \frac{\text{spektrale Monochromatorbandbreite}}{\text{Breite des (flachen) Fluoreszenzspektrums}} = \frac{5 \text{ nm}}{70 \text{ nm}} \approx 0,07$$

B Räumlicher Anteil der detektierten Fluoreszenz, selektiert durch die Öffnung einer Blende

$$\text{im Abstand } R = 50 \text{ mm} \quad B = \frac{\text{Fläche der Blendenöffnung}}{\text{Kugeloberfläche}} \approx \frac{1 \text{ mm}^2}{4\pi R^2} \approx 0,00003$$

D Detektionsempfindlichkeit der Anlage, sie beinhaltet Durchlaß von Polarisator ($\sim 50\%$) und Monochromator ($\sim (25\%)^2$, zwei Gitter) sowie die Sensitivität der Photokathode ($\sim 10\%$ bei 700 nm). Das Produkt dieser Werte ergibt $\sim 0,003$. Das ist konsistent mit dem Wert, den man durch Einsetzen der Werte für *W*, *E*, *F* und *B* in [Gl. 2.1] erhält:

$$D = \frac{\text{Detektionsrate}}{\text{Anregungsrate} \cdot W \cdot E \cdot F \cdot B} \approx 0,004$$

Diese Zahl kann natürlich nur eine grobe Abschätzung sein, zumal die eingehenden Faktoren polarisations- und wellenlängenabhängig sind. Im experimentellen Aufbau wurde dem durch das Einfügen variabler Graufilter je nach Detektionswellenlänge Rechnung getragen. Der spektrale Verlauf der Detektions-Empfindlichkeits-Funktion wurde bestimmt, indem anstelle der Probe eine Wolfram-Eichlampe mit zertifiziertem Emissionsspektrum plazierte wurde. Dann wurden für unterschiedliche Monochromator-Spaltöffnungen (1 mm und 2 mm) und Polarisatorstellungen (senkrecht, parallel, magischer Winkel) Spektren für den Wellenlängenbereich 400 nm bis

800 nm aufgenommen. Die Division des zertifizierten Eichspektrums durch die auf diese Weise erhaltenen Empfindlichkeitskurven ergab den spektralen Verlauf der Korrekturfunktion, mit der im weiteren alle stationären Spektren multipliziert wurden. Die solcherart bearbeiteten Emissionsspektren sind also Detektor-korrigiert und damit Anlagen-unabhängig.

Leistungsdichte pro Reaktionszentrum

Umgekehrt kann mit Hilfe von Gl. [2.1] aus der Begrenzung der Detektionsrate auf 4000 Ereignisse pro Sekunde unter Berücksichtigung der abgeschätzten Werte für W , E , F , D und B eine Obergrenze für die Strahlleistung in der Küvette angegeben werden, nämlich 1 mW. Diese Zahl kann umgerechnet werden auf die Zahl N der Anregungen, die pro Sekunde und RZ erzeugt werden. Sie ist gleich dem Produkt aus der Anregungsintensität I pro Quadratzentimeter und Sekunde, dem Absorptionsquerschnitt s eines einzelnen Chlorophyll-Moleküls in Quadratzentimeter und der Zahl C der Chlorophyllmoleküle pro RZ:

$$N = I \cdot s \cdot C \quad \text{Gl. [2.2]}$$

Der Absorptionsquerschnitt s eines einzelnen Chlorophyll-Moleküls in Quadratzentimetern ist mit dem molaren Extinktionskoeffizienten $e = 17000/\text{M}\cdot\text{cm}$ für PS I bei 630 nm und der Avogadrokonstante N_0 durch folgende Beziehung verbunden:

$$s = 1000 \cdot \frac{e \cdot \ln 10}{N_0} = 3.8 \cdot 10^{-21} \cdot e = 65 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2 \quad \text{Gl. [2.3]}$$

