

Entwicklung eines Step-Scan
FTIR-Experiments zur Untersuchung der
lichtinduzierten Wasserspaltung der
oxygenen Photosynthese

Dem Fachbereich Physik der
Freien Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Dr. rer. nat.

eingereichte Dissertation

von
Herr Dipl.-Phys. Björn Süß
aus
Pforzheim

Berlin
September 2011

Datum der Einreichung: 2011/09/16

Datum der Disputation: 2011/11/16

Referent: Prof. Dr. Holger Dau

Koreferent: Prof. Dr. Joachim Heberle

Abstract

The Photosystem II is a central component of photosynthesis, which in turn constitutes directly or indirectly the basis for most forms of life. Infrared spectroscopy can provide detailed information both about structure and kinetics of photoactivated reactions at the PSII. Of particular interest are, therefore, time-resolved FTIR (Fourier-Transform-Infrared) measurements. The so-called Step-Scan mode provides the best time resolution, which is in this case only limited by the electronics of the detector. However, this mode requires an enormously high amount of samples for a complete, time-resolved infrared spectrum with an acceptable signal-to-noise ratio. Since the PSII cannot be used repetitively, the production of several 10000 homogeneous samples is a precondition for such measurements. Up to now, such Step-Scan measurements on the PSII have not been reported in literature. In the present work a setup for a Step-Scan FTIR spectrometer was constructed and first time-resolved measurements of the catalytic cycle were implemented. The most important results which have been achieved, are the following: (1) Establishment of a reliable sample preparation procedure and measurement technique. (2) Construction of a sample changer that allows measuring about 4000 samples per day. (3) Construction of an automatic sample creator. This allows for a fast production of very uniform samples with clearly defined absorption. (4) Development of a control software for the automatization of measurements. (5) Steady state measurements of the catalytic cycle with high signal-to-noise ratio. A good molar extinction coefficient was obtained and data from literature was reproduced well. (6) Rapid-Scan measurements on manganese-depleted samples, which also agree well with literature and allow for a reliable assignment of bands. (7) First Step-Scan measurements on the PSII with 61596 fresh samples and a high signal-to-noise ratio. (8) Development of an evaluation software which by means of extensive corrections and selection increases the signal-to-noise ratio even more. (9) Coordination changes of bicarbonate - a ligand of the non-hem-iron from the acceptor site - from a bidentate to a monodentate coordination could be confirmed. (10) Tyrosine bands could be detected for the first time at intact PSII samples. The present work documents the operational reliability and application spectrum of the setup. Furthermore, the data shown here represents the first Step-Scan data on the PSII which has been reported so far.

Zusammenfassung

Das Photosystem II (PSII) ist ein zentraler Bestandteil der Photosynthese, welche wiederum direkt oder indirekt Grundlage für die meisten Lebensformen auf der Erde ist. Die Infrarotspektroskopie kann detaillierte Informationen sowohl über die Struktur als auch über die Kinetiken der photoaktivierten Reaktionen am PSII liefern. Von besonderem Interesse sind daher zeitaufgelöste FTIR (Fourier-Transformations-Infrarot-) Messungen. Der sogenannten Step-Scan Modus liefert dabei die beste Zeitauflösung, da diese hier lediglich durch die Detektorelektronik begrenzt ist. Allerdings benötigt man eine enorm hohe Anzahl von Proben für ein komplettes, zeitaufgelöstes Infrarotspektrum mit akzeptablem Signal-Rausch-Verhältnis. Da das PSII aber nicht mehrfach für Messungen genutzt werden kann, muss die Herstellung mehrerer 10000 gleichartiger Proben gewährleistet sein. Bisher wurde in der Literatur nicht von solchen Messungen berichtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Aufbau für Step-Scan FTIR Messungen konstruiert und erste zeitaufgelöste Messungen des katalytischen Zyklus durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse, die erzielt wurden, sind folgende: (1) Etablieren einer zuverlässigen Probenpräparationstechnik und Messmethodik. (2) Konstruktion eines Probenwechslers, der das Vermessen von etwa 4000 Proben pro Tag ermöglicht. (3) Konstruktion eines automatischen Probenerstellers. Dieser ermöglicht die schnelle Herstellung sehr homogener Proben mit klar definierter Absorption. (4) Erstellen einer Steuerungssoftware für die Automatisierung der Messungen. (5) Messungen stationärer Zustände des katalytischen Zyklus mit sehr hohem Signal-Rausch-Verhältnis. Dabei wurde ein sehr kleiner Missparameter erreicht und Literaturspektren sehr gut reproduziert. (6) Rapid-Scan Messungen an Mangan freien Proben, die ebenfalls Literaturdaten sehr gut reproduzieren und sichere Bandenzuordnungen ermöglichen. (7) Erste Step-Scan Messungen am PSII mit 61596 Einzelmessungen mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis. (8) Entwicklung einer Auswertungssoftware, die durch umfangreiche Korrektur- und Auswahlverfahren das Signal-Rausch-Verhältnis noch weiter verbessert. (8) Globale Simulation der spektralen Zeitverläufe. Diese ermöglichte die Zuordnung vieler Banden zu den stationären Messungen an manganhaltigen und -freien Proben. (9) Die Änderung der Koordination des Hydrogencarbonats - einem Liganden des Nicht-Häm-Eisens der Akzeptorseite - von einer zweizähnigen zu einer einzähnigen Bindung konnte bestätigt werden. (10) Tyrosinbanden konnten zum ersten mal an intakten Photosystemen detektiert werden. Diese Arbeit belegt somit zum einen die Funktionstüchtigkeit und Anwendungsmöglichkeiten des Aufbaus; zum anderen sind die hier gezeigten Step-Scan Messungen die ersten, die für das wasseroxidierende PSII berichtet wurden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Photosystem II	3
2.1	Oxygene Photosynthese	3
2.2	Photosystem II	4
2.3	Mangankomplex	7
3	Grundlagen der Messmethode	13
3.1	IR Spektroskopie	13
3.2	FTIR	14
3.2.1	Dispersive Spektrometer	14
3.2.2	FTIR Spektrometer	15
3.2.3	Auflösung	17
3.2.4	Apodisation	18
3.2.5	Phasenkorrektur	19
3.2.6	Anzahl der Interferogrammpunkte	20
3.2.7	Lambert-Beersches Gesetz	21
3.2.8	Differenzspektren	21
4	Konstruktion des Probenerstellers und Probenwechslers	23
4.1	Komponenten des Probenwechslers	24
4.1.1	Gehäuse	24
4.1.2	Halterung des Probenerstellers	25
4.1.3	Probenhalter	25
4.1.4	Linearversteller, Spiegel und Filter	25
4.2	Probenersteller	30
4.3	Periphere Komponenten	33

4.3.1	Kühlung mit flüssigem Stickstoff	34
4.3.2	Laserenergie	35
4.3.3	Komponenten zur Justage des Infrarotstrahls	37
5	FTIR Steuerung	39
5.1	Reiter I	39
5.2	Reiter II	44
6	Messung der stationären Zustände	49
6.1	Aufbau	50
6.1.1	FTIR Spektrometer	50
6.1.2	Temperierbarer Probenhalter	50
6.2	Probenpräparation	52
6.3	Wahl des Elektronenakzeptors	53
6.4	Messparameter	55
6.4.1	Einstellungen des Spektrometers	55
6.4.2	Vorblitz	56
6.4.3	Blitzprotokoll	56
6.5	Missparameter	57
6.5.1	Programm zur Berechnung des Missparameters	58
6.6	Ergebnisse	60
6.6.1	Differenzspektren	60
6.6.2	Diskussion	64
7	Messung der stationären Zustände mit dem Probenwechsler	65
7.1	Probenpräparation und Messprotokoll	65
7.1.1	Einstellungen des Spektrometers	65
7.1.2	Blitzprotokoll	66
7.2	Ergebnisse	67
7.2.1	Zuordnung der Banden	72
7.2.2	Diskussion	85
8	Zeitaufgelöste Messungen an Mn-freien Proben	87
8.1	Probenpräparation und Messprotokoll	88
8.2	Messparameter	88
8.2.1	Einstellungen des Spektrometers	88

8.2.2	Weitere Parameter	89
8.3	Ergebnisse	90
8.3.1	Bandenzuordnung	94
8.3.2	Diskussion	99
9	Step-Scan Messungen	101
9.1	Probenpräparation und Messprotokoll	101
9.1.1	Vorbereitungen	101
9.1.2	Probenpräparation	102
9.1.3	Ermitteln der guten Probenpunkte	103
9.1.4	Beginn der Messung	103
9.2	Messparameter	104
9.2.1	Einstellungen des Spektrometers	104
9.2.2	Test der Aktivität der Proben	106
9.2.3	Blitzprotokoll	109
9.2.4	Erhöhte Schichtdicke	109
9.2.5	Anzahl der Messungen	109
9.3	Datenauswertung	110
9.3.1	50 Hz Korrektur	110
9.3.2	Aussortieren von Zeitverläufen mit Messfehlern	113
9.3.3	Aufaddieren und Mitteln der Daten	115
9.3.4	Extrahieren der einzelnen Zeitverläufe	115
9.3.5	Auswertung für den ersten Übergang	116
9.3.6	Auswertung der weiteren Übergänge	117
9.4	Reduktion des Rauschens	118
9.4.1	Faktor Analysis	118
9.4.2	Singulärwertzerlegung	118
9.4.3	Bestimmung der Anzahl der Faktoren	119
9.4.4	Gewichtete Singulärwertzerlegung	120
9.5	Laserartefakt	123
9.5.1	Ursache	123
9.5.2	Artefakt einer Farbstofflösung	125
9.5.3	Artefakt inaktiver Photosysteme	127
9.5.4	Korrektur	129
9.6	Simulation der Zeitverläufe	133

9.6.1	Zeitkonstanten der einzelnen Übergänge	134
9.6.2	Globale Simulation	135
10	Step-Scan Ergebnisse	137
10.1	Anfangsspektren	137
10.1.1	Unkorrigierten Daten	137
10.1.2	Korrigierte Daten	139
10.2	Akzeptorseite	141
10.2.1	Oxidation des Akzeptorchinons Q_A	141
10.2.2	Spektren nach 10 ms	143
10.2.3	Hydrogencarbonat	145
10.2.4	22 ms Phase der Simulation	151
10.2.5	Vergleich der 10 ms Spektren mit der 22 ms Phase	151
10.3	Donorseite	153
10.3.1	Vergleich der Simulationsamplituden mit den Spektren der stationären Zustände	153
10.3.2	Vergleich der Endspektren mit den Spektren der stationären Zustände	160
10.3.3	Tyrosin Z	162
10.4	Diskussion	171
11	Ausblick	173
11.1	Technische Erweiterungen	173
11.1.1	Externe Datenaufnahme	173
11.1.2	Entfernen des Gleichspannungsanteils	173
11.2	Laserartefaktkorrektur	175
11.3	Strengere Selektion	176
12	Zusammenfassung	177

Kapitel 1

Einleitung

Das Photosystem II ist eine der wichtigsten Biomaschinen der Welt. Es ist ein grundlegender Baustein zur Energiegewinnung, die das Leben erst ermöglicht. Das Abfallprodukt Sauerstoff ist wiederum die Grundlage allen höheren Lebens [Richter, 1996]. Diese herausragende Stellung und das Potential effektiver Energiegewinnung machen es zu einem interessanten Forschungsobjekt.

Das Photosystem II wurde schon auf vielfältige Weise untersucht, wobei Methoden wie z.B. Sauerstoffmessungen [Joliot et al., 1971, Forbush et al., 1971], Fluoreszenzmessungen [Dau, 1994], Elektronenspinresonanz (EPR) [Peloquin und Britt, 2001] und Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) [Robblee et al., 2001, Dau et al., 2003] eine entscheidende Rolle spielten und ein recht genaues Bild der Struktur und des Reaktionsablaufs lieferten. Eine weitere Methode, die das Potential hat präzise Informationen über Kinetiken und Strukturen zu liefern, ist die Infrarotspektroskopie. Als Sensor für molekulare Schwingungen liefert sie gleichzeitig eine Vielzahl an Informationen, die durch Methoden wie isotopisches Labeln oder den Austausch spezifischer Gruppen gedeutet werden können. Wasserstoffbrücken und Protonierungsreaktionen, wichtige Bestandteile von Redoxreaktionen und Protonentransfers, sind im Gegensatz zu den meisten Methoden direkt messbar [Barth und Zscherp, 2002]. Kinetische Informationen sind durch zeitaufgelöste Infrarotmessungen zugänglich. Eine Art der Messung stellt der sogenannte Rapid-Scan Modus dar. Hier ist die Zeitauflösung durch die mechanische Bewegung eines Spiegels begrenzt und liegt daher im Millisekundenbereich [Gerwert et al., 1990]. Die einzelnen Übergänge des Photozyklus des Photosystems II (PSII) laufen jedoch wesentlich schneller ab und lassen sich daher nicht im Rapid-Scan Modus beobachten. Lediglich Messungen der

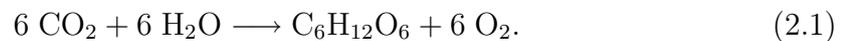
stationären Zustände sind daher möglich. Eine weitere Methode, deren Zeitauflösung lediglich durch die Detektorelektronik limitiert wird und heutzutage im Nanosekundenbereich liegt, ist die Step-Scan Messung [Rammelsberg et al., 1997]. Dieser Modus würde es ermöglichen, die Schritte des Photozyklus zu verfolgen, da sich Konformationsänderungen des Proteinkomplexes, Protonierungsreaktionen und Redoxreaktionen im Infrarotspektrum widerspiegeln. Obwohl derartige Informationen von großem Interesse sind, wurden bisher in der Literatur keine Step-Scan Messungen am PSII berichtet. Der Grund hierfür sind außerordentlich hohe Anforderungen an den Messaufbau. An einer PSII Probe kann nur eine einzige Messung durchgeführt werden, danach ist sie unbrauchbar. Für ein zeitaufgelöstes Infrarotspektrum ist es im Step-Scan Modus jedoch nötig, den Zeitverlauf bei hunderten Spiegelpositionen zu messen. Um ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, muss diese Messung vielfach wiederholt werden, wodurch die Zahl der benötigten Einzelmessungen in den zwei- bis dreistelligen Tausenderbereich ansteigt. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, trotz dieser enormen Anforderungen die Step-Scan Methode auf das PSII anzuwenden. Hierzu war es zunächst nötig die FTIR Messmethode in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren, im nächsten schritt eine adäquate Probenpräparation zu entwickeln und schlussendlich durch einen neu konstruierten Aufbau der Step-Scan Methode gerecht zu werden.

Kapitel 2

Photosystem II

2.1 Oxygene Photosynthese

Die Natur nutzt die Sonnenenergie mit Hilfe der Photosynthese. Bei diesem Prozess werden zum einen Wassermoleküle gespalten, zum anderen wird CO_2 in energiereiche Kohlenhydrate umgewandelt [Richter, 1996]. Die Energie der Photonen wird somit chemisch gespeichert



Die primäre Energiegewinnung findet in der sogenannten Lichtreaktion statt, die Energiespeicherung in einer Licht unabhängigen Dunkelreaktion. Das PSII als Teil der Lichtreaktion befindet sich bei den Zellen von Grünalgen und höheren Pflanzen in den Chloroplasten, das sind Zellorganellen, in denen wiederum eine Membran, die Thylakoidmembran, stapelförmig eingelagert ist (siehe Abbildung 2.1). Bei phototrophen Bakterien liegt das PSII ebenfalls in der Thylakoidmembran, die bei diesen Organismen jedoch durch eine nach innen gerichtete Einstülpungen der Cytoplasmamembran realisiert ist. Diese Membran teilt den Raum in zwei Teile, das Stroma und das Lumen. Eingebettet als Transmembranproteine befinden sich:

Photosystem II (PSII): der Erzeuger einer primären Ladungstrennung nach Lichtabsorption. Es leitet Elektronen weiter und erzeugt einen Protonengradienten zwischen dem Lumen und dem Stroma.

Cytochrom- b_6/f : eine Elektronenbrücke zwischen dem PSII und PSI.

2.2. PHOTOSYSTEM II

Photosystem I (PSI): reduziert mit den vom PSII gelieferten Elektronen NADP^+ zu NADPH, einem Reduktionsmittel für weitere Reaktionen. Zu diesem Zweck wird vom PSI ein weiteres Photon absorbiert.

ATPase: wandelt, angetrieben durch den vom PSII erzeugten Protonengradienten, Adenosindiphosphat (ADP) in Adenosintriphosphat (ATP) um. ATP wirkt als Energielieferant für endotherme Reaktionen.

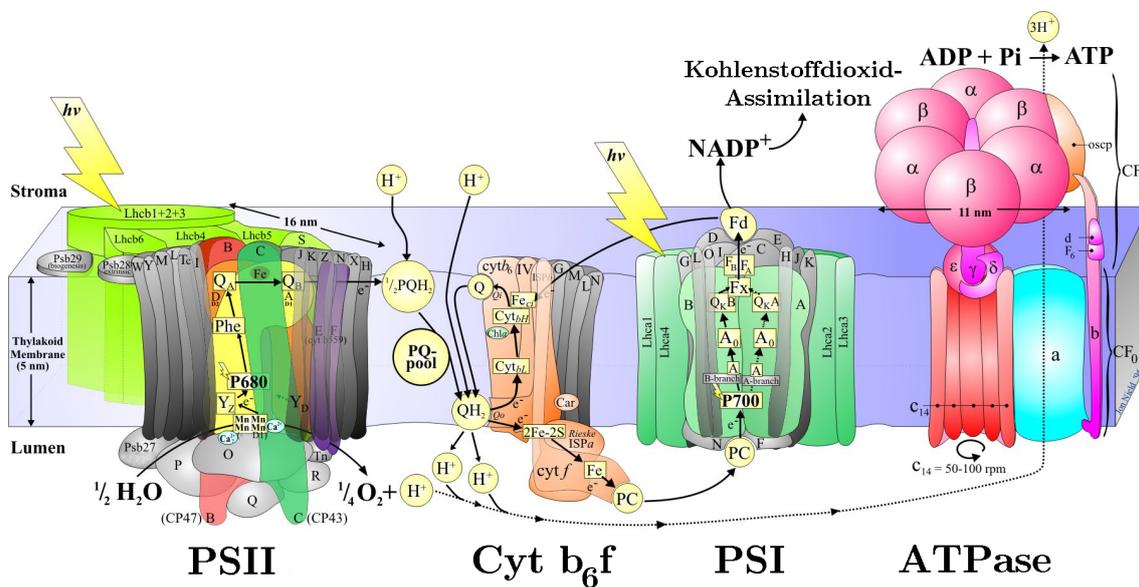
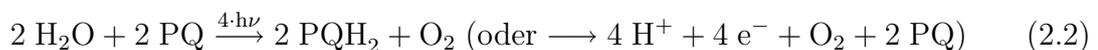


Abbildung 2.1: Die Transmembranproteine der Thylakoidmembran. Mit dem Photosystem II (PSII), dem Cytochrom- b_6/f (Cyt b_6/f), dem Photosystem I (PSI) und der ATPase.

Quelle: <http://www.jonniel.com/en/psIIimages/oxygenicphotosynthmodel.html>

2.2 Photosystem II

Das PSII ist ein Transmembrankomplex, der aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut ist (siehe Abbildung 2.2). An ihm findet die primäre Ladungstrennung statt. Der komplizierte Reaktionsverlauf lässt sich auf eine einfache Formel reduzieren:



2.2. PHOTOSYSTEM II

Wasser wird oxidiert und ein Plastochinon (PQ) wird zu einem Hydrochinon (PQH₂) reduziert. Essenziell für die Funktion sind hauptsächlich sechs Proteine, die zusammen als „Kern Komplex“ bezeichnet werden [Pho, 2005]:

- CP47 und CP43 sind Chlorophyll-a tragende Pigmentproteine. Sie stellen somit die Lichtantennen des Kerns dar.
- D1 und D2, sie enthalten den katalytischen Kern, der als Dimer aufgebaut ist, wobei ein Teil nicht direkt an der Ladungstrennung beteiligt ist. Das D2 Protein enthält das Plastochinon Q_A, das ein Teil der Elektronentransportkette des aktiven Teiles ist. Das D1 Protein beherbergt

P680: ein Chlorophyll-a Komplex, der primäre Elektronendonator, der nach Elektronenabgabe ein außerordentlich hohes Oxidationspotential entwickelt [Rappaport et al., 2002].

Pheophytin: ein Mg-freies Chlorophyll, das die Elektronen zu den Plastochinonen weiterleitet.

Plastochinon Q_B: das austauschbar gebunden ist und schrittweise zu einem Hydrochinon reduziert wird und die Elektronen abtransportiert.

Tyrosin Z: das Bindeglied zwischen dem katalytischen Zentrum und dem primären Elektronendonator P680.

Mangankomplex: bestehend aus vier Manganatomen und einem Kalziumatom. Dieser Komplex ist das katalytische Zentrum, an dem Wasser gespalten wird. Dies führt zur primären Ladungstrennung und dem Aufbau eines Protonengradienten über der Thylakoidmembran.

- Cyt b₅₅₉ mit den beiden Untereinheiten α und β enthält Elektronendonatoren, die aber nicht an der direkten Ladungstrennung beteiligt sind.

2.2. PHOTOSYSTEM II

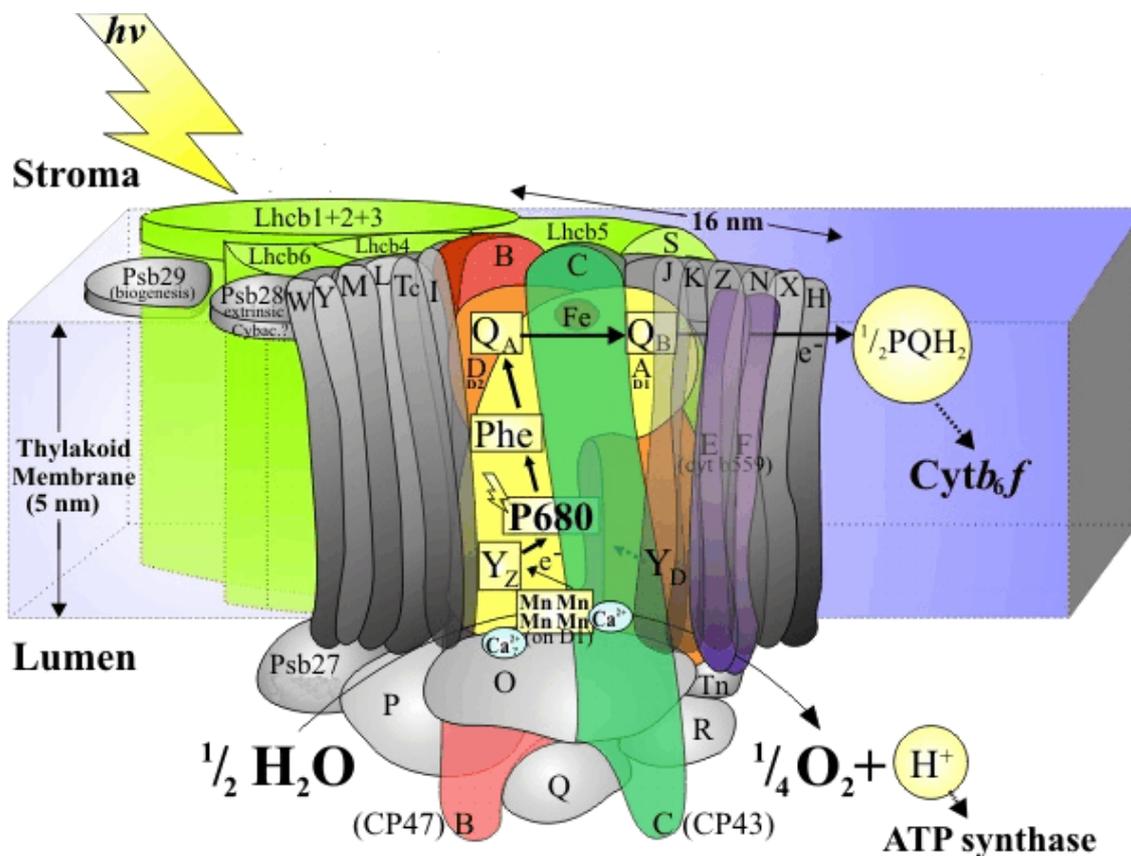


Abbildung 2.2: Schemabild des Photosystem II (PSII)

Quelle: <http://www.jonniel.com/en/psIIimages/PSII.html>

Die Reaktion läuft prinzipiell so ab, dass das in einem Lichtsammelkomplex absorbierte Licht zu einem delokalisierten angeregten Chlorophyllzustand führt, der innerhalb einiger hundert Femtosekunden das P680 erreicht [Pho, 2005]. Dort führt er in wenigen Nanosekunden zu einer primären Ladungstrennung. Ein Elektron vom P680 wandert zum Pheophytin und bildet das erste Radikalpaar $[P680^+Phe^-]$. Das Plastochinon Q_A oxidiert nun innerhalb einiger hundert Pikosekunden das Pheophytin und bildet das Radikalpaar $[P680^+Q_A^-]$. Das Elektron wird schließlich zu dem zweiten Plastochinon Q_B geleitet, das wiederum nach Erhalt von zwei Elektronen und zwei Protonen aus dem Stroma die Bindungsstelle als Hydrochinon verlässt und durch ein oxidiertes Plastochinon ersetzt wird. Das oxidierte P680 entwickelt ein enormes Oxidationspotential und oxidiert das Tyr_Z [Rappaport et al., 2002]. Dieses wiederum erhält ein Elektron vom katalytischen Zentrum, dem Mangankomplex.

2.3 Mangankomplex

Der Mangankomplex ist der finale Elektronenlieferant. Er schöpft seine Elektronen aus einem in der Zelle in großer Menge vorhandenen Stoff, dem Wasser. Der Mangankomplex setzt sich aus vier Manganatomen und einem Calciumatom zusammen. Unter der Bezeichnung „Mangankomplex“ werden aber auch ligierende Aminosäurereste, Wassermoleküle und ein eventuell vorhandener Chlorid Kofaktor zusammengefasst. Im Prinzip werden alle Teile der Umgebung der Manganatome dazugezählt, die direkt zur Wasserspaltung beitragen [Dau und Haumann, 2008]. In einer zyklischen, vierstufigen Reaktion werden zwei Wassermolekülen vier Elektronen entzogen. Die Wassermoleküle werden daraufhin gespalten, der molekulare Sauerstoff entweicht als Abfallprodukt und die Protonen werden in das Lumen geleitet. Entdeckt wurde der vierstufige Zyklus von [Joliot et al., 1969] durch Messungen der Sauerstoffentwicklung. Wird eine dunkeladaptierte PSII Probe mit kurzen, sättigenden Lichtblitzen beleuchtet, so wird erst nach dem dritten Blitz eine hohe Sauerstofffreisetzung gemessen (siehe Abbildung 2.3). Die nächste maximale Sauerstoffentwicklung ereignet sich beim 7. und dann beim 11. Blitz. Basierend auf diesen Resultaten entwickelte [Kok et al., 1970] ein Modell. Dieses erklärt die zyklische Sauerstofffreisetzung durch eine Komponente des PSII, die bis zur Spaltung der Wassermoleküle bei jeder Blitzanregung höher oxidiert wird und somit Oxidationsäquivalente ansammelt. Die einzelnen Stufen des Zyklus werden als S-Zustände bezeichnet, die jeweils für die Anzahl der Oxidationsäquivalente stehen. Beginnend beim dunkelstabilen S_1 -Zustand, bei dem schon ein Oxidationsäquivalent vorhanden ist, wird nach drei Blitzen der S_4 -Zustand erreicht, der aber sogleich unter Abgabe molekularen Sauerstoffs in den S_0 -Zustand zerfällt. Dieses zyklische Verhalten kann sehr gut mit der Messung der Sauerstoffentwicklung des PSII gezeigt werden [Forbush et al., 1971, Joliot et al., 1971]. Erst nach dem dritten Blitz steigt die Sauerstoffentwicklung stark an. Der vierschrüttige Zyklus ist auch bei höheren Blitzen gut zu erkennen, wobei jedoch eine Dämpfung der Oszillation sichtbar ist. Dies lässt sich durch eine allmähliche Desynchronisation der einzelnen PSII-Komplexe erklären (siehe Kapitel 6.5)). Bei den einzelnen S-Übergängen finden neben Redoxvorgängen auch Deprotonierungsreaktionen und strukturelle Änderungen des Mangankomplexes statt (siehe Abbildung 2.4).

S1 → **S2**: Mit dem ersten absorbierten Photon wird der Übergang in den S2-Zustand

vollzogen. Selbst bei tiefen Temperaturen, etwa bis 160 K - 200 K, ist dieser Übergang möglich [Paula et al., 1985, Miller und Brudvig, 1991]. Die Zeitkonstante des Übergangs ist pH-unabhängig und zeigt nur kleine Änderungen bei einem H₂O/D₂O-Austausch [Haumann et al., 1997]. Messungen elektrochromischer Absorptionsänderungen deuten nicht auf eine Deprotonierung hin [Rappaport et al., 1994]. Somit geht dieser Übergang wahrscheinlich ohne Deprotonierung vonstatten. Der S2-Zustand ist nicht dunkelstabil. Er zerfällt in den S1-Zustand mit einer Halbwertszeit von etwa drei Minuten bei PSII-Membranfragmenten mit dem Elektronenakzeptor PpbQ (entspricht den Proben dieser Arbeit) [Styring und Rutherford, 1988]. Ist das PSII in intakten Thylakoidmembranen liegt ein zweiphasiger Zerfall vor, mit einer Halbwertszeit der schnellen Phase von 1.5 s bis 11 s und einer Halbwertszeit der langsamen Phase von 32 s bis 75 s [Messinger et al., 1993, Vermaas et al., 1984].

S2→**S3**: Der zweite Übergang geht mit einer Deprotonierung einher. Dies zeigt sich durch Messungen mit einem amphiphilen pH-Indikator [Junge et al., 2002]. Auch ist die Zeitkonstante des Übergangs pH-abhängig und reagiert auf einen H₂O/D₂O-Austausch [Haumann et al., 1997]. Ohne Deprotonierung wäre das Redoxpotential für eine weitere Oxidation des Mn-Komplexes zu hoch (>1.1 V) [Dau und Haumann, 2008]. Damit der Elektronentransport stattfinden kann, findet nach Bildung des Tyrosinradikals eine Deprotonierung statt. Wie der S2-Zustand, ist auch der S3-Zustand nicht dunkelstabil. Er zerfällt in den S1-Zustand mit einer Halbwertszeit von etwa vier Minuten bei PSII-Membranfragmenten mit PpbQ [Styring und Rutherford, 1988]. Befindet sich das PSII in intakten Thylakoidmembranen, liegt ein zweiphasiger Zerfall vor, mit einer Halbwertszeit der schnellen Phase von 1.5 s bis 7 s und einer Halbwertszeit der langsamen Phase von etwa 90 s [Messinger et al., 1993, Vermaas et al., 1984].

S3→**S0**: Die Absorption eines dritten Photons führt zur Wasserspaltung und Sauerstofffreisetzung. Vor der Bildung des molekularen Sauerstoffs wird der S4-Übergangszustand innerhalb von etwa 200 μ s gebildet [Haumann et al., 2005]. Zeitaufgelöste XAS- und EPR-Daten deuten auf keinen Elektronentransfer bei der Bildung des S4-Übergangszustands hin [Haumann et al., 2005, Razeghifard und Pace, 1997, Westphal et al., 2000, Dau und Haumann, 2007, Babcock et al.,

1976]. Messungen elektrochromischer Absorptionsänderungen zeigen jedoch eine Deprotonierung nach Bildung des Tyrosinradikals [Rappaport et al., 1994]. Die niedrige Übergangsrate bei niedrigen pH-Werten könnte durch die Unterbindung dieser Deprotonierung erklärt werden [Bernat et al., 2002]. Nach der Deprotonierung ist der Elektronentransport zum Tyrosinradikal möglich, wodurch der potentielle S_4^+ -Übergangszustand gebildet wird [Dau und Haumann, 2008]. Daraufhin tritt die Wasserspaltung und Sauerstofffreisetzung ein. Messungen mit einem amphiphilen pH-Indikator deuten auf eine weitere Deprotonierung mit einer Millisekundenzeitkonstante hin [Junge et al., 2002, Haumann und Junge, 1994]. Der S_0 -Zustand ist semi-dunkelstabil. Bei PSII-Membranfragmenten mit PpbQ wird der Mangankomplex mit einer Halbwertszeit von 50 Minuten in den S_1 -Zustand oxidiert, bei intakten Thylakoiden beträgt die Halbwertszeit 20 Minuten [Styring und Rutherford, 1987].

$S_0 \rightarrow S_1$: Beim letzten Übergang des S-Zyklus gibt es trotz des Elektronentransfers keine Anzeichen für eine Ladungsänderung. Dies zeigen Untersuchungen elektrochromischer Absorptionsänderungen [Haumann et al., 1994, Kretschmann und Witt, 1993, Kretschmann et al., 1996]. Es ist daher wahrscheinlich, dass es zu einer Deprotonierung kommt [Dau und Haumann, 2008].

Trotz intensiver Forschung ist die Wasseroxidation im PSII noch nicht vollständig verstanden. Der genaue Ablauf der Elektronentransfer- und Deprotonierungsreaktionen ist in vielen Punkten noch spekulativ und erfordert weitere Untersuchungen. So ist z.B. unklar, ob die einzelnen Deprotonierungen direkt bei den Wassermolekülen oder an einer Base im PSII stattfinden. Eine genaue Zuordnung dieser Basen zu einzelnen Gruppen ist wichtig für ein besseres Verständnis und könnte durch die FTIR Messmethodik möglich werden. Neben der genauen Bestimmung energetischer Parameter, wie pK-Werte, Enthalpie-Änderungen und Redoxpotentiale, werden besonders zeitaufgelöste Messungen, wie Step-Scan FTIR, eine wichtige Rolle spielen, um die genauen Abläufe und Übergangszustände zu identifizieren.

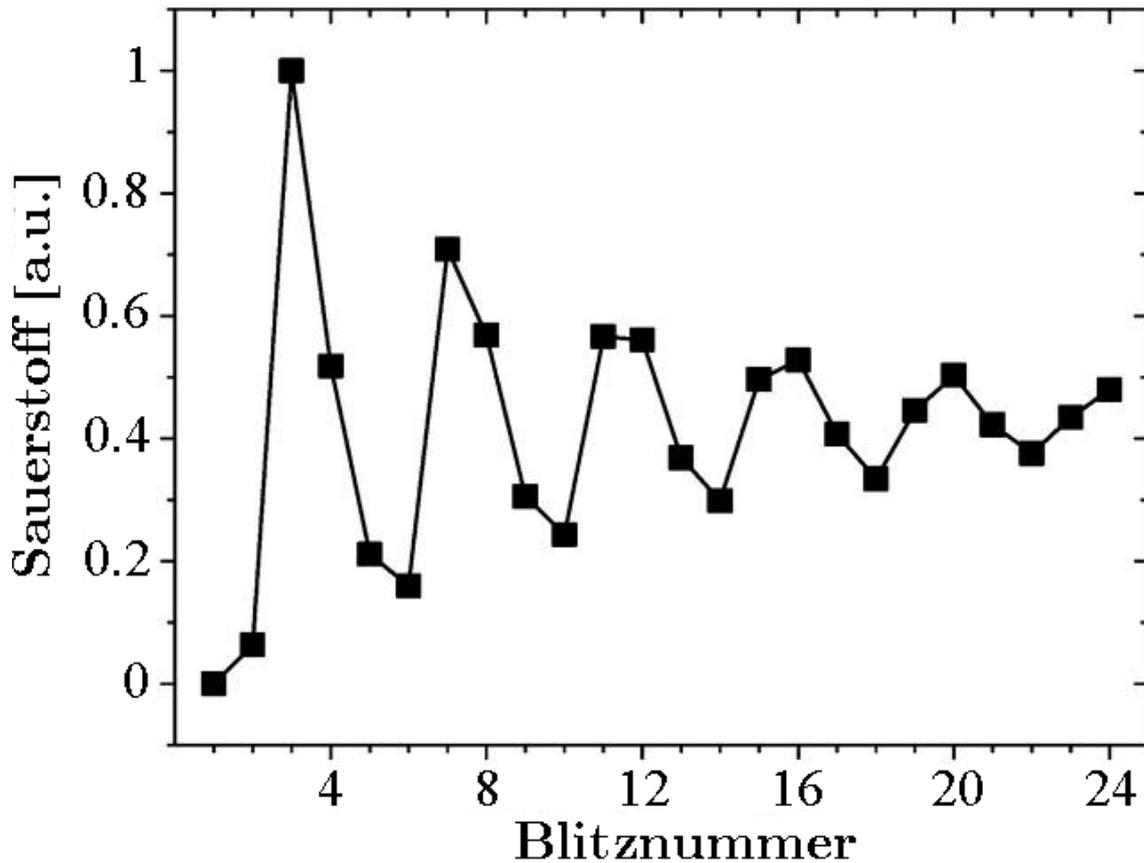


Abbildung 2.3: Gezeigt ist der Verlauf der Sauerstoffentwicklung einer dunkeladaptierten PSII-Probe. Beginnend bei dem dunkelstabilen S1-Zustand wird nach Applikation kurzer Lichtblitze die Sauerstofffreisetzung gemessen. Erst nach dem dritten Lichtblitz ist eine hohe Sauerstoffkonzentration feststellbar. Bei den nächsten Blitzen fällt sie wieder ab und erreicht Maxima beim siebten und elften Blitz. Dieses Verhalten verdeutlicht das zyklische Verhalten des PSII bei der Wasserspaltung. Die allmähliche Dämpfung dieser zyklischen Freisetzung ist auf eine ansteigende Durchmischung der S-Zustände in der Probe zurückzuführen (siehe Kapitel 6.5).

Verändert nach Vorlage aus: [Forbush et al., 1971]

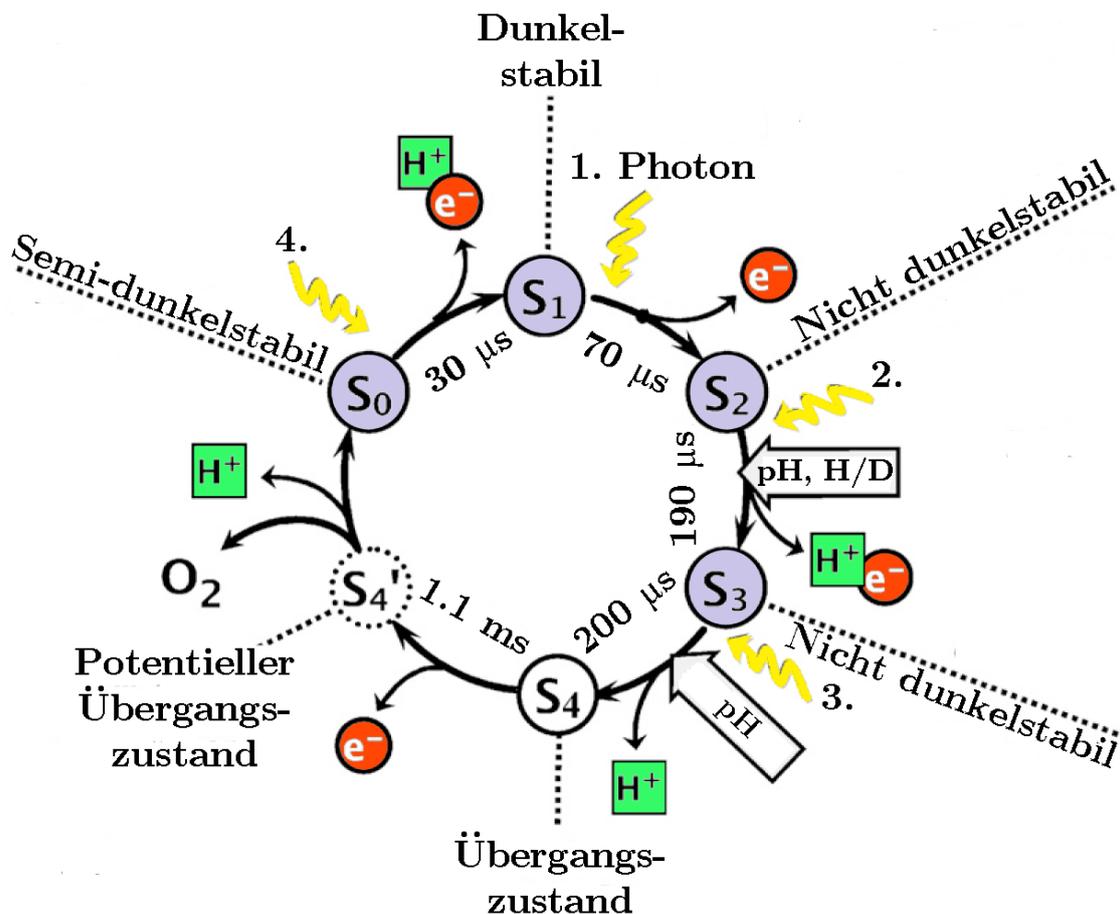


Abbildung 2.4: Schemabild des S-Zyklus. Für einen kompletten Zyklus werden vier Photonen absorbiert. Beginnend beim dunkelstabilen S₁-Zustand, werden mit der Absorption der Photonen die Zustände S₂, S₃ und S₀ erreicht. Beim Übergang vom S₃- in den S₀-Zustand werden die Übergangszustände S₄ und S₄' durchschritten und molekularer Sauerstoff freigesetzt. Veranschaulicht werden auch die Elektronenfreisetzungen sowie die Protonenfreisetzungen mit ihrem wahrscheinlichsten Auftreten. Auch die Abhängigkeit der Zeitkonstanten von einem H₂O/D₂O-Austausch oder vom pH-Wert wird gezeigt. Die Halbwertszeiten der Übergänge beziehen sich auf Werte aus [Haumann et al., 2005]

Verändert nach Vorlage aus: [Dau und Haumann, 2008]

2.3. MANGANKOMPLEX

Kapitel 3

Grundlagen der Messmethode

3.1 IR Spektroskopie

Molekulare Schwingungen erzeugen und absorbieren elektromagnetische Strahlung im infraroten Spektralbereich. Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch ein Molekül hängt von dessen Übergangsdipolmoment $M_{i \rightarrow f}$, das aus störungstheoretischen Überlegungen folgt, ab

$$M_{i \rightarrow f} = \langle \Psi_0 \Phi_i | \boldsymbol{\mu} | \Psi_0 \Phi_f \rangle . \quad (3.1)$$

Der Anfangszustand $\langle \Psi_0 \Phi_i |$ und der Endzustand $|\Psi_0 \Phi_f \rangle$ wurden nach der Born-Oppenheimer Näherung in eine elektronische Wellenfunktion Ψ_0 und eine Kernwellenfunktion Φ_i bzw. Φ_f zerlegt. $\boldsymbol{\mu}$ ist der elektrische Dipolmomentoperator. Je größer das Übergangsdipolmoment ist, desto stärker koppelt, d.h. interagiert das Molekül mit der Strahlung. Die Übergangswahrscheinlichkeit von dem Zustand ϕ_i in einen anderen Zustand ϕ_f kann durch die zeitabhängige Störungstheorie der Quantenmechanik bestimmt werden, die zu Fermis Goldener Regel führt. Diese besagt nun, dass die Übergangswahrscheinlichkeit $\Gamma_{i \rightarrow f}$ proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmoments ist

$$\Gamma_{i \rightarrow f} = \frac{2\pi}{\hbar} \rho(E_f) |M_{i \rightarrow f}|^2 . \quad (3.2)$$

Hierbei ist $\rho(E_f)$ die Zustandsdichte der Endzustände ist. Die temperaturabhängige Besetzungswahrscheinlichkeit der Vibrationszustände entspricht näherungsweise

einer Boltzmannverteilung. Bei Zimmertemperatur befinden sich die meisten Oszillatoren im Grundzustand. Die Absorption eines Photons führt zu einem Übergang in den ersten angeregten Schwingungszustand. Für diesen Übergang berechnet sich das Übergangsdipolmoment folgendermaßen

$$M_{0 \rightarrow 1} = \left\langle \frac{\partial \mu}{\partial R} \right\rangle \sqrt{\frac{\hbar}{4\pi m_r \nu}} . \quad (3.3)$$

Der rechte Term ist der Beitrag der Kerne. Der linke Term stammt von dem Beitrag der Elektronen und stellt den Erwartungswert für die Änderung des elektrischen Dipolmoments an der Gleichgewichtsposition dar. Aus dieser Gleichung folgt, dass IR Absorption nur stattfinden kann, wenn sich das Dipolmoment des Moleküls ändert. Um die erlaubten Energieniveaus der Schwingungszustände zu bestimmen, kann man das Potential der Kerne durch eine Parabel nähern, wie es für einen harmonischen Oszillator üblich ist:

$$V = \frac{1}{2}kr^2 \quad (3.4)$$

Hierbei stellt k die Bindungsstärke der Kerne mit der Relativkoordinate r dar. Mit Nutzung der Born-Oppenheimer Näherung ergibt sich die Schrödingergleichung somit zu:

$$-\frac{\hbar^2}{2m_r} \frac{d^2\Phi}{dr^2} + V\Phi = E\Phi \quad (3.5)$$

Gelöst wird diese von den äquidistanten Energien

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2} \right) \hbar \sqrt{\frac{k}{m_r}} . \quad (3.6)$$

Die Äquidistanz gilt streng nur für ein harmonisches Potential und ist in Wirklichkeit nicht immer gegeben.

3.2 FTIR

3.2.1 Dispersive Spektrometer

In dispersiven Spektrometern wird ein polychromatischer Lichtstrahl in seine Einzel Frequenzen aufgespalten und bei jeder einzelnen Frequenz eine Messung, z.B. Absorptionsmessung durchgeführt. Diese Messmethode birgt einige Nachteile:

- Da für jede Frequenz eine Einzelmessung durchgeführt werden muss, sind viele Messungen notwendig. Je höher die Auflösung sein soll, desto mehr Messungen werden benötigt. Bei einer FTIR Messung hingegen kann bei einer einzigen Messung das gesamte Spektrum aufgenommen werden.
- Der polychromatische Lichtstrahl wird vom dispersiven Element räumlich aufgespalten. Um eine Frequenz auszuwählen, muss eine Apertur einen gewissen Bereich auswählen. Je größer die Apertur ist, desto schlechter ist die Genauigkeit der gemessenen Frequenz und damit der Auflösung. FTIR-Spektrometern weisen eine sehr hohe Genauigkeit auf, da zur Ermittlung der Spiegelposition ein Laser genutzt wird.
- Das Benutzen einer Apertur verringert die Intensität des Lichts und damit das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung. Je höherauflösend ein Spektrometer ist, desto schlechter ist sein Signal-Rausch-Verhältnis. Die Apertur bei FTIR-Spektrometern kann wesentlich größer gewählt werden, da der polychromatische Lichtstrahl benutzt wird. Durch die größere Apertur weisen FTIR Spektrometer ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis auf.

3.2.2 FTIR Spektrometer

Im FTIR Spektrometer wird der polychromatische Lichtstrahl in zwei Teilstrahlen aufgespalten. Nach einem gewissen Laufweg, der kleiner als die zeitliche Kohärenzlänge des Lichtstrahls ist, werden die Teilstrahlen wieder vereint und interferieren. Wird nun ein Laufweg konstant gehalten und der andere kontinuierlich verändert, kann ein variierendes Detektorsignal, das Interferogramm aufgenommen werden. Man erhält also die Intensität der Lichtquelle in Abhängigkeit vom Gangunterschied δ der beiden Teilstrahlen. Berechnet man die Fouriertransformierte des Interferogramms, erhält man das Frequenzspektrum der Lichtquelle. Dies wird aus den folgenden Berechnungen ersichtlich:

Wird in einem Interferometer eine monochromatische Lichtquelle mit der Wellenlänge λ eingestrahlt, so kommt es bei einem Gangunterschied von dem Vielfachen der Wellenlänge zur konstruktiven Interferenz, also einer maximalen Intensität am Detektor. Bei Gangunterschieden von $\frac{2n+1}{2}$ mal der Wellenlänge kommt es zur destruktiven Interferenz. Am Detektor wird ein minimales Signal gemessen. Somit wird

3.2. FTIR

eine kosinusförmige Intensität in Abhängigkeit vom Gangunterschied der Teilstrahlen am Detektor gemessen

$$I(\delta) \propto \cos(2\pi\delta\nu) . \quad (3.7)$$

Die Auswertung der Fouriertransformierten ergibt dann die Amplitude und Wellenlänge der Lichtquelle.

Bei einer polychromatischen Lichtquelle passiert genau das Gleiche, nur eben für viele verschiedene Frequenzen gleichzeitig. Die Intensität am Detektor ist also proportional zur Summe aller kosinusförmigen Einzelsignale. Da das Spektrum kontinuierlich ist, geht diese Summe in ein Integral über

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu)\cos(2\pi\delta\nu)d\nu . \quad (3.8)$$

Die Fouriertransformation von solch einem Signal liefert die Amplituden in Abhängigkeit von der Wellenlänge, also das Spektrum der Lichtquelle

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta)\cos(2\pi\delta\nu)d\delta . \quad (3.9)$$

Wird nun wirklich ein Interferogramm gemessen, so stellt man fest, dass es nicht vollkommen symmetrisch zu dem Punkt ist, bei dem die beiden Teilstrahlen den gleichen Abstand zum Strahlteiler haben. Dies liegt an den optischen Eigenschaften des Strahlteilers und der Elektronik. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der konstruktiven Interferenz bei den einzelnen Frequenzen der polychromatischen Lichtquelle. Das Interferogramm kann also nicht mehr durch reine Kosinusterme beschrieben werden. Es muss ein wellenzahlabhängiger Phasenfaktor eingefügt werden

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu)\cos(2\pi\delta\nu + \phi(\nu))d\nu . \quad (3.10)$$

Mit den Additionstheoremen der trigonometrischen Funktionen kann die Phasenverschiebung durch Sinusterme beschrieben werden. Die geraden Interferogrammenteile werden durch Kosinusterme beschrieben, die ungeraden Beiträge durch Sinusterme.

Unter Nutzung der Eulerischen Identität kann dann das Interferogramm in einer einfachen Weise komplex beschrieben werden

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu) e^{-i2\pi\delta\nu} d\nu . \quad (3.11)$$

Die Fouriertransformation davon liefert wiederum das Spektrum der Lichtquelle

$$S(\nu) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) e^{i2\pi\delta\nu} d\delta . \quad (3.12)$$

Das Interferogramm kann nur für eine begrenzte Spiegelauslenkung gemessen werden. Das idealisierte grenzenlose Interferogramm wird bei der Messung auf beiden Seiten begrenzt. Dies entspricht einer Multiplikation des idealen Interferogrammes mit einer Rechteckfunktion, die zwischen der positiven und negativen Spiegelauslenkung Δ , eins ergibt

$$I_{\text{Messung}}(\delta) = I(\delta) * \text{rect}(\delta) \quad \text{rect}(\delta) = \begin{cases} 1 & \text{if } -\Delta \leq \delta \leq \Delta \\ 0 & \text{if } \Delta > |\delta| \end{cases} \quad (3.13)$$

Dadurch entsteht bei Berechnung des Spektrums eine Multiplikation in der Fouriertransformierten. Nach dem Faltungstherorem kann solch eine Fouriertransformierte geschrieben werden als die Faltung der Fouriertransformierten der beiden Faktoren

$$S_{\text{Messung}}(\nu) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} I_{\text{Messung}}(\delta) e^{i2\pi\delta\nu} d\delta \quad (3.14)$$

$$S_{\text{Messung}}(\nu) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) * \text{rect}(\delta) e^{i2\pi\delta\nu} d\delta \quad (3.15)$$

$$S_{\text{Messung}}(\nu) = \text{FT}(I(\delta)) * \text{FT}(\text{rect}(\delta)) . \quad (3.16)$$

Dies bedeutet, dass das ideale Spektrum mit der Fouriertransformierten der Rechteckfunktion, also der Sinc-Funktion, gefaltet wird.

3.2.3 Auflösung

Die Faltung mit der Sinc-Funktion bewirkt eine Begrenzung der Auflösung. Je geringer der Spiegelweg ist, desto breiter ist die Sinc-Funktion. Durch die Faltung

wird das realen Spektrum verbreitert. Diese Beschränkungen lassen sich durch die Faltung einer einzigen scharfen Spektrallinie mit dem Spektrum $S(\nu_{\text{monochrom}})$ und einer Sinc-Funktion quantitativ analysieren

$$S(\nu) = 2\Delta S(\nu_{\text{monochrom}}) * \text{sinc}(2\pi(\nu_{\text{monochrom}} - \nu)\Delta) . \quad (3.17)$$

Diese Funktion ist wiederum eine Sinc-Funktion mit den Nulldurchgängen des Hauptmaximums bei $(\nu_{\text{monochrom}} - \frac{1}{2\Delta})$. Damit nun zwei Spektrallinien exakt unterschieden werden können, sollten die Nulldurchgänge beider Sinc Funktionen zusammenfallen. Dies ist bei

$$\Delta\nu = \frac{1}{\Delta_{\text{Max}}} \quad (3.18)$$

der Fall, wobei $\Delta\nu$ der Abstand der beiden Wellenzahlen ist. Gleichung 3.18 ist das Kriterium für den minimalen Spiegelweg Δ_{Max} bei einer gewünschten Wellenzahlauflösung $\Delta\nu$.

3.2.4 Apodisation

Die Faltung des idealen Spektrums mit der Sinc-Funktion bewirkt, dass neben den realen Maxima im Spektrum Nebenmaxima als störende Messartefakte entstehen. Diese Nebenmaxima können durch den Einsatz von Apodisationsfunktionen vermindert werden. Die Apodisationsfunktion wird einfach mit dem gemessenen Interferogramm multipliziert. Das ideale Spektrum ist jetzt mit der Fouriertransformierten der Apodisationsfunktionen gefaltet. Für die stärkste Elimination der Nebenmaxima muss die Gaußfunktion als Apodisationsfunktionen benutzt werden, da sie bei der Fouriertransformation wieder zu einer Gaußfunktion wird. Allerdings birgt das den großen Nachteil, dass die Auflösung des Spektrums durch das Abschneiden vieler Informationen sehr klein wird. Deshalb werden i.a. andere Apodisationsfunktionen genutzt. Für meine Messungen nutzte ich die mittelstarke Norton-Beer Apodisationsfunktion:

$$A(\delta) = \sum_{i=0}^3 C_i \left[1 - \left(\frac{\delta}{\Delta} \right)^2 \right]^i \quad (3.19)$$

Dabei ist δ die Spiegelposition, Δ der gesamte Spiegelweg und die C_i sind Konstanten. Für die mittlere Norton-Beer Funktion ist $C_0=0.152442$, $C_1=-0.136176$, $C_2=0.983734$ und $C_3=0$ [Norton und Beer, 1976].

3.2.5 Phasenkorrektur

Wird ein komplettes Interferogramm aufgenommen, so fällt auf, dass es entgegen der Theorie nicht vollständig symmetrisch zur Mittelposition ist. Dafür gibt es mehrere Ursachen:

- **Optische Ursachen:** Der Brechungsindex optischer Materialien ist nicht konstant über alle Wellenlängen des Lichts. Beim Durchgang durch den Strahlteiler ändert sich für jede Wellenlänge somit der Punkt bei dem die beiden Teilstrahlen des Interferometers den gleichen Weg zurückgelegt haben. Dies kann unter Umständen auch von Vorteil sein, da ein solches Interferogramm abgeschwächte Interferenzmaxima aufweist und somit mit einer geringeren Bitzahl digitalisiert werden kann.
- **Elektronische Effekte:** Durch elektronische Bauteile, wie z.B. Tiefpassfilter, wird bei Rapid-Scan-Messungen ein Wellenlängenabhängiger Phasenfaktor in das Interferogramm eingefügt.
- **Abtastfehler:** Wird das Interferogramm nicht exakt abgetastet kommt es zu zusätzlichen Phasenbeiträgen.

Das Ergebnis einer komplexen Fouriertransformartion ist das komplexe Spektrum $S_{\text{Messung}}(\nu)$:

$$S_{\text{Messung}}(\nu) = \text{Re}(\nu) + i \text{Im}(\nu) \quad (3.20)$$

Um die Amplituden der einzelnen Frequenzbeiträge zu erhalten wird der Betrag berechnet

$$|S_{\text{Messung}}(\nu)| = \sqrt{\text{Re}(\nu)^2 + \text{Im}(\nu)^2} . \quad (3.21)$$

Für doppelseitig aufgenommene Interferogramme stellt der Betrag das gewünschte Spektrum dar. Bei halbseitigen Interferogrammen ist eine Phasenkorrektur nötig. Dafür stellen wir das komplexe Spektrum durch dessen Betrag und Phase dar:

$$S_{\text{Messung}}(\nu) = |S_{\text{Messung}}(\nu)| e^{i\Theta_\nu} \quad (3.22)$$

Ein reales Spektrum mit Phasenkorrektur kann durch Multiplikation mit $e^{-i\Theta_\nu}$ erhalten werden. Dabei ist $\Theta_\nu = \arctan \frac{\text{Im}(\nu)}{\text{Re}(\nu)}$ die wellenzahlabhängige Phase. Bei doppelseitig aufgenommenen Interferogrammen erhält man somit das Betragspektrum, es

ändert also nichts, eine Korrektur findet nicht statt. Bei halbseitig aufgenommenen Interferogrammen werden auch einige Punkte auf der zweiten Seite des Interferogrammes aufgenommen und somit die Phase Θ_ν aus dem Interferogramm mit der reduzierten Anzahl an Punkten gewonnen. Dies ist möglich, da sich die Phase nicht stark mit der Wellenzahl ändert. Danach kann das korrigierte Spektrum berechnet werden

$$S_{\text{Messung}}^{\text{Korr}}(\nu) = (\text{Re}(\nu) + i \text{Im}(\nu))e^{-i\Theta_\nu} . \quad (3.23)$$

Dieses Korrekturverfahren wurde von Mertz entwickelt [Mertz, 1965], [Mertz, 1967]. Obwohl eine Phasenkorrektur, wie mathematisch gezeigt wurde, nur sinnvoll für die Korrektur von halbseitig aufgenommenen Interferogrammen ist, wird es in vielen Arbeiten auch auf doppelseitige Interferogramme angewandt. In diesen Fällen beansprucht eine Phasenkorrektur nur Rechenzeit und führt zu keiner Verbesserung der Daten. Die Step-Scan Messungen dieser Arbeit wurden doppelseitig aufgenommen, deshalb wurde keine Phasenkorrektur durchgeführt. Eine Aufnahme von halbseitigen Spektren unter Einbeziehung der Phasenkorrektur mag auf den ersten Blick als der bessere Weg erscheinen. Tatsächlich liegen die Vorteile beim doppelseitig aufgenommenen Interferogramm. Der Rauschanteil entspricht zweier halbseitiger Messungen, eine Phasenkorrektur ist nicht nötig und insgesamt sind weniger Messungen nötig, da bei halbseitigen Messungen immer einige Punkte der zweiten Hälfte des Interferogramms gemessen werden um die Phasenkorrektur durchführen zu können.

3.2.6 Anzahl der Interferogrammpunkte

Das Interferogramm wird bei der Datenaufnahme in diskreten Schritten abgetastet. Für die Berechnung des Spektrums muss daher die diskrete Fouriertransformation angewandt werden

$$S(\nu) = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^N I(n) e^{i2\pi \frac{(\nu_{\text{max}} - \nu)n}{\nu_{\text{max}} - \nu_{\text{min}}}} . \quad (3.24)$$

Um die Frequenzen, aus denen ein Interferogramm besteht, exakt reproduzieren zu können, ist eine Mindestanzahl an Interferogrammpunkten nötig. Diese Anzahl ergibt sich aus dem Abtasttheorem, nach dem die Abtastrate des Signals mindestens doppelt so groß sein muss wie die Differenz der größten und der kleinsten Frequenz, die zu dem Signal beitragen. Ist dies nicht der Fall, treten sogenannte Aliasingeffekte auf. Im Spektrum erscheinen Frequenzen, die es nicht gibt. Sie stammen von

Vielfachen jener Frequenzen, die außerhalb des Abtastbereiches liegen. Um diese Effekte zu verhindern werden optische Filter in das FTIR-Spektrometer eingebaut, die die Bandbreite des Globars begrenzen. Bei Rapid-Scan-Messungen können auch elektronische Filter die Bandbreite des Signals verkleinern.

