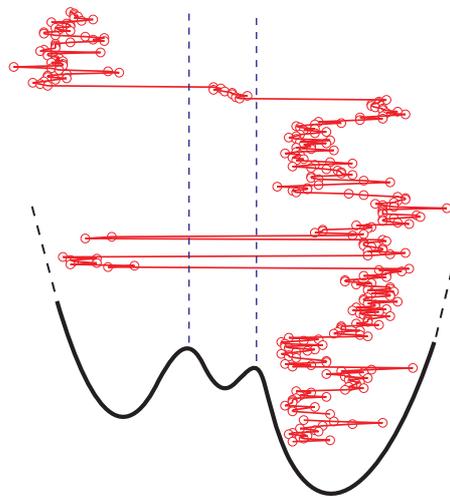
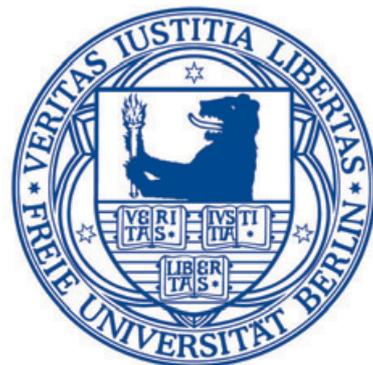


Einzelmolekül-Spektroskopie am Photosystem I



Im Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin
eingereichte Dissertation



Hauke Studier

5. November 2007

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Robert Bittl an der Freien Universität Berlin.

Berlin, am 5. November 2007

Erstgutachter: Prof. Dr. Robert Bittl
Zweitgutachter: Prof. Dr. Paul Fumagalli

Tag der Disputation: 17. Dezember 2007

Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment than biology, and if we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms.

R. P. Feynman [Fey63]

Abstract

A confocal spectrometer for low temperatures with sufficient efficiency to detect single-molecule fluorescence was built in the course of this work. It was used to investigate spectral properties, heterogeneities and dynamics of the low-energy antenna chlorophylls in individual Photosystem I (PS I) complexes from three different cyanobacteria: *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*), *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7002. A fluorescence polarization analysis on single PS I monomers from *T. elongatus* reveals three pigment pools contributing to the red-shifted emission. In addition, the angle between the transition dipole moments of emitters from C708 and C719 were determined to be near 90° . In the spectral regions of the red-most states of all three species intense zero-phonon lines (ZPLs) were observed showing marked spectral diffusion. A clear effect due to the substitution of hydrogen for deuterium in the solvent was discovered, visible as significant reduction of spectral fluctuations. This suggests that proton displacement is one of the main processes responsible for fine-tuning of site energies in PS I. The occurrence of spectral jumps of ZPLs above 10 cm^{-1} in absence of external excitation was proved to be highly unlikely at 1.4 K. Consequently, at cryogenic temperatures proton tunneling in the vicinity of the red pools is very unlikely without excitation. Even for far red-shifted states of the PS I from all of the three above-mentioned species small Huang-Rhys factors were found, implying only a weak coupling of the electronic transition to the bath of vibrational modes. This finding indicates that no distinct electron-phonon coupling is necessary for the strong redshift of these states.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Photosystem I	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Aufbau und Funktion	7
1.2.1 Einführung	7
1.2.2 Kopplungsmechanismen und Energietransfer	12
1.2.3 Proteinmatrix	15
1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“	19
1.3.1 Einführung	19
1.3.2 Ursprung der Rotverschiebung	21
1.3.3 Spektrale Eigenschaften	22
1.3.4 Funktion in der Natur	26
2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen	29
2.1 Einleitung	29
2.1.1 Stand der Forschung	30
2.2 Photophysik eines Makromoleküls	31
2.2.1 Einführung	31
2.2.2 Grundlagen für die optische Molekülspektroskopie	35
2.2.3 Absorption und Fluoreszenz	36
2.2.4 Modellierung der spektralen Form	38
2.3 Konfokale Mikroskopie	43
2.3.1 Einführung	43
2.3.2 Konfokales Prinzip	44
2.3.3 Laterale und axiale Auflösung	45
3 Experiment	51
3.1 Aufbau des konfokalen Spektrometers	51
3.1.1 Einführung	51
3.1.2 Funktionsweise und Übersicht	52
3.1.3 Lichtquelle: Laser und Einmoden-Lichtwellenleiter	54
3.1.4 Rastermethode: Galvano-Spiegeldreher	55
3.1.5 Ansprüche an das Objektiv	56

3.1.6	Badkryostat und Pumpensystem	58
3.1.7	Die Lochblende	61
3.1.8	Optisches Filtersystem	62
3.1.9	Lawinenphotodiode und Spektrometer mit CCD-Kamera	62
3.1.10	Detektionseffizienz	65
3.1.11	Computergestützte Datenakquisition	66
3.2	Präparation der Proben	66
3.2.1	Einführung	66
3.2.2	Photosystem I-Proben	66
3.2.3	Lösungsmittel zur Verdünnung der Probe	67
3.2.4	Anordnung der Probe	67
3.3	Messbedingungen	68
3.3.1	Experimentelle Auflösung bei tiefer Temperatur	68
3.3.2	Nachweis für die Detektion einzelner Moleküle	70
3.3.3	Verwendete Anregungsleistung	70
3.3.4	Hintergrundsignal bei der Aufnahme eines Spektrums	72
4	Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände	73
4.1	Einleitung	73
4.2	Stationäre Fluoreszenzspektren individueller PS I-Trimere	73
4.2.1	von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	74
4.2.2	von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	75
4.2.3	von <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	76
4.3	Spektrale Dynamik in der Fluoreszenz	78
4.3.1	Zeitabhängigkeit der Linienbreite	79
4.3.2	Emissionslinien mit mehreren diskreten Realisierungen	81
4.3.3	Energiebereiche der Emissionslinien	82
4.3.4	Spektrale Diffusion von breiten Emissionsbanden	84
4.4	Separation von Fluoreszenzbanden	86
4.4.1	PS I-Monomere von <i>T. elongatus</i>	86
4.4.2	PS I in trimerer Form	91
4.5	Vergleich der Fluoreszenz einzelner Komplexe mit der eines Ensembles	94
4.6	Diskussion	98
4.7	Zusammenfassung	103
5	Energielandschaft der Proteinumgebung	105
5.1	Einleitung	105
5.2	Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung	105
5.2.1	beim PS I von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	105
5.2.2	beim PS I von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	109
5.3	Auslöser der Fluoreszenzdynamik bei tiefer Temperatur	112
5.4	Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel	114

5.4.1	auf das PS I von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	114
5.4.2	auf das PS I von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	117
5.5	Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen	119
5.6	Entstehung der breiten roten Fluoreszenzbande	123
5.7	Diskussion	124
5.8	Zusammenfassung	133
6	Charakterisierung der roten Zustände	135
6.1	Einleitung	135
6.2	Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform .	136
6.2.1	beim PS I von <i>Thermosynechococcus elongatus</i>	137
6.2.2	beim PS I von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	140
6.2.3	beim PS I von <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	144
6.3	Korrelation zwischen verschiedenen roten Zuständen	146
6.3.1	Änderungen im Energietransfer	147
6.3.2	Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten	149
6.4	Diskussion	151
6.5	Zusammenfassung	158
	Zusammenfassung	161
	Ausblick	165
	Summary	167
	Anhang	169
	Literaturverzeichnis	173
	Publikationen	191
	Akademischer Lebenslauf	193
	Danksagung	195

Einleitung

Die Natur birgt eine große Ideensammlung, von der wir lernen können. Die im Zuge der Evolution hervorgebrachten effektiven biochemischen Systeme beinhalten funktionelle Gruppen, deren Mechanismen im Detail vielfach noch unverstanden sind. Die Biophysik befindet sich gegenwärtig in der Situation, dass häufig sogar Grundprinzipien noch nicht erschlossen sind. Dies betrifft auch an der Photosynthese beteiligte Systeme, die in der Lage sind, aus Sonnenlicht Energieressourcen zu schaffen, ohne die höher entwickeltes Leben auf der Erde undenkbar ist. Laut *Worldwatch Institute* hat sich der Energieverbrauch der Weltbevölkerung in den letzten 50 Jahren verfünffacht. Die Energiebilanz der heutigen Technik zur Nutzung regenerativer Energien fällt sehr gering aus. Die Maschinerie der Natur hingegen besitzt eine hohe Effizienz. Um die brillante Entwicklungsarbeit der Natur nutzen zu können, müssen die beteiligten Systeme im Detail verstanden werden. Ein wichtiges molekulares Solar-Kraftwerk ist das Photosystem I (PS I). Seine Hauptaufgabe besteht darin, Sonnenlicht einzufangen und damit eine stabile Ladungstrennung herbeizuführen, ähnlich einer Halbleiter-Solarzelle. Zum Lichtsammeln dienen dem PS I Antennenpigmente, die ihre Anregungsenergie an ein Reaktionszentrum (RC) weitergeben, um die Ladungstrennung einzuleiten. Eine spezielle Gruppe dieser Pigmente übernimmt eine Schlüsselrolle in der PS I-Forschung. Ihre optischen Übergangsenergien liegen gegenüber der erforderlichen Anregungsfrequenz des RCs rotverschoben. Sie werden daher allgemein als „rote Chlorophylle“ bezeichnet. Sowohl über ihre Funktion, als auch über den Mechanismus, der zu ihrer Rotverschiebung führt, wird aktuell noch diskutiert. Ihre Anwesenheit hat großen Einfluss auf den Energietransfer und wirkt sich auch stark auf die Fluoreszenzeigenschaften von PS I aus. Eine Einführung zum Thema PS I, insbesondere im Hinblick auf die roten Chlorophylle, wird im Kapitel 1 geboten.

Die spektralen Eigenschaften der roten Chlorophylle sind eingehend mit konventionellen Spektroskopiemethoden in Absorption, Emission und Fluoreszenzanregung untersucht worden. Die gewonnenen Informationen sind durch die Mittelung über ein Ensemble von PS I-Komplexen stark inhomogen verbreitert. Detailliertere Kenntnisse sind mit den verfeinerten Methoden der energiselektiven Fluoreszenzspektroskopie und des Lochbrennens erlangt worden, die jedoch immer noch über ein großes Teilensemble mitteln. Die einzige Technik, die eine Ensemble-Mittelung vollständig vermeidet, ist die Einzelmolekül-Spektroskopie (SMS). Mittlerweile kann man sie zu den etablierten Methoden zählen, auch wenn sie noch nicht so weit verbreitet ist. Die optische SMS nutzt die Fluoreszenz einzelner Moleküle als Sonde. Für die technische Realisierung wird die Anordnung eines konfokalen Mikroskops genutzt. Um das schwache Fluoreszenzsignal eines einzelnen

Einleitung

Moleküls zu detektieren, bestehen hohe Anforderungen an alle optischen Komponenten, insbesondere an das Objektiv und die Detektoren. Wichtige Aspekte zur Photophysik von Makromolekülen und zur konfokalen Mikroskopie werden in Kapitel 2 beleuchtet.

Um mit der Methode der optischen SMS bei der Klärung offener Fragen zu den roten Chlorophyllen des PS I beizutragen, war das erste Ziel meiner Arbeit, ein Einzelmolekül-Spektrometer zu bauen. Eine detaillierte Beschreibung der Apparatur findet man in Kapitel 3. Unter physiologischen Bedingungen ist die Fluoreszenzquantenausbeute von PS I für die SMS zu gering, da es seine primäre Funktion der Ladungstrennung erfüllt. Die roten Chlorophylle können dabei Anregungsenergie nur durch zusätzliche Absorption von vibronischer Energie aus der Proteinmatrix auf das RC übertragen. Dies kann man sich für ein SMS-Experiment zu Nutze machen, indem man durch kryogene Temperaturen den größten Teil der vibronischen Energie einfriert. Dadurch werden die roten Chlorophylle für die Anregungsenergie zur Falle und ihre Fluoreszenzquantenausbeute wird stark angehoben. Mein Ziel war es daher, insbesondere Messungen bei tiefen Temperaturen zu ermöglichen. Für den optischen Zugang bei Temperaturen unter dem Heliumsiedepunkt ist die Umspülung der Probe mit suprafluidem Helium notwendig. Experimente an schockgefrorenen PS I-Proben haben gezeigt, dass sowohl der Energietransfer vom Antennensystem zum RC als auch Teilprozesse der Ladungstrennung funktionieren, d.h. ein Elektronentransfer bis zum A_1 , teilweise sogar bis zum F_B [Sch98]. Somit erscheint die Annahme vernünftig, dass die Integrität von PS I im schockgefrorenen Zustand zumindest für den interessierenden Teil gewährleistet ist.

Meine Arbeit leistet zu folgenden Fragestellungen wissenschaftliche Beiträge:

- Die Anzahl roter Chlorophylle im PS I ist relativ klein. Aus Ergebnissen der Ensemble-Spektroskopie wird angenommen, dass die Menge in den PS I verschiedener Organismen variiert. Ein Ziel war es, die genaue Anzahl der roten Emitter zu bestimmen. Besonders interessant ist dabei das cyanobakterielle PS I der Spezies *Thermosynechococcus elongatus*, da von ihm die bisher genaueste Röntgenstruktur (2,5 Å) vorliegt.
- Welche homogenen spektralen Eigenschaften sind für die roten Zustände charakteristisch? Unklar ist bisher, wie ausgeprägt die spektrale Heterogenität eines bestimmten roten Zustands in verschiedenen PS I-Komplexen ist und wie die einzelnen roten Zustände zu den aus der Literatur bekannten Ensemble-Spektren beitragen. Wie sieht die homogene Linienform eines einzelnen roten Zustands aus?
- Bisher wird davon ausgegangen, dass für die starke Rotverschiebung der roten Chlorophylle eine ausgeprägte Elektron-Phonon-Kopplung notwendig ist, d.h. die zugehörigen elektronischen Übergänge koppeln stark an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins. Dies wird in der Literatur durch das Beimischen von Ladungstransferzuständen zu den exzitonisch gekoppelten Zuständen erklärt. Ist eine starke Elektron-Phonon-Kopplung essentiell für die starke Rotverschiebung der roten Chlorophylle?

- Gibt es einen effizienten Energietransfer zwischen verschiedenen roten Zuständen innerhalb eines Monomers? Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde auch ermittelt, wie die Übergangsdipolmomente der einzelnen roten Zustände im PS I von *T. elongatus* zueinander räumlich orientiert sind.
- Die roten Chlorophylle stellen im Wirkungsgefüge aus Antennen und Protein spezielle Sonden dar, die sehr sensibel auf strukturelle Veränderungen reagieren und diese im optischen SMS-Experiment weitergeben. Gibt es Hinweise darauf, was für Konformationsänderungen bei 1,4 K noch stattfinden können und unter welchen Voraussetzungen? Am bakteriellen Lichtsammelkomplex LH2 sind bei 1,4 K Konformationsänderungen im Protein nachgewiesen worden [Hof03]. Kann am PS I ein ähnliches Verhalten beobachtet werden? Wie ist die Energielandschaft der Proteinumgebung der roten Zustände organisiert?
- Beim nicht-photochemischen Lochbrennen wird vorausgesetzt, dass sich die Potentialhyperflächen im elektronischen Grund- und elektronisch angeregten Zustand unterscheiden. Details sind bisher keine bekannt. Mit Hilfe von Experimenten an teildeutierten Proben konnte der Frage nachgegangen werden, ob Protonentunneln bei 1,4 K möglich ist und welche Rolle dabei der elektronische Zustand spielt. PS I diene diesbezüglich als Modellsystem. Die hierzu in Kapitel 5 entwickelten Ideen können vermutlich auch auf andere Proteinkomplexe übertragen werden.

Einleitung

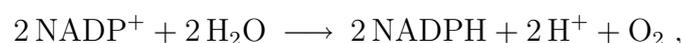
1 Photosystem I

1.1 Einleitung

Die Photosynthese sorgt für den Aufbau von organischer Materie durch Lichtenergie und schafft damit die Grundlage für fast alles irdische Leben. Die ältesten fossilen Cyanobakterien sind ca. 3,5 Milliarden Jahre alt. Vermutlich haben sich Bakterien mit anoxygener Photosynthese schon früher entwickelt und sind heute nur nicht mehr nachweisbar. Für diese war Sauerstoff ein starkes Zellgift. Erst die Cyanobakterien haben die oxygene, sauerstoffentwickelnde Photosynthese mit zwei hintereinander geschalteten Photosystemen entwickelt, wodurch ihnen die energetisch sehr aufwendige Spaltung molekularen Wassers möglich wurde. Die nötige Energie spendet die Sonne, die somit einen Hauptbeitrag zur Entstehung von terrestrischem Leben geleistet hat. Sie strahlt pro Tag ca. $1,5 \cdot 10^{22}$ kJ auf die Erde ein, wovon ca. 1 % durch photosynthetische Organismen absorbiert wird. Jährlich werden ca. 10^{11} t CO_2 durch Photosynthese fixiert ($\cong 10^{18}$ kJ). Die Gesamtreaktion der Photosynthese ergibt unter Lichtzufuhr folgende Bilanz:



wobei die freie Energiedifferenz zwischen dem Produktzustand und dem Ausgangszustand $\Delta G = 492,2$ kJ/mol beträgt. Die oxygene Photosynthese wird von den unterschiedlichsten Organismen genutzt. Bei Pflanzen und Grünalgen findet sie in den Chloroplasten statt. Der Innenraum, das Stroma, ist mit löslichen Enzymen des Calvinzyklus und membranartigen Strukturen, den Thylakoiden, gefüllt. Diese besitzen ein System aus Lipiddoppelmembranen, der Thylakoidmembran, die eine wässrige Innenphase, Thylakoidlumen, umschließt. In Cyanobakterien sind keine speziellen Zellorganellen ausgebildet und die Thylakoide sind direkt ins Zellplasma eingelagert. Photosynthese umfasst Licht- und Dunkelreaktionen. Letztere finden im Stromaraum statt und beinhalten die Fixierung von CO_2 zum Aufbau von Zucker. Sie werden vom Calvinzyklus beschrieben, der in Lehrbüchern eingehend behandelt wird [Str95, Voe95]. Die Lichtreaktionen laufen in und an der Thylakoidmembran ab. Sie beinhalten den Elektronentransport mit der Bilanz



1 Photosystem I

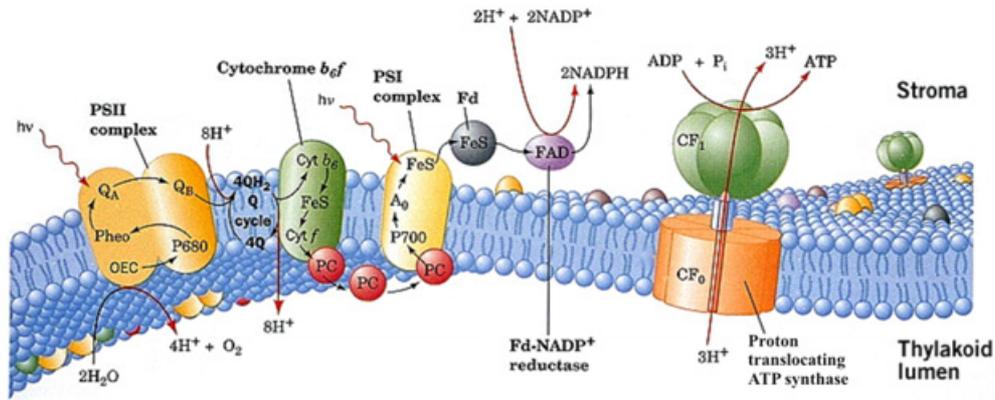
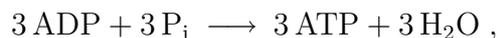


Abbildung 1.1: Schnitt durch die Thylakoidmembran. Vier Proteinkomplexe sind an der oxygenen Photosynthese beteiligt. Im PS II wird nach Absorption zweier Photonen P680 oxidiert und Q_B über transmembranen Elektronentransfer zum Hydrochinon (*plastoquinol* PQH_2) reduziert. Dieses diffundiert in die Membran zum Cytochrom b_6f ($Cyt\ b_6$). Derweil reduziert die Wasseroxidase das $P680^+$ -Ion und spaltet dabei Wasser. Das Q_B wird vom $Cyt\ b_6$ reoxidiert. Dabei werden effektiv zwei Protonen ans Lumen abgegeben und zwei Elektronen durch den $Cyt\ b_6$ -Komplex transferiert und auf Plastocyanin (PC) übertragen. Im PS I wird nach Absorption eines Photons $P700$ oxidiert. Der transmembrane Elektronentransfer mündet auf Ferredoxin (Fd), welches $NADP^+$ zu $NADPH$ reduziert. Das $P700^+$ -Ion wird vom PC rereduziert. Der durch die Lichtreaktion aufgebaute Protonengradient zwischen Stroma und Lumen wird von der ATP-Synthase zur Umwandlung von ADP zu ATP genutzt. Das Bild wurde von Eberhard Schlodder zur Verfügung gestellt.

wobei die freie Energiedifferenz $\Delta G = 432,1\text{ kJ/mol}$ beträgt und die Photophosphorylierung



bei der die freie Energiedifferenz bei $\Delta G = 3 \cdot 49,3\text{ kJ/mol}$ liegt. Die „Maschinerie“ für diese Prozesse besteht aus vier Funktionseinheiten, die in die Thylakoidmembran eingebettet sind. In Abbildung 1.1 werden diese vier transmembranen Proteinkomplexe, bestehend aus Photosystem II (PS II), Cytochrom b_6f , Photosystem I (PS I) und der ATP- CF_0CF_1 -Synthase, in einem schematischen Schnitt durch die Membran dargestellt. In der Bildunterschrift werden die einzelnen Prozesse kurz skizziert. Eine ausführliche Abhandlung findet man z.B. in Ref. [Häd99]. Da das Augenmerk dieser Arbeit auf das PS I gerichtet ist, wird nur auf das PS I näher eingegangen. Das PS I ist ein Pigment-Proteinkomplex und eines von zwei Photosystemen, die im Zuge der oxygenen Photosynthese Lichtenergie in chemische Energie umwandeln. Unter Lichteinwirkung findet im PS I, ähnlich wie im PS II, eine Ladungstrennung statt, indem ein Elektron über eine Elektronentransferkette von Kofaktoren durch die Membran transportiert wird. Der oxidierte primäre Donator $P700^+$ wird von Plastocyanin oder Cytochrom c_6 wieder reduziert. Auf der Akzeptorseite wird Ferredoxin bzw. Flavodoxin vom terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum reduziert. In einem weiteren Schritt wird schließlich $NADP^+$ zu $NADPH$ reduziert. Der Aufbau der Elektronentransferkette ähnelt der Bandstruktur hinsichtlich Valenz- und Leitungs-

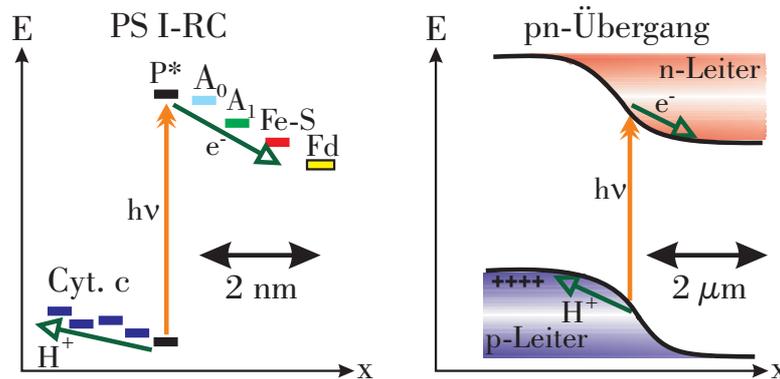


Abbildung 1.2: Vergleich zwischen PS I-Reaktionszentrum und Halbleiter-Photodiode hinsichtlich Energiefluss und Elektronenbewegung. Im physikalischen Sinn kann PS I als nanoskalierte molekulare Photodiode aufgefasst werden. Ihr Wirkungsquerschnitt übertrifft auf engstem Raum den eines synthetisch herstellbaren pn-Übergangs um drei Größenordnungen.

band in einem pn-Übergang. PS I kann als nanoskalierte Photodiode betrachtet werden. In Abbildung 1.2 wird das technische mit dem biologischen System verglichen. Die in der Thylakoidmembran eingebetteten PS I-Komplexe steuern den Energiefluss auf der nm-Längenskala, während in Halbleiter-Solarzellen, deren Herstellung aus hochreinen Kristallen sehr viel Energie kostet, die Ladungstrennung auf einer größeren Längenskala von Mikrometern erfolgt. Der Vorteil einer großen dielektrischen Funktion des biologischen Systems erwächst aus den großen Übergangsdipolmomenten von aromatischen Molekülen. Entsprechende Werte für Chlorophylle findet man in [Kno03]. Zur Nutzung von technischer Photovoltaik werden außer den Halbleiter-Zellen lichtsammelnde Optiken, Spannungswandler und energiespeichernde Akkumulatoren benötigt. Insgesamt amortisiert sich Photovoltaik daher wenn überhaupt erst nach vielen Jahren Nutzung. Die an der Photosynthese beteiligten „molekularen Maschinen“ wie PS I werden von der Natur selbst hergestellt, verwendet und bei Beschädigung ausgetauscht. Die Energiebilanz ist positiv.