Die Zahl der Antennen-Chlorophyll-Moleküle pro RZ ist rund 100, und 1 mW Laser-Lichtleistung ergibt bei einer Strahlfläche von $\sim 1 \text{ mm}^2$ eine Leistungsdichte von $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$ bzw. $1000 \text{ W}/\text{m}^2$. Da ein rotes Photon von 630 nm eine Energie von $\sim 0.3 \text{ eV}$ besitzt, entspricht das $\sim 350 \cdot 10^{15} \text{ Photonen}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$. Das Einsetzen in Gl. [2.2] ergibt für N etwa 2000 Anregungen pro RZ und Sekunde. Da aber in einer Sekunde 4 Millionen Pulse auftreffen, wird jedes RZ während eines einzelnen Anregungspulses von weniger als 10^{-3} Anregungen getroffen.

Damit ist durch die Leistungsbegrenzung der TCSPC-Methode ausgeschlossen, daß sich mehrere Anregungen gleichzeitig in einem Kernantenne-RZ-Komplex befinden. Wäre das der Fall, könnte es bei ihrem Aufeinandertreffen zur Annihilation der Anregung kommen. Die Fluoreszenz-Kinetik würde dadurch künstlich beschleunigt werden (Den Hollander et al. 1983, Deprez et al. 1990).

Offene Zentren erfordern eine Beschränkung der Intensität des Anregungslichtes

Für Messungen am offenen Komplex müssen die durch das Anregungslicht geschlossenen Zentren rechtzeitig ausgetauscht werden, um auch die nachfolgende Messung wieder am offenen Komplex durchführen zu können. Das kann durch Umpumpen der Probe durch eine Durchflußküvette (2 mm x 2 mm, Starna) mit einer Geschwindigkeit von 36 ml/min nicht erreicht werden, da sich unter diesen Umständen ein einzelnes RZ ~ 7 ms in einem \varnothing 1 mm Strahlfleck aufhalten würde, die schließenden Photonen aber alle 0,5 ms eintreffen. Es muß also Sorge getragen werden, daß in der Redox-Reaktion



die Geschwindigkeits-Konstante k_{red} der Rückreaktion die für die Hinreaktion k_{ox} deutlich übersteigt.

Die Rückreaktion wird durch den Redox-Mediator PMS vermittelt. Durch zeitaufgelöste $P700^+$ Absorptionsbleichung konnte festgestellt werden, daß die Rate dafür bei einer Konzentration von 150 μM PMS einen Sättigungswert von ungefähr 500 s^{-1} erreicht. Weitere Erhöhung der PMS-Konzentration führt zu einer Trübung der Lösung, jedoch nicht zu einer schnelleren Reduktion von $P700^+$. Da also die Geschwindigkeits-Konstante k_{red} der Rückreaktion nicht weiter erhöht werden kann, muß umgekehrt die Anregungsintensität pro RZ herabgesetzt werden. Das kann auf zwei Wegen erfolgen: Verminderung der Lichtleistung von 1 mW auf 0,1 mW einerseits und Erhöhung der bestrahlten Fläche durch unfokussierten Laserstrahl und Öffnung der Anregungsblende von \varnothing 1 mm auf \varnothing 2 mm andererseits. Damit wird die Anregungsleistung um das 40 fache auf 50 Anregungen pro RZ und Sekunde reduziert, was 2,5 mW/cm^2 entspricht. Das bedeutet, daß jedes RZ ungefähr alle 20 ms von einer Anregung getroffen wird. Damit liegt die Geschwindigkeits-Konstante k_{ox} der Hinreaktion in Gl. [2.4] um einen Faktor zehn unter der für die Rückreaktion, so daß sich mit der Summe beider Konstanten, also in etwa 1 ms, ein Gleichgewicht einstellt, das zu $> 90\%$ auf Seiten der offenen Zentren liegt. Unter solchen Bedingungen vermessene Proben werden als „offen“ bezeichnet, obwohl sie einen geringen Anteil geschlossener RZ enthalten.