3.2.7 Lambert-Beersches Gesetz

Wird in den polychromatischen Lichtstrahl eine absorbierende Probe gebracht, so kann die Änderung des Spektrums der Lichtquelle durch zwei Messungen ermittelt werden. Die eine ohne Probe mit einer Intensität $I_0(\nu)$ und die andere mit Probe, hier ergibt sich eine Intensität $I(\nu)$. Der Quotient der beiden Intensitäten ist die Transmission $T(\nu)$:

$$T(\nu) = \frac{I(\nu)}{I_0(\nu)} = e^{-\alpha(\nu)cd} \quad (3.25)$$

mit dem Absorptionskoeffizienten $\alpha(\nu)$, der Konzentration c und der Schichtdicke d der Probe. Der exponentielle Zusammenhang zwischen der Transmission auf der einen Seite und der Konzentration sowie der Schichtdicke auf der anderen Seite wird Lambert-Beersches Gesetz genannt. Die Wichtigkeit dieses Zusammenhanges wird bei der Definition der Absorption $A(\nu)$ deutlich

$$A(\nu) = \log_{10} \frac{1}{T(\nu)} = \frac{1}{\ln(10)} \alpha(\nu)cd . \quad (3.26)$$

Die Absorption ist proportional zur Konzentration des Stoffes. Liegt nun eine Mischung N verschiedener absorbierender Substanzen vor, setzt sich die Absorption aus den einzelnen Absorptionen der Substanzen zusammen

$$A(\nu) = \frac{d}{\ln(10)} \sum_{i=1}^N \alpha_i(\nu)c_i . \quad (3.27)$$

3.2.8 Differenzspektren

Werden einfache Substanzen mit nur wenigen Banden untersucht, ergibt sich ein übersichtliches Spektrum. Kompliziertere Moleküle, wie z.B. Proteine, weisen zehntausende Schwingungsbanden auf. Sollen Änderungen, herbeigeführt durch eine Reaktion, untersucht werden, so gehen die interessanten Banden in der Menge unter.

3.2. FTIR

Eine Möglichkeit diese Banden sichtbar zu machen, ist die Berechnung von Differenzspektren. Dafür wird die Absorption vor der Reaktion $A_i(\nu)$ und nach der Reaktion $A_f(\nu)$ gemessen. Das Differenzspektrum

$$D(\nu) = A_f(\nu) - A_i(\nu) \quad (3.28)$$

enthält nur die Banden, die sich während der Reaktion geändert haben. Positive Banden sind neu entstanden, negative sind verschwunden. Die Messbedingungen müssen dabei sehr stabil sein, da der Hintergrund, die Stärke der Absorptionsspektren, um die Größenordnung 10^3 bis 10^4 größer ist als die Änderungen.

Kapitel 4

Konstruktion des Probenerstellers und Probenwechslers

Das benutzte Spektrometer, das Vertex 70, ist standardmäßig für die Messung einer einzigen Probe ausgelegt. Damit sind Rapid-Scan Messungen und repetierende Step-Scan Messungen ohne Probenwechsel möglich. Für die Step-Scan Messung an PSII-Proben jedoch wird für jede Interferogrammposition eine frische Probe benötigt. Für eine einzige Messung werden somit mindestens zwischen 300 und 400 frische Proben benötigt. Für ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis wird eine Anzahl an frischen Proben bzw. Messungen im zwei- bis dreistelligen Tausenderbereich benötigt. Dies macht die Nutzung eines Probenwechslers unumgänglich. Diesen in den Probenraum des Spektrometers einzubauen ist problematisch. Einerseits sollte der Durchmesser des Infrarotstrahls möglichst klein sein, um mehr Messungen pro Fläche durchführen zu können. Dies könnte durch Verkleinerung der Apertur, mit der Konsequenz des Intensitätsverlustes erreicht werden, oder durch eine Linse, die ebenfalls erhebliche Reflexionsverluste aufweisen würde. Andererseits ist das Volumen des Probenraums des Spektrometers mit einer Grundfläche von 25 cm x 24 cm sehr beschränkt. Der Probenwechsler könnte nur sehr kleine Dimensionen aufweisen. Um diese Problematiken zu lösen wurde der Infrarotstrahl aus dem Gerät durch Planarspiegel ausgekoppelt. Der divergente Strahl wird 20 cm hinter der Vertexfront mittels eines Ellipsoidspiegels fokussiert (siehe Abbildung 4.2). Im Fokus befindet sich der neue Probenpunkt. Die Rückleitung des IR-Strahls erfolgt ebenfalls über einen Ellipsoidspiegel und einen Planarspiegel. Durch diese Anordnung wurde genug Platz für einen X-Z-Kreuztisch und die Strahleinkopplung des Anre-

gungslasers geschaffen. Der IR-Strahldurchmesser wird durch den Ellipsoidspiegel um den Faktor 6,7 verkleinert. Dadurch wird eine hohe IR-Intensität bei geringem Strahldurchmesser erreicht und es kann auch eine hohe Zahl an Probenpunkten pro Fläche gemessen werden. Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Komponenten der Konstruktion eingegangen.

4.1 Komponenten des Probenwechslers

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen den kompletten Probenwechsler mit seinen Komponenten. Um die Funktionstüchtigkeit des Aufbaus zu gewährleisten wird eine millimetergenaue Konstruktion benötigt. Alle Konstruktionszeichnungen wurden mit der Software „SolidWorks“ durchgeführt. Der umfangreiche Bau wurde durch die institutseigene Feinwerktechnik durchgeführt. Unkomplizierte Komponenten wurden selbst erstellt.

4.1.1 Gehäuse

Das Gehäuse dient als Halterung für die Komponenten, als Lichtschutz und gewährleistet eine Trennung der inneren Wasserdampf- und CO₂- freien Atmosphäre von der Umgebungsluft. Es ist nicht komplett luftundurchlässig, da es ständig mit getrockneter Luft gespült wird. Die Abmessungen wurden so klein wie möglich gewählt um das Entfernen von Wasserdampf nach dem Öffnen zu beschleunigen. Die Montage am schwingungsgedämpften Tisch erfolgt durch Verschraubung mit einer geschweißten Konstruktion, die die gesamte Last trägt. Die luftdichte Ankopplung an das Vertex erfolgt durch Rohre mit Außengewinde. Die Stirnseite weist eine Dichtung auf. Diese Rohre werden nun von der Innenseite des Gehäuses auf die IR-Strahlausgänge des Vertex geschraubt. Die Einkopplung des Anregungslasers erfolgt über ein beschichtetes Glasfenster mit 10 mm Durchmesser. An fünf verschiedenen Stellen befinden sich Anschlüsse für die Trockenluft um eine homogene Spülung zu gewährleisten. Das Gehäuse verfügt über elf Kabeldurchführungen. Sechs dienen der Regelung und Spannungsversorgung der Linearverstärker, der Peltierelemente und des Schrittmotors des Probenerstellers, zwei für Ein- und Ableitung des Kühlwassers für die Peltierelemente. Ein Anschluss wird für eine Membran-Vakuum Pumpe genutzt, die das Entfernen von Wasserdampf im Gehäuse vor den Messungen beschleunigt. An einem weiteren ist ein Temperatur- und Feuchtigkeitsmessgerät vom

Typ GFTB der Firma Greisinger montiert. Ein Anschluss steht für Erweiterungen zur Verfügung. Alle weiteren Komponenten sind in dem Gehäuse montiert.

4.1.2 Halterung des Probenerstellers

Zur Produktion der Proben wird der automatische Probenersteller eingebaut. Um ihn im Probenraum zu fixieren, ist dort eine gabelförmige Arretierung befestigt. Auf dieser kann der Probenversteller verschraubt werden. Die Halterung ist auf drei manuellen Linearverstellern montiert um den Probenersteller in X-,Y- und Z-Richtung auszurichten.

4.1.3 Probenhalter

Er besteht aus eloxiertem Aluminium und hat eine Kapazität von maximal 69 Proben. Die Temperaturregulierung erfolgt über vier wassergekühlte Peltierelemente mit einer Leistung von je 45 Watt, die eine sehr schnelle Änderung der Temperatur erlauben und eine gewünschte Temperatur stabil halten (maximale Schwankung < 0.1 °C). Der PTC (Positive Temperature Coefficient) Temperaturfühler für die Regelung ist in einer Bohrung des Halters eingeklebt.

4.1.4 Linearversteller, Spiegel und Filter

Linearversteller für den Probenhalter

Für die Aufgabe die Probenpunkte anzufahren und stabil zu halten wurden die motorisierten Hochpräzisionslinearversteller M-404 von Physik Instrumente (PI) ausgewählt. Sie gewährleisten ein hohes Maß an Präzision, Haltekraft, Zuverlässigkeit und sind über eine Dynamic Link Library gut über eigene Programme steuerbar. Zwei Linearversteller mit je 20 cm Verstellweg wurden senkrecht montiert um einen X-Z-Kreuztisch zu erhalten.

Umlenkspiegel

Die Spiegel für die Ein- und Auskopplung des IR-Strahls aus dem Vertexgehäuse wurden jeweils auf einem MF11-Spiegelhalter der Firma Linos für die Feinjustage und zwei manuellen Linearverstellern für die grobe Positionsjustage montiert.

Ellipsoidspiegel

Ellipsoidspiegel fokussieren das Licht von einem Punkt F1 auf einen zweiten Punkt F2. Das Verhältnis der beiden Abstände entspricht dem Skalierungsfaktor. Dieser wurde so gewählt, dass einerseits der Durchmesser des IR-Strahls so klein wie möglich ist und andererseits noch eine klar definierte und stabile Fokusposition erreicht wird. Denn je stärker die Fokussierung desto stärker divergiert auch der Strahl vor und hinter dem Fokus. Der Punkt F1 stellt den alten Originalfokuspunkt des Vertex dar, der allerdings durch die Umlenkspiegel versetzt ist, F2 den neuen. Der ausgewählte Ellipsoidspiegel mit $F1=282$ mm und $F2=42$ mm besitzt eine Verkleinerung des alten IR-Durchmessers bei F1 um den Faktor 6,7 (siehe Abbildung 4.1). Beide Spiegelhalter sind zur Feinjustage auf Linearverstellern montiert. Diese werden über eine Säule auf zwei manuellen Linearverstellern zur Grobjustage montiert, um die gewünschte Höhe über dem Gehäuseboden zu erreichen.

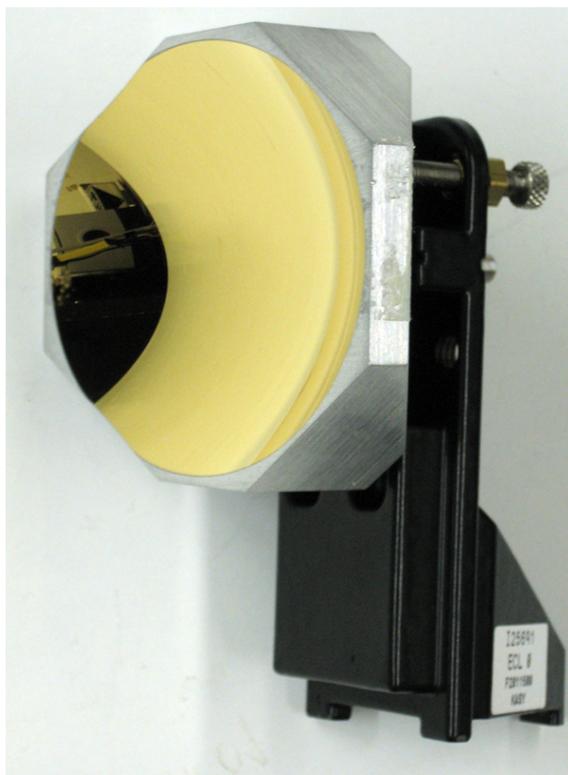


Abbildung 4.1: Foto eines der Ellipsoidspiegel, die für die Fokussierung des Infrarotstrahls benutzt wurden.

Spiegel für den Anregungslaser

Ein silberbeschichteter Spiegel von 25 mm Durchmesser, der auf einem Linos Spiegelhalter MF-25PF zur Feinjustage montiert ist, lenkt den Strahl des Anregungslasers auf den IR-Fokus. Die Befestigung mit dem Gehäuseboden erfolgt über eine Aluminiumsäule.

Infrarotfilter

An dem Strahlaus- und -eingang wurde jeweils ein Interferenzfilter montiert. Als Substrat diente Germanium. Diese Filter erfüllen vier Aufgaben:

- Der Vertex 70 interne HeNe-Laser zur Messung der Spiegelposition im Interferometer wird von dem Filter blockiert. Ohne diesen Schutz würde der Strahl direkt auf die Probe treffen und diese ständig anregen.
- Nach Anregung der Probe kann Streulicht des Nd:YAG-Lasers auf den MCT-Detektor treffen und eventuell ein Störsignal erzeugen. Der Filter blockiert das sichtbare Licht.
- Die beiden Filter trennen den Innenraum des Vertex 70 von dem Gehäuse des Probenwechslers. Dadurch ist es möglich diese getrennt mit Trockenluft zu spülen.
- Das Spektrum des Globars ist sehr breitbandig und würde ungefiltert eine hohe Abtastrate, d.h. viele Spiegelpositionen erfordern um Aliasingeffekte zu vermeiden. Die Filter begrenzen die Bandbreite und verringern dadurch auch die Anzahl der zu messenden Spiegelpositionen.

Für eine optimale Bandbreite wurde speziell ein steilkantiger Filter von der Firma LOT-Oriel hergestellt. Die Transmission bei 1800 cm^{-1} beträgt 80 % und bei 1100 cm^{-1} 73 %.

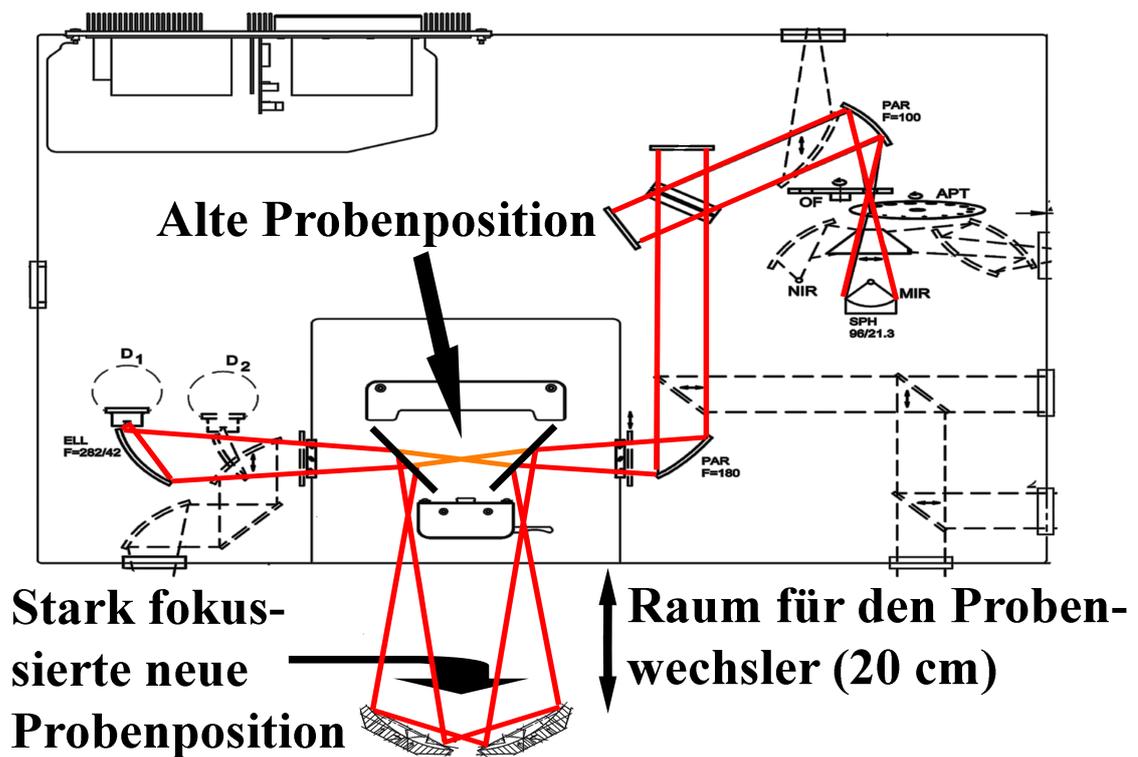


Abbildung 4.2: Schemazeichnung des ausgekoppelten Infrarotstrahlengangs.

Veränderte Schemazeichnung des Vertex: Bruker Optik GmbH

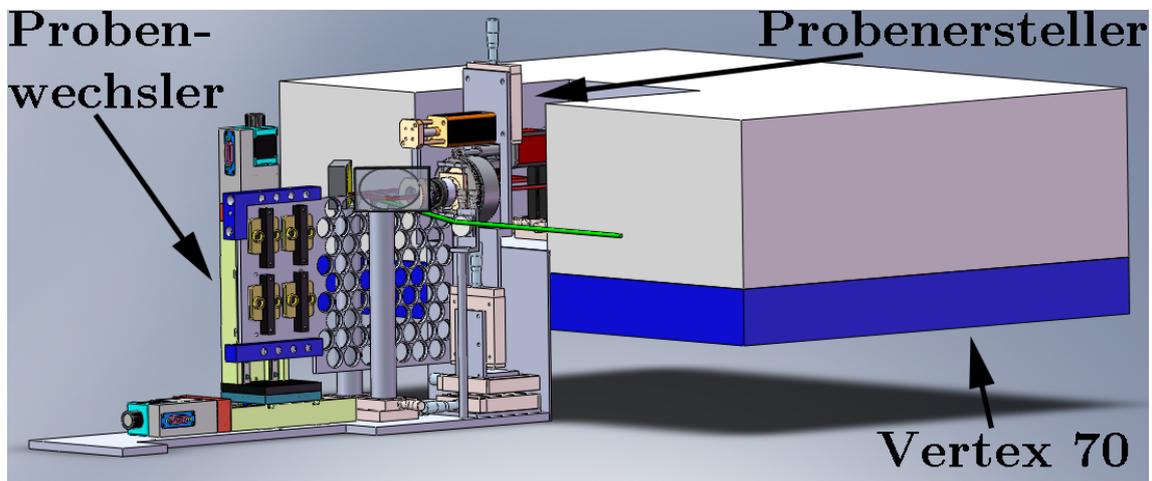


Abbildung 4.3: Konstruktionszeichnung des in das Spektrometer eingebauten Probenwechslers. Auch der Probenersteller ist montiert.

*CAD Daten der manuellen Linearversteller: Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG ;
 CAD Daten der motorisierten Linearversteller: Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG*

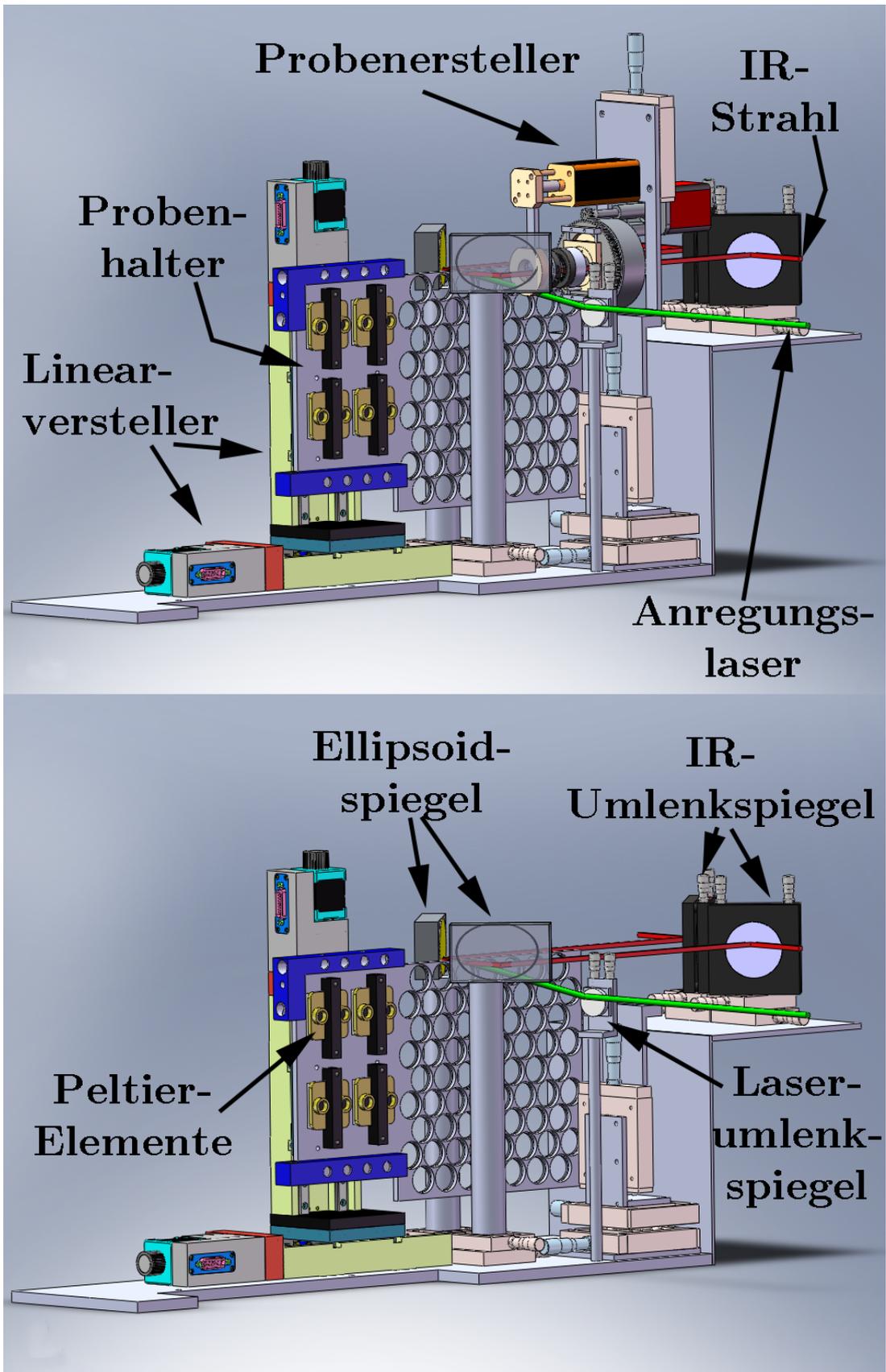


Abbildung 4.4: Konstruktionszeichnungen des Probenwechslers mit eingebautem Probenhalter (oben) und ohne Probenhalter (unten). CAD Daten der manuellen Linearversteller und der großen Spiegelhalter: Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG ; CAD Daten der motorisierten Linearversteller: Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG

4.2 Probenersteller

Werden die Proben von Hand erstellt, wird die leicht getrocknete PSII-Präparation auf eine CaF_2 -Scheibe aufgetragen und mit einer zweiten abgedeckt. Die Schichtdicke wird nun durch Pressen, Drehen und Schieben optimiert und regelmäßig im Probenraum überprüft. Dies kann aber nicht mit hoher Präzision durchgeführt werden. Die Schichten werden meist etwas zu dick oder zu dünn. Die Prozedur ist sehr zeitaufwendig und auch die Qualität der Proben ist im Bezug auf die Homogenität oft nicht zufriedenstellend. Diese Eigenschaften sind fatal bei der Probenpräparation für die Step-Scan Messungen. Hier werden viele möglichst homogene Proben benötigt. Eine allzu lange Produktionszeit lässt die Proben altern, ihre Aktivität sinkt. Wird das Gehäuse zu oft geöffnet, wird es stark mit Wasserdampf kontaminiert. Um diese Problematiken zu lösen wurde eine Maschine zum schnellen Produzieren homogener Proben konstruiert (siehe Abbildung 4.5 und 4.6). Dieser Ersteller wird in das Gehäuse des Probenwechslers eingebaut und erlaubt dadurch während der Produktion die Schichtdicke zu kontrollieren. Die optimale Bewegung der CaF_2 -Scheiben wurde manuell getestet. Es wird sowohl Druck auf die Platten als auch Bewegung der Platten gegeneinander benötigt um die Schichtdicke homogen zu vermindern. Der Druck kann am einfachsten durch einen pneumatischen Zylinder erzeugt werden. Durch Änderung des Luftdrucks mittels eines Ventils kann der Anpressdruck stufenlos geregelt werden. Der Kompaktzylinder RA-192020 der Firma Norgren wurde für die Druckkomponente ausgewählt. Das Gerät wurde so konstruiert, dass sowohl konzentrische als auch azentrische Bewegungen der CaF_2 -Scheibe in Bezug auf die ruhende CaF_2 -Scheibe möglich sind. Die Azentrizität kann mittels eines Linearverstellers eingestellt werden. Die Bewegung wird von dem Schrittmotor QSH 4218 der Firma Trinamic erzeugt, dessen Drehzahl durch ein Getriebe aus zwei Zahnrädern um den Faktor 8 erniedrigt und sein Drehmoment um denselben Faktor erhöht wird. Der hohe Strom und die Schrittpulse werden von einer, nach dem Vorbild von „<http://www.roboternetz.de/wissen/index.php/Schrittmotoren>“, selbstgebauten Verstärkerkarte, deren Hauptkomponenten die ICs L297 und L298 sind, geliefert. Die einzelnen Schritte werden nun durch TTL- (Transistor-Transistor-Logik) Pulse an diese Karte ausgelöst. Die beiden Scheiben befinden sich in zwei Haltern. In dem einen, aus Aluminium gefertigten Halter, kann eine CaF_2 -Scheibe festgeschraubt werden. Die andere liegt in einem PVC (Polyvinylchlorid) Halter. Beide

4.2. PROBENERSTELLER

Halter werden durch einen Aluminiumring vor Verrutschen gesichert und können so bequem transportiert und in den Probenersteller ein- und ausmontiert werden. Auf der Rückseite der beiden Halter ist ein Moosgummiring aufgeklebt um leichte Druckunterschiede auszugleichen. Die Halterkombination wird einfach in Vertiefungen im Ersteller, passend zu den Haltern eingesetzt.

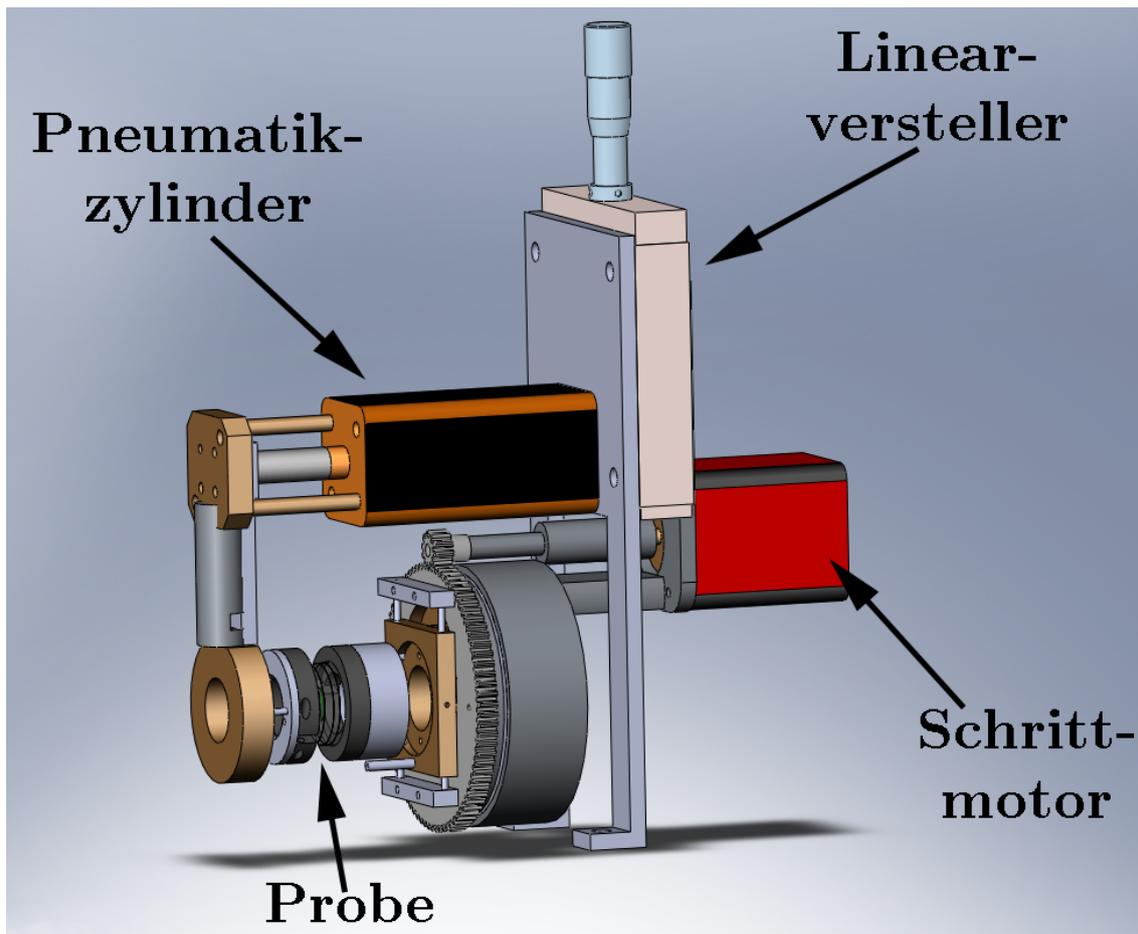


Abbildung 4.5: Konstruktionszeichnung des Probenerstellers.

CAD Daten des manuellen Linearverstellers: Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG

4.3 Periphere Komponenten

Multifunktionskarte

Die Kommunikation des Steuerungsprogramms „FTIR Steuerung“ mit den einzelnen Komponenten erfolgt über TTL-Signale die von der Multifunktionskarte NI6115 von National Instruments erzeugt werden. Auch Rückmeldungen der einzelnen Komponenten werden von der Karte aufgenommen. Die Kommunikation mit der Karte erfolgt über eine Dynamic Link Library. Die Karte ermöglicht außerdem die digitale Datenaufnahme mit einer Genauigkeit von 16 Bit und einer Abtastrate von 10 MHz. Dadurch können die Position und Störungen der Spiegelposition aufgenommen werden. Für die Datenaufnahme stehen vier Kanäle simultan zur Verfügung und es ist geplant das Experiment auf eine externe Datenaufnahme des Detektorsignals zu erweitern. Bisher erfolgt die Datenaufnahme über den internen A/D-Wandler des Spektrometers.

Pulsgenerator

Der Pulsgenerator 9500+ von Quantum Composers mit einer Auflösung von 1 ns wurde für die Ansteuerung des Schrittmotors des Probenersellers und zur Steuerung des Anregungslasers mit TTL-Pulsen genutzt:

- Um die Blitzlampen und den Q-Switch des Anregungslasers optimal ansteuern zu können muss ein Zeitabstand von 250 μ s zwischen den Pulsen eingehalten werden. Da beim Einstellen des Laserstrahls eine geringere Intensität gewünscht ist und trotzdem die Einstellung des Glan-Taylor-Prismas nicht verstellt werden soll, ist eine Verringerung einfach durch eine Vergrößerung der Zeit zwischen den Pulsen möglich. Auch das Aufwärmen des Lasers, also der Blitzlampen und der Kristalle, ist bei beliebiger Frequenz (maximal 20 Hz) leicht durchzuführen.
- Bei Step-Scan Messungen an den PSII-Proben werden an jedem Probenpunkt vier Blitze ausgelöst. Der erste mit einer Verzögerung von 12,5 ms nach dem Startimpuls, alle weiteren mit einem Zeitabstand von 115 ms.
- Die Schrittmotorkarte benötigt TTL-Signale für die Drehrichtung, Halb- oder Ganzschritte und die Anzahl der Schritte. Diese Aufgaben wurden von dem Pulsgenerator übernommen.

Für jede Aufgabe wurden einzelne Programme im Speicher des Pulsgenerators programmiert, die bei Bedarf geladen werden können.

Trockenluftgenerator

Der Trockenluftgenerator wurde von der Firma CMC Instruments gebaut und liefert maximal 14 Liter Trockenluft pro Minute. Durch das Druckschwingadsorptionsverfahren wird aus Druckluft der störende Wasserdampf und CO₂ entfernt. Die Restkonzentration liegt jeweils unter 1 ppm.

4.3.1 Kühlung mit flüssigem Stickstoff

Der MCT-Detektor muss mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Um dieses schnell und während langen Messungen störungsfrei durchführen zu können, wurde eine automatische Stickstoffkühlung gebaut. Der flüssige Stickstoff befindet sich in einem 150 l fassenden Dewar. Im geschlossenen Zustand baut sich durch Verdunsten des flüssigen Stickstoffs im Dewar ein Druck auf. Über einen Heber ist die Verbindung nach außen gewährleistet. Hier wurde ein elektrisch steuerbares und für diese Temperaturen geeignetes Ventil montiert. Durch ein Sicherheitsventil wird ein Überdruck von 0.5 Bar konstant gehalten. Der Ausgang des steuerbaren Ventils ist über einen isolierten Silikonschlauch mit einem aus Eigenbau stammenden Einfüllstutzen mit dem Detektor verbunden. Ist der Detektor gefüllt, kann der flüssige Stickstoff über einen am Stutzen montierten Silikonschlauch in einen Behälter laufen. Hier befindet sich ein Temperatursensor, der den gefüllten Zustand meldet. Gesteuert wird das Befüllen von einem Mikrocontroller mit einem RISC-Mikrocontrollerchip Atmel AT-Mega32 in einer praktischen C-Control Einheit der Firma Conrad Electronics. Die Programmierung des Controllers wurde ebenfalls selbst durchgeführt. Der Befehl das Befüllen zu starten wird von dem Steuerungsprogramm „FTIR Steuerung“ entweder durch manuelle Eingabe oder automatisch erteilt. Um Unfälle mit dem flüssigen Stickstoff zu vermeiden ist die maximale Befülldauer auf sechs Minuten beschränkt und ein weiteres Befüllen erst nach einer Stunden möglich. Das elektronische Ventil ist stromlos geschlossen und damit auch bei Stromausfällen dicht.

Anregungslaser

Als Anregungslaser wurde der frequenzverdoppelte Nd:YAG Laser „Brilliant ω “ der Firma Quantel benutzt. Vor den Messungen wurde der Laser mindestens 20 Minuten bei 10 Hz Blitzfrequenz aufgewärmt. Für die Messungen wurde er bei der optimalen Zeit zwischen dem Auslösen der Blitzlampen und des Q-Switches von 250 μs betrieben. Dadurch werden Schwankungen der Laserenergie minimiert. Der Laser strahlt bei einer Lichtfrequenz von 532 nm. In diesem Bereich absorbieren die Chlorophylle am wenigsten. Dadurch erhält man die höchste Homogenität der Ausleuchtung einer Probe und verhindert somit einen Gradienten in der Population der S-Zustände.

Glan-Taylor-Prisma

Um die Energie des starken Anregungslasers abzuschwächen wird ein Glan-Taylor-Prisma der Firma ThorLabs „SM1PM10“ benutzt. Die Laserenergie wurde so gering wie möglich eingestellt um Laserartefakte zu minimieren.

4.3.2 Laserenergie

Die Kriterien für die Höhe der Laserenergie waren die Signalstärke der Differenzspektren der stationären Zustände und vor allem der Missparameter, da dieser alle spektralen Punkte einschließt. Die Laserenergie wurde soweit wie möglich reduziert, dass diese beiden Parameter noch keine signifikanten Änderungen aufweisen (siehe Abbildung 4.7). Der benutzte Glan-Taylor-Winkel ist 81 °. Die exakte Energie bei dieser Einstellung direkt am Probenpunkt lässt sich nicht genau ermitteln. Platz für einen Messkopf ist dort nicht vorhanden und der schräge Eintritt des Strahls erschwert die Berechnungen. Eine Simulation des Strahlenganges außerhalb des Aufbaus ergab für den benutzten Winkel von 81 ° des Glan-Taylor-Prismas einen Wert von etwa 3 $\frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}$. Dieser Wert ist aber mit Fehlern behaftet, da eine exakte Simulation nur schwer durchzuführen ist.

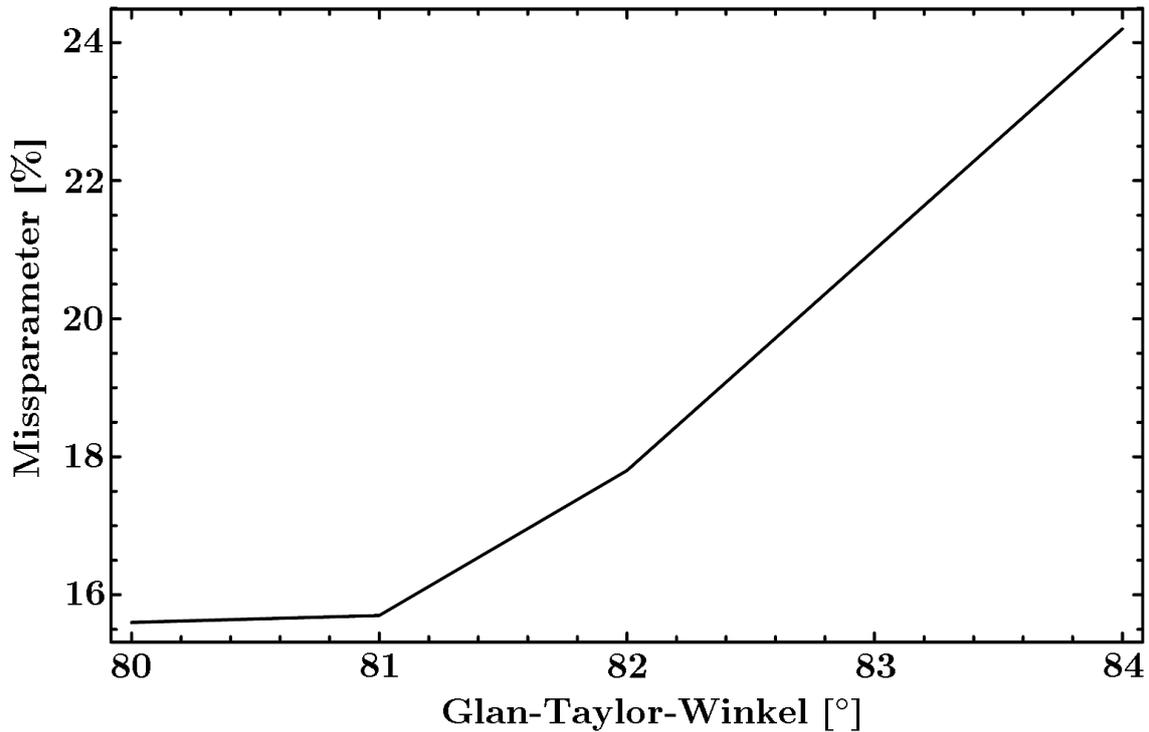


Abbildung 4.7: Gezeigt ist der Missparameter in Abhängigkeit von eingestellten Winkel des Glan-Taylor-Prismas und damit von der Laserenergie. Um Laserartefakte bei den Step-Scan Messungen, zu vermeiden, wird die Laserintensität soweit wie möglich reduziert. Dabei soll der Missparameter keine erhöhten Werte aufweisen. Damit ist eine sättigende Laserintensität gewährleistet. Der schon bei niedrigen Winkeln erhöhte Missparameter von 15,5 % ergibt sich aus der geringen Anzahl an Messungen (20 Proben pro Winkel) und dem damit erhöhten Rauschen. Der steile Anstieg oberhalb von 81 ° ist auch in den Rohdaten, als abnehmende Signalamplitude sichtbar (nicht gezeigt).

4.3.3 Komponenten zur Justage des Infrarotstrahls

Nach dem Einbau des Probenwechslers muss der Infrarotstrahlengang neu eingestellt werden. Der Infrarotstrahl ist unsichtbar, was die grundlegende Justage sehr erschwert. Deshalb wurde der Global durch eine Halogenlampe mit selbstgebaute Halterung ersetzt. Für die drei Fokuspunkte - die zwei alten Fokuspunkte hinter den Umlenkspiegeln und den neuen zwischen den Ellipsoidspiegeln - wurden Aperturen mit Säulen erstellt, die sich genau auf der richtigen Höhe befinden und eingebaut werden können. Dadurch ist die grundlegende Justage der einzelnen Komponenten leicht möglich. Danach wird der Global wieder eingesetzt, die Aperturen entfernt und die Feinjustage erfolgt durch Maximierung des Detektorsignals. Dafür sollte auch eine Probe im Strahlengang sein, da es durch Brechungseffekte bei den CaF_2 -Scheiben tatsächlich einen Unterschied, d.h. einen leichten Strahlversatz gibt.

4.3. PERIPHERE KOMPONENTEN

Kapitel 5

FTIR Steuerung

Um den gesamten Messablauf und die daran beteiligten Komponenten zu steuern, wurde die Steuerungssoftware „FTIR Steuerung“ in der Programmiersprache C# geschrieben. Um die Bedienung zu erleichtern, ist die empfohlene Vorgehensweise in der Bedienungsfläche angezeigt. Das Programm ist auf zwei Reiter verteilt. Die einzelnen Funktionen werden im Detail erläutert:

5.1 Reiter I

Hier befinden sich die Hauptkomponenten des Programms zur Steuerung des Probenwechslers und der automatisierten Datenaufnahme (siehe Abbildung 5.1).

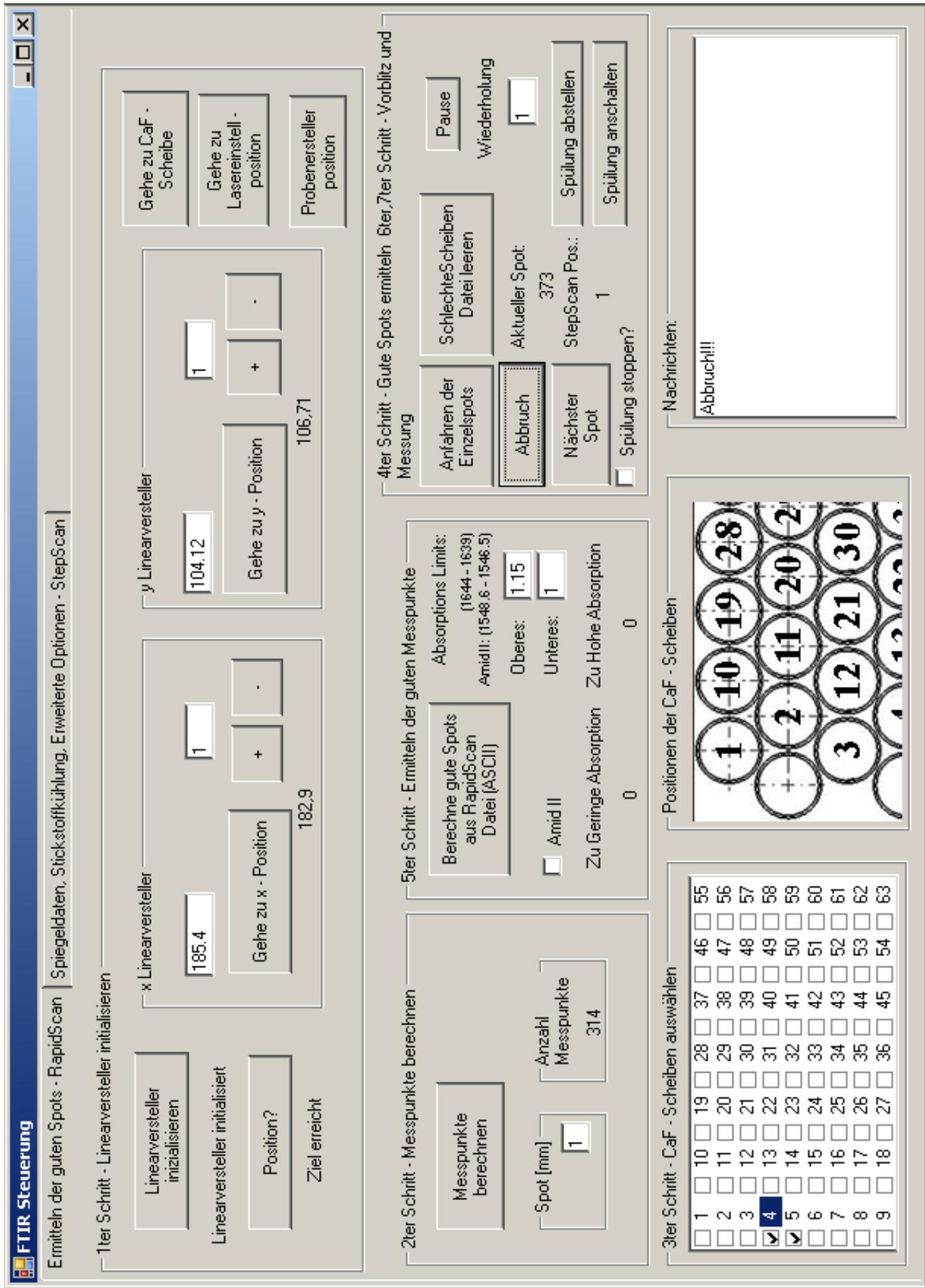


Abbildung 5.1: Bildschirmfoto des ersten Teils des Steuerungsprogrammes. Hier befinden sich die wichtigsten Steuerungselemente. Der Ablauf der Messungen ist für eine intuitive Bedienbarkeit in einzelne Schritte aufgeteilt.

I: Linearversteller

Die Linearversteller werden über eine Dynamic Link Library (dll) angesprochen. Sie müssen beim Starten des Programms initialisiert werden. Dabei werden auf beiden Achsen Referenzpunkte angefahren. Die Positionen der Linearversteller sind frei wählbar, oder können schrittweise verändert werden. Außerdem können mit einem Tastendruck einzelne Positionen direkt angefahren werden:

- CaF₂-Scheiben als Referenz bei Messungen von Schichtdicken und Test der IR-Intensität, z.B. beim Einstellen der Spiegel.
- An der Lasereinstellposition befindet sich die IR sensitive Folie. Hier kann der anregende Laserstrahl auf den IR-Strahl eingestellt werden.
- Die Probenerstellerposition fährt die Linearversteller in eine Position, die den Einbau des Probenerstellers ermöglicht und den IR-Strahl nicht behindert. Außerdem beinhaltet das Drücken des Knopfes eine Schutzfunktion für die Linearversteller: Damit diese nicht aus Versehen in den Probenersteller fahren, können die Linearversteller erst nach nochmaligem Drücken des Knopfes bewegt werden. Der Schutzmodus wird durch Änderung der Farbe und des Textes des Knopfes angezeigt.

II: Messpunkte berechnen

Die Größe des Probenpunktes kann frei gewählt werden. Das Programm berechnet daraus die maximal mögliche Anzahl an Messpunkten pro CaF₂-Scheibe und deren Positionen.

III: CaF₂-Scheiben auswählen

Hier werden durch einfaches Auswählen die Positionen des Probenhalters ausgewählt, die mit Proben besetzt sind.

IV: Anfahren der Probenpunkte

Mit Drücken des Knopfes „Anfahren der Einzelspots“ werden, synchronisiert mit der Datenaufnahme durch Opus, die einzelnen Messpunkte angefahren.

- Ablaufsteuerung: Die Messung kann mit „Pause“ angehalten und mit „Abbruch“ jederzeit beendet werden. Mit „Nächster Spot“ wird der aktuelle Probenpunkt übersprungen.
- Wiederholung: Hier kann die Anzahl der gewünschten Wiederholungen der Gesamtmessung eingegeben werden. Dies wird z.B. bei wiederholter Messung an einem Probenpunkt, oder bei Proben, die nach einer gewissen Zeit in den Ausgangszustand zurückkehren, benötigt.
- Die Anzeige „Aktueller Spot“ gibt die gesamte Anzahl angefahrener Probenpunkte an. „StepScan Pos.“ zeigt die aktuelle Position bei Step-Scan Messungen an.
- Spülung: Mit „Spülung stoppen?“ wird die Wasserkühlung der Peltierelemente während der Datenaufnahme deaktiviert. Dies ist für Step-Scan Messungen absolut notwendig, da ansonsten starke Vibrationen im Interferogrammzeitverlauf zu sehen sind (siehe Abbildung 5.2). Nach der Datenaufnahme, beim Anfahren des nächsten Probenpunktes und/oder Warten auf die Bereitschaft des Spektrometers wird die Spülung wieder aktiviert. Nach dem Abschalten ruht das Programm eine halbe Sekunde, damit die Schwingungen abklingen können. Die Temperaturregelung bleibt während der gesamten Messung aktiviert. Somit ist die Temperaturstabilität gewährleistet, da der PID- (Proportional, Integral, Differentiell) Regler die sich ändernde Warmseite der Peltierelemente bei 10 °C leicht ausgleichen kann. Mit „Spülung abstellen“ wird die Spülung ganz abgeschaltet. „Spülung anschalten“ aktiviert sie wieder.

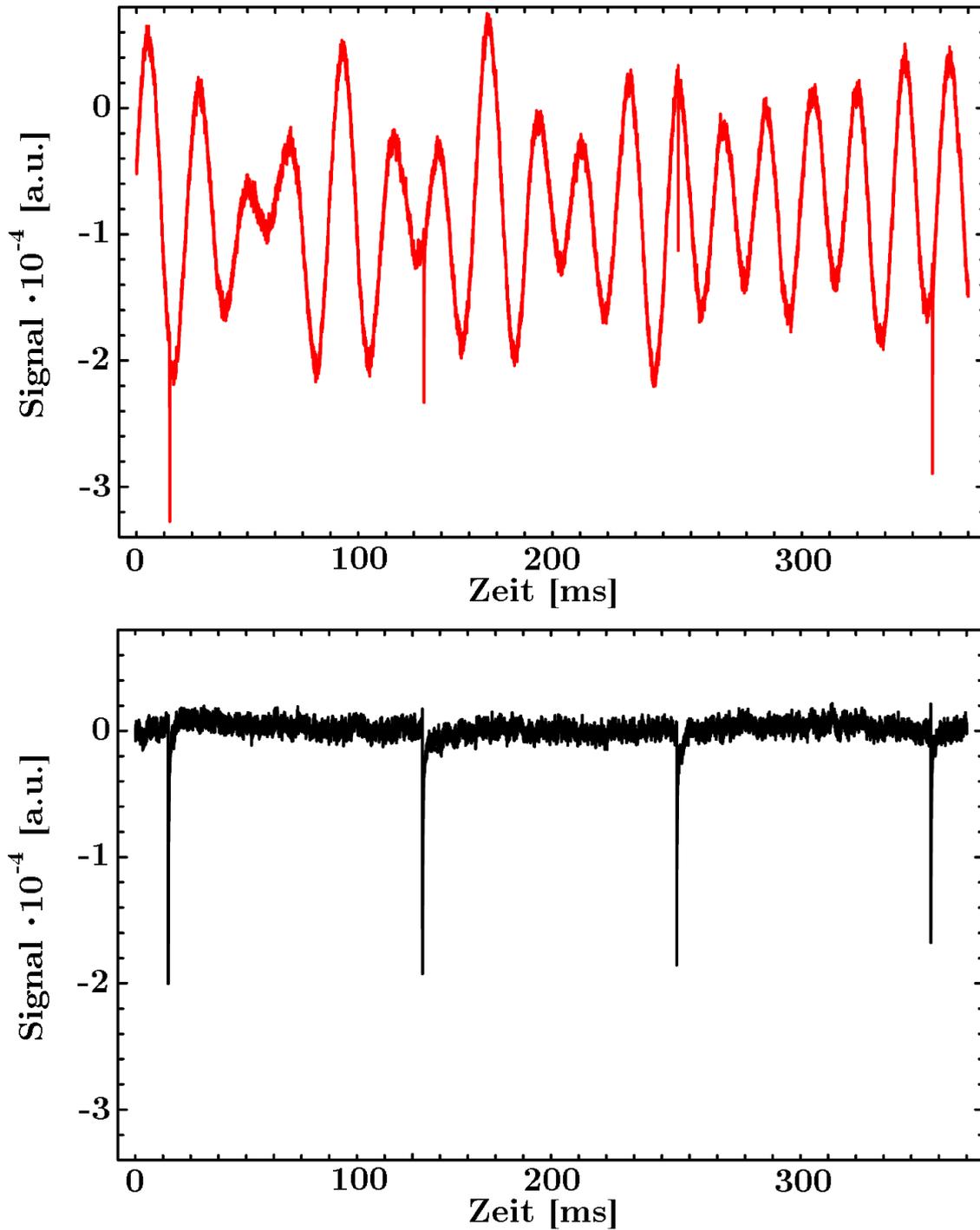


Abbildung 5.2: Der gesamte Zeitverlauf des Detektorsignals an einer Spiegelposition mit einer aktivierten Wasserkühlung (oben) und ausgeschalteter Wasserkühlung (unten). Die durch die Wasserkühlung hervorgerufenen Störungen sind enorm. Deshalb wird die Wasserkühlung während den Messungen deaktiviert.

- Schlechte Scheiben Datei leeren: Probenpunkte, die eine zu hohe oder zu niedrige Absorption aufweisen, werden nicht gemessen. Diese Punkte werden vom Programm gespeichert und mit dieser Schaltfläche gelöscht, sodass wieder alle Probenpunkte angefahren werden (siehe nächsten Punkt).

V: Ermitteln der guten Messpunkte

Vor jeder Messung wird eine Rapid-Scan Testmessung durchgeführt, die die Absorption jedes einzelnen Probenpunktes testet. Für die tatsächliche Messung geeignete Punkte werden vom Programm berechnet und daraufhin die schlechten ignoriert. Als Eignungskriterium wurden Absorptionswerte für Wellenzahlen aus der Amid I oder alternativ aus der Amid II Bande vorgegeben. Außerdem wurden Bereiche ausgewählt, die keine oder nur sehr kleine Wasserbanden von gasförmigem Wasser aufweisen, um die Auswahl vom Trocknungsgrad der Probenbox unabhängig zu machen.

- Die Absorption wird entweder in der Amid I Region zwischen 1644 cm^{-1} und 1639 cm^{-1} oder, aktiviert mit der Schaltfläche „Amid II“, zwischen 1548.6 cm^{-1} und 1546.5 cm^{-1} ermittelt. Das Programm sucht automatisch den richtigen Wellenzahlbereich in der Datei und ermittelt die mittlere Absorption.
- Absorption Limits: Hier kann die gewünschte Ober- und Untergrenze der Absorption ausgewählt werden.
- Mit „Berechne gute Spots aus RapidScan Datei“ werden nun die guten Spots ermittelt. Probenpunkte mit zu hoher oder zu niedriger Absorption werden neben der Schaltfläche angezeigt. Die Gesamtzahl der guten Punkte wird in der Nachrichtenfläche angezeigt.

Nachdem die guten Probenpunkte ermittelt sind, kann mit der Schaltfläche VI die Step-Scan oder Rapid-Scan Messung gestartet werden.

5.2 Reiter II

Hier befinden sich erweiterte Befehlsoptionen und die Steuerung der Peripherie (siehe Abbildung 5.3).

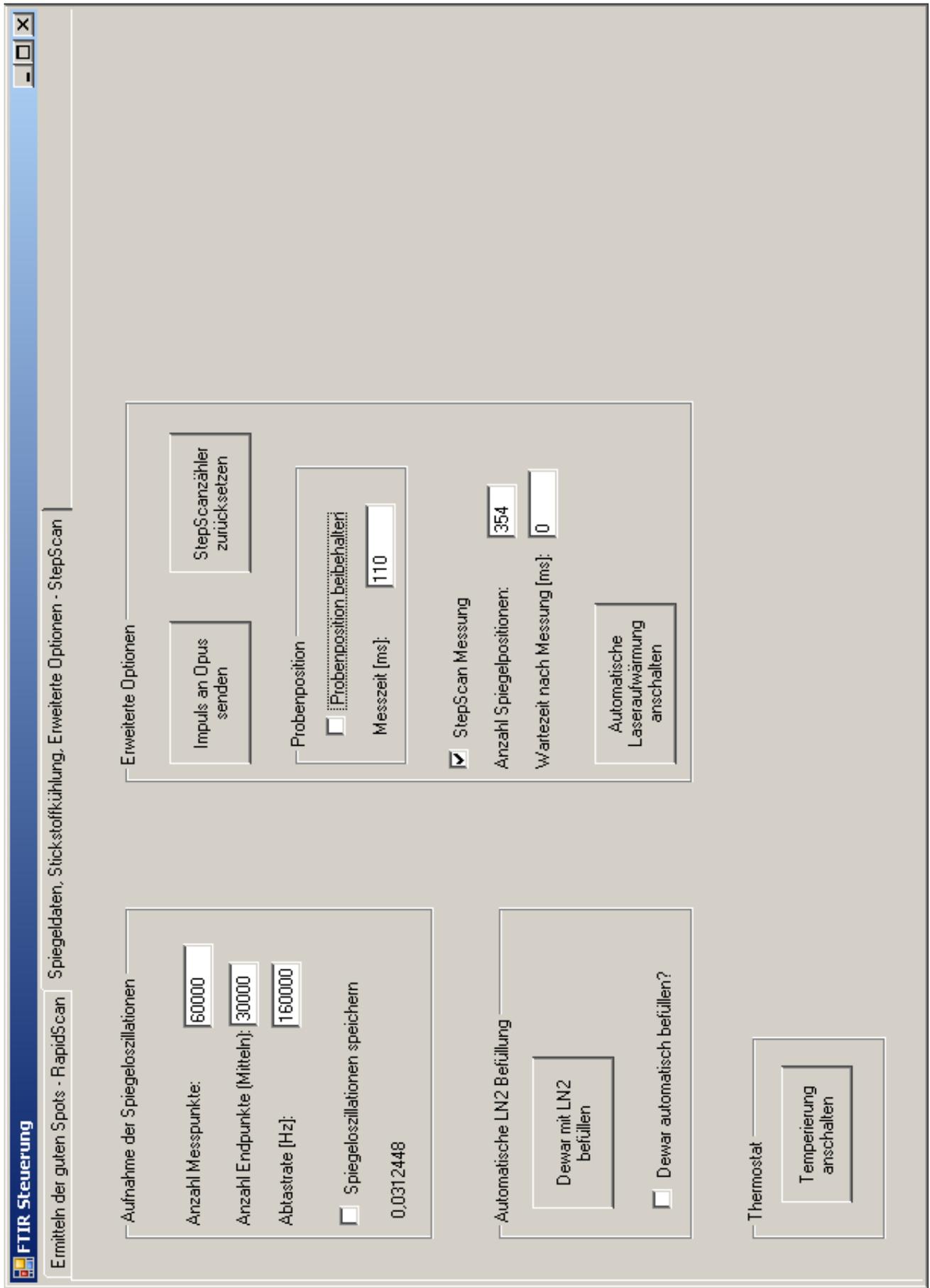


Abbildung 5.3: Bildschirmfoto des zweiten Teils des Steuerungsprogrammes. Hier befinden sich erweiterte Steuerungselemente.

Aufnahme der Spiegelszillationen

Es ist optional möglich, die Schwankungen des Interferometerspiegels digital aufzunehmen und zu speichern. Die Daten stammen von einer Fotodiode innerhalb des Spektrometers. Digitalisiert werden sie mit maximal 10 Mhz von der Multifunktionskarte. Ausgewählt werden kann die Anzahl der aquirierten Messpunkte, die Abtastrate und die Anzahl der Punkte, die gespeichert werden soll. Ist die Anzahl der Punkte, die gespeichert werden sollen, geringer als die der aufgenommenen, wird gemittelt. Bei Aktivierung der Option werden die Spiegelschwankungen bei jeder Messung aufgenommen und in dem Ordner "c:\Stability" gespeichert.

Automatische LN2-Befüllung

Beim Drücken des Knopfes „Dewar mit LN2 befüllen“ wird der MCT-Detektor des Vertex automatisch mit flüssigem Stickstoff befüllt. Das Befüllen wird von einem Atmel Microcontroller gesteuert und der Füllstatus mit einem Temperatursensor ebenfalls vom Mikrocontroller detektiert. Um einen Unfall zu vermeiden, wird die Befüllung unabhängig vom Temperatursensorsignal nach sechs Minuten beendet. Nach dem Befüllen ist ein erneutes Befüllen erst nach einer Stunde möglich. Bei Aktivierung von „Dewar automatisch befüllen“, wird der Dewar automatisch alle fünf Stunden befüllt. Während und eine Minute nach dem Befüllen wird eine eventuell laufende Messung pausiert um Störungen zu vermeiden.

Thermostat

Hier kann die Temperaturregelung angeschaltet werden. Es wird automatisch das Peltierregelgerät und die Peltierkühlung eingeschaltet. Außerdem wird der Laser und dessen Wasserkühlung angeschaltet.

Erweiterte Optionen

- Impuls an Opus senden: Da die Bruker Software „Opus“ und das Vertex oft zu unvorhersagbarem Verhalten tendieren ist es möglich auf Knopfdruck einen TTL-Puls an das Spektrometer und damit an „Opus“ zu senden. Dadurch kann bei manchem Fehlverhalten des Spektrometers oder der „Opus“-Software ein kompletter Abbruch vermieden werden.