1.2 Aufbau und Funktion

1.2.1 Einführung

Die Struktur von PS I

Die PS I von Prokaryonten und Eukaryonten sind ähnlich aufgebaute Multiproteinkomplexe. Leichte Unterschiede bestehen in Anzahl und Organisation der Polypeptide. Die

1 Photosystem I

Struktur des PS I von höheren Pflanzen und Algen umfasst 13 Proteinuntereinheiten und zusätzlich periphere Lichtsammelkomplexe (LHC I) [Mel05], ein Ringsystem aus Polypeptiden, dessen eingebaute Chlorophylle dem PS I von Eukaryonten einen größeren Wirkungsquerschnitt verschaffen. Das cyanobakterielle PS I besitzt 12 Untereinheiten (A – F, I – M, X) und eine Gesamtmolekülmasse von 350 kDa. Detaillierte strukturelle Informationen wurden durch Röntgenstrukturanalyse an Kristallen vom cyanobakteriellen PS I der thermophilen Spezies *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*, früher: *Synechococcus elongatus*) gewonnen. Die Auflösung beträgt derzeit 2,5 Å [Jor01]. Die Auflösung der Röntgenstruktur des PS I von höheren Pflanzen beträgt zum Vergleich zur Zeit 3,4 Å [Amu07]. Während vom PS I in Cyanobakterien angenommen wird, dass es in seiner natürlichen Umgebung in trimerer Form vorliegt [Boe87, Sch97], wurden in den Membranen von Eukaryonten bisher nur PS I-Monomere gefunden [Boe90, Ger02]. Das unterschiedliche Aggregationsverhalten ist vermutlich auf die leicht differenzierende Polypeptidzusammensetzung zurückzuführen. Im pflanzlichen PS I fehlen die Untereinheiten PsaM und PsaX gegenüber dem cyanobakteriellen PS I. Dafür sind zusätzlich die drei Untereinheiten PsaG, PsaH und PsaN vorhanden. Die Struktur des PS I von *T. elongatus* wird in Abbildung 1.3 gezeigt. Sein Gerüst wird von zwei großen (PsaA, PsaB) und sechs kleineren (PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM und PsaX) integralen Membranproteinen mit α -Helices gebildet. Drei Proteinuntereinheiten sind von der Stromaseite an den Komplex gebunden (PsaC, PsaD und PsaE) und eine ist in das Lumen exponiert (PsaF). Das Proteinrückgrat trägt 127 Kofaktoren: 96 Chlorophylle (grün eingezeichnet), 22 Carotinoide, vier Lipide, drei Eisen-Schwefel-Zentren (Fe_4S_4) und zwei Phylloquinone. Der Kern des Komplexes wird von den Untereinheiten PsaA und PsaB gebildet, die je elf transmembrane α -Helices enthalten, von denen jeweils fünf die Kernstruktur mit der Elektronentransferkette darstellen. Die restlichen 12 Polypeptide beinhalten einen großen Teil der Antennenchlorophylle. An die Untereinheit PsaC sind die terminalen Akzeptoren gebunden, die beiden Fe_4S_4 -Zentren F_A und F_B .

Die Funktion

Eine Übersicht der Funktion von PS I als lichtgetriebene Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde bereits in der Einleitung 1.1 gegeben. Unter Lichteinwirkung transferiert PS I Elektronen vom Plastocyanin PCy oder Cytochrom *c6* zum Ferredoxin Fd oder Flavodoxin. Die Bruttoreaktion wird durch die Gleichung



beschrieben. Das lösliche PCy befindet sich dabei im Lumen der Thylakoide und das Fd im Stromaraum der Chloroplasten bei den Eukaryonten bzw. im Cytoplasma bei den Prokaryonten. Die Reaktion wird durch die Absorption von Lichtenergie in den Antennenpigmenten angetrieben. In Abbildung 1.4 wird die Wirkungsweise des PS I als „Energie-trichter“ veranschaulicht. Nach effizientem Energietransfer wird die Anregungsenergie auf

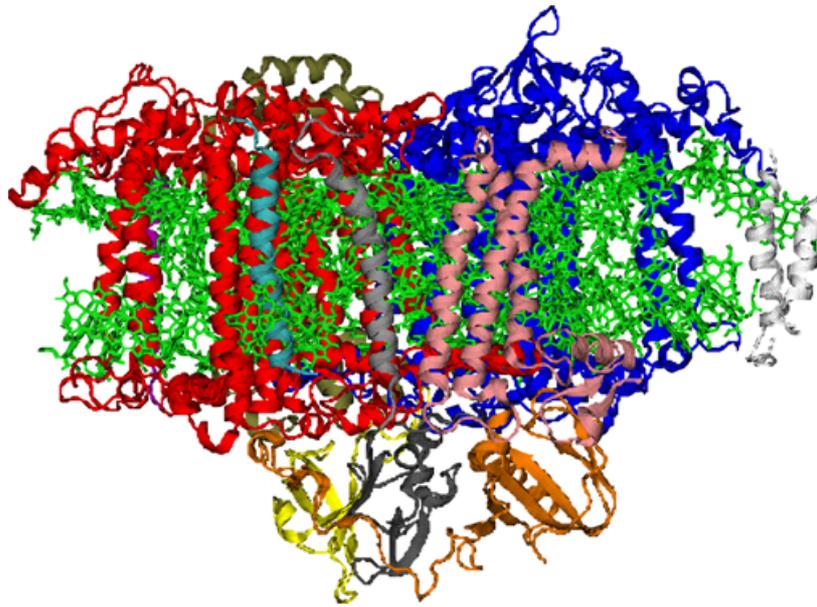


Abbildung 1.3: Strukturdarstellung eines PS I-Monomers vom Cyanobakterium *T. elongatus*. Die Blickrichtung liegt in der Membranebene, wobei sich oben die lumenale und unten die stromale Seite befindet. Die Antennenchlorophylle sind in grün eingezeichnet und die Proteinuntereinheiten in: PsaA → blau, PsaB → rot, PsaC → dunkelgrau, PsaD → orange, PsaE → gelb, PsaF → bronze, PsaI → grau, (PsaJ vollst. verdeckt), PsaK → weiß, PsaL → rosa, PsaM → mintgrün, PsaX → magenta. Die Trimerisierungsachse liegt bei der Untereinheit PsaL. Die Röntgenstruktur wurde in Ref. [Jor01] veröffentlicht. Die Darstellung wurde mit VMD erstellt [Hum96].

den primären Donator P700 übertragen. Die primäre Ladungsseparierung erfolgt aus dem ersten elektronisch angeregten Singulettzustand $^1\text{P700}^*$. Als primärer Elektronenakzeptor wirkt ein Chlorophyll, das als A_0 bezeichnet wird. Vom $\text{A}_0^{\bullet-}$ nimmt der sekundäre Akzeptor, das als A_1 bezeichnete Phylloquinon (Vitamin K_1), das Elektron auf. $\text{A}_1^{\bullet-}$ überträgt das Elektron auf F_X , einem der drei Fe_4S_4 -Zentren. F_A und F_B vermitteln schließlich als redoxaktive Gruppe die Elektronenübertragung vom F_X^{red} auf das $\text{Fd}(\text{I})$. Wie beim bakteriellen RC ist auch das RC beim PS I in zwei Zweigen organisiert. Mehr Details zur Struktur und Funktion von PS I werden von den Ref. [Gol91, Set92, Bry92, Mal96, Bre97] geboten.

Pigmentgruppen und Absorptionseigenschaften

Die primären Lichtsammelpigmente in der Photosynthese sind die Chlorophylle (griechisch: *chloros* → grün, *phullon* → Blatt). Detaillierte Informationen über Struktur und Eigenschaften von Chlorophyllen findet man in den Ref. [Sch91, Str95]. In der oxygenen Photosynthese existieren zwei unterschiedliche Typen von Chlorophyllen: Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b). Absorptionsspektren von Chl a und Chl b in Lösung werden in Abbildung 1.5 gezeigt. Durch die unvollständige Überlappung wird die spektra-

1 Photosystem I

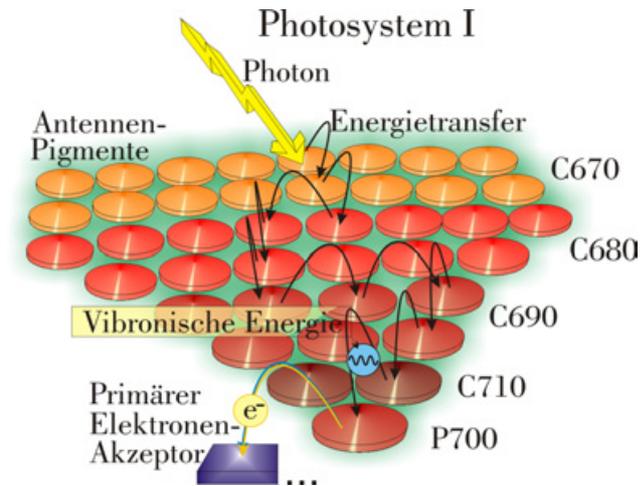


Abbildung 1.4: Veranschaulichung der Wirkungsweise des PS I als „Energietrichter“. Einfallende Photonen werden von dem Antennensystem gesammelt. Die meisten Pigmente haben hierfür ihr Absorptionsmaximum bei ca. $\lambda = 680 \text{ nm}$ (C680). Anschließend wird die Energie effektiv an niederenergetischer absorbierende Pigmente weitergeleitet. Die Energie kann auch Pigmente durchlaufen, deren angeregte Zustände unter dem des Reaktionszentrums liegen. Dann wird für den letzten Transferschritt die Absorption von vibronischer Energie aus dem Protein benötigt. Nach Anregung des P700 zum P700* erfolgt die Oxidation zum P700⁺, und eine stabile Ladungstrennung wird eingeleitet.

le Region, in der absorbiert werden kann, ausgedehnt. Bei beiden Arten von Chlorophyllen ist der Hauptanteil der Absorption über zwei Banden im sichtbaren Spektralbereich verteilt: Die Soret-Bande mit ihrem Maximum bei ca. 430 nm für Chl a (bzw. ca. 460 nm für Chl b) und eine Bande im roten Spektralbereich, die den Q_y -Übergang repräsentiert, mit ihrem Maximum bei ca. 670 nm für Chl a (bzw. ca. 650 nm für Chl b). Sowohl der Soret-Übergang als auch der Q_y -Übergang besitzen sehr große Extinktionskoeffizienten in der Größenordnung von $10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [Sch91, Str95]. Die Ursache liegt in der Molekülstruktur. Chlorophyll besteht aus einem Tetrapyrrolring, an den eine Phytolkette gebunden ist. Das starke Übergangsdipolmoment wird von dem konjugierten π -Elektronensystem des Rings bewirkt. In der Ringebene kann senkrecht zu dem starken Übergangsdipol noch ein zweiter Übergang, der Q_x -Übergang, stattfinden. Dieser absorbiert im Bereich von 580 – 640 nm. Die Q_x -Bande wird jedoch aufgrund des nur schwach absorbierenden Q_x -Übergangs von der Q_y -Bande verdeckt. Die insgesamt schwache Absorption im grünen Spektralbereich lässt die Blätter der meisten Pflanzen grün aussehen.

Für die Funktionen des PS I ist noch eine zweite Gruppe Pigmente essentiell: die Carotinoide. Drei unterschiedliche Typen sind im PS I enthalten: Carotin, Lutein und Violaxanthin. Anders als bei den Chlorophyllen ist die Struktur der Carotinoide hauptsächlich linear. Sie besteht aus einer je nach Typ variierenden Polyenkette. Die Absorptionseigenschaften werden auch in diesen Systemen durch konjugierte π -Elektronen bestimmt. Der elektronische $S_0 - S_1$ -Übergang ist optisch verboten, so dass im Spektrum der $S_0 - S_2$ -Übergang dominiert. Dieser Übergang besitzt einen sehr großen Extinktionskoeffizienten von $1,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (für β -Carotin). Carotinoide übernehmen in der Photosynthese etliche Aufgaben. Zwei erscheinen besonders wichtig und werden hier kurz hervorgehoben. Carotinoide sind sehr effiziente Energiedonatoren und dienen dem PS I somit als zusätzliche Antennenpigmente. Vermutlich viel wichtiger als die Lichtsammelfunktion ist ihre doppelte Schutzfunktion für die Chlorophylle: Zum einen werden Tripletzustände der Chlorophylle effektiv gelöscht, die durch ihre Langlebigkeit unerwünschte Photoreak-

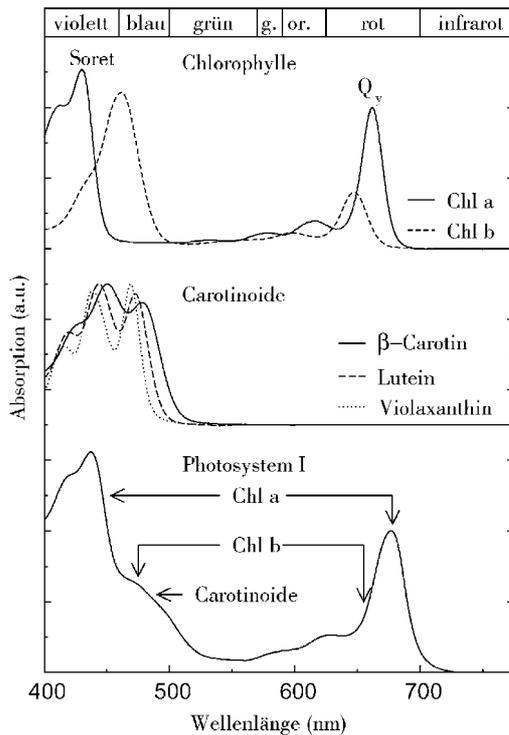


Abbildung 1.5: Absorptionsspektren bei Raumtemperatur. **Oben:** Chlorophyll a (Chl a) in Pyridin und Chlorophyll b (Chl b) in Aceton. **Mitte:** β -Carotin in Hexan, Lutein und Violaxanthin in Methylpentan. **Unten:** gesamter PS I-Komplex, der aus Mais isoliert wurde (PS I-200). Die Spektren sind nicht auf ihre Oszillatorstärke normalisiert. Quelle: [Gob02] (modifiziert).

tionen wie z.B. Bindungsbrechung bewirken können. Dadurch wird zum anderen die Entstehung von schädlichem Singulett-Sauerstoff stark herabgesetzt, der zur oxidativen Zerstörung von Pigmenten und Proteinen führt. Dennoch entstehender Singulett-Sauerstoff wird effizient in Triplett-Sauerstoff umgesetzt. Diese Funktion ist zum Überleben des Organismus notwendig. Die genauen Reaktionsprozesse der Carotinoide werden z.B. in Ref. [Häd99] beschrieben. Durch das starke Herabsetzen der Triplettausbeute der PS I-Pigmente ermöglichen die Carotinoide der optischen Einzelmolekül-Spektroskopie den Zugang auf das System.

Wie oben erwähnt, besteht der Chromophor-Teil eines PS I-Monomers aus 96 chemisch identischen Chl a-Molekülen. Ihre räumliche Verteilung, Orientierung und die unterschiedlichen Proteinbindungsplätze führen zu einer Vielzahl von Wechselwirkungen, die die lokalen optischen Übergangsenergien der Pigmente, genannt „*site energies*“, modifizieren. Auf die verschiedenen Kopplungsarten wird in den Abschnitten 1.2.2 und 2 genauer eingegangen. Der Einfluss auf die elektronische Struktur von gebundenen Pigmenten gegenüber der von gelösten Chlorophyllen bewirkt sowohl im Absorptions- als auch im Fluoreszenzspektrum Verschiebungen der Maxima von bis zu ca. 10 nm und eine starke Veränderung der Linienform. Wie der Abbildung 1.5 entnommen werden kann, wird z.B. das Absorptionsmaximum der Q_y -Bande auf ca. 680 nm verlagert. Die Heterogenität in den optischen Übergangsenergien der verschiedenen Pigmente und die zusätzlich überlagerten zeitlichen Fluktuationen, die auf der dynamischen Struktur von Proteinen beruhen, führen zu Verbreiterungen und Schultern in den Spektren. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit ist das Ausschmieren des Absorptionsspektrums oberhalb von

1 Photosystem I

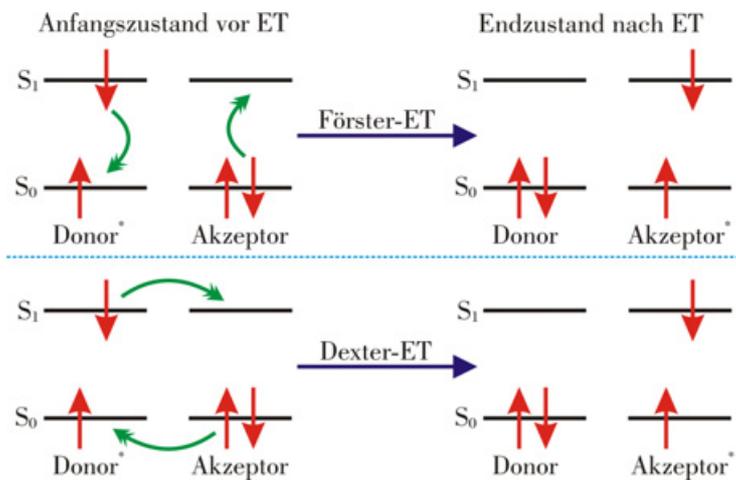


Abbildung 1.6: Schema zu den beiden Modellen des Energietransfers (ET). Im oberen Teil wird der Prozess des Förster-ET veranschaulicht und im unteren der des Dexter-ET. Die roten Pfeile symbolisieren die Spinzustände der beteiligten Elektronen in den Zuständen S_0 und S_1 . Die grünen Pfeile markieren die Übergänge der am jeweiligen ET beteiligten Elektronen.

$\lambda \geq 700$ nm interessant. Diese Absorption erfordert einen „Aufwärts“-Energietransfer, um das RC anregen zu können. Das in Abbildung 1.5 dargestellte PS I-Spektrum stammt von einer aus Maispflanzen extrahierten Probe, d.h. die oben erwähnten Chl b enthaltenden LHC I-Ringe tragen zum Spektrum bei.

1.2.2 Kopplungsmechanismen und Energietransfer

Das Antennensystem im PS I erstreckt sich über mehrere Proteinuntereinheiten, die zusammen einen supramolekularen Antennenkomplex bilden. Die größten Distanzen von Antennenpigmenten bis zum Reaktionszentrum (RC) betragen bis zu ca. 80 Å innerhalb eines cyanobakteriellen PS I-Monomers. Damit die absorbierte Strahlungsenergie effizient zum RC geleitet werden kann, muss die Transferzeit kurz gegenüber der natürlichen Lebensdauer der angeregten Zustände sein. Der Transfer über große Entfernungen erfolgt in mehreren Schritten über verschiedene Zwischenträger. Die Effizienz der strahlungslosen Übertragung von elektronischer Anregungsenergie hängt von dem Abstand, der Orientierung und den energetischen Verhältnissen von Donator und Akzeptor zueinander ab. In Pigment-Proteinkomplexen photosynthetischer Organismen treten zwei Energietransferprozesse auf, deren Mechanismen sich fundamental unterscheiden: der Förster-Energietransfer [För46] (auch Förster-Resonanztransfer genannt) und der Dexter-Energietransfer [Dex53, Dex69] (auch als Austauschtransfer bezeichnet). Beide Prozesse werden in Abbildung 1.6 schematisch gezeigt. Beim Förster-ET sind die Übergangsdipolmomente von Donator und Akzeptor über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung gekoppelt.

Diese hängt proportional zu r^{-3} vom Abstand r ab. Die Transferrate steigt proportional zum Quadrat der Wechselwirkungsenergie an. Demnach gilt für die Rate des Förster-ETs die Abstandsabhängigkeit

$$k_{\text{Förster}} \propto \frac{\kappa^2}{r^6 n^4} \frac{\Phi_{\text{D}}}{\tau_{\text{D}}} \int_0^{\infty} d\lambda \lambda^4 \epsilon_{\text{A}}(\lambda) F_{\text{D}}(\lambda) = k_{\text{rad}} R_0^6 \frac{1}{r^6}.$$

Hierbei ist κ^2 ein Orientierungsfaktor, der die relative Orientierung der beteiligten Übergangsdipolmomente misst, n der Brechungsindex, Φ_{D} die Fluoreszenzquantenausbeute des Donators in Abwesenheit des Akzeptors, τ_{D} die Fluoreszenzlebenszeit, ϵ_{A} der Exkinktionskoeffizient des Akzeptors, F_{D} das normalisierte Fluoreszenzspektrum des Donators und k_{rad} die Emissionsrate des Donators. Das Integral beschreibt den Überlapp des Fluoreszenzspektrums des Donators mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Üblicherweise werden die Parameter in einem Parameter R_0 zusammengefasst. Er entspricht dem sogenannten Försterradius, der den Donator-Akzeptorabstand angibt, bei dem die Wahrscheinlichkeit für eine Energieübertragung gerade 50 % beträgt. Donator und Akzeptor sind beim Förster-Mechanismus Resonanz-gekoppelt. Zwischen ihnen werden keine Elektronen ausgetauscht. Eine semiquantitative Betrachtung ergibt, dass der Försterradius bei großem Überlappungsintegral bis zu 100 Å betragen kann. Bei typischen Chl *a*-Abständen von ca. 8 – 16 Å in den Antennen und einem Energiebereich der einzelnen Absorptionsmaxima von ca. 660 – 730 nm finden ET-Schritte im Zeitbereich von ca. 100 fs bis wenigen ps statt, d.h. bei der Annahme einer mittleren Transferzeit von 1 ps sind bei einer Lebenszeit eines angeregten Singulettzustands von ca. 2 – 4 ns bis zu 100 sequentielle ET-Schritte möglich, bis die Energie mit einem Verlust $\leq 5\%$ das RC erreicht.