Die Verringerung der Anregungsleistung hat eine proportionale Verringerung der Detektionsrate zur Folge, also auf ~ 400 Ereignisse pro Sekunde im Emissionsmaximum. Dies ist zuwenig, um in sinnvollen Zeitabschnitten ausreichend Ereignisse zu detektieren für ein zufriedenstellendes Signal/Rausch-Verhältnis. Es war daher notwendig, die Monochromator-Spaltbreite von 5 nm auf

10 nm auszudehnen, was die spektrale Auflösung einschränkt. Außerdem mußte die Öffnung der Emissionsblende von $\varnothing 1$ mm auf $\varnothing 1,5$ mm erweitert werden. Damit wird ein größerer Raumwinkel detektiert, was die Zeitauflösung beeinträchtigt. Diese Modifikationen erlaubten es, mittels TCSPC Fluoreszenzspektroskopie am offenen PS I Kernantenne-RZ-Komplex durchzuführen. Bisherige Arbeiten geben entweder höhere oder gar keine Anregungsleistungsdichten an. Es kann also davon ausgegangen werden, daß hiermit erstmals Messungen am offenen PS I Kernantenne-RZ-Komplex bei Zimmertemperatur vorgestellt werden.

Dabei zeigt sich eine geringfügig verminderte Fluoreszenz-Ausbeute in Proben mit offenen Zentren im Vergleich zu solchen mit geschlossenen Zentren. Als Kontrolle, daß dieser Effekt nicht durch unspezifische Löschung aufgrund der Zugabe der Redoxkomponenten verursacht wird, wurden diese einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Es konnte keine Abhängigkeit der Fluoreszenz-Ausbeute von der Konzentration des einzeln in der Lösung vorliegenden Ascorbat oder PMS festgestellt werden. Enthielt die Lösung jedoch gleichzeitig 5 mM Ascorbat und 150 μ M PMS, so konnte eine Zunahme der Fluoreszenz-Ausbeute mit der Leistungsdichte des eingestrahlten Lichtes festgestellt werden. Daraus folgt, daß die verminderte Fluoreszenz-Ausbeute in Proben mit offenen Zentren tatsächlich auf das Öffnen der Zentren zurückzuführen ist.

Als zusätzliche Kontrolle wurden die Messungen an Proben mit offenen Zentren folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde bei niedriger Anregungsintensität ein Fluoreszenzzerfall an der Probe ohne Ascorbat und PMS aufgenommen, also an geschlossenen Zentren. Alsdann erfolgte die Zugabe von Ascorbat und PMS und die Messung am offenen Komplex mit niedriger Anregungsintensität an den jetzt offenen Zentren. Abschließend wurde die Lichtintensität erhöht und an der die Redox-Komponenten enthaltenden Probe noch eine Zerfallskurve mit durch das Licht geschlossenen Zentren aufgenommen. Die Analyse der Zerfallskinetiken ergab identische Lebensdauern für die beiden Messungen an geschlossenen Zentren. Ein relativ geringer aber signifikanter Unterschied wurde für die Zerfallskinetik an offenen Zentren beobachtet.

Tieftemperaturmessungen

Für Tieftemperaturmessungen fand die sogenannte „backface“ Strahlgeometrie Verwendung. Dabei traf der Anregungsstrahl die Flachküvette in fast gestrecktem Winkel zur Detektionsrichtung, also von hinten. Das wurde notwendig, da es beim Schock-Einfrieren der Proben durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff selbst bei Zugabe von 65 % Glycerol geschehen

kann, daß die Probe nicht klar sondern rissig bis schneeig gefriert. In einer solchen Probe tritt vielfache Streuung sowohl des Anregungs- wie des Fluoreszenzlichtes auf. Um diese Streulichtartefakte zu minimieren, wählt man die Schichtdicke der Probe so gering wie möglich; hier wurden 0,1 mm Küvetten (Starna) verwendet. Diese Küvetten konnten nicht mehr durch die Seitenwand angeregt werden, weshalb zur „backface“ Geometrie übergegangen wurde, was eine geringfügige Änderung des Strahlengangs im Vergleich zum Abb. [2.2] bedeutete. Um die gleiche optische Dichte (0,03) wie bei den Proben für ZT-Messungen zu erreichen, wurde die Chlorophyll-Konzentration entsprechend erhöht auf 160 μM . In einem Helium-Durchfluß-Kryostaten (Oxford CF 1204) wurde die Probe auf 5 K temperiert.