- StepScanzähler zurücksetzen: Falls die Software „Opus“ oder das Spektrometer abstürzen sollten, kann hiermit der Zähler, der die aktuelle Interferogrammposition zählt, auf Null gesetzt werden.
- Probenposition: Ist diese Schaltfläche aktiviert, wird die aktuelle Position der Linearversteller beibehalten. Somit ist es möglich mehrere Messungen auf einem Probenpunkt durchzuführen. Bei Messzeit kann angegeben werden, wie lange die Wasserkühlung bei jeder Messung deaktiviert werden soll.
- Mit der Schaltfläche „StepScan Messung“ wird dem Programm mitgeteilt, dass man im Step-Scan Modus messen will. Die Anzahl der Spiegelpositionen wird eingegeben. Optional kann eine Wartezeit nach jeder Messung eingegeben werden.
- Automatische Laseraufwärmung anschalten: Nach Betätigen des Knopfes wird jede Sekunde ein Blitzlampen-Signal an den Laser geschickt. Dies dient zum Aufwärmen der Blitzlampen und verhindert das automatische Abschalten des Lasers, das nach 15 Minuten ohne Signal automatisch eintritt. Während der Messung werden die Pulse automatisch pausiert.

Kapitel 6

Messung der stationären Zustände

Mit Messungen der stationären Zustände, die sich zwischen den Blitzen einstellen, wurde die FTIR Messmethode in unserer Arbeitsgruppe eingeführt. Die ersten Messungen wurden noch ohne Probenersteller durchgeführt. Zu den ersten Schritten gehörte deshalb der Bau eines temperierbaren Probenhalters, sowie das Etablieren der Probenpräparation mit Tests der Elektronenakzeptoren und dem optimalen Messprotokoll. Intensivere Messungen bei Auflösungen von 2 cm^{-1} , 4 cm^{-1} und 8 cm^{-1} sowie Messungen mit dem Inhibitor DCMU wurden zusammen mit Julia Menzel durchgeführt, wobei in ihrer Diplomarbeit detailliert auf die Messungen bei 4 cm^{-1} und 8 cm^{-1} Auflösung und die Inhibitormessungen eingegangen wird [Menzel, 2009]. Deshalb werden in dieser Arbeit nur die bisher unveröffentlichten 2 cm^{-1} Messungen gezeigt. Das Rauschniveau und die Schwankungen der Grundlinie bei den Messungen ohne den Probenwechsler sind auf Grund der geringen Anzahl an Messungen (~ 20 Einzelmessungen mit je 80 doppelseitigen Scans, daraus ergeben sich 1600 doppelseitige Einzelscans pro Übergang) schlechter als bei den Messungen mit dem Probenwechsler für die Step-Scan Messungen. Eine genauere Auswertung der Differenzspektren mit einer Zuordnung der Banden ist deshalb in Kapitel 7 über die stationären Messungen mit dem Probenwechsler zu finden.

6.1 Aufbau

6.1.1 FTIR Spektrometer

Für alle Messungen wurde ein Vertex 70 FTIR Spektrometer der Firma Bruker benutzt. Es ermöglicht Messungen im Rapid-Scan und Step-Scan Modus, wobei für die Messungen der stationären Zustände nur der Rapid-Scan Modus benutzt wurde. Die Datenaufnahme erfolgt durch die Bruker Software OPUS 6.5.

Detektor

Als Detektor wird der schnelle, photovoltaische MCT-Detektor KV100-1-B-7/190 der Firma Kolmar benutzt. Er besitzt eine Bandbreite von 16 MHz und eine spezifische Detektivität von $6.31 \cdot 10^{10}$ Jones.

6.1.2 Temperierbarer Probenhalter

Um Messungen der stationären Zustände des PSII durchführen zu können, wurde ein temperierbarer Probenhalter mit der Software „Solid Works“ konstruiert, der in den Probenraum des Vertex 70 eingebaut werden kann (siehe Abbildung 6.1). Eine Probe zwischen zwei CaF_2 -Scheiben kann außerhalb des Spektrometers in einen Halter eingeschraubt und anschließend in den Probenhalter eingeschoben werden. Der Bau erfolgte durch die Feinwerktechnik der Freien Universität Berlin. Die Temperierung erfolgt über zwei Peltierelemente der Firma Peltron, die mit einer Wasserkühlung gegengekühlt werden. Die Steuerung der Peltierelemente erfolgt über ein Gerät der Firma Peltron. Die Temperaturstabilität beträgt ± 0.1 °C. Der Anregungslaser wird durch ein eingeklebtes antireflexbeschichtetes Glasfenster eingekoppelt und über einen Silberspiegel auf die Probe geleitet.

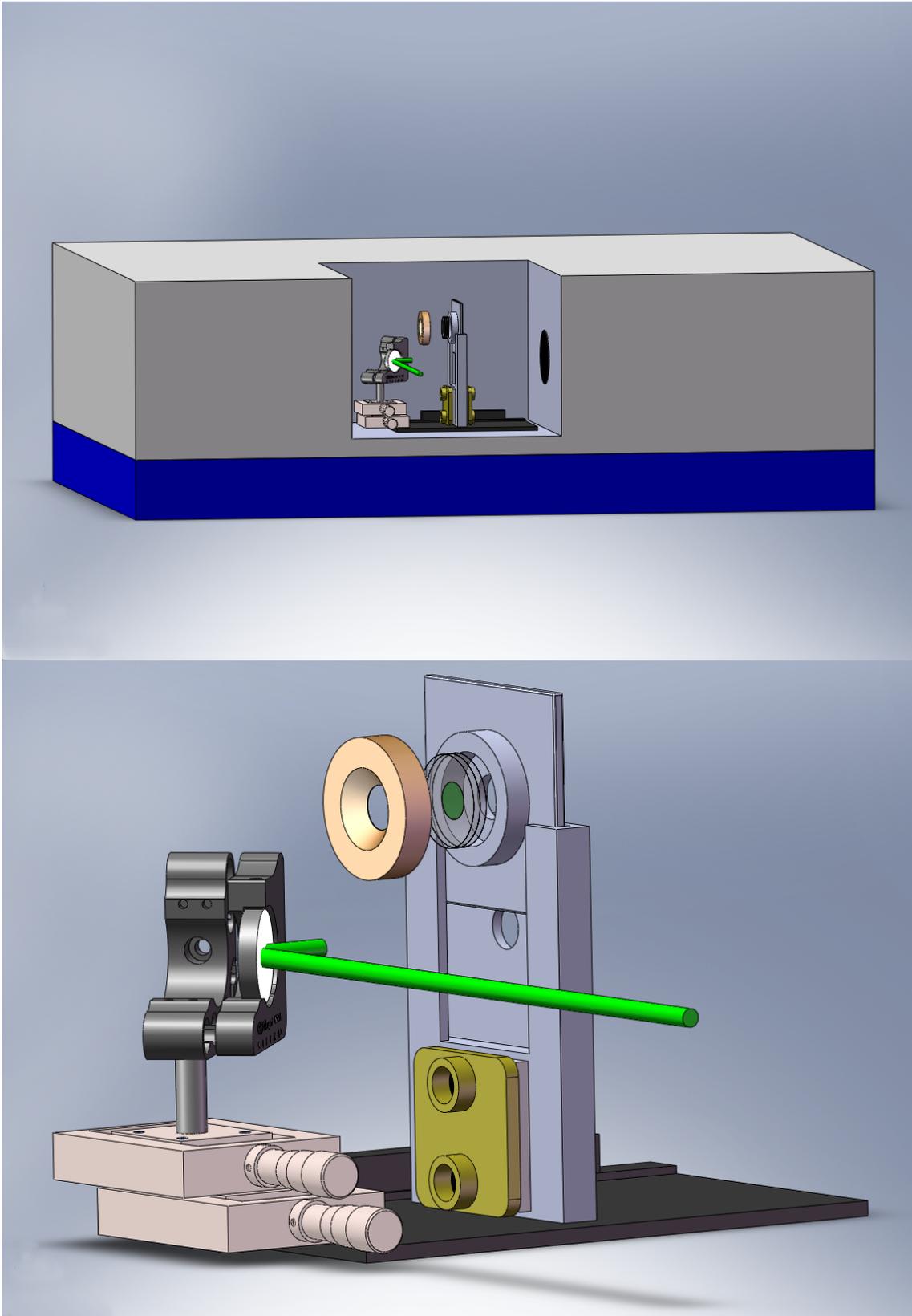


Abbildung 6.1: Konstruktionszeichnungen des temperierbarer Probenhalters, oben mit dem Spektrometer, unten freistehend. Die Probe kann in den Halter eingeschoben werden. Der Laser wird über ein Fenster eingekoppelt.

CAD Daten der manuellen Linearversteller: Qioptiq ;

CAD Daten des Spiegelhalters: Newport Corporation

Anregungslaser

Als Anregungslaser wurde der frequenzverdoppelte Nd:YAG-Laser Minilite II von Continuum benutzt. Dieser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 532 nm. Dieses grüne Licht wird nur wenig von unseren Proben absorbiert, wodurch eine homogene Ausleuchtung der Probe gewährleistet ist. Die Laserintensität wird so eingestellt, dass es zu einer Sättigung kommt. Das heißt, dass alle PSII-Zentren angeregt werden (siehe Kapitel 4.3.2).

6.2 Probenpräparation

Die Probenpräparation findet zum Schutz der Probe bei schwachem grünem LED Licht statt. Ausgehend von PSII Membranpartikeln, die auf eine in [Berthold et al., 1981] dargestellte Weise mit dem zusätzlichen Proteinstabilisator Glycin-Betain [Schiller und Dau, 2000] aus Spinat gewonnen und bei -80°C gelagert werden, beginnt die Präparation mit dem Auftauen der Probe auf Eis. Nach einer Stunde werden die Proben bei 50000 g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Zentrat wird verworfen. Dem Rest wird jetzt je nach Messung der Elektronenakzeptor oder Inhibitor zugegeben. Dies geschieht nach der Zentrifugation, da ansonsten der Zusatz mit dem Zentrat entfernt wird. Wasser absorbiert stark im interessanten IR-Bereich und sollte deshalb so weit wie möglich entfernt werden ohne jedoch die Aktivität der PSII Partikel zu vermindern. Deshalb wird der abzentrifugierte Probenrest nun nochmals mit trockener Luft, bis eine zähe Masse entsteht, getrocknet. Die Probe muss als wenige μm dicke Schicht zwischen zwei infrarotdurchlässige und durchsichtige Scheiben gebracht werden. Als Scheibenmaterial wurde Calciumfluorid (CaF_2) gewählt, da es einerseits im gewünschten IR-Bereich von $5.5 \mu\text{m}$ bis $8.3 \mu\text{m}$ genügend Transmission bietet und außerdem eine noch geringere Wasserlöslichkeit als Bariumfluorid (BaF_2), das Alternativmaterial, aufweist. Optimalerweise, vor allem im Hinblick auf spätere Step-Scan-Messungen, bei denen so viele Proben wie möglich benötigt werden, sollte so viel Fläche wie möglich für die Messung zur Verfügung stehen. Um die dünne Schicht herzustellen gibt es nun zum Beispiel die Möglichkeit einen Abstandshalter aus einem dünnen Material zwischen den Scheiben einzubringen. Allerdings birgt diese Methode große Schwierigkeiten mit unseren Proben. Denn falls zu viel Probenmaterial aufgetragen wird, kommt es zu einem Überfluten des Abstandshalters. Wird zu wenig aufgetragen, ist der Probenpunkt zu klein. Auf Grund der Konsistenz,

die auch durch Schwankungen der gelagerten PSII Präparationen variiert, ist eine genaue Dosierung schwierig. Auch das Trocknen der PSII-Probe, aufgetragen durch genau dosierbare Pipetten direkt auf den CaF_2 -Scheiben, hat sich nicht bewährt. Die Proben werden auf diese Weise inhomogen. Am besten bewährt hat sich ein direktes Auftragen der getrockneten Probe und das Erzeugen der dünnen Schicht durch Pressen, Drehen und Schieben der abdeckenden CaF_2 -Scheibe. Die Schichtdicke wird so gewählt, dass die Absorption im Vergleich zu den unbeschichteten CaF_2 -Scheiben bei der Amid I Bande, etwa 1650 cm^{-1} , auf eins eingestellt wird. Die Intensität ist somit zehnmal schwächer als ohne Probe. Dies ist die geringste Intensität im spektralen Messbereich, da sich hier das Maximum der Wasserbanden befindet. Ist die Schichtdicke eingestellt, wird der Rand der Scheiben mit einer dünnen Schicht schweren Hochvakuumfettes der Firma Wacker bestrichen um ein Austrocknen der Probe zu verhindern.

6.3 Wahl des Elektronenakzeptors

Durch die Abtrennung des PSII von dem Cytochrom- b_6/f Komplex und dem PSI ist die natürliche Elektronentransportkette unterbrochen. Die gebildeten Hydrochinone werden nicht oxidiert und es kommt zu einer Erschöpfung des Plastochinonpools. Das durch Ladungstrennung gebildete Q_A^- kann das Elektron nicht mehr weiterleiten, das Photosystem ist blockiert. Die Ladungstrennung wird durch Rekombination rückgängig gemacht und ein Fortschreiten des Mn-Komplexes im S-Zyklus wird verhindert. Um dies zu vermeiden kann ein künstlicher Elektronenakzeptor zugegeben werden. Oft werden, wie am Ende des Elektronentransfers im PSII, Chinone wie DCBQ (Dichlor-p-benzochinon) oder PpbQ (Phenyl-p-benzoquinone) benutzt. Im FTIR Bereich wird hauptsächlich Kaliumhexacyanidoferrat(III) kurz Ferricyanid benutzt, da es keine spektralen Änderungen im Messbereich von 1100 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} aufweist [Noguchi, 2007], [Babcock und Hillier, 2001], [Kimura und aki Ono, 2003]. Um eine Oxidation des Nicht-Häm-Eisens zwischen den beiden Plastochinonen Q_A und Q_B zu vermeiden, kann das Oxidationspotential durch eine Mischung von Ferricyanid und Ferrocyanid (Kaliumhexacyanidoferrat(III)) herabgesetzt werden [Noguchi und Inoue, 1995]. Bei unseren Proben zeigte sich jedoch, dass Ferricyanid oder eine Mischung aus Ferricyanid und Ferrocyanid zu einem stark erhöhten Missparameter (siehe Kapitel 6.5) von 16 % führt [Menzel, 2009]. Dies liegt

nur wenig unter dem Missparameter der Messungen ohne Elektronenakzeptor der 24 % beträgt [Menzel, 2009]. Zu besseren Ergebnissen führt die Zugabe von Chinonen wie DCBQ und PpbQ. PpbQ stabilisiert die Zustände S2 und S3 [Styring und Rutherford, 1988] und wurde auch schon bei FTIR-Messungen am PSII eingesetzt [Suzuki et al., 2006]. Bei meinen Proben beträgt der Missparameter etwa 8 % bei Messungen mit 4 cm^{-1} Auflösung ohne Probenwechsler und den Messungen mit dem Probenwechsler bei 2 cm^{-1} (siehe Kapitel 7.2 und [Menzel, 2009]). Deshalb wählte ich PpbQ als Elektronenakzeptor für die weiteren Messungen. Die Konzentration des Elektronenakzeptors beträgt $550 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$. Testmessungen ergaben, dass ab einer Konzentration unter $225 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$ die Konzentration an Elektronenakzeptor zu gering ist, sodass Q_B^- gebildet wird (sichtbar an einer Absorptionsbande bei 1480 cm^{-1}) und der zyklische Reaktionsablauf gestört ist (siehe Kapitel 6.5). Für alle Messungen, außer den Messungen an den Mn-freien Proben, wurde PpbQ als Elektronenakzeptor benutzt. Bei den Mn-freien Proben ist eine Rekombination der getrennten Ladungen gewünscht und deshalb wird kein Elektronenakzeptor zugegeben. Um reines, oxidiertes PpbQ zu erhalten wurde das PpbQ umkristallisiert.

Umkristallisation von Phenyl-p-benzoquinone

Im Weiteren wird das schrittweise Vorgehen der Umkristallisation nach [Müller, 2005] beschrieben:

- $\sim 250 \text{ mg}$ PpbQ in einem Becherglas einwiegen.
- PpbQ unter Rühren und vorsichtigem Erhitzen durch Zugabe von heißem Ethanol (p.a., ca. 9 ml) lösen.
- Heiße Lösung schnell filtrieren (Schleicher & Schuell) und den Filter mit heißem Ethanol (p.a.) nachspülen.
- Klare Lösung in einer Kristallisierschale abgedeckt im Abzug abkühlen lassen.
- Ausgefallene Kristalle von dem Lösungsmittel durch Filtration trennen. Dabei mit kaltem Ethanol (p.a.) waschen.
- Kristallines Pulver im Exsikkator bei Raumtemperatur trocknen.

6.4 Messparameter

Die Probe wird eine Stunde vor der eigentlichen Messung in den auf 10 °C temperierten Probenhalter eingebaut. Innerhalb dieser Zeit wird die feuchte Luft durch Spülen mit trockener Luft entfernt.

6.4.1 Einstellungen des Spektrometers

Auflösung

Als spektrale Auflösung der Messung wurde 2 cm^{-1} gewählt.

Spiegelgeschwindigkeit und Aufnahmemodus

Die Spektren wurden mit der maximalen Spiegelgeschwindigkeit gemessen. Diese entspricht $5 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ oder einer Frequenz von 160 kHz wenn die Anzahl der Nulldurchgänge des HeNe-Lasersignals gemessen wird. Das Interferogramm wurde beidseitig und bei der Vor- und Rückwärtsbewegung des Spiegels aufgenommen. Die Daten wurden im DC-Modus aufgenommen.

Frequenzbereich und elektronische Filter

Die Abtastfrequenz wurde so gewählt, dass ein Wellenzahlbereich von 0 cm^{-1} - 2257 cm^{-1} abgedeckt wird.

Apertur

Die Apertur hinter dem Globar wurde bei den Messungen ohne Probenwechsler auf den maximalen Wert von 8 mm eingestellt.

Parameter der Fouriertransformation

Durch die „OPUS“-Software wurde eine Phasenkorrektur durchgeführt. Sie erfolgte durch den Mertz Algorithmus (siehe Kapitel 3.2.5). Durch das Anhängen von Nullen wurden 3 zusätzliche Interpolationspunkte in das Spektrum eingefügt. Es wurde die Apodisationsfunktion „Norton-Beer-Mittel“ auf die Interferogramme angewandt [Norton und Beer, 1976].

6.4.2 Vorblitz

Die Probenpräparation wird bei möglichst schwachem grünen Licht einer LED Lampe durchgeführt um eine Anregung der Photosysteme zu vermeiden. Werden dennoch Photosysteme angeregt, kehren die Photosysteme bei Membranfragmenten mit dem Elektronenakzeptor PpbQ bei 18 °C im S2- oder S3-Zustand mit einer Halbwertszeit von etwa drei bzw. vier Minuten wieder in den S1-Zustand zurück [Styring und Rutherford, 1988]. Befinden sie sich jedoch im S0-Zustand, beträgt die Halbwertszeit etwa 50 Minuten [Styring und Rutherford, 1987]. Obwohl bei diesen Messungen eine Wartezeit vor der Messung von einer Stunde eingehalten wurde, um den Probenraum mit trockener Luft zu spülen, reicht diese Zeit nicht aus um damit alle Photosysteme im S0-Zustand relaxieren können. Deshalb wurde vor der Wartezeit ein sättigender Laserblitz appliziert um alle Photosysteme in einen Zustand zu bringen, der schnell in den S1-Zustand relaxiert. Außerdem wird durch den Vorblitz das Tyr_D oxidiert, da es ansonsten störende Banden erzeugen könnte [Noguchi und Sugiura, 2002].

6.4.3 Blitzprotokoll

Nach einer Stunde Wartezeit wird die Probe mit insgesamt 12 Laserblitzen angeregt. Vor dem ersten Blitz werden zwei Messungen mit je 80 Einzelscans von der Probe durchgeführt um ein Dunkelspektrum zu erhalten. 100 ms nach den Laserblitzen werden für 8 Sekunden 80 Rapid-Scans durchgeführt (siehe Abbildung 7.1).

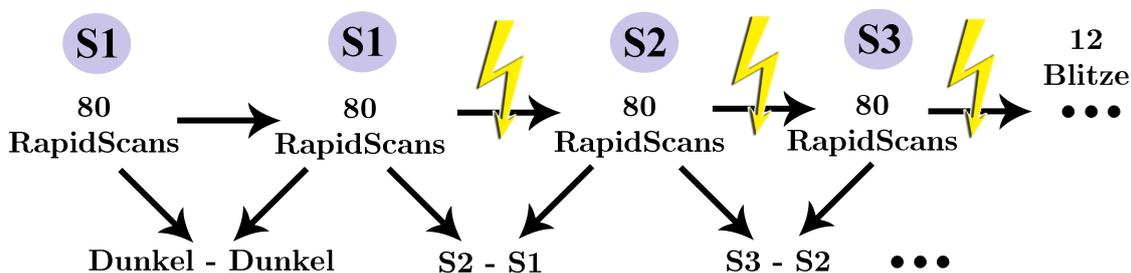


Abbildung 6.2: Blitzprotokoll der Messungen ohne Probenwechsler. Es wurden insgesamt 12 Laserblitze auf einer Probe appliziert. Von jedem S-Zustand wurden 80 doppelseitige Rapid-Scans durchgeführt. Die Berechnung der Differenzspektren ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Grundlinienkorrektur

Die Grundlinienkorrektur basiert auf den Messungen mit dem Probenwechsler (siehe Kapitel 7). Wegen der hohen Anzahl an möglichen Messungen ist bei den Messungen mit dem Probenwechsler die Grundlinie bei Messungen an verschiedenen Tagen reproduzierbar. Die Messungen mehrerer Tage wurden trotzdem für maximale Genauigkeit gemittelt und für jeden Übergang 10 Nullstellen im Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} ausgewählt. Zwischen den gewünschten Nullstellen der Spektren wurde eine Gerade approximiert und von den Spektrenpunkten der Messungen ohne Probenwechsler abgezogen. Es folgen die genauen Positionen der Nullstellen:

S1→**S2**: 1800 cm^{-1} , 1716 cm^{-1} , 1673 cm^{-1} , 1593 cm^{-1} , 1517 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} ,
 1377 cm^{-1} , 1306 cm^{-1} , 1242 cm^{-1} , 1195 cm^{-1}

S2→**S3**: 1800 cm^{-1} , 1722 cm^{-1} , 1611 cm^{-1} , 1584 cm^{-1} , 1532 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} ,
 1390 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1219 cm^{-1} , 1132 cm^{-1}

S3→**S0**: 1800 cm^{-1} , 1712 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} , 1609 cm^{-1} , 1573 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} ,
 1452 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1276 cm^{-1} , 1151 cm^{-1}

S0→**S1**: 1800 cm^{-1} , 1723 cm^{-1} , 1691 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} , 1469 cm^{-1} , 1413 cm^{-1} ,
 1302 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1215 cm^{-1} , 1100 cm^{-1}

6.5 Missparameter

Die Wahrscheinlichkeit der individuellen Übergänge des Mangankomplexes der einzelnen Photosysteme in einer Probe nach Lichtanregung mit einem sättigenden Laserpuls ist kleiner als Eins. Dies führt zu einer mit der Blitzzahl ansteigenden Durchmischung der S-Zustände. Es gibt mehrere Ursachen, die zur Durchmischung führen [Meunier und Popovic, 1990], [Shinkarev und Wraight, 1993b], [Shinkarev und Wraight, 1993a]:

- Photosysteme, deren Chinon Q_A sich im reduzierten Zustand befindet.
- Rekombinationsvorgänge, hauptsächlich die Rekombination des Radikalpaares $[P680^+, Q_A^-]$. Dies passiert z.B. wenn der $Q_A \rightarrow Q_B$ Elektronentransfer blockiert ist.

- Das Relaxieren der einzelnen S-Zustände in den dunkelstabilen S1-Zustand. Dies ist hauptsächlich bei den Zuständen S2 und S3 der Fall (siehe Kapitel 6.4.2).
- Eine nichtsättigende Blitzanregung.

6.5.1 Programm zur Berechnung des Missparameters

Der Missparameter kann aus den gemessenen Daten ermittelt werden. Dazu werden zuerst vier ideale Übergangsspektren in Abhängigkeit des noch unbekanntem Missparameters berechnet. Die Übergangsspektren ab dem fünften Blitz können mit den idealen Spektren simuliert werden. Der wahrscheinlichste Missparameter ergibt die geringste Abweichung zwischen den simulierten und den gemessenen Übergangsspektren. Es folgt eine genaue Darstellung der Vorgehensweise. Vor dem ersten Blitz liegt eine reine S1-Population vor. Dies wird durch die Applikation eines Vorblitzes gesichert. Die Simulationen wurden auch mit einer von Null verschiedenen S0-Population durchgeführt was aber zu schlechteren Übereinstimmungen zwischen Messung und Simulation führt. Somit ist das erste wellenzahlabhängige Übergangsspektrum S_{Messung}^1 ein reines S1→S2 Übergangsspektrum. Trotzdem ist es noch nicht das ideale Übergangsspektrum S_{Ideal}^1 da durch die verfehlten Photosysteme die Amplitude zu klein ist. Mit dem Missparameter m kann das gemessene Spektrum beschrieben werden

$$S_{\text{Messung}}^1 = S_{\text{Ideal}}^1(1 - m) . \quad (6.1)$$

Damit ergibt sich das ideale Spektrum zu

$$S_{\text{Ideal}}^1 = \frac{S_{\text{Messung}}^1}{1 - m} . \quad (6.2)$$

Beim zweiten Blitz vollzieht der Anteil $m(1 - m)$ den ersten Übergang und $(1 - m)^2$ den zweiten. Um das ideale Spektrum zu errechnen, wird der Anteil, der den S1→S2 Übergang vollzieht, abgezogen und danach das Spektrum auf die korrekte Amplitude gebracht

$$S_{\text{Ideal}}^2 = \frac{S_{\text{Messung}}^2 - (m(1 - m) \cdot S_{\text{Ideal}}^1)}{(1 - m)^2} \quad (6.3)$$

Für die höheren Blitze gilt die gleiche Vorgehensweise. Allgemein werden die idealen Übergänge beschrieben durch

- die gemessenen Übergangsspektren
- das erste ideale Spektrum
- den Übergangsvektor \vec{T}^n mit der Blitzzahl n . Er wird bestimmt durch

$$\vec{T}^{n+1} = \mathbf{M} \cdot \vec{T}^n \quad (6.4)$$

mit der Matrix \mathbf{M}

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} m & 0 & 0 & (1-m) \\ (1-m) & m & 0 & 0 \\ 0 & (1-m) & m & 0 \\ 0 & 0 & (1-m) & m \end{pmatrix} \quad (6.5)$$

und den Übergangsvektoren frühere Blitze, beginnend mit dem ersten Übergangsvektor

$$\vec{T}^1 = \begin{pmatrix} (1-m) \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (6.6)$$

Damit ergeben sich die idealen Übergänge zu

$$S_{\text{Ideal}}^{n+1} = \frac{\overbrace{S_{\text{Messung}}^{n+1} - \sum_{i=1}^n (S_{\text{Ideal}}^n \cdot T_i^{n+1})}^{\text{Abziehen der falschen Übergänge}}}{\underbrace{T_{n+1}^{n+1}}_{\text{Erhöhen der Amplitude}}} \quad 1 \leq n \leq 3 \quad (6.7)$$

wobei die tiefgestellten Indizes die Komponente des Vektors angeben. Die Übergänge ab Blitz fünf können mit diesen idealen Spektren beschrieben werden

$$S_{\text{Sim}}^n = \sum_{i=1}^4 (S_{\text{Ideal}}^i \cdot T_i^{n+1}) \quad n \geq 5. \quad (6.8)$$

Der Missparameter kann jetzt durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt werden

$$\min_m \sum_{n=5}^{12} (S_{\text{Messung}}^n - S_{\text{Sim}}^n)^2. \quad (6.9)$$

Mit dem berechneten Missparameter können mit den Formeln 6.2 und 6.7 die idealen Übergangsspektren berechnet werden.

6.6 Ergebnisse

6.6.1 Differenzspektren

In Abbildung 6.3 ist ein Vergleich der S-Übergänge gezeigt. Für jeden Übergang werden auch die Spektren der höheren Zyklenzahlen gezeigt. Der Missparameter der Messung ergab sich zu 10 %. Der leicht höhere Wert im Vergleich zu den Messungen mit dem Probenwechsler, die einen Missparameter von 8.2 % aufweisen, kann auf eine nicht vollständig korrekte Grundlinienkorrektur zwischen den vorgegebenen Nullstellen und durch ein höheres Rauschniveau, aufgrund der geringen Anzahl an Messungen, zurückgeführt werden. Die geringe Dämpfung der spektralen Amplituden zeigt, dass die Photosysteme den Zyklus gut durchlaufen. Ein Vergleich mit Messungen anderer Gruppen, die ebenfalls mit Membranpartikeln messen, wie [Babcock und Hillier, 2001], zeigt, dass unsere Messungen sehr viel besser den Zyklus durchlaufen. Offensichtlich wird dies durch den Vergleich der Missparameter, der für die Messungen von [Babcock und Hillier, 2001] 20 % beträgt. Der Verlauf dominanter Banden des ersten und zweiten Überganges wird durch vertikale Striche veranschaulicht. Abbildung 6.4 zeigt einen Vergleich der Spektren des ersten Zyklus mit den berechneten, idealen Übergangsspektren. Die Dämpfung der spektralen Amplituden aufgrund der ansteigenden Durchmischung ist durch eine ansteigende Differenz zwischen den gemessenen und den idealen Spektren ersichtlich. Die Simulation des zweiten Durchgangs des S-Zyklus durch eine Mischung der idealen Spektren, erzielt gute Übereinstimmungen (siehe Abbildung 6.5). Eine detaillierter Vergleich der Banden mit der Literatur und deren Zuordnung wird in Kapitel 7.2.1 diskutiert.

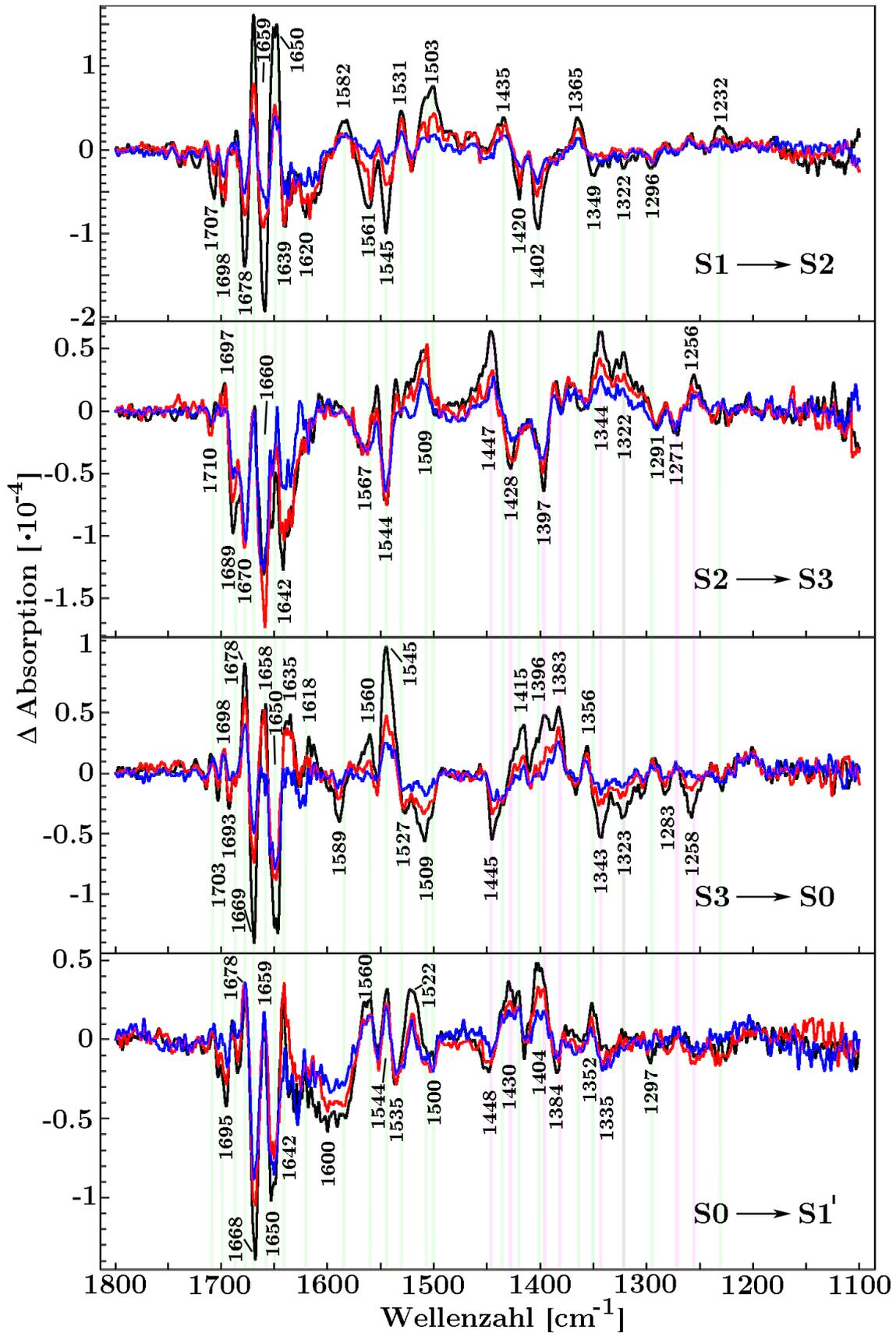


Abbildung 6.3: Vergleich der blitzinduzierten FTIR Differenzspektren für drei Durchgänge durch den S-Zyklus (schwarz, rot, blau). Starke Banden des ersten (grün) und zweiten (pink) Überganges werden durch Linien in den anderen Übergängen verdeutlicht.

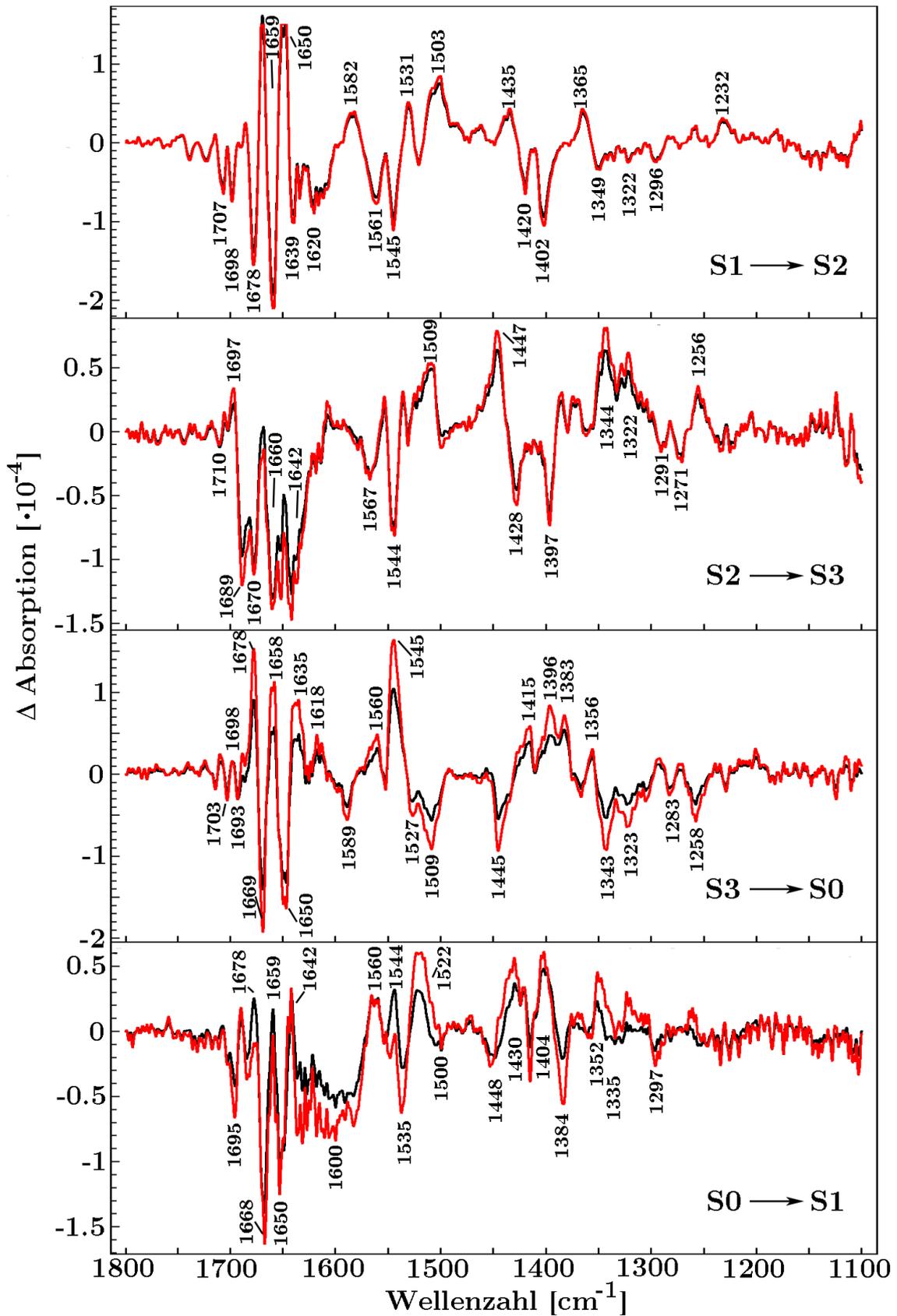


Abbildung 6.4: Vergleich der Übergänge des ersten Durchganges (schwarz) mit den berechneten idealen Übergangsspektren (rot).

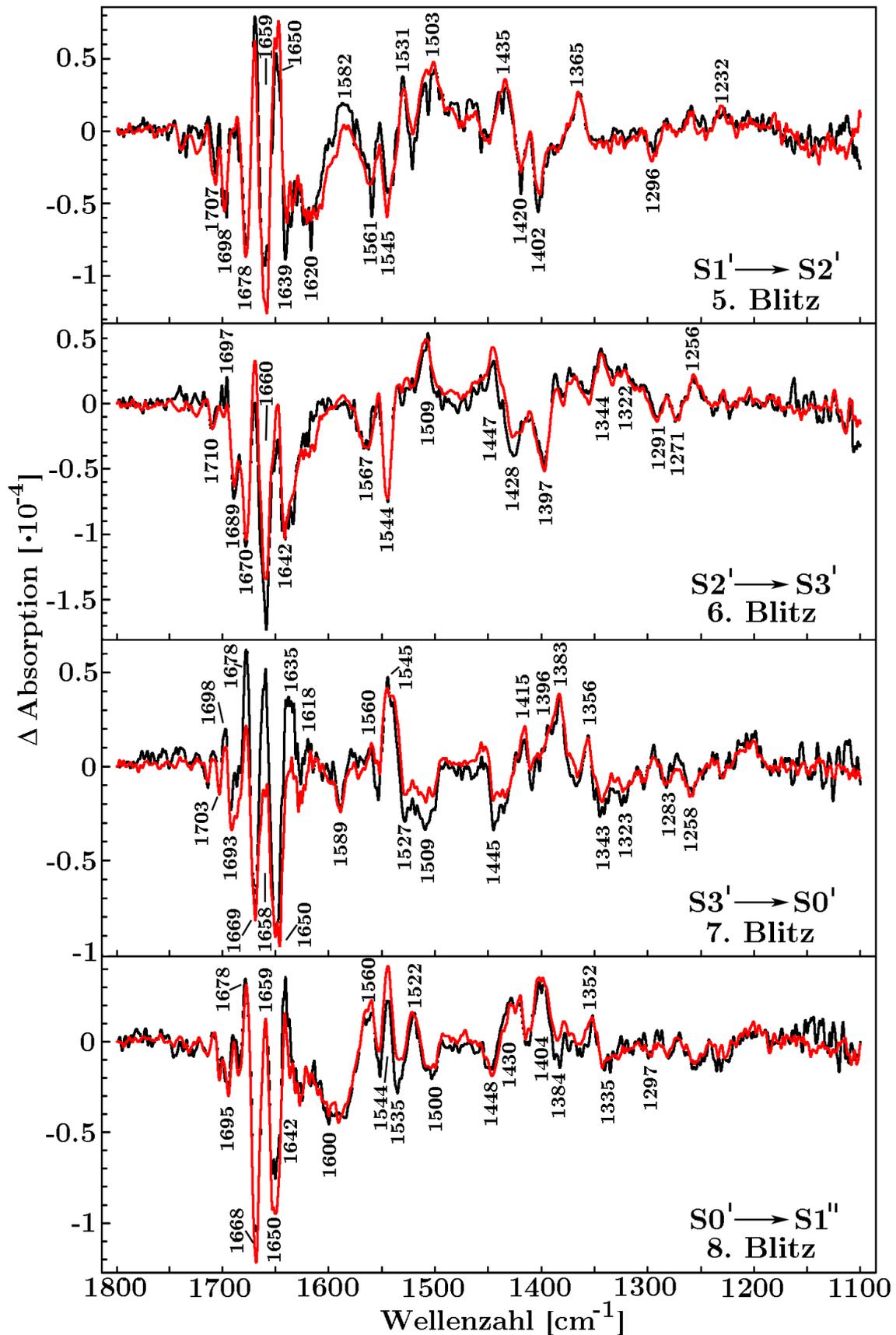


Abbildung 6.5: Vergleich der Differenzspektren des zweiten S-Durchganges mit deren Simulation durch die idealen Spektren. Fehlende Übereinstimmungen sind auf Fehler in der Grundlinie zurückzuführen.

6.6.2 Diskussion

Die ersten FTIR Messungen am PSII in unserer Arbeitsgruppe wurden noch ohne Probenwechsler im Rapid-Scan Modus durchgeführt. Trotz der daraus folgenden geringen Anzahl an Messungen (20 Proben) konnten bereits gute Ergebnisse erreicht werden. Die Übergangsspektren der stationären Zustände zeigen bei Messungen über drei Zyklen nur eine geringe Abschwächung der Signalamplitude und reproduzieren die Spektren des ersten Zyklus gut. Dies spricht für eine gelungene Entwicklung der Probenpräparation und Wahl des Elektronenakzeptors. Um die Abschwächung der Signalamplitude mit ansteigender Blitzzahl quantifizieren zu können, wurde ein Programm entwickelt, das den sogenannten „Missparameter“ ermittelt. Dieser gibt den prozentualen Anteil der Photosysteme an, welche einen Übergang nicht vollziehen. Mittels dieses Missparameters können perfekte Übergangsspektren berechnet werden (siehe Abbildung 6.4), die nur die spektralen Änderungen des jeweiligen Übergangs enthalten.

Kapitel 7

Messung der stationären Zustände mit dem Probenwechsler

7.1 Probenpräparation und Messprotokoll

Die Schritte der Probenpräparation und der Ermittlung der guten Probenpunkte können den Kapiteln 9.1.2 und 9.1.3 entnommen werden, wobei die Schichtdicke in der Amid I Region auf 1 ± 0.2 eingestellt wurde.

7.1.1 Einstellungen des Spektrometers

Auflösung

Als spektrale Auflösung der Messung wurde 2 cm^{-1} gewählt.

Spiegelgeschwindigkeit und Aufnahmemodus

Die Spektren wurden mit der maximalen Spiegelgeschwindigkeit gemessen. Diese entspricht $5 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ oder einer Frequenz von 160 kHz wenn die Anzahl der Nulldurchgänge des HeNe-Lasersignals gemessen wird. Das Interferogramm wurde beidseitig und bei der Vor- und Rückwärtsbewegung des Spiegels aufgenommen. Die Daten wurden im AC-Modus aufgenommen.

Frequenzbereich und elektronische Filter

Die Abtastfrequenz wurde so gewählt, dass ein Wellenzahlbereich von 0 cm^{-1} - 2633 cm^{-1} abgedeckt wird.

Apertur

Die Apertur hinter dem Globar wurde bei den Messungen mit Probenwechsler auf 3 mm eingestellt. Damit ergibt sich bei der Probe ein IR-Strahldurchmesser von unter 1 mm.

Parameter der Fouriertransformation

Durch die „OPUS“-Software wurde eine Phasenkorrektur durchgeführt. Sie erfolgte durch den Mertz Algorithmus (siehe Kapitel 3.2.5). Durch das Anhängen von Nullen wurden 3 zusätzliche Interpolationspunkte in das Spektrum eingefügt. Es wurde die Apodisationsfunktion „Norton-Beer-Mittel“ auf die Interferogramme angewandt [Norton und Beer, 1976].

7.1.2 Blitzprotokoll

Jeder Probenpunkt wird mit insgesamt 10 Laserblitzen angeregt (siehe Abbildung 7.1). Vor dem ersten Blitz werden zwei Messungen mit je 50 doppelseitigen Einzelscans im Rapid-Scan Modus von der Probe durchgeführt um ein Dunkelspektrum zu erhalten. 100 ms nach den Laserblitzen werden für 5 Sekunden 50 Rapid-Scans durchgeführt (siehe Abbildung 7.1). Da mit dem Probenwechsler sehr viele Proben gemessen werden können, wurde die Anzahl der Scans pro Probe von 80 auf 50 Scans reduziert, um die Anzahl der Rekombinationen der Photosysteme so gering wie möglich zu halten. Bei den Messungen mit dem Probenwechsler wurden nur 10 Blitze appliziert, damit bei einer eventuellen Anregung benachbarter Probenpunkte durch Streulicht möglichst wenig Photosysteme im relativ stabilen S₀-Zustand angereichert werden. Nach 10 Blitzen befinden die Photosysteme sich - falls bei jeden Blitz eine Anregung stattfindet - im S₃-Zustand. Die Wahrscheinlichkeit Systeme im S₀-Zustand anzutreffen ist also minimal. Die S₂- und S₃-Zustände relaxieren in den S₁-Zustand (siehe Kapitel 6.4.2).

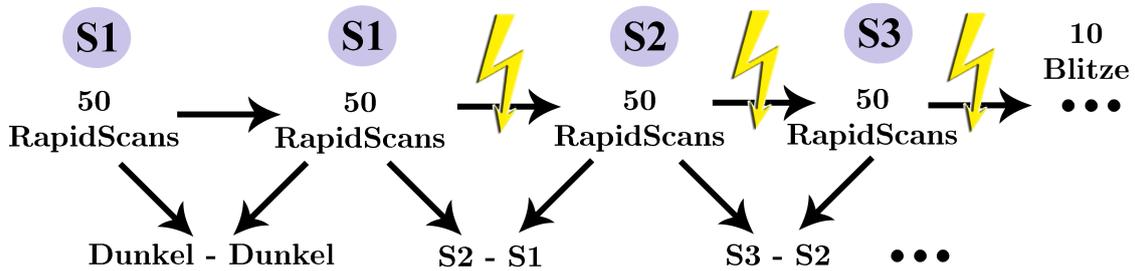


Abbildung 7.1: Blitzprotokoll der Messungen mit Probenwechsler. Es wurden insgesamt 10 Laserblitze auf einer Probe appliziert.

Anzahl der Messungen

Es wurden 300 Probenpunkte vermessen. Dadurch ergibt sich für jeden Übergang eine Anzahl von 15000 doppelseitigen Einzelscans. Aus der großen Anzahl ergibt sich das gute Signal-Rausch Verhältnis und die Reproduzierbarkeit der Grundlinie.

7.2 Ergebnisse

Messungen der S-Übergänge mit PSII Membranpartikeln wurden schon in [Babcock und Hillier, 2001] und mit PSII-Kern-Partikeln von *Thermosynechococcus elongatus* in [Noguchi und Sugiura, 2002, Noguchi und Sugiura, 2003] sowie mit PSII-Kern-Partikeln von *Synechocystis sp. PCC6803* bei [Kimura und aki Ono, 2003, Yamanari et al., 2004] vorgestellt. Alle Messungen wurde bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} durchgeführt, wobei starke Apodisationsfunktionen angewandt wurden. Die Messungen von z.B. [Noguchi und Sugiura, 2002] weisen daher eher die Form meiner Daten bei einer Auflösung von 10 cm^{-1} auf. Dadurch werden sicherlich alle künstlichen Nebenmaxima eliminiert, doch Details der einzelnen Banden, wie eine weitere Aufspaltung, bleiben verborgen. Auch scheint bei den Messungen in der Literatur die mit der Blitzzahl ansteigende Dämpfung der Signalamplitude sehr stark zu sein. Bei [Noguchi und Sugiura, 2002] wird der Missparameter mit $\sim 12 \%$ angegeben. Bei [Babcock und Hillier, 2001] beträgt er sogar 20% und bei [Yamanari et al., 2004] etwa 18% . Der Missparameter meiner Messungen mit dem Probenwechsler ergab lediglich 8.2% , wobei der niedrige Wert schon durch die geringe Dämpfung der Signalamplituden sichtbar ist. Ein Vergleich der Bandenpositionen mit den Messungen von [Babcock und Hillier, 2001], die ebenfalls an PSII Membranpartikeln

vorgenommen wurden, zeigt, dass fast alle Banden mit einer Genauigkeit von $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ reproduziert werden können. Aber auch bei den Messungen von [Noguchi und Sugiura, 2002, Noguchi und Sugiura, 2003, Kimura und aki Ono, 2003, Yamanari et al., 2004] sind große Übereinstimmungen zu sehen. Die detaillierten Übereinstimmungen und Zuordnungen der Banden können den Tabellen 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 und 7.10 entnommen werden. Die erstaunlich guten Übereinstimmungen, auch mit den Messungen an PSII-Kern-Partikeln von *Thermosynechococcus elongatus*, wie sie von der Gruppe um Noguchi benutzt werden, und den PSII-Kern-Partikeln von *Synechocystis sp. PCC6803*, wie sie von der Gruppe um Ono benutzt werden, sind auffallend. Ein Vergleich von Messungen mit dem Inhibitor DCMU und zusätzlichen Messungen mit Mn-freien Proben genau dieser Organismen zeigte schon bei [Remy et al., 2004] große Übereinstimmungen. Diese Ergebnisse und die hier gezeigten Übereinstimmungen vieler Banden zeugen von einer sehr ähnlichen Struktur der Photosysteme in verschiedenen Organismen. In Abbildung 7.2 ist ein Vergleich der S-Übergänge gezeigt. Für jeden Übergang werden auch die Spektren der höheren Zyklenzahlen gezeigt. Der geringe Missparameter wird in der schwachen Dämpfung der Amplituden sichtbar. Der Verlauf dominanter Banden des ersten und zweiten Überganges wird durch vertikale Striche veranschaulicht. In Abbildung 7.5 sind die Verläufe einiger Banden gezeigt. Sie zeigen ein gut sichtbares vierschrittiges zyklisches Verhalten, das auf Vorgänge am Mn-Komplex zurückzuführen ist. Abbildung 7.3 zeigt einen Vergleich der Spektren des ersten Zyklus mit den berechneten idealen Übergangsspektren. Die Dämpfung der spektralen Amplituden durch die ansteigende Durchmischung ist durch eine ansteigende Differenz zwischen den gemessenen und den idealen Spektren ersichtlich. Die Simulation des zweiten Durchgangs des S-Zyklus durch eine Mischung der idealen Spektren erzielt gute Übereinstimmungen (siehe Abbildung 7.4).

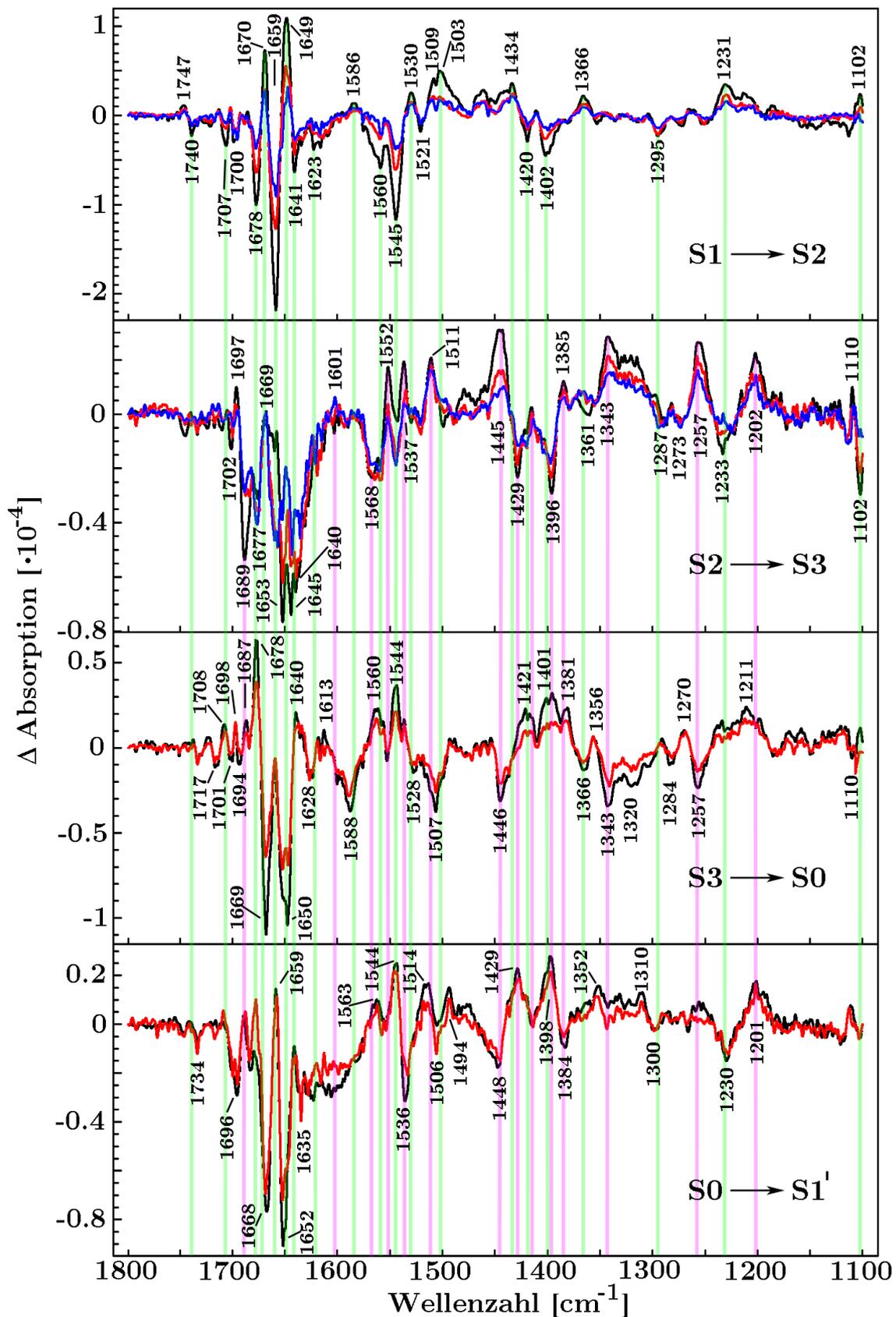


Abbildung 7.2: Vergleich der blitzinduzierten FTIR Differenzspektren für drei (S1/S2, S2/S3) bzw. zwei (S3/S0, S0/S1) Durchgänge durch den S-Zyklus (schwarz, rot, blau). Starke Banden des ersten (grün) und zweiten (pink) Überganges werden durch Linien in den anderen Übergängen verdeutlicht.

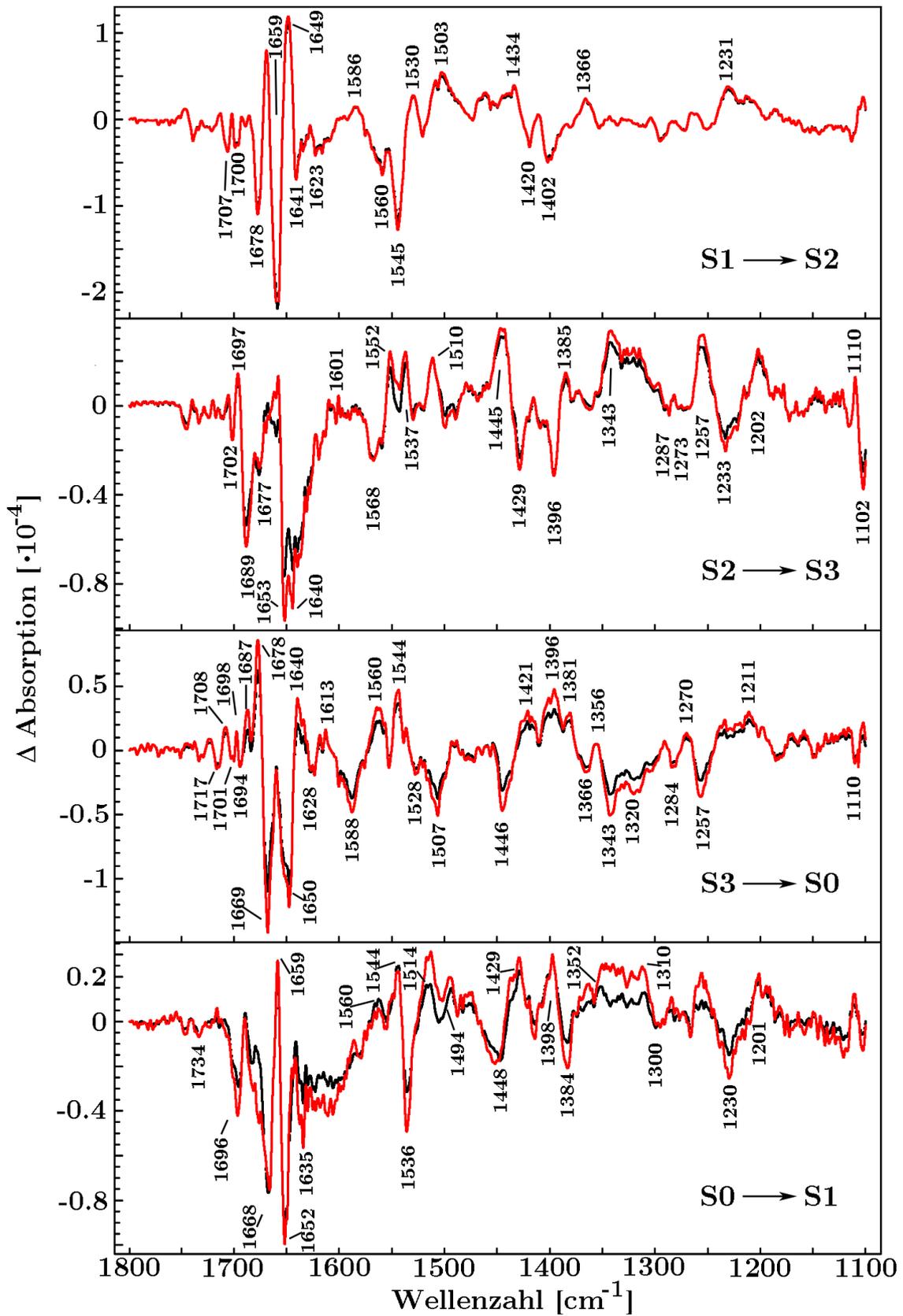


Abbildung 7.3: Vergleich der Übergänge des ersten Durchganges (schwarz) mit den berechneten idealen Übergangsspektren (rot).

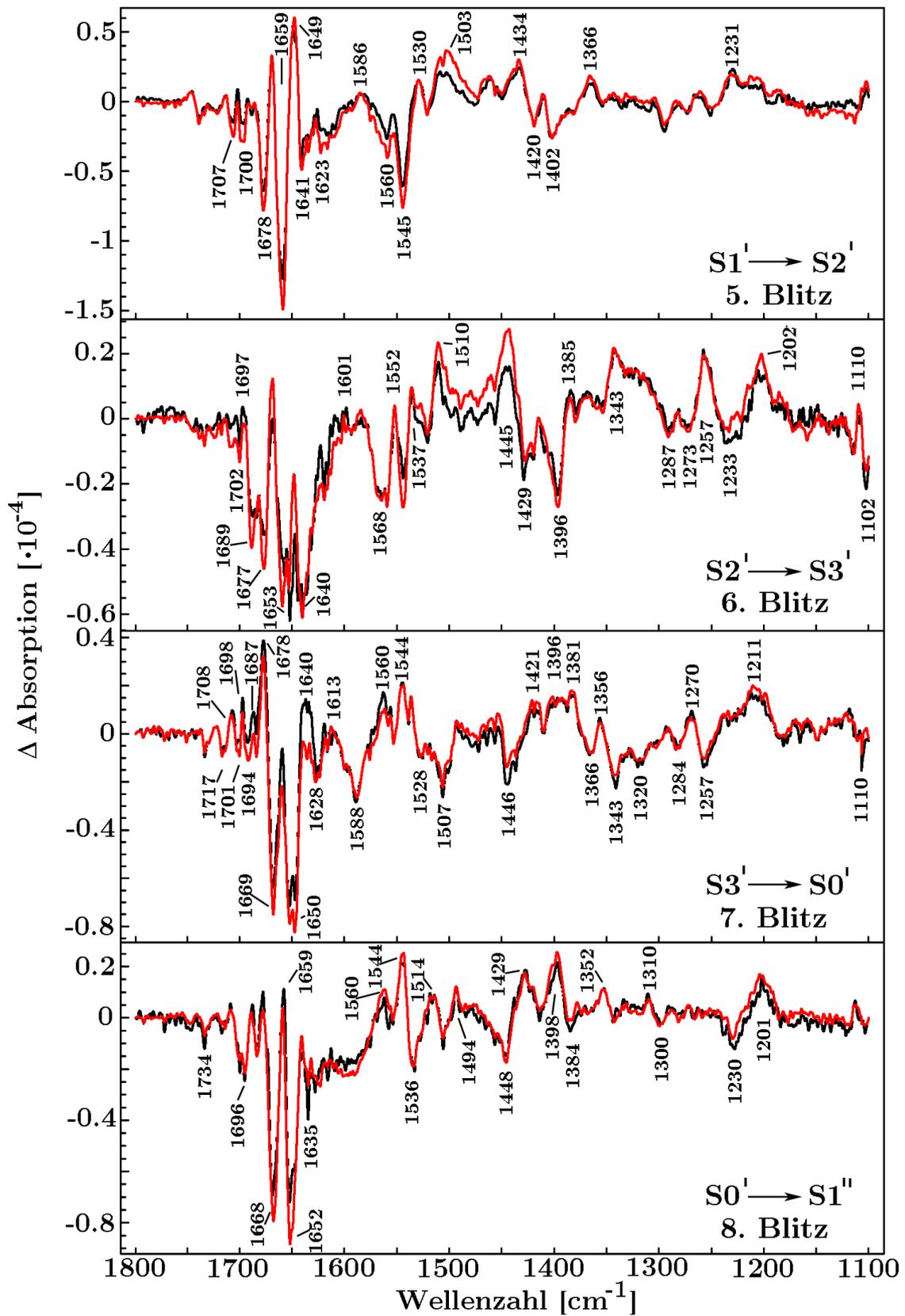


Abbildung 7.4: Vergleich der Differenzspektren des zweiten S-Durchganges mit deren Simulation durch die idealen Spektren.