Dem Dexter-ET liegt ein andersartiger Mechanismus zugrunde. Er hängt von dem direkten Überlapp der elektronischen Wellenfunktionen des Donators und des Akzeptors ab. Da elektronische Wellenfunktionen außerhalb eines Moleküls exponentiell abfallen, ist ein sehr geringer Abstand zwischen Donator und Akzeptor erforderlich, typischerweise der van der Waals-Abstand, damit der Prozess stattfinden kann. Außerdem muss die Resonanzbedingung zwischen den Übergängen erfüllt sein, jedoch weniger streng als beim Förster-ET. Die Abstandsabhängigkeit der Rate des Dexter-ETs ergibt sich zu

$$k_{\text{Dexter}} \propto e^{-\alpha r},$$

wobei α dem Dexterkoeffizienten entspricht. Wird die Bedingung des Überlapps der Wellenfunktionen erfüllt, kann der Dexter-ET zwischen zwei Pigmenten sehr schnell, bis wenige fs, erfolgen. Dabei werden, anders als beim Förster-ET, Elektronen zwischen den Pigmenten ausgetauscht. Während beim Förster-ET aufgrund der langsam mit r abfallenden Abstandsfunktion $\sim r^{-6}$ Entfernungen von bis zu 100 Å in einem Schritt überbrückt werden können, ist der Dexter-ET aufgrund seiner exponentiellen Abstandsabhängigkeit

1 Photosystem I

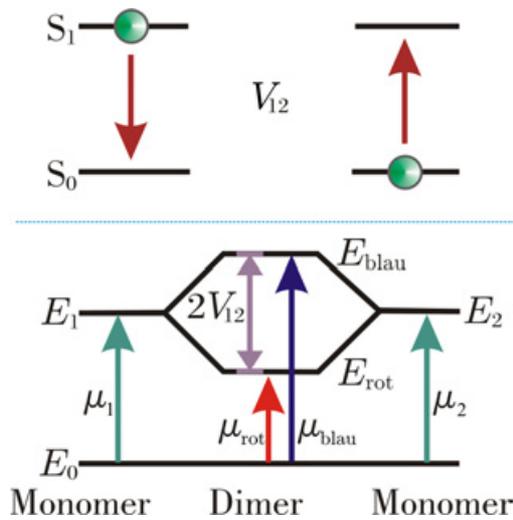


Abbildung 1.7: Schema zur exzitonischen Kopplung zwischen zwei identischen Monomeren. Durch die räumliche Annäherung der Monomere werden die beiden angeregten Zustände S_1 der Energien $E_1 = E_2$ der separaten Monomere aufgespalten. Zwei exzitonische Zustände der Energien E_{blau} , E_{rot} werden gebildet, deren Energiedifferenz der zweifachen Wechselwirkungsenergie V_{12} entspricht. Die zugehörigen Übergänge sind eingezeichnet. Unten wird in einer Vektordarstellung eine mögliche Orientierung der Übergangsdipolmomente angegeben. Von ihr ist abhängig, ob nur einer der exzitonischen Zustände oder beide optisch angeregt werden können. Strahlender Zerfall findet nur bei dem Zustand der Energie E_{rot} statt.

nur über sehr kleine Distanzen möglich. Aus Simulationen der Kinetik des ETs im PS I, einigen Phycobiliproteinen und äußeren Antennenkomplexen geht hervor, dass ein über mehrere hintereinander geschaltete Einzelschritte erfolgreicher Transfermechanismus nach Förster die Gesamtkinetik der Systeme sehr gut beschreiben kann. Eine Ausnahme bildet der ET von Carotinoiden zu Chlorophyllen. Der S_1 -Zustand von Carotinoiden hat nur eine Lebenszeit von maximal ca. 10 ps. Daher sind sie als Donatoren gemäß dem Förster-Mechanismus ungeeignet. Carotinoide sind häufig in sehr kleinem Abstand zu Chlorophyllen angeordnet, so dass die Voraussetzungen für einen effizienten Dexter-ET gegeben sind. Dieser ist essentiell für die effiziente Triplett-Löschung.

Sind in der Proteinstruktur zwei Pigmente sehr dicht beieinander lokalisiert, so dass Dexter-ET eventuell möglich ist, tritt zwischen den elektronisch angeregten Zuständen eine starke Wechselwirkung auf, die zu erheblichen Veränderungen in den optischen Spektren führt. Sie wird als exzitonische Kopplung bezeichnet. Zwei oder mehrere exzitonisch gekoppelte Pigmente bilden ein „Supermolekül“, dessen angeregter Zustand exzitonisch aufgespalten ist. Der Mechanismus wird in Abbildung 1.7 veranschaulicht. Die exzitonischen Zustände sind über die beteiligten Pigmente verteilt. Die Kopplung basiert im Wesentlichen auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung wie der Förster-ET. Formal kann die exzitonische Kopplung als Kopplungsmatrix

$$M = \begin{pmatrix} E_1 & V_{12} \\ V_{12} & E_2 \end{pmatrix}$$

geschrieben werden, wobei hier sich M in dem Fall auf ein Dimer bezieht. Auf der Hauptdiagonalen stehen die Übergangsenergien der beiden ungekoppelten Monomere. Die Nichtdiagonalelemente beinhalten die exzitonische Kopplung $V_{12} = V_{Förster} + V_{Dexter}$, die sich aus einem Förster- und einem Dexter-Anteil zusammensetzt. In der klassischen Punkt-Dipol-Näherung wird die Kopplungsenergie zwischen zwei Dipolen $\vec{\mu}_1$ und $\vec{\mu}_2$ im

Abstand r durch den Ausdruck

$$V_{12} \simeq \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \quad (1.1)$$

beschrieben [Pop82]. Diese Näherungsform der Coulomb-Wechselwirkung ist anwendbar, wenn die räumliche Ausdehnung von beiden Übergangsdichten klein gegenüber dem intermolekularen Abstand ist. Die Energien der exzitonenischen Zustände in einem Dimer mit $E_1 = E_2$, wie in Abbildung 1.7 dargestellt, betragen: $E_{\text{blau}} = E_1 + V_{12}$ und $E_{\text{rot}} = E_1 - V_{12}$.

1.2.3 Proteinmatrix

Wie bei allen funktionellen Gruppen lebender Zellen spielt auch beim PS I das Proteinrückgrat eine tragende Rolle. Proteine sind lineare Polymere, die sich unter physiologischen Bedingungen spontan in eine kompakte 3D-Struktur falten. Der Faltungsmechanismus galt lange Zeit als Mysterium. Besonders interessant ist das Levinthal-Paradoxon [Lev69], wonach sich der native Zustand bei vorausgesetztem „*random walk*“ erst nach vielen Größenordnungen des gegenwärtigen Alters des Weltalls von $5 \cdot 10^{17}$ s einstellen würde. Nur in der Architektur des gefalteten Zustands „funktioniert“ die Kette aus Aminosäuren, liegt also die biologisch aktive Form des Proteins vor. Die Beziehung zwischen Funktion und Struktur stellt eine zentrale Frage der Proteinforschung dar. Die aus der Kristallographie erhaltenen Strukturen suggerieren oft ein statisches Bild der Proteinstruktur. Jedoch ist ein fundamentales Charakteristikum am Protein, dass die Funktion essentiell von der Dynamik der Struktur beeinflusst wird [Kar83]. Proteine fluktuieren im thermischen Gleichgewicht zwischen verschiedenen Strukturen und nehmen angeregte Zustände an, wenn Funktionsprozesse stattfinden. Ein gegebenes Proteinmodell liefert üblicherweise die Grundzustandstruktur. Die Struktur von Zwischenzuständen, in denen das Protein sich nicht im Gleichgewicht befindet, ist momentan nur bei sehr wenigen Systemen bekannt. Die native Form eines Proteins ist nur in geeigneter Umgebung stabil. In wässriger Lösung gehört die Hydrathülle gewissermaßen zur Proteinstruktur dazu und beeinflusst ihre Eigenschaften maßgebend.

Um zu beleuchten, welche Art von Wechselwirkungen die native Form stabilisieren, wird die Gibbsche freie Energie $G = H - TS$ betrachtet, die sich aus der Enthalpie H und der mit der Temperatur T gewichteten Entropie S zusammensetzt. Der Beitrag der kovalenten Bindungen zur Enthalpie spielt aufgrund seiner energetischen Größe für die Dynamik der Polymerkette keine Rolle. Ins Gewicht fallen schwache Bindungen mit Energien nur wenig höher als $k_B T^1$, die somit thermischen Fluktuationen unterliegen: elektrostatische Wechselwirkungen zwischen polaren Seitenketten, van-der-Waals-Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Peptidkette und zwischen der Peptidkette und dem Lösungsmittel. Für Proteine ist charakteristisch, dass sich große enthalpische und

¹ k_B ist die Boltzmannkonstante.

1 Photosystem I

große entropische Beiträge in der freien Energie fast vollständig kompensieren, d.h. die Energiedifferenz entspricht der Bindungsenergie weniger Wasserstoffbrückenbindungen. Die resultierende marginale Stabilität ist für die Proteinfunktion essentiell und ermöglicht erst die Flexibilität der Struktur. Generell unterliegt dabei ein wesentlicher Teil der gesamten Bewegung dem Lösungsmittel, d.h. die enthalpischen und entropischen Beiträge zu den Fluktuationen der freien Energie im Protein stammen maßgeblich von der Umgebung und der Hydrathülle [Fen02, Bay05, Ren06].

Zur Modellierung der Stabilität des Proteins verwendet man eine effektive Energiefunktion, die alle Beiträge zur freien Energie außer der Konformationsentropie der Polypeptidkette enthält. Die Funktion beschreibt seine Potentialfläche als Hyperfläche in einem $(3n - 6)$ -dimensionalem Raum, wobei n der Anzahl der Atome des Proteins und der Hydrathülle entspricht, d.h. alle Konformationsfreiheitsgrade der Kette inklusive der Hydrathülle werden berücksichtigt. Ihr Ergebnis wird Energielandschaft des Proteins genannt. Die „traditionelle“ Beschreibung von Proteinen in diskreten Zuständen [Tso72] berücksichtigt keine Fluktuationen innerhalb jedes Zustands und stellt somit ein zu einfaches Modell dar, um spezielle Experimente zu erklären. In dem Modell der Energielandschaft wird ein Polypeptid als Polymer behandelt [Fra91, Wol95, Doy97], womit eine wesentlich realitätsnähere Beschreibung der Proteindynamik möglich ist. Das Protein wechselt demnach den Konformationszustand durch eine kontinuierliche Variation seiner molekularen Bindungslängen und Bindungswinkel. Da diese Bewegung unberechenbar ist, ähnelt sie stark einer Brownschen Bewegung in einem Kraftfeld. Einen Übersichtsartikel über die Brownsche Dynamik findet man in [Hän90].

Vom ungefalteten zum kompakten nativen Zustand hat die Energielandschaft global die Form eines Trichters [Dil97, Wol99]. Sein weiter Rand beschreibt die Vielzahl an offenen Konformationen der entfalteten Peptidkette, d.h. die hohe Konformationsentropie. Unterscheidet sich die gegebene Konformation deutlich von der nativen Form bzw. das Protein ist zufällig gefaltet, also denaturiert, dann erwartet man einen hohen Grad der Entartung. Die zugehörige Energielandschaft ist rau mit vielen lokalen Minima willkürlicher Struktur. Die native Form hingegen besitzt eine wohldefinierte Energielandschaft in der oben beschriebenen Trichterform mit geringer Rauigkeit. Die Vielzahl an nicht-nativen Zuständen sind von dem Minimum durch eine Energielücke getrennt. Beim Faltungsprozess können nicht alle lokalen Wechselwirkungen simultan optimiert werden, wodurch eine Quasi-Entartung des Grundzustandes entsteht. Demzufolge existiert im Minimum selbst eine große Menge an Mikrozuständen ähnlicher Energie, die auch als Konformationssubzustände bezeichnet werden [Fra79]. Experimente unterschiedlicher Methoden, wie Mößbauer-Spektroskopie und Röntgenbeugung, haben ergeben, dass auch innerhalb dieser Minima wieder Minima zu finden sind [R.H75, Fra79, Ans85, Fra88, You91]. Jeder Subzustand entspricht einem Punkt im oben beschriebenen Hyperraum, und Fluktuationen der Struktur verkörpern Sprünge zwischen diesen Punkten. Frauenfelder *et al.* haben zur Beschreibung von Proteinen die Formalismen von Gläsern und Spingläsern übernommen und postuliert, dass die Energielandschaft hierarchisch in Rängen mit sich sukzessiv

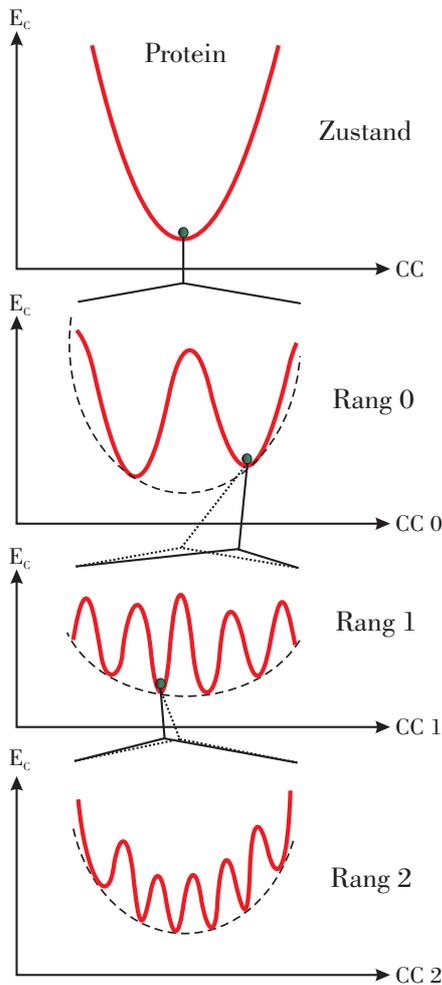


Abbildung 1.8: Stark vereinfachter eindimensionaler Querschnitt durch eine fiktive Energielandschaft eines Proteins. Oben wird ein Gesamtbild der Konformationsenergie E_C als Funktion der Konformationskoordinate CC gezeigt. Die Darstellungen darunter repräsentieren drei unterschiedliche Ränge mit sich von 0-2 sukzessiv in der Höhe verringern den Energiebarrieren. Jeder Energieminimum entspricht ein spezieller Subzustand im jeweiligen Rang, der sich von den anderen in Enthalpie, Entropie und Volumen unterscheidet. Die Subzustände sind durch die Energiebarrieren voneinander separiert. Insbesondere ab Rang 1 ist die Auftragung von E_C über der jeweiligen CC als schematisch anzusehen. E_C ist eine Hyperfläche in einem Hyperraum. Die zahlreichen Energieminima und -barrieren können real nur durch Verteilungen beschrieben werden. Wie viele Ränge im PS I sinnvollerweise separat zu betrachten sind, ist unklar, d.h. nach Rang 2 ist die Existenz weiterer Ränge denkbar. Die Art der Darstellungsform stammt von Frauenfelder *et al.* [Fra91].

in der Höhe verringern den Energiebarrieren organisiert ist [Fra91, Fen02, Hof03, Fen04]. Dieses Modell der Energiefunktion wird in Abbildung 1.8 gezeigt. Fluktuationen zwischen verschiedenen Subzuständen innerhalb eines Ranges und zwischen den Subzuständen verschiedener Ränge werden durch die Bewegung unterschiedlicher Bestandteile des Systems aus Protein, Hydrathülle und Lösungsmittel ausgelöst. Unter physiologischen Bedingungen verharren Proteine generell nicht in einem Konformationszustand, sondern „erkunden“ ihre Energielandschaft durch ständiges Springen in andere Subzustände. Die große spektrale Breite an Energiebarrieren zwischen Konformationszuständen führt zu einer Proteindynamik, deren Zeitkonstanten sich über viele Größenordnungen erstrecken. Die harmonische Schwingung eines Wasserstoffatoms dauert z.B. unter physiologischen Bedingungen typischer Weise 10 fs. Die Proteindynamik ist stark von der Temperatur abhängig. Unterhalb einer Temperatur T_d , der so genannten dynamischen Übergangstemperatur, verhält sich das Protein wie ein harmonischer Festkörper, d.h. die Wärmekapazität steigt linear mit der Temperatur. Darüber ähneln die Bewegungen des Proteins innerhalb seiner nativen Form denen einer Flüssigkeit, d.h. insbesondere thermisch aktivierte Konformationsübergänge finden statt [Par02]. Der intuitiven Erwartung

1 Photosystem I

entgegen haben Experimente erwiesen, dass selbst nahe dem absolutem Nullpunkt Konformationsübergänge stattfinden [Köh89, Hof03]. Hofmann *et al.* haben Übergänge bei 1,4 K mit Hilfe von Einzelmolekül-Spektroskopie in Fluoreszenzanregung am LH2 beobachtet. In diesem Temperaturregime sind die meisten unter physiologischen Bedingungen möglichen Konformationsfluktuationen eingefroren. Grundsätzlich sind in Abhängigkeit von der Barrierenhöhe und -breite neben arrheniusaktivierten Prozessen auch Tunnelprozesse denkbar. Die Tunnelwahrscheinlichkeit P ist proportional zu

$$P \propto \exp\left(-\frac{2\ell\sqrt{2mH}}{\hbar}\right), \quad (1.2)$$

wobei ℓ der Reaktionskoordinatenlänge, H die Barrierenhöhe und m der Masse des tunnelnden Teilchens entsprechen. Elektronen tunneln über große Distanzen bis zu $< 25 \text{ \AA}$. Mit Gleichung 1.2 erhält man für die Transferlänge eines tunnelnden Protons bei gleicher Wahrscheinlichkeit einen Wert von $0,58 \text{ \AA}$, der der Länge der Reaktionskoordinate ähnelt. Die größere Masse eines Deuterons führt zu einer entsprechenden Distanz von $0,41 \text{ \AA}$. Untersuchungen mit Hilfe des kinetischen Isotopeneffekts sind demnach attraktiv, um Protonen-Tunneln in Enzymen nachzuweisen, was jedoch nur bei einer sehr begrenzten Anzahl von Enzymen gelang [Cha89, Jon96]. Hofmann *et al.* argumentieren in ihrer Studie, dass durch die Anregung mit Photonen mit einer Energie von jeweils ca. $1,5 \text{ eV} \gg k_{\text{B}}T$ das Spektrum an möglichen Konformationsänderungen, die ohne Einstrahlung bei $k_{\text{B}}T$ zugänglich sind, stark erweitert wird. Nach der Anregung kann jeweils ein neuer Gleichgewichtszustand gefunden werden, der nicht dem Ursprünglichen entsprechen muss. In den Fluoreszenzanregungsspektren spiegelt sich dieser Prozess durch variierende Übergangsenergien des Chromophors in einer spektral diffundierenden Linie wieder.

Generell sind sinnvoller Weise zwei verschiedene Relaxationsprozesse zu unterscheiden: Bei dem einen relaxiert das Molekül aus einem ungünstigeren Zustand in den Gleichgewichtszustand. Ein nicht-Gleichgewichtszustand wird hingegen durch eine chemische Reaktion oder eine Temperatur- oder Druckveränderung produziert. Die Relaxation aus diesem Zustand kann mittels einer Observablen $M(t, T)$, z.B. die spektrale Position oder Linienbreite einer Emissionslinie, beobachtet werden. Dann wird die Zustandsänderung durch die Relaxationsfunktion

$$\Phi(t, T) = \frac{M(t, T) - M_{\text{eq}}(T)}{M(0, T) - M_{\text{eq}}(T)}$$

charakterisiert. $M(0, T)$ entspricht dem Wert $M(t, T)$ direkt nach dem Sprung und $M_{\text{eq}}(T)$ dem Wert nach Erreichen des neuen Gleichgewichtszustandes. Einfache derartige Reaktionen verlaufen gemäß der Debye-Relaxation in exponentiellen Zeitverläufen und die Temperaturabhängigkeit folgt dem Arrhenius Gesetz

$$\kappa(H, T) = A \exp\left(-\frac{H}{k_{\text{B}}T}\right),$$

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

wobei H die Barrierenhöhe und A ein Vorfaktor sind. Komplexe Systeme, wie z.B. Gläser, zeigen ein anderes Verhalten [Ric94]. Die zeitlichen Verläufe von Relaxationen können meistens durch ein Potenzgesetz, die gestreckte Exponentialfunktion oder Kohlrauschfunktion

$$\Phi(t, T) = \Phi(0) \exp\left(-[\kappa(T)t]^\beta\right), \quad \beta < 1$$

beschrieben werden. Dabei folgt der Ratenkoeffizient $\kappa(H, T)$ häufig nicht dem Arrhenius Gesetz, sondern kann z.B. durch die Ferry-Bässler-Relation

$$\kappa(H^*, T) \simeq A \exp\left(-\left[\frac{H^*}{k_B T}\right]^2\right)$$

angenähert werden, wobei der Energieparameter H^* ein Maß für die statistische Rauigkeit der Energielandschaft darstellt. Die Ursache für nicht-exponentielle Verläufe liegt im kollektiven Charakter von Relaxationsphänomenen.

Aufgrund der großen Mannigfaltigkeit an mikroskopischen Faltungstrajektorien sind Details der Energielandschaft Messungen am Ensemble nicht zugänglich. Grundsätzlich sind optische Experimente, in denen ein an das Proteingerüst gekoppelter Chromophor als Sonde genutzt wird, interessant, um Proteindynamik sichtbar zu machen. Selektive Methoden wie zeitaufgelöstes Lochbrennen [Fri96, dH99, Ski99, Her04] und "three-pulse stimulated photon echo" [Lee95a, Lee95b] haben bereits Zugang zu einigen Details verschiedener Energielandschaften gefunden. Aufgrund der hohen Selektivität kommt Einzelmolekül-Methoden ein großes Potential zu. Einen guten Übersichtsartikel über Untersuchungen von Konformationsdynamik mit Hilfe von Einzelmolekül-Spektroskopie findet man in [Wei99, Wei00].

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

1.3.1 Einführung

Ein interessantes Charakteristikum in der spektralen Heterogenität von PS I ist die Absorption bei größeren Wellenlängen als 700 nm, d.h. in einem Spektralbereich, der gegenüber dem primären Elektronendonator P700 rotverschoben liegt. Diese Besonderheit tritt sowohl beim PS I von grünen Pflanzen als auch bei dem von Algen und Cyanobakterien auf. Die Abbildung 1.9 zeigt ein Tieftemperatur-Absorptionsspektrum vom PS I des Cyanobakteriums *T. elongatus*. Die grobe Form und die Lage der beiden Hauptmaxima ähnelt der vom pflanzlichen PS I und wurde bereits anhand der Abbildung 1.5 beschrieben. Oberhalb von 700 nm bis ins nahe Infrarot sticht die absorbierte Intensität deutlich heraus und bildet sogar ein separates Maximum. Die Funktion und die Natur dieser Rotverschiebung gehören zu den Schlüsselthemen in der Spektroskopie am

1 Photosystem I

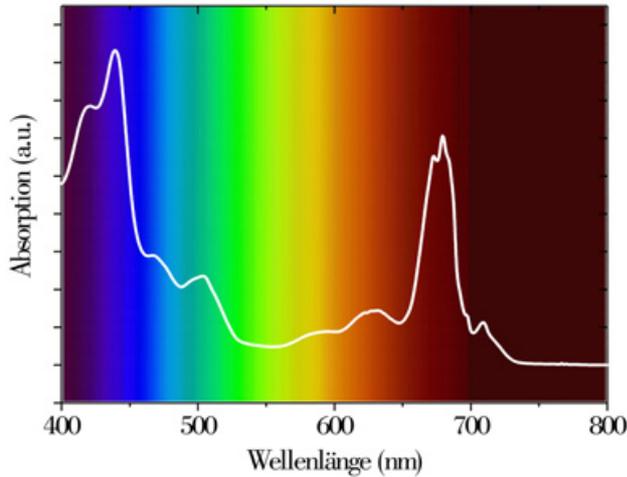


Abbildung 1.9: Absorptionsspektrum vom cyanobakteriellen PS I bei tiefer Temperatur (5 K). Bei der Probe handelt es sich um isolierte Trimere von der Spezies *T. elongatus* (Ensemble). Der Hintergrund spiegelt die entsprechenden Farben des sichtbaren Spektralbereichs wider. Die Messdaten stammen von Eberhard Schlodder.