Aufnahme von stationären Fluoreszenzspektren in situ

Sowohl zur Charakterisierung der Probe *in situ* als auch zur Aufnahme von Spektren an definiert offenen Zentren war es notwendig, die TCSPC-Anlage zur Aufnahme von stationären Fluoreszenzspektren zu benutzen. Dafür wird für jede gewünschte Wellenlänge über einen identischen Zeitabschnitt (typischerweise einige Sekunden) eine Zerfallskurve aufgenommen und anschließend die Zahl der Ereignisse in allen Kanälen aufsummiert. Die erhaltene Summe ist ein Maß für die stationäre Fluoreszenzquantenausbeute bei der entsprechenden Wellenlänge, wenn man von identischen Anregungsbedingungen ausgehen kann. Diese sind in der Praxis durch die Laserstabilität begrenzt. Auftragung der summierten Ereignisse gegen die Detektionswellenlänge ergibt ein stationäres Fluoreszenzspektrum.

2.4 Datenanalyse, zerfallsassoziierte Spektren

Spektrenarten

Zeitaufgelöste Fluoreszenz mit ps-Auflösung wurde für verschiedene Wellenlängen zwischen 680 nm und 750 nm gemessen. Jede dieser Messungen ergab eine Zerfallskurve, die die Abnahme der Fluoreszenz mit der Zeit nach dem Anregungspuls beschrieb. Abb. [2.3] zeigt in einer semi-logarithmischen Darstellung einen typischen Fluoreszenz-Abkling-Zeitverlauf sowie die Systemantwortfunktion und eine Anpassung der Zerfallskurve durch eine mit der Systemantwortfunktion gefaltete Summe von vier Exponentialfunktionen. Aus den Zeitverläufen kann man zeitaufgelöste Emissions-Spektren erhalten („Time Resolved Emission Spectrum“, TRES), die den spektralen Verlauf der Fluoreszenz zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellen und als orthogonaler Schnitt entlang der Wellenlängenachse durch die Zerfallskurven gefunden werden können. Zerfallsassoziierte Spektren („Decay-Associated Spectrum“, DAS), stellen den

spektralen Verlauf der Amplitude („Decay-Associated Amplitude Spectrum“, DAAS) bzw. Ausbeute („Decay-Associated Yield Spectrum“, DAYS) einer bestimmten Zerfallskomponente dar. Diese Formen repräsentieren also Spektren im strengen Sinne einer Wellenlängenabhängigkeit. Sie können aus den ursprünglich gemessenen Zerfällen errechnet werden, wobei jeder Zerfallskurve ein Punkt im TRES- oder DAS-Spektrum entspricht.

Globale Zerlegung in Exponentialfunktionen

Wenn alle im untersuchten System ablaufenden Prozesse erster Ordnung sind, ist die Populationsdynamik im System durch ein lineares Differentialgleichungssystem erster Ordnung beschreibbar. Die Lösung eines solchen Systems besitzt die Form:

$$F(\mathbf{I}, t) = \sum_i S_i A_i(\mathbf{I}) \cdot \exp(-t / \tau_i) \quad \text{Gl. [2.5]}$$