7.2.1 Zuordnung der Banden

Da spezielle chemische Bindungen in begrenzten Bereichen des Infrarotspektrums absorbieren, ist schon eine grobe Zuordnung der Banden möglich [Barth und Zscherp, 2002, Sokrates, 1994]. In dem Bereich zwischen etwa 1700 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} absorbieren C=O Bindungen der Amide der Polypeptide. Dieser Bereich wird auch als Amid I Bereich bezeichnet. Hier liegt eine wichtige Informationsquelle über die Sekundärstruktur von Polypeptiden. Der Bereich zwischen etwa 1650 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} kann den asymmetrischen Streckschwingungen der deprotonierten Carboxylate (COO^-) zugeordnet werden. Im Bereich zwischen etwa 1600 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} absorbieren C-N Streckschwingungen und N-H Scherschwingungen. Dieser Bereich wird auch als Amid II Region bezeichnet. Auch aus dieser Region können Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur gezogen werden. Zwischen etwa 1450 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} absorbieren die symmetrischen Streckschwingungen der Carboxylate (COO^-). Eine bessere Zuordnung erhält man durch Austausch einer Atomsorte durch deren Isotop. Der Vergleich vor und nach dem Austausch zeigt diejenigen Banden, die eine Verschiebung im spektralen Bereich aufweisen. Noch genauere Erkenntnisse können durch den Austausch individueller Atome oder ortsspezifische Mutagenese gewonnen werden. Speziell bei der Mutagenese muss jedoch beachtet werden, dass auch andere Banden Änderungen nach der Mutagenese aufweisen können [Strickler et al., 2006]. Auch das Entfernen einzelner Komponenten, wie z.B des Mangan Komplexes oder das Blockieren einzelner Komponenten durch Inhibitoren wie DCMU liefern wichtige Informationen über den Ursprung einzelner Banden [Berthomieu et al., 1990, Hienerwadel et al., 1996]. Ein Vergleich der Absorptionsbanden mit Modellverbindungen, die Teilen des PSII entsprechen, und den Absorptionsbanden der PSII Messungen bieten eine weitere Möglichkeit Banden zuzuordnen [Bauscher et al., 1990]. Eine Markierung mit ^{13}C und ^{15}N wurde von [Noguchi et al., 1995b, Noguchi und Sugiura, 2003, Kimura und aki Ono, 2003, Yamanari et al., 2004] durchgeführt. Die ^{13}C Markierung führte zu starken Verschiebungen der Banden zwischen 1700 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} um 40 cm^{-1} - 50 cm^{-1} . Eine ^{15}N Markierung führt lediglich zu einer geringen Verschiebung der Banden zwischen 1700 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} . Diese Bereiche wurden deshalb der Amid I Region der Polypeptide zugeordnet. Die Banden zwischen 1541 cm^{-1} und 1545 cm^{-1} wurden bei der ^{13}C und ^{15}N Markierung um 10 cm^{-1} - 20 cm^{-1} verschoben und deshalb den Amid II Banden zugeordnet. Die Banden um 1588 und 1513 cm^{-1} - 1509 cm^{-1} zeigten starke Verschiebungen

bei ^{13}C Markierung aber keine Verschiebung durch ^{15}N Markierung. Sie können deshalb der asymmetrischen Carboxylatschwingung zugeordnet werden. Die starken Banden zwischen 1450 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} verschieben sich bei ^{13}C Markierung um 25 cm^{-1} - 45 cm^{-1} und weisen keine Verschiebung bei ^{15}N Markierung auf. Sie werden deshalb den symmetrischen Carboxylatschwingungen zugeordnet.

Ein Austausch von H_2O durch D_2O führt zu einer Verschiebung der Bande bei 1560 cm^{-1} zu 1578 cm^{-1} [Noguchi et al., 1995a, Menzel, 2009]. Aus Messungen an einigen Carboxylat-Modellverbindungen mit unterschiedlichen Wasserstoffbrücken kann gefolgert werden, dass diese Bande zu einem Carboxylat Liganden gehört, der stark über eine Wasserstoffbrücke an den Mangankomplex gebunden ist. Diese Zuordnung wird auch durch Berechnungen mittels der Dichtefunktionaltheorie bestätigt [Fischer und Wydrzynski, 2001]. Es folgt ein detaillierter Vergleich der gemessenen Banden mit Literaturdaten und daraus folgend, die Zuordnung zu einzelnen Bindungen (siehe Tabellen 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 und 7.10).

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	Referenz
1747 (+)	1749 (+)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1747 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1740 (-)	1738 (-)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1737 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1722 (-)	1723 (-)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1722 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1707 (-)	1704 (-)	COOH C=O Str. / Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1707 (-)	COOH C=O Str. / Amid I	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1708 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1703 (+)	1702 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1700 (-)	1697 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1693 (+)	1695 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1678 (-)	1686 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1676 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1679 (-)	Amid I	[Kimura und aki Ono, 2003]
1670 (+)	1677 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
	1670 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1668 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1659 (-)	1663 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1661 (-)	Amid I	[Kimura und aki Ono, 2003]
1649 (+)	1652 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1652 (+)	Amid I	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1649 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.1: Bandenzuordnungen des S1→S2 Übergangs

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	Referenz
1641 (-)	1641 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1642 (-)	Amid I	[Kimura und aki Ono, 2003]
1635 (-)	1636 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1586 (+)	1588 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1587 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1586 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1576 (-)	1574 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Yamanari et al., 2004]
1560 (-)	1564 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1565 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1563 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1545 (-)	1541 (-)	Amid II	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1545 (-)	Amid II	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1543 (-)	Amid II	[Yamanari et al., 2004]
	1544 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1530 (+)	1529 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1521 (-)	1524 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1509 (+)	1509 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1507 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1508 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Yamanari et al., 2004]
	1512 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.2: Bandenzuordnungen des S1→S2 Übergangs (Fortsetzung)

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	Referenz
1434 (+)	1436 (+)	Amid II	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1436 (+)	Amid II	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1438 (+)	Amid II	[Yamanari et al., 2004]
1420 (-)	1417 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1417 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1417 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Yamanari et al., 2004]
	1420 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1402 (-)	1402 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1400 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1400 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Yamanari et al., 2004]
	1403 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1366 (+)	1363 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1364 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1363 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Yamanari et al., 2004]
	1366 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1353 (-)	1351 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1343(+)	1343 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1340 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
1332 (+)	1328 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1328 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Kimura und aki Ono, 2003]
	1337 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.3: Bandenzuordnungen des S1→S2 Übergangs (Fortsetzung)

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	Referenz
1295 (-)	1294 (-)	N-Freie Umgebung	[Yamanari et al., 2004]
1261 (+)	1260 (+)	COH Def.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1260 (+)	COH Def.	[Kimura und aki Ono, 2003]
1251(-)	1247 (-)	COH Def.	[Kimura und aki Ono, 2003]
1144 (-)	1146 (-)	N-Freie Umgebung	[Yamanari et al., 2004]
1187 (+)	1184 (+)	N + C Gruppen	[Yamanari et al., 2004]
1113 (-)	1113 (-)	N + C Gruppen	[Yamanari et al., 2004]
1102 (+)	1105 (+)	N + C Gruppen	[Yamanari et al., 2004]

Tabelle 7.4: Bandenzuordnungen des S1→S2 Übergangs (Fortsetzung)

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	
1741 (+)	1738 (+)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1721 (+)	1721 (+)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1706 (+)	1704 (+)	COOH C=O Str. / Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1697 (+)	1697 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1689 (-)	1688 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1688 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1669 (+)	1666 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1669 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1661 (-)	1659 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1660 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1645 (-)	1643 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1640 (-)	1641 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1585 (+)	1587 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1568 (-)	1566 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1543 (-)	1545 (-)	Amid II	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1545 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1537 (+)	1535 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1511 (+)	1513 (+)	Amid II / Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1509 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1445 (+)	1446 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1444 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.5: Bandenzuordnungen des S2→S3 Übergangs

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	
1429 (-)	1428 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1396 (-)	1396 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1396 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1361 (-)	1358 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1361 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1343 (+)	1342 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
	1342 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1257 (+)	1255 (+)	COH Def.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1258 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.6: Bandenzuordnungen des S2→S3 Übergangs (Fortsetzung)

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	
1751 (-)	1752 (-)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1749 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1738 (+)	1738 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1734 (-)	1734 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1723 (+)	1722 (+)	COOH C=O Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1723 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1717 (-)	1716 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1701 (-)	1702 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1698 (+)	1697 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1685 (-)	1684 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1678 (+)	1677 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1679 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1669 (-)	1670 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1671 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1650 (-)	1653 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1648 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1640 (+)	1642 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1638 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1613 (+)	1613 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1588 (-)	1588 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1576 (-)	1575 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.7: Bandenzuordnungen des S3→S0 Übergangs

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	
1544 (+)	1543 (+)	Amid II	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1544 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1507 (-)	1508 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1446 (-)	1444 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1443 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1418 (+)	1417 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1401 (+)	1400 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1381 (+)	1382 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1356 (+)	1360 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1343 (-)	1345 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1341 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1320 (-)	1324 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1291 (+)	1291 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1257 (-)	1256 (-)	COH Def.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1258 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.8: Bandenzuordnungen des S3→S0 Übergangs (Fortsetzung)

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	
1742 (+)	1739 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1734 (-)	1734 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1715 (-)	1716 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1710 (+)	1710 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1696 (-)	1694 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1690 (+)	1688 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1668 (-)	1666 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1669 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1659 (+)	1659 (+)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1659 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1652 (-)	1653 (-)	Amid I	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1650 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1563 (+)	1564 (+)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1555 (-)	1554 (-)	Amid II	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1558 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.9: Bandenzuordnungen des S0→S1 Übergangs

7.2. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	
1544 (+)	1545 (+)	Amid II	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1546 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1536 (-)	1537 (-)	Asym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1506 (-)	1507 (-)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1448 (-)	1446 (-)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1429 (+)	1430 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]
1398 (+)	1397 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
1352 (+)	1355 (+)	Sym. COO ⁻ Str.	[Noguchi und Sugiura, 2003]
	1352 (+)	-	[Babcock und Hillier, 2001]

Tabelle 7.10: Bandenzuordnungen des S0→S3 Übergangs (Fortsetzung)

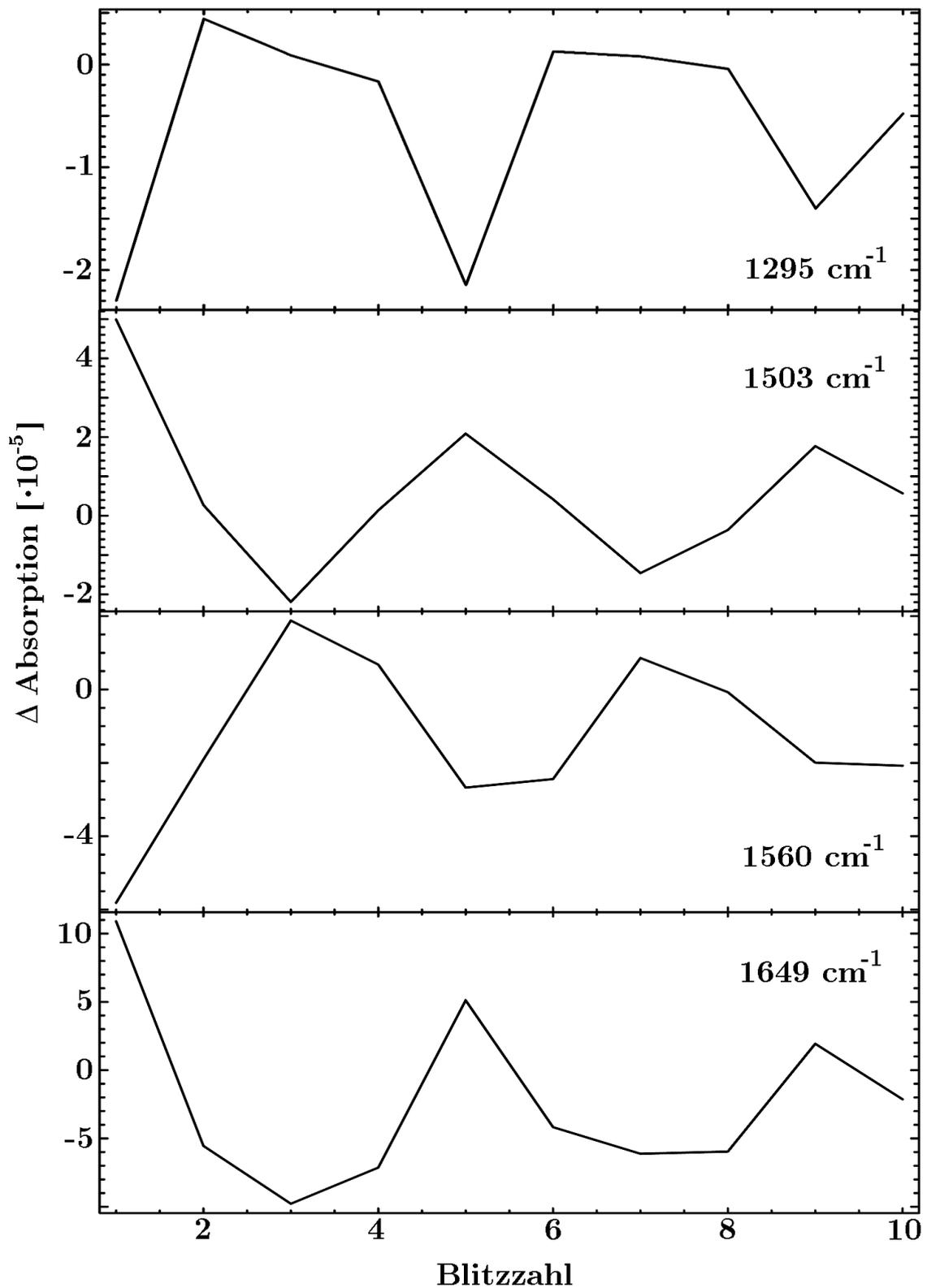


Abbildung 7.5: Gezeigt werden die Verläufe der Absorptionänderungen bei einigen Wellenzahlen mit ansteigender Blitzzahl. Alle Banden zeigen ein gut sichtbares vierschrftiges zyklisches Verhalten. Dies zeigt, dass sie durch Änderungen am Mangankomplex hervorgerufen werden. Vergleichbar sind diese Verläufe mit der Sauerstofffreisetzung aus Abbildung 2.3, wobei sich hier komplexere Muster ergeben, da nicht nur die Schritte der Sauerstofffreisetzung beobachtet werden.

7.2.2 Diskussion

Durch die Einführung des Probenwechslers konnte die Anzahl der Einzelmessungen bzw. Proben erheblich erhöht werden. Daraus resultiert ein sehr geringes Rauschniveau und, vielleicht sogar noch wichtiger, eine stabilere Grundlinie als bei den Messungen ohne Wechsler. Die Übergangsspektren zeigen eine bisher unerreichte Qualität sowohl bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnisses als auch der Auflösung. Die Reproduzierbarkeit der Übergangsspektren beim Durchschreiten mehrerer Zyklen wird in anderen Arbeitsgruppen nicht erreicht. Quantifiziert durch den Missparameter werden pro Übergang 4 % bis 12 % mehr Zentren zum Übergang angeregt als bei vergleichbaren Messungen aus der Literatur. Der Verlauf der Absorptionänderungen bei einzelnen Wellenzahlen zeigt deshalb eine klare Viereroszillation mit sehr geringer Dämpfung (siehe Abbildung 7.5). Fast alle Banden der Übergangsspektren können durch den Vergleich mit Literaturspektren zugeordnet werden. Dadurch wird auch die Ähnlichkeit des Aufbaus der Photosysteme verschiedener Organismen wie *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechocystis sp. PCC6803* und der von uns benutzten PSII-Membranfragmente aus Spinat deutlich. Mit der Berechnung des Missparameters war es wiederum möglich die idealen Übergangsspektren zu berechnen (siehe Abbildung 7.3). Die hohe Qualität der Messungen und die Möglichkeit, eine sehr große Anzahl an Proben mit dem Probenwechsler zu messen, bereiten den Weg für zeitaufgelöste FTIR Messungen.

7.2. ERGEBNISSE

Kapitel 8

Zeitaufgelöste Messungen an Mn-freien Proben

Um die Apparatur mittels zeitaufgelöster Rapid-Scan Messungen zu testen, wurden in Zusammenarbeit mit Joachim Buchta aus der AG-Dau an der Freien Universität Berlin Messungen an Photosystemen ohne Mangankomplex durchgeführt. Bei diesen Messungen findet nach der Blitzanregung die primäre Ladungstrennung statt, die in dem Radikalpaar $[Q_A^- Tyr_Z^+]$ endet. Da ohne Mn-Komplex eine Elektronenquelle fehlt, rekombinieren diese Zustände wieder mit einer Halbwertszeit von etwa 100 ms bei 22 °C. Damit kann diese Rekombination mittels der Rapid-Scan Technik untersucht werden. Direkt nach der Blitzanregung wird sowohl Q_A^- als auch Tyr_Z^+ gebildet und Banden sichtbar, die von den beiden Komponenten stammen. Dabei sind im Hinblick auf die Step-Scan Messungen an intakten Photosystemen vor allem die Tyr_Z^+ Banden von Interesse, da die Reduktion des Tyr_Z^+ an die Vorgänge am Mn-Komplex gekoppelt ist. In dieser Arbeit wird hauptsächlich auf die qualitativen Ergebnisse dieser Messung eingegangen. Ein Vergleich mit Messungen aus der Literatur liefert die Zuordnung der Banden zu Q_A^- und Tyr_Z^+ . Die Positionen dieser Banden zu kennen ist sehr wichtig für die Auswertung der Step-Scan Messungen. Die zeitaufgelösten Messungen lassen auch Rückschlüsse auf das Signal-Rausch Verhältnis der Messungen und die Funktionalität des Aufbaus und der Messmethodik zu. Eine genauere kinetische Auswertung wird in der Dissertation von Joachim Buchta nachzulesen sein [Buchta,].

8.1 Probenpräparation und Messprotokoll

Das Entfernen des Mangan Komplexes wurde von Joachim Buchta nach [Allakhverdiev et al., 1994] vorgenommen, mit dem Unterschied, dass der Waschschrift mit dem Tris-Puffer bei pH 9 anstatt pH 8 durchgeführt wurde. Dadurch wird der Mn-Komplex effektiver entfernt. Vor der Messung wurden die Proben auf den entsprechenden pH-Wert gebracht und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 50000 g zentrifugiert. Die weiteren Schritte der Probenpräparation für die Messung und der Ermittlung der guten Probenpunkte können den Kapiteln 9.1.2 und 9.1.3 entnommen werden, wobei jedoch bei diesen Proben kein Vorblitz appliziert wird. Die Absorption der Proben in der Amid I Region wurde auf eins eingestellt.

8.2 Messparameter

8.2.1 Einstellungen des Spektrometers

Auflösung

Die spektrale Auflösung der Messung wird durch die Breite des Interferogrammes bestimmt. Die Breite entspricht wiederum der maximalen Auslenkung des beweglichen Spiegels des Interferometers. Deshalb ist die zeitliche Auflösung mit der spektralen Auflösung gekoppelt. Je höher die Zeitauflösung gewählt wird, desto geringer ist die spektrale Auflösung, da eine schnelle Rapid-Scan Messung einen kleinen Spiegelweg voraussetzt. Um einen Kompromiss zwischen akzeptabler zeitlicher und spektraler Auflösung einzugehen wurde eine Auflösung von 8 cm^{-1} gewählt.

Spiegelgeschwindigkeit und Aufnahmemodus

Um die maximale Zeitauflösung zu erhalten wurde mit der maximalen Spiegelgeschwindigkeit gemessen. Diese entspricht $5 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$ oder einer Frequenz von 160 kHz wenn die Anzahl der Nulldurchgänge des HeNe Lasersignals gemessen wird. Das Interferogramm wurde beidseitig und bei der Vor- und Rückwärtsbewegung des Spiegels aufgenommen. Um die Zeitauflösung zu maximieren wurden die Interferogramme halbiert und die Vor- und Rückwärtsbewegung getrennt.

Frequenzbereich und elektronische Filter

Die Abtastfrequenz wurde so gewählt, dass ein Wellenzahlbereich von 0 cm^{-1} - 2257 cm^{-1} abgedeckt wird. Um hochfrequente Störungen zu minimieren wurde ein 20 kHz Tiefpassfilter benutzt.

Parameter der Fouriertransformation

Da die Interferogramme aufgespalten werden, ist eine Phasenkorrektur notwendig. Sie erfolgte durch den Mertz Algorithmus (siehe Kapitel 3.2.5). Durch das Anhängen von Nullen wurden 3 zusätzliche Interpolationspunkte in das Spektrum eingefügt. Um eine möglichst hohe und genaue spektrale Auflösung zu erhalten wurde auf den Einsatz einer Apodisationsfunktion verzichtet.

Zeitauflösung

Die Zeitauflösung entspricht der maximalen Zeitauflösung von 77 ms bei 8 cm^{-1} Auflösung.

8.2.2 Weitere Parameter

Temperatur

Um Abhängigkeiten der Rekombinationsvorgänge von der Temperatur zu untersuchen wurden Messungen bei 22 °C und 10 °C durchgeführt. Die Temperatur wurde durch die Peltierelemente geregelt.

pH-Wert

Auch die Abhängigkeit der Rekombinationsvorgänge vom pH-Wert wurde mit einem pH-Wert von 6,2 und 8 untersucht.

Blitzfrequenz

Die Datenaufnahme erfolgte 1,5 Sekunden vor dem Blitz und 10 Sekunden nach dem Blitz (siehe Abbildung 8.1). Durch die sehr hohe Anzahl an Proben betrug die Zeit zwischen zwei Anregungen derselben Probe etwa 2 Stunden. Die Proben wurden höchstens zweimal angeregt.



Abbildung 8.1: Blitzprotokoll der zeitaufgelösten Rapid-Scan-Messung. Jede Probe wurde höchstens zweimal beblitzt, mit einer minimalen Pause von 2 Stunden.

Anzahl der Messungen

Für jede gemittelte Messung bei den einzelnen Temperaturen und pH-Werten wurden 500 Einzelproben vermessen. Für höchste Zeitauflösung wurden hier die Vor- und Rückwärtsbewegung des Spiegels getrennt und die doppelseitigen Interferogramme aufgespalten.

8.3 Ergebnisse

Als Dunkelspektrum wurden die Spektren vor der Laserblitzapplikation gemittelt und somit Differenzspektren berechnet. Die Spektren wurden durch Singulärwertzerlegung rauschreduziert (siehe Kapitel 9.4). In den Abbildungen 8.2 und 8.3 sind dreidimensionale Zeitverläufe für den Wellenzahlbereich von 1400 cm^{-1} bis 1512 cm^{-1} bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ zu sehen. Die Rekombination des Radikalpaares $[Q_A^- \text{ Tyr}_Z^+]$ zeigt, wie nach der Arrhenius-Gleichung zu erwarten ist, eine Temperaturabhängigkeit. Der pH-Effekt ist jedoch deutlich stärker. In den Abbildungen 8.5 und 8.6 sind Zeitverläufe bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von 8 bzw. 6,2 zu sehen. Proben mit einem pH-Wert von 6,2 weisen eine deutlich schnellere Rekombination des Radikalpaars auf als mit einem pH-Wert von 8. Bei Mn-freien Proben kommt es zu einer Protonenfreisetzung nach der Oxidation des Tyr_Z , deren Zeitkonstante und Menge pro PSII ebenfalls pH-abhängig ist [Rappaport und Lavergne, 1997, Renger und Voelkner, 1982, Förster und Junge, 1984]. Diese Protonenfreisetzung hängt direkt mit der pH-Abhängigkeit der Zeitkonstante der Rekombination des Radikalpaares zusammen. Es wird angenommen, dass durch die Oxidation des Tyr_Z der pK-Wert einer nahen, protonierten Gruppe abgesenkt wird, sodass eine Deprotonierung eintritt. Die deprotonierte Gruppe wiederum beeinflusst durch Coulombwechselwirkung die Energielücke der Gibbs freien Energie zwischen den beiden Zuständen $\text{Tyr}_Z^{\text{Ox}}/\text{P}_{680}$ und $\text{Tyr}_Z/\text{P}_{680}^+$

und beeinflusst somit den Rekombinationsvorgang des Radikalpaares $[Q_A^- Tyr_Z^+]$. Der Grad der Deprotonierung der Gruppe im Ensemble der PSII hängt vom pH-Wert der Probe ab und steigt mit zunehmendem pH-Wert. Mit der Oxidation des Tyr_Z geht wahrscheinlich auch eine Deprotonierung des Tyr_Z einher, wobei das Proton, gebunden über eine Wasserstoffbrücke, in der Nähe des Tyrosins bleibt und nach Reduktion des Tyrosins wieder an das Tyr_Z bindet [Junge et al., 2002, Ahlbrink et al., 1998, Mamedov et al., 1998, Hays et al., 1998]. Der Akzeptor dieses Protons ist wahrscheinlich ein Stickstoff am Histidin_{D1-190}. Somit wird nach der Oxidation des Tyr_Z der Komplex $[Tyr_Z^\bullet - O \cdots H - N - His_{D1-190}]^+$ gebildet. Die eigentliche Protonenfreisetzung erfolgt wahrscheinlich ebenfalls durch dieses Histidin_{D1-190}, von dem Pyridin Stickstoff [Rappaport und Lavergne, 1997, Rappaport und Lavergne, 2001]. Es wird außerdem angenommen, dass es zu der Rekombination des Radikalpaares einen konkurrierenden Prozess gibt, bei dem das Tyr_Z durch einen weiteren Elektronendonator reduziert wird [Babcock und K.Sauer, 1975, Yerkes et al., 1983, Dekker et al., 1984, Rappaport und Lavergne, 1997]. Ein Anhaltspunkt der diese Annahme bestätigen könnte ist, dass bei einigen Proben ein signifikanter Anteil des gebildeten Q_A^- nicht vollständig verschwindet, sondern auch noch nach über 10 Sekunden erhalten bleibt (siehe Abbildung 8.6). Bei allen Proben verbleibt zumindest ein kleiner Anteil des Q_A^- nach der Messzeit, wobei eine genaue Trennung in einen zweiphasigen Zeitverlauf beim Q_A^- und einen einphasigen Zeitverlauf beim Tyr_Z^+ , wie er bei [Rappaport und Lavergne, 1997] gezeigt wird, nicht bestätigt werden kann. Die Identität des potentiellen Elektronendonors ist nicht eindeutig geklärt [Rappaport und Lavergne, 1997]. Ausgeschlossen wird das Cytochrome b_{559} , da keine gekoppelte Oxidation nachgewiesen werden konnte [Buser et al., 1990]. [Yerkes et al., 1983, Dekker et al., 1984] vermuteten in der reduzierten Form des zugesetzten Elektronenakzeptors den Elektronendonator. Doch sowohl die Messungen von [Rappaport und Lavergne, 1997], als auch die hier vorliegenden Ergebnisse, die ohne Elektronenakzeptor gewonnen wurden, widerlegen diese Vermutung. Ein möglicher Donor könnte ein verbliebenes Manganatom im PSII sein, das dem Waschschrift mit dem Tris-Puffer widersteht [Kuwabara und Murata, 1983, Rappaport und Lavergne, 1997]. Da der Anteil des verbleibenden Q_A^- bei meinen Messungen von der Probe abhängt, wird diese Vermutung gestützt. Ein weiterer Kandidat ist das Chl_Z , dem eine Absorptionsbande bei 430 nm zugeordnet werden könnte, die Änderungen während der Tyr_Z -Reduktion aufweist [Thompson und Brudvig, 1988].

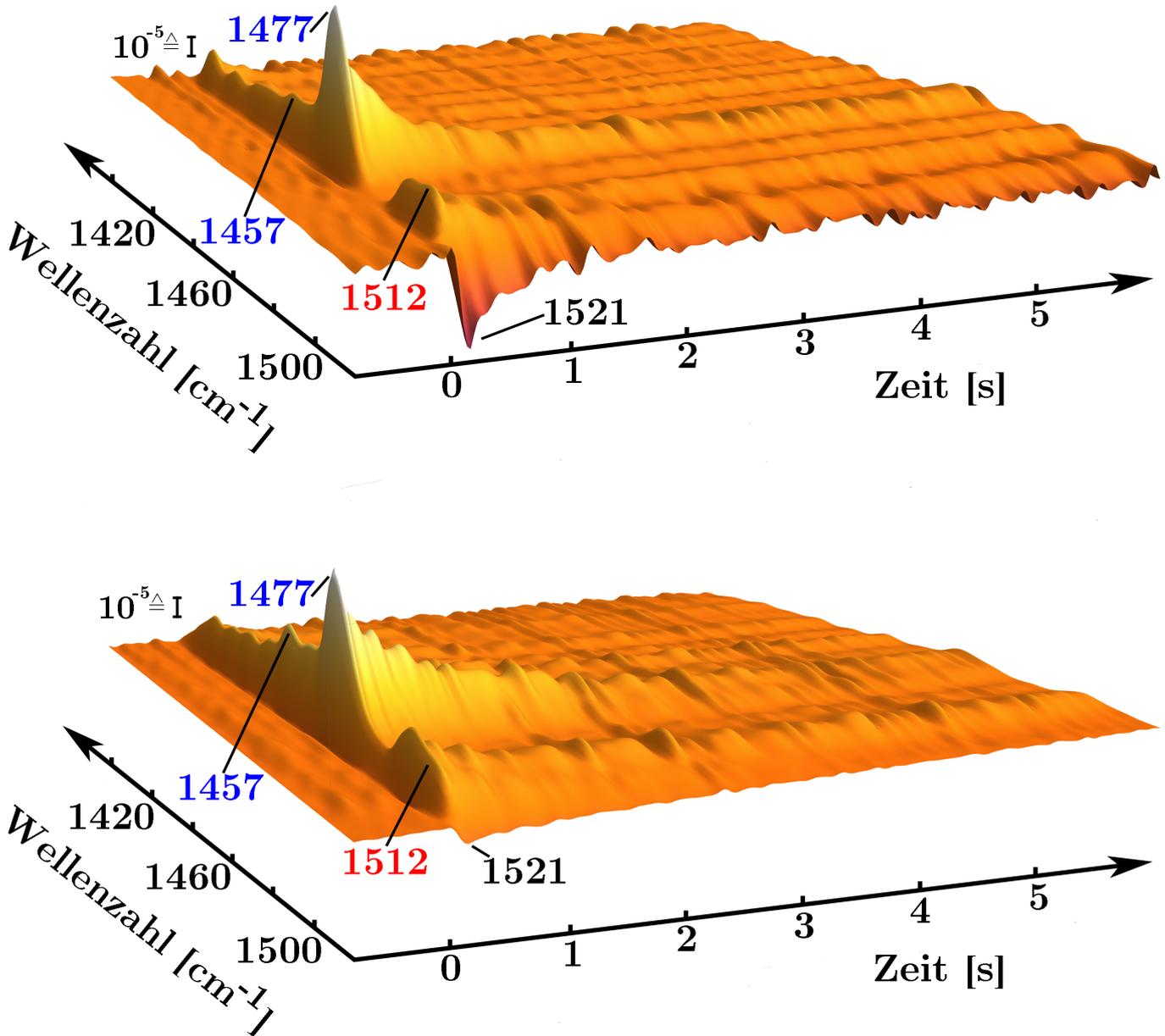


Abbildung 8.2: Zeitverläufe der Wellenzahlen von 1400 cm^{-1} bis 1512 cm^{-1} bei 22 °C und einem pH von 6,2 (oben) und einem pH von 8 (unten). Bei pH 8 ist im Vergleich zu pH 6,2 die Rekombination deutlich verlangsamt. In diesem Wellenzahlbereich liegt neben anderen starken Banden die stärkste Absorptionsbande des Q_A bei 1477 cm^{-1} . Es gibt Banden die dem Q_A zugeordnet werden können (blau) und eine Bande (1512 cm^{-1}) die dem Tyr_Z zugeordnet werden kann (rot). 1521 cm^{-1} kann nicht eindeutig zugeordnet werden.

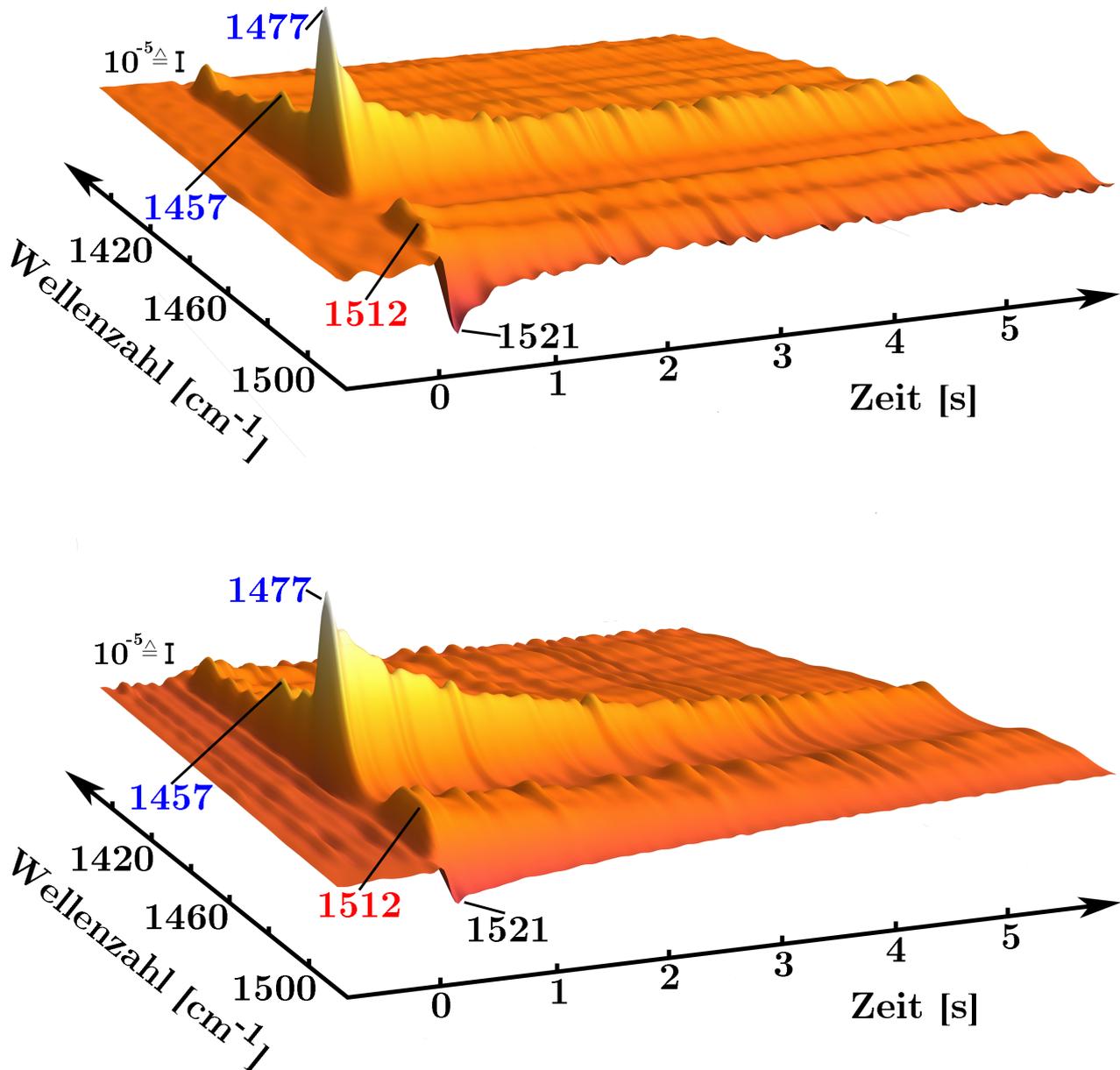


Abbildung 8.3: Zeitverläufe der Wellenzahlen von 1400 cm⁻¹ bis 1512 cm⁻¹ bei 10 °C und einem pH von 6,2 (oben) und einem pH von 8 (unten). Im Vergleich zu den Messungen bei 22°C, ist die Rekombination etwas langsamer. In dem dargestellten Wellenzahlbereich liegt neben anderen starken Banden die stärkste Absorptionsbande des Q_A bei 1477 cm⁻¹. Es gibt Banden die dem Q_A zugeordnet werden können (blau) und eine Bande (1512 cm⁻¹) die dem Tyr_Z zugeordnet werden kann (rot). 1521 cm⁻¹ kann nicht eindeutig zugeordnet werden.

8.3.1 Bandenzuordnung

Durch einen Vergleich mit Literaturspektren, die reine Q_A und Tyr_Z Spektren zeigen, lassen sich die Banden der Mn-freien Probe zuordnen (siehe Abbildung 8.4). Eine Zusammenfassung der Banden im Vergleich zur Literatur und deren Zuordnung zu einzelnen Komponenten des PSII kann den Tabellen 8.1 und 8.2 entnommen werden.

Q_A

Reine Spektren der Änderung am Chinon Q_A , also Q_A^-/Q_A Differenzspektren, können aus Mn-freien PSII-Proben gewonnen werden. Durch die Zugabe des Inhibitors DCMU wird der $Q_A - Q_B$ Elektronentransfer blockiert. Nach Blitzanregung wird aber auch der primäre Donor, das P680, oxidiert, sodass $P680^+$ gebildet wird. Dessen Reduktion kann durch einen Elektronendonator, wie z.B. Hydroxylamin, bewerkstelligt werden [Berthomieu et al., 1990], [Berthomieu et al., 1992], [Noguchi et al., 1992], [Remy et al., 2004] und [Zhang et al., 1997].

Tyr_Z

Differenzspektren von Tyr_Z^+/Tyr_Z können ebenfalls aus Mn-freien PSII-Proben gewonnen werden. Es wird ein Elektronenakzeptor wie z.B. Ferrocyanid zugesetzt, um eine Tyr_Z^+/Q_A^- Rekombination zu verhindern. Um Q_A^-/Q_A Beiträge zu vermeiden wird erst eine Sekunde nach Blitzanregung gemessen, da dann alle vorhandenen Q_A^- durch den Elektronenakzeptor zu Q_A oxidiert wurden [Berthomieu et al., 1998].

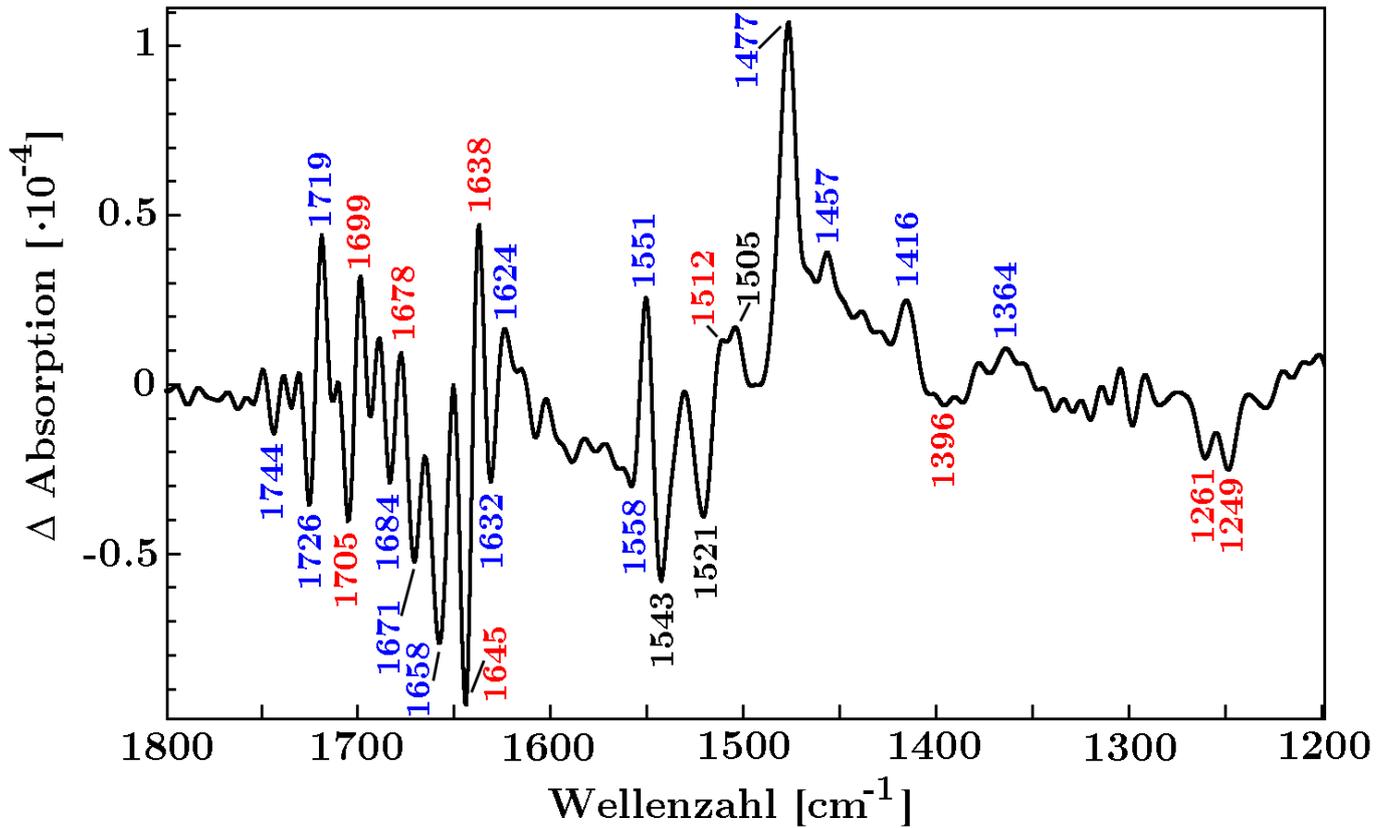


Abbildung 8.4: Differenzspektrum der blitzinduzierten FTIR Rapid-Scan Messung nach 77 ms. Es gibt Banden, die dem Q_A zugeordnet werden können (blau), und einige Banden, die dem Tyr_Z zugeordnet werden können (rot). Einige Banden können nicht eindeutig zugeordnet werden (schwarz).

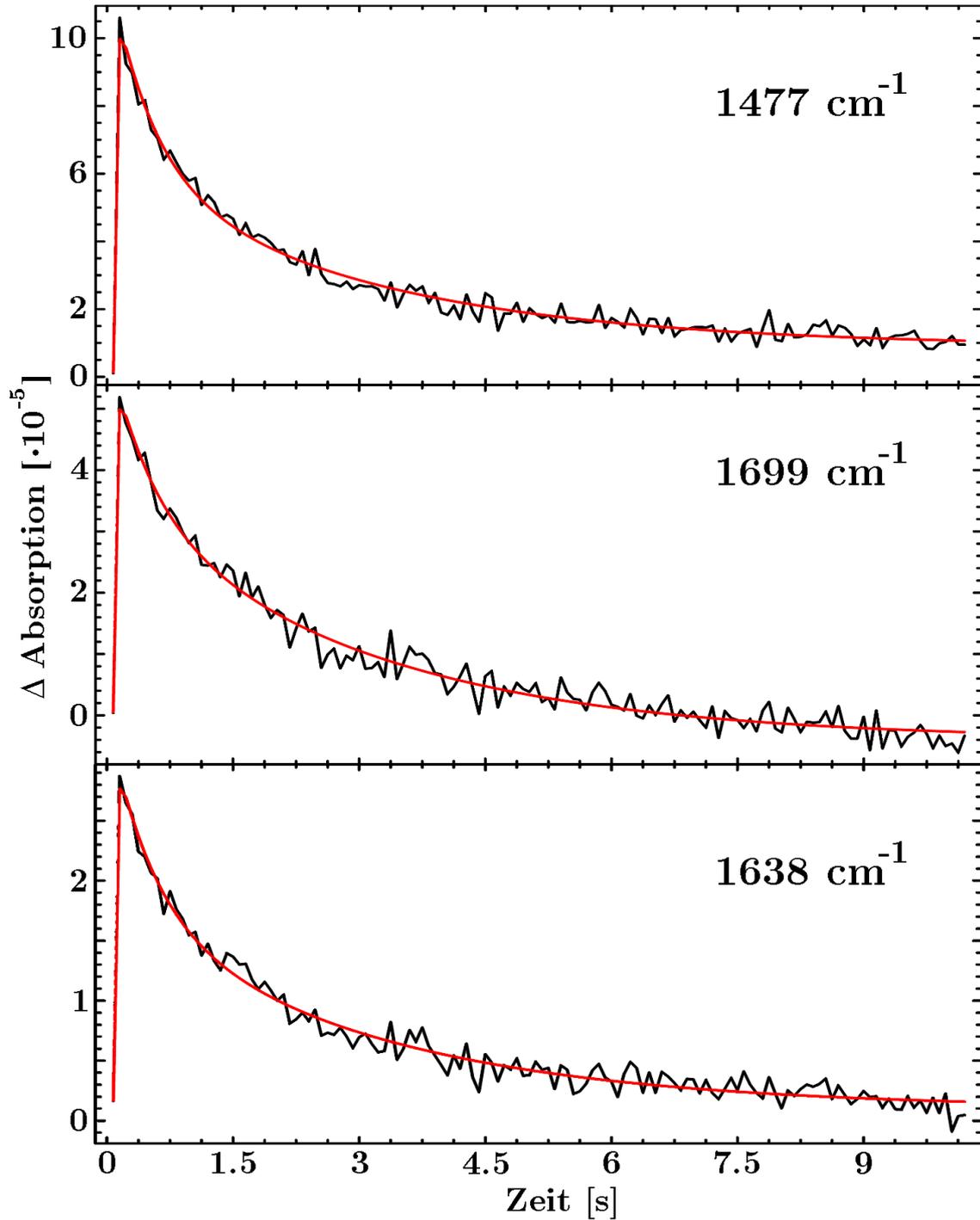


Abbildung 8.5: Zeitverläufe dreier Wellenzahlen der blitzinduzierten FTIR Rapid-Scan Messung bei einem pH-Wert von 8 und 10 °C (schwarz). Die Wellenzahl 1477 cm^{-1} kann dem reduzierten Q_A zugeordnet werden, die beiden anderen Wellenzahlen stammen vom oxidierten Tyr_Z . In rot ist eine globale Simulation mit den Zeitkonstanten 25 ms (Anstieg), 526 ms und 3070 ms zu sehen.

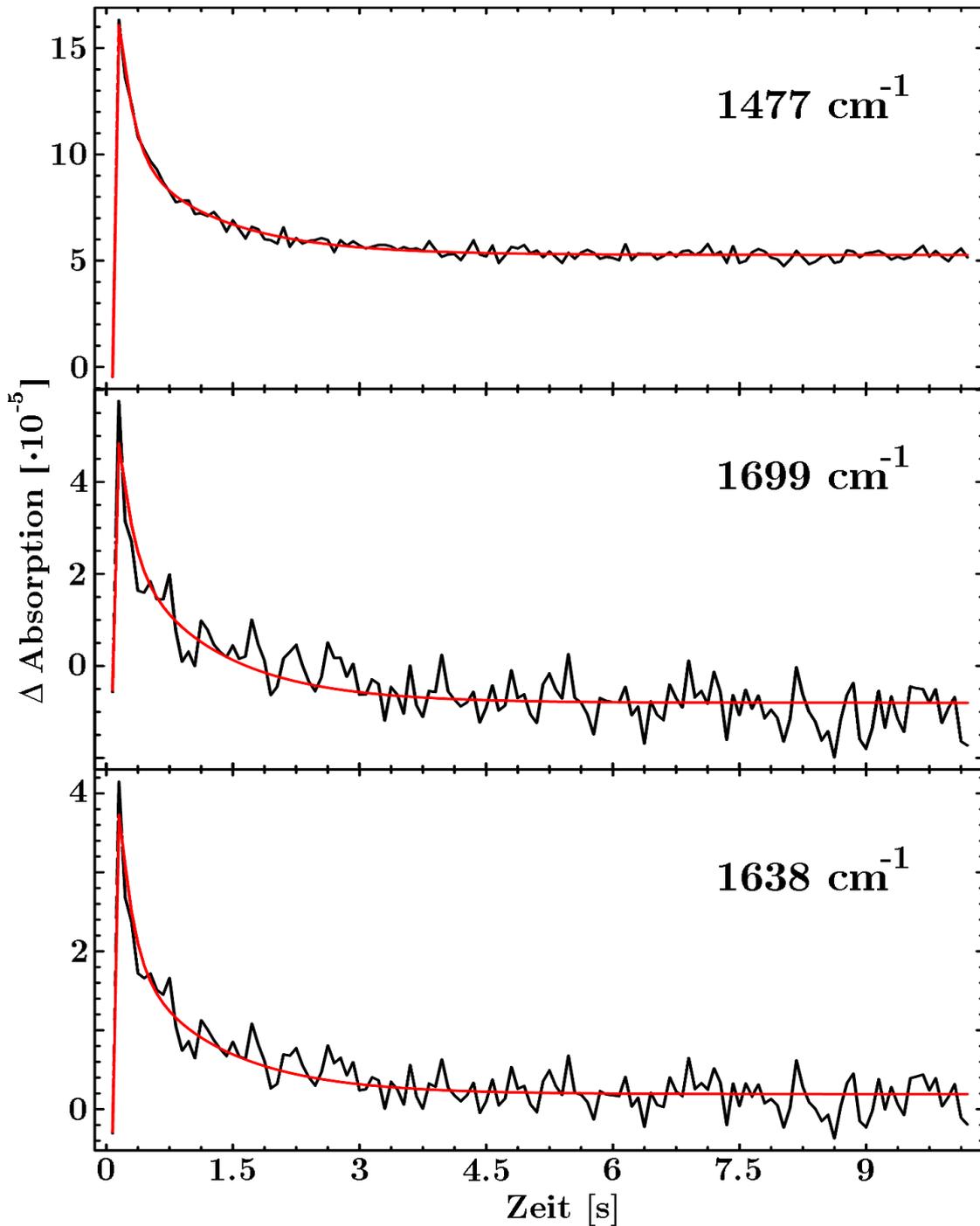


Abbildung 8.6: Zeitverläufe dreier Wellenzahlen der blitzinduzierten FTIR Rapid-Scan Messung bei einem pH-Wert von 6 und 10 °C (schwarz). In rot ist eine globale Simulation mit den Zeitkonstanten 25 ms (Anstieg), 160 ms und 1109 ms zu sehen. Im Vergleich zu pH 8 (siehe Abbildung 8.5) wird die viel schnellere Rekombination des Radikalpaares deutlich, deren pH-Abhängigkeit auf Deprotonierungsreaktionen im Umfeld des Tyr_Z zurückzuführen ist. Der auffällige Rest des Q_A⁻ bei der Wellenzahl 1477 cm⁻¹ könnte durch eine alternative Reduktion des Tyr_Z verursacht werden.

8.3. ERGEBNISSE

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	Referenz
1744 (-)	1744 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1726 (-)	1725 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1719 (+)	1720 (+)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1705 (-)	1706 (-)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1699 (+)	1700 (+)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1684 (-)	1682 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1678 (+)	1679 (+)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1671 (-)	1672 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1658 (-)	1657 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1645 (-)	1644 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
	1646 (-)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1638 (+)	1639 (+)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1632 (-)	1632 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1624 (+)	1625 (+)	Q _A	[Hienerwadel et al., 1996]
1558 (-)	1560 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
1551 (+)	1550 (+)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
	1552 (+)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1543 (-)	1542 (-)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
	1542 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1998]
1521 (-)	1520 (-)	Q _A	[Berthomieu et al., 1992]
	1519 (-)	Q _A	[Remy et al., 2004]
	1523 (-)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]
1512 (+)	1513 (+)	Tyr _Z	[Berthomieu et al., 1998]

Tabelle 8.1: Vergleich der gemessenen Banden mit Literaturdaten der Mn-freien Proben

Diese Arbeit	Literatur	Zuordnung	Referenz
	1478 (+)	Q_A	[Berthomieu et al., 1992]
	1477 (+)	Q_A	[Zhang et al., 1997]
1477 (+)	1478 (+)	Q_A	[Berthomieu et al., 1990]
	1478 (+)	Q_A	[Noguchi et al., 1992]
	1478 (+)	Q_A	[Hienerwadel et al., 1996]
	1478 (+)	Q_A	[Remy et al., 2004]
	1456 (+)	Q_A	[Hienerwadel et al., 1996]
1457 (+)	1458 (+)	Q_A	[Berthomieu et al., 1990]
	1458 (+)	Q_A	[Noguchi et al., 1992]
1416 (+)	1417 (+)	Q_A	[Berthomieu et al., 1992]
1396 (-)	1399 (-)	Tyr_Z	[Berthomieu et al., 1998]
	1365 (+)	Q_A	[Berthomieu et al., 1992]
1364 (+)	1365 (+)	Q_A	[Noguchi et al., 1992]
1261 (-)	~ 1260 (-)	Tyr_Z	[Berthomieu et al., 1992]
1249 (-)	1252 (-)	Tyr_Z	[Berthomieu et al., 1998]

Tabelle 8.2: Vergleich der gemessenen Banden mit Literaturdaten der Mn-freien Proben (Fortsetzung)

8.3.2 Diskussion

Nach Lichtanregung von Mn-freien Proben wird das Radikalpaar $[Q_A^- Tyr_Z^+]$ gebildet, welches mit einer Zeitkonstanten im ms-Bereich rekombiniert. Dieser Vorgang lässt sich somit noch gut mit dem Rapid-Scan Modus untersuchen. Bei nur 500 gemessenen Proben zeigen diese ersten zeitaufgelösten Messungen ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Dies ist ein weiteres Indiz, dass unser Aufbau für die angestrebten, anspruchsvollen Step-Scan Messungen geeignet ist.

Um eine Interpretation dieser kommenden Messungen zu erleichtern, kann die in der Literatur getroffene Zuordnung der Banden zweier wichtiger Komponenten des PSII überprüft werden. Das ist zum einen das Q_A auf der Akzeptorseite und zum anderen das Tyr_Z auf der Donorseite des PSII. Die Literaturspektren konnten gut reproduziert und somit eine Zuordnung der wichtigen Banden des Q_A und Tyr_Z getroffen werden. Für die Step-Scan Messungen sind die Banden des Tyr_Z von besonderem Interesse. In intakten Photosystemen ist seine Reduktion an Vorgänge am Mn-Komplex gekoppelt. Es ist daher ein Sensor für Prozesse, die dort stattfinden. Die in der Literatur ausführlich beschriebene pH-Abhängigkeit des Rekombinationsvorganges konnte bestätigt werden. Indizien für den ebenfalls in der Literatur beschriebenen, zur Rekombination konkurrierenden Prozess, bei dem das Tyr_Z^+ durch einen alternativen Donor reduziert wird, spiegeln sich ebenfalls in den Spektren wider.

Kapitel 9

Step-Scan Messungen

9.1 Probenpräparation und Messprotokoll

Um die Proben möglichst effektiv, schnell und schonend anzufertigen und zu messen wurde ein spezielles Protokoll entwickelt.

9.1.1 Vorbereitungen

- Zuerst wird die Zentrifuge auf 0 °C vorgekühlt und 18 ml PSII Membranfragmente aus dem -80 °C Kühlschrank zum Auftauen auf Eis gelegt. Ebenso wird der tiefgefrorene Elektronenakzeptor aufgetaut.
- Alle Werkzeuge für die Probenpräparation wie Zentrifugenröhrchen, Schaber, Uhrgläser, die Scheibenhalter des Probenerstellers und die CaF₂-Scheiben selbst, werden auf Eis gekühlt um die Proben möglichst wenig zu schädigen.
- Der Detektor wird durch das Steuerungsprogramm mit flüssigem Stickstoff befüllt.
- Das Programm „STEP“ des Pulsgenerators wird geladen. Dieses Programm ermöglicht das Starten des Schrittmotors im Probenersteller.
- Der Luftdruck für den Probenersteller wird auf 0.8 bar Überdruck eingestellt. Der Druck ist abhängig von der gewünschten Schichtdicke. Für dünnere Schichten wird der Druck tendenziell erhöht (~ 1 bar Überdruck).
- Die Spülung des Gehäuses mit trockener Luft wird auf 11 $\frac{1}{\text{min}}$ erhöht.

- Der Probenwechsler wird durch das Steuerungsprogramm auf die Position für den Einbau des Probenerstellers gefahren.
- Der Probenersteller wird in der Halterung arretiert und die Spannungsversorgung, Steuerungskabel und der Pneumatikschlauch werden angeschlossen.
- Nach mindestens 20 Minuten bei gutem Kontakt zum Eis werden die PSII Membranfragmente in die gekühlten Zentrifugenröhrchen gegeben und dann für 15 Minuten bei 0 °C und 50000 g zentrifugiert.

9.1.2 Probenpräparation

- Das Zentrifugat wird verworfen und das Sediment auf ein gekühltes Uhrglas gegeben. Jetzt erfolgt die Zugabe des Elektronenakzeptors PpbQ. Die Konzentration des Elektronenakzeptors beträgt $550 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$ in Bezug auf das ursprüngliche Probenvolumen vor dem Zentrifugieren. Die Probe wird sorgfältig unter Trockenluft und stetigem Rühren weiter getrocknet. Dieser Vorgang ist abhängig von der individuellen Probenpräparation und wird solange fortgeführt bis die Probe eine zähflüssige Konsistenz aufweist. Dann wird die Probe in ein vorgekühltes Eppendorf Gefäß gefüllt und auf Eis gelagert.
- Zwei CaF_2 -Scheiben ohne Probe werden in den Probenersteller geladen und eine Rapid-Scan Hintergrundmessung mit 4 cm^{-1} wird durchgeführt
- Etwas Probe wird auf eine gekühlte CaF_2 -Scheibe gegeben und mit einer weiteren Scheibe abgedeckt. Die beiden Scheiben werden in den Probenersteller geladen. Jetzt wird der Pneumatikzylinder aktiviert, der die Scheiben zusammenpresst. Eine Rapid-Scan Messung wird gestartet, die laufend die aktuelle Absorption in der Amid I oder Amid II Region anzeigt. Jetzt kann der Schrittmotor des Probenerstellers aktiviert werden. Wenn die gewünschte Absorption eingestellt ist, wird der Schrittmotor abgestellt, der Pneumatikzylinder entlüftet und die Probe kann entnommen werden. Für die Step-Scan Messungen wurde eine Absorption von 0.8 bei der Amid II Region eingestellt.
- Eventuell am Scheibenrand überstehende Probe wird entfernt und die Verbindungsstelle der beiden Scheiben mit ausreichend schwerem Vakuumfett bestrichen um ein Austrocknen der Probe zu vermeiden.

- Die fertige Probe wird auf Eis gelagert.
- Die letzten drei Punkte werden so lange wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Proben produziert ist.