PS I. Die Größe der energetischen Verschiebung gegenüber der primären photochemischen Falle beträgt bei Raumtemperatur $2 - 3 k_B T$. Einen Übersichtsartikel findet man in [vG94]. Obwohl für die stark rotverschobene Absorption nur eine kleine Gruppe aus 2-10 % aller Chlorophylle verantwortlich ist, wirkt sich die Anwesenheit dieser sogenannten „roten Chlorophylle“ stark auf den Energietransfer und das Einfangverhalten von Energie im gesamten PS I-Komplex aus. Dies belegen sowohl Experimente mit stationärer als auch mit zeitaufgelöster Spektroskopie. Um die roten Chlorophylle zu identifizieren wurden quantenchemische Rechnungen durchgeführt. Unter Vernachlässigung der Chlorophyll-Protein-Wechselwirkungen können die Tieftemperaturspektren der roten Chlorophylle nicht adäquat beschrieben werden [Sen02]. Auch Berechnungen der lokalen optischen Übergangsenergien von Chlorophyllen in ihrer lokalen Proteinbindungstasche wurden auf der Grundlage von Strukturdaten angestellt [Byr02, Dam02]. Obwohl diese Rechnungen die wesentlichen Merkmale der Absorptionsspektren von den Antennen-Chlorophyllen reproduzieren, können die roten Chlorophylle mit ihrer Hilfe nicht zugeordnet werden. Demnach sind experimentelle Studien, die detaillierte Informationen über Übergangsenergien, Anzahl der roten Chlorophylle und ihrer Kopplung liefern, von erheblicher Bedeutung. Detaillierte experimentelle Untersuchungen mit Hilfe konventioneller Fluoreszenzspektroskopie führen zu strukturlosen, inhomogen verbreiterten Ensemble-Spektren. Durch Techniken selektiver Spektroskopie, wie der häufig verwendeten Methode des nicht-photochemischen Lochbrennens in Kombination mit Messungen der linearen Druckverschiebung und der Starkverbreiterung wird darauf geschlossen, dass es sich bei den roten Chlorophyllen nicht um Monomere handeln kann, sondern vielmehr um stark gekoppelte Chlorophylle [Rät00, Rei01, Zaz02b, Iha03]. Aufgrund der zusätzlich auftretenden großen Stokesverschiebung und den aus simulierten Lochbrennspektren bestimmten großen Huang-Rhys-Faktoren wird den roten Zuständen zudem ein signifikanter Ladungstransfercharakter zugeordnet [Hay00, Rät00, Zaz02b, Hsi04]. In den folgenden Abschnitten wird auf einige Details der roten Chlorophylle genauer eingegangen.

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

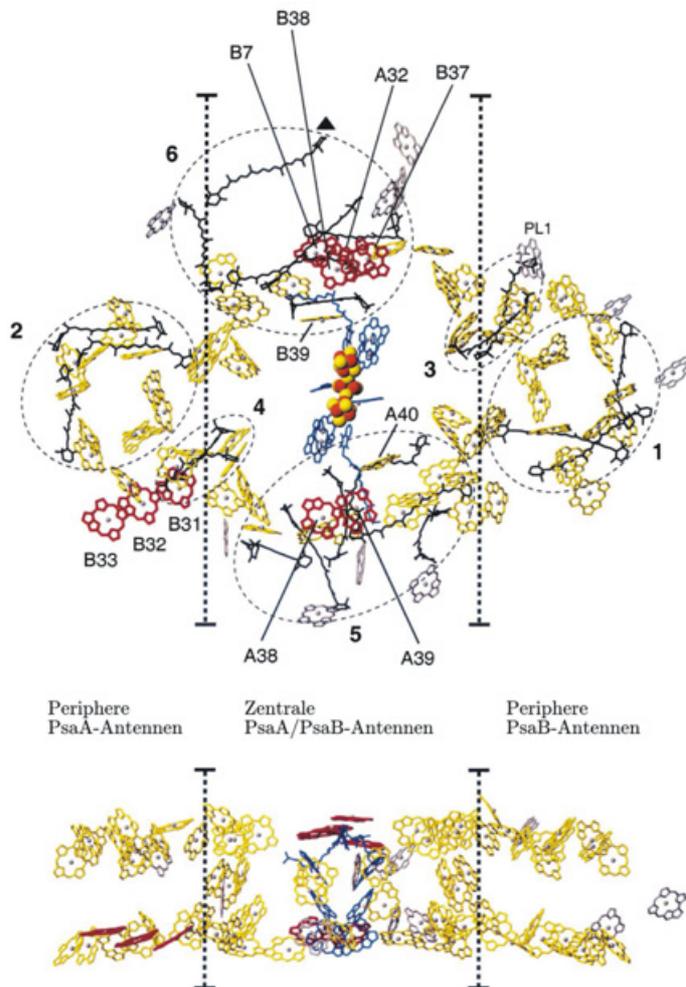


Abbildung 1.10: Konfiguration aller Kofaktoren im cyanobakteriellen PS I von *T. elongatus* mit Hauptaugenmerk auf den Antennenpigmenten. **Oben:** Aufsicht vom Stroma aus auf die Membranebene. **Unten:** Seitenansicht entlang der Membranebene. Organische Kofaktoren der Elektronentransfer-Kette sind in blau eingezeichnet, der Eisen-Schwefel-Cluster in gelb und orange und die Antennenpigmente in gelb. Die Chlorophylle, die an die peripheren Untereinheiten gebunden sind, und das Phospholipid sind grau eingefärbt. Die Carotinoide, die in sechs Clustern organisiert sind, werden durch die gestrichelten Ellipsoide angedeutet. Chlorophylle, die als Kandidaten für die roten Chlorophylle gelten, sind in rot dargestellt. Die Abbildung ist aus Jordan *et al.* entnommen [Jor01].

1.3.2 Ursprung der Rotverschiebung

Für die starke Rotverschiebung der roten Chlorophylle im PS I sind etliche Ursachen denkbar. Die Emissionen der roten Chlorophylle aller PS I Partikel haben gemeinsam, dass die emittierenden Spezies durch eine beträchtliche inhomogene Verbreiterung in der Größenordnung von $200 - 400 \text{ cm}^{-1}$ charakterisiert sind und ferner durch eine relativ große Stokesverschiebung, z.B. $160-200 \text{ cm}^{-1}$ bei den roten Chlorophyllen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Gob94, Pål96, Rät00, Hay00, Com00]. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser Eigenschaften mit denen des photochemisch aktiven Pigments P_{RC} , dem „*special pair*“ des bakteriellen Reaktionszentrums, geht man davon aus, dass die roten Emissionen jenseits 700 nm im PS I ebenfalls von stark exzitonisch gekoppelten Chlorophyllen stammen [Shu93, Gob94, Com00, Eng01]. Auch bei dem Modell „Ring aus Dimeren“ der bakteriellen Lichtsammelkomplexe LH1 und LH2 führt man die beobachtete starke Rotverschiebung auf die starke exzitonische Kopplung innerhalb jedes einzelnen Dimers zurück [Fle97].

Falls der Ursprung in einer starken exzitonischen Kopplung innerhalb der roten Pig-

1 Photosystem I

mente liegt, so können Chl a-Moleküle, die für die rote Absorption verantwortlich sind, anhand ihrer dimeren bzw. multimeren Form am zuverlässigsten aus den strukturellen Daten von Jordan *et al.* abgeleitet werden [Jor01]. Die Abbildung 1.10 vermittelt einen Einblick in die Röntgenstruktur. Bezüglich dieser Daten werden von den Autoren vier mutmaßliche Kandidaten vorgeschlagen: drei Dimere und ein Trimer. Zwei dieser Dimere, aC – A38/aC – A39 nach der Notation der Autoren, sind auf der stromalen Seite der Membran in den Untereinheiten PsaA und PsaB angeordnet. Einer befindet sich in der Nähe von PsaL und der andere in der Nähe von PsaF. Das dritte Chl a-Pärchen aC – A32/aC – B7 liegt auf der lumenalen Seite in der Trimerisierungs-Region und steht im Kontakt mit PsaL. Bei allen drei Dimeren sind die Chlorin-Ebenen nahezu parallel ausgerichtet und mit einem Ebenenabstand von $3,5 \text{ \AA}$ π -gestapelt. Die laterale Verschiebung zwischen den Metallzentren beträgt $7,6 - 8,9 \text{ \AA}$. Das Chl a-Trimer ist ebenfalls auf der lumenalen Seite der Membran, jedoch in der Nähe von PsaX gebunden. Seine Chlorophylle aC – B31, aC – B32 und aC – B33 sind stufenweise in ähnlichen Chl a-Abständen wie bei den Dimeren angeordnet. Dieses vielfach als „Dreierstapel“ bezeichnete Trimer besitzt die Besonderheit, dass nur das aC – B31 fest an ein Histidin (His B470) gebunden ist. Die Mg^{2+} -Ionen der anderen beiden Chl a sind mit Wasser koordiniert. Damjanović *et al.* haben mittels der semi-empirischen quantenchemischen Methode INDO/S (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) die Anregungsenergien der 96 Chl a im PS I-Monomer von *T. elongatus* berechnet [Dam02]. Aus den berechneten Eigenenergien des effektiven Hamiltonian wurde das Absorptionsspektrum berechnet und eine vorsichtige Zuordnung der roten Chlorophylle vorgenommen: Die Absorption bei $\lambda = 708 \text{ nm}$ wird gemäß einer Symmetrieanalyse einem Dimer A26 – A27 zugeschrieben, die bei $\lambda = 715 \text{ nm}$ einem Dimer B24 – B25 und die bei $\lambda = 719 \text{ nm}$ einem Tetramer der Chlorophylle A31, A32, B06 und B07.

1.3.3 Spektrale Eigenschaften

Absorption

Am PS I wurde mit Hilfe spektroskopischer Methoden am Ensemble bereits eine Vielzahl grundlegender Studien durchgeführt. Um zunächst einen Einblick in die hohe spektrale Heterogenität zu erhalten, betrachte man die linke Teilabbildung der Abbildung 1.11. In ihr sind die Absorptionsspektren von PS I verschiedener Cyanobakterien in trimerer und monomerer Form im roten Spektralbereich gegenübergestellt. Offensichtlich absorbiert der größte Teil der inneren Antennen-Chlorophylle in allen hier berücksichtigten PS I in einer breiten Bande mit einem Maximum bei ca. 680 nm , wobei außer in einem schmalen Bereich im Maximum zwischen den verschiedenen PS I kaum Abweichungen zu finden sind. Im Vergleich dazu zeigt freies Chlorophyll (Chl a), in organischem Lösungsmittel gelöst, bei ca. 670 nm ein breites Maximum in der Absorption [Hof91]. Auffällig heraus sticht nun die spektrale Vielfältigkeit, die sich am energetisch roten Fuß des Maximums abzeichnet. Aus den Kurvenverläufen geht deutlich hervor, dass die Anzahl und Energien

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

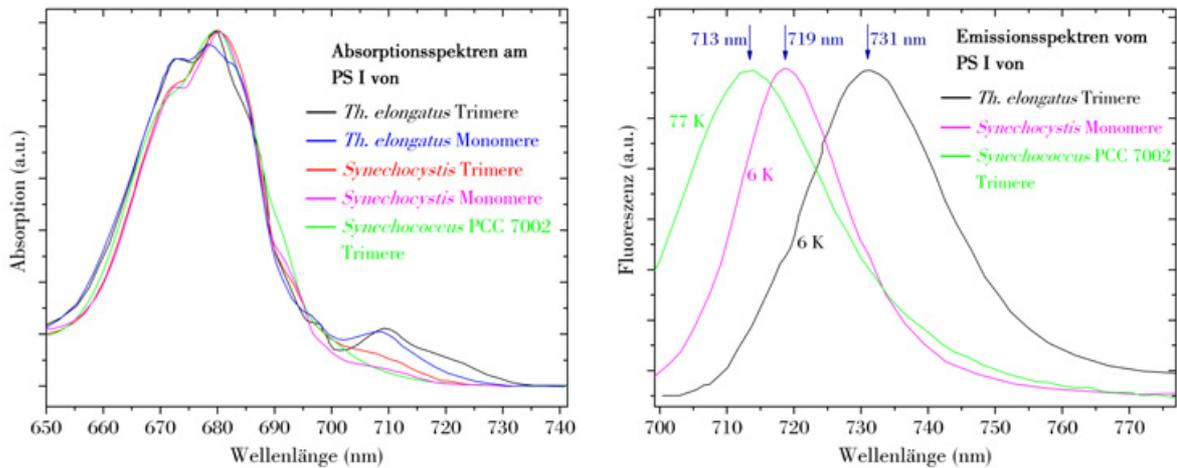


Abbildung 1.11: Ensemblemessungen am cyanobakteriellen PS I verschiedener Spezies. **Links:** übereinander gelegte Absorptionsspektren, die auf das jeweilige Absorptionsmaximum normalisiert wurden. **Rechts:** Fluoreszenzspektren, die auf das jeweilige Emissionsmaximum normalisiert wurden. Alle Spektren wurden bei ca. 6 K aufgenommen, außer die von *Synechococcus* sp. PCC 7002, deren Messtemperatur bei 77 K lag. Die Daten wurden aus Pålsson *et al.* [Pål96, Pål98] und Gobets *et al.* [Gob94, Gob01a] entnommen. Die Spektren vom PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 wurden freundlicherweise von Eberhard Schlodder gemessen.

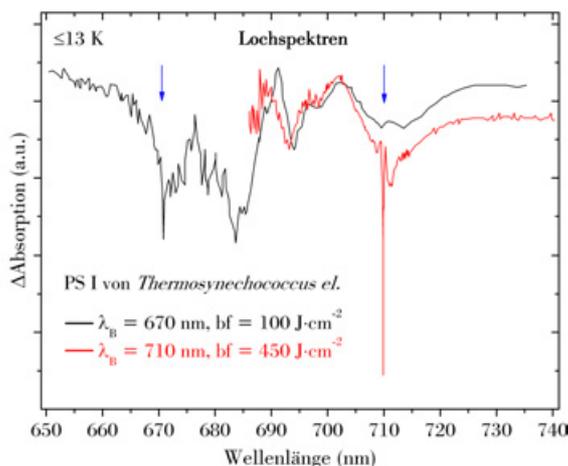


Abbildung 1.12: Typische Lochspektren am PS I von *T. elongatus*. Die blauen Pfeile markieren die im Bild angegebenen Brenn-Wellenlängen λ_B . In der schwarzen Kurve ($\lambda_B = 670$ nm) erkennt man deutlich die Satelliten bei ca. $\lambda \simeq 710$ nm und $\lambda \simeq 713$ nm. Für $\lambda_B = 710$ nm (rot eingetragen) wird das Loch von einer benachbarten breiten Struktur begleitet. Die Daten wurden aus Zazubovich *et al.* [Zaz02b] entnommen. Die Punktdichten der Literaturspektren wurden beim Digitalisierungsprozess verringert.

der roten Chlorophylle stark von der Spezies und darüber hinaus auch vom jeweiligen Aggregationszustand der PS I-Komplexe abhängig ist [Shu91, vdL93, Gob94, Pål96]. Mit Hilfe von Gaußscher Zerlegung wurden die Maxima der 4 K-Absorptionsspektren sowie die Anzahl der beitragenden Chl a abgeschätzt [Pål96, Gob01b]. Die ermittelten Werte sind in der Tabelle 1.1 gegenübergestellt. Auf diese Weise wurde die Gruppe der roten Chlorophylle erstmals aufgeteilt, d.h. man hat spektrale Anteile, die man aus der Struktur der Linienform extrahiert hat, unterschiedlichen Verbänden roter Pigmente zugeordnet. Aus den jeweils zentralen spektralen Lagen in der Absorption wurden in der Literatur entsprechende Bezeichnungen eingeführt. Demnach wird z.B. der Verband der

1 Photosystem I

Tabelle 1.1: Mittels Gaußscher Zerlegung von Absorptionsspektren bestimmte Anzahl der roten Chlorophylle. Die Lage der Maxima der Banden wurden aus [Gob01b] entnommen. Die Werte (+) stammen aus [Hay00] und die Werte (*) entsprechen den Angaben aus [Pål96], wobei diese an die korrekte Anzahl von Chl a-Molekülen angepasst wurden (in Anzahl pro Monomer).

PS I-Spezies	Absorption (nm)		Emission (nm)		Anzahl Chl a
	6 K	RT	6 K	RT	
<i>T. elongatus</i>	708	702	-	707	~ 3–4*
	719	708	730	723	~ 3–4*
<i>Synechocystis</i>	708	702–703	720	711–712	~ 2+
	714	-	-	-	~ 2+

Chl a mit der am weitesten rotverschobenen Absorption im PS I von *T. elongatus* C719 genannt [Pål96]. Für das inhomogen verbreiterte Band bei 708 nm von PS I-Trimeren von *Synechocystis* wird durch dieses Verfahren eine zugehörige Oszillatorstärke ermittelt, die einer Anzahl von ca. 4 – 5 Chl a-Molekülen entspricht. Aufgrund der Datenlage aus der Absorptionsspektroskopie wurde davon ausgegangen, dass PS I von *Synechocystis* nur diesen einen Verband roter Chlorophylle besitzt [Gob94, Pål98]. Hayes *et al.* gehen an dieser Stelle einen Schritt weiter mit Hilfe der Methode des nicht-photochemischen Lochbrennens (NPHB). Von ihnen wird demnach vorgeschlagen, dass zwischen zwei Beiträgen in der Bande unterschieden werden kann und dass zwei Chl a bei einem C706-Verband und ebenfalls zwei bei einem C714-Zusammenschluss mitwirken [Hay00]. Das Bild zweier Verbände von roten Pigmenten im PS I von *Synechocystis* wird ferner von Melkozernov *et al.* mit transienter Absorptionsspektroskopie unterstützt [Mel01b]. Im Gegensatz zum PS I von *Synechocystis* werden für PS I der Spezies *T. elongatus* gemäß der Tabelle 1.1 von Pålsson *et al.* zwei separate Banden ermittelt [Pål96], deren Maxima bei 708 nm und 719 nm liegen. Basierend auf einer NPHB-Studie wird auch beim PS I von *T. elongatus* von einem differenzierteren Ergebnis berichtet. Zazubovich *et al.* gehen danach von einem dritten Verband roter Chlorophylle bei ca. 715 nm (C715) aus [Zaz02b]. Außerdem berechnen sie unter Berücksichtigung der neuesten Strukturdaten [Jor01], aus denen die Anzahl von 96 Chl a pro PS I-Monomer hervorgeht, dass ca. sieben Chl a zur roten Absorption beitragen. In der Abbildung 1.12 sind zwei typische Lochspektren vom PS I von *T. elongatus* dargestellt. Bei einer Brennwellenlänge von $\lambda_B = 670$ nm tauchen Satelliten im Spektralbereich jenseits P700 auf, anhand derer man auf einen effektiven Energietransfer auf die roten Chlorophylle schließen kann. Außerdem zeigt sich, dass bei stark roter Brennwellenlänge ($\lambda_B = 710$ nm) zusätzlich zum scharfen Loch eine benachbarte breite Struktur erzeugt wird, die als Schwingungsseitenbande (PSB) interpretiert wird.

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

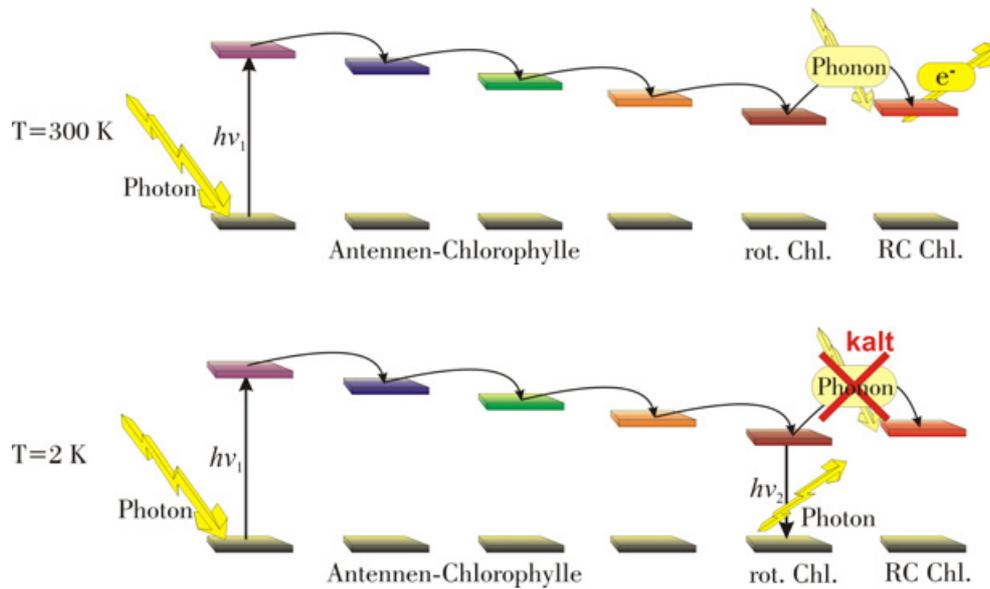


Abbildung 1.13: Energietransfer im Pigmentsystem vom PS I. Durch einfallendes Licht wird auf einem Antennenpigment ein angeregter Zustand erzeugt. Dieser bewegt sich über weitere Pigmente unter Energieverlust. Ein großer Teil der insgesamt von den Antennen gesammelten Energie gelangt bis zu den roten Chlorophyllen. In Abhängigkeit von der vorherrschenden Temperatur ergibt sich folgende Fallunterscheidung: **Oben:** Unter physiologischen Bedingungen genügt die Energie via Absorption von Schwingungsenergie, um das RC anzuregen. Es erfolgt eine stabile Ladungstrennung. **Unten:** Unter Laborbedingungen bei Tieftemperatur (1,4 K) genügt die vibronische Energie im Protein nicht aus, um den letzten Transferschritt zu ermöglichen. Der energetisch tiefste erreichbare Zustand relaxiert. Die Fluoreszenz der beteiligten roten Chlorophylle kann schließlich nachgewiesen werden.

Fluoreszenz

Die Gruppe der roten Chlorophylle hat trotz ihrer verhältnismäßig geringen Anzahl von Pigmenten großen Einfluss auf die Fluoreszenz von PS I. Die Komplexe aus *Synechocystis* zeigen bei Raumtemperatur ein Maximum bei 685-690 nm (F685), das eine breite Schulter bis hin zu ca. 780 nm besitzt [Wit92]. Das PS I von *T. elongatus* zeigt sein Maximum der Emission bei Raumtemperatur sogar jenseits von 700 nm [Hol93, Koe98]. F685 deutet sich hier nur als schwache Schulter an. Bei Raumtemperatur ist die Fluoreszenzquantenausbeute von PS I-Partikeln aller Spezies sehr gering [vG94] und die Quanteneffizienz der Ladungstrennung liegt bei 95 %. Die roten Chlorophylle können die Anregungsenergie sehr effizient auf den primären Donator P700 übertragen [Tri93a, Shu95, Mel98]. Durch eine Verringerung der Temperatur wird die Fluoreszenzquantenausbeute drastisch gesteigert [Gob94, Pål98, Byr00, Jel00], da ein großer Teil der Anregungsenergie in den roten Chlorophyllen gefangen bleibt, d.h. bei tiefen Temperaturen steht zu wenig vibronische Energie für den Aufwärts-Energietransfer zur Verfügung. Bei tiefer Temperatur erreichen ca. 50 % der gesamten Anregung nicht die photochemische Falle [Pål98, Gob01a].

1 Photosystem I

In Abbildung 1.13 wird der Prozess des Energietransfers in Abhängigkeit von der Temperatur illustriert. Ensemble-Emissionsspektren der drei in dieser Arbeit behandelten cyanobakteriellen PS I bei tiefer Temperatur werden in der rechten Teilabbildung der Abbildung 1.11 gezeigt. Im Vergleich emittiert also das PS I von *T. elongatus* stärker rotverschoben als die PS I der Spezies *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002, wobei die Energiedifferenz zum letzteren knapp 350 cm^{-1} beträgt. Mit Hilfe von energiespektroskopischer Fluoreszenzspektroskopie an den roten Chlorophyllen des PS I von *Synechocystis* wurde anhand der Abhängigkeit des Emissionsmaximums von der Anregungswellenlänge der Abstand von Null-Phononen-Linie (ZPL) und PSB auf ca. 140 cm^{-1} abgeschätzt [Gob94, Gob98]. Der PSB wird eine stark ausgeprägte Stokesverschiebung für die roten Pigmente C708 von ca. 15 nm entnommen und ein Huang-Rhys-Faktor von mindestens $S = 3$ zugeordnet [Gob98]. Zum Vergleich liegt nach einer NPHB-Studie der entsprechende Huang-Rhys-Faktor je nach Brenn-Wellenlänge λ_B von 702-722 nm zwischen $S = 0,6$ und $S = 1,9$ [Rät00]. Aufgrund der ermittelten großen Huang-Rhys-Faktoren und der großen Stokesverschiebung wird von einem starken Ladungstransfercharakter der roten Zustände ausgegangen [Hay00, Rät00, Zaz02b, Hsi04].