Dabei ist die Emissionswahrscheinlichkeit $F(\mathbf{I}, t)$ proportional zu der Besetzungswahrscheinlichkeit zur Zeit t für die bei der Wellenlänge \mathbf{I} emittierenden Spezies im System. Die Lebensdauern τ_i sind theoretisch für alle Spezies identisch, also „global“ für die Zerfälle bei allen Wellenlängen. Die Amplituden $A_i(\mathbf{I})$ der verschiedenen Komponenten i hängen dagegen von der Wellenlänge \mathbf{I} ab. Eine Auftragung dieser Amplituden nach geeigneter Normierung (siehe nächster Abschnitt) ergibt für jedes τ_i ein zugehöriges DAS. Werden weniger Lebensdauern aufgelöst als Spezies im System vertreten sind, kann das zur „Nichtglobalität“ der aufgelösten Lebensdauern führen.

Die gemessenen Fluoreszenz-Zerfallskurven für die verschiedenen Wellenlängen wurden mit der Systemantwort-Funktion entfaltet und global an eine Summe von Exponentialfunktionen angepaßt. Als Gütekriterium dienten dabei die „gewichteten Residuen“, wie sie im unteren Teil von Abb. [2.3] dargestellt sind. Es wurde die Summe der Quadrate der mit ihrer statistischen Signifikanz gewichteten Abweichungen zwischen Anpassung und Messung („reduziertes Chi-Quadrat“) minimiert. Dafür wurde das Programm „Globals Unlimited“ verwendet, das einen nicht-linearen Levenberg-Marquardt Algorithmus verwendet (siehe, z.B. Press et al. 1992). Entwickelt wurde dieses Programm am Laboratory for Fluorescence Dynamics an der University of Illinois (Beechem et al. 1991). Herzlichen Dank auch dorthin! Das Zeitfenster wurde dabei auf 300 Kanäle gesetzt ($\sim 1,5$ ns), was zum Bestimmen von Lebensdauern bis hin zu einigen Hundert Pikosekunden ausreichend ist. Eine längerlebige Komponente wurde vorher in einem Zeitfenster von ~ 5 ns Länge bestimmt und für die Anpassung im kurzen Zeitfenster fixiert.