9.1.3 Ermitteln der guten Probenpunkte

- Jetzt kann der Probenersteller ausgebaut werden und der durch die Peltierelemente auf 2 °C gekühlte Probenwechsler kann unter Benutzung des speziellen Ladewerkzeugs mit den Proben bestückt werden.
- Das Gehäuse wird nun geschlossen und die Peltierkühlung auf -5 °C reduziert.
- Die Membranvakuumpumpe wird an das Gehäuse angeschlossen und gestartet. Sie zieht etwas weniger Luft als das Trockenluftgerät in das Gehäuse pumpt um keine Außenluft einzusaugen und gewährleistet eine schnellere Entfernung der feuchten Luft im Gehäuse als ohne Pumpe.
- Der Laser wird gestartet und mit einer Frequenz von 10 Hz aufgewärmt.
- Nach einer Wartezeit von mindestens 45 Minuten wird wieder zuerst eine Hintergrundmessung an den internen CaF₂-Scheiben ohne Probe durchgeführt.
- Dann wird eine kurze Rapid-Scan Messung an allen Probenpunkten der bestückten Plätze des Probenwechslers gestartet. Die Probenpunkte werden automatisch angefahren.
- Bei jedem Probenpunkt wird ein Laserblitz ausgelöst um Photosysteme, die sich eventuell im S0-Zustand befinden, in den S1-Zustand zu bringen.
- Aus dieser Messung werden vom Steuerungsprogramm die guten Probenpunkte mit der gewünschten Absorption ermittelt. Für die Step-Scan Messungen beträgt die gewünschte Absorption $0,8 \pm 0,2$.

9.1.4 Beginn der Messung

Messung des Dunkelspektrums

Nach vier Stunden ist das Feuchtigkeitsniveau der Luft gering genug für die Step-Scan Messungen.

- Der Detektor wird erneut mit flüssigem Stickstoff befüllt.
- Die Membranpumpe wird entfernt und die Trockengasspülung auf $2 \frac{1}{\text{min}}$ reduziert.
- Die Temperatur des Probenwechslers wird auf $10 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht.
- Es werden drei gute Probenpunkte ausgewählt und pro Punkt eine Step-Scan Messung ohne Auslösen der Photoreaktion mit 1000 Zeitpunkten durchgeführt.
- Es wird über alle Zeitpunkte und alle drei Proben gemittelt um das Dunkelinterferogramm zu erhalten.

Beginn der Step-Scan Messung

- Das Messprogramm des Pulsgenerators wird aktiviert.

Jetzt kann die eigentliche Step-Scan Messung gestartet werden.

9.2 Messparameter

Die Interferogrammzeitverläufe wurden mit der „Opus“ Software von Bruker aufgenommen.

9.2.1 Einstellungen des Spektrometers

Auflösung

Für die Messung wurde eine Auflösung von 10 cm^{-1} genutzt um einerseits eine akzeptable Auflösung zu gewährleisten und andererseits die Anzahl der benötigten Proben pro Interferogramm so niedrig wie möglich zu halten.

Frequenzbereich

Die Infrarotfilter gewähren eine effektive Bandbreitenbegrenzung. Dies erlaubt die Abtastrate des Signals nach dem Abtasttheorem zu verringern, wodurch die Anzahl an Proben pro Interferogramm weiter reduziert werden konnte. Der für die Messung genutzte Frequenzbereich lag zwischen $1974,84 \text{ cm}^{-1}$ und $987,42 \text{ cm}^{-1}$. Dass bei diesem Frequenzbereich keine Aliasingfrequenzen entstehen, wurde auch

durch Rapid-Scan Messungen der stationären Zustände bei diesem Frequenzbereich getestet (siehe Abbildung 9.1). Der Vergleich mit den Messungen der stationären Zustände aus Kapitel 7, die mit einem großen Frequenzbereich gemessen wurden, zeigen das keine zusätzliche Aliasingbanden entstehen.

Anzahl der Interferogramm- und Zeitpunkte

Das Interferogramm wurde doppelseitig gemessen. Die Anzahl der Interferogrammpunkte ist mit diesen Einstellungen 354 Punkte. Die Anzahl der Zeitpunkte wird von der Opus Software auf 30000 Punkte limitiert. Dies entspricht einem Zeitbereich von 375 ms, in dem vier Übergänge gemessen wurden.

Apertur

Die interne Apertur des Spektrometers wurde auf 3 mm reduziert. Bei dieser Einstellung ist ein realer Durchmesser von unter einem Millimeter im Messfokus, in dem sich die Probe befindet, noch gewährleistet.

Vorverstärker

Der interne Vorverstärker hat die Einstellungen Ref, A, B und C. Die Verstärkung von Stufe zu Stufe musste experimentell ermittelt werden und entspricht einem Faktor von 4. Für die Messungen wurde die Vorverstärkereinstellung A genutzt.

Abtastrate

Das Detektorsignal wurde mit der maximalen Frequenz von 80 kHz abgetastet. Dies entspricht einer Datenaufnahme alle 12.5 μ s.

Tiefpassfilter

Um Störungen im hochfrequenten Bereich zu eliminieren und das Signal zwischen den Abtastpunkten zu mitteln, wurde ein Tiefpassfilter mit einer Grenzfrequenz von 20 kHz ausgewählt. Ein Tiefpassfilter bewirkt eine Verzögerung der Anstiegszeit eines sich sprunghaft ändernden Signals. Da das Signal nur alle 12.5 μ s abgetastet wird, ist eine Anstiegszeit um diesen Größe vertretbar. Um die Anstiegszeit t_a von 10 % auf 90 % des Endsignals zu bestimmen, wird, wie bei einem Tiefpass bzw.

Kondensator üblich, ein exponentieller Anstieg des gemessenen Signals S_{Mess} auf die Sprunghöhe S_{Sprung} mit der Zeitkonstanten τ angenommen

$$S_{\text{Mess}}(t) = S_{\text{Sprung}}(1 - \exp^{-\frac{t}{\tau}}). \quad (9.1)$$

Nach Auflösen dieser Gleichung nach t kann die Anstiegszeit t_a mit den Zeitpunkten, bei denen das Signal 90 % und 10 % des Endsignals erreicht hat, berechnet werden:

$$t_a = t_{90\%} - t_{10\%} = \tau(\ln(0.9) - \ln(0.1)) \approx 2.2\tau \quad (9.2)$$

Die Zeitkonstante ergibt sich aus der Grenzfrequenz des Tiefpasses:

$$f_{\text{Grenz}} = \frac{1}{2\pi\tau} \quad (9.3)$$

Somit ist

$$t_a \approx \frac{1}{3f_{\text{Grenz}}}. \quad (9.4)$$

Die Anstiegszeit für einen 20 kHz Tiefpass ist also etwa 17 μs , was einem akzeptablen Wert entspricht.

DC-Kopplung

Die Messungen wurden im DC gekoppelten Modus durchgeführt um auch langsame Vorgänge im ms Bereich messen zu können.

9.2.2 Test der Aktivität der Proben

Für die Step-Scan-Messungen wird eine längere Wartezeit vor der Messung benötigt als bei den Messungen der stationären Zustände. Dies liegt zum einen daran, dass erheblich mehr Proben produziert und gemessen werden müssen und zum anderen wird eine längere Trocknungszeit der Probenkammer vor der Messung eingehalten um die Störungen durch Wasserdampf zu minimieren. Die Zeit von der Produktion bis zu Messung der Proben beträgt etwa sechs Stunden, wobei die Temperatur bei der Produktion 0 °C beträgt und bei der Trocknung des Probenraumes -5 °C. Um zu testen ob die lange Wartezeit zu signifikanten Schäden bei den Photosystemen führt, wurden Messungen der stationären Zustände mit Proben durchgeführt, die auf dieselbe Weise präpariert wurden wie die Step-Scan Proben. Auch die Warte-

und Messzeiten sowie die Messparameter (außer das Blitzprotokoll, das entspricht Kapitel 7.1.2) waren identisch zu den Step-Scan Messungen. Für den Test wurden 300 Proben mit 50 Scans pro Übergang gemessen. Somit ergeben sich 15000 Einzelscans pro Übergang. Der Vergleich mit den Messungen aus Kapitel 7 zeigt, dass die Proben noch ausreichend aktiv sind (siehe Abbildung 9.1). Der Missparameter ist dennoch leicht erhöht und ergibt sich zu 12 % (die Messungen der stationären Zustände mit dem Probenwechsler ergab einen Wert von 8.2 %). Daraus ist ersichtlich, dass es durch die lange Wartezeit vor der Messung zu einer leichten Abnahme der Aktivität kommt.

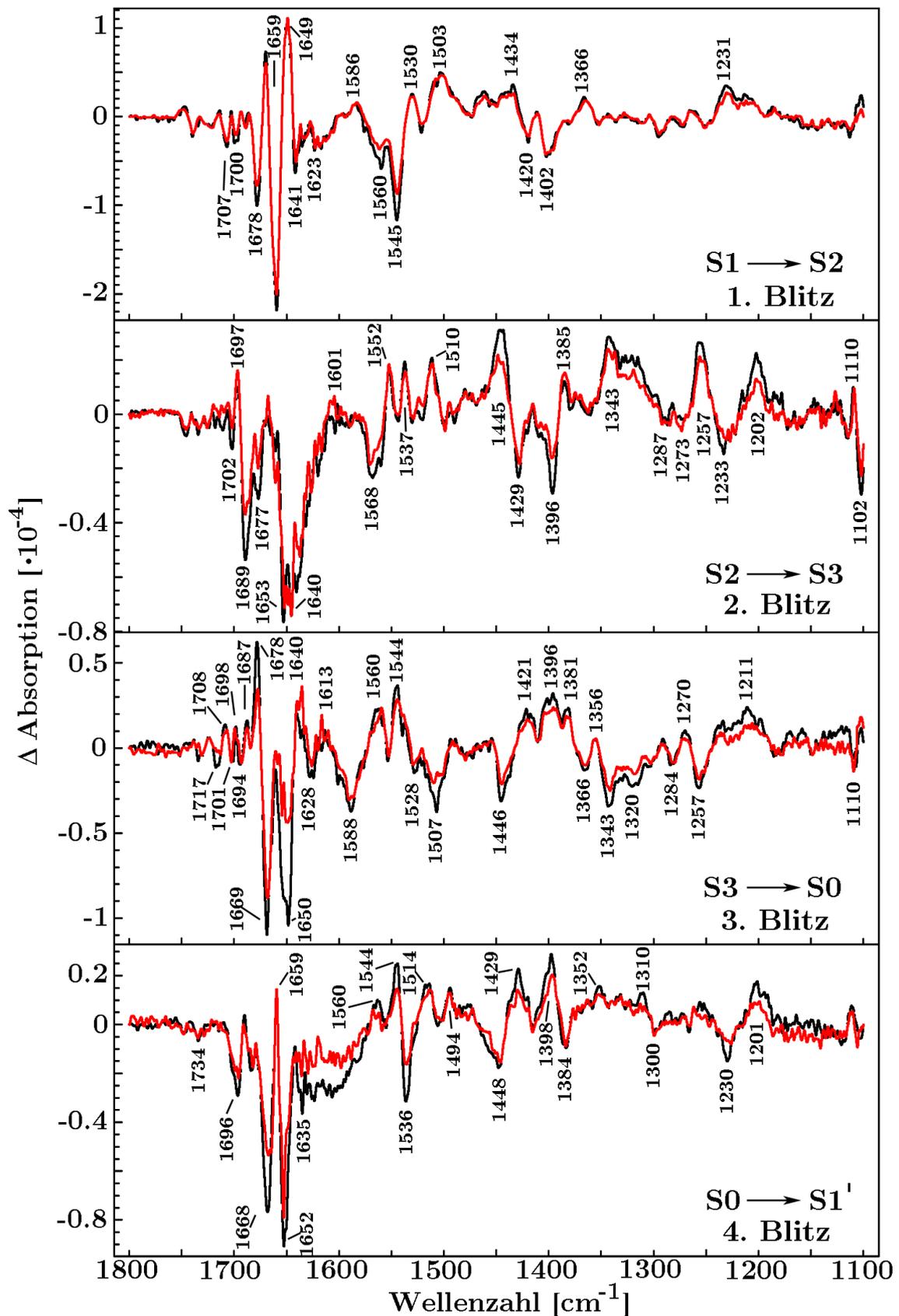


Abbildung 9.1: Der Vergleich der Rapid-Scan-Messungen aus Kapitel 7 (schwarz) mit Messungen der stationären Zustände mit Proben, die exakt die gleiche Präparation und Wartezeit vor der Messung sowie die gleichen Messparameter aufweisen wie die Proben der Step-Scan-Messungen (rot). Die große Übereinstimmung zeigt, dass die Proben noch eine hohe Aktivität aufweisen.

9.2.3 Blitzprotokoll

Die Datenaufnahmesoftware „Opus“ der Firma Bruker limitiert die Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte auf 30000. Dies entspricht bei einer Abtastrate von 80 kHz einer Aufnahmezeit von 375 ms. Diese Zeit wurde auf die vier S-Übergänge aufgeteilt, sodass genug Zeit bestand die Akzeptorseite durch den Elektronenakzeptor zu oxidieren. Damit ergaben sich für die ersten drei Übergänge eine Aufnahmezeit von 115 ms. Der vierte Übergang wurde wegen der limitierten Anzahl an Datenpunkten nur für 17.5 ms aufgenommen (siehe Abbildung 9.2). Vor dem ersten Laserblitz wurden der Gleichspannungsanteil des Signals und der Rauschpegel der Messung für 12.5 ms aufgenommen.

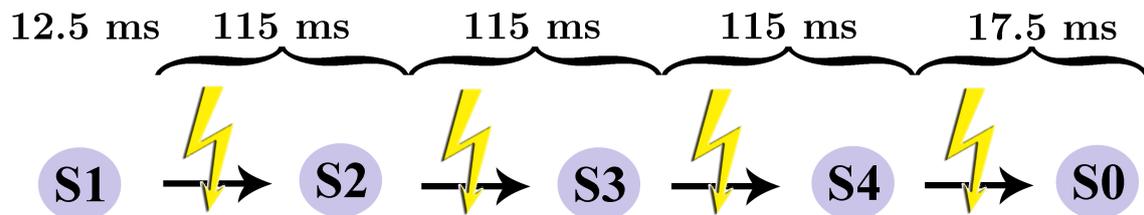


Abbildung 9.2: Blitzprotokoll der Step-Scan-Messungen. Jede Probe wurde einmal mit vier Blitzen belichtet.

9.2.4 Erhöhte Schichtdicke

Es wurde zuerst versucht analog zu den Rapid-Scan Messungen, mit einer Schichtdicke, die einer Absorption von 1 bei der Amid I Region entspricht, Step-Scan Messungen durchzuführen. Es zeigte sich, dass das Signal-Rausch Verhältnis zu klein war. Deshalb wurde die Schichtdicke erhöht. Sie wurde auf 0.8 in der Amid II Region eingestellt. Dies entspricht etwa einer Absorption von 1.6 in der Amid I Region. Die höhere Absorption bedingt aber eine Verringerung der Signalstärke in der Amid I Region, wodurch die Signale in diesem Bereich starkem Rauschen unterworfen sind. Bei der Auswertung der Daten wurde deshalb weitestgehend auf diesen Bereich verzichtet.

9.2.5 Anzahl der Messungen

Für die Step-Scan Messungen wurden insgesamt 174 komplette doppelseitige Messungen mit 354 Spiegelpositionen aufgenommen. Dies entspricht 61596 Einzelmessungen.

sungen bzw. frischen Probenpunkten.

9.3 Datenauswertung

Nach Aufnahme der Step-Scan Messungen von der Bruker Software „Opus“, wurden die Daten im ASCII Format gespeichert und von einer selbst geschriebenen Mathematica Software weiterverarbeitet. Der schematische Ablauf der Datenverarbeitung ist in Abbildung 9.3 zu sehen.

9.3.1 50 Hz Korrektur

An manchen Tagen weisen einige Zeitverläufe eine Schwankung um 50 Hz auf, die schon vor Applikation des ersten Laserblitzes vorhanden ist und sich ohne Phasensprünge durch die gesamte Messung über vier Laserblitze fortsetzt. Um dieses Messartefakt zu verringern, wurde an die einzelnen noch nicht gemittelten Zeitverläufe $D_{\nu t}$ eine Sinusschwinung simuliert, deren Amplitude, Phase und Frequenz am besten zu den Schwankungen passt. Es wird also eine kontinuierliche Sinusfunktion von den Daten abgezogen (siehe Abbildung 9.4). Das 50 Hz Rauschen konnte außerdem durch die Benutzung eines Trenntransformators zwischen dem Spektrometer und dem Stromnetz verringert werden.

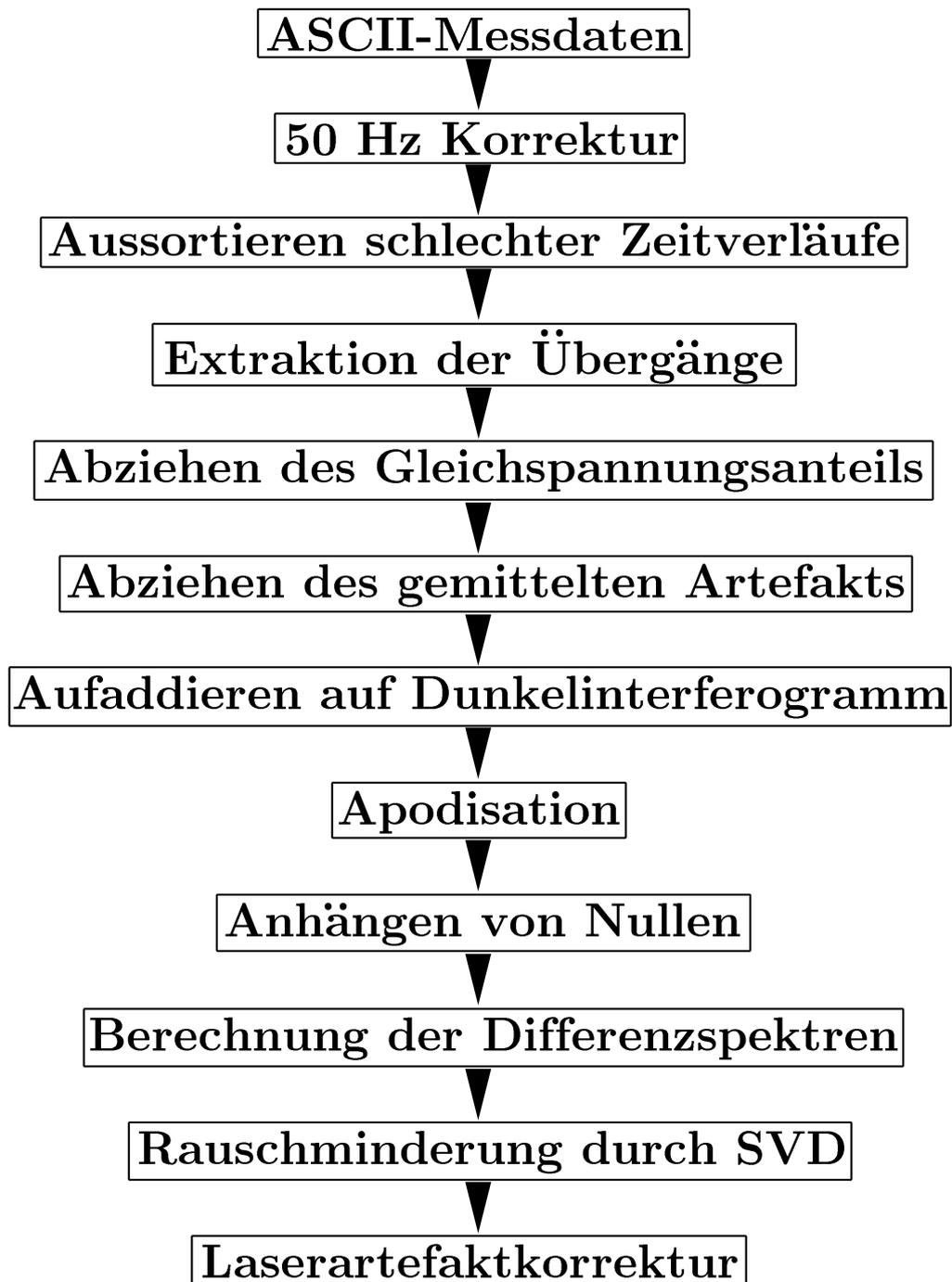


Abbildung 9.3: Schema der einzelnen Schritte der Datenauswertung

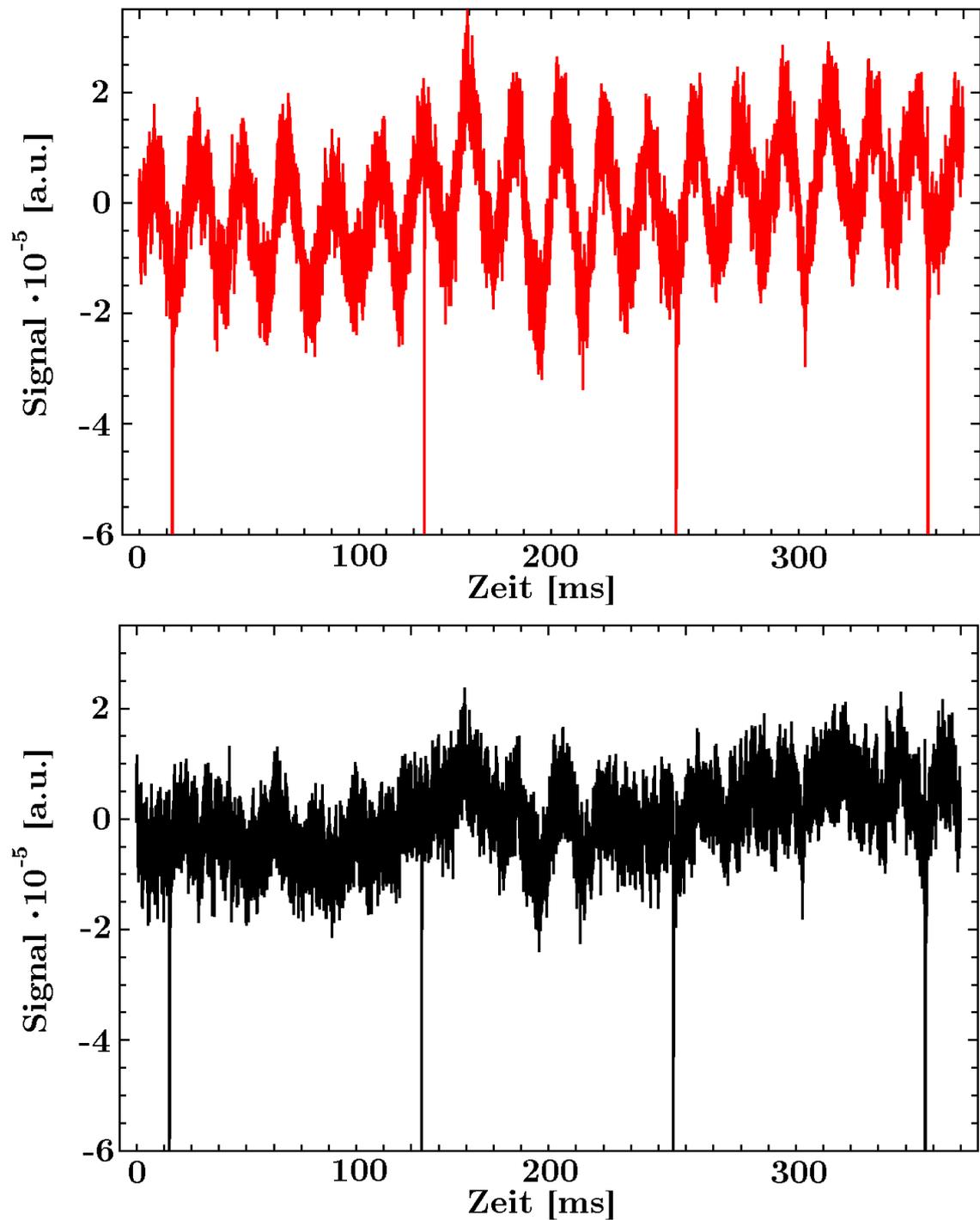


Abbildung 9.4: Der gesamte Zeitverlauf des Detektorsignals an einer Spiegelposition mit sehr starkem 50 Hz Rauschen (oben). Unten ist derselbe Zeitverlauf nach der 50 Hz Korrektur zu sehen.

9.3.2 Aussortieren von Zeitverläufen mit Messfehlern

Immer wieder sind einzelne Zeitverläufe stark gestört. Solche Störungen sind

- starke Drifts des Signals, die z.B. von Temperaturschwankungen stammen könnten.
- Große Schwankungen, die sich nicht durch den ganzen Zeitverlauf fortsetzen. Diese stammen wahrscheinlich von Vibrationen der Umgebung. Solche Signale können sogar von Personen verursacht werden, die am Labor vorbeigehen, oder von Tätigkeiten in benachbarten Räumen. Deshalb wurde die Messung bevorzugt abends gestartet, da dann am wenigsten Betrieb herrscht.
- Große Signalspitzen, die eventuell durch die Spannungsversorgung auftreten können.

Das Aussortieren solcher Zeitverläufe kann die Signalqualität erheblich verbessern. Wegen der großen Datenmenge wurde dieses Aussortieren automatisiert und läuft in mehreren Schritten ab.

1. Der erste Schritt besteht darin, aus den ungemittelten Zeitverläufen die Bereiche von 5 Messpunkten vor den Laserblitzen und 95 Punkte nach den Laserblitzen auszuschneiden, da bei den Blitzen eine starke Signaländerung auftritt die Störungen vortäuschen würden.
2. Für jeden Zeitverlauf bei jeder Spiegelposition wird die Standardabweichung ausgerechnet.
3. Durch visuellen Vergleich der Standardabweichungen wurde ein Wert $\text{StdAbw}_{\text{Max}}$ ausgesucht, bei dem eine Messung als zu stark gestört erachtet wird.
4. Die Signalstärke ist nicht für alle Spiegelpositionen gleich. Sie steigt tendenziell gegen die Mittelposition des Interferogrammes an, weist aber auch dort Schwankungen zwischen sehr kleinen und großen Werten auf. Um dieses Verhalten zu berücksichtigen, wurde die Anzahl der als schlecht deklarierten Zeitverläufe für alle Messungen an den einzelnen Spiegelpositionen zu $\text{Anz}_{\text{schlecht}}(\delta)$, mit der Spiegelposition δ , aufaddiert. Es wird nun angenommen, dass bei jeder Spiegelposition im Durchschnitt die gleiche Anzahl an Ausreißern zu erwarten ist. Aus dieser Annahme und der Anzahl der schlechten

Messungen bei den Spiegelpositionen im Vergleich zu $\text{StdAbw}_{\text{Max}}$ wurde eine einfache empirische Gleichung aufgestellt, die das entscheidende Kriterium darstellt ob ein Zeitverlauf aussortiert wird oder nicht und dazu führt, dass bei jeder Spiegelposition im Durchschnitt gleich viele Datensätze aussortiert werden:

$$\text{StdAbw}(\delta) > \text{StdAbw}_{\text{Max}} \cdot (0.96 + 0.009 \cdot \text{Anz}_{\text{schlecht}}(\delta)) \quad (9.5)$$

Falls diese Relation erfüllt ist, wird der Zeitverlauf aussortiert.

In der Nähe des Mittelpunktes der Interferogramme steigt das Rauschniveau stark an. Hier gibt es Spiegelpositionen, bei denen keine Messung die Kriterien für einen akzeptablen Zeitverlauf erfüllte und auch eine visuelle Analyse zeigte, dass das Signal weitaus kleiner als der Rauschpegel ist. Eine Einbeziehung dieser Zeitverläufe führt zu erheblichen Störungen bei allen spektralen Zeitverläufen. Deshalb wurde bei 15 Spiegelpositionen keine Änderungen auf das Dunkelinterferogramm addiert. Diese Vorgehensweise führt natürlich zu Fehlern im Spektrum. Um diese Fehler zu untersuchen, wurde eine Rapid-Scan Messung der stationären Zustände auf die selbe Art und Weise beschnitten. Das Resultat zeigt, dass die spektralen Details von der Prozedur unverändert bleiben (siehe Abbildung 9.5). Die Änderungen ähneln einer Grundlinienkorrektur, wobei es bei diesem Vorgehen durchaus dazu führen kann, dass aus positiven Banden negative werden. Wird das starke Rauschen der 15 aussortierten Spiegelpositionen jedoch mit einbezogen, sind solche Effekte noch wesentlich stärker, da die starken Schwankungen des Rauschens große Änderungen vortäuschen.

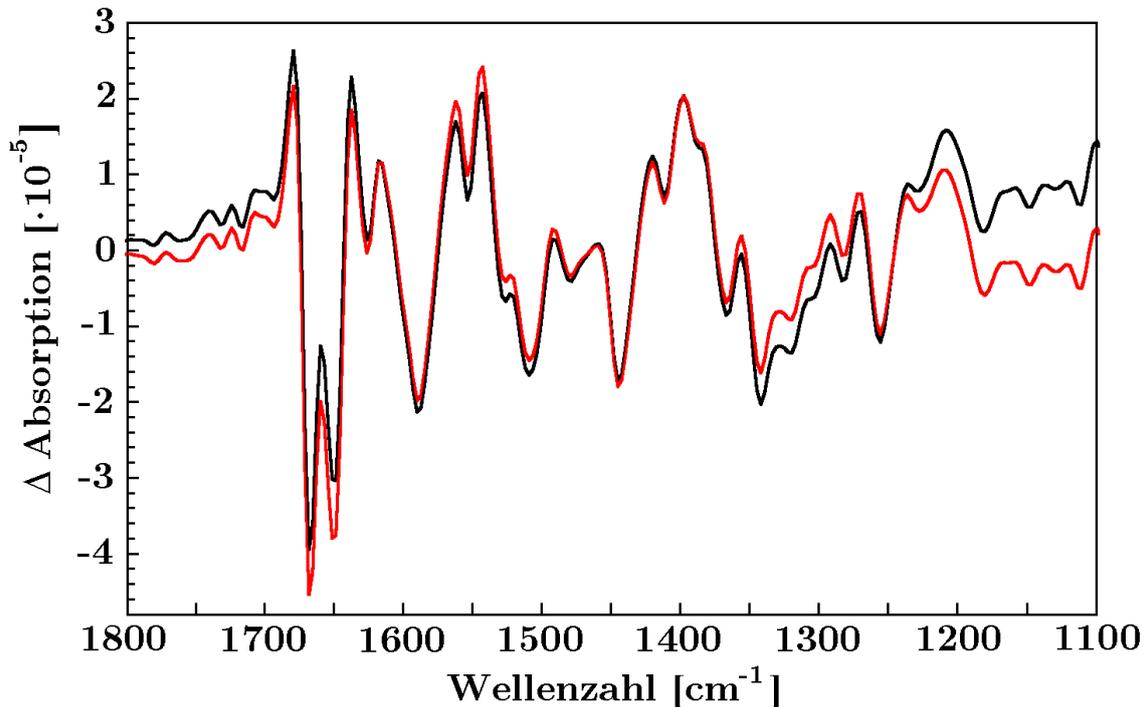


Abbildung 9.5: Ein Differenzspektrum einer Rapid-Scan Messung des dritten Überganges (schwarz, ohne Grundlinienkorrektur). Werden bei der Mittelposition des Interferogrammes nach dem Übergang bei 15 Spiegelpositionen die Änderungen entfernt, ähneln die spektralen Änderungen einer Grundlinienkorrektur (rot).

9.3.3 Aufaddieren und Mitteln der Daten

Nach Extraktion der schlechten Zeitverläufe werden die Messungen an den einzelnen Spiegelpositionen aufaddiert. Dies erfolgt vor der Fouriertransformation, da nur die Änderungen der Signale an den einzelnen Spiegelpositionen weiterverarbeitet werden und somit ein möglichst präziser Anfangswert, der Gleichspannungswert, vor dem ersten Blitz abgezogen werden muss. Die Daten werden unter Berücksichtigung der aussortierten Daten gemittelt.

9.3.4 Extrahieren der einzelnen Zeitverläufe

Die Zeitverläufe werden in vier Teile geteilt, wobei jeweils 1014 Datenpunkte (12,7 ms) vor dem Laserblitz und für die ersten drei Teile 9161 Datenpunkte (114,5 ms) nach

dem Blitz vorhanden sind. Bei dem vierten Blitz sind nur 1296 Datenpunkte (16,2 ms) nach dem Blitz vorhanden, da die Bruker Software „OPUS“ die Aufnahme auf 30000 Datenpunkte limitiert. Die einzelnen Teile erstrecken sich bis 10 Datenpunkte (125 μ s) vor dem nächsten Laserblitz.

9.3.5 Auswertung für den ersten Übergang

Abzug des Gleichspannungsanteils

Der Mittelwert über die ersten 1005 Datenpunkte wird bei jeder Spiegelposition abgezogen. Die einzelnen Werte werden in einer Datei gespeichert.

gemittelttes Laserartefakt

Um an den Enden des Interferogrammes sprunghaften Anstiege zu vermeiden, die zu Fehlern nach der Fouriertransformation führen würden, wird ein mittleres Laserartefakt abgezogen. Als mittlerer Zeitverlauf eines Laserartefakts wird der Mittelwert der ersten und der letzten 50 Zeitverläufe des Interferogrammes berechnet und von allen Zeitverläufen abgezogen. Durch diese Korrektur werden die spektralen Zeitverläufe nicht verändert.

Aufaddieren der Änderungen auf das Dunkelinterferogramm

Alle Zeitverläufe werden auf das Dunkelinterferogramm aufaddiert.

Apodisation

Bei der Datenaufnahme wird nur ein beschränktes Interferogramm aufgenommen, was zu fehlerhaften Signalen nach der Fouriertransformation führt. Um diese zu minimieren wurde für die Step-Scan Daten die Norton-Beer-Medium Apodisationsfunktion angewandt (siehe Kapitel 3.2.4). Sie wurde sowohl an das Dunkelinterferogramm als auch an das Interferogramm mit den Zeitverläufen multipliziert.

Anhängen von Nullen

Um eine Interpolation der Spektralwerte zu erreichen, wurde an die Step-Scan Daten die dreifache Anzahl an Datenpunkten als Nullen angehängt. Also werden an jede

Seite des Interferogrammes 531 Nullen angehängt. Dieses Vorgehen führt zu sieben interpolierten Punkten zwischen den unabhängigen Punkten.

Berechnung der Spektren

Nach der Berechnung der Fouriertransformation des Dunkelinterferogramms $I_{\text{Dunkel}}(\delta)$ und aller Interferogramme der Reaktionskinetiken $I_{\text{Dunkel}}(\delta) + \Delta I(\delta)$ werden die Differenzspektren $D(\nu t)$ in Abhängigkeit von der Wellenzahl ν und dem Zeitpunkt t berechnet:

$$D(\nu t) = \text{Log} \left[\frac{\text{FT}[I_{\text{Dunkel}}(\delta)]}{\text{FT}[I_{\text{Dunkel}}(\delta) + \Delta I(\delta)]} \right] \quad (9.6)$$

Rauschreduzierung

Auf die Details der Rauschreduzierung wird in Kapitel 9.4 eingegangen.

Laserartefaktkorrektur

Auf die Details der Laserartefaktkorrektur wird in Kapitel 9.5 eingegangen.

9.3.6 Auswertung der weiteren Übergänge

Die Auswertung der weiteren Übergänge unterscheidet sich nur in Bezug auf die Subtraktion des Gleichspannungsanteiles und einer weiteren Differenzbildung der Endspektren um die Änderungen für den jeweiligen Übergang zu erhalten.

Abzug des Gleichspannungsanteils

Von den Daten wird derselbe Gleichspannungsanteil abgezogen wie beim ersten Übergang. Die Werte werden aus einer Datei geladen.

Abzug des Anfangsspektrums

Am Ende der Auswertung, die der des ersten Überganges entspricht, werden 200 der Spektren (2,5 ms) vor dem Laserblitz gemittelt und von allen Einzelspektren abgezogen. Dadurch werden die Änderungen im Vergleich zum vorhergehenden Übergang sichtbar.

9.4 Reduktion des Rauschens

9.4.1 Faktor Analysis

Werden bei einer Messung Daten gewonnen, die als lineare Summe von Produkttermen dargestellt werden können, ist es möglich diese Daten faktoranalytisch zu untersuchen. Diese Methode birgt einige hervorragende Möglichkeiten die Daten zu analysieren, wie dies beim sogenannten „Target Testing“ der Fall ist. Es ist des weiteren möglich die Datenqualität zu verbessern, indem der Rauschlevel gesenkt wird und somit das Signal-Rausch Verhältnis verbessert wird [Malinowski, 1991]. Auf die gemessenen Step-Scan Daten wurde diese Methode der Rauschreduktion angewandt. Dies ist zulässig da die spektralen Zeitverläufe $D(\nu t)$ sich als lineare Summe einiger wellenzahlabhängigen Amplituden $a(\nu, i)$ und einer Anzahl an grundlegenden Zeitverläufen $z(i, t)$ darstellen lassen:

$$D(\nu t) = \sum_{i=1}^N a(\nu, i) \cdot z(i, t) \quad (9.7)$$

Die Anzahl dieser grundlegenden Zeitverläufe ist die Anzahl der Faktoren N . Die Daten werden nun als Matrix betrachtet, wobei die Wellenzahlen den Zeilen entsprechen und die Zeitpunkte den Spalten:

$$D_{\nu t} = A_{\nu, i} \cdot Z_{i, t} \quad (9.8)$$

9.4.2 Singulärwertzerlegung

Solch eine Matrix kann durch eine Singulärwertzerlegung in drei Matrizen aufgespalten werden,

$$D_{\nu t} = U_{\nu\nu} S_{\nu\nu} V_{\nu t}^T, \quad (9.9)$$

wobei die Dimension der Matrix S dem größeren der beiden Indizes ν und t entspricht. Diese Matrixzerlegung enthält Komponenten einer Eigenwertzerlegung der sogenannten kovarianten Matrizen DD^T und $D^T D$. Für die Matrizen U und V gilt nämlich:

$$U^T U = \mathbb{1} \quad (9.10)$$

$$V^T V = \mathbb{1} \quad (9.11)$$

damit sind U und V orthonormal. Außerdem gilt:

$$U^T D D^T U = S^2 = V^T D^T D V \quad (9.12)$$

Damit sind die Spalten der Matrix U Eigenvektoren der kovarianten Datenmatrix $D D^T$ und die Spalten der Matrix V Eigenvektoren der kovarianten Datenmatrix $D^T D$. Die Eigenwerte sind jeweils die zugehörigen Quadrate der Diagonalwerte der Matrix S . Die Matrix S ist diagonal und beinhaltet die Wurzeln der Eigenwerte, Singulärwerte genannt, in sortierter Weise. Je größer ein Eigenwert, desto früher ist er in S aufgelistet. S_{11} repräsentiert somit den größten Singulärwert. Bei rauschfreien Daten ist nur die Anzahl der Singulärwerte ungleich Null, die der Anzahl der Faktoren des physikalischen Vorganges entspricht. Dies gilt unabhängig von der Dimension der Matrix $D_{\nu t}$. Bei gemessenen Daten, die immer einen gewissen Anteil an Rauschen aufweisen, sind im Allgemeinen alle Singulärwerte ungleich Null. Die Anzahl der physikalisch relevanten Faktoren ist aber geringer. Man kann die Anzahl der Singulärwerte als die Anzahl der Dimensionen in einem Faktorraum beschreiben, in dem nur die Dimensionen der Faktoren physikalisch relevante Informationen enthalten und der durch die zugehörigen Eigenvektoren aufgespannt ist. Die weiteren Dimensionen, die Eigenvektoren, die zu kleinen Singulärwerten gehören, die scheinbar bei realen Messungen existieren, enthalten nur Rauschen. Die Faktordimensionen bestehen jedoch aus den physikalisch relevanten Informationen und einem Rauschanteil. Werden nun die Dimensionen entfernt, die keine physikalischen Informationen enthalten, kann ein Teil des Rauschens entfernt werden ohne physikalische Informationen zu verlieren (siehe Abbildung 9.6).

9.4.3 Bestimmung der Anzahl der Faktoren

Die Bestimmung der Anzahl der Faktoren ist ein wichtiger Punkt. Einerseits darf man keine physikalisch relevanten Informationen verlieren, aber andererseits will man so viel Rauschen wie möglich eliminieren. Die zuverlässigste Bestimmung der Anzahl der Faktoren basiert auf dem Wissen über die Fehler einer Messung. In meinen Messungen wird diese Information aus dem Teil der Messung gewonnen, der vor dem ersten Blitz aufgenommen wurde. In diesen 12,5 ms findet noch keine Reaktion statt, sodass die Schwankungen der Werte der Differenzspektren auf das Rauschen zurückzuführen sind. Die Anzahl der Faktoren wird nun über die residualen Standardabweichungen bestimmt. Die residuale Standardabweichung der Messung folgt

aus

$$\text{RSD}_{\text{Mess}} = \sqrt{\frac{1}{\nu t} \sum_{i=1}^{\nu} \sum_{k=1}^t \text{Err}_{ik}^2} \quad (9.13)$$

Wobei Err für den Fehler steht, die Abweichung des Messwertes vom realen Wert, der vor dem ersten Blitz Null ist. Die residuale Standardabweichung der faktorreduzierten Daten mit N Faktoren ist

$$\text{RSD}_{\text{Fakt}} = \sqrt{\frac{\nu}{\nu t(\nu - N)} \sum_{i=1}^{\nu} \sum_{k=1}^t (D_{ik} - D_{ik}^{\dagger})^2}, \quad (9.14)$$

wobei $D_{\nu t}^{\dagger}$ die auf N Faktoren reduzierte Datenmatrix ist. Aus einem Vergleich der beiden Standardabweichungen folgt die Anzahl der Faktoren [Malinowski, 1991]:

$$\text{RSD}_{\text{Fakt}} \stackrel{!}{\leq} \text{RSD}_{\text{Mess}} \quad (9.15)$$

Die residuale Standardabweichung der faktorreduzierten Daten muss also kleiner sein als die der Messung. Aus dieser Bedingung lässt sich die Anzahl der Faktoren ermitteln. Praktisch beginnt man mit einem Faktor und vergleicht die Standardabweichungen. Ist die Ungleichung nicht erfüllt, wird auf zwei Faktoren erhöht. Diese Prozedur wird so lange durchgeführt bis die korrekte Anzahl an Faktoren bestimmt wurde.

9.4.4 Gewichtete Singulärwertzerlegung

Da zur Signalerhöhung in den Differenzspektren eine hohe Schichtdicke gewählt wurde, ist der Rauschpegel in der Amid I Region sehr hoch. Dies wurde bei der Singulärwertzerlegung berücksichtigt, indem die Daten vor der Zerlegung mit der Standardabweichung für die einzelnen Wellenzahlen gewichtet wurden. Die Gewichtungsfaktoren ergaben sich aus

$$\text{Gew}(\nu) = \frac{\text{Mittelwert}(\text{StdAbw}(\nu))}{\text{StdAbw}(\nu)} \quad (9.16)$$

Nach der Singulärwertzerlegung wurde die Gewichtung wieder durch Multiplikation mit den inversen Gewichtungsfaktoren rückgängig gemacht um korrekte Signalamplituden bei den jeweiligen Wellenzahlen zu erhalten. Eine Bestimmung der Anzahl

9.4. REDUKTION DES RAUSCHENS

der Faktoren mit den gewichteten Daten führt zu einer kleineren oder gleichen Anzahl im Vergleich zu den ungewichteten Daten. Es wurde immer die Anzahl der Faktoren der ungewichteten Daten angewandt.

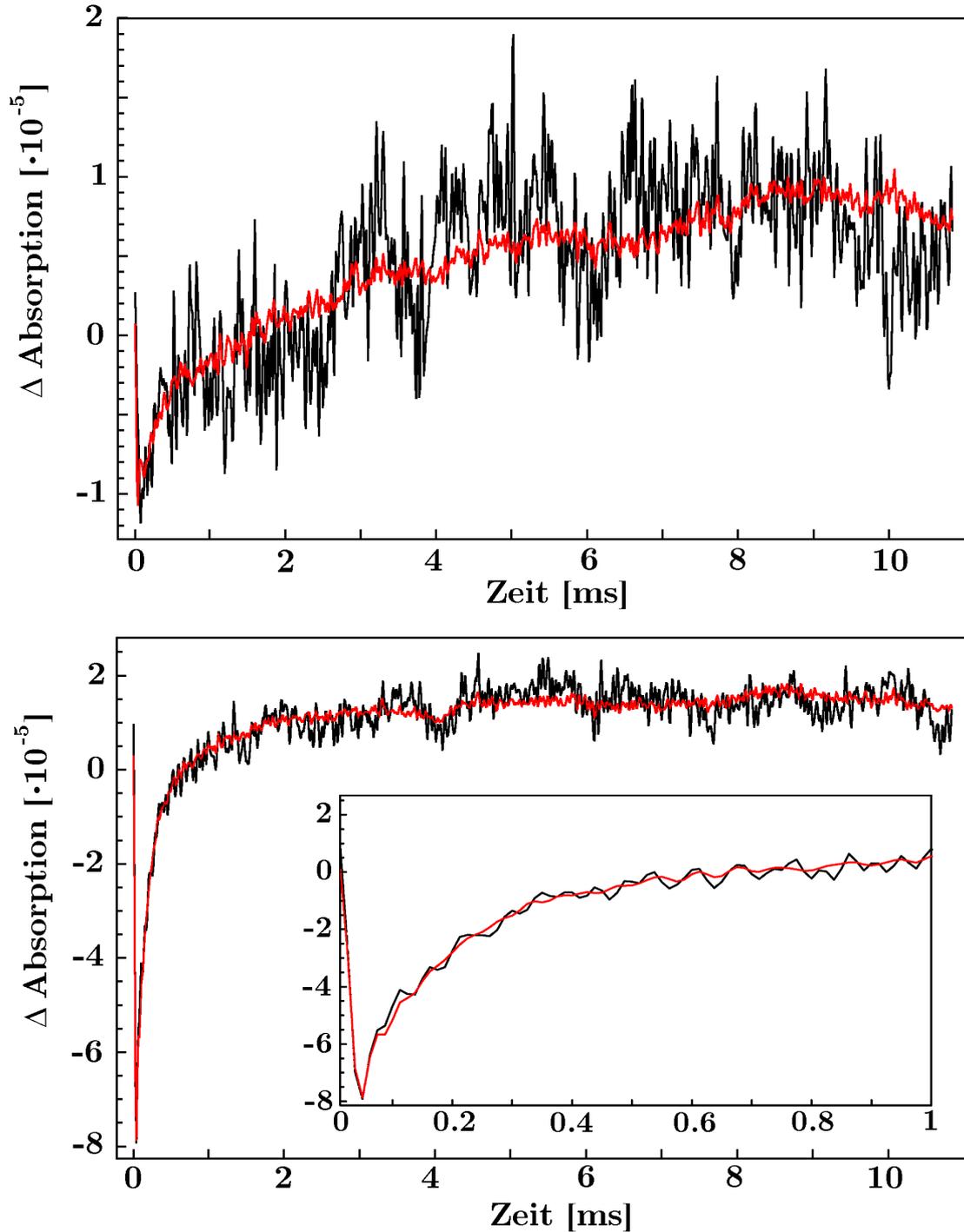


Abbildung 9.6: Es werden die spektralen Zeitverläufe der Messung (schwarz) mit den durch Singulärwertzerlegung rauschgeminderten Zeitverläufen (rot) verglichen (oben: 1264 cm^{-1} , unten: 1353 cm^{-1}). Selbst die schnellen realen Änderungen zu Beginn der Messung bleiben erhalten wohingegen das Rauschen stark reduziert wird.

9.5 Laserartefakt

9.5.1 Ursache

Um die Photoreaktionen auszulösen wird ein kurzer Laserpuls appliziert. Die Energie dieses Pulses wird zum Teil absorbiert, wodurch es zu einer Erwärmung der Probe kommt. Dabei wird sowohl das Wasser als auch das Probenmaterial, die PSII Membranpartikel, erwärmt. Dies führt zu einem starken Laserartefakt, das die spektralen Informationen der Photoreaktion stört. Ein solches Laserartefakt, das durch eine Erwärmung der Probe entsteht, wurde schon bei [Garczarek, 2004] beschrieben. Um auszuschließen, dass das Artefakt optischen oder elektrischen Ursprungs ist, wurde eine Step-Scan Messung mit zwei unbeschichteten CaF_2 -Scheiben durchgeführt. Bei dieser Messung ist ein 1000-mal kleineres Artefakt als mit probenbeschichteten CaF_2 -Scheiben zu sehen (siehe Abbildung 9.7). Es ist sehr gleichförmig bei jeder Spiegelposition und führt deshalb zu keinen sichtbaren spektralen Änderungen.

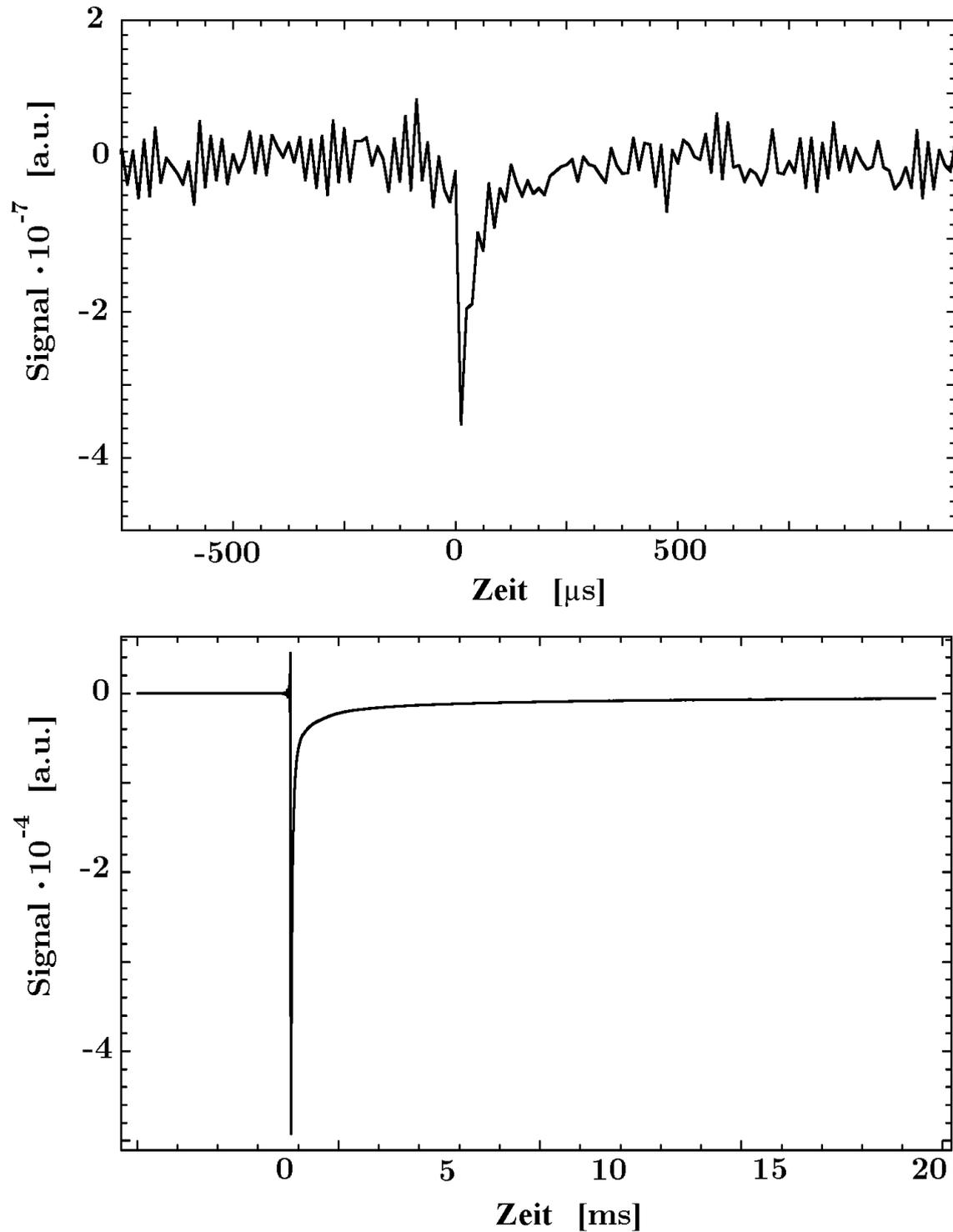


Abbildung 9.7: Die Ursache des Laserartefaktes wurde durch den Vergleich einer Step-Scan Messung ohne Probe (oben) und mit einer PSII Probe (unten) untersucht. Das Artefakt der Messung ohne Probe ist 1000-mal kleiner.

9.5.2 Artefakt einer Farbstofflösung

Dass Absorptionsänderungen durch Erwärmung herbeigeführt werden können, wurde durch Step-Scan Messungen an einer wässrigen Farbstofflösung gezeigt. Nach Absorption des Laserpulses erwärmt der Farbstoff Bromkresolpurpur (BCP) das Wasser. Die spektralen Änderungen stammen nicht aus Schwankungen der Laserenergie oder Absorptionsschwankungen der Probe. Das wird bei einem Vergleich der Maxima der Artefakte des Detektorsignals mit der Spiegelposition ersichtlich. Die Schwankung der Artefaktamplitude ist keine statistisch verteilte Größe, sondern zeigt Symmetrien zur Mittelposition des Interferogrammes, wie sie bei Absorptionsänderungen einer Probe auftreten (siehe Abbildung 9.8).

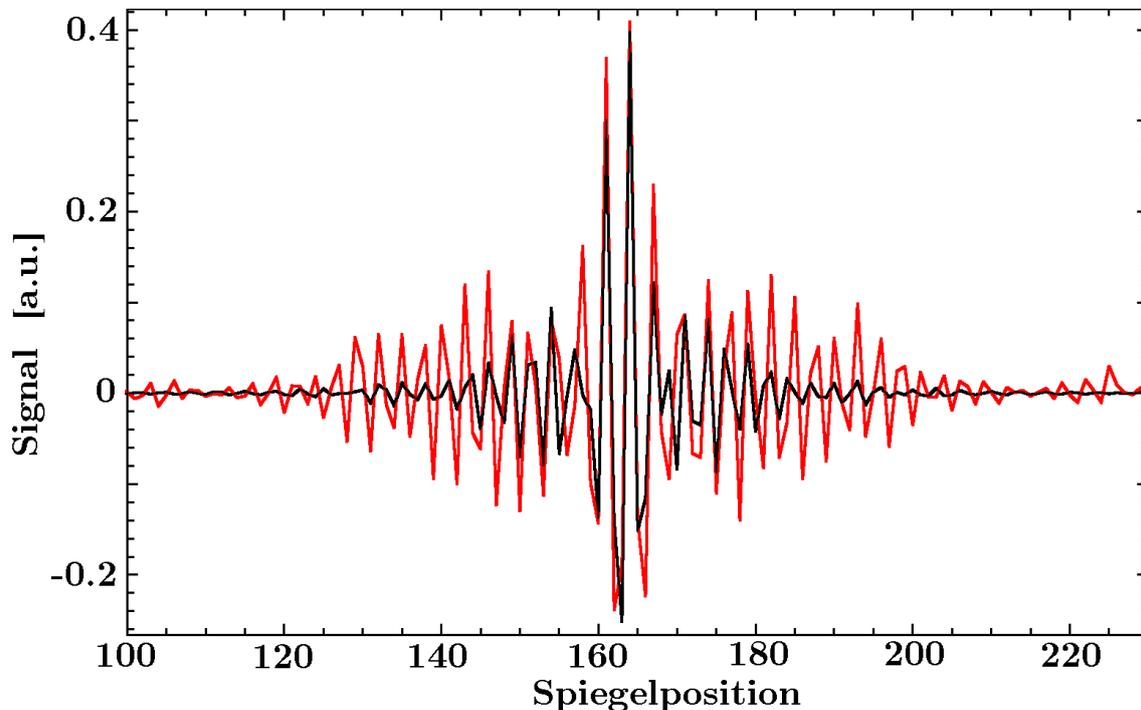


Abbildung 9.8: Die Abhängigkeit der Laserartefaktstärke von der Spiegelposition kann durch einen Vergleich des Interferogrammes der BCP-Messung (schwarz), mit der Amplitude des Artefaktmaximums (rot) an den verschiedenen Spiegelpositionen gezeigt werden. Die Artefaktmaxima wurden durch 5000 geteilt und der Mittelwert über alle Maxima abgezogen.

Auf Grund des viel höheren Wassergehalts und des Fehlens der proteinhaltigen Probe stimmen die Differenzspektren für die Farbstofflösung (siehe Abbildung 9.9) und der

PSII Proben nicht überein (siehe Abbildung 9.11).

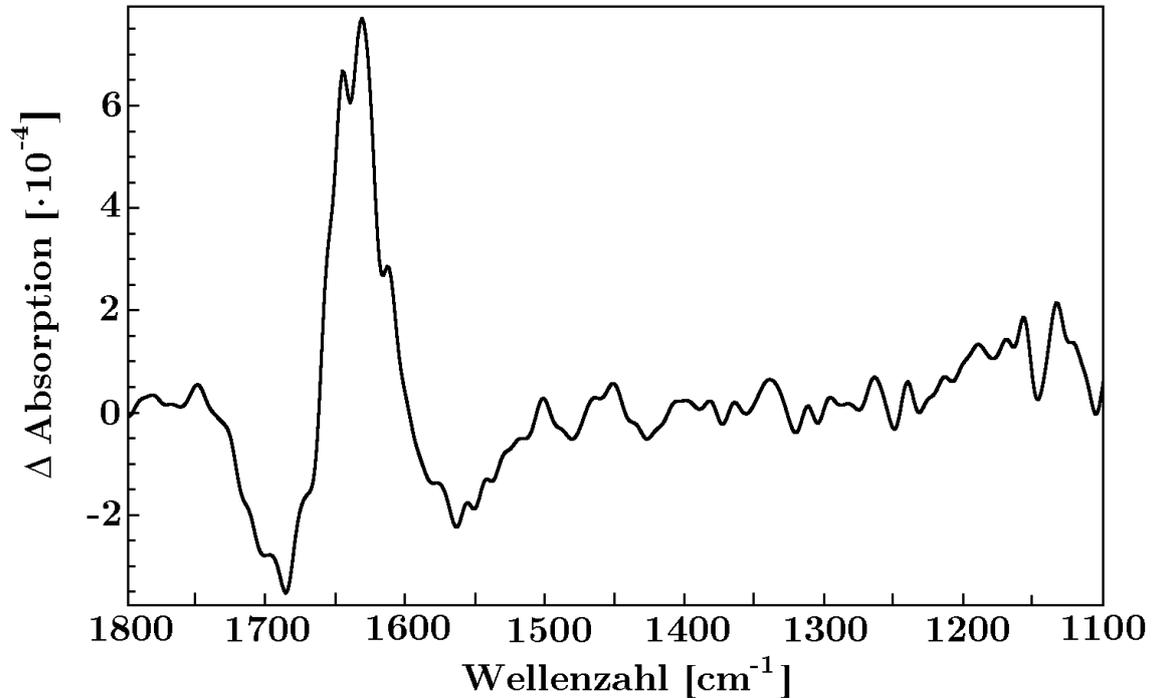


Abbildung 9.9: Das Differenzspektrum des Farbstoffes Bromcresolpurpur zum Zeitpunkt des maximalen Artefaktes zeigt Absorptionsänderungen, die auf Temperaturänderung durch Lichtabsorption zurückzuführen sind. Das Differenzspektrum unterscheidet sich stark von den durch Temperaturerhöhung hervorgerufenen Absorptionsänderungen der PSII Membranfragmete.

Untersucht man die spektralen Zeitverläufe beim Laserartefakt, so gibt es, wie man dem Spektrum entnehmen kann, große und kleine sowie positive und negative Amplituden des Artefaktes. Die prinzipielle Form des Zeitverlaufs sieht sehr ähnlich aus. Um zu untersuchen, ob sie sich nur um einen Faktor unterscheiden, wurde eine große, negative Bande mit einer kleinen, positiven verglichen. Man kann nun versuchen den Zeitverlauf der kleinen Bande durch den Zeitverlauf der großen zu simulieren, indem diese mit einem Faktor multipliziert wird (siehe Abbildung 9.10). Diese Simulation führt zu einer sehr guten Übereinstimmung und wurde auch mit weiteren Banden getestet.