1.3.4 Funktion in der Natur

Die Natur hat im Zuge der Evolution den Umweg des Energieflusses durch die gegenüber der Anregungsenergie des primären Elektronen-Donators rotverschobenen Pigmente eingerichtet. Die Ursache ist bis heute ungeklärt. Über die vermeintlich ausschlaggebenden Vorteile, die die Natur aus dieser energetischen Senke gewinnt, wird viel diskutiert. Intuitiv könnte man annehmen, dass die Gruppe der roten Chlorophylle als lokale Fallen auf die Anregungsenergie wirken und somit der Effizienz der Ladungstrennung im Reaktionszentrum abträglich sind. Dem hingegen vermuten einige Autoren, dass wenn sich das PS I im Ungleichgewicht befindet, ihre Anwesenheit die Effektivität steigern könnte, indem sie die Anregungsenergie nahe P700 konzentrieren [vG88b, vG88a, Muk90, Wer92, Hol93, Mel01a]. Ein anderer Vorschlag besteht darin, dass die roten Chlorophylle eine Art Schutzfunktion vor photochemischer Beschädigung übernehmen [Muk90, Kar99a]. Der Mechanismus könnte so funktionieren, dass die bei den roten Chlorophyllen lokalisierte Anregungsenergie vom oxidierten primären Donator $P700^+$ gelöscht wird, da die spektrale Überlappung der Emission der roten Pigmente und der Absorption von $P700^+$ als sehr günstig erachtet wird [Shu95, Kar99a]. Dadurch könnte die andernfalls unter sehr starken Lichtverhältnissen erhöhte Ausbildung von Triplett-Zuständen verhindert werden, die zur Erzeugung von schädlichem Singulett-Sauerstoff führen würde. Ferner wird als wesentliche Ursache ihrer Existenz erachtet, dass die roten Chlorophylle das PS I mit einem spektral erweiterten Wirkungsquerschnitt ausstatten [Tri93b, Tri93c]. In einer Studie von Rivadossi et al. wurde die Rolle der roten Pigmente im pflanzlichen PS I von grünen Blättern unter verschiedenen Lichtverhältnissen untersucht [Riv99]. Demnach sammeln die roten Chlorophylle, obgleich sie bei Tageslicht nur ca. 4 – 5 % des Lichts einfangen,

1.3 Antennensystem der „roten Chlorophylle“

unter einer bei ca. 680 nm verringerten Licht-Umgebung bis zu 40 % der Gesamtheit aller einfallenden Photonen. Alternativ könnten die roten Chlorophylle auch nur eine Begleiterscheinung der hohen Dichte an Pigmenten im PS I-Partikel sein, die signifikant größer ist als in anderen photosynthetischen Antennenkomplexen. Eine Lösung von Chlorophyllen in organischem Lösungsmittel mit einer der im PS I vergleichbaren Konzentration zeigt eine stark verminderte Fluoreszenzquantenausbeute, während sich beim Absorptionsverhalten verglichen mit einer niedrig konzentrierten Lösung keine Änderung einstellt [Bed76]. Dieses Phänomen wird damit erklärt, dass bei hoher Chlorophyll-Konzentration einerseits ein erheblicher Energietransfer stattfinden kann und andererseits einige Chlorophylle zufällig so angeordnet sind, dass sie, genau übereinander liegend, in Form eines Dimers die Anregungsenergie löschen können. Im PS I sind die Antennenpigmente so organisiert, dass dieser Effekt nicht auftritt, da andernfalls die Effizienz des Systems stark darunter leiden würde. Stattdessen könnte im PS I die hohe Chlorophyll-Konzentration im Zusammenhang mit der Notwendigkeit, direkt übereinander liegende Chlorophylle zu vermeiden, dazu geführt haben, dass sich die vorhandenen exzitonisch gekoppelten räumlich versetzten Dimere gebildet haben [Gob01a, Fro01]. Ein gutes Beispiel für eine solche versetzte Schichtung von Pigmenten liefern Chlorosome, die Antennenkomplexe der grünen Schwefelbakterien, die einige Tausend Bakteriochlorophyll c (BChl c) enthalten. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei ca. 740 nm, während sich das von BChl c in monomerer Form bei ca. 660 nm befindet. Darüber hinaus besitzen die BChl c-Moleküle in Chlorosomen eine 7-8 mal höhere effektive Oszillatorstärke als BChl c-Monomere [Sav98]. Welche dieser Ansätze wesentliches Kriterium der Natur waren, die roten Chlorophylle in den Bauplan mit einzubeziehen, bleibt spekulativ. Die Frage nach dem „warum“ wird aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge auch in naher Zukunft eine spannende Frage darstellen. Zu ihrer Lösung beizutragen, ist nicht zuletzt auch Ziel dieser Arbeit.

1 Photosystem I

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

2.1 Einleitung

Die Idee, ein einzelnes Molekül anhand seiner Fluoreszenz zu sehen, ist bereits etwa 100 Jahre alt. Jean Perrin [Per18] unternahm erste Experimente, die nur am Entwicklungsstand der Technik jener Zeit scheiterten. Sowohl die Lichtquellen, als auch die Filter waren unzureichend. Ebenso kannte man keine Farbstoffe mit genügend hoher Fluoreszenzquantenausbeute. Darüber hinaus ist das menschliche Auge als Detektor für das Licht eines einzelnen Moleküls zu unempfindlich [Spr00b]. Man ging schließlich davon aus, dass die optische Messung eines einzelnen Atoms oder Moleküls einfach unmöglich sei. Nur wenige Dekaden später, in den frühen 1950'er Jahren, gelang es mit Hilfe der Elektronenmikroskopie, einzelne Atomreihen in Kristallen zu beobachten. Nach weiteren 30 Jahren wurde durch Rastertunnel- und Rasterkraftmikroskopie atomare Auflösung erreicht. In der Zwischenzeit wurde es gleichfalls möglich, einzelne Atome optisch in der Gasphase im Atomstrahl mittels Laser zu untersuchen.

Jedoch besteht ein großer Unterschied zwischen der Detektion einzelner Moleküle unter Vakuumbedingungen und dem entsprechenden Experiment, bei dem die Moleküle in einer Wirtsmatrix eingebettet sind. Zum einen produziert ein Substrat üblicherweise eine starke optische Hintergrundstrahlung durch Streuprozesse wie Raman oder Rayleigh oder trägt sogar selbst Verunreinigungen, die bei Bestrahlung fluoreszieren. Zum anderen leuchtet ein gebundenes Molekül im Normalfall bei ständiger Anregung nicht stabil, im Gegensatz zu einem Atom im Vakuum, das praktisch permanent emittieren kann. Beim gebundenen Molekül wird die Fluoreszenz in der Regel irreversibel gelöscht. Diese Art von Prozess wird allgemein als Photobleichen bezeichnet. Diese Effekte und inhärenten Eigenschaften gebundener Moleküle wurden schon Mitte der 1970'er Jahre von Hirschfeld [Hir76a, Hir76b] erkannt. Er leistete auf dem Gebiet der Einzelmolekül-Detektion (SMD) unter physiologischen Bedingungen Pionierarbeit, indem er zum Beispiel ein einzelnes, mit 80-100 Fluorophoren markiertes Antikörper-Molekül nachweisen konnte. Von ihm stammte die Idee, ein kommerzielles Instrument zu bauen, das Virometer, um einzelne Viren nachweisen zu können und sie zu klassifizieren. Die noch bestehenden Hürden konnten bald darauf überwunden werden. Ende der 1980'er, Anfang der 1990'er Jahre gelang erstmals die optische Detektion einzelner Moleküle im Festkörper und in Flüssigkeit. Die

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

erste Veröffentlichung zur optischen SMD stammt von Moerner und Kador [Moe89], die mit der Methode der sensitiven doppelt modulierten Absorption das System Pentazen in para-Terphenyl bei tiefen Temperaturen untersuchten. Unmittelbar danach zeigten Orrit und Bernard [Orr90] am gleichen System, dass mit Hilfe von Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der vom einzelnen Molekül stammenden Linien beachtlich gesteigert werden kann. Kurz zuvor gelang Keller und seinen Kooperationspartnern die Messung einzelner Fluorophore in einem Flüssigkeitsstrom. Als dann 1993 Betzig und Chichester [Bet93] mittels Raster-Nahfeld-Mikroskopie das erste Einzelmolekülbild von Molekülen auf einer Oberfläche bei Raumtemperatur aufnahmen, wurden unversehens die Tragweite und das Potential der Einzelmolekül-Spektroskopie (SMS) dramatisch erweitert [Amb94, Tra94, Xie94]. Dies gilt insbesondere, nachdem man im Jahr 1996 erkannt hatte, dass sich mit der klassischen und einfacheren Methode der konfokalen Mikroskopie ebenso gute Signale von einzelnen Molekülen messen lassen [Mac96].

2.1.1 Stand der Forschung

Durch die Methode der optischen SMS hat man innerhalb der letzten zehn Jahre Zugang zu völlig neuen Informationen erschlossen. Eine gute Übersicht bieten [Bas97, Tam00, Moe02, Moe03]. Zuvor konnte man mit Hilfe von optischen Experimenten an makroskopischen Proben immer nur über ein Ensemble von Molekülen mitteln. Jedoch verhält sich jedes einzelne Molekül in Abhängigkeit seiner Umgebung, der Art und Stärke der Kopplung an diese und auch gegebenenfalls der Wechselwirkung mit anderen Molekülen innerhalb des Probenvolumens unterschiedlich. Man erhält daher mit konventioneller optischer Spektroskopie eine inhomogen verbreiterte Linienform. Darin verborgen liegen die einzelnen statistisch verteilten homogenen Beiträge aller enthaltenen Moleküle. Mit der Methode der SMS können nun nicht nur auf direktem Wege die einzelnen homogenen Linienbreiten aufgedeckt werden, sondern auch zeitliche Fluktuationen ermittelt werden, die in der Ensemble-Messung vollkommen unzugänglich sind. Insbesondere in der Biophysik bzw. Molekularbiologie liegt daher ein großer Nutzen dieser Messmethode. Eine interessante Zusammenstellung von Arbeiten in diesem Bereich findet man in der Ref. [Rig01]. Aber auch in der Festkörperphysik gibt es interessante Anwendungen, wie zum Beispiel die Untersuchung von Defektzentren in Diamanten [Niz05]. Im Vergleich mit anderen Methoden ist bei der optischen SMS hervorzuheben, dass sie zu den preisgünstigeren Wegen zählt, um Struktur und Dynamik eines Systems zu untersuchen. Ihre Stärke liegt insbesondere darin, dass die Probe aus Distanz auch jenseits der Oberflächenschicht gemessen werden kann, d.h. über ein System können Tiefeninformationen gewonnen werden, ohne Störung oder gar Zerstörung des Systems, was z.B. bei der Gefrierbruchmethode nicht vermieden werden kann. Einen guten Überblick über letztere Methode findet man in [Fuj97]. Außerdem besteht eine große Auswahl an möglichen Versuchsbedingungen: wässrige Lösung bei Zimmertemperatur, gefrorene Lösung bei tiefen Temperaturen, in einer Polymerschicht, an Luft, im Vakuum und noch weitere. Mittlerweile werden auch

erfolgreich andere Messtechniken mit der optischen SMS kombiniert, wie z.B. die Fluoreszenzlebenszeit Mikroskopie (FLIM) [Tin00, Kne03, Ken07]. Seit neuester Zeit sind auch SMS-Experimente in Absorption möglich [Bal06, Car07, Gru07], bei denen die chemische Selektivität optischer Absorptionsspektroskopie mit der atomaren Auflösung eines Rastertunnelmikroskops kombiniert werden. SMS-Methoden, die in Absorption messen, haben gegenüber denen, die in Emission messen, den Vorteil, keine Bedingungen an die zu untersuchenden Moleküle zu stellen, denn wenige Moleküle fluoreszieren, aber jedes Molekül absorbiert.

Im Hinblick auf an der Photosynthese beteiligte Einheiten wurde mit Hilfe der SMS bereits eine Reihe von Pigmentprotein-Komplexen wie LH1 [Ket02, Ger03], LH2 [Tie99, Bop99, vO99, Hof03, Hof05] und LHCII [Tie01] untersucht. Die erste Einzelmolekül-Studie an PS I-Komplexen wurde von Jelezko *et al.* im Jahr 2000 durchgeführt [Jel00]. Hier konnten erstmals die Fluoreszenzbänder von individuellen Verbänden roter Chlorophylle aufgelöst werden.

2.2 Photophysik eines Makromoleküls

2.2.1 Einführung

Im Folgenden werden die photophysikalischen Eigenschaften von einzelnen Makromolekülen behandelt. Das Augenmerk liegt auf photosynthetischen Einheiten, insbesondere auf dem PS I. Vorab sollen kurz die Grundvoraussetzungen geklärt werden, die ein einzelnes Molekül erfüllen muss, damit seine Untersuchung mit der Methode der optischen SMS Erfolg hat. Die wichtigsten Anforderungen sind: Das Molekül muss unter den gegebenen Versuchsbedingungen photophysikalisch und photochemisch stabil sein. Der erforderliche Zeitraum der Stabilität hängt dabei vom gewünschten Informationsgehalt ab, d.h. bei Steigerung der Anregungsleistung stehen mehr Fluoreszenzphotonen zur Detektion zur Verfügung, falls keine Sättigung einsetzt. Durch die Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird ein schnellerer Messprozess ermöglicht. Nur der Teil der Proteindynamik kann in Form von spektraler Diffusion direkt erfasst werden, der auf der gleichen Zeitskala wie der Messprozess stattfindet. Über schnellere Dynamik können mit Einschränkungen in manchen Fällen indirekt anhand von Linienbreiten Informationen gewonnen werden. Fällt das Molekül bei verwendeter Anregungsleistung zu schnell in einen Dunkelzustand, so dass die Menge der detektierbaren Photonen nicht ausreicht, dann ist das System der optischen SMS nicht zugänglich.

Die Abbildung 2.1 zeigt als Beispiel ein nicht maßstabsgetreues, vereinfachtes Jablonski-Diagramm eines typischen Chromophor-Moleküls. Übergänge können zwischen dem Grundzustand S_0 und den angeregten Singulettzuständen S_1 , S_2 und dem Triplettzustand T_1 stattfinden. Einige Repräsentanten sind eingezeichnet. Die Absorptionsrate k_{12} ist proportional zum eingestrahnten Photonenfluss und zum Absorptionsquerschnitt des

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

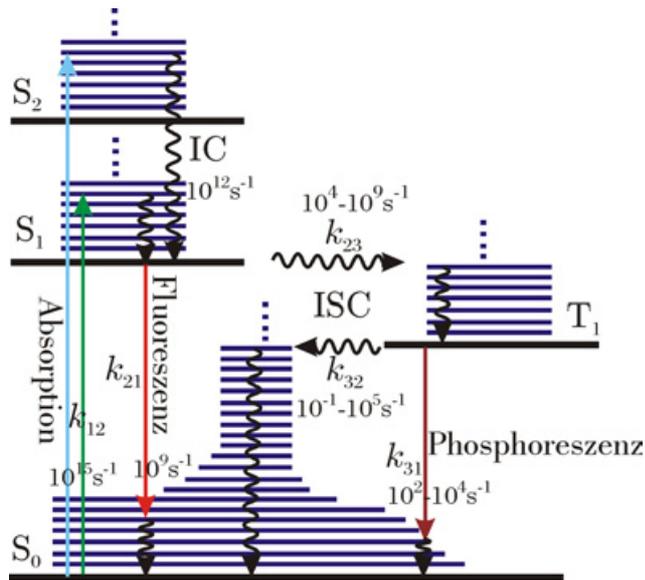


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm eines typischen Chromophor-Moleküls. Zwischen den verschiedenen vibronischen Niveaus der elektronischen Zustände sind einige mögliche Übergänge mit zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten eingezeichnet. Die geschwängelten Pfeile markieren strahlungslose und die farbigen strahlende Prozesse.

Moleküls, der ohne Korrekturen für das lokale Feld durch

$$\sigma_0 = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e c \gamma_{\text{hom}}} f$$

gegeben wird. γ_{hom} in s^{-1} ist dabei die homogene Linienbreite, die von den Relaxationszeiten des Übergangs bestimmt wird. f entspricht der Oszillatorstärke des elektronischen Übergangs. Damit ein Molekül effektiv angeregt werden kann, sollte sein Absorptionsquerschnitt möglichst groß sein und damit $f \approx 1$. Man kann ein Molekül in sinnvoller Weise nicht beliebig stark anregen, denn bei hoher Anregungsleistung treten Sättigungseffekte auf, die zur Abhängigkeit des Absorptionsquerschnitts σ_0 von der Laserintensität I führen:

$$\sigma(I) = \frac{\sigma_0}{1 + I/I_S},$$

wobei I_S der Sättigungsintensität

$$I_S = \frac{h\nu}{\sigma_0} \left(\frac{k_{21} + k_{23}}{2 + k_{23}/k_{31}} \right)$$

entspricht. Im Abschnitt 3.3.3 wird sich herausstellen, dass bei den von uns verwendeten Anregungsleistungen Sättigungseffekte keine Rolle spielen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt beinhaltet die Anforderung an das Emissionsverhalten. Dessen ausschlaggebender Parameter ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Sie errechnet sich aus dem Verhältnis von emittierter zu absorbierten Photonenanzahl

$$\Phi_F = \frac{k_{21}}{k_{21} + k_{23}}.$$

Im Idealfall liegt Φ_F nahe eins. Dies wird nur erreicht, wenn die *intersystem crossing*-Rate (ISC-Rate) k_{23} möglichst klein ist. Der Übergang vom Singulett- in den Triplettzustand ist aufgrund des damit verbundenen Umklappen des Spins spinverboten. Die Spin-Bahn-Kopplung bewirkt jedoch eine endliche Wahrscheinlichkeit dieses Übergangs. Die Triplettlebensdauer ist vergleichsweise sehr lang, wie in Abbildung 2.1 aufgeführt ist. Während dieser Zeit befindet sich der Chromophor in einer Dunkelphase, da er nicht für die Anregung zur Verfügung steht. Dieses Verhalten wird als „*blinking*“ bezeichnet und wird z.B. in Ref. [Moe97] demonstriert. Bei Systemen mit hoher Triplettausbeute oder überwiegend strahlungslosen Relaxationsprozessen, bei denen die Anregungsenergie als Wärme ins Gitter fließt, genügt die abgegebene Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls nicht zur Detektion.

Das PS I ist ein Multi-Chromophor-System, bei dem der größte Teil der Pigmente zum Einfangen von Licht benutzt wird. Die gesammelte Energie wird in effektivem Energietransfer auf das Reaktionszentrum weitergeleitet und mündet in einer photochemischen Ladungstrennung. Unter physiologischen Bedingungen geht dem System wenig Anregungsenergie verloren. Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute ist PS I der SMS bei Raumtemperatur noch unzugänglich [Jel00]. Wie jedoch im einleitenden Kapitel zum PS I ausführlich behandelt wurde, wird bei tiefen Temperaturen ein Teil der Anregungsenergie auf den roten Chlorophyllen gefangen. Freie Chlorophyll-Monomere in Lösung haben eine Triplett-Quantenausbeute

$$\Phi_{\text{ISC}} = \frac{k_{23}}{k_{21} + k_{23} + k_{\text{Rest}}}$$

von $\Phi_{\text{ISC}} = 0,64$ [Bow67] und verhindern somit ihre Detektion mit SMS-Methoden. In Abhängigkeit von der Umgebung kann Φ_{ISC} jedoch wesentlich geringere Werte von bis zu $5 \cdot 10^{-3}$ annehmen [Chi91]. In Kooperation wurde kürzlich von Jelezko *et al.* Φ_{ISC} der roten Chlorophylle mittels Korrelationsanalyse auf $1 \cdot 10^{-2}$ bestimmt [Ell06]. Aus dem stark verringerten Wert wird darauf geschlossen, dass die roten Chlorophylle in nahem Kontakt zu Carotinoiden lokalisiert sind. Diese Nähe ermöglicht die Nutzung der roten Chlorophylle als Fluoreszenzsonde für die Spektroskopie einzelner PS I-Komplexe. Im Fluoreszenzspektrum wird der Einfluss der Vielzahl der in einem einzigen PS I-Komplex an das Proteingerüst gebundenen Pigmente, die einer großen Zahl an Interaktionen unterliegen, widergespiegelt. Zum einen koppeln die Pigmente untereinander und zum anderen an die jeweilige Proteinumgebung. Da die Proteinumgebung lokal erheblich variiert, werden die jeweils an verschiedenen Orten gebundenen Pigmente auch stark unterschiedlich beeinflusst. Dadurch unterscheiden sich die mittleren optischen Übergangsenergien. Darüber hinaus ist ein Protein kein starres Gebilde. Demzufolge können selbst zwei sich entsprechende Pigmente jeweils an gleicher Stelle gebunden innerhalb zweier verschiedener PS I-Komplexe stark unterschiedliche Einflüsse erfahren.

Zwei fundamentale Interaktionen, die Spektren von Pigment-Protein-Komplexen bestimmen, sind die Kopplung zwischen den Elektronen und die Kopplung der Elektronen an die

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

inter- und intramolekularen vibronischen Freiheitsgrade. Bei der elektronischen Kopplung unterscheidet man zwischen exzitonischer - und Ladungstransferkopplung. Eine ausführliche Abhandlung findet man z.B. in [May00]. Während letztere Kopplung vom Überlapp der Wellenfunktionen lebt und somit exponentiell vom Abstand zwischen Donator und Akzeptor abhängt, benötigt die exzitonische Kopplung keinen Überlapp der Wellenfunktionen. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben wurde, hängt sie außerhalb der Reichweite der Wellenfunktionen reziprok von der dritten Potenz der Distanz zwischen Donator und Akzeptor ab. Durch die beiden unterschiedlichen Abstands-Abhängigkeiten gelingt der Natur einerseits ein effektiver Energietransfer der Anregungen im Antennensystem und andererseits eine effiziente Ladungstrennung im Reaktionszentrum. Herrscht zwischen verschiedenen Pigmenten eine starke exzitonische Kopplung, so wird bei Lichteinstrahlung nicht ein individuelles Pigment angeregt, sondern das gekoppelte „Supermolekül“. N Pigmente tragen zu N exzitonischen Zuständen bei, wie in Abbildung 1.7 für $N = 2$ demonstriert wird. Zu welchen dieser Zustände ein Absorptionsübergang aus dem Grundzustand möglich ist, hängt von der relativen Orientierung der beiden Pigmente ab. In der Fluoreszenz wird nur der unterste exzitonische Zustand beobachtet. Der Lokalisierungsgrad eines angeregten Zustandes hängt von den relativen Stärken der Pigment-Pigment-Kopplung und der Pigment-Protein-Kopplung zueinander ab. Die langsame und schnelle Proteindynamik führt zu statischer bzw. dynamischer Unordnung. Diese neigt zur Lokalisierung der elektronischen Zustände. Für den Energietransfer zwischen den Antennen sind zwei begrenzende Fälle ausschlaggebend. Dominiert die Kopplung der Pigmente untereinander über die Kopplung an die Proteinumgebung, lassen sich die optischen Spektren und die exzitonische Relaxation zwischen den delokalisierten, angeregten Zuständen mit Hilfe der Multi-Level-Redfield Theorie [Red57, Red65, Jea92, Pol94, May00] beschreiben. Demgemäß führt die Kopplung der Exzitonen an die Proteinumgebung zu einer Verkürzung der Lebenszeit der exzitonischen Zustände. Für die optischen Übergänge zwischen den verschiedenen exzitonischen Zuständen und dem Grundzustand ergeben sich lorentzförmige Linien im Spektrum. Im Falle starker Pigment-Protein-Kopplung sind die angeregten Zustände lokalisiert. Der resultierende Energietransfer wird durch die Förstertheorie [För46] beschrieben. Dabei wird die Transfer-Rate vom Überlappungsintegral zwischen dem Emissionsspektrum des Donators und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors bestimmt. Zudem tritt ein interessanter Effekt auf, wenn ein exzitonischer Zustand mit einem Ladungstransferzustand mischt. Die starke elektronisch-vibronische Kopplung des letzteren führt dann zu einer ebenfalls stärkeren Kopplung des exzitonischen Zustands an die Vielfalt der vibronischen Freiheitsgrade des Proteingerüsts. Dieses Szenario entsteht, wenn z.B. zwei Chromophore so dicht gelegen sind, dass die Wellenfunktionen erheblich überlappen. Dann koppelt der optische Übergang zusätzlich zur exzitonischen Kopplung an die intermolekularen Ladungstransferzustände. Experimentelle Beobachtungen an Chromophoren mit geringem Abstand finden hierin einen Erklärungsansatz, d.h. z.B. optische Übergänge mit ausgeprägten vibronischen Seitenbanden, starker Rotverschiebung, deutlichem Stark-Effekt sowie starken Druck-Verschiebungen. Ein Ladungstransferzustand ist polar. Indem die Proteinumgebung polarisiert wird, entsteht eine starke

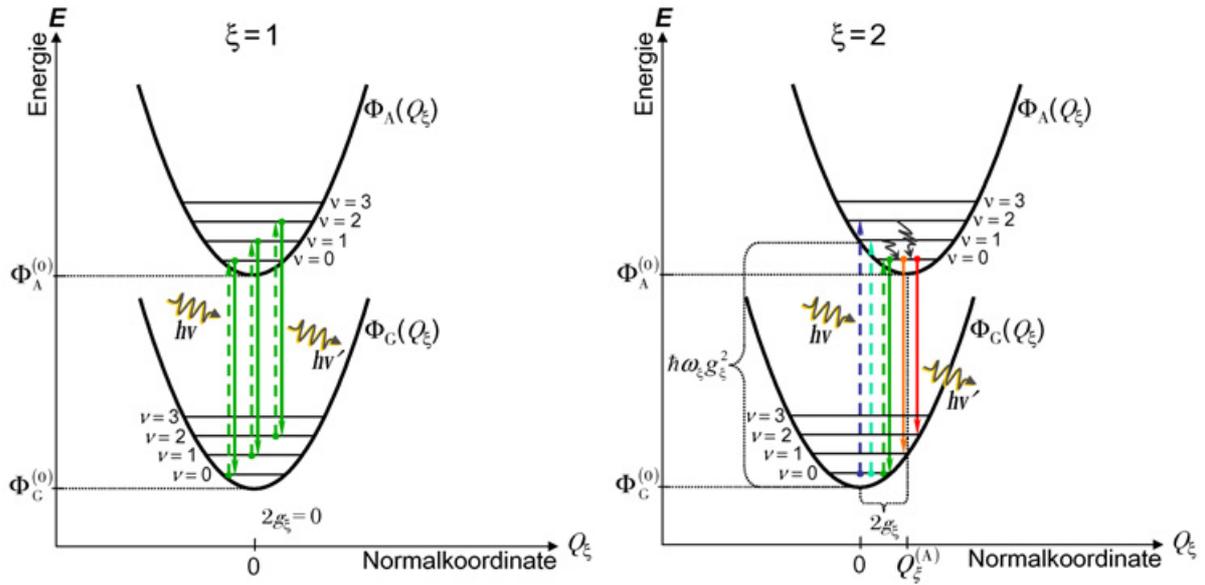


Abbildung 2.2: Auftragung der potentiellen Energie über den Normalkoordinaten Q_ξ für jeweils Grund- und angeregten elektronischen Zustand für zwei verschiedene Normalmoden $\xi = 1$ und $\xi = 2$. **Im linken Bild**, für $\xi = 1$, nimmt der Kern für beide elektronischen Zustände dieselbe Gleichgewichtslage ein, so dass vibronische Schwingungen an keinen der möglichen elektronischen Übergänge koppeln. Der zugehörige Huang-Rhys-Faktor S beträgt Null. **Im rechten Bild**, für $\xi = 2$, liegt eine andere Situation vor: Zwischen den beiden Gleichgewichtslagen der Kerne besteht ein Versatz $2g_\xi$, so dass vibronische Schwingungen an die elektronischen Übergänge koppeln. S nimmt einen endlichen positiven Wert an.