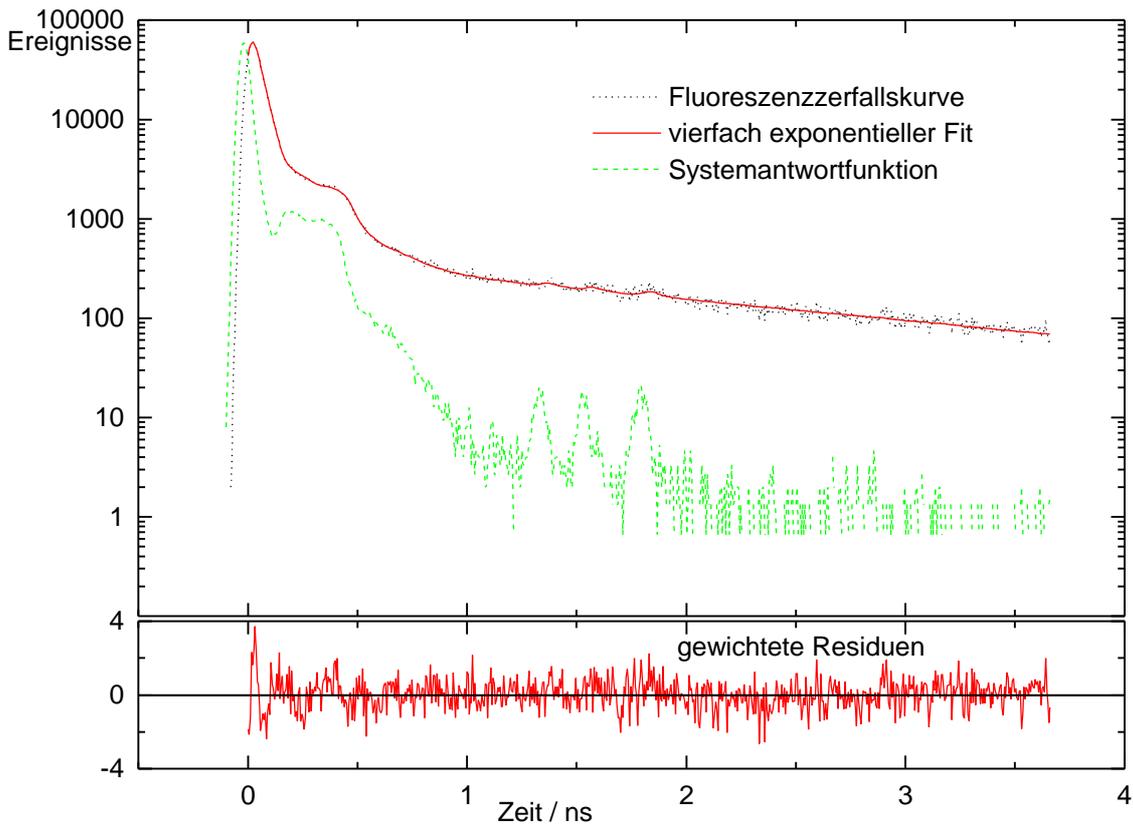


Abb. [2.3]

Typische gemessene Fluoreszenz-Zerfallskurve, die Systemantwortfunktion dazu und die Kurve, die den Fluoreszenz-Zerfall nach Herausfaltung der Systemantwortfunktion als Summe von vier Exponential-Funktionen beschreibt. Im unteren Teil des Bildes sind die gewichteten Abweichungen zwischen Anpassung und Zerfallskurve dargestellt.

Zur Abschätzung des Vertrauensintervalls für die derart bestimmten Lebensdauern wurde eine sogenannte „exhaustive search“-Analyse durchgeführt (Beechem et al. 1991). Bei dieser „erschöpfenden Suche“ wird die zu überprüfende Lebensdauer zwangsweise festgehalten bei einer Reihe von Werten in der Umgebung des vermuteten Minimums. Für jeden dieser Werte werden alle anderen Parameter bis zum minimal möglichen Chi-Quadrat optimiert. Auftragung der erzielten Chi-Quadrat-Werte über die angenommenen Werte der untersuchten Lebensdauer ergibt einen Eindruck, wie weit diese sich ändern kann, ohne ein festgelegtes Kriterium zu verletzen. Dafür wird der F-Test verwendet, der besagt, mit welcher Signifikanz sich zwei vermutete Ergebnisse unterscheiden (Press et al. 1992). Als Signifikanz-Grenze wird ein Niveau definiert, das für normalverteilte Ereignisse 1σ entspricht, also $\sim 67\%$. Die Abweichungen vom optimalen Wert der untersuchten Lebensdauer, für die diese Signifikanzgrenze erreicht wird, werden als Fehlerintervall angegeben. Da die Chi-Quadrat-Hyperfläche nicht notwendig

symmetrisch um das untersuchte Minimum ist, können auch asymmetrische Fehlerintervalle auftreten. Die mit der Methode der erschöpfenden Suche gefundenen Fehlergrenzen sind die maximal möglichen, da hierbei alle möglichen Veränderungen aller möglichen Parameter berücksichtigt werden.

Normierung der DAS

Die aus der „Globals Unlimited“- Entfaltungs- und Anpassungsprozedur stammenden Vorfaktoren A_i vor den Exponentialtermen haben nur eine mathematische Bedeutung, sie geben den relativen Anteil einer Zerfallskomponente zum Gesamtzerfall bei einer Wellenlänge an. Für die Vergleichbarkeit dieser Werte zwischen unterschiedlichen Wellenlängen und Messungen müßte eine identische Meßdauer an jedem Punkt gegeben sein, da die Amplituden mit der Meßzeit skalieren. Da aber bei der Aufnahme von Fluoreszenz-Zerfallskurven zum Erreichen eines bestimmten Signal/Rausch-Verhältnisses immer bis zur gleichen Zahl von Ereignissen im Kanal mit den meisten Ereignissen gemessen wird, die Zerfälle bei unterschiedlichen Wellenlängen aber unterschiedlich schnell sein können, wird im allgemeinen die Akkumulationszeit für unterschiedliche Wellenlängen unterschiedlich sein.