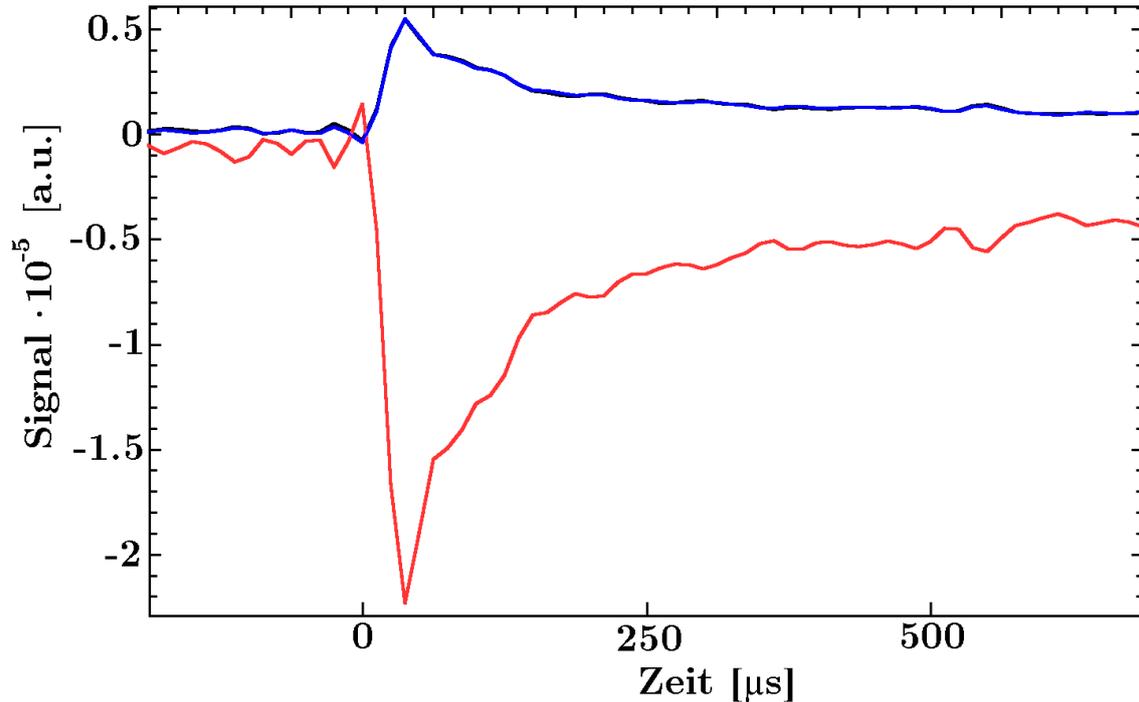


Abbildung 9.10: Um zu untersuchen, ob sich die Artefaktzeitverläufe nur durch einen Faktor unterscheiden, wurde ein Zeitverlauf mit kleiner Amplitude (schwarz, 1749 cm^{-1}) durch einen mit großer, negativer Amplitude (rot, 1563 cm^{-1}) simuliert. Die Simulation (blau) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem schwarzen Zeitverlauf.

Es scheint also möglich zu sein die Spektren mit einem Artefaktzeitverlauf und einer Amplitudenverteilung zu korrigieren und den Artefaktbeitrag zu entfernen oder wenigstens zu verringern.

9.5.3 Artefakt inaktiver Photosysteme

Um das Artefaktpektrum einer PSII Probe zu ermitteln, wurde diese mehrere Stunden dem Licht ausgesetzt und danach gemessen. Dass die primäre Ladungstrennung nicht stattfindet, kann an dem völligen Fehlen einer Chinonbande festgestellt werden. Nach 15 Tagen wurde an derselben Probe nochmals gemessen. Obwohl sich der Wassergehalt durch die langsame Verdunstung des Wassers aus der Probe verringert hat, ist das gemessene Differenzspektrum noch qualitativ ähnlich, doch ändern sich die Amplituden der Banden zum Teil erheblich. Die Abhängigkeit des Artefaktpektrums vom Wassergehalt, Probengehalt und optischer Absorption macht eine Korrektur sehr schwierig. Deshalb wurde das Korrekturspektrum aus den Step-Scan Messungen der intakten Probe gewonnen.

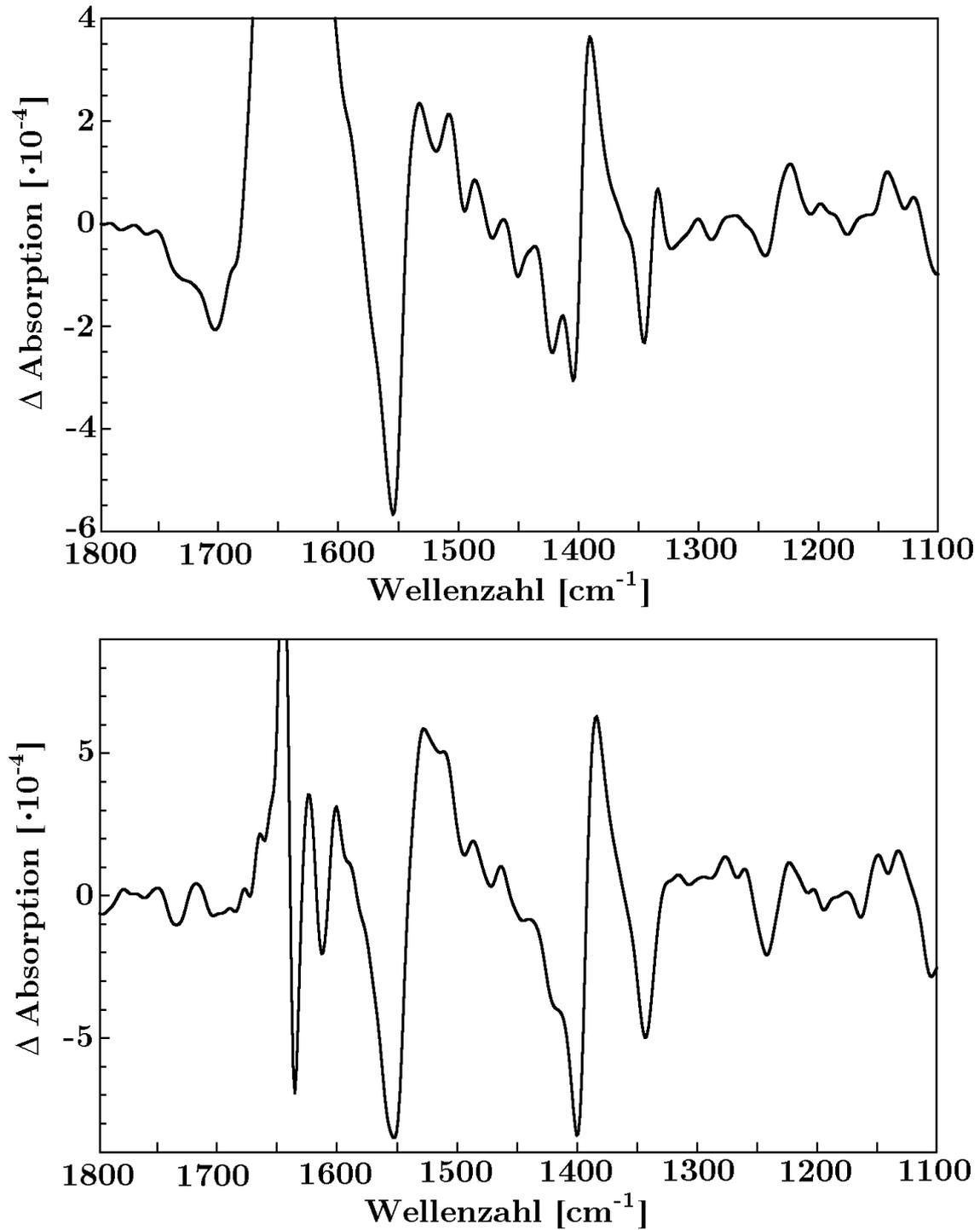


Abbildung 9.11: Die Differenzspektren einer inaktiven PSII Probe beim Artefaktmaximum. Oben eine wenige Stunden alte Probe. Unten dieselbe Probe nach 15 Tagen. Die Spektren zeigen noch qualitative Ähnlichkeiten, doch der gesunkene Wassergehalt ändert die Stärken der Banden.

9.5.4 Korrektur

Um die Laserintensität so gering wie möglich zu halten und somit die Absorption und Erwärmung der Probe zu verringern, wurde mittels Rapid-Scan Messungen der stationären Zustände die Laserenergie ermittelt, bei der gerade noch keine signifikante Änderungen der Amplitude und des Missparameters der Differenzspektren erfolgt (siehe Kapitel 4.3.2). Die weiteren Korrekturen erfolgten an den gemessenen Daten. Um Fehler bei der Fouriertransformation zu vermeiden, wurde zuerst ein mittleres Laserartefakt von allen Zeitverläufen abgezogen. Dies führt noch zu keiner Änderung der spektralen Zeitverläufe und die Absorptionsänderungen durch Erwärmung der Probe sind noch voll erhalten. Ein erster Versuch der Artefaktkorrektur bestand darin, diese bei den Interferogrammzeitverläufen durchzuführen. Ein mittlerer Laserartefaktverlauf wurde an jeden Zeitverlauf simuliert und abgezogen. Die resultierenden Differenzspektren direkt nach dem Blitz weisen durch solch eine Korrektur kein Artefaktspektrum auf und Spektren mit den erwarteten, gut sichtbaren Akzeptorseitenbanden werden sichtbar. Leider stört dieses Vorgehen die Zeitverläufe. Es werden starke ms Phasen generiert, die in den ursprünglichen, unkorrigierten Daten nicht sichtbar sind. Eine Korrektur bei den spektralen Zeitverläufen hat sich hingegen als erfolgreicher herausgestellt. Denn hier werden sowohl die spektralen Anteile des Artefakts bei den ersten Messpunkten eliminiert als auch die Zeitverläufe der ms Phasen nicht gestört, da der Korrekturzeitverlauf keine solchen Phasen aufweist. Im Interferogramm entstehen diese ungewünschten langsamen Phasen dadurch, dass sich das Artefakt aus zwei Komponenten zusammensetzt. Der eine Teil ist bei allen Spiegelpositionen gleich und weist langsame Zerfallsphasen auf. Der zweite Beitrag ist spiegelpositionsabhängig und enthält keine langsamen Zerfallsphasen. Das macht eine Korrektur unmöglich, da im Interferogrammbereich nicht zwischen den schnellen Phasen des Photosystems und des Artefakts unterschieden werden kann. Im spektralen Bereich ist dies möglich, da es Bereiche gibt, die keine Änderungen durch die Reaktionen am Photosystem aufweisen. Ein herausragender Bereich ist um 1800 cm^{-1} , da hier keine Banden der Photoreaktion erwartet werden und auch der niedrigste Rauschlevel des gesamten spektralen Bereichs vorliegt (siehe Abbildung 9.12).

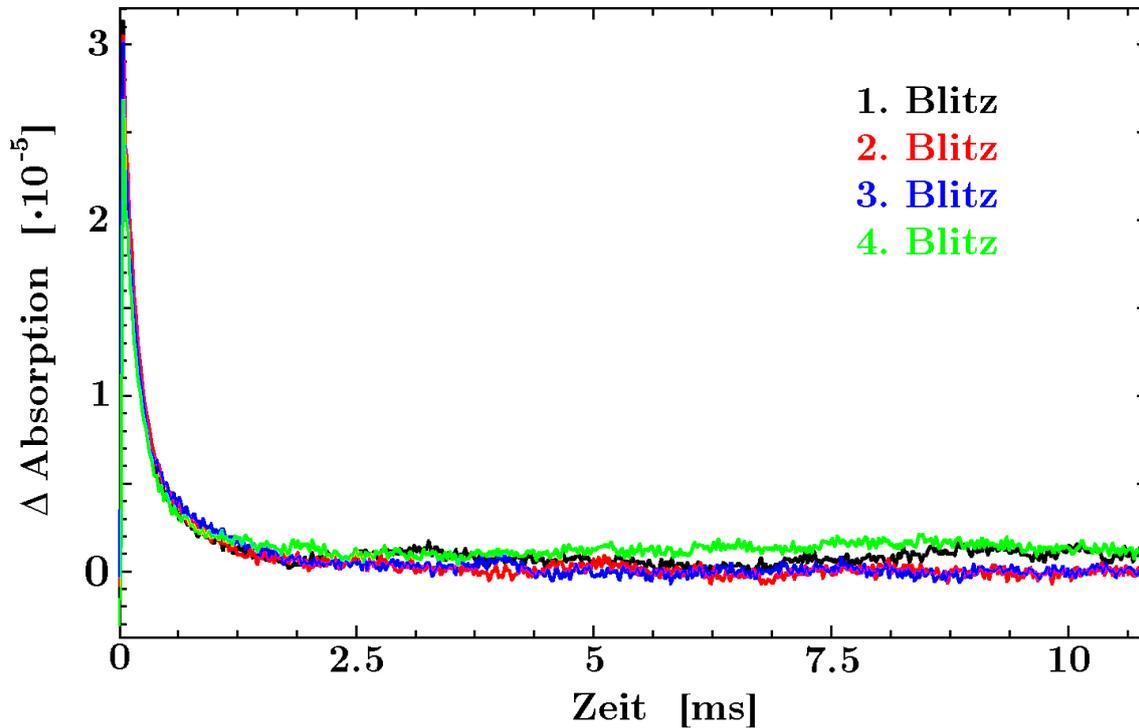


Abbildung 9.12: Die Zeitverläufe des Laserartefaktes bei 1800 cm^{-1} . Für den ersten (schwarz), zweiten (rot), dritten (blau) und vierten Übergang (grün)

Anstiegsverhalten

Eine Untersuchung der Zeitverläufe bei 1800 cm^{-1} zeigt (siehe Abbildung 9.13), dass das Anstiegsverhalten des Artefaktes sich von Blitz zu Blitz unterscheidet. In Übereinstimmung damit zeigen die Interferogrammzeitverläufe das gleiche Anstiegsverhalten. Dies liegt an einer zum Auslösezeitpunkt des Laserblitzes leicht versetzten Datenerfassung der Wandlerkarte.

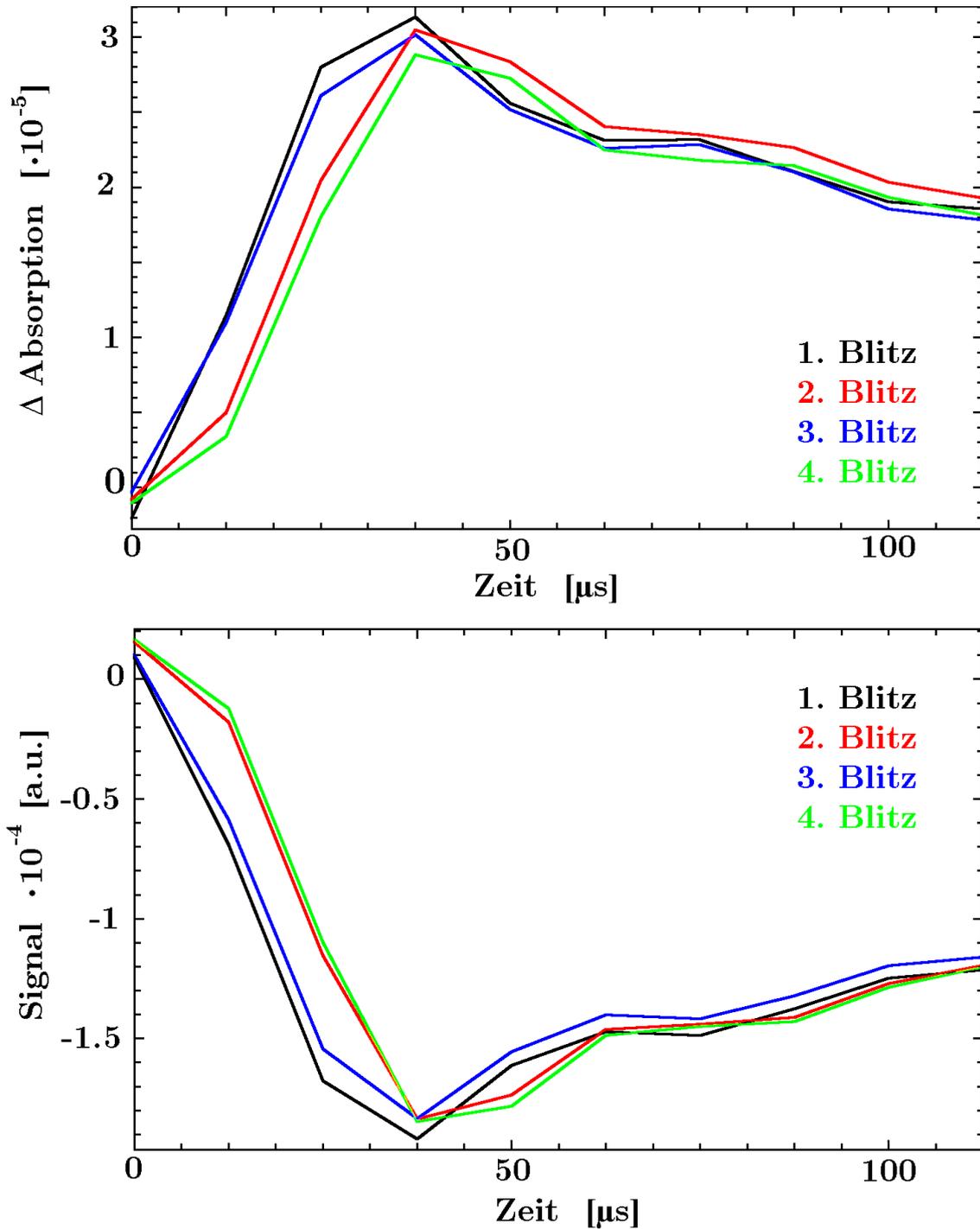


Abbildung 9.13: Ein genauerer Blick auf das Anstiegsverhalten des spektralen Laserartefaktes bei 1800 cm^{-1} (oben) und des am Detektor gemessenen Artefaktes (unten) zeigt, dass der zweite (rot) und dritte (grün) Übergang ein anderes Anstiegsverhalten aufweisen als der erste (schwarz) und der dritte (blau) Übergang. Die Ursache ist eine versetzte Datenerfassung zum Auslösezeitpunkt des Laserblitzes

Wird nun zur Korrektur ein gemittelter Zeitverlauf herangezogen, ist der Anstieg bis $50 \mu\text{s}$ nach Blitz 2 und Blitz 4 noch stark durch das Artefakt gestört. Um dieses zu vermeiden, wurde jeweils mit dem zum Übergang gehörigen Zeitverlauf bei 1800 cm^{-1} korrigiert.

Amplitudenverteilung

Die Amplitude des Artefaktes ist abhängig von der Wellenzahl, wie bei den Messungen mit Farbstoff und inaktiviertem PSII zu sehen ist. Diese Amplitudenverteilung ist stark abhängig von der Probe und dem Wassergehalt. Um sie direkt aus den PSII Messungen zu gewinnen, wurde der dritte Übergang mit dem Laserartefaktzeitverlauf bei 1800 cm^{-1} und den erwarteten Phasen von $10 \mu\text{s}$, $2,2 \text{ ms}$ und 22 ms simuliert (siehe Kapitel 9.6.1). Für diese Prozedur wurde der dritte Übergang herangezogen, da hier die geringsten Amplituden der schnellen Phasen des Photosystems erwartet werden, die die Simulation stören könnten. Die gewonnene Amplitudenverteilung für den Laserartefaktzeitverlauf entspricht den Korrekturamplituden (siehe Abbildung 9.14).

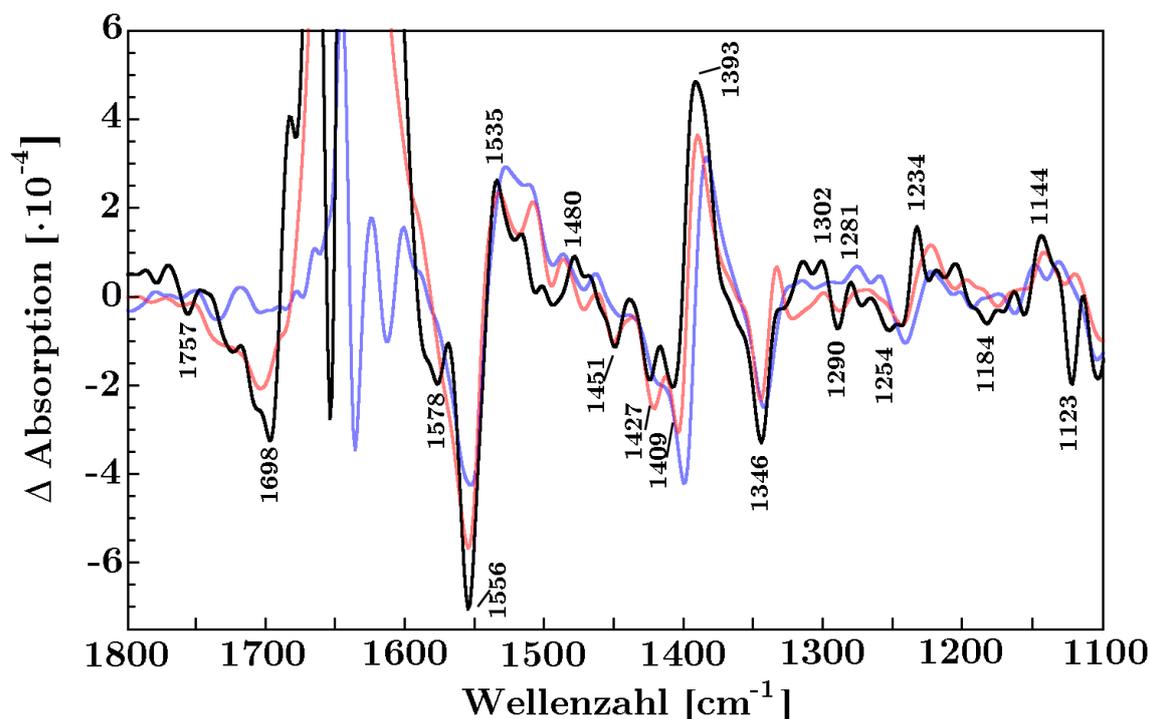


Abbildung 9.14: Die Korrekturamplituden bei den einzelnen Wellenzahlen, gewonnen aus einer Simulation des dritten Überganges mit einem Laserartefaktanteil. Die Verteilung zeigt die qualitativen Ähnlichkeiten zu den Artefaktspektren der inaktiven PSII Proben (rot, blau)

Diese Verteilung stimmt qualitativ gut mit den Messungen des Artefakts an den inaktiven PSII Proben überein. Wird die Korrektur durchgeführt, werden bei allen Blitzen die erwarteten starken Akzeptorseitenbanden direkt nach dem Blitz sichtbar. Die Zeitverläufe im ms Bereich werden im Vergleich zu den nichtkorrigierten Zeitverläufen nicht gestört.

9.6 Simulation der Zeitverläufe

Die Grundannahme für die Simulation der Zeitverläufe ist ein Reaktionsverlauf, der sich aus mehreren Reaktionen erster Ordnung zusammensetzt

$$D(\nu, t) = \sum_{i=1}^N a_i(\nu) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (9.17)$$

wobei $a_i(\nu)$ die Amplituden der einzelnen Reaktionsverläufe für die entsprechenden Wellenzahlen darstellt. Die Zeitkonstanten τ_i korrespondieren zu Vorgängen an der Akzeptor- und der Donorseite des Photosystems II.

9.6.1 Zeitkonstanten der einzelnen Übergänge

Die Reduktion des Akzeptorchinons Q_A und die Oxidation des Donors Tyr_Z ereignen sich schneller als die Zeitauflösung der Messung. Diese Vorgänge wurden deshalb mit einer Zeitkonstante von $10 \mu s$ simuliert. Die Oxidation des Akzeptorchinons Q_A erfolgt durch den Elektronenakzeptor PpbQ mit einer Zeitkonstante von 22 ms. Diese Zeitkonstante wurde aus einer Simulationen der gemittelten Zeitverläufe bei der Wellenzahl 1478 cm^{-1} gewonnen (siehe 10.2.1). Die Zeitkonstanten für die S-Übergänge des Mangankomplexes und der Reduktion des Tyr_Z bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden aus Simulationen der Zeitverläufe gewonnen, die dem Tyr_Z zugeordnet wurden (siehe Kapitel 10.3.3). Der Zerfall dieser Banden ereignet sich mit der gleichen Zeitkonstante, mit der der Mn-Komplex in den nächsten Zustand übergeht. Alle Übergänge wurden mit der schnellen $10 \mu s$ Phase, der langsamen 22 ms Phase, einer Konstanten und mit der dem jeweiligen Übergang entsprechenden Zeitkonstanten simuliert. Es stellte sich heraus, dass bereits beim zweiten Übergang auf einigen Zeitverläufen eine ms Phase zu sehen ist. Wahrscheinlich ist es auf Grund eines nicht optimal eingestellten Anregungslasers zu einem S2-Anteil vor dem ersten Laserblitz gekommen, sodass der $S3 \rightarrow S0$ Übergang bei einigen Photosystemen einen Blitz zu früh eintritt. Deshalb wurde bei den Simulationen für den zweiten Übergang auch die Zeitkonstante des dritten mit einbezogen. Dieses Vorgehen ist nicht unkritisch, da bei einigen Zeitverläufen die Simulation zu scheinbar übertriebenen und unpassenden gegenläufigen Amplituden kommt. Aber auch das ist schwer zu beurteilen, da die Spektren der stationären Zustände für den zweiten und dritten Übergang viele entgegengesetzte Banden aufweisen. Auch beim vierten Übergang wurde unter Berücksichtigung des Missparameters die ms Phase des dritten Überganges simuliert. Bei den Simulationen wurde außer bei der zweiten Laseranregung auf Beiträge durch S2-Dunkelanteile verzichtet. Versuche, diese Beiträge zu berücksichtigen, führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Die aus der Simulation folgende Zeitkonstante für den $S2 \rightarrow S3$ Übergang ist mit $225 \mu s$ zu langsam. Ursache könnte ein Anteil an PSII Partikeln sein, die auch oder erst bei dieser Blitzanregung den $S1 \rightarrow S2$ Übergang beschreiten. Die Zeitkonstante für den $S0 \rightarrow S1$ Übergang ist zu langsam. Hier sieht man

9.6. SIMULATION DER ZEITVERLÄUFE

wohl durch die ansteigende Durchmischung hauptsächlich Beiträge des ersten und zweiten Überganges.

Quelle	Physikalische Bedeutung	Zeitkonstante [μs]
[Renger und Hanssum, 1992]	$S1 \longrightarrow S2$	232
	$S2 \longrightarrow S3$	564
	$S3 \longrightarrow S0$	2250
	$S0 \longrightarrow S1$	105
Simulation	$Q_A \text{Tyr}_Z \longrightarrow Q_A^- \text{Tyr}_Z^+$	10 (Anstiegszeit der Messapparatur)
	$Q_A^- \longrightarrow Q_A$	22000
	$S1 \longrightarrow S2$	182
	$S2 \longrightarrow S3$	225
	$S3 \longrightarrow S0$	2650
	$S0 \longrightarrow S1$	215

Tabelle 9.1: Die für die Simulationen genutzten Zeitkonstanten und zum Vergleich Literaturdaten aus [Renger und Hanssum, 1992]

9.6.2 Globale Simulation

Mit diesen Zeitkonstanten wurden die Daten global simuliert um die Amplituden $a_i(\nu)$ der einzelnen Zeitkonstanten zu bestimmen. Dazu schreiben wir zuerst Gleichung 9.17 in Matrixform:

$$D_{\nu t} = A_{\nu i} T_{it} \quad (9.18)$$

Daraus können die Amplituden $A_{\nu i}$ gewonnen werden, indem mit der Pseudoinversen von T_{it} von rechts multipliziert wird. Diese erhält man, indem man von rechts mit der Transponierten von T_{it} multipliziert und dann ebenfalls von rechts mit der Inversen

9.6. SIMULATION DER ZEITVERLÄUFE

von $\mathbf{T}_{it}\mathbf{T}_{it}^T$ multipliziert. Somit ergeben sich die Amplituden zu

$$\mathbf{A}_{\nu i} = \mathbf{D}_{\nu t}\mathbf{T}_{it}^T(\mathbf{T}_{it}\mathbf{T}_{it}^T)^{-1} \quad (9.19)$$

Dieses Ergebnis entspricht der besten Lösung für die vorgegebenen τ_i nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate [Malinowski, 1991].

Kapitel 10

Step-Scan Ergebnisse

Der letzte Schritt der Datenauswertung ist die Laserartefaktkorrektur. Zum Vergleich werden die Unkorrigierten und Korrigierten Spektren der ersten μs gezeigt.

10.1 Anfangsspektren

10.1.1 Unkorrigierten Daten

In den bezüglich des Laserartefakts unkorrigierten Spektren der ersten μs ist das Artefaktspektrum bei allen vier Übergängen eine dominierende Komponente. Dies zeigt ein Vergleich mit den Artefaktspektren die aus den inaktiven Proben gewonnen wurden (siehe Abbildung 9.14). Einzig die Chinonbande bei 1478 cm^{-1} ist noch erkennbar (siehe Abbildung 10.1). Dies zeigt dass eine Laserartefaktkorrektur unumgänglich ist um die Spektren der ersten μs zu erhalten.

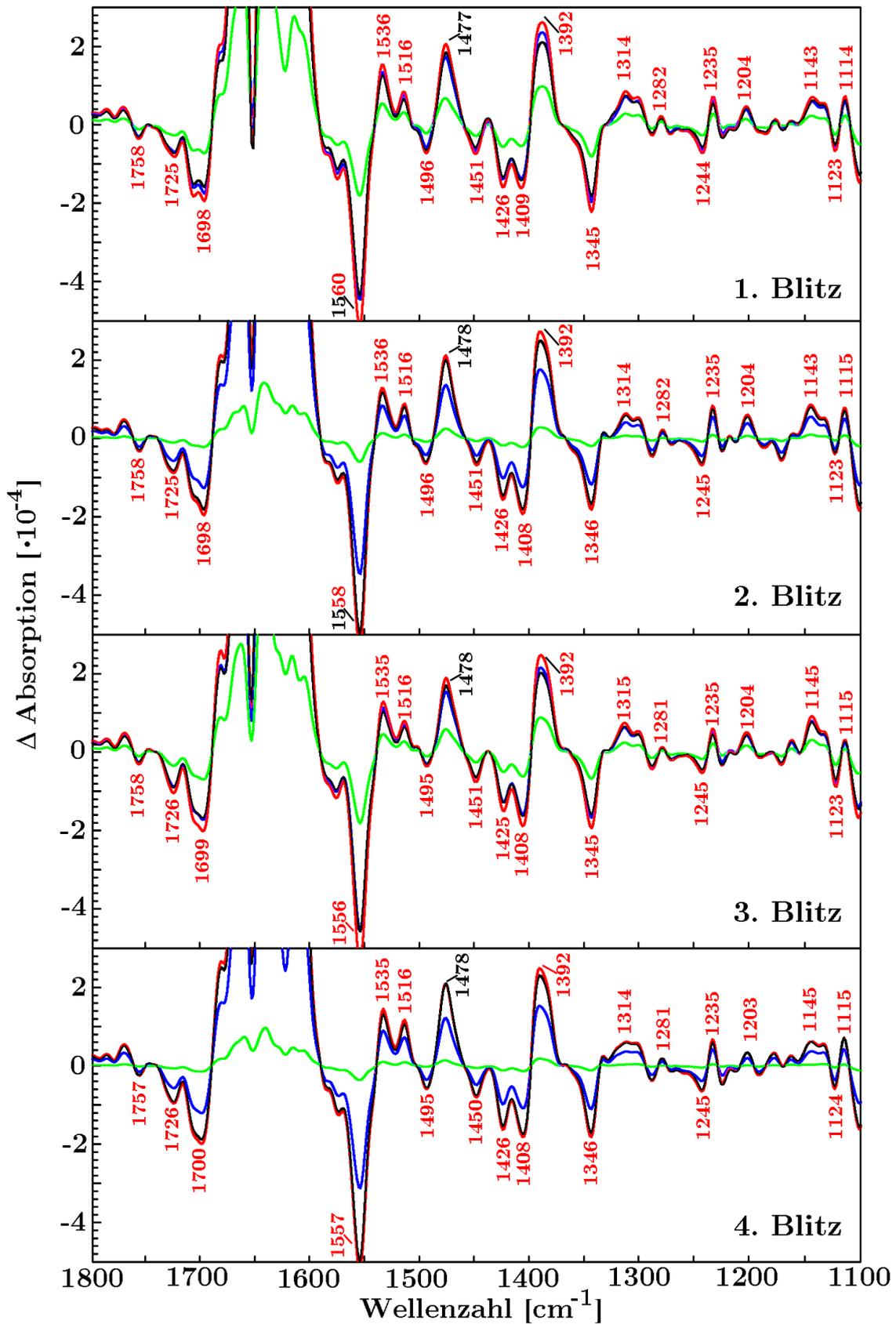


Abbildung 10.1: Die ersten Spektren nach der Blitzanregung ohne Artefaktkorrektur; 12,5 μs (grün), 25 μs (blau), 37,5 μs (rot), 50 μs (schwarz). Außer der Q_A -Bande (schwarz), können alle dominanten Banden dem Laserartefakt zugeordnet werden (rot). Das langsamere Anstiegsverhalten beim zweiten und vierten Blitz durch die versetzte Datenaufnahme ist auch hier gut zu erkennen.

10.1.2 Korrigierte Daten

Die aus der Korrektur resultierenden Spektren erscheinen realistischer, da viele Banden Komponenten des PSII zugeordnet werden können (siehe Abbildung 10.2). In den ersten μs sollten sich die Banden bilden, die im Vergleich zu der Zeitauflösung der Apparatur instantan ablaufen. Dazu gehören die primäre Ladungstrennung, bei der das Akzeptorchinon Q_A reduziert und der Donor Tyr_Z oxidiert wird. Die meisten Banden lassen sich durch einen Vergleich der Mn-freien Proben zuordnen (siehe Tabelle 8.1 und 8.2). Somit lassen sich die Banden bei 1717 cm^{-1} , 1684 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1547 cm^{-1} und 1477 cm^{-1} dem Chinon Q_A zuordnen. Die Banden bei 1708 cm^{-1} , 1525 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} dem Tyr_Z . Die beiden Banden bei 1228 cm^{-1} und 1255 cm^{-1} können einem Hydrogencarbonat, das ein Ligand des Nicht-Häm-Eisens zwischen den Chinonen Q_A und Q_B ist, zugeordnet werden (siehe Kapitel 10.2.3). Auch bei den korrigierten Spektren fällt der langsamere Anstieg der spektralen Amplituden für den zweiten und dritten Übergang auf (siehe Kapitel 9.5.4). Interessant ist auch ein Anstieg im Bereich um 1400 cm^{-1} bei der ersten Blitzanregung, der sich im Vergleich zu den anderen unterscheidet. Hier kann man neben einer Bande des $\text{S1} \rightarrow \text{S2}$ Übergangs und des Tyr_Z eine Bande sehen, die zur Akzeptorseite gehört.

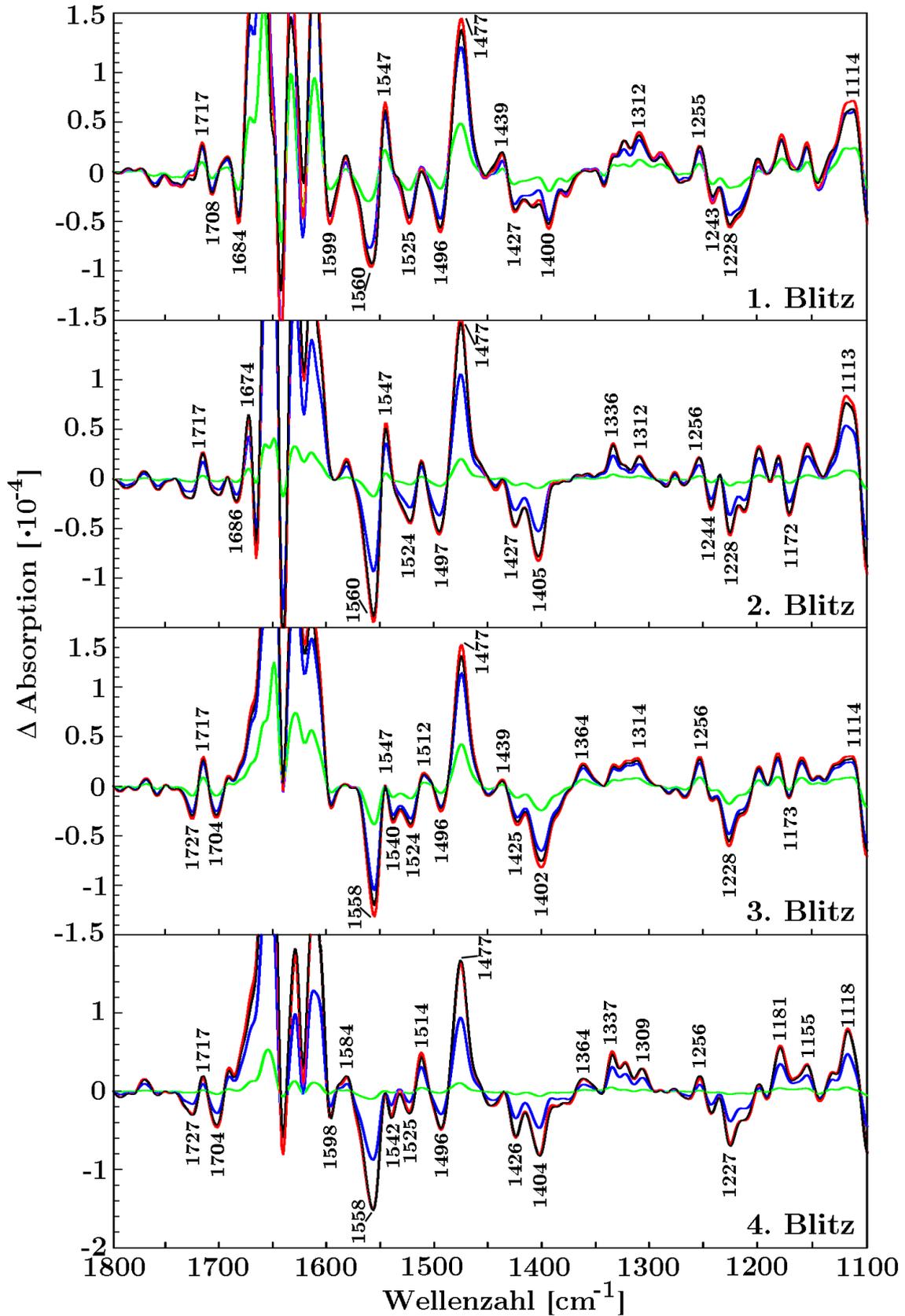


Abbildung 10.2: Die ersten Spektren nach der Blitzanregung mit Artefaktkorrektur; 12,5 μs (grün), 25 μs (blau), 37,5 μs (rot), 50 μs (schwarz). Die Spektren der Änderungen des PSII werden deutlich sichtbar.

10.2 Akzeptorseite

Die Akzeptorseite sollte bei jedem Blitz die gleichen Änderungen aufweisen und somit zu starken Signalen führen. Dies wird durch meine Messungen bestätigt.

10.2.1 Oxidation des Akzeptorchinons Q_A

Die Reduktion des Akzeptorchinons Q_A findet unterhalb der Zeitauflösung der Apparatur statt und entspricht somit einem schnellen Sprung mit der Anstiegszeit der Messvorrichtung. Q_A wird wiederum von dem zugesetzten Elektronenakzeptor Pp-bQ oxidiert. Eine herausragende Bande ist die CO-Streckschwingung bei 1478 cm^{-1} , deren Position aus Untersuchungen mit diversen Inhibitoren, die den $Q_A \rightarrow Q_B$ Elektronentransfer blockieren, bekannt ist [Takano et al., 2008]. Die Absorptionsbande des Q_B liegt neben der Q_A Bande bei 1480 cm^{-1} . Das Maximum meiner Messungen liegt eindeutig bei 1478 cm^{-1} , woraus entweder eine direkte Oxidation des Q_A durch den Elektronenakzeptor oder eine sehr schnelle Oxidation des Q_B nach dem Elektronentransfer folgt. Die Zeitverläufe der ersten drei Blitze zeigen bei 1478 cm^{-1} gut übereinstimmende Kinetiken und Amplituden. Der vierte Übergang konnte nur für 16 ms aufgenommen werden und wird daher nicht gezeigt. Um die Kinetiken zu untersuchen, wurden die drei ersten Zeitverläufe gemittelt und eine Simulation durchgeführt. Um die Anzahl der Datenpunkte zu reduzieren und realistische Werte für die schnellen Zeitkonstanten zu erhalten, wurden die Daten logarithmisch gemittelt. Die Simulation wurde mit einem schnellen Anstieg, einem Artefaktbeitrag für eventuell noch vorhandenen Artefaktstörungen und einer langsamen Zerfallskomponente durchgeführt. Dem schnellen Anstieg entspricht eine Zeitkonstante von $10\text{ }\mu\text{s}$, der langsame Zerfall findet mit einer Zeitkonstante von 22 ms statt.

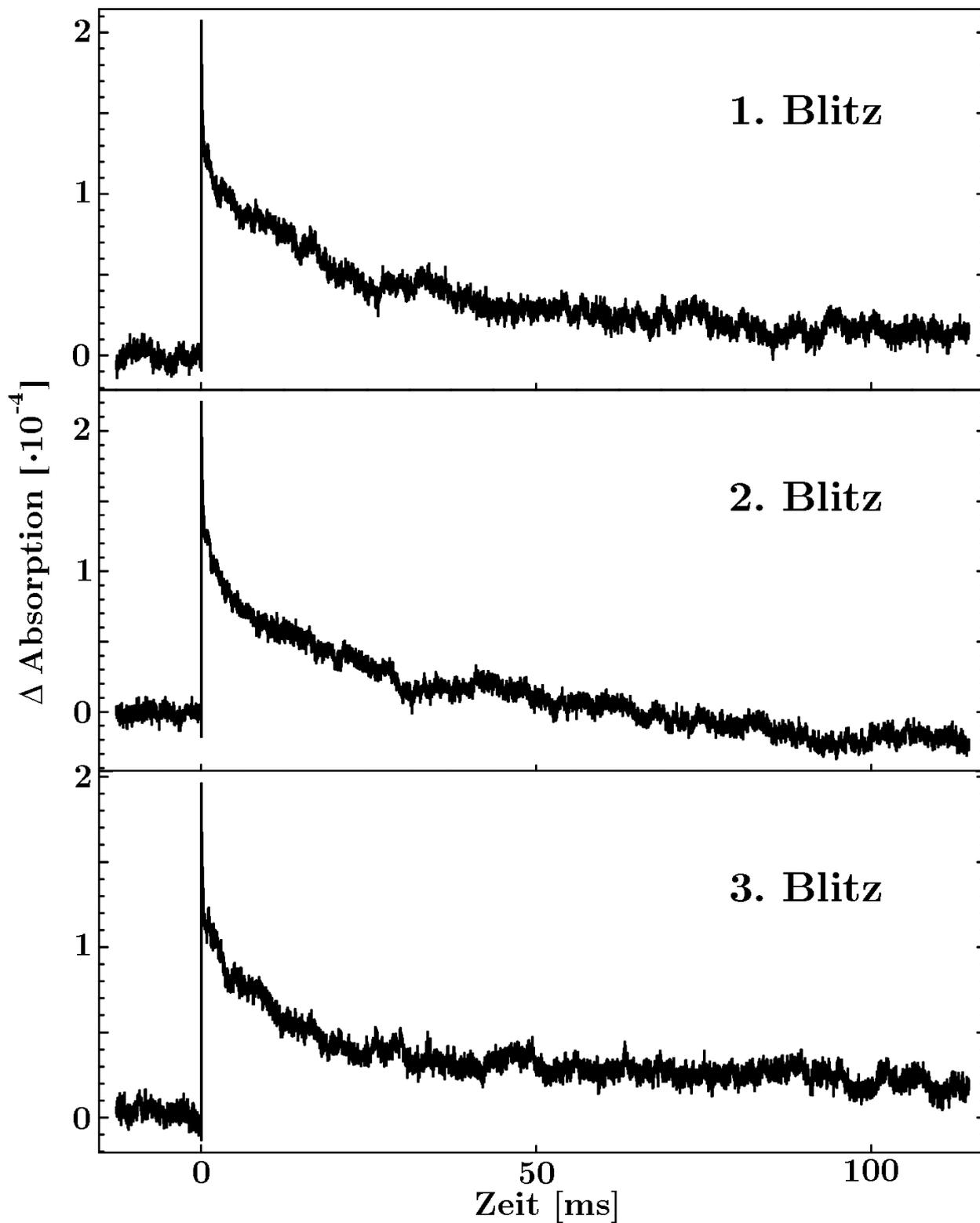


Abbildung 10.3: Um einen Eindruck von dem Signal-Rausch Verhältnis der Messung zu bekommen, wird der $Q_A^- \rightarrow Q_A$ Übergang für die ersten drei Blitze ohne Singulärwertzerlegung und Laserartefaktkorrektur gezeigt.

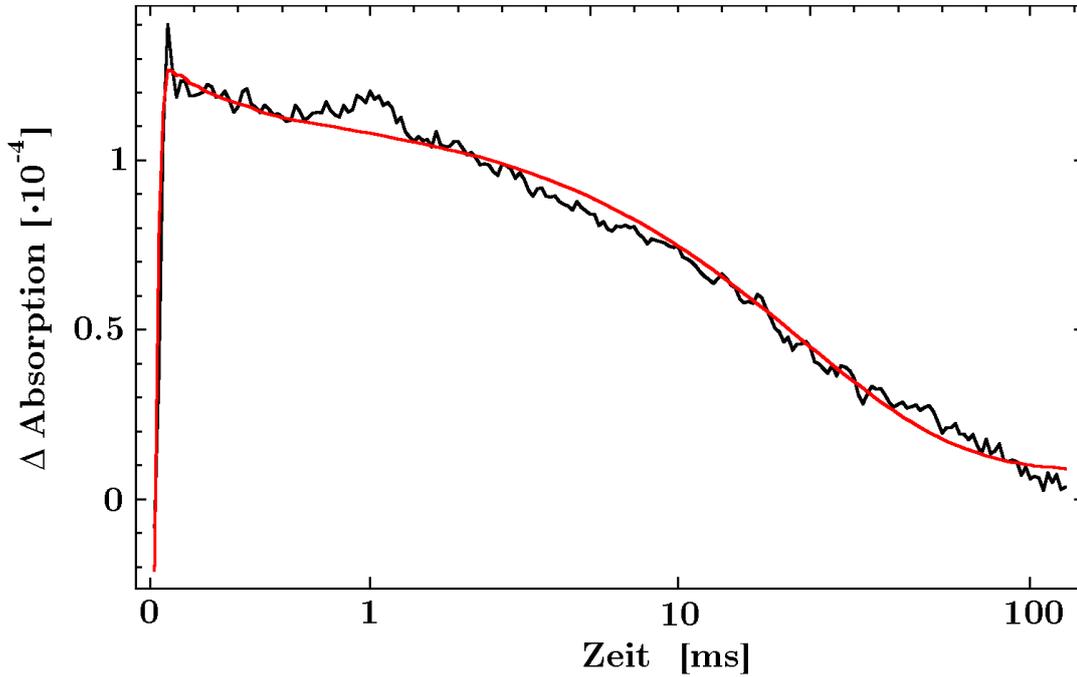


Abbildung 10.4: Eine Simulation (rot) des gemittelten $Q_A^- \rightarrow Q_A$ Übergangs wurde an logarithmisch gemittelten, rauschreduzierten und korrigierten Daten (schwarz) vorgenommen.

10.2.2 Spektren nach 10 ms

9-10 ms nach der Photoanregung sollten alle Übergänge vollständig abgeschlossen sein und auch eventuelle Beiträge des Laserartefaktes sind hier nicht mehr zu erwarten. Die 80 Einzelspektren in diesem Zeitbereich wurden gemittelt. Vergleicht man nun diese gemittelten Spektren der einzelnen Übergänge, so wird deutlich, dass in diesem Zeitbereich die Akzeptorbanden das Spektrum noch immer dominieren. Von den Banden der S-Übergänge ist nur beim ersten Übergang etwas zu erkennen, da dieser, auch bei den Messungen der stationären Zustände, die größten Amplituden aufweist. Dieser Übergang zeigt sich am besten bei den Banden 1500 cm^{-1} und 1444 cm^{-1} . Die Banden dieser Wellenzahlen zeigen sich nur beim $S1 \rightarrow S2$ Übergang. Die Banden bei 1727 cm^{-1} , 1716 cm^{-1} , 1559 cm^{-1} , 1523 cm^{-1} , 1477 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} können dem Chinon Q_A zugeordnet werden (siehe Tabelle 8.1 und 8.2).

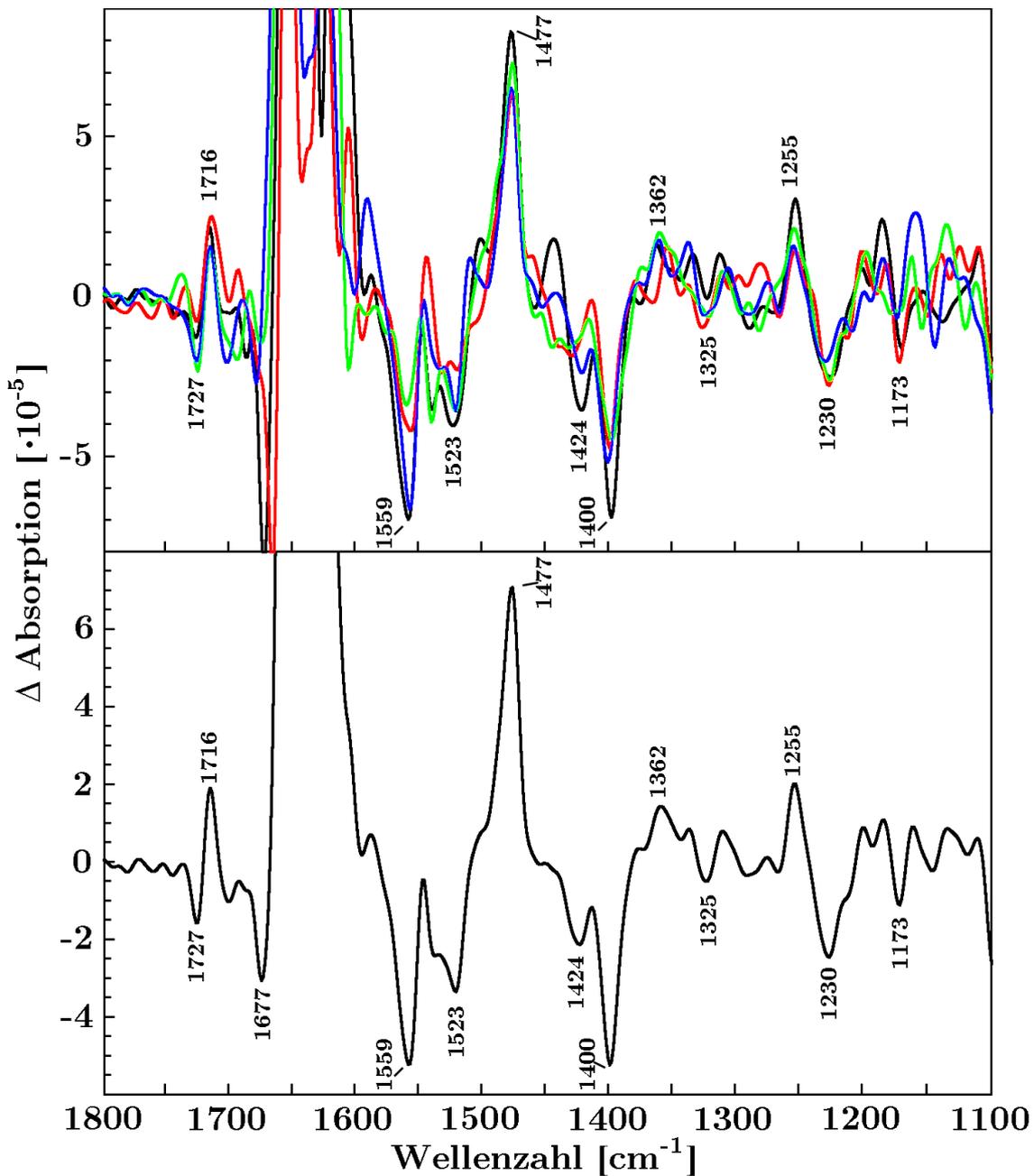


Abbildung 10.5: Die zwischen 9 ms und 10 ms gemittelten Spektren (oben) für die erste (schwarz), zweite (rot), dritte (blau) und vierte (grün) Blitzanregung zeigen große Übereinstimmungen. Beiträge der Akzeptorseite dominieren das Spektrum. Unten ist das gemittelte Spektrum über alle vier Blitzanregungen zu sehen.

10.2.3 Hydrogencarbonat

Zwischen den beiden Chinonen Q_A und Q_B liegt ein Nicht-Häm-Eisen im Fe(II)-Zustand. Dieser prinzipielle Aufbau gilt sowohl für die Photosysteme der Pflanzen, als auch die der Bakterien [Ferreira et al., 2004, Guskov et al., 2009, Deisenhofer und Michel, 1989]. Ein Ligand des Nicht-Häm-Eisens ist ein Hydrogencarbonat bei den Pflanzen [Hienerwadel und Berthomieu, 1995] und ein Glutamat bei den bakteriellen Reaktionszentren (BRZ). Dieses Hydrogencarbonat ist verantwortlich für einige Eigenschaften der Akzeptorseite des PSII. Es beeinflusst die Bindungseigenschaften von Herbiziden, den Elektronentransfer vom Q_A zum Q_B und die Bildung des Hydrochinons nach zweifacher Blitzanregung [van Rensen et al., 1988, Stemler und Murphy, 1985, Eaton-Rye und Govindjee, 1988b, Eaton-Rye und Govindjee, 1988a, Berthomieu und Hienerwadel, 2001]. Es beeinflusst außerdem das Mittelpunktspotential des Eisens (Fe(III)/Fe(II)) von 400 mV und dessen pH-Abhängigkeit [Diner und Petrouleas, 1987, van Rensen et al., 1988, Berthomieu und Hienerwadel, 2001, Ikegami und Katoh, 1973, Bowes et al., 1979, Petrouleas und Diner, 1986]. Die beiden Banden bei 1255 cm^{-1} und 1230 cm^{-1} (siehe Abbildung 10.6) können diesem Hydrogencarbonat zugeordnet werden [Berthomieu und Hienerwadel, 2001]. Diese Zuordnung konnte durch Oxidation des Nicht-Häm-Eisens mittels des Elektronenakzeptors Kaliumhexacyanidoferrat(III) und anschließende Reduktion nach Bildung von Q_A^- durch die photoinduzierte Ladungstrennung gewonnen werden. Dass die beiden Banden nicht dem Eisen sondern dem Hydrogencarbonat zuzuordnen sind, wurde durch einen Austausch des Hydrogencarbonats durch Lactat, Glykolat, und Glyoxylat gezeigt. Messungen der Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) mittels der FTIR-Methode an Mn-freien PSII, und zeitaufgelöste XAS-Messungen an intakten PSII, deuten auf eine einzähnige Bindung des Hydrogencarbonats im Fe(III) und eine zweizähnige Bindung im Fe(II) Zustand hin [Chernev et al., 2011, Hienerwadel und Berthomieu, 1995]. Messungen des Elektronentransfers vom Q_A zum Q_B durch zeitaufgelöste FTIR- und Absorptionsmessungen im UV- bzw. sichtbaren Bereich an BRZ wurden durch eine Oxidation des Nicht-Häm-Eisens von Fe(II) zu Fe(III) und der anschließenden Reduktion während des Elektronentransfers gedeutet [Remy und Gerwert, 2003]. Diese Interpretation konnte nicht durch Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) an BRZ bestätigt werden [Hermes et al., 2006]. Es kommt somit zu keiner Bildung von Fe(III) beim Elektronentransport vom Q_A zum Q_B . Somit können die FTIR-Banden nicht durch die Bildung von Fe(III) erklärt werden. Zeitaufgelöste Eisen-K-Kanten-XAS-

Messungen an intakten PSII mit dem Nicht-Häm-Eisen im Fe(II)-Zustand zeigen bei den photoinduzierten Übergängen, nach Bildung von Q_A^- , spektrale Änderungen, die durch eine Änderung der zweizähnigen Bindung des Hydrogencarbonats zu einer einzähnigen Bindung erklärt werden können (siehe Abbildung 10.7) [Chernev et al., 2011]. Bei der folgenden Oxidation des Q_A^- wird wiederum eine zweizähnigen Bindung gebildet. Die Bildung einer einzähnigen Bindung nach Reduktion der Akzeptorseite wird auch durch theoretische Simulationen mittels der Dichtefunktionaltheorie bestätigt [Chernev et al., 2011]. Somit wird eine Änderung der Ligandenbindung sowohl durch eine Oxidation des Nicht-Häm-Eisens als auch durch eine Reduktion des Chinons Q_A unter Beibehaltung des Fe(II)-Zustands hervorgerufen. Die vorliegenden Messungen lassen den selben Schluss zu. Das sofortige Erscheinen der beiden Banden bei 1255 cm^{-1} und 1230 cm^{-1} kann auf die Änderung der zweizähnigen Bindung des Hydrogencarbonats zu einer einzähnigen Bindung zurückgeführt werden. Die erneute Bildung der einzähnigen Bindung und damit das Verschwinden der Absorptionsbanden erfolgt mit der gleichen Zeitkonstante wie die Oxidation des Q_A^- . Dies bedeutet, dass die einzähnige Bindung mit dem Elektronentransfer zum Q_B oder Elektronenakzeptor wiederhergestellt wird.

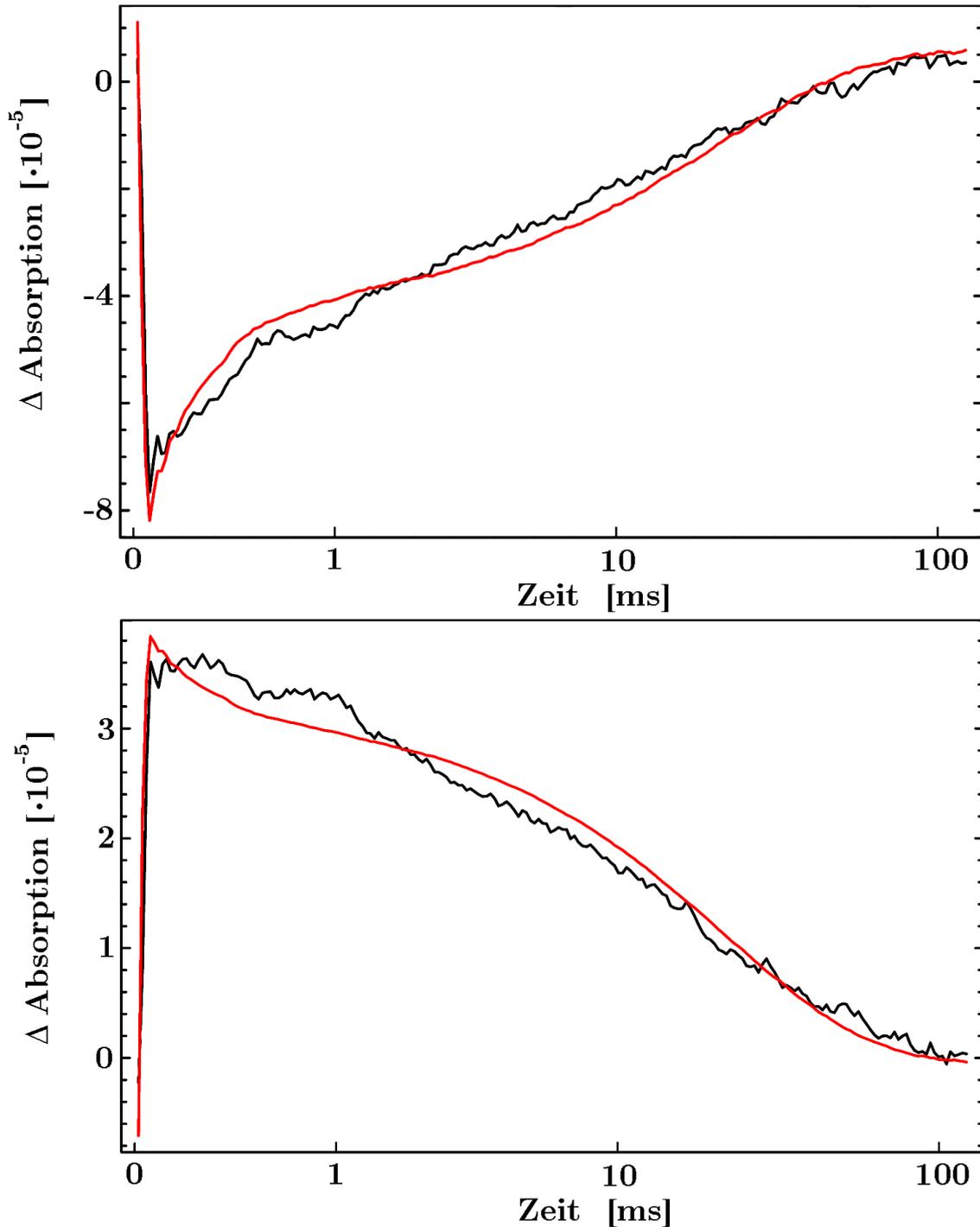


Abbildung 10.6: Gezeigt werden die über die ersten drei Blitze logarithmisch gemittelten spektralen Zeitverläufe (schwarz) bei den Wellenzahlen 1230 cm^{-1} (oben) und 1255 cm^{-1} (unten). In rot ist eine Simulation mit einer schnellen Zeitkonstanten von $10\text{ }\mu\text{s}$ für den Anstieg, der 22 ms Phase analog dem Q_A^- -Zerfall und einem Laserartefaktbeitrag. Die Simulationen ergeben keine perfekte Übereinstimmung. Die Diskrepanzen werden auf Störungen und Drifteffekte zurückgeführt.