Kopplung an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins. Daraus resultiert eine starke Kopplung an intermolekulare Schwingungen und eine starke Änderung des permanenten Dipolmoments bezüglich des Grundzustandes. Im optischen Spektrum schlägt sich dieser Effekt in einer ausgeprägten vibronischen Seitenbande nieder. Der erste exakte Ausdruck für die lineare Absorption eines einzelnen Chromophores, der an ein Kontinuum von harmonischen Schwingungen gekoppelt ist, stammt von Lax und von Kubo und Toyozawa [Lax52, Kub55]. Eine Möglichkeit, die Kopplung eines Pigments an das Protein zu beschreiben, wird durch die Spektraldichte geboten. Sie erfasst, wie die verschiedenen vibronischen Moden des Proteins an einen optischen Übergang im Pigment koppeln. Dieser Ansatz wird im Abschnitt 2.2.4 verfolgt. Für einen Proteinkomplex mit mehreren Chromophoren gibt es keinen exakten Ausdruck, da die Behandlung beider Einflüsse, Kopplung zwischen den Chromophoren und elektronisch-vibronische Kopplung, mit einer nicht-störungstheoretischer Methode bisher für die Theorie ein ungelöstes Problem darstellt.

2.2.2 Grundlagen für die optische Molekülspektroskopie

Aufgrund der um drei Größenordnungen größeren Masse der Kerne geschieht ein elektronischer Übergang mit vernachlässigbar kleiner Beeinflussung der um Größenordnungen

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

langsameren Kernbewegung. Gemäß dem Franck-Condon-Prinzip ist die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs proportional dem Produkt aus elektronischem Übergangsdipolmatrixelement und dem Überlapp der Schwingungswellenfunktionen zwischen denen der Übergang stattfindet. Die Annahme, dass die Energiedifferenz zwischen dem elektronisch angeregten und dem Grundzustand linear von der Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage abhängt, führt zu harmonischen Potentialflächen mit gleicher Krümmung für elektronischen Grund- und angeregten Zustand. Die Abbildung 2.2 zeigt die vibronischen Konfigurationen im Kernpotential in Abhängigkeit von der generalisierten Kernkoordinate von dem elektronisch angeregten und Grundzustand eines Moleküls für zwei verschiedene Normalmoden $\xi = 1$ und $\xi = 2$. In der Born-Oppenheimer-Näherung wird die Kernposition auf der Zeitskala des Übergangs als fest angenommen. Daraus resultieren bzgl. der Kernkoordinate senkrechte Übergänge zwischen den vibronischen Zuständen der beiden elektronischen Niveaus, wovon einige in der Abbildung 2.2 eingezeichnet sind. In der Regel sind die Potentialminima von Grund- und angeregtem elektronischem Zustand, die jeweiligen Gleichgewichtslagen, je nach Normalmode ξ aufgrund verschiedener Bindungspotentiale von Grund- und angeregtem Zustand gegeneinander verschoben, wie in der rechten Teilabbildung 2.2 dargestellt ist. Anschaulich kann man sich vorstellen, dass sich durch die elektronische Anregung die Verteilung der Ladungsdichte am Pigment verändert. Die Kerne relaxieren in eine neue Gleichgewichtslage. Die Größe dieser Änderung spiegelt sich in dem Versatz $2g_\xi$ der beiden Potentialflächen wider. Je größer der Wert von $2g_\xi$ ist, desto stärker koppeln elektronische Übergänge an vibronische Schwingungen. Über den Versatz $2g_\xi$ ist der sogenannte Huang-Rhys-Faktor $S \propto g_\xi^2$ definiert [Hua50]. Er wird als Maß für die Kopplungsstärke des elektronischen Übergangs an die Schwingungsfreiheitsgrade im Molekül verwendet und gibt die Zahl der Schwingungsquanten an, die bei optischen Übergängen im Mittel angeregt werden [Lax52]. Die zum Versatz $2g_\xi$ zugehörige Energie $\hbar\omega_\xi g_\xi^2$ wird Reorganisationsenergie genannt.

2.2.3 Absorption und Fluoreszenz

Der elektronische Übergang zwischen den beiden vibronischen Grundzuständen des elektronisch angeregten und des elektronischen Grundzustands wird als Null-Null-Übergang bezeichnet. Findet dieser mit genügender Wahrscheinlichkeit statt, wird im Spektrum eine scharfe Linie erzeugt, die sogenannte Null-Phononen-Linie (ZPL). Der Begriff „Phonon“ wurde aus der Festkörperphysik übernommen und wird in der Literatur vielfach im Gebiet der Proteine verwendet, obwohl ein Phonon streng genommen nur für das periodische Gitter eines endlos ausgedehnten Festkörpers definiert ist. Die spektrale Position der ZPL stimmt für Absorption und Emission überein. In der Abbildung 2.3 sind ein berechnetes Absorptions- und Emissionsspektrum dargestellt. Je nachdem wie stark der elektronische Übergang an Proteinschwingungen koppelt, werden bei der Absorption höhere vibronische Niveaus des elektronisch angeregten Zustands, oder bei der Emission des elektronischen Grundzustands, angeregt. In den Spektren bilden sich durch diesen Pro-

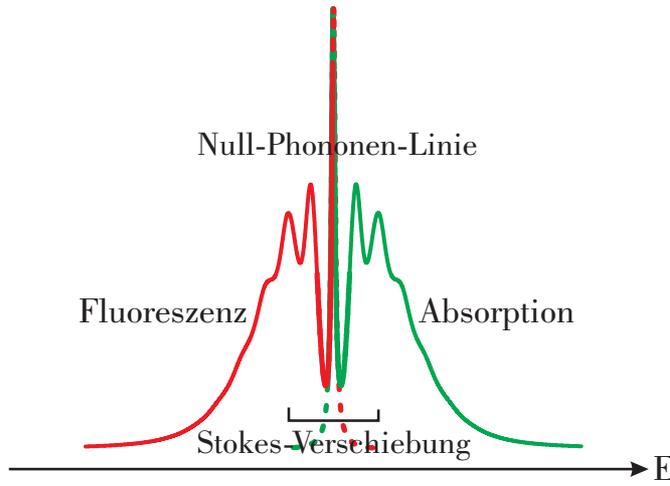


Abbildung 2.3: Berechnetes Absorptions- bzw. Emissionsspektrum aufgetragen über der Energie. Die beiden spektralen Verläufe überschneiden sich in der Mitte in einer Linie, der Null-Phononen-Linie (ZPL), die gleichzeitig die jeweiligen Schwingungsseitenbanden (PSBs) ineinander spiegelt. Der Abstand zwischen den Schwerpunkten der beiden PSBs wird als Stokesverschiebung bezeichnet. Für die Berechnung wurden folgende Werte angenommen: $S = 2$ (Huang-Rhys-Faktor), $\omega_m = 25 \text{ cm}^{-1}$ (mittlere Schwingungsfrequenz) und $\Gamma_{L,G} = 15 \text{ cm}^{-1}$ (Linienbreite von ω_m).

zess breit ausgeschmierte Schwingungsbanden aus, die Schwingungsseitenbanden genannt werden. Absorptions- und Emissionsspektrum sind zur spektralen Position der ZPL in der Mitte spiegelsymmetrisch angeordnet. Die Verschiebung der Schwerpunkte der beiden Spektren gegeneinander ist als Stokesverschiebung bekannt. Das Verhältnis der integrierten Intensität der ZPL I_{ZPL} zur Gesamtintensität aus I_{ZPL} und der Intensität der Schwingungsseitenbande I_{PSB} ergibt den Debye-Waller-Faktor [Orr93]

$$\alpha_{DW}(T) = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PSB}},$$

der dem Verhältnis der Oszillatorstärke des 0-0-Übergangs zur gesamten Oszillatorstärke entspricht. Er ist ein Maß für die Stärke der Elektron-Phonon-Kopplung und ist temperaturabhängig. Über die Beziehung

$$\alpha_{DW}(T) = e^{-S(T)}$$

hängt er mit dem im Abschnitt 2.2.2 eingeführten Huang-Rhys-Faktor S zusammen. Hofmann *et al.* haben mittels multivariater Spektrenanalyse am LH2 für die Übergänge der B800-Anregung ein α_{DW} zwischen 0,4 und 0,9 bestimmt, was in die Region einer schwachen Elektron-Phonon-Kopplung fällt [Hof05].

In der Näherung eines harmonischen Oszillators lassen sich die Franck-Condon-Faktoren folgendermaßen berechnen:

$$F_{ag}^2 = \frac{(S_k)^{\nu_k} e^{-S_k}}{\nu_k!},$$

wobei a für elektronisch angeregt und g für den elektronischen Grundzustand steht und S_k und ν_k der Huang-Rhys-Faktor und die Schwingungsfrequenz der an den elektronischen Übergang gekoppelten k -ten Normalschwingung sind. Die S_k ergeben sich zu $S_k = \pi \hbar^{-1} c \nu_k (\Delta Q_k)^2$, wobei ΔQ_k ein Maß für die Geometrieänderungen der Kerne zwi-

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

schen Anfangs- und Endzustand ist.

2.2.4 Modellierung der spektralen Form

Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Molekül, dessen Energieniveaudifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand der Photonenenergie $\hbar\omega$ des eingestrahnten Lichts entspricht, so kann Energie absorbiert werden. Der Absorptionsquerschnitt $\alpha(\omega)$ wird an Hand der Energieverlustrate des eingestrahnten elektrischen Feldes und dem Energiefluss des Feldes, dem *Poyntingvektor* S_P bestimmt

$$\alpha(\omega) = -\frac{1}{S_P} \left(\frac{d}{dt} E_{\text{ext}} \right). \quad (2.1)$$

E_{ext} beschreibt das eingestrahlte Feld, und der *Poyntingvektor* ist als $S_P = \frac{cn}{8\pi} |\vec{E}_0|^2$ definiert, wobei c der Vakuumlichtgeschwindigkeit und n dem Brechungsindex und E_0 der Amplitude des externen Feldes

$$E(t) = E_0 \vec{\varepsilon} \cos(\omega t) \quad (2.2)$$

mit der Frequenz ω entspricht. $\vec{\varepsilon}$ ist der Einheitsvektor in Richtung der Polarisation des Feldes. Die Energieverlustrate des externen Feldes ist der Rate des im Molekül optisch induzierten Übergangs proportional

$$dE_{\text{ext}} = -\hbar\omega k_{G \rightarrow A} dt. \quad (2.3)$$

Zur Berechnung der Absorption benötigt man noch die Kopplung zwischen dem eingestrahnten Feld und dem optischen Übergang. In Dipolnäherung erhält man

$$V_{AG}(t) = V_{AG}^{(0)} \cos(\omega t) = -\vec{E}(t) \vec{\mu}_{AG}, \quad (2.4)$$

wobei $V_{AG}^{(0)} = E_0 \vec{\varepsilon} \vec{\mu}_{AG}$ der Kopplung zum Zeitpunkt $t = 0$ und $\vec{\mu}_{AG} = \int dQ \Psi_G^* \hat{d} \Psi_A$ (mit \hat{d} dem Dipolmoment-Operator und Ψ_G, Ψ_A den elektronischen Zuständen im Grund- bzw. angeregten Zustand) dem Übergangsdipolmoment im Molekül entsprechen. Nach Fermis Goldener Regel ist die Übergangsrate durch

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} \left| V_{AG}^{(0)} \right|^2 \delta(\hbar\omega + E_G - E_A) \quad (2.5)$$

gegeben. Bezieht man nun die Schwingungsfreiheitsgrade ein und vernachlässigt gemäß der Condon-Näherung die Abhängigkeit des Übergangsdipolmoments von den vibroni-

schen Freiheitsgraden, erhält man für die Rate

$$k_{G \rightarrow A} = \frac{2\pi}{\hbar} \sum_{i,j} f(\omega_{G_i}) \left| \int dQ \chi_{G_i}^* \chi_{A_j} \right|^2 E_0^2 |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2(\varphi) \delta(\hbar\omega + E_{G_i} - E_{A_j}). \quad (2.6)$$

Um die Orientierung des Moleküls zum eingestrahlten Feld zu berücksichtigen, wurde das Skalarprodukt $|\vec{\epsilon} \vec{\mu}_{AG}|^2 = |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2 \varphi$ verwendet. Die vibronischen Zustände sind als χ_{G_i} und χ_{A_j} aufgeführt, jeweils für Grund- und angeregten Zustand. Setzt man nun die Rate zusammen mit dem *Poyntingvektor* in die Gleichung für den Absorptionsquerschnitt ein, so erhält man entsprechend [Lax52] schließlich

$$\alpha(\omega) = \frac{4\pi^2\omega}{\hbar c n} |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2 \varphi D_\alpha(\omega). \quad (2.7)$$

Für die Fluoreszenz entnimmt man der gleichen Referenz

$$I(\omega) = \frac{4\omega^3 n^3}{\hbar^2 c^3} |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2 \varphi D_I(\omega). \quad (2.8)$$

Dabei wurden die Linienform-Funktion $D_\alpha(\omega)$ und $D_I(\omega)$ gebildet. Erstere ist gegeben durch

$$D_\alpha(\omega) = \sum_{i,j} f(\omega_{G_i}) \left| \int dQ \chi_{G_i}^* \chi_{A_j} \right|^2 \delta(\omega + \omega_{G_i} - \omega_{A_j}). \quad (2.9)$$

Die Linienform-Funktion der Emission unterscheidet sich nur durch Wechsel der Vorzeichen innerhalb der Deltafunktion, da hier der angeregte Zustand der Anfangszustand der Betrachtung ist. Dadurch sind die beiden Funktionen spiegelsymmetrisch. Alternativ kann die Deltafunktion in Gl. 2.9 als Zeitintegral dargestellt werden

$$D_\alpha(\omega) = \frac{1}{2\pi} \sum_{i,j} f(\omega_{G_i}) \int_{-\infty}^{\infty} dt \left| \int dQ \chi_{G_i}^* \chi_{A_j} \right|^2 e^{i(\omega + \omega_{G_i} - \omega_{A_j})t}. \quad (2.10)$$

Führt man nun den Operator H_G mit

$$H_G \chi_{G_i} = \hbar\omega_{G_i} \chi_{G_i} \quad (2.11)$$

ein, kann die Gl. 2.10 umgeschrieben werden in

$$D_\alpha(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt \int dQ \frac{\exp\left(\frac{-H_G}{k_B T}\right)}{\text{Tr}\left\{\exp\left(\frac{-H_G}{k_B T}\right)\right\}} \exp\left(\frac{i}{\hbar} H_G t\right) \exp\left(-\frac{i}{\hbar} H_A t\right). \quad (2.12)$$

Diese Funktion stellt die vibronische Bewegung innerhalb der Potentialfläche des elektronischen Grundzustands in Relation zu derselbigen des angeregten Zustands. In der Praxis

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

können die quantenmechanischen Zustände eines makroskopischen Reservoirs, das mit einem System aus Chromophoren interagiert, nicht explizit berechnet werden. Dies trifft insbesondere auf ein willkürlich eingefrorenes, ungeordnetes Lösungsmittel als Umgebung zu. Handelt es sich bei dem Reservoir jedoch um eine weitestgehend geordnete Struktur, die bei genügend tiefer Temperatur nur kleine Oszillationen um die Gleichgewichtslage zulässt, dann ist eine harmonische Näherung möglich. Dafür legt man einen stationären Punkt im Konfigurationsraum fest, der einem globalen Minimum, der Gleichgewichtslage entspricht. Dann können die Kernbewegungen als Superposition von voneinander unabhängigen, harmonischen Schwingungen aufgefasst werden. Dabei haben die Oszillationen der individuellen Atome innerhalb einer Normalmode alle die gleiche Frequenz. Nur die Amplituden, die von der jeweiligen Masse bestimmt werden, unterscheiden sich. Die Potentialfläche $\Phi_j(r)$ für den elektronischen Zustand Ψ_j wird bis zur zweiten Ordnung in der Kernausslenkung $R(t)$ in einer Taylorreihe entwickelt. Nach Einführen von Normalkoordinaten q_ξ erhält man für den Hamiltonoperator der vibronischen Bewegung

$$H_{\text{vib}}^{(j)} = \sum_{\xi} \frac{p_{\xi}^2}{2\mu_{\xi}} + \Phi_0(j) + \frac{\mu_{\xi}\omega_{\xi}^2}{2} \left(q_{\xi} - q_{\xi}^{(j)} \right)^2. \quad (2.13)$$

Der erste Teil der Summe über ξ beschreibt die kinetische Energie der Kerne, der zweite und dritte beinhalten die potentielle Energie des elektronischen Zustands j in der Gleichgewichtslage und für eine kleine Auslenkung der Kerne. Dabei ist p_{ξ} der Impuls, μ_{ξ} die reduzierte Masse und ω_{ξ} die Frequenz des ξ -ten Oszillators, und $q_{\xi}^{(j)}$ ist die zum jeweiligen elektronischen Zustand Ψ_j gehörige Minimumposition der Potentialfläche. Die verschiedenen vibronischen Frequenzen ω_{ξ} sollten zwar unabhängig vom elektronischen Zustand sein, aber die beiden Potentialflächen vom Grund- bzw. angeregten Zustand sind entlang der verschiedenen Normalmodenkoordinaten gegeneinander um

$$2g_{\xi} = 2\sqrt{\frac{\mu_{\xi}\omega_{\xi}}{2\hbar}} \left(q_{\xi}^{(A)} - q_{\xi}^{(G)} \right) \quad (2.14)$$

verschoben. Unter Berücksichtigung der Schwingungsbewegung ergibt sich für die Linienfunktion

$$D_{\alpha}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{AG})t} e^{G(t) - G(0)}, \quad (2.15)$$

mit der Übergangsenergie $\hbar\omega_{AG} = \Phi_A^{(0)} - \Phi_G^{(0)}$, die durch die Werte der zugehörigen vibronischen Gleichgewichts-Konfigurationen der entsprechenden Potentialflächen definiert wird. Die zeitabhängige Funktion $G(t)$ im Exponenten wird durch

$$G(t) = \int_0^{\infty} d\omega J_{AG}(\omega) \left\{ (1 + n(\omega)) e^{-i\omega t} + n(\omega) e^{i\omega t} \right\} \quad (2.16)$$

gegeben. Hier wurde die Spektraldichte

$$J_{\text{AG}}(\omega) = \sum_{\xi} g_{\xi}^2 \delta(\omega - \omega_{\xi}) \quad (2.17)$$

analog zu [Ren02] eingeführt. Sie beschreibt, wie Schwingungen mit der Frequenz $\omega = \omega_{\xi}$ an den optischen Übergang des Pigments koppeln. $n(\omega) = (\exp(\hbar\omega/k_{\text{B}}T) - 1)^{-1}$ ist die Bose-Einstein-Verteilung. Sie beschreibt die Anzahl der bei einer gegebenen Temperatur im Mittel angeregten Schwingungsquanten. Für kleine Temperaturen ist $n(\omega) \approx 0$. Daraus erhält man für $T \rightarrow 0$

$$G(t) = \int_0^{\infty} d\omega J(\omega) e^{-i\omega t} \quad (2.18)$$

und zum Zeitpunkt $t = 0$

$$G(0) = \int_0^{\infty} d\omega J(\omega) = S, \quad (2.19)$$

wobei $S = \int d\omega J_{\text{AG}}(\omega) = \sum_{\xi} g_{\xi}^2$ dem Huang-Rhys-Faktor entspricht. Er ist ein Maß dafür, wie stark die vibronischen Schwingungen an den elektronischen Übergang koppeln. Nun kann man die Linienform-Funktion in zwei Teile zerlegen:

$$D(\omega) = \frac{e^{-S}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{\text{AG}})t} (e^{G(t)} - 1 + 1) = Z(\omega) + B(\omega). \quad (2.20)$$

Der erste Summand $Z(\omega) = \exp(-S) \delta(\omega - \omega_{\text{AG}})$ beschreibt die Null-Phononen-Linie und der zweite das vibronische Seitenband

$$B(\omega) = \frac{e^{-S}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{\text{AG}})t} (e^{G(t)} - 1). \quad (2.21)$$

Als nächstes kann die Exponentialfunktion in eine Taylorreihe entwickelt werden

$$e^{G(t)} = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{1}{j!} (G(t))^j = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{1}{j!} \left(\int_0^{\infty} d\omega' J(\omega') e^{-i\omega' t} \right)^j \quad (2.22)$$

und in die Gleichung für das Seitenband eingesetzt werden:

$$B(\omega) = \frac{e^{-S}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{\text{AG}})t} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{1}{j!} \left(\int_0^{\infty} d\omega' J(\omega') e^{-i\omega' t} \right)^j. \quad (2.23)$$

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

Vertauscht man nun die Zeit und Frequenzintegrale

$$B(\omega) = e^{-S} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{1}{j!} \int_0^{\infty} d\omega_1 \dots \int_0^{\infty} d\omega_j J(\omega_1) \dots J(\omega_j) \delta(\omega - \omega_{\text{AG}} - \omega_1 - \dots - \omega_j) \quad (2.24)$$

und substituiert $\tilde{\omega} = \omega - \omega_{\text{AG}}$, dann muss für die Integration gelten: $\tilde{\omega} = \omega_1 + \dots + \omega_j$. Daraus folgt, dass man das Integral in guter Näherung als n -fache Faltung des ersten Summanden schreiben kann

$$B(\omega) = e^{-S} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{1}{j!} \Theta_j(\tilde{\omega}) . \quad (2.25)$$

Dabei ist

$$\Theta_j(\tilde{\omega}) = \int_0^{\tilde{\omega}} d\omega_2 J(\omega_2) \Theta_{j-1}(\tilde{\omega} - \omega_2) \quad (2.26)$$

$$\text{mit } \Theta_1(\tilde{\omega}) = J(\tilde{\omega}) . \quad (2.27)$$

Nun wird eine lorentzförmige¹ Spektraldichte angenommen: $J(\omega) = S f(\omega)$ mit

$$f(\omega) = \frac{\frac{\gamma}{2\pi}}{(\omega - \omega_m)^2 + \left(\frac{\gamma}{2}\right)^2} , \quad (2.29)$$

wobei gilt: $\int d\omega J(\omega) = S \int d\omega f(\omega) = S$. Um die Funktion $f(\omega)$ j mal mit sich selbst zu falten, betrachtet man ihre Fourier-Darstellung

$$f(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i\omega t} e^{i\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}|t|}, \text{ d.h. } f(t) = \frac{1}{2\pi} e^{i\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}|t|} . \quad (2.30)$$

Dann erhält man nach oben aufgeführter Rechnung und dem Faltungsgesetz für die Funktion Θ

$$\Theta_j(\omega) = S^j \frac{\frac{j\gamma}{2\pi}}{(\omega - j\omega_m)^2 + \left(\frac{j\gamma}{2}\right)^2} . \quad (2.31)$$

¹Eine spontane Emission enthält aufgrund der Abstrahlungsdämpfung ein Kontinuum von Frequenzen. Die Relaxationszeit des Übergangs bestimmt die homogene Linienbreite der Emission des einzelnen Moleküls. Ihre spektrale Form wird durch eine Lorentzkurve

$$L(\omega') = \frac{2 I_{\text{ZPL}}}{\pi} \frac{\gamma_{\text{hom}}}{4(\omega_0 - \omega')^2 + \gamma_{\text{hom}}^2} \quad (2.28)$$

mit der Halbwertsbreite γ_{hom} (FWHM), der energetischen Lage ω_0 und der Intensität I_{ZPL} beschrieben.