Deshalb muß im Nachhinein eine physikalisch sinnvolle rechnerische Skalierung vorgenommen werden. Möglich sind Amplituden-Normierung und Ausbeuten-Normierung.

Die *Amplitude* A_i bei einer bestimmten Wellenlänge stellt ein Maß dar für die Gesamtzahl der bei dieser Wellenlänge fluoreszierenden *Chromophore*. Diese Zahl hängt von der Pigmentzusammensetzung der Antenne ab. Normierung der Relativ-Amplituden A_i auf gleiche, wellenlängen-unabhängige Absolut-Amplituden hat im DAS eine Überbetonung der kleineren Pools zur Folge, für PS I also der „röteren“. Physikalisch sinnvoller ist die Normierung auf das Fluoreszenz-Ausbeutespektrum, da dabei die DAS die tatsächliche Anregungsverteilung in der Antenne widerspiegeln.

Die *Ausbeute* Q_i bei einer bestimmten Wellenlänge stellt ein Maß dar für die Gesamtzahl der bei dieser Wellenlänge emittierten *Fluoreszenzquanten*, d. h. die Fläche unter der Zerfallskurve integriert über die gesamte Zeitachse bis zum Abklingen des langsamsten Prozesses. Für exponentielle Zerfälle ist diese Fläche gegeben durch: $S_i Q_i = S_i A_i t_i$.

Da stationäre Fluoreszenz-Spektren die Wellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenz-Ausbeute darstellen, ergibt sich ein konsistentes Bild zwischen zeitaufgelösten und stationären Messungen, wenn die Relativ-Amplituden A_i^{ist} so skaliert werden, daß die Ausbeuten Q_i^{ist} (summiert über alle

Zerfallskomponenten bei einer Wellenlänge $Q_I^{ist} = S_i Q_i^{ist} = S_i A_i^{ist} \tau_i$) den Wert Q_I^{soll} des im Maximum auf eins normierten *in situ* gemessenen stationären Fluoreszenz-Spektrums bei dieser Wellenlänge widerspiegeln:

$$A_i^{korr} = A_i^{ist} \cdot Q_I^{soll} / Q_I^{ist}. \quad \text{Gl. [2.6]}$$

Nach dieser Normierung der DAS können die gegen die Wellenlänge aufgetragenen Zerfalls-Amplituden A_i^{korr} (DAAS) und Ausbeuten $Q_i^{korr} = A_i^{korr} \cdot \tau_i$ (DAYS) unterschiedlicher Systeme miteinander verglichen werden. Die DAYS summieren sich zum normierten stationären Fluoreszenz-Spektrum. Die DAAS summieren sich zu einem Spektrum, das die Emission zum Zeitpunkt „ $t = 0$ “ wiedergibt. Von der Zeitauflösung des Experimentes hängt es ab, welche schnellen Prozesse tatsächlich bereits zu diesem nominellen Zeitnullpunkt vollendet sind. Nimmt man z.B. an, daß die intramolekulare Relaxation deutlich schneller als 1 ps abläuft, der intermolekulare Energietransfer hingegen deutlich langsamer, erwartet man ein Stokes-verschobenes Absorptionsspektrum der Probe.

Zur Interpretation der DAS

Die so erhaltenen DAS geben die Wellenlängenabhängigkeit der Relativamplitude einer Lebensdauer wieder. Im Falle einer heterogenen Mischung von Fluorophor-Spezies ohne Energietransfer im angeregten Zustand repräsentiert jede der Exponentialfunktionen den Zerfall der Anregung in einer der Spezies im System. Das zugehörige DAS gibt dann das Emissionsspektrum dieser Spezies wieder, also sein Species-Associated Spectrum („SAS“).