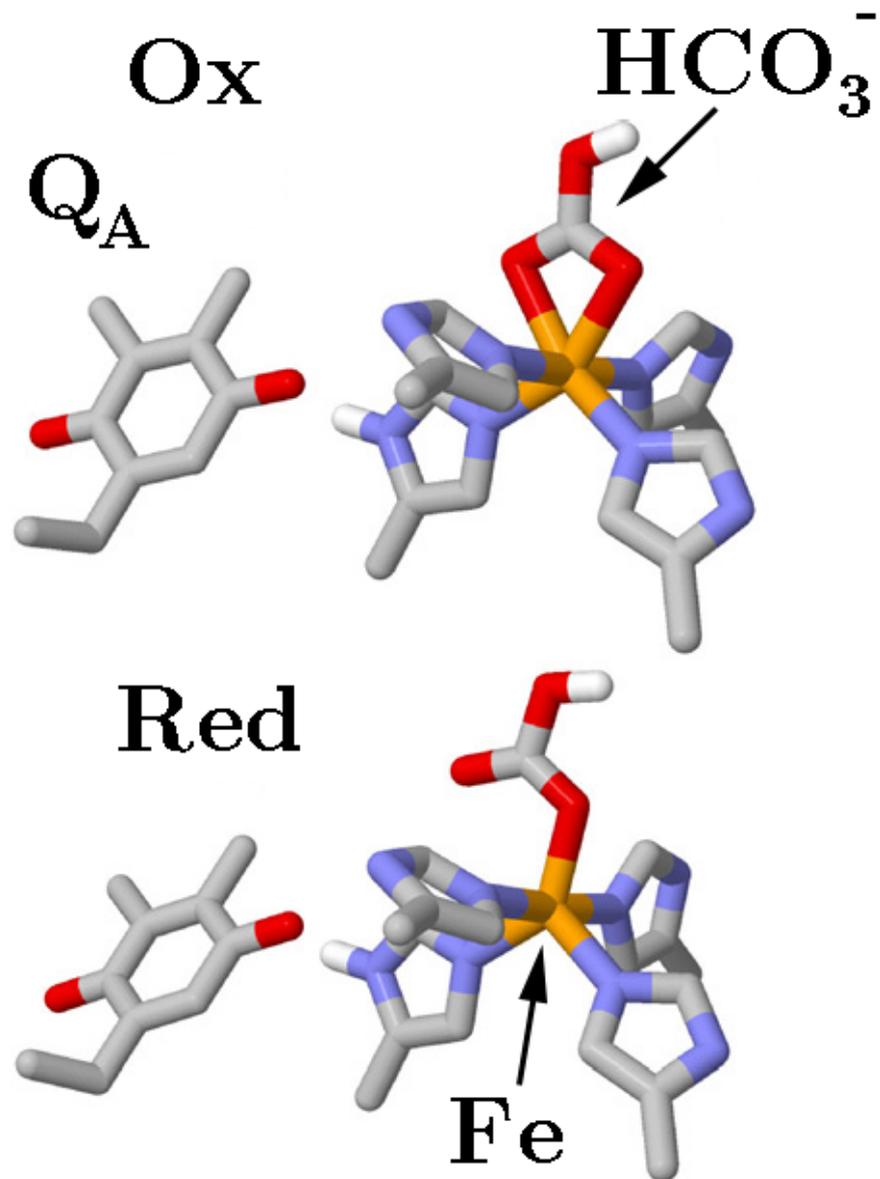


Abbildung 10.7: Ergebniss einer DFT-Simulation aus [Chernev et al., 2011]. Bei oxidierten Q_A liegt eine zweizählige Bindung des Hydrogencarbonats zu dem Nicht-Häm-Eisen vor (oben). Diese Bindung ändert sich zu einer einzähligen Bindung bei einer Reduktion des Q_A (unten)

Bearbeitet nach Vorlage aus [Chernev et al., 2011]

Weitere Bande der Akzeptorseite

Das reine $Q_A \rightarrow Q_A^-$ Spektrum ist aus Messungen an Mn-freien Photosystemen mit dem Inhibitor DCMU, das den Elektronentransfer vom Q_A zum Q_B blockiert, und einem Elektronendonator, wie Hydroxylamin, um den oxidierten primären Donor $P680^+$ zu reduzieren, bekannt [Takano et al., 2008, Berthomieu et al., 1990, Berthomieu et al., 1992, Noguchi et al., 1992, Hienerwadel et al., 1996, Remy et al., 2004]. Die Messungen mit DCMU an PSII Proben mit Mn-Komplex sollten zum einen Banden des Q_A enthalten und außerdem Banden des $S1 \rightarrow S2$ Übergangs aufweisen. Spektren von Mn-freien Photosystemen mit DCMU und einem Elektronendonator sollten nur noch die Banden des Chinons Q_A enthalten. Es fällt auf, dass das reine Q_A -Spektrum keine Komponenten um 1400 cm^{-1} Wellenzahlen aufweist. Bei den Messungen intakter PSII mit DCMU werden diese Banden dem $S1 \rightarrow S2$ Übergang zugeordnet [Noguchi et al., 1992, Remy et al., 2004]. Meine Messungen zeigen jedoch starke Banden in diesem Bereich bei allen Übergängen. Diese Banden verschwinden aber mit einer Zeitkonstanten von 22 ms. Im Prinzip könnten sie von schadhaften Photosystemen stammen, die bei jedem Blitz den ersten Übergang wiederholen. Doch dann sollte diese Bande auch mit der entsprechenden Zeitkonstanten ansteigen. Dies ist nur bei dem Zeitverlauf des ersten Laserblitzes zu sehen. Dieser Zeitverlauf scheint sich aus einem sprunghaften Anstieg, wie bei den weiteren Blitzanregungen, und einer Komponente, die dem $S1 \rightarrow S2$ Übergang entspricht, zusammensetzen. Bei den anderen Blitzen ist nur der prompte Anstieg zu sehen. Die Bande ist auch noch nach 10 ms zu sehen und kann daher nicht auf Tyr_Z zurückgeführt werden, das ebenfalls eine Bande bei 1400 cm^{-1} aufweist (siehe Tabelle 8.1 und 8.2). Der Zerfall dieser prompten Bande entspricht der 22 ms Zeitkonstante der Q_A -Oxidation. Dies spricht dafür, dass diese Bande durch die Akzeptorseite verursacht wird. Allerdings wird ihre Ursache durch die Entfernung des Mn-Komplexes ebenfalls entfernt, denn bei diesen Proben verschwindet diese Bande (siehe Kapitel 8.3.1).

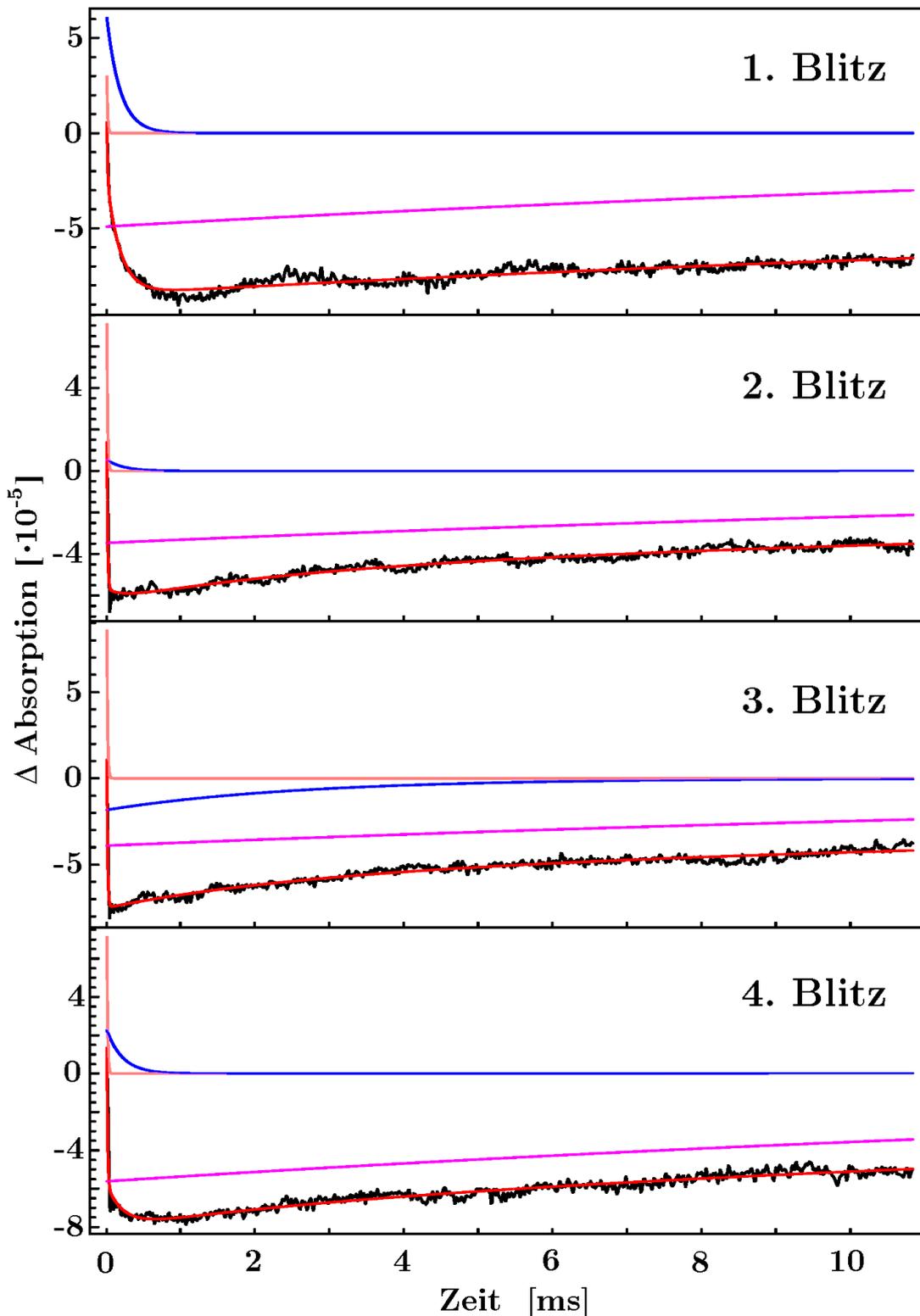


Abbildung 10.8: Der erste Übergang zeigt bei 1400 cm^{-1} einen Anstieg mit einer Zeitkonstante, die dem $\text{S1} \rightarrow \text{S2}$ Übergang entspricht. Die folgenden Übergänge zeigen keine solche langsame Phase. Nur der vierte Übergang zeigt einen kleinen Anteil, der wahrscheinlich aus einem S2 -Anteil vor der ersten Blitzanregung stammt. Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S -Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen.

10.2.4 22 ms Phase der Simulation

Wie die Simulation der Q_A -Bande zeigt, erfolgt die Relaxation der Akzeptorseite in ihren Grundzustand mit einer Zeitkonstanten von 22 ms. Die Amplituden dieser Phase (siehe Abbildung 10.9) sollten also dem Spektrum der Akzeptorseite entsprechen. Im Großen und Ganzen wird dies bestätigt, wobei es durchaus Ausnahmen gibt, wie z.B. bei 1530 cm^{-1} , wo positive Amplituden simuliert wurden, die bei anderen Übergängen nicht auftreten. Tatsächlich ist gerade bei dieser Wellenzahl die Bande des Spektrums nach 110 ms, also kurz vor der nächsten Blitzanregung, im Vergleich zu dem Spektrum der stationären Zustände viel zu klein, ja sogar negativ anstatt positiv. Solche Fehler stammen von Drifteffekten, die schon in den Rohdaten enthalten sind und nicht von der Photoreaktion stammen. Diese Drifteffekte stören die korrekte Ausbildung der Spektren zu späteren Zeitpunkten. Die Banden bei 1727 cm^{-1} , 1716 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} , 1522 cm^{-1} , 1476 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} lassen sich dem Chinon Q_A zuordnen (siehe Tabelle 8.1 und 8.2). Die beiden Banden bei 1255 cm^{-1} und 1229 cm^{-1} lassen sich wiederum dem Hydrogencarbonat zuordnen (siehe Kapitel 10.2.3), das ein Ligand des Nicht-Häm-Eisens zwischen dem Q_A und dem Q_B ist. Die Bande bei 1547 cm^{-1} könnte sich aus einer Bande des Q_A bei 1542 cm^{-1} und einer Bande des Hydrogencarbonats bei 1552 cm^{-1} zusammensetzen.

10.2.5 Vergleich der 10 ms Spektren mit der 22 ms Phase

Ein Vergleich der Spektren 10 ms nach Blitzanregung mit der 22 ms Phase der Simulation (siehe Abbildung 10.10) sollte Übereinstimmungen zeigen, da beide Spektren hauptsächlich der Akzeptorseite zuzuordnen sind. Dies wird bestätigt, wenn es auch Abweichungen gibt. Die Hauptursache für Diskrepanzen der beiden Spektren ist hauptsächlich auf Driftvorgänge, die sich in der 22 ms Phase der Simulation zeigen, zurückzuführen.

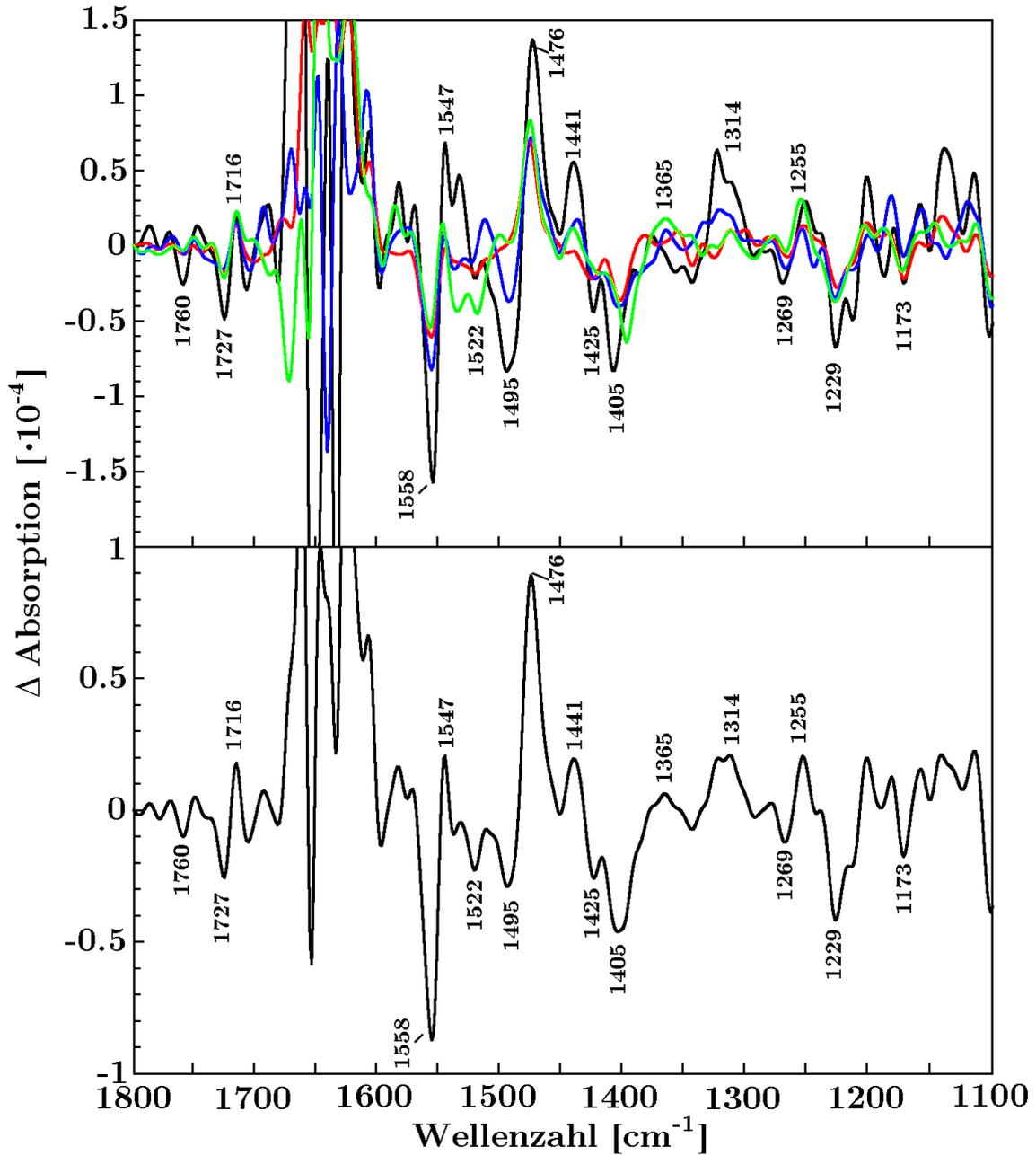


Abbildung 10.9: Die Amplituden der langsamen 22 ms Phase (oben) für die erste (schwarz), zweite (rot), dritte (blau) und vierte (grün) Blitzanregung. Diese Phase steht für die Relaxation der Akzeptorseite. Störungen stammen von Driftvorgängen aus den Rohdaten. Unten ist das gemittelte Amplitudenspektrum über alle vier Blitzanregungen zu sehen.

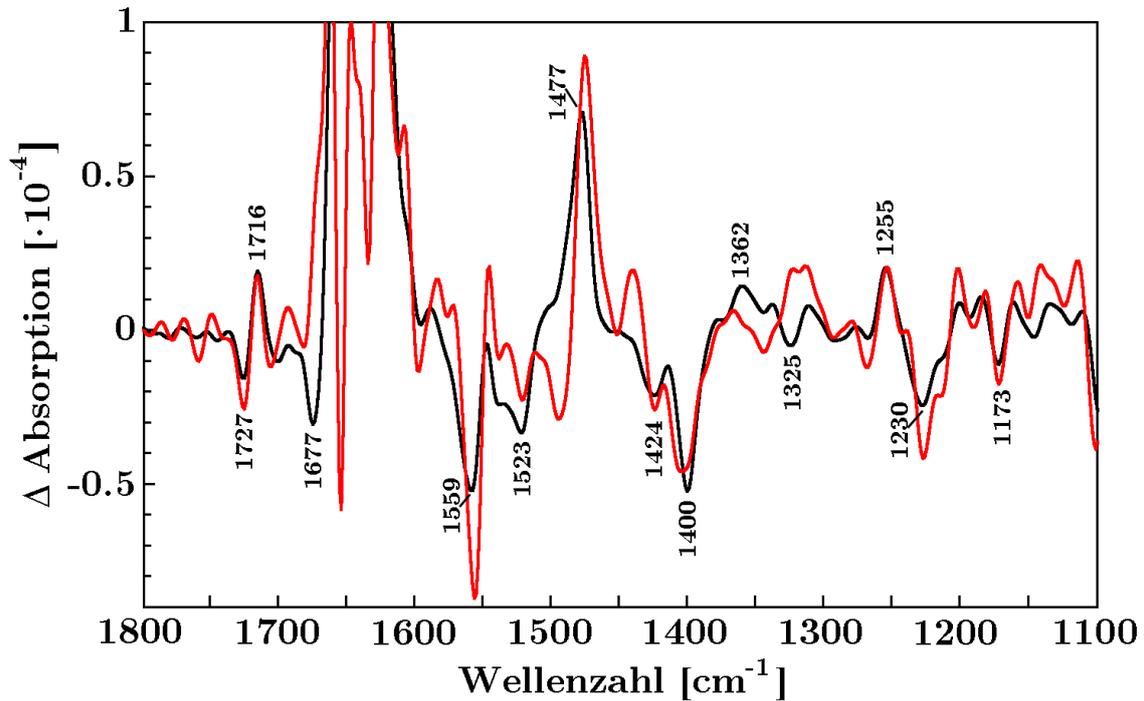


Abbildung 10.10: Vergleich des gemittelten Spektrums zwischen 9 ms und 10 ms (schwarz) und der gemittelten 22 ms Phase (rot). Unterschiede sind auf Driftvorgänge der Rohdaten zurückzuführen, die auch dazu führen, dass die Endspektren des zweiten und dritten Überganges unter die Rauschgrenze fallen.

10.3 Donorseite

Die Donorseite ist von besonderem Interesse, da hier das katalytische Zentrum des Photosystems liegt.

10.3.1 Vergleich der Simulationsamplituden mit den Spektren der stationären Zustände

Im Folgenden werden die Amplitudenspektren der zu den entsprechenden Übergängen gehörigen Phasen der Simulation mit den gemessenen Übergangsspektren verglichen. Da eine negative Amplitude der Simulation dem Anstieg einer Bande entspricht, werden jeweils die mit -1 multiplizierten Amplitudenspektren gezeigt. Im Idealfall sollten die Amplitudenspektren den Übergangsspektren plus einem An-

teil des Tyrosin Z entsprechen.

S1 → S2

Das Amplitudenspektrum der 182 μs Phase zeigt gute Übereinstimmungen mit dem Übergangsspektrum. Unterschiede bei 1118 cm^{-1} , 1244 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} , 1513 cm^{-1} , 1693 cm^{-1} , 1705 cm^{-1} und 1733 cm^{-1} lassen sich durch Tyrosin Z Banden erklären (siehe Kapitel 10.3.3). Die große Abweichung bei 1478 cm^{-1} liegt genau bei der Q_A Bande.

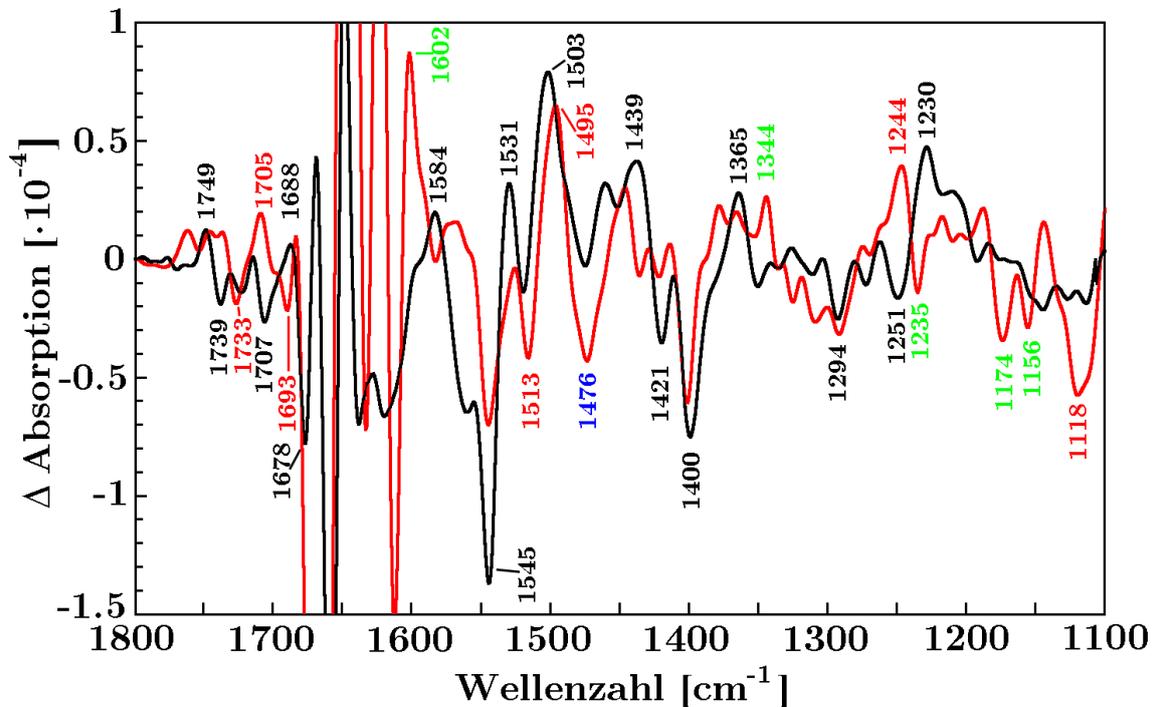


Abbildung 10.11: Der Vergleich einer Rapid-Scan-Messung (schwarz, Amplitude verdoppelt zum besseren Vergleich) des S1 → S2 Übergangs mit der simulierten 182 μs Phase der Simulation der ersten Blitzanregung. Die Amplituden der 182 μs Phase sollten dem Übergangsspektrum plus den Beiträgen der Tyr_Z -Banden entsprechen. Banden des S1 → S2 Übergangs sind schwarz, Banden, die dem Tyr_Z zugeordnet werden können, sind rot markiert. In blau ist die Q_A -Bande markiert und Banden, die sich nicht zuordnen lassen, sind grün markiert.

S2→S3

Einige Zeitverläufe nach der zweiten Blitzanregung weisen eine ms Phase auf. Auch zeigt das Amplitudenspektrum einer Simulation nur mit einer 225 μ s Phase keine gute Übereinstimmung mit dem zweiten Übergangsspektrum. Deshalb wurde, unter der Annahme, dass es durch einen S2-Anteil vor der ersten Blitzanregung schon zu S3→S0 Übergängen kommt, mit einer zusätzlichen 2,65 ms Phase simuliert. Dieses Vorgehen ist nicht unkritisch, da es oft zu gegenläufigen Amplituden kommt, die allerdings auch von den beiden Übergängen erwartet werden. Somit ist die Trennung zwischen fehlerhafter Simulation und echten spektralen Beiträgen schwer. Ein S2-Anteil vor der ersten Blitzanregung könnte durch eine fehlerhafte Einstellung des Anregungslasers verursacht werden. Der Vergleich der Übergangsspektren mit den Simulationsamplituden zeigt jedenfalls einige Übereinstimmungen. Auch können wieder einige fehlende Übereinstimmungen z.B. bei 1118 cm^{-1} , 1244 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} und 1733 cm^{-1} auf Tyrosin Z Reaktionen zurückgeführt werden (siehe Kapitel 10.3.3).

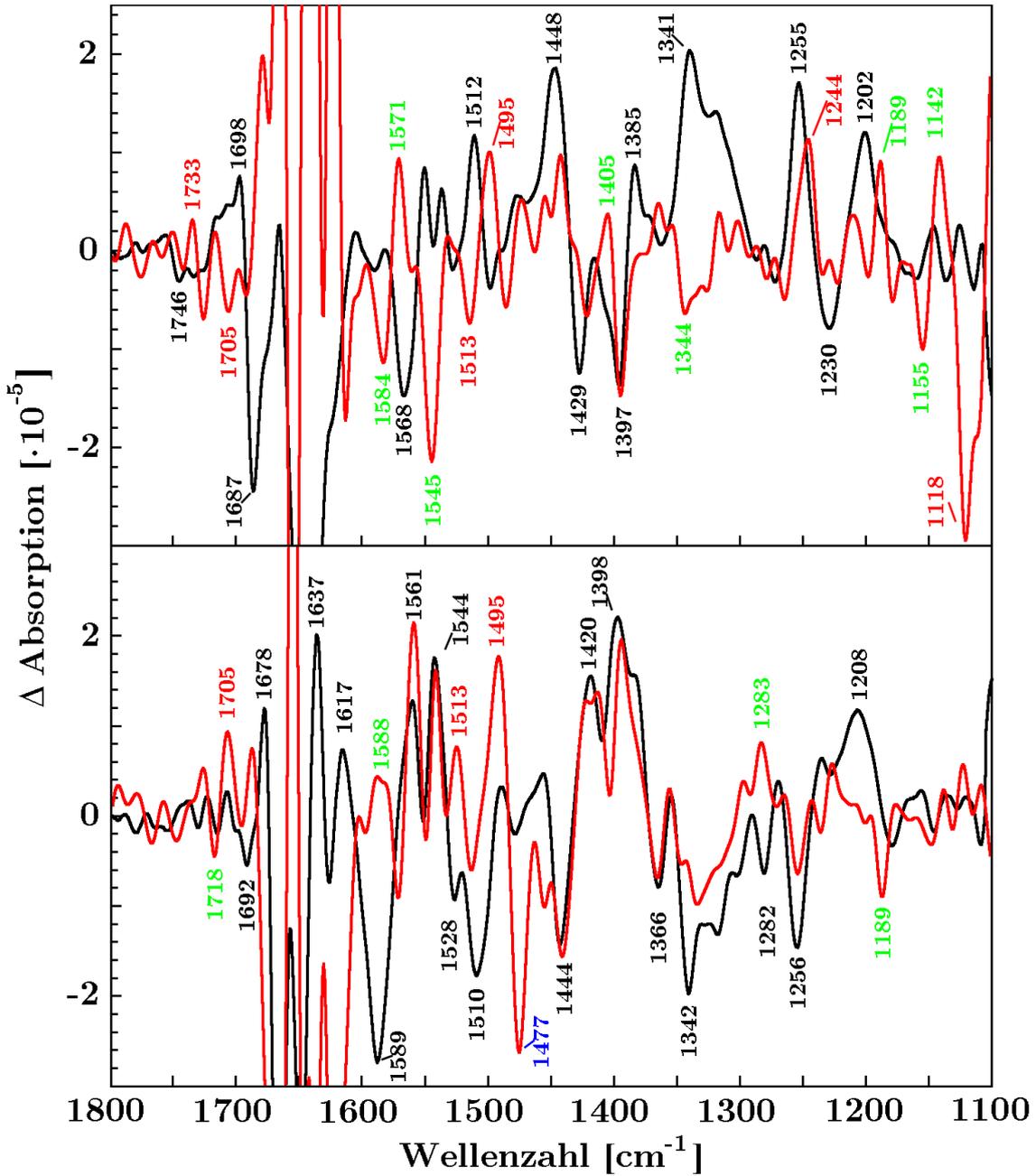


Abbildung 10.12: Der Vergleich einer Rapid-Scan Messung (schwarz) des S2→S3 Übergangs (oben) und des S3→S0 Übergangs (unten) mit der 225 μs Phase bzw. der 2,65 ms Phase (Phasenamplituden zum besseren Vergleich mal 3 multipliziert) der Simulation der zweiten Blitzanregung. Durch einen S2-Anteil vor dem ersten Blitz scheinen einige Zentren schon bei der zweiten Laseranregung den S3→S0 Übergang zu vollziehen. Banden der S-Übergänge sind schwarz, Banden, die dem Tyr_Z zugeordnet werden können, sind rot markiert. In blau ist die Q_A-Bande markiert und Banden, die sich nicht zuordnen lassen, sind grün markiert.

S3→S0

Die Simulation der 2,65 ms Phase zeigt ebenfalls gute Übereinstimmungen mit dem entsprechenden Übergangsspektrum. Auch weist es denselben Fehler bei 1478 cm^{-1} auf wie er beim ersten Übergang und der ms-Phase des zweiten Überganges zu sehen ist. Die fehlenden Übereinstimmungen bei 1118 cm^{-1} , 1244 cm^{-1} , 1263 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} , 1513 cm^{-1} , 1693 cm^{-1} , 1705 cm^{-1} und 1733 cm^{-1} lassen sich wiederum auf die Reaktionen am Tyrosin Z zurückführen (siehe Kapitel 10.3.3).

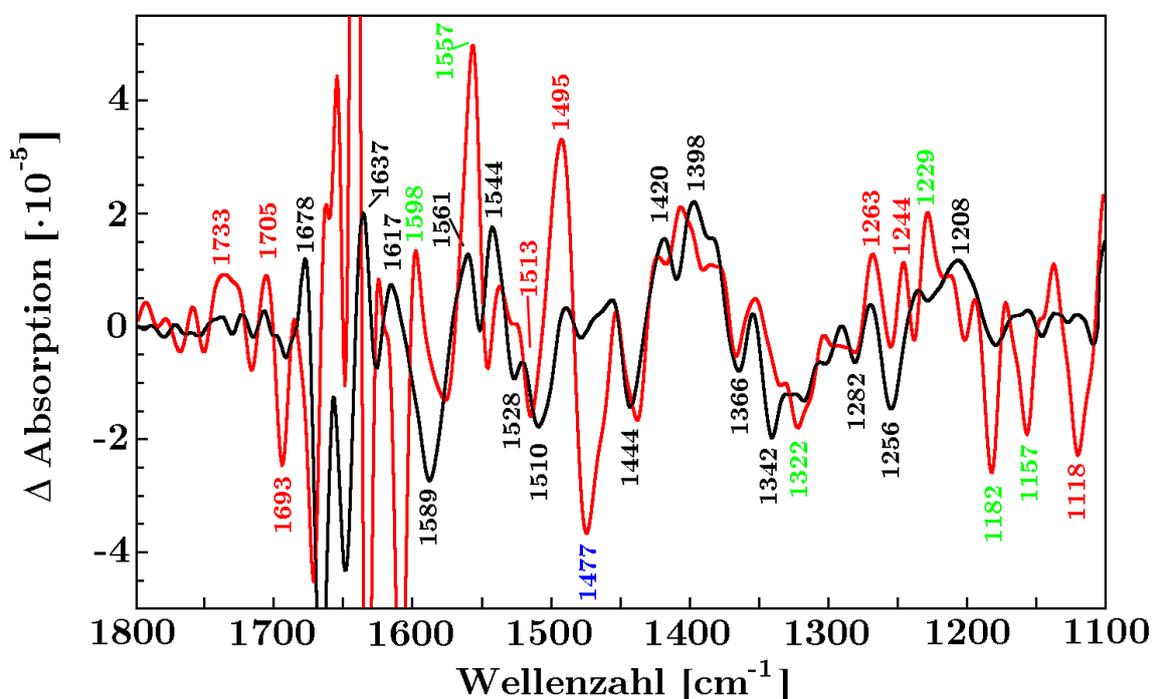


Abbildung 10.13: Der Vergleich einer Rapid-Scan Messung (schwarz) des S3→S0 Übergangs mit der 2,65 ms Phase der Simulation der dritten Blitzanregung. Banden des S3→S0 Übergangs sind schwarz, Banden, die dem Tyr_Z zugeordnet werden können, sind rot markiert. In blau ist die Q_A-Bande markiert und Banden, die sich nicht zuordnen lassen, sind grün markiert.

S0→S1

Beim vierten Übergang sind die Übereinstimmungen am geringsten. Eine mit der Blitzzahl ansteigende Durchmischung, eine kleine Amplitude des S0→S1 Übergangsspektrums und Reste des Laserartefaktes stören die Zeitverläufe zu stark. Auch die Übereinstimmungen der 2.65 ms Phase mit dem dritten Übergangsspektrum sind nicht mehr so ausgeprägt wie bei der zweiten und dritten Blitzanregung. Simulationen, die eine 182 μ s Komponente, verursacht durch S2-Anteile vor der ersten Blitzanregung, mit einbeziehen, führen zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.

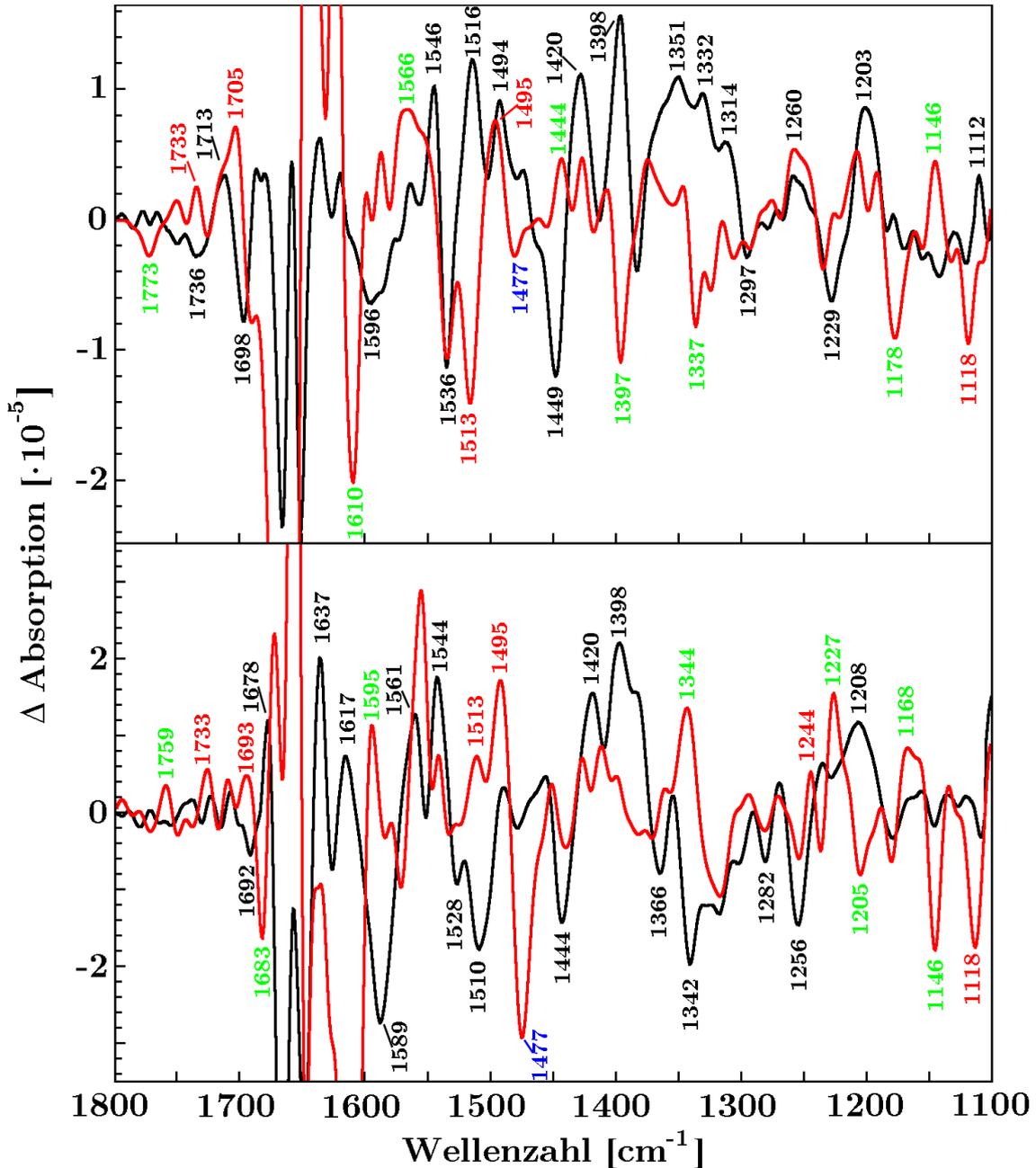


Abbildung 10.14: Der Vergleich einer Rapid-Scan Messung (schwarz) des $S_0 \rightarrow S_1$ Übergangs (oben) und des $S_3 \rightarrow S_0$ Übergangs (unten) mit der simulierten 215 μs Phase bzw. der 2,65 ms Phase (Phasenamplituden zum besseren Vergleich mal 3 multipliziert) der Simulation der vierten Blitzanregung. Die Übereinstimmungen der 215 μs Phase mit dem Übergangsspektrum sind durch die ansteigende Durchmischung der Zustände und störende Reste des Laserartefaktes nur gering. Banden der S-Übergänge sind schwarz, Banden, die dem Tyr_Z zugeordnet werden können, sind rot markiert. In blau ist die Q_A -Bande markiert und Banden, die sich nicht zuordnen lassen, sind grün markiert.

10.3.2 Vergleich der Endspektren mit den Spektren der stationären Zustände

Als Endspektren werden die gemittelten Spektren zwischen 109 ms und 110 ms nach der Blitzanregung bezeichnet. Wegen der limitierten Anzahl an Datenpunkten sind diese Spektren nur bei den ersten drei Blitzen vorhanden. Das Endspektrum des ersten Überganges zeigt noch gute Übereinstimmungen mit dem Spektrum des S1→S2 Überganges. Bei den weiteren Übergängen ist die Amplitude schon nahe dem Rauschniveau und Drifteffekte in den Rohdaten stören die Ausbildung der korrekten Endspektren erheblich.

S1→S2

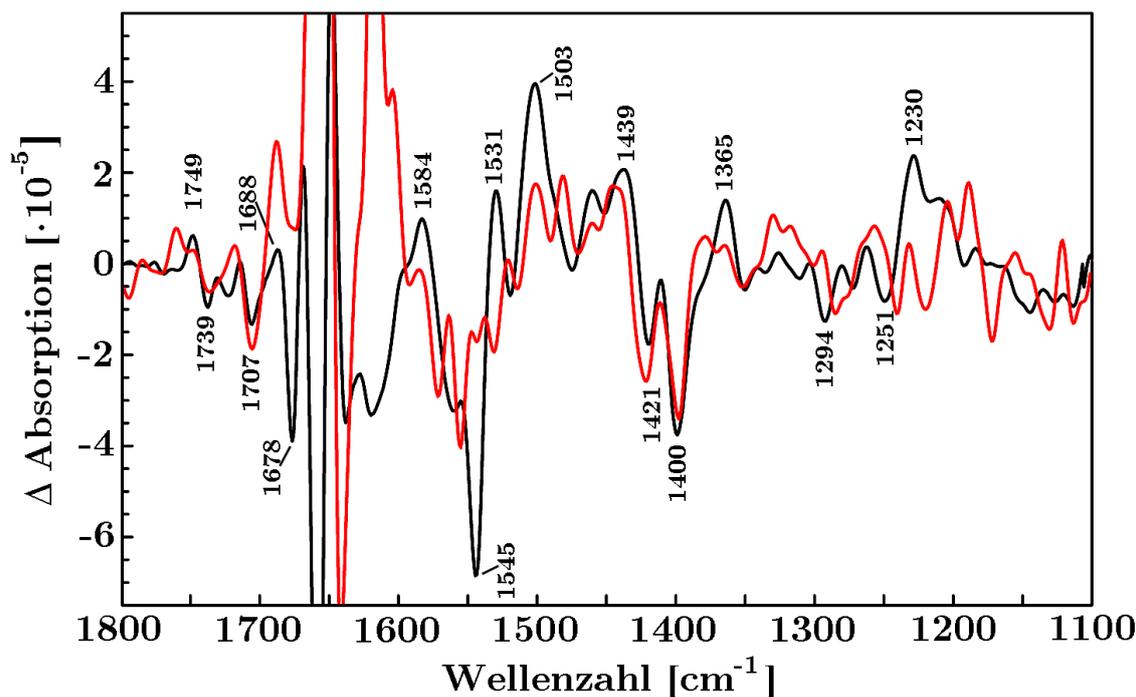


Abbildung 10.15: Der Vergleich einer Rapid-Scan Messung des S1→S2 Übergangs (schwarz) mit dem Endspektrum der ersten Blitzanregung (rot).

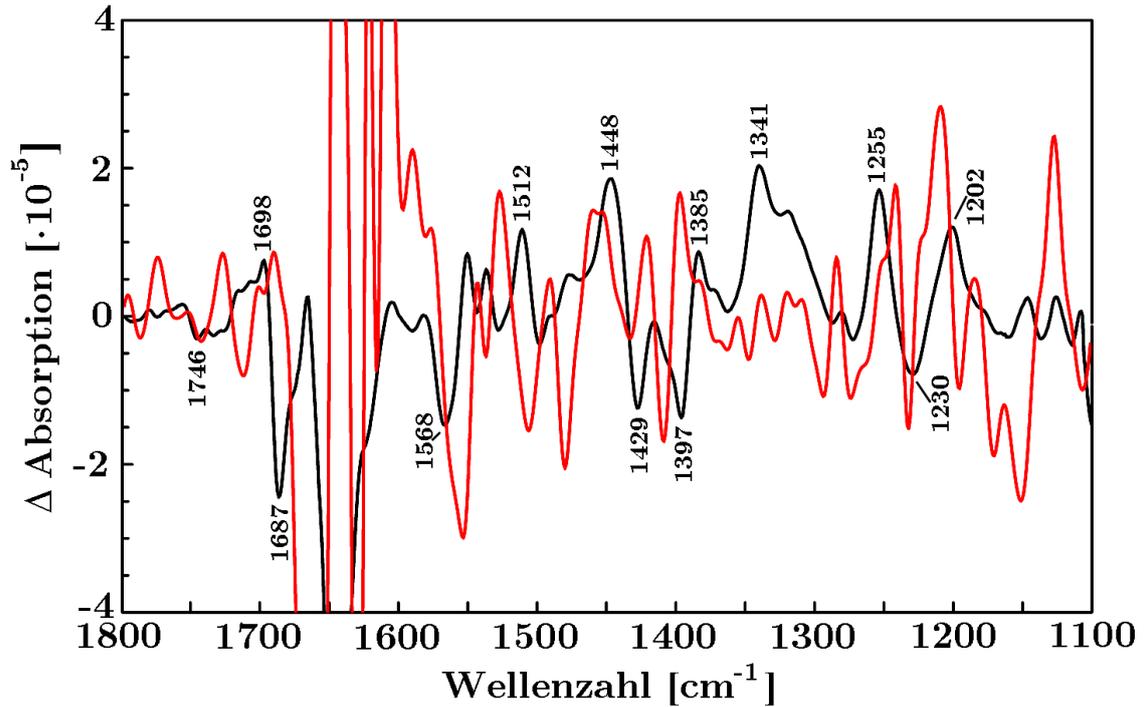


Abbildung 10.16: Der Vergleich einer Rapid-Scan Messung des S2→S3 Übergangs (schwarz) mit dem Endspektrum der ersten Blitzanregung (rot).

S3→S0

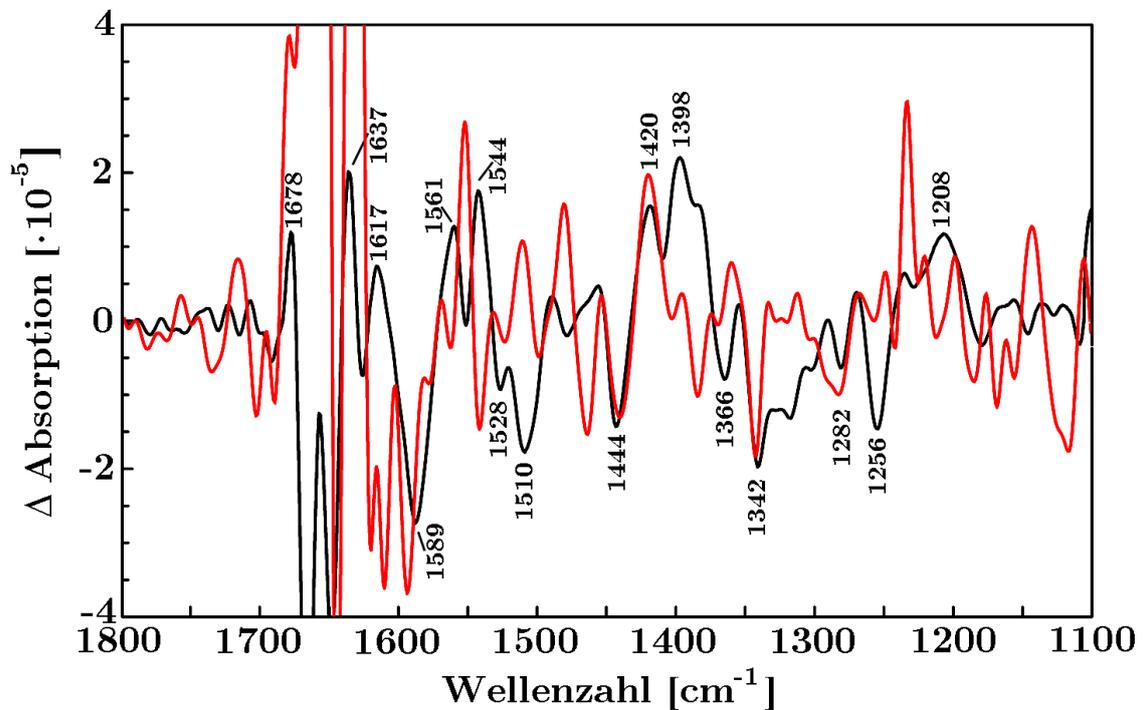


Abbildung 10.17: Der Vergleich einer Rapid-Scan Messung des S3→S0 Übergangs (schwarz) mit dem Endspektrum der ersten Blitzanregung (rot).

10.3.3 Tyrosin Z

Außer bekannten Banden aus den Messungen der stationären Zustände werden bei den Übergängen Banden erwartet, die von der Oxidation und der anschließenden Reduktion des Tyrosin Z stammen. Durch die Oxidation wird ein prompter Sprung erwartet, da sie schneller als die Zeitauflösung des Experimentes abläuft. Die anschließende Reduktion durch den Mn-Komplex findet mit den jeweiligen Zeitkonstanten der Übergänge statt. In der Literatur sind einige Tyrosin Banden des PSII bekannt [Berthomieu et al., 1998, Hienerwadel et al., 1997, Zhang et al., 1997]. Allerdings stammen diese Daten von Photosystemen ohne Mn-Komplex. Das Vorhandensein des Mn-Komplexes könnte durchaus einen Einfluss auf die jeweiligen Bandenpositionen haben. Meine Messungen zeigen an einer Vielzahl von Wellenzahlen ein Zeitverhalten, das dem Tyrosin direkt oder dessen Umgebung entstammen könnte. Eine wichtige positive Bande, die aus der Literatur bekannt ist liegt bei 1513 cm^{-1} und konnte durch $^{13}\text{C}_1(4) - \text{Tyr}_Z$ Markierung der $\nu(\text{CO})$ Streckschwingung des Tyr_Z zugeordnet werden, da dieser Marker hauptsächlich die C4-O Bindung beeinflusst. Diese Markierung führt zu einer deutlichen Bandenverschiebung zu 1485 cm^{-1} [Berthomieu et al., 1998]. Meine Messungen zeigen bei dieser Bande (1513 cm^{-1}) eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen Übergang, wobei die Reduktion des Tyrosins als Phase mit der zum jeweiligen Übergang gehörenden Zeitkonstante nachvollziehbar ist (siehe Abbildung 10.18). Somit kann diese Bande dem Tyrosin zugeordnet werden.

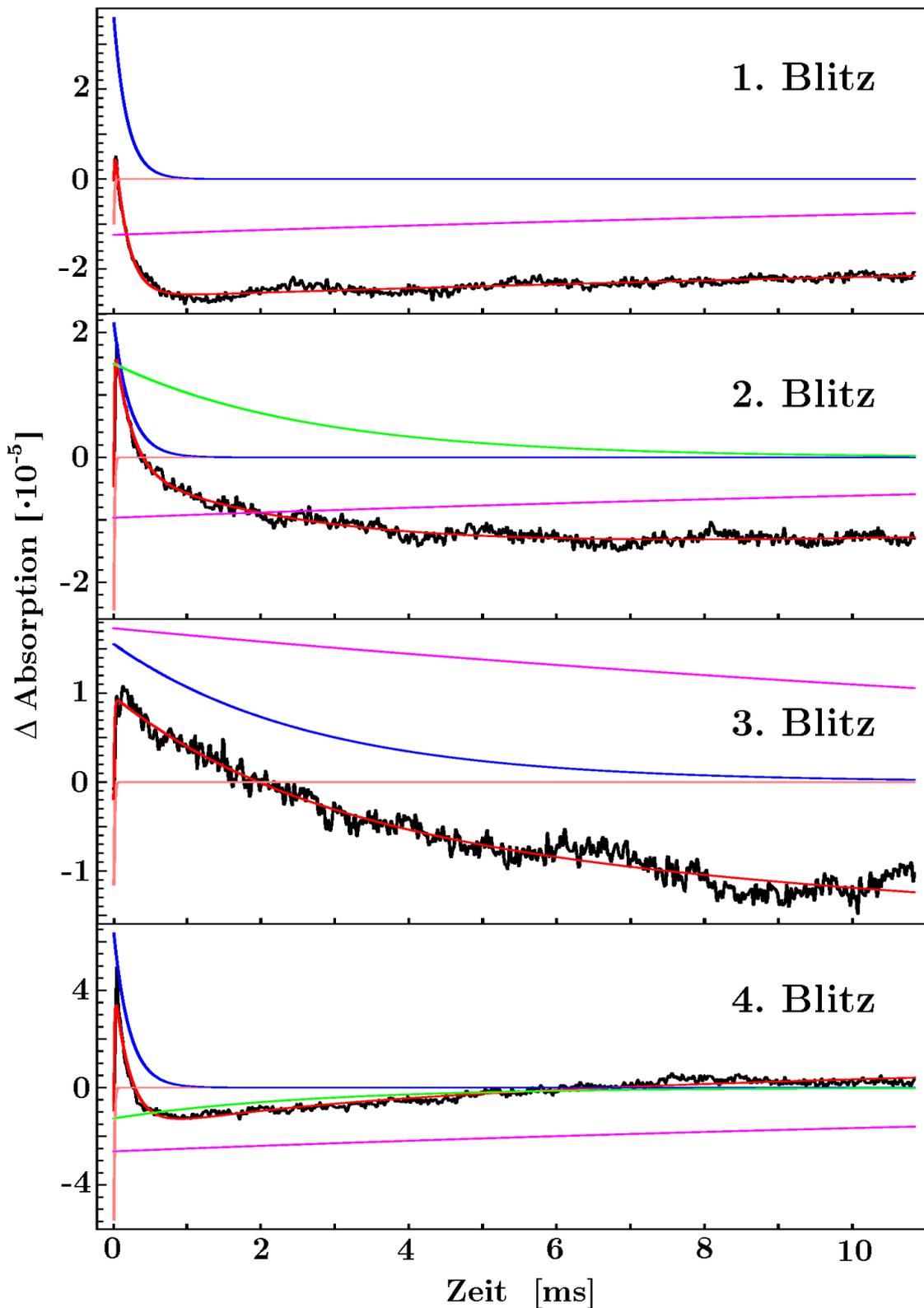


Abbildung 10.18: Zeitverläufe bei 1513 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

Es wurde außerdem vorgeschlagen, die Deformationsschwingung $\delta(\text{COH})$ im Vergleich mit Untersuchungen an der Modellverbindung p-Methylphenol der Wellenzahl 1252 cm^{-1} zuzuordnen [Hienerwadel et al., 1997], die eine breite negative Bande aufweist. Eine Markierung mittels $^{13}\text{C}_1(4) - \text{Tyr}_Z$ führt zu einem breiten Signal bei etwa 1234 cm^{-1} . Bei meinen Daten könnten diese Bande der Wellenzahl 1244 cm^{-1} entsprechen (siehe Abbildung 10.19). Sowohl bei [Berthomieu et al., 1998] als auch bei [Zhang et al., 1997] wird eine positive Tyrosinbande bei 1699 cm^{-1} bei Mn-freien Photosystemen diskutiert. Diese Banden befinden sich in der Absorptionsregion der Carbonylgruppe und könnten vom Grundgerüst der Polypeptide oder von Kofaktoren der Chlorophylle stammen. Der Bande bei 1699 cm^{-1} entspricht bei meinen Messungen eine positive Bande bei 1693 cm^{-1} (siehe Abbildung 10.24). Einer negativen 1646 cm^{-1} Bande bei [Berthomieu et al., 1998] könnte die 1641 cm^{-1} Bande bei meinen Messungen entsprechen (siehe Abbildung 10.23). Eine ebenfalls sehr prominente Bande, die in den Spektren von [Berthomieu et al., 1998] sichtbar ist aber nicht diskutiert wurde, liegt bei etwa 1080 cm^{-1} . Dieser Bande könnte 1118 cm^{-1} bei meinen Messungen entsprechen (siehe Abbildung 10.21). Der Bereich um 1730 cm^{-1} zeigt bei [Berthomieu et al., 1998] ebenfalls kleinere Absorptionsänderungen, auf die nicht näher eingegangen wird. Diesen Banden könnte die 1733 cm^{-1} Bande zuzuordnen sein (siehe Abbildung 10.20). Eine weitere Bande, die dem Tyrosin entstammen könnten, liegt bei 1495 cm^{-1} (siehe Abbildung 10.22). Diese Bande zeigt schon beim zweiten Übergang ms Anteile. Sie scheint somit sehr sensitiv für den $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ Übergang zu sein.