Für den geneigten Leser wird im Anhang A die Gleichung 2.31 durch vollständige Induktion verifiziert, was bisher nicht in der Literatur aufgeführt wurde. Mit diesem Ergebnis wird die vibronische Seitenbande für eine lorentzförmige Spektraldichte zu

$$B(\omega) = e^{-S} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{S^j}{j!} \Theta_j(\omega) \quad . \quad (2.32)$$

Die Gl. 2.32 wird im Kapitel 6 zur Simulation der Linienform in verschiedenen Spektralbereichen verwendet. Hayes *et al.* sind zur Simulation ihrer Lochbrennspektren von einem ähnlichen Ansatz ausgegangen [Hay94, Pul95].

2.3 Konfokale Mikroskopie

2.3.1 Einführung

Die bislang adäquateste Methode, um auf optischem Weg ein einzelnes Molekül zu untersuchen, besteht darin, aus einem kleinen Proben-Volumen, in dem sich aufgrund starker Verdünnung höchstens ein einziger Chromophor befindet, die laserinduzierte Fluoreszenz zu sammeln. Die Fortschritte der letzten 15 Jahre in der Detektortechnik haben dafür den Weg bereitet, mit dem Prinzip des konfokalen Mikroskops einzelne Moleküle nachzuweisen und zu untersuchen. Durch diese Methode werden die Ideen aus optischer Mikroskopie, bei der nur Licht von der Probe gesendet oder empfangen wird, und Raster-Tunnel-Mikroskopie, bei der die Untersuchung der Probe lokal mit Hilfe eines kleinen Objekts erfolgt, vereint. Anstelle einer scharfen Spitze vermittelt hier das Molekül selbst seine Untersuchung.

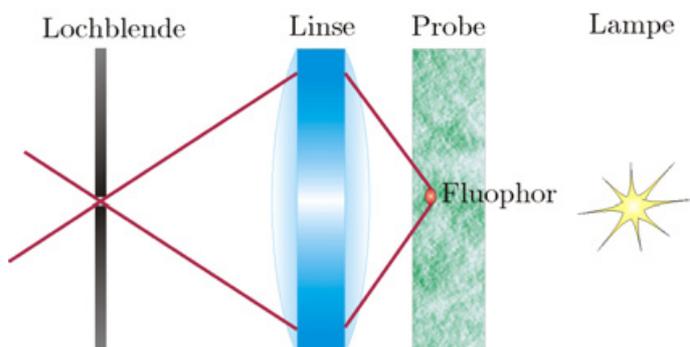


Abbildung 2.4: Eine Probe wird von einer Lampe angeregt und über eine Linse abgebildet. Die Lochblende lässt Licht von dem eingezeichneten Fluorophor gerade passieren, während Licht von außerhalb des Fokuspunkts großteils abgeschnitten wird.

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

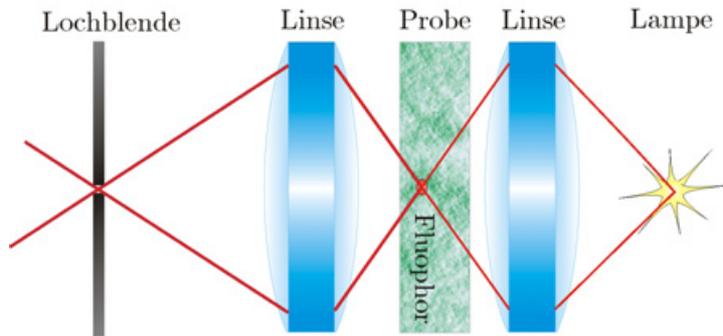


Abbildung 2.5: Zusätzlich zu der in Abbildung 2.4 gezeigten Konstellation wird nun die Probe selektiv angeregt. Der Fluorophor hat eine konfokale Position, da er sich sowohl im Fokuspunkt der Lichtquelle als auch im Fokuspunkt der Lochblende befindet.

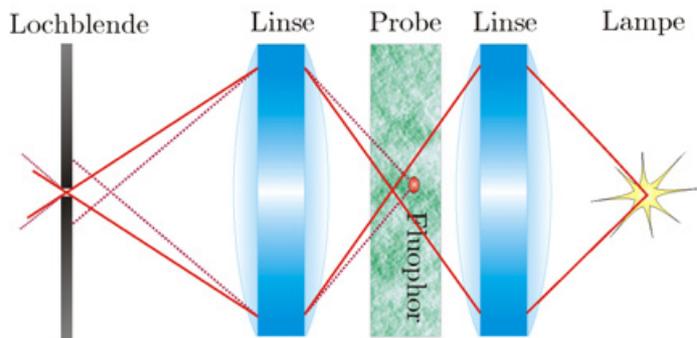


Abbildung 2.6: Im Gegensatz zu der in Abbildung 2.5 dargestellten Situation befindet sich nun der Fluorophor außerhalb des konfokalen Volumens. Sein schwaches Streulicht wird von der Lochblende fast vollständig abgeschnitten.

2.3.2 Konfokales Prinzip

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde bereits 1957 von Marvin Minsky vorgeschlagen [Min57, Min88], blieb jedoch weitgehend unbeachtet. Das lag vermutlich am Mangel von starken Lichtquellen und leistungsfähigen Computern, um mit den Datenmengen umzugehen. Nach Ablauf des Patents um 1979 wurde das Prinzip an zwei verschiedenen Stellen gleichzeitig erneut erfunden: einmal theoretisch von Sheppard in Oxford und experimentell vom holländischen Physiker Brakenhoff [Bra85]. Die konfokale Technik ermöglicht mikroskopische Aufnahmen mit gesteigertem Kontrast im Vergleich zu konventioneller optischer Mikroskopie, was insbesondere für dicke Proben gilt. Somit können insbesondere bei dicken Proben direkt Tiefenschnitte abgebildet werden, ohne dass die Probe zuvor mit Hilfe spezieller Präparationsverfahren zerstört werden muss. Die Idee dieser Methode verlangt, dass dem gewünschten Signal überlagertes Streulicht aus der Umgebung eingedämmt wird. Dies gelingt, indem man das betrachtete Volumen möglichst stark einschränkt. Zwei Faktoren bestimmen die Begrenzung des Volumens: zum einen die Beleuchtung und zum anderen eine geeignete Selektion vor dem Detektor. Letzteres wird dadurch erreicht, dass eine Lochblende vor dem Detektor Licht aus dem Fokuspunkt vollständig passieren lässt, während Licht von außerhalb des Fokuspunkts nur sehr wenig durchdringen kann (s. Abbildung 2.4).

Zusätzlich ist man bemüht, das Anregungsvolumen möglichst klein werden zu lassen. Dazu bildet man eine nahezu punktförmige Lichtquelle, die im Idealfall ein gaußförmiges

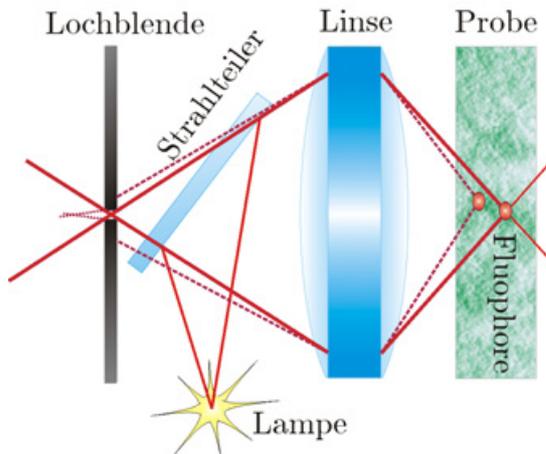


Abbildung 2.7: Durch einen Strahlteiler wird ein einfaches koaxiales konfokales Mikroskop ermöglicht. Die Linse vor der Probe fokussiert den Strahl der Beleuchtungsquelle auf die Probe. Gleichmaßen sammelt die Linse das Licht von der Probe und fokussiert es auf die Lochblende.

Strahlprofil aufweist, auf die Probe ab (s. Abbildung 2.5). So wird sichergestellt, dass sich die Fokusgröße der Anregung in der Größenordnung der Beugungsgrenze befindet. Das auf diese Art und Weise selektierte Detektionsvolumen entspricht genau dem Anregungsvolumen, worin der Name „konfokales Mikroskop“ seinen Ursprung hat. Licht von außerhalb des konfokalen Volumens wird doppelt diskriminiert. Einerseits wird dort nur sehr schwach angeregt und andererseits wird der größte Teil dieses Lichts durch die Lochblende ausgeblendet (s. Abbildung 2.6). Daraus resultiert die besonders hervorzuhebende Tiefenselektion. Alle axial außerhalb der Fokusebene liegenden Fluorophore werden als unscharfe Fläche auf die Lochblende abgebildet (s. Abbildung 2.7). Das Verhältnis dieser Fläche und der Größe der Lochblende bestimmt den Grad der Diskriminierung. Der Preis für den verbesserten Kontrast, der mit dieser Messmethode erreicht wird, ist, dass immer nur ein Punkt abgebildet wird. Um ein vollständiges Abbild der Probe zu erhalten, muss diese daher abgerastert werden.

An dieser Stelle soll noch darauf eingegangen werden, dass beim konfokalen Mikroskop zur Beleuchtung üblicherweise ein Laser als Anregungsmedium dient. Beim herkömmlichen Lichtmikroskop hingegen wird im Normalfall eine inkohärente Lampe verwendet. Kohärente Beleuchtung, wie z.B. mittels Laser, führt in der Mikroskopie grundsätzlich zu Problemen, da ungewollte Interferenzerscheinungen die Abbildungsqualität vermindern. Glücklicherweise spielen beim konfokalen Mikroskop Interferenzeffekte in der Form keine Rolle, da während sich der fokussierte Strahl über die Probe bewegt, immer nur ein Punkt zur Zeit beleuchtet wird. Somit kann ein anderer heller Punkt aus der Umgebung keinen Interferenzbeitrag leisten. Daher treten in der Konsequenz keine *speckle*-Effekte auf, die zu Problemen führen würden.

2.3.3 Laterale und axiale Auflösung

Im Folgenden wird die Auflösung eines Mikroskops beschrieben. Da eine allgemeine Darstellung der funktionellen Zusammenhänge in drei Dimensionen relativ komplex ist, wer-

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

den die beiden Anteile für laterale und axiale Auflösung separat als Spezialfälle behandelt. Zunächst werden die Beugungseigenschaften einer Linse betrachtet. Die Abbildung 2.8 zeigt die Intensitätsverteilung im Fokus einer mit einem kollimierten Strahl beleuchteten Linse. Die Hauptintensität in der Mitte bis zum ersten Minimum ist als Airy-Scheibe bekannt. Sie wird von konzentrischen Beugungsringen begleitet, die die Auflösungsfähigkeit der Linse begrenzen. Das Beugungsmuster wird von der *point-spread*-Funktion (PSF) $p(z, r)$ beschrieben, wobei in der Abbildung 2.8 der Fall für $z = 0$ dargestellt ist. Bei Abbildung eines beliebigen Objekts erhält man als Ergebnis immer eine Faltung der Objektfläche mit der PSF. Mit diesem Wissen erscheint es sinnvoll, die Größe der Lochblende beim konfokalen Mikroskop auf die Ausdehnung des Hauptmaximums der PSF des verwendeten Objektivs abzustimmen. Bei der Wahl einer zu kleinen Lochblende verliert man Intensität, ohne an Auflösung zu gewinnen. Wählt man eine zu große Lochblende, gewinnt man an Intensität verliert aber entscheidend an nötiger Auflösung, falls man beabsichtigt, die Fluoreszenz einzelner Moleküle separat darstellen zu können. Bei der Airy-Scheibe handelt es sich um die gebräuchlichste Näherung der lateralen PSF für kreisrunde Aperturen in ihrer Fokusebene. Streng genommen gilt sie nur für paraxiale Systeme, d.h. für Systeme mit kleiner numerischer Apertur $NA = n \sin \vartheta$, wobei n dem Brechungsindex des Mediums und ϑ dem halben Winkel des Lichtkegels, der zu einem Punkt hin konvergiert oder von einem Punkt weg divergiert, entsprechen. Somit ist diese Näherung effektiv keine besonders glückliche Wahl für ein Mikroskop. Dennoch wird die Airy-Scheibe für gewöhnlich aufgrund ihres recht einfachen Formalismus

$$p^{(T)}(\rho) = p(z = 0, \rho) = \frac{2J_1^2(\rho)}{\rho^2} \quad (2.33)$$

zur Beschreibung der lateralen Auflösung verwendet. J_1 ist dabei die sphärische Besselfunktion erster Ordnung und

$$\rho = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{r}{V} NA \quad (2.34)$$

die reduzierte Variable entlang der zur optischen Achse transversalen Ebene, wobei r dem Abstand zur optischen Achse, V der Vergrößerung des Objektivs, λ der Wellenlänge des Lichts und NA der numerischen Apertur entsprechen. Aufgrund der Rotationssymmetrie der meisten optischen Komponenten hat die laterale PSF auch in der Regel die Eigenschaft, rotationssymmetrisch zur optischen Achse zu liegen, d.h. senkrecht zur optischen Achse ist jede Richtung gleichwertig. Tatsächlich unterscheidet sich die Lösung für $p^{(T)}(\rho)$, die man mit Hilfe recht aufwendiger Mathematik ohne Näherung erhält, für große NA qualitativ auch nicht von der Airy-Funktion. Der interessierte Leser findet eine ausführliche Behandlung in der Ref. [Web96]. Die Hauptabweichung besteht darin, dass die korrekte laterale PSF ein wenig breiter ist als die der Näherung und die Intensität der Beugungsringe nie ganz Null wird.

Ebenfalls mit einer einfachen mathematischen Umschreibung erhält man in der paraxialen

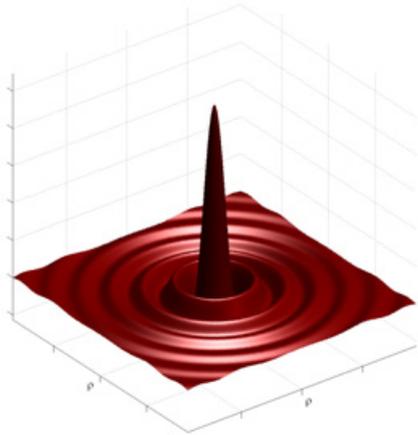


Abbildung 2.8: *Point-spread-Funktion* eines konventionellen optischen Mikroskops. (Für Details s. Text)

Näherung

$$p^{(A)}(\zeta) = p(\zeta, \rho = 0) = \left(\frac{\sin \zeta / 4}{\zeta / 4} \right)^2 \quad (2.35)$$

für die axiale PSF, wobei

$$\zeta = \frac{2\pi}{n\lambda} NA^2 z \quad (2.36)$$

der reduzierten Variable in z -Richtung entspricht.

Gemäß dem Rayleigh-Kriterium ist die Auflösung einer optischen Komponente transversal zur optischen Achse als der Radius der Airy-Scheibe definiert. Aus der lateralen *point-spread-Funktion* $p^{(T)}(\rho)$ erhält man somit für die zur optischen Achse transversalen Auflösung eines konventionellen optischen Mikroskops

$$r_{\text{Airy}} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \vartheta} . \quad (2.37)$$

Beim konfokalen Mikroskop hängt die Auflösung vom konfokalen Volumen ab. Durch die allgemeine Gleichung $p(\zeta, \rho)$ wird seine Beleuchtung beschrieben. Gleichzeitig bestimmt die gleiche dreidimensionale PSF das Detektionsvolumen. Im Falle identischer optischer Komponenten für Anregung sowie Detektion (s. Abbildung 2.7) erhält man für die dreidimensionale PSF des konfokalen Mikroskops somit

$$p_{\text{konf}}(\zeta, \rho) = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho) , \quad (2.38)$$

also das Quadrat der PSF des herkömmlichen Mikroskops (vergl. Abbildung 2.8).

Mit Verwendung von Objektiven großer NA in Verbindung mit entsprechend kleinen Lochblenden lässt sich das konfokale Volumen aufgrund des Beugungslimits nicht unter einen Wert von ungefähr einem Mikrometer bringen [Rig93]. Jedoch kann z.B. mit Hilfe des Verfahrens der „*stimulated emission depletion*“ eine Schmälerung des Anregungsvolu-

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

mens bis zu einem Faktor von 18 in Bezug auf ein herkömmliches konfokales Mikroskop erreicht werden [Kla00]. Das Ergebnis der Funktion (2.38) ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Durch das Quadrieren entsteht ein schärferes Maximum, wodurch sich eine etwas bessere laterale Auflösung ergibt

$$r_{\text{konf}} = \frac{0,61}{\sqrt{2}} \frac{\lambda}{n \sin \vartheta} . \quad (2.39)$$

Selbstverständlich gilt die Gleichung (2.39) nur im Falle guter Konfokalität, d.h. bei der Wahl einer geeigneten Lochblende für das jeweilige Objektiv.

Die starke Kontrastverbesserung des konfokalen Mikroskops kommt zum Vorschein, wenn man seine Abbildungseigenschaften von Objekten betrachtet, die außerhalb der Fokusebene liegen. Entlang der optischen Achse ergibt sich für die axiale PSF

$$p_{\text{konf}}^{(\text{T})}(\zeta) = p_{\text{konf}}(\zeta, \rho = 0) = \left(\frac{\sin \zeta/4}{\zeta/4} \right)^4 . \quad (2.40)$$

Gemäß dem Rayleigh Kriterium wird auch die Auflösung in z -Richtung wieder über eine Intensitätsminderung von 26 % in der Verbindungslinie zwischen zwei gleichhellen abgebildeten Objekten definiert

$$\Delta z_{\text{konf}} = 1,5 \frac{n\lambda}{NA^2} . \quad (2.41)$$

Diese enorme axiale Auflösung wird beim konfokalen Mikroskop real erreicht, d.h. zwei gleichhelle Punkte auf der optischen Achse im Abstand Δz_{konf} können tatsächlich auseinander gehalten werden. Die Sichtbarkeit oder Trennbarkeit zweier Objekte wird allerdings nicht ausschließlich vom Kontrast, sondern auch wesentlich vom Rauschen bestimmt. Dieses kann nicht beliebig reduziert werden. Die untere Grenze wird von den statistischen poissonverteilten Prozessen der Ankunft von Photonen bestimmt, dem sogenannten Schrot- oder Quantenrauschen. Die Qualität des Signals hängt somit nicht nur vom Kontrast, sondern auch stark von der Beleuchtung ab. Dadurch, dass beim konfokalen Mikroskop Punkt für Punkt nacheinander beleuchtet wird, kann die Probe beim konfokalen Mikroskop mit deutlich höherer Intensität bestrahlt werden als beim konventionellen Mikroskop. Darüber hinaus ergibt sich durch das Abrastern ein weiterer Vorteil. Die Probe wird nur lokal mit Licht belastet, d.h. während z.B. ein Fluorophor untersucht wird, befinden sich alle andern zu dem Zeitpunkt in Dunkelheit und können somit in dieser Zeit nicht photobleichen.

Im Gegensatz zur herkömmlichen Mikroskopie ist die konfokale Mikroskopie ein digitales Bildgebungsverfahren, d.h. eine stärkere Vergrößerung erfolgt nicht durch Auswechseln des Objektivs, sondern durch eine feinere Abrasterung. Da die Auflösung jedoch durch die Beugungsbegrenzung des konfokalen Volumens bestimmt wird, hat eine beliebig feine Rasterung keinen Sinn. Dem Nyquist-Shannonschen Abtasttheorem zu Folge sollten

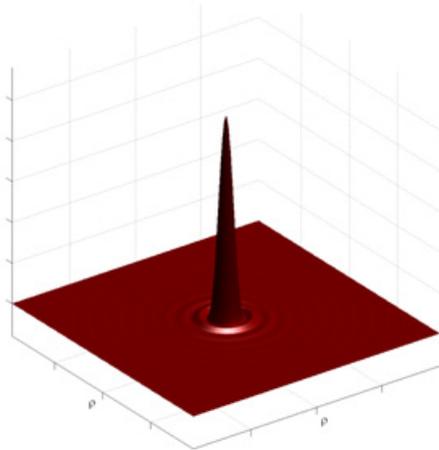


Abbildung 2.9: Laterale *point-spread*-Funktion eines konfokalen Mikroskops. Man erhält sie durch Quadrieren der Airy-Funktion (s. Abbildung 2.8).

jedoch mindestens 2,3 Rasterschritte für eine Fläche in der Größe der entsprechenden Schnittfläche des konfokalen Volumens transversal zur optischen Achse vollführt werden, wenn keine Informationen verloren gehen sollen. Für digitale Abbildungssysteme wird zur Bestimmung der Auflösung üblicherweise das Sparrow-Kriterium verwendet. Hierbei wird das Rayleigh-Kriterium in der Weise ergänzt, dass, anders als beim menschlichen Auge, Kontrastverstärkung und Hintergrundkorrekturen möglich sind.

Die konfokale Mikroskopie bietet ideale Voraussetzungen zur optischen Untersuchung einzelner Fluorophore. Durch die hohe axiale Auflösung ergibt sich eine große Flexibilität und Akzeptanz, unterschiedlichste Proben typen, in Form und besonders Tiefe, zu spektroskopieren. Unerwünschte Hintergrundstrahlung, wie z.B. Ramanstreuung, von außerhalb des konfokalen Volumens wird effektiv ausgeblendet. Als Observable dient bei der Detektion einzelner Moleküle immer deren Fluoreszenz. Um sicher zu gehen, dass beim Abrastern einer Probe sich tatsächlich nur ein einziges Molekül zur Zeit im konfokalen Volumen aufhält, muss die Probe hinreichend stark verdünnt sein, so dass die Moleküldichte kleiner wird als die laterale Auflösung der Apparatur. Auf den experimentellen Aufbau wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Viele Anwendungen der konfokalen Mikroskopie zur Untersuchung einzelner Moleküle werden in [Rig01, Zan02, Bas97, Tam00] vorgestellt, in [Paw91] wird insbesondere die Untersuchung makroskopischer Systeme, z.B. Visualisierung biologischer Zellen, behandelt.