Findet Anregungsenergie-Austausch im angeregten Zustand statt, werden ebenfalls so viele Exponentialfunktionen wie Spezies erwartet. Sie können jedoch aufgrund des Energietransfers zwischen den Fluorophoren nicht mehr den Spezies individuell zugeordnet werden. Vielmehr repräsentiert dann jede Exponentialfunktion einen *Prozeß* der Umverteilung oder des Zerfalls der Anregungsenergie, an dem mehrere Spezies teilhaben können. Die DAS sind dann nicht mehr mit den SAS der individuellen Spezies identifizierbar, sondern stellen eine Linearkombination aus diesen dar. In dieser Arbeit sollen Anregungstransfer- und Anregungsabbau- *Prozesse* verfolgt werden, die beschrieben werden durch die DAS. Es wird hier nicht versucht, die SAS der individuellen Pigmentpools aus den Fluoreszenzzerfällen zu extrahieren.

Wenn zwischen allen Spezies Energietransfer möglich ist, werden mathematisch so viele Lebensdauern wie Spezies erwartet, von denen alle außer einer einzigen Umverteilungsprozesse beschreiben. Solche Prozesse besitzen DAS, die sowohl positive Amplituden für den Anregungs-

zerfall als auch negative Amplituden für die Anregungszunahme aufweisen. Eine einzige Komponente, nämlich die mit der größten Lebensdauer, weist ein DAS mit überall positiven Amplituden auf. Sie beschreibt den Zerfall der Anregung aus dem umverteilten Zustand.

Experimentell werden in der Regel weniger Exponenten aufgelöst, als Spezies im System vorliegen. Unter diesen können auch mehrere mit überall positiven DAS vorkommen. Dafür sind verschiedene Ursachen möglich:

- 1) mehrere Komponenten unterscheiden sich in ihren Lebensdauern so wenig, daß Zeitauflösung und Signal/Rausch-Verhältnis des Experimentes nicht ausreichen, um sie zu trennen. Das erhaltene DAS stellt dann die Summe der nicht aufgelösten Komponenten dar, was zu überall positiven DAS führen kann.
- 2) Nicht alle Spezies kommunizieren wechselseitig, manche Rückwärtskanäle sind „zu eng“. Das führt zu Sub-Einheiten innerhalb des Systems, innerhalb derer die Anregung mit einer eigenen Zerfallszeit mit überall positivem DAS zerfällt.

Für den Vergleich zwischen dem aus experimentellen Zerfallskurven errechneten DAS und dem aus mathematischen Modellen stammenden DAS ist es wichtig, folgendes zu beachten: Aus experimentellen Zerfallskurven errechnete DAS sind aufgrund der endlichen Monochromator-Spaltbreite „Bandenspektren“. Außerdem weisen die Banden aller Pigmentpools selbst bei 5 K eine inhomogene Breite von ~10 nm FWHM auf, wie aus der Zerlegung des Tieftemperatur-Absorptionsspektrums ersichtlich ist. Im Gegensatz dazu stellen die aus mathematischen Modellen im Kapitel 4 stammenden DAS „Strichspektren“ dar, da dort für die Darstellung die Breite der Banden keine Berücksichtigung findet, um die Zahl der variablen Parameter einzuschränken.

Außerdem zeigen die simulierten DAS die Besetzung der Pigmentpools aufgetragen gegen deren *Absorptionswellenlänge*, stellen also Anregungsspektren dar (DAXS, Decay-Associated Excitation Spectra) während gemessene DAS die Besetzung von Pigmentpools widerspiegeln, die bei der Meßwellenlänge *emittieren*.

Zum Vergleich simulierter DAXS mit gemessenen DAS muß man sich erstere also Stokes-verschoben und Gauß-verbreitert vorstellen.

In diesem Kapitel wurde beschrieben, wie ungeachtet der Schließung durch das Meßlicht an offenen PS I Proben Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden können.