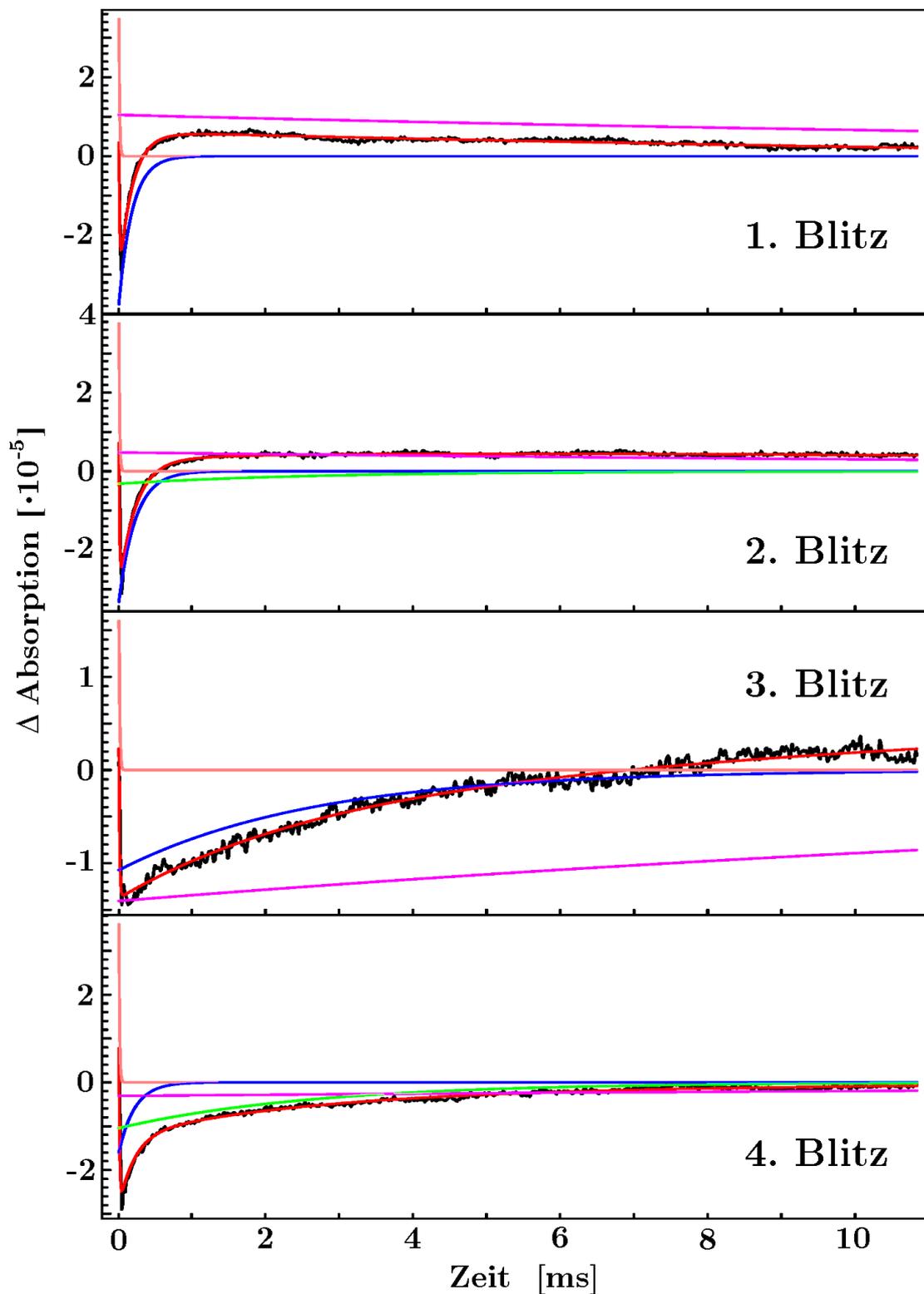


Abbildung 10.19: Zeitverläufe bei 1244 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

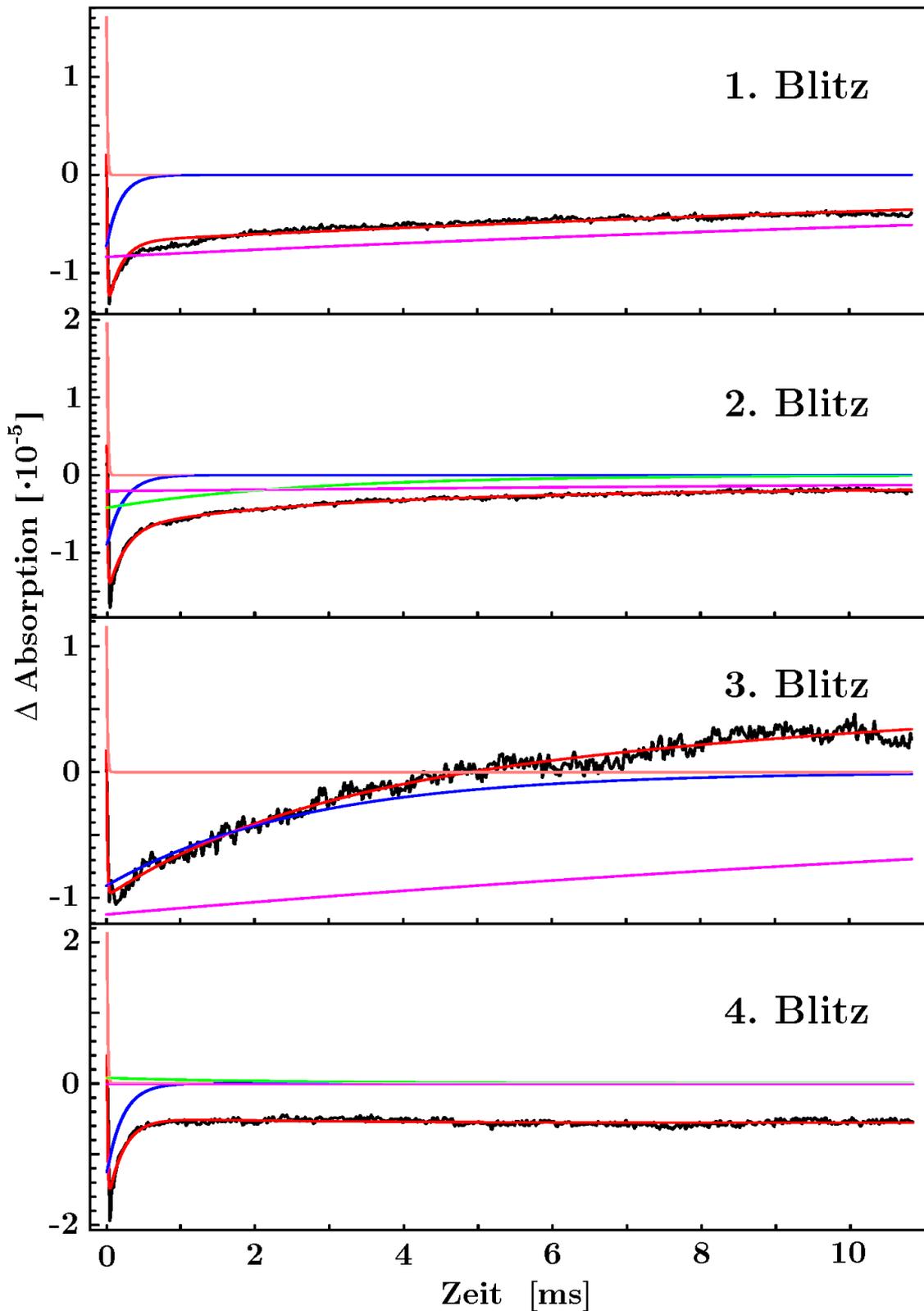


Abbildung 10.20: Zeitverläufe bei 1733 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

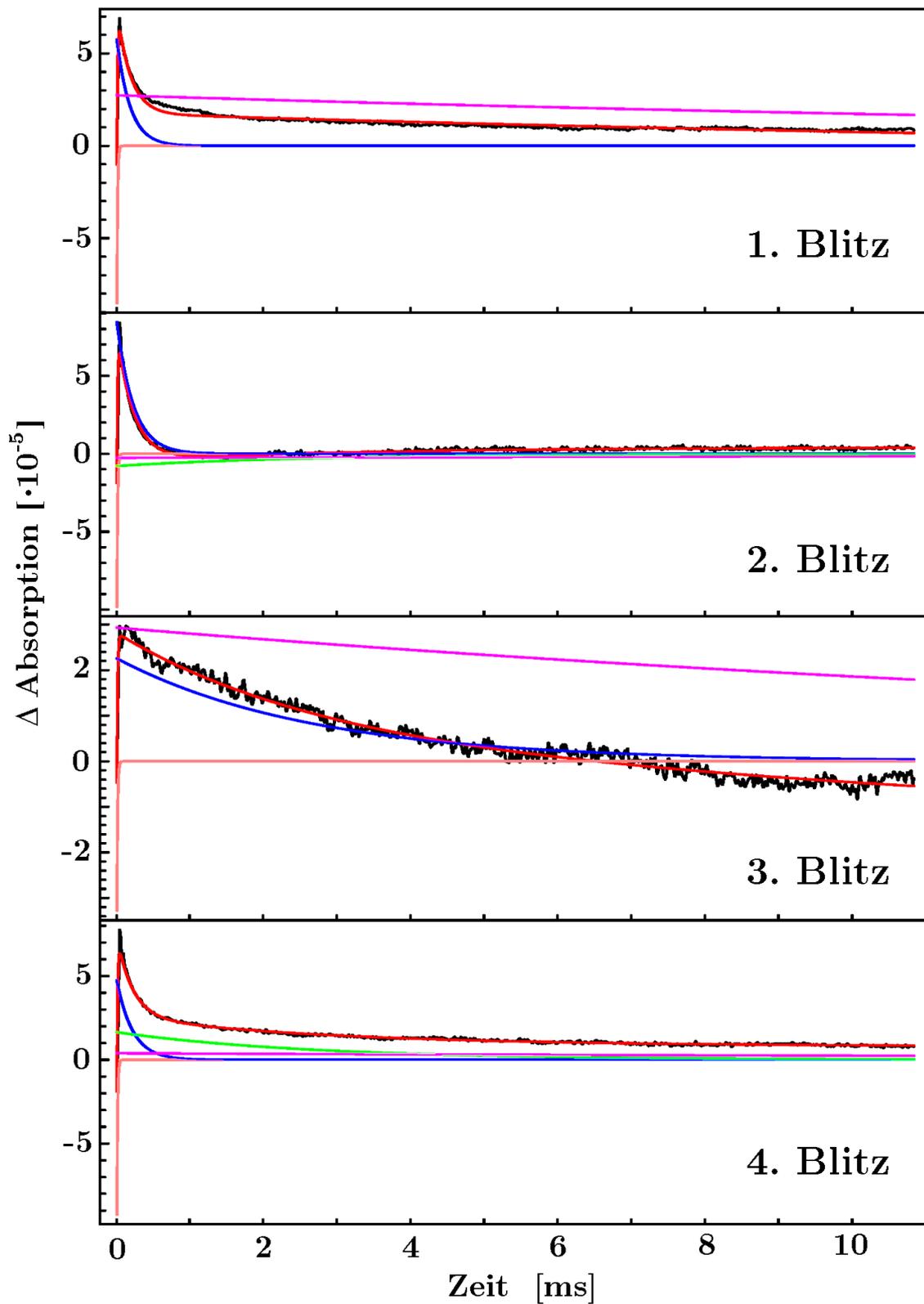


Abbildung 10.21: Zeitverläufe bei 1118 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

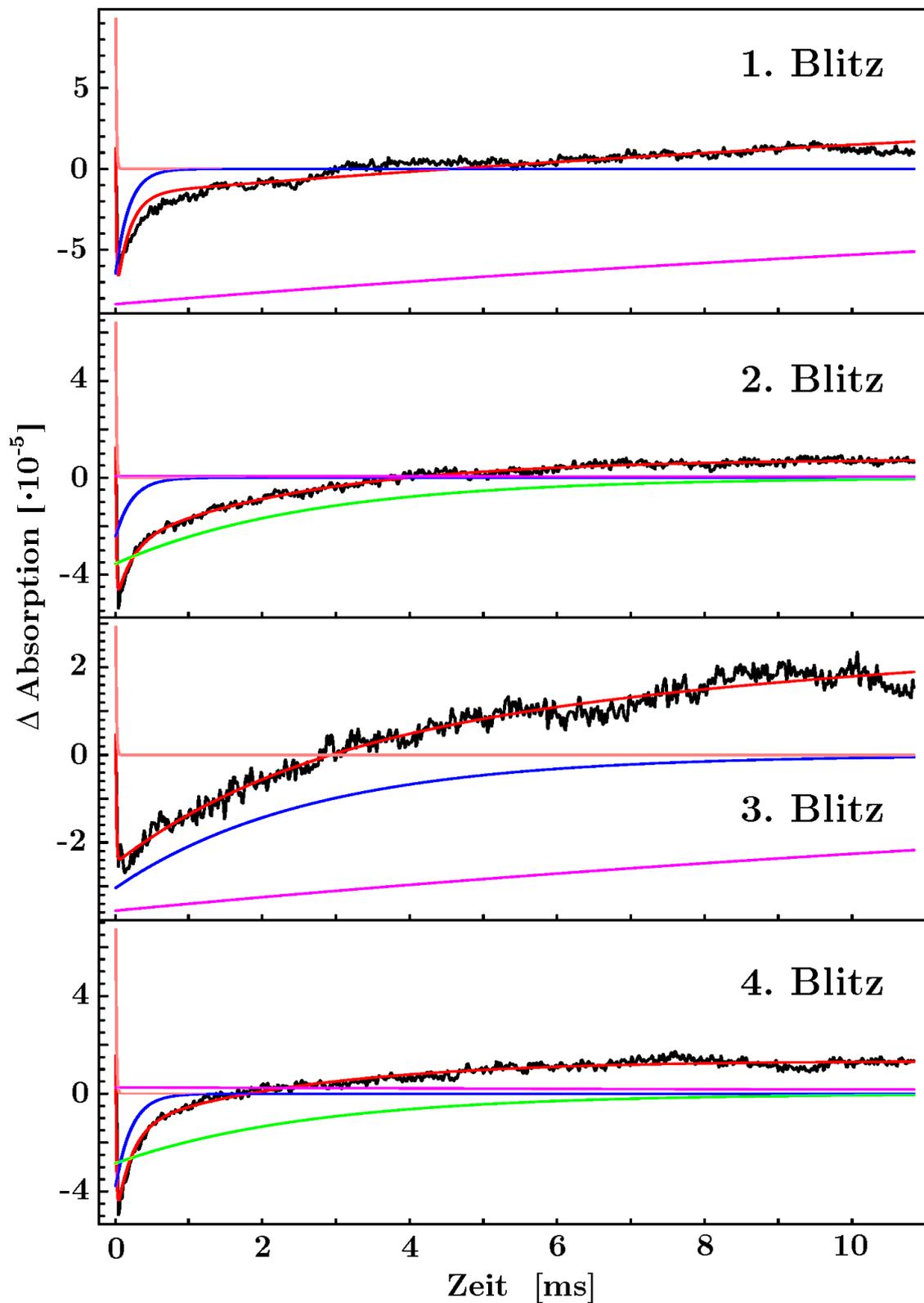


Abbildung 10.22: Zeitverläufe bei 1495 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

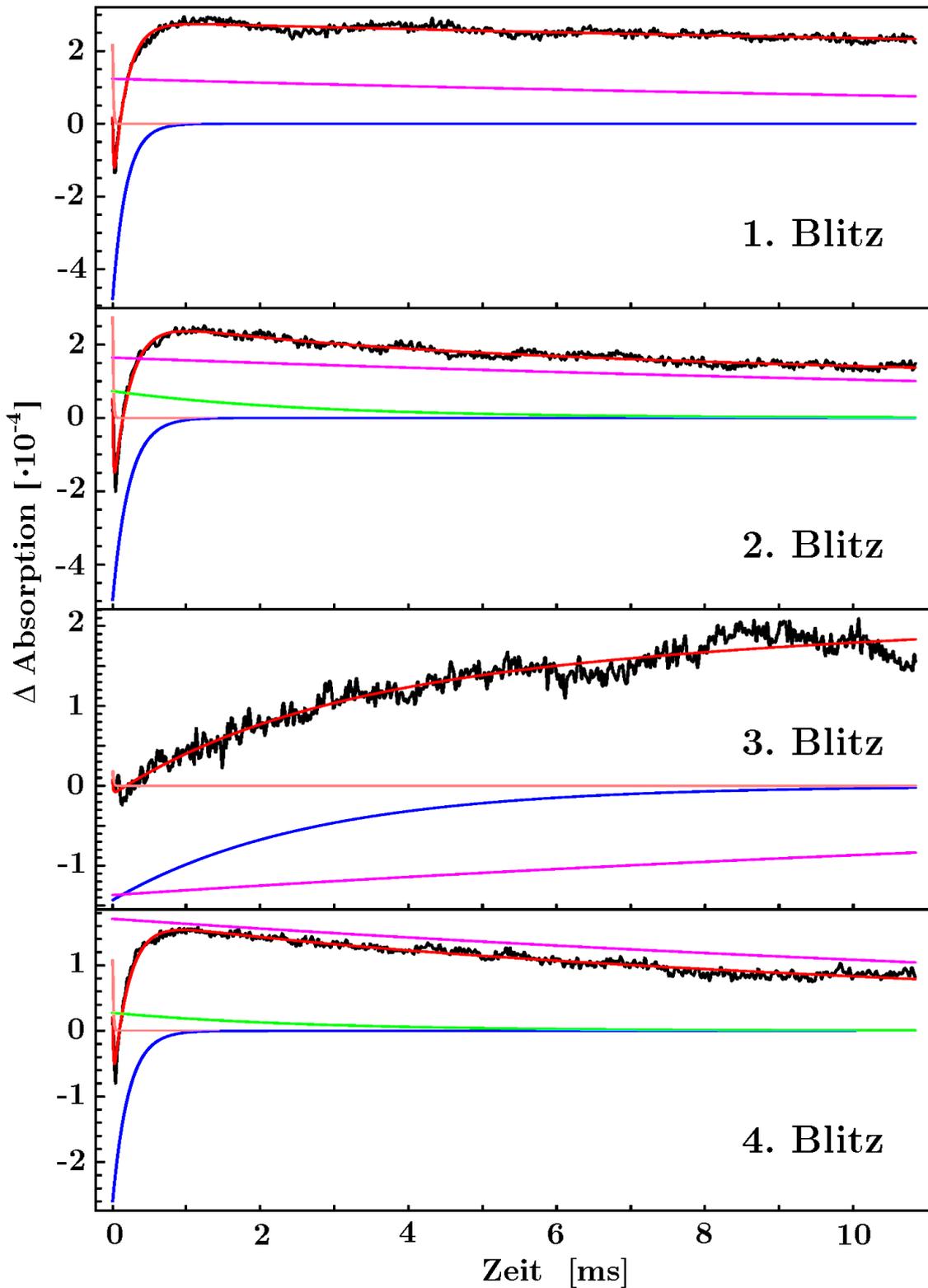


Abbildung 10.23: Zeitverläufe bei 1641 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

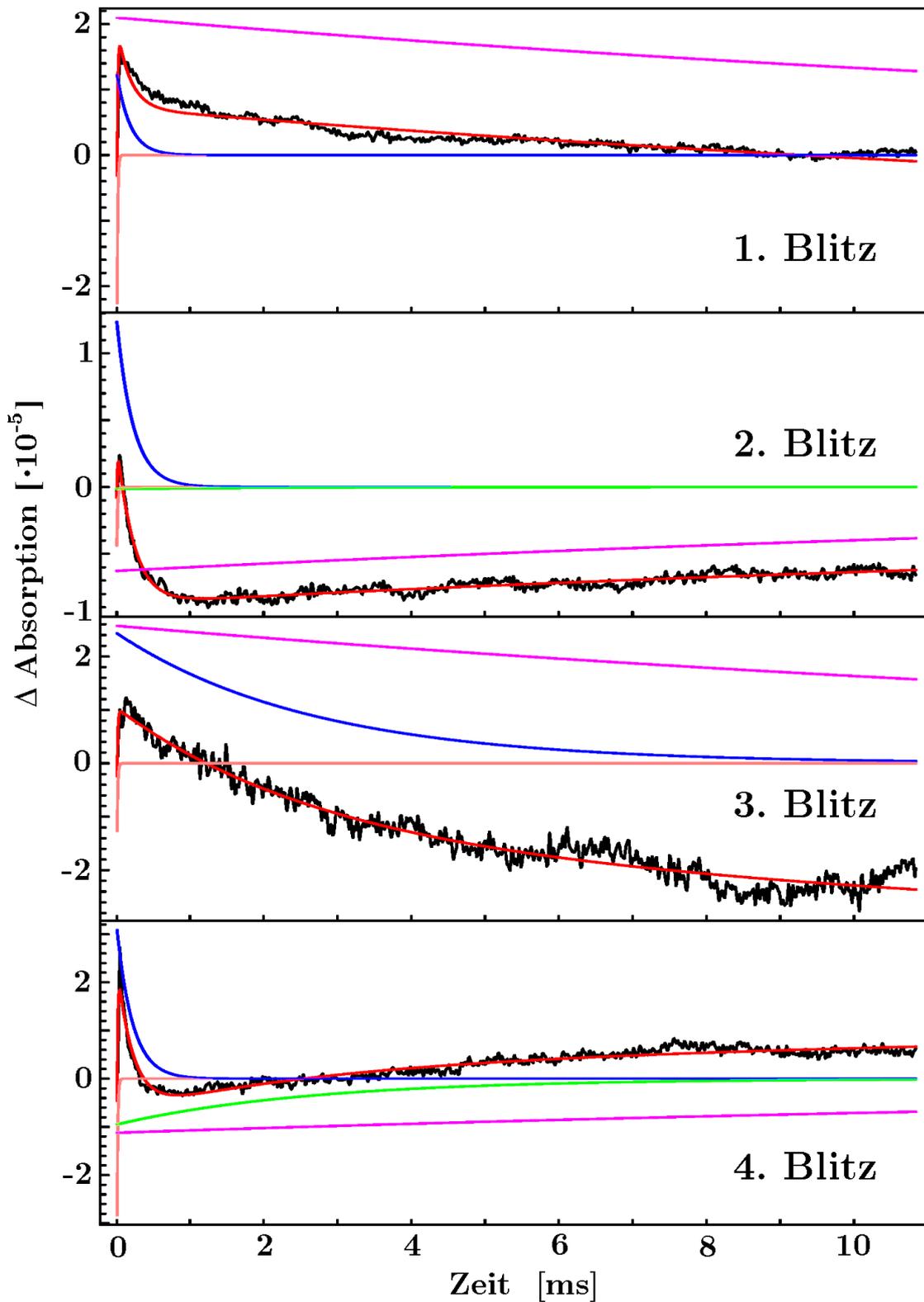


Abbildung 10.24: Zeitverläufe bei 1693 cm^{-1} . Die Simulation (rot) der spektralen Zeitverläufe (schwarz) setzt sich aus einer Komponente für den S-Übergang (blau), einem schnellen Anstieg (orange), der langsamen Relaxation der Akzeptorseite (lila) und einer Konstanten (nicht gezeigt) zusammen. Bei den zweiten und dritten Anregung wird eine zusätzliche 2,65 ms Phase simuliert (grün).

Diese Arbeit	Literatur
1118 (+)	1080 (+)
1244 (-)	1252 (-)
1513 (+)	1513 (+)
1641 (-)	1646 (-)
1693 (+)	1699 (+)
1733 (-)	1730 (-)
1495 (-)	-

Tabelle 10.1: Vergleich der gemessenen Tyrosin Z Banden mit Literaturdaten aus [Berthomieu et al., 1998]

10.4 Diskussion

Die ersten nicht-repetitiven Step-Scan Messungen am PSII weisen ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis auf. Die Oxidation des Akzeptorquinons Q_A durch den Elektronenakzeptor ist klar erkennbar und reproduzierbar. Dies zeigt die prinzipielle Funktionalität der Messungen. Ein großes Problem stellt jedoch das durch Erwärmung der Probe verursachte Laserartefakt dar. Sein spektraler Beitrag unterhalb einer ms liegt in der selben Größenordnung wie die dominanten Banden der photoaktivierten Reaktionen. Damit stören seine Beiträge eine genaue Untersuchung der Vorgänge am PSII, insbesondere die der Donorseite. Es wurde eine Korrekturmethode vorgestellt, die das Artefakt zu einem großen Teil entfernt. Ein vollkommenes Entfernen der Artefaktbeiträge ist jedoch nicht gelungen. Dieses wird schon bei den Zeitkonstanten der globalen Simulation deutlich, wobei sich z.B. für den $S2 \rightarrow S3$ Übergang eine zu schnelle Zeitkonstante ergibt. Eine weitere Verbesserung der Korrektur bzw. Reduzierung des Artefaktes wird für eine genauere Auswertung nötig sein. Die dargestellten Messungen stellen aber einen ersten, vielversprechenden Schritt dar. Trotz der Artefaktbeiträge ergaben sich einige wichtige Resultate. Die Vorgänge an der Akzeptorseite führen zu starken Banden und lassen sich gut

untersuchen. Besonders hervorzuheben sind dabei die detektierten Änderungen des Bindungszustands des Hydrogencarbonats, das ein Ligand des Nicht-Häm-Eisens der Akzeptorseite ist. Diese Vorgänge konnten zum ersten Mal mit der FTIR Methode zeitaufgelöst beobachtet werden. Sie ergänzen und bestätigen Messungen mittels anderer Methoden aus der Literatur.

Von besonderem Interesse sind auch die Untersuchungen der Donorseitenbeiträge. Hier liegt mit dem Mn-Komplex das katalytische Zentrum des PSII. Viele Banden, vor allem des S1→S2 Übergangs, der durch den ersten Blitz induziert wird, lassen sich durch einen Vergleich mit den Messungen der stationären Zustände der Donorseite zuordnen. Ein Vergleich der Amplitudenspektren der Simulationsphasen mit den Spektren der stationären Zustände ermöglicht die Zuordnung von Banden der ersten drei Übergänge. Der S3→S0 Übergang weist als einziger eine recht langsame Zeitkonstante von über 2 ms bei 10 °C auf. Da Störungen durch das Laserartefakt bereits eine ms nach der Blitzanregung sehr klein werden, ist diese 2 ms Phase gut beobachtbar. Durch den Vergleich mit den Rapid-Scan Messungen an Mn-freien Proben kann eine Vielzahl an Banden dem donorseitigen Tyr_Z zugeordnet werden. Dies war zum ersten mal bei intakten PSII möglich.

Kapitel 11

Ausblick

11.1 Technische Erweiterungen

11.1.1 Externe Datenaufnahme

Um die derzeitige Abtastrate der Datenaufnahme von 80 kHz zu erhöhen und die Limitierung der Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte von 30000 zu umgehen, ist geplant, anstatt des Spektrometer-internen Verstärkers und A/D-Wandlers auf externe Komponenten umzusteigen. Als externer Vorverstärker steht ein Modell von Bruker mit einer Bandbreite von 20 Mhz zur Verfügung. Die Digitalisierung soll mit der in Kapitel 4.3 beschriebenen Multifunktionskarte mit einer Abtastfrequenz von 10 MHz bei einer 16-Bit Auflösung erfolgen.

11.1.2 Entfernen des Gleichspannungsanteils

Bei Messungen am PSII sind auch Zeitverläufe im ms-Bereich interessant. Diese würden bei AC-gekoppelten Messungen herausgefiltert werden. Deshalb werden die Messungen im DC-gekoppelten Modus durchgeführt. Dies führt aber dazu dass Gleichspannungsanteile entstehen. Bei den bisherigen Messungen wurde auf ein Entfernen dieses Anteils vor den Messungen verzichtet, da ein A/D-Wandler mit einer Auflösung von 24-Bit zur Verfügung stand. Der Gleichspannungsanteil wurde später durch ein Programm entfernt und die Änderungen auf ein Dunkelinterferogramm addiert. Bei den Messungen mit der Multifunktionskarte stehen nur 16-Bit zur Verfügung. Deshalb soll der Gleichspannungsanteil entfernt und das Signal weiter um einen Faktor 100-500 verstärkt werden. Um die Auflösung der Wandlerkarte op-

timal ausnutzen zu können, soll der Gleichspannungsanteil möglichst gering sein. Abweichungen vom Gleichspannungsanteil, die an dem Differenzverstärker anliegen, werden um den Faktor 100-500 verstärkt. Um dennoch eine sehr präzise Gleichspannungskorrektur zu bewerkstelligen, wurde eine einfache und zuverlässige Schaltung entwickelt (siehe Abbildung 11.1), die von der fachbereichsinternen Elektronikwerkstatt umgesetzt wurde (siehe Abbildung 11.2).

Digitaler Gleichspannungskompensator

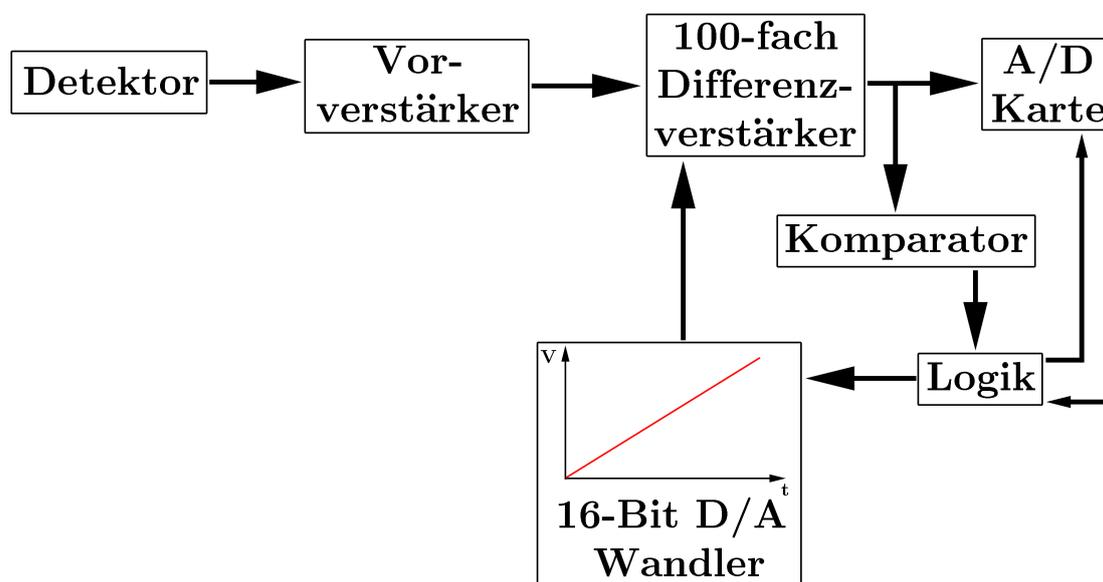


Abbildung 11.1: Schema der Gleichspannungskompensation

Nach dem Ansteuern einer neuen Spiegelposition des Interferometers, wird dem Gleichspannungskompensator von der Multifunktionskarte ein TTL-Puls übermittelt. Dieses Signal startet eine von einem 16-Bit D/A-Wandler erzeugte Spannungsrampe, die an einem Eingang des Differenzverstärkers anliegt. Hinter dem Differenzverstärker kontrolliert ein Komparator, ob ein Spannungsnulldurchgang vorliegt. Ist dies der Fall, wird die Aktuelle Spannung der Rampe beibehalten und ein TTL-Puls an die Multifunktionskarte geschickt, der das Ende der Gleichspannungskorrektur und damit die Bereitschaft für die eigentliche Messung anzeigt. Die Zeit, die dafür

11.2. LASERARTEFAKTKORREKTUR

benötigt wird, ist kleiner als die Äquilibrierungszeit nach dem Erreichen der neuen Spiegelposition, die hauptsächlich wegen der Wasserkühlung eingehalten werden muss. Somit entstehen keine zeitlichen Nachteile durch die Korrektur.



Abbildung 11.2: Foto des digitalen Gleichspannungskompensators

Ein großer Vorteil ist die Messung der Spannung hinter dem Differenzverstärker, wodurch ein hohes Maß an Präzision der Korrektur erreicht wird.

11.2 Laserartefaktkorrektur

Eines der größten Probleme der Step-Scan Messungen ist das Laserartefakt, das die spektralen Zeitverläufe unter 1 ms stört. Obwohl eine möglichst geringe Laserenergie genutzt wurde, ist der Beitrag immer noch groß. Die hohe Absorption der Probe bringt unausweichlich eine Erwärmung und somit ein Laserartefakt mit sich. Eine weitere Verbesserung der Korrektur wäre von großem Nutzen. Da das Laserartefakt durch eine Erwärmung der Probe verursacht wird, wäre es möglich das Artefaktspektrum durch den Vergleich zweier Dunkelmessungen bei verschiedenen Temperaturen zu bestimmen. Das Zeitverhalten kann so nicht bestimmt werden. Dieses könnte

z.B. durch den Vergleich einer Messung mit einer sättigenden Laserenergie und einer zweiten Messung mit einer nochmals erhöhten Laserenergie bestimmt werden. Die Differenz beider Messungen sollte dem Laserartefaktverlauf entsprechen, da durch die sättigende Lichtanregung bei beiden Messungen die Beiträge der Photosysteme herausfallen. Eine weitere Lösung ist die Nutzung von „Kern Komplex Partikeln“. Diese enthalten viermal weniger Chlorophyll pro Photosystem als die Membranpartikel [Ghanotakis und Yocum, 1986]. Dadurch würde das Signal-Artefaktverhältniss stark verbessert. Die Produktion großer Mengen dieser Partikel, die für Step-Scan Messungen benötigt werden, sind allerdings mit erheblichem Aufwand verbunden.

11.3 Strengere Selektion

Es hat sich gezeigt, dass Drifteffekte und starke Störungen der Interferogrammzeitverläufe eine Ursache für Fehler in den Endspektren, d.h. nach etwa 100 ms, sind. Weitere Messungen mit einer strengeren Auswahl der guten Zeitverläufe im Interferogrammbereich können diese Drifteffekte entscheidend minimieren.

Kapitel 12

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FTIR Messmethodik in der biophysikalischen Arbeitsgruppe von Prof. Dau an der Freien Universität Berlin eingeführt. Als finales Ziel galt es, zeitaufgelöste Messungen im Step-Scan Modus an Proben, die nicht mehrmals angeregt werden können, zu ermöglichen und diese zum ersten Mal am PSII durchzuführen. Dieses Ziel konnte erreicht werden. Im Einzelnen wurden folgende Fortschritte und Ergebnisse erzielt:

1. Die ersten Schritte beinhalteten die Etablierung einer zuverlässigen Probenpräparationstechnik und Messmethodik für PSII Membranpartikeln.
2. Um Step-Scan Messungen ohne repetitive Photoanregung einer Probe durchführen zu können, wurde ein temperierbarer Probenwechsler konstruiert, der die Möglichkeit bietet tausende Probenvolumina pro Tag zu messen. Erreicht wird dies zum einen durch eine starke Fokussierung des Infrarotstrahls auf einen Durchmesser von unter 1 mm, zum anderen durch eine hohe Zahl an Probenscheiben im Wechsler.
3. Um eine große Anzahl möglichst einheitlicher Probenscheiben in einem akzeptablen Zeitraum präparieren zu können, wurde ein Probenersteller konstruiert. Während der Herstellung kann die Schichtdicke des PSII Präparates zwischen den CaF₂-Scheiben durch FTIR- Messungen kontrolliert werden. Dadurch ist die schnelle Produktion sehr homogener Proben mit einer klar definierten Absorption möglich.
4. Eine komfortable Steuerungssoftware für den Probenwechsler ermöglicht vielfältige Anwendungen. Diese umfassen z.B. Rapid-Scan Messungen stationärer

Zustände, zeitaufgelöste Rapid-Scan Messungen von Reaktionsabläufen oder auch Step-Scan Messungen im repetierenden sowie im nicht-repetierenden Modus.

5. Alle Abläufe, vor allem die Step-Scan Messungen, wurden automatisiert. Pro Tag sind bis zu 4000 Einzelmessungen möglich, wodurch stationäre Zustände mit einem sehr hohen Signal-Rausch Verhältnis gemessen werden und im Step-Scan Modus mehrere komplette Scans pro Tag durchgeführt werden können. Die Funktionstüchtigkeit der Photosysteme über die gesamte Messzeit ist durch Testmessungen der stationären Zustände und einer reproduzierbaren Akzeptorseitenaktivität bei den Step-Scan Messungen auch bei höherer Blitzzahl belegbar.
6. Messungen der stationären Zustände des katalytischen Zyklus reproduzieren Literaturspektren sehr gut, wobei im Vergleich eine Verbesserung des sogenannten Missfaktors erreicht werden konnte.
7. Auch zeitaufgelöste Rapid-Scan Messungen an Mn-freien Proben reproduzieren die Literaturdaten gut, wodurch eine sichere Zuordnung einzelner Banden möglich wird.
8. Es wurden die ersten nicht-repetierenden Step-Scan Messungen am Photosystem II durchgeführt, wobei 174 doppelseitige Interferogramme aufgenommen wurden mit 61596 Einzelmessungen. Mit der Applizierung von vier Anregungsblitzen wird der S-Zyklus einmal durchschritten.
9. Es wurde eine umfangreiche Auswertungssoftware erstellt. Berücksichtigt wurden dabei neben den üblichen Auswertungsschritten vielfältige Korrektur- und Auswahlverfahren, die zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis führen. So wurde z.B. durch die Methode der Singulärwertzerlegung das Rauschniveau beträchtlich gemindert, ohne Verlust an physikalischer Information. Ein wichtiger Punkt der Korrekturmaßnahmen ist auch die Laserartefaktkorrektur. Durch Erwärmung der Probe kommt es zu einer Störung der spektralen Zeitverläufe. Es wurde eine Korrekturmethode entwickelt, die eine erhebliche Abschwächung der Störung ermöglicht.
10. Spektrale Zeitverläufe mit einem sehr guten Signal-Rausch Verhältnis bei einer noch überschaubaren Anzahl an Messungen konnten gewonnen werden.

Weitere Messungen, eine noch strengere Auswahl der Interferogrammzeitverläufe und eine weitere Verbesserung der Laserartefaktkorrektur könnten die Qualität der Messungen noch verbessern.

11. Eine globale Simulation der spektralen Zeitverläufe macht Zuordnungen diverser Banden in Übereinstimmung mit den stationären Messungen und den Messungen mit den Mn-freien Proben möglich.
12. Die Änderung der Koordination des Hydrogencarbonats - einem Liganden des Nicht-Häm-Eisens der Akzeptorseite - beim Elektronentransfer von einer zweizähligen zu einer einzähligen Bindung konnte bestätigt werden.
13. Tyrosinbanden, deren Position bisher nur aus Messungen an Mn-freien Proben zugänglich waren, konnten zum ersten mal an intakten Photosystemen detektiert werden.

Alles in allem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein leistungsfähiges FTIR Experiment erstellt, mit dem nicht-repetierende Step-Scan Messungen durch hohe Automatisierung in einem Umfang durchgeführt werden können, welcher manuell nicht zu bewerkstelligen wäre. Über diese Eigenschaft verfügen nur sehr wenige Messaufbauten, aber gerade sie ist entscheidend, um das Photosystem II mit einer Zeitauflösung untersuchen zu können, die nicht durch die Spiegelbewegung des Interferometers limitiert ist. Die in dieser Arbeit aufgenommenen Daten, welche die Funktion und vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Aufbaus belegen, sind die ersten Step-Scan Messungen, die für das wasseroxidierende Photosystem II berichtet wurden.



Literaturverzeichnis

- [Pho, 2005] (2005). *Photosystem II*. Springer, 22nd edition.
- [Ahlbrink et al., 1998] Ahlbrink, R., Haumann, M., Cherepanov, D., Bogershausen, O., Mulkidjanian, A., und Junge, W. (1998). Function of tyrosine Z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor. *Biochemistry*, 37:1131–1142.
- [Allakhverdiev et al., 1994] Allakhverdiev, S., Karacan, M., Somer, G., Karacan, N., Khan, E., Rane, S., Padhye, S., Klimov, W., und Renger, G. (1994). Reconstitution of the Water-Oxidizing Complex in Manganese-Depleted Photosystem II Complexes by Using Synthetic Binuclear Manganese Complexes. *Biochemistry*, 33:12210–12214.
- [Babcock et al., 1976] Babcock, G., Blankenship, R. E., und Sauer, K. (1976). Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast photosystem II. *FEBS Lett.*, 61:286–289.
- [Babcock und Hillier, 2001] Babcock, G. T. und Hillier, W. (2001). S-State Dependent Fourier Transform Infrared Difference Spectra for the Photosystem II Oxygen Evolving Complex. *Biochemistry*, 40:1503–1509.
- [Babcock und K.Sauer, 1975] Babcock, G. T. und K.Sauer (1975). A rapid, light-induced transient in electron paramagnetic resonance signal II activated upon inhibition of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 376:315–328.
- [Barth und Zscherp, 2002] Barth, A. und Zscherp, C. (2002). What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35:369–430.

- [Bauscher et al., 1990] Bauscher, M., Navedryk, E., Bagley, K., Breton, J., und Mäntele, W. (1990). Investigation of models for photosynthetic electron acceptors: Infrared spectrochemistry of ubiquinone and its anion. *FEBS letters*, 261:191–195.
- [Bernat et al., 2002] Bernat, G., Morvaridi, F., Feyziyev, Y., und Styring, S. (2002). pH Dependence of the Four Individual Transitions in the Catalytic S-Cycle during Photosynthetic Oxygen Evolution. *Biochemistry*, 41:5830–5843.
- [Berthold et al., 1981] Berthold, D. A., Babcock, G. T., und Yocum, C. F. (1981). A highly oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS letters*, 134:231–234.
- [Berthomieu und Hienerwadel, 2001] Berthomieu, C. und Hienerwadel, R. (2001). Iron Coordination in Photosystem II: Interaction between Bicarbonate and the Q_B Pocket Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 40:4044–4052.
- [Berthomieu et al., 1998] Berthomieu, C., Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., und Diner, B. A. (1998). Hydrogen Bonding of Redox-Active Tyrosine Z of Photosystem II Probed by FTIR Difference Spectroscopy. *Biochemistry*, 37:10547–10554.
- [Berthomieu et al., 1992] Berthomieu, C., Navedryk, E., Breton, J., und Boussac, A. (1992). Further characterization of Q_A photoreduction using ¹⁵N-labeled PSII membranes. *Res. in Photosynthesis*, II:53–56.
- [Berthomieu et al., 1990] Berthomieu, C., Navedryk, E., Mäntele, W., und Breton, J. (1990). Characterization by FTIR spectroscopy of the photoreduction of the primary quinon acceptor Q_A in Photosystem II. *FEBS letters*, 269:363–367.
- [Bowes et al., 1979] Bowes, J. M., Crofts, A. R., und Itoh, S. (1979). A high potential acceptor for Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 547:320–335.
- [Buchta,] Buchta, J. *Doktorarbeit in Vorbereitung*. PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- [Buser et al., 1990] Buser, C. A., Thompson, L. K., Diner, B. A., und Brudvig, G. W. (1990). Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II. *Biochemistry*, 92:8977–8985.

- [Chernev et al., 2011] Chernev, P., Zaharieva, I., Dau, H., und Haumann, M. (2011). A high potential acceptor for Photosystem II . *J. Biol. Chem.*, 286:5368–5374.
- [Dau, 1994] Dau, H. (1994). Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.*, 60:1–23.
- [Dau und Haumann, 2007] Dau, H. und Haumann, M. (2007). Time-resolved X-ray spectroscopy leads to an extension of the classical S-state cycle model of photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.*, 92:327–343.
- [Dau und Haumann, 2008] Dau, H. und Haumann, M. (2008). The manganese complex of photosystem II in its reaction cycle - Basic framework an possible realisation at the atomic level. *Coord. Chem. Rev.*, 252:273–295.
- [Dau et al., 2003] Dau, H., Liebisch, P., und Haumann, M. (2003). X-ray absorption spectroscopy to analyze nuclear geometry and electronic structure of biological metal centers-potential and questions examined with special focus on the tetranuclear manganese complex of oxygenic photosynthesis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376:562–583.
- [Deisenhofer und Michel, 1989] Deisenhofer, J. und Michel, H. (1989). The Photosynthetic Reaction Center from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science*, 245:1463–1473.
- [Dekker et al., 1984] Dekker, J. P., Gorkom, H. J. V., Brok, M., und Ouwehand, L. (1984). Optical characterization of Photosystem II electron donors. *Biochim. Biophys. Acta*, 764:301–309.
- [Diner und Petrouleas, 1987] Diner, B. A. und Petrouleas, V. (1987). Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of Photosystem II by exogenous quinones acting through the QB binding site. I. Quinones, kinetics and pH-dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, 895:107–125.
- [Eaton-Rye und Govindjee, 1988a] Eaton-Rye, J. J. und Govindjee (1988a). Electron transfer through the quinone acceptor complex of Photosystem II after one or two actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 935:248–257.

- [Eaton-Rye und Govindjee, 1988b] Eaton-Rye, J. J. und Govindjee (1988b). Electron transfer through the quinone acceptor complex of Photosystem II in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes as a function of actinic flash number and frequency. *Biochim. Biophys. Acta*, 935:237–247.
- [Ferreira et al., 2004] Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., und Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303:1831–1838.
- [Fischer und Wydrzynski, 2001] Fischer, G. und Wydrzynski, T. (2001). Isotope effects in FTIR difference spectra of the photosynthetic oxygen-evolving catalytic site determined by ab initio calculations on model compounds. *J. Phys. Chem. B.*, 105:12894–12901.
- [Forbush et al., 1971] Forbush, B., Kok, B., und McGloin, M. (1971). Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-II. Damping of flash yield oscillation, deactivation. *Photochem. Photobiol.*, 14:307–321.
- [Förster und Junge, 1984] Förster, V. und Junge, W. (1984). Protolytic reactions at the donor side of photosystem II: Proton release in TRIS-washed chloroplasts. *Advances in Photosynthesis Research*, 2:305–308.
- [Garczarek, 2004] Garczarek, F. (2004). *Die Rolle interner Wassermoleküle bei der Protonentranslokation des Bakteriorhodopsins untersucht mittels FT-IR-Spektroskopie*. PhD thesis, Ruhr-Universität Bochum.
- [Gerwert et al., 1990] Gerwert, K., Souvignier, G., und Hess, B. (1990). Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9774–9778.
- [Ghanotakis und Yocum, 1986] Ghanotakis, D. F. und Yocum, C. F. (1986). Purification and properties of an oxygen-evolving reaction center complex from photosystem II membranes. *FEBS Lett.*, 197:244–248.
- [Guskov et al., 2009] Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., und Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution.

- lution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16:334–342.
- [Haumann et al., 1997] Haumann, M., Bögershausen, O., Cherepanov, D., Ahlbrink, R., und Junge, W. (1997). Photosynthetic oxygen evolution: H/D isotope effects and the coupling between electron and proton transfer during the redox reactions at the oxidizing side of Photosystem II. *Photosynthesis Research*, 51:193–208.
- [Haumann et al., 1994] Haumann, M., Bögershausen, O., und Junge, W. (1994). Photosynthetic oxygen evolution: Net charge transients as inferred from electrochromic bandshifts are independent of proton release into the medium. *FEBS Lett.*, 355:101–105.
- [Haumann und Junge, 1994] Haumann, M. und Junge, W. (1994). Extent and rate of proton release by photosynthetic water oxidation in thylakoids: Electrostatic relaxation versus chemical production. *Biochemistry*, 33:864–872.
- [Haumann et al., 2005] Haumann, M., Liebisch, P., Müller, C., Barra, M., Grabolle, M., und Dau, H. (2005). Photosynthetic O₂ Formation Tracked by Time-Resolved X-ray Experiments. *Science*, 310:1019–1021.
- [Hays et al., 1998] Hays, A. A., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., und Debus, R. J. (1998). Role of D1-His190 in Proton-Coupled Electron Transfer Reactions in Photosystem II: A Chemical Complementation Study. *Biochemistry*, 37:11352–11365.
- [Hermes et al., 2006] Hermes, S., Bremm, O., Garczarek, F., Derrien, V., Liebisch, P., Loja, P., Sebban, P., Gerwert, K., und Haumann, M. (2006). A Time-Resolved Iron-Specific X-ray Absorption Experiment Yields No Evidence for an Fe²⁺ → Fe³⁺ Transition during Q_A⁻ → Q_B Electron Transfer in the Photosynthetic Reaction Center. *Biochemistry*, 45:353–359.
- [Hienerwadel und Berthomieu, 1995] Hienerwadel, R. und Berthomieu, C. (1995). Bicarbonate binding to the non-heme iron of photosystem II, investigated by Fourier transform infrared difference spectroscopy and ¹³C-labeled bicarbonate. *Biochemistry*, 34:16288–16297.

- [Hienerwadel et al., 1996] Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., und Berthomieu, C. (1996). Fourier transform infrared difference study of Tyrosine_D oxidation and plastoquinone Q_A reduction in Photosystem II. *Biochemistry*, 35:15447–15460.
- [Hienerwadel et al., 1997] Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., Diner, B. A., und Berthomieu, C. (1997). Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling. *Biochemistry*, 36:14712–14723.
- [Ikegami und Katoh, 1973] Ikegami, I. und Katoh, S. (1973). Studies on chlorophyll fluorescence in chloroplasts II. Effect of ferricyanide on the induction of fluorescence in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *Plant Cell Physiol.*, 14:829–836.
- [Joliot et al., 1969] Joliot, P., Barbierie, G., und Chabaud, R. (1969). Un nouveaux modele des centres photochimiques du systeme II. *Photochem. Photobiol.*, 10:309–329.
- [Joliot et al., 1971] Joliot, P., Joliot, A., Bouges, B., und Barbierie, G. (1971). Studies of system II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence, and oxygen emission. *Photochem. Photobiol.*, 14:287–305.
- [Junge et al., 2002] Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulkidjanian, A., und Clausen, J. (2002). Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 357:1407–1417.
- [Kimura und aki Ono, 2003] Kimura, Y. und aki Ono, T. (2003). Functional and structural study on chelator-induced suppression of S2/S1 FTIR spectrum in photosynthetic oxygen-evolving complex. *J. Inorg. Biochem.*, 97:231–239.
- [Kok et al., 1970] Kok, B., Forbush, B., und McGloin, M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. *Photochem. Photobiol.*, 11:457–475.
- [Kretschmann et al., 1996] Kretschmann, H., Schlodder, E., und Witt, H. T. (1996). Net charge oscillation and proton release during water oxidation in photosynthesis. An electrochromic band shift study at pH 5.5–7.0. *Biochim. Biophys. Acta*, 1274:1–8.

- [Kretschmann und Witt, 1993] Kretschmann, H. und Witt, H. (1993). Chemical reduction of the water splitting enzyme system of photosynthesis and its light-induced reoxidation characterized by optical and mass spectrometric measurements: A basis for the estimation of the states of the redox active manganese and of water in the quaternary oxygen-evolving S-state cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1144:331–345.
- [Kuwabara und Murata, 1983] Kuwabara, T. und Murata, N. (1983). Quantitative Analysis of the Inactivation of Photosynthetic Oxygen Evolution and the Release of Polypeptides and Manganese in the Photosystem II Particles of Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 24:741–747.
- [Malinowski, 1991] Malinowski (1991). *Factor Analysis in Chemistry*. John Wiley & Sons, 2nd edition.
- [Mamedov et al., 1998] Mamedov, F., Sayre, R. T., und Styring, S. (1998). Involvement of Histidine 190 on the D1 Protein in Electron/Proton Transfer Reactions on the Donor Side of Photosystem II. *Biochemistry*, 37:14245–14256.
- [Menzel, 2009] Menzel, J. (2009). Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie am Photosystem II zur Untersuchung des Reaktionszyklus. Master’s thesis, Freie Universität Berlin.
- [Mertz, 1965] Mertz, L. (1965). *Transformations in Optics*. John Wiley & Sons.
- [Mertz, 1967] Mertz, L. (1967). Auxiliary computation for Fourier spectrometry. *Infrared Phys.*, 7:17–23.
- [Messinger et al., 1993] Messinger, J., Schroeder, W. P., und Renger, G. (1993). Structure-function relations in photosystem II. Effects of temperature and chaotropic agents on the period four oscillation of flash-induced oxygen evolution. *Biochemistry*, 32:7658–7668.
- [Meunier und Popovic, 1990] Meunier, P. C. und Popovic, R. (1990). Control of misses in oxygen evolution by the oxidoreduction state of plastochinone in *Dunaliella Tertiolecta*. *Photosynth. Res.*, 23:213–221.

- [Miller und Brudvig, 1991] Miller, A. F. und Brudvig, G. W. (1991). A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of Photosystem II membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056:1–18.
- [Müller, 2005] Müller, C. A. (2005). *Methodenentwicklung und Durchführung fortgeschrittener Röntgenabsorptionsmessungen am Mangan-Calcium-Komplex des Photosystems II*. PhD thesis, Freie Universität Berlin.
- [Noguchi, 2007] Noguchi, T. (2007). Light-induced FTIR difference spectroscopy as a powerful tool toward understanding the molecular mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.*, 91:59–69.
- [Noguchi et al., 1992] Noguchi, T., aki Ono, T., und Inoue, Y. (1992). Detection of structural changes upon S1-to-S2 transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry*, 31:5953–5956.
- [Noguchi et al., 1995a] Noguchi, T., aki Ono, T., und Inoue, Y. (1995a). A carboxylate ligand interacting with water in the oxygen-evolving center of photosystem II as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1232:59–66.
- [Noguchi et al., 1995b] Noguchi, T., aki Ono, T., und Inoue, Y. (1995b). Direct detection of a carboxylate bridge between Mn and Ca²⁺ in the photosynthetic oxygen-evolving center by means of Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1228:189–200.
- [Noguchi und Inoue, 1995] Noguchi, T. und Inoue (1995). Identification of FTIR signals from the non-heme iron in photosystem II. *J. Biochem.*, 118:9–12.
- [Noguchi und Sugiura, 2002] Noguchi, T. und Sugiura, M. (2002). Flash-Induced FTIR Difference Spectra of the Water Oxidizing Complex in Moderately Hydrated Photosystem II Core Films: Effect of Hydration Extent on S-State Transitions. *Biochemistry*, 41:2322–2330.
- [Noguchi und Sugiura, 2003] Noguchi, T. und Sugiura, M. (2003). Analysis of flash-induced FTIR difference spectra of the S-state cycle in the photosynthetic water-oxidizing complex by uniform ¹⁵N and ¹³C isotope labeling. *Biochemistry*, 42:6035–6042.

- [Norton und Beer, 1976] Norton, R. H. und Beer, R. (1976). New apodizing functions for Fourier spectrometry. *J. Opt. Soc. Am.*, 66:259–264.
- [Paula et al., 1985] Paula, J. D., Innes, J., und Brudvig, G. (1985). Electron transfer in photosystem II at cryogenic temperatures. *Biochemistry*, 24:8114–8120.
- [Peloquin und Britt, 2001] Peloquin, J. M. und Britt, R. D. (2001). EPR/ENDOR characterization of the physical and electronic structure of the OEC Mn cluster. *Biochim. Biophys. Acta*, 1503:96–111.
- [Petrouleas und Diner, 1986] Petrouleas, V. und Diner, B. (1986). Identification of Q₄₀₀, a high-potential electron acceptor of Photosystem II, with the iron of the quinone-iron acceptor complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 849:264–275.
- [Rammelsberg et al., 1997] Rammelsberg, R., Hessling, B., Chorongiewski, H., und Gerwert, K. (1997). Molecular Reaction Mechanisms of Proteins Monitored by Nanosecond Step-Scan FT-IR Difference Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 51:558–562.
- [Rappaport et al., 1994] Rappaport, F., Blanchard-Desce, M., und Lavergne, J. (1994). Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transitions of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184:178–192.
- [Rappaport et al., 2002] Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P. J., Diner, B. A., und Lavergne, J. (2002). Kinetics and Pathways of Charge Recombination in Photosystem II. *Biochemistry*, 41:8518–8527.
- [Rappaport und Lavergne, 1997] Rappaport, F. und Lavergne, J. (1997). Charge Recombination and Proton Transfer in Manganese-Depleted Photosystem II. *Biochemistry*, 36:15294–15302.
- [Rappaport und Lavergne, 2001] Rappaport, F. und Lavergne, J. (2001). Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1503:246–259.
- [Razeghifard und Pace, 1997] Razeghifard, M. R. und Pace, R. J. (1997). Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach PSII membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1322:141–150.

- [Remy und Gerwert, 2003] Remy, A. und Gerwert, K. (2003). Coupling of light-induced electron transfer to proton uptake in photosynthesis. *Nat. Struct. Biol.*, 10:637–644.
- [Remy et al., 2004] Remy, A., Niklas, J., Kuhl, H., Kellers, P., Schott, T., Rögner, M., und Gerwert, K. (2004). FTIR spectroscopy shows structural similarities between photosystems II from cyanobacteria and spinach. *FEBS letters*, 271:563–567.
- [Renger und Hanssum, 1992] Renger, G. und Hanssum, B. (1992). Studies on the reaction coordinates of the water oxidase in PS II membrane fragments from spinach. *FEBS letters*, 299:28–32.
- [Renger und Voelkner, 1982] Renger, G. und Voelkner, M. (1982). Studies on the proton release pattern of the donor side of system II: Correlation between oxidation and deprotonization of donor D1 in Tris-washed inside-out thylakoids. *FEBS Lett.*, 149:203–207.
- [Richter, 1996] Richter, G. (1996). *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag.
- [Robblee et al., 2001] Robblee, J. H., Cinco, R. M., und Yachandra, V. K. (2001). X-ray spectroscopy-based structure of the Mn cluster and mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1503:7–23.
- [Schiller und Dau, 2000] Schiller, H. und Dau, H. (2000). Preparation protocols for high-activity Photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S2-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 55:138–144.
- [Shinkarev und Wraight, 1993a] Shinkarev, V. P. und Wraight, C. (1993a). Kinetic factors in the bicycle model of oxygen evolution by Photosystem II. *Photosynth. Res.*, 38:315–321.
- [Shinkarev und Wraight, 1993b] Shinkarev, V. P. und Wraight, C. A. (1993b). Oxygen evolution in photosynthesis: From unicycle to bicycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:1834–1838.
- [Sokrates, 1994] Sokrates, G. (1994). *Infrared characteristic group frequencies*. John Wiley & Sons.

- [Stemler und Murphy, 1985] Stemler, A. und Murphy, J. (1985). Bicarbonate-Reversible and Irreversible Inhibition of Photosystem II by Monovalent Anions. *Plant Physiol.*, 77:974–977.
- [Strickler et al., 2006] Strickler, M. A., Hillier, W., und Debus, R. J. (2006). No evidence from FTIR difference spectroscopy that glutamate-189 of the D1 polypeptide ligates a manganese ion that undergoes oxidation during the S_0 to S_1 , S_1 to S_2 , or S_2 to S_3 transitions in photosystem II. *Biochemistry*, 45:8801–8811.
- [Styring und Rutherford, 1987] Styring, S. und Rutherford, A. W. (1987). In the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II the S_0 State Is Oxidized to the S_1 State by D^+ (Signal II_{slow}). *Biochemistry*, 26:2401–2405.
- [Styring und Rutherford, 1988] Styring, S. und Rutherford, A. W. (1988). Deactivation kinetics and temperature dependence of the S-state transitions in the oxygen-evolving system of Photosystem II measured by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 933:378–387.
- [Suzuki et al., 2006] Suzuki, H., Taguchi, Y., Sugiura, M., Boussac, A., und Noguchi, T. (2006). Structural Perturbation of the Carboxylate Ligands to the Manganese Cluster upon Ca^{2+}/Sr^{2+} Exchange in the S-State Cycle of Photosynthetic Oxygen Evolution As Studied by Flash-Induced FTIR Difference Spectroscopy. *Biochemistry*, 45:13454–13464.
- [Takano et al., 2008] Takano, A., Takahashi, R., Suzuki, H., und Noguchi, T. (2008). Herbicide effect on the hydrogen-bonding interaction of the primary quinone electron acceptor Q_A in photosystem II as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Photosynth. Res.*, 98:159–167.
- [Thompson und Brudvig, 1988] Thompson, L. K. und Brudvig, G. W. (1988). Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 27:6653–6658.
- [van Rensen et al., 1988] van Rensen, J. J. S., Tonk, W. J. M., und Bruijn, S. D. (1988). Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary quinone electron acceptor of photosystem II via the non-haem iron of the quinone-iron acceptor complex. *FEBS Lett.*, 226:347–351.

- [Vermaas et al., 1984] Vermaas, W. F. J., Renger, G., und Dohnt, G. (1984). The reduction of the oxygen-evolving system in chloroplasts by thylakoid components. *Biochim. Biophys. Acta*, 764:194–202.
- [Westphal et al., 2000] Westphal, K. L., Lydakis-Simantiris, N., Cukier, R. I., und Babcock, G. T. (2000). Effects of Sr^{2+} -Substitution on the Reduction Rates of Y_Z in PSII Membranes-Evidence for Concerted Hydrogen-Atom Transfer in Oxygen Evolution. *Biochemistry*, 39:16220–16229.
- [Yamanari et al., 2004] Yamanari, T., Kimura, Y., Mizusawa, N., Ishii, A., und Ono, T. (2004). Midto low-frequency Fourier transform infrared spectra of S-state cycle for photosynthetic water oxidation in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochemistry*, 43:7479–7490.
- [Yerkes et al., 1983] Yerkes, C. T., Babcock, G. T., und Crofts, A. R. (1983). A Tris-induced change in the midpoint potential of Z, the donor to photosystem II, as determined by the kinetics of the back reaction. *FEBS Lett.*, 158:359–363.
- [Zhang et al., 1997] Zhang, H., Razeghifard, M. R., Fischer, G., und Wydrzynski, T. (1997). A Time-Resolved FTIR Difference Study of the Plastoquinone QA and Redox-Active Tyrosine Z Interactions in Photosystem II. *Biochemistry*, 36:11762–11768.

Publikationen

Konferenzbeiträge

- Björn Süss und Holger Dau, The photosynthetic Mn complex in its reaction cycle, Satellite Meeting: Solar Energy and Artificial Photosynthesis, July 2007, London, (Poster)
- Björn Süss und Holger Dau, The photosynthetic Mn complex in its reaction cycle, 14th International Congress of Photosynthesis, July 2007, Glasgow, (Poster)
- Björn Süss und Holger Dau, The Photosynthetic Mn Complex in Its Reaction Cycle: An Attempt to Obtain Pure FTIR Difference Spectra for the Four Transitions Between Semi-Stable S-States and for Q_B Redox Transitions, 14th International Congress of Photosynthesis, July 2007, Glasgow, (Publikation)
- Björn Süss und Holger Dau, The photosynthetic Mn complex in its reaction cycle, SFB 498 International Symposium Protein-Cofactor Interactions in Biological Processes, September 2007, Berlin, (Poster)
- Björn Süss, Steps towards FTIR step-scan experiments on the PSII donor side, Joint Group Meeting Dau/Styring, May 2008, Uppsala, (Vortrag)
- Julia Menzel und Björn Süss und Holger Dau, Water oxidation in Photosystem II - FTIR difference spectra of four S-state transitions, Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, September/Oktober 2008, Berlin, (Poster)

- Björn Süss und Holger Dau, Time resolved FTIR to track photosynthetic water oxidation, Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, September/Oktober 2008, Berlin, (Poster)
- Björn Süss und Julia Menzel und Holger Dau, S-state transitions of the Mn-complex studied by conventional FTIR difference spectroscopy and steps towards a difficult step-scan experiment, Joint Group Meeting Dau/Styring, Sept 2009, Uppsala, (Vortrag)
- Björn Süss und Joachim Buchta und Petko Chernev und Holger Dau, Time resolved FTIR to track photosynthetic water oxidation, Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biophysik, Oktober 2009, Bochum, (Poster)

Danksagung

- Ich danke Prof. Dr. Holger Dau für die Möglichkeit, dieses interessante Projekt in seiner Arbeitsgruppe zu verwirklichen. Ich danke ihm auch für die Unterstützung, das in mich gesetzte Vertrauen und den wissenschaftlichen Freiraum, den er mir gelassen hat.
- Dr. Michael Haumann danke ich für sein Interesse an dem Projekt sowie für die vielen konstruktiven Tipps bei der Fertigstellung dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Joachim Heberle danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur. Auch danke ich ihm für die Möglichkeit, Step-Scan Messungen in seiner Arbeitsgruppe beizuwohnen und so meine ersten Erfahrungen auf diesem Gebiet zu machen.
- Falk Metzler und Andre Klaus danke ich für die Korrekturvorschläge.
- Alexander Gold von der institutseigenen Feinwerktechnik danke ich für die gute Zusammenarbeit.
- Monika Fünning danke ich für die Präparation der qualitativ hochwertigen PSII-Membranfragmente.
- Petko Chernev für erhellende Einblicke in seine Computerprogramme.
- Joachim Buchta, Alexander Grundmeier und Andre Klaus danke ich für die angenehme Zeit in unserem Büro.
- Simone Löscher für die angenehmen Abwechslungen innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe.
- Ich danke meinen Eltern für die Erfüllung der heiklen Aufgabe mich großzuziehen.
- Ich danke vor allem meiner lieben Freundin Franziska für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht und dass sie mich glücklich macht.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Berlin, 16.09.2011