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

3 Experiment

3.1 Aufbau des konfokalen Spektrometers

3.1.1 Einführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konfokales Spektrometer für Raum- und Tieftemperatur-Messungen aufgebaut. Für Experimente am PS I lag der Anspruch darin, die Fluoreszenz einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen detektieren zu können. Da sich bei Raumtemperatur diverse technische Details einfacher lösen lassen, wurde zunächst ein Aufbau zur Messung von Proben bei Raumtemperatur erstellt. Als ein wesentlicher Punkt von vielen sei diesbezüglich beispielsweise das Objektiv genannt. Da ein einzelnes Molekül nicht viel Licht abgibt und darüber hinaus im allgemeinen in alle Raumrichtungen abstrahlt, sollte das Objektiv möglichst viel Licht einsammeln können, also eine möglichst große numerische Apertur haben. Für die Mikroskopie bei Raumtemperatur ist der Markt sehr groß, so dass das Sortiment an Objektiven mit großer numerischer Apertur und immer kleineren optischen Aberrationen ständig erweitert wird. Der größte erreichbare Wert für die numerische Apertur liegt bei $NA = 1,65$ ¹. Nun stellt man fest, dass für Tieftemperatur-Anwendungen nur eine ganz begrenzte Anzahl von Herstellern überhaupt Objektive anbietet, da der Markt vergleichsweise sehr klein ist. Beim Abkühlen im flüssigen Helium ist das Objektiv großen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Ungünstigerweise sind gerade die Objektive mit großer numerischer Apertur bei zugleich möglichst klein gehaltener optischer Aberration die mechanisch empfindlichsten. Dennoch lassen sich geeignete Objektive finden, die sogar die theoretisch größtmögliche numerische Apertur im flüssigen Helium von $NA \approx 0,95$ beinahe erreichen. Allerdings sind aufgrund der Verzerrungen bei tiefen Temperaturen die optischen Aberrationen entsprechend größer als bei Raumtemperatur. In diesem Kapitel werden einige Details beschrieben, wie man dieses und einige andere Probleme löst, um schließlich ein messbereites Einzelmolekül-Spektrometer für tiefe Temperaturen fertigzustellen. Dafür wird zunächst eine Funktionsübersicht gegeben, bevor im Anschluss einzelne Komponenten näher erläutert werden.

¹Dieser Wert wird nur mit Hilfe von speziellem Immersionsöl und speziellen Deckgläschen erreicht

3.1.2 Funktionsweise und Übersicht

Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des optischen Gesamtaufbaus. Er untergliedert sich in einen Raumtemperatur- und einen Tieftemperaturaufbau. Beide teilen sich aus ökonomischen Gründen den Anregungs- und Detektionszweig. Man beachte, dass im Schema sämtliche Lichtwege simultan aufgezeigt werden. Dies dient nur der Anschauung und hat messtechnisch keinerlei Relevanz. Um die Funktionsweise der Apparatur am einfachsten nachzuvollziehen, ist es hilfreich den Lichtweg von Quelle bis Detektor zu verfolgen. Der aus der Faser austretende Laserstrahl wird durch ein Objektiv in geeignetem Abstand kollimiert und über einen dichroitischen Strahlteiler in den Strahlengang des konfokalen Mikroskops eingespeist. Von dort an bis zur Probe sind der Anregungsstrahl und der Strahl der Fluoreszenz, der nachgewiesen werden soll, deckungsgleich. Wie bereits im Abschnitt 2.3.2 erwähnt wurde, besteht beim konfokalen Mikroskop die Notwendigkeit, die Probe abzurastern, um ein vollständiges Bild der Probe zu erhalten. Technisch wird dies realisiert, indem entweder die Probe orthogonal zum Anregungsstrahl verschoben wird oder der Anregungsstrahl über die Probe bewegt wird. Letztere Lösung hat gegenüber der ersteren einige wesentliche Vorteile. Zum einen liegt die Rastergeschwindigkeit höher, zum anderen ist die mechanische Toleranz aufgrund der verkleinernden Wirkung des Objektivs weniger kritisch. Darüber hinaus erfordert erstere Methode insbesondere bei tiefen Temperaturen einen großen technischen Aufwand und wird daher von den wenigsten Gruppen praktiziert. Dementsprechend verwendet das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute konfokale Mikroskop auch die letztere Methode. Die nächste optische Komponente im Strahlengang in Richtung zur Probe ist daher ein Galvano-Spiegeldreher, der den Anregungsstrahl in x- und in y-Richtung ablenken kann. Somit kann von hier aus mit dem Laserstrahl z.B. eine Kegel- oder Pyramidenoberfläche abgefahren werden. Um diese Strahlablenkung zum Abrastern der Probe nutzen zu können, muss sie in eine fokussierende Bewegung überführt werden. Die einfachste optische Lösung bietet ein telezentrisches System, das aus zwei Linsen besteht. Im Fokuspunkt der ersten Linse befindet sich der Galvano-Spiegeldreher. Des Weiteren überlagern sich die Fokuspunkte beider Linsen in der Mitte zwischen sich. Der zweite Fokuspunkt der zweiten Linse fällt mit der Hauptebene des Objektivs zusammen, so dass diese immer im gleichen Punkt jedoch unter anderem Winkel getroffen wird. Dadurch bewegt sich der Fokuspunkt des Anregungsstrahls in der Fokusebene des Objektivs über die Probe. Beim Betrachten des Strahlengangs in Abbildung 3.1 beachte man, dass der Anregungsstrahl selbst zwischen den Linsen divergiert, während er außerhalb des Linsensystems stets kollimiert ist. Um bei Raum- und bei Tieftemperatur messen zu können, besitzt der Aufbau zwei unabhängige telezentrische Systeme. Das eine System mündet in einem Immersionsöl-Objektiv und das andere in einem Tieftemperatur-Objektiv innerhalb eines Helium-Badkryostaten. Nach erfolgter Anregung der Probe hat das jeweilige Objektiv die Aufgabe, einen möglichst großen Teil der Fluoreszenz aus dem konfokalen Volumen zu sammeln und schließlich kollimiert genau dem Anregungsstrahl entgegenzusenden. Auf diese Weise gelangt, während der Galvano-Spiegeldreher Punkt für Punkt die Probe abrastert, die jeweils zu jedem

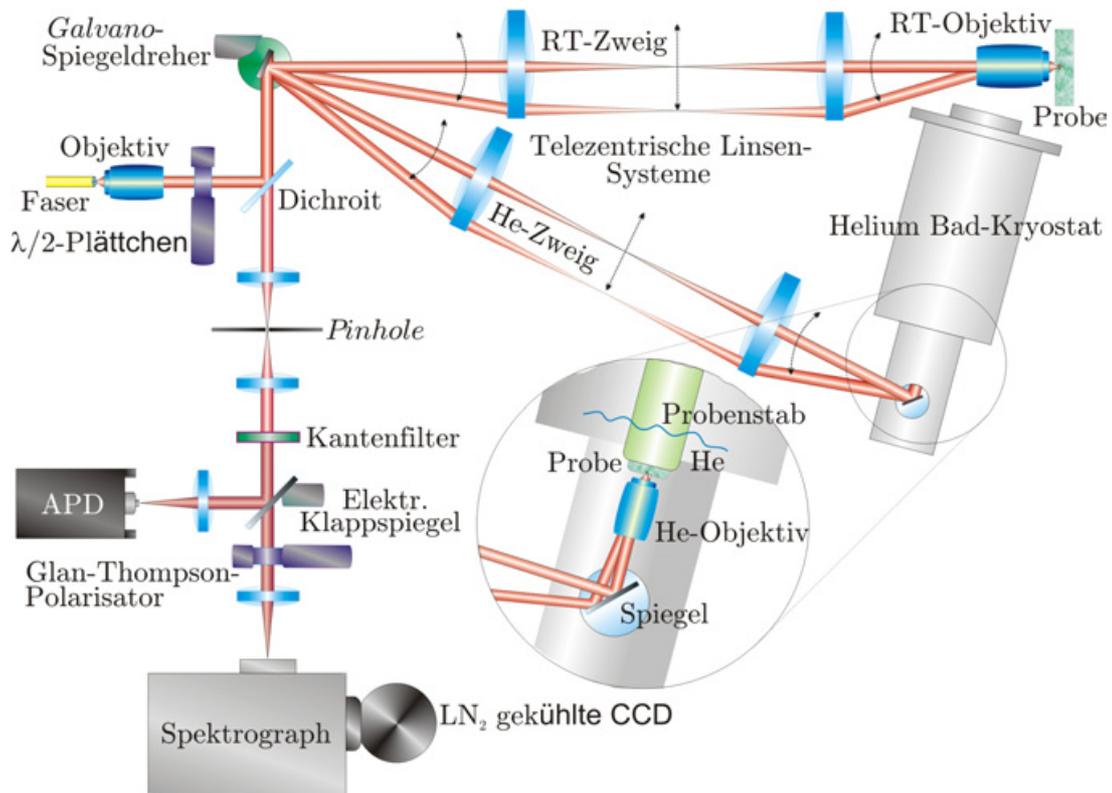


Abbildung 3.1: Schema des optischen Gesamtaufbaus. Über die Faser wird ein kollimierter Anregungsstrahl in das System eingespeist. Im Bereich der telezentrischen Linsen-Systeme für Raum- und Tieftemperatur sind jeweils zwei Strahlrichtungen eingezeichnet, die über den Spiegeldreher eingestellt werden. Bei jedem Rasterschritt wird Licht von der Probe auf demselben optischen Pfad bis hinter den dichroitischen Strahlteiler gelenkt. Mit Hilfe der Lochblende wird Licht aus dem Anregungsvolumen in der Probenebene selektiert. Der Kantenfilter lässt nur längerwellige Anteile als das Laserlicht passieren. Der Nachweis erfolgt entweder über eine Lawinen-Photodiode (*avalanche photodiode* - kurz: APD) oder eine stickstoffgekühlte, von der Rückseite her beleuchtete (*back-illuminated*) charge coupled device-Kamera (CCD).

Punkt zugehörige Fluoreszenz bis zum dichroitischen Strahlteiler, an dem der Laser in den Strahlengang reflektiert wird. Anders als die ebenfalls hier ankommende Rückstreuung des Laserlichts kann die stokesverschobene Fluoreszenz den Strahlteiler zu 95 % passieren. Auf dem Weg in den Detektionskanal wird nun der kollimierte Anteil der Fluoreszenz mit Hilfe einer Linse auf die Lochblende abgebildet und dahinter mittels einer zweiten Linse wieder kollimiert. Die divergierenden Anteile der Fluoreszenz stammen von außerhalb des konfokalen Volumens und werden an dieser Stelle größtenteils abgeschnitten (s. Abschnitt 2.3.2). Um die Laserrückstreuung möglichst vollständig abzublocken, befinden sich im weiteren Strahlenverlauf einige Langpass-Kantenfilter. Im Schema Abbildung 3.1 ist einer exemplarisch dargestellt. Der Aufbau bietet zwei verschiedene Detektionsmöglichkeiten, zwischen denen mit Hilfe eines elektrisch klappbaren Spiegels ausgewählt werden kann. Die erste dient zum messen der integrierten Intensität. Hierzu wird die Fluoreszenz

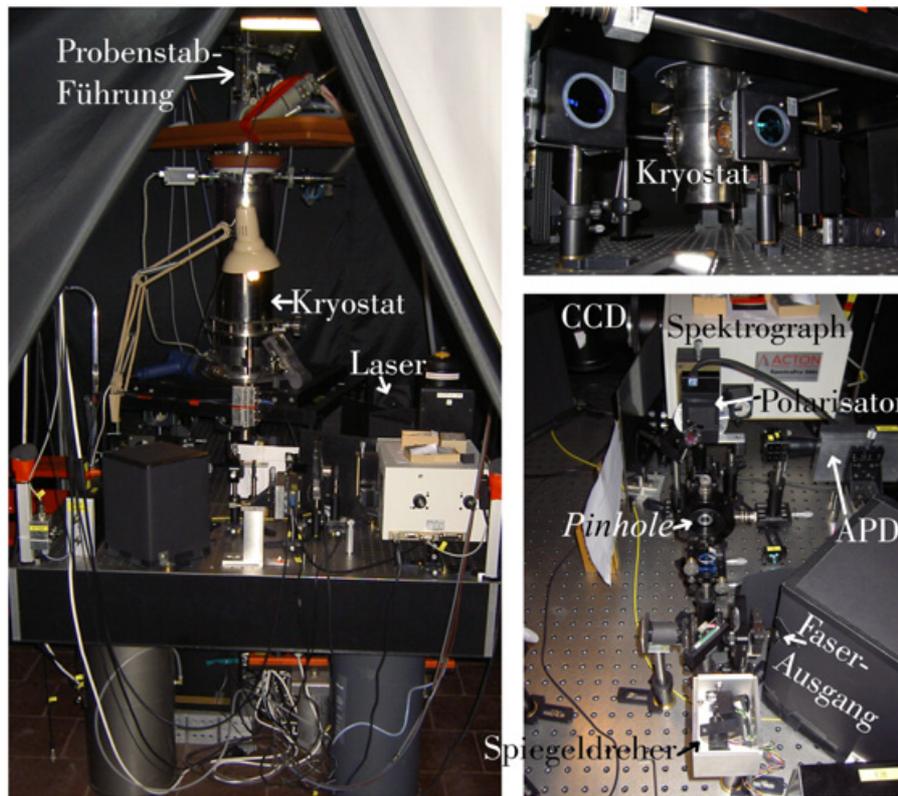


Abbildung 3.2: Photo von Teilen des erstellten Messaufbaus. Das **linke Bild** zeigt einen Einblick in die Dunkelkammer, in der das Experiment abläuft. Die Steuerung erfolgt von außerhalb. Im Teilbild **rechts oben** sieht man den optischen Zugang zum Kryostaten. **Rechts unten** ist der Detektionskanal dargestellt.

mittels einer Linse auf eine Avalanche Photodiode (APD) abgebildet. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass die Fluoreszenz spektral aufgelöst erfasst wird. Dafür wird die Fluoreszenz ebenfalls mit einer Linse in einen Gitterspektrographen fokussiert. Die spektral aufgespaltene Fluoreszenz wird dann simultan mit Hilfe einer Stickstoff-gekühlten *back illuminated charge-coupled-device*-Kamera (CCD-Kamera) aufgezeichnet. Die Datenakquisition und Steuerung des Experiments erfolgt über einen Linux-Computer. In Abbildung 3.2 sind wichtige Teile des Aufbaus auf Photos festgehalten. Nicht dargestellt ist die instrumentelle Peripherie wie z.B. das Pumpensystem.

3.1.3 Lichtquelle: Laser und Einmoden-Lichtwellenleiter

Da das hier beschriebene konfokale Mikroskop dazu gebaut ist, Moleküle räumlich zu selektieren, werden an die Schmalbandigkeit des Lasers keine hohen Ansprüche gestellt. Hohe Anforderungen hingegen werden an seine Leistungsstabilität gestellt, denn die Detektion der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls reagiert sehr sensibel auf Schwankungen

der Anregungsintensität. Eine kostengünstige und zugleich sehr Platz sparende Alternative zum Farbstofflaser bietet das Littman-System. Bei diesem Diodenlaser befindet sich innerhalb der Kavität ein verstellbares Gitter. Dadurch kann die emittierte Frequenz verstimmt werden. Zudem verleiht diese Konstruktion in Verbindung mit einer sehr hochwertigen Diode dem Laser eine gute Leistungsstabilität und geringe Bandbreite. Das verwendete Lasersystem wurde von der Firma Sacher entwickelt und vertrieben. Es besteht aus einer Kontrolleinheit (MLD 1000) und zwei Lasern (TEC-500-0685-05 und TEC-500-0635-05). Damit während des Experiments in verschiedenen Wellenlängenbereichen angeregt werden kann, sind die beiden Laser so montiert, dass innerhalb von ca. zehn Minuten von einem Laser zum anderen gewechselt werden kann. Die beiden zur Verfügung stehenden Bereiche erstrecken sich über $676 \text{ nm} < \lambda < 688 \text{ nm}$ und $634 \text{ nm} < \lambda < 643 \text{ nm}$. Die Bandbreite der Laser beträgt über einen Zeitraum von 20 s nicht mehr als 5 MHz (typ. 2 MHz). Beide Laser strahlen kontinuierlich (*cw*).

Die Hauptschwierigkeit liegt darin, beide Laser in ein und dieselbe polarisationserhaltende Einmoden-Faser einzukoppeln, wobei mit Hilfe eines klappbaren Spiegels zwischen den Lasern ausgewählt wird. Die Faser dient dem Aufbau als nahezu ideale Punktlichtquelle. Diese Eigenschaft ist jedoch weniger entscheidend. Hingegen ist wichtig, dass nur eine Mode in den Strahlengang eingekoppelt wird. Denn wie aus der Gaußschen Strahlenoptik bekannt ist, führt ein Gaußsches Strahlprofil bei Abbildung mit einer Linse zum kleinsten Fokuspunkt. Daher ist diese Eigenschaft des Anregungsstrahls für die Größe des konfokalen Volumens von Bedeutung, damit einzelne Moleküle räumlich selektiert werden können. Der Durchmesser der verwendeten Faser beträgt ca. $7 \mu\text{m}$. Sie ist bereits vom Hersteller Schäfter-Kirchhoff konfektioniert. Zum Ein- bzw. Auskoppeln dienen Standard-Faserkoppler (Newport). Der Auskoppler wird so justiert, dass der ausgekoppelte Strahl kollimiert ist. Die Einstellung des Strahldurchmessers erfolgt durch geeignete Wahl des Auskoppler-Objektivs.

3.1.4 Rastermethode: Galvano-Spiegeldreher

Das Abrastern der Probe erfolgt mit Hilfe eines Galvano-Spiegeldrehers in Kombination mit einem telezentrischen Linsensystem. Der Spiegeldreher stammt vom italienischen Hersteller Galvoline (G1222HS). Er besteht aus zwei Servomotoren, die auf dem Prinzip sich bewegender Magneten basieren. Jeder dieser Motoren trägt einen Silberspiegel, so dass ein eintreffender Strahl sowohl in x- als auch in y-Richtung abgelenkt werden kann (s. Abbildung 3.3). Die Größe der Spiegel beträgt $8 \times 6 \text{ mm}^2$ und $6 \times 14 \text{ mm}^2$. Ein sinnvolles Maß für die Rastergeschwindigkeit ist die Zeit für einen Schritt, die so genannte „Absetzzeit“. Sie hängt unter anderem von den Trägheitsmomenten und dem beschleunigendem Drehmoment ab. Mit einer Trägheit der Rotoren von $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ kg} \cdot \text{m}^2$ und einer Drehmomentkonstante von $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ Nm/A}$ kann in guter Qualität mit einer maximalen Frequenz von ca. 5 kHz gerastert werden. Die daraus resultierenden großen Beschleunigungen belasten die Spiegel und Rotoren stark, so dass hohe Ansprüche an deren Steifig-

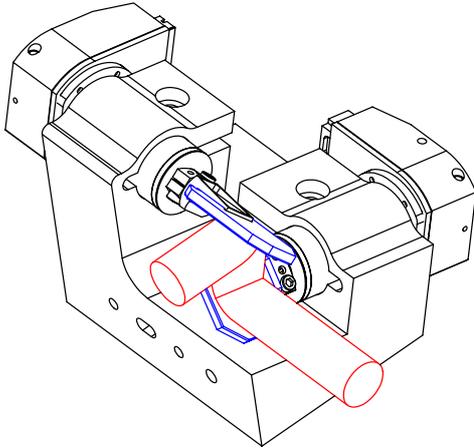


Abbildung 3.3: Technische Zeichnung des prinzipiellen Aufbaus der Galvano-Spiegeldreher. Die beiden Galvano-Servomotoren sind fest in eine massive Aluminium-Halterung eingespannt, um eine hohe Verwindungssteifigkeit zu gewährleisten. Auf die Rotoren sind jeweils ein Silberspiegel montiert, hier blau eingezeichnet. Die Ablenkung eines auftreffenden Lichtstrahls wird in rot angedeutet.

keit gestellt werden. Die üblicherweise beim Experiment gewählte Rastergeschwindigkeit lag jedoch eine ganze Größenordnung darunter. Denn beim Abrastern einer Fläche von zum Beispiel $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ in der Probenebene und einer Schrittweite von $1/3 \mu\text{m}$ wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei geringeren Verweilzeiten als ca. 2 ms pro Punkt unvernünftig, da dieser Wert nur noch eineinhalb Größenordnungen von der Detektortotzeit (50 ns) entfernt liegt.

Die Ansteuerung der Servomotoren erfolgt über eine Treiberkarte (C355). Diese verarbeitet zwei analoge Signale in Form von Spannungen im Bereich von $\pm 10 \text{ V}$. Den gegebenen Spannungen sind entsprechende Spiegelpositionen zugeordnet. Zur präzisen Signaleingabe dient eine 16 Bit Digital-Analog-Wandler-Karte (Meilhaus ME-6000). Um eine möglichst hohe Winkelauflösung zu erreichen, wird die ausgegebene Spannung mit Hilfe eines Spannungsteilers geeignet verringert. Die Auflösung der lateralen Schrittweite in der Probenebene beträgt dadurch weniger als 30 nm. Zur Lokalisierung einzelner Moleküle genügt in der Regel eine um mindestens eine Größenordnung geringere Abtastung der Probe. Jedoch wird nach Selektion eines Moleküls die volle Auflösung des Galvano-Spiegeldrehers genutzt, um das Fluoreszenz-Signal zu optimieren.

3.1.5 Ansprüche an das Objektiv

Ein wichtiger Bestandteil des konfokalen Mikroskops ist sein Objektiv. Wie in Abschnitt 3.1.2 bereits erwähnt, wird das Objektiv in zweifacher Weise benutzt: einmal für die Beleuchtung der Probe und ebenso zum Sammeln des Lichts von der Probe. Daher wird die Qualität der Apparatur maßgeblich von der Güte des Objektivs bestimmt. Von der Industrie wird ein großer Entwicklungsaufwand betrieben, um Objektive mit immer geringeren optischen Aberrationen zu erschaffen. Die kritischsten Abbildungsfehler sind die sphärische sowie die axiale und laterale chromatische Aberration, Koma, Bildfeldwölbung

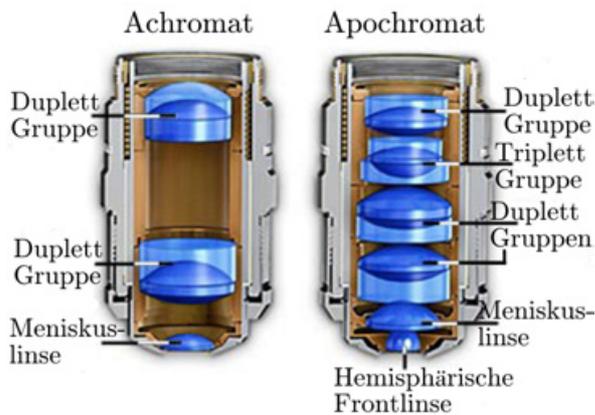


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung zweier Objektiventypen im Querschnitt. Die Bauform eines Achromaten kann wesentlich kompakter sein als hier gezeigt. Die zugrunde liegende Abbildung stammt aus Ref. [Spr98].

und Astigmatismus. Nicht allen dieser Aberrationen kann auf einfache Art und Weise begegnet werden. Eine ausführlichere Beschreibung dieser Problematik wird z.B. in [Zan02] gegeben. Gegenüber einer herkömmlichen Linse bietet ein so genannter Achromat die erste deutliche Verbesserung hinsichtlich des Farbfehlers. Dieser besteht aus zwei gleichgroßen Linsen, deren Gläser zwei unterschiedliche Abbesche Zahlen

$$V = \frac{n_D - 1}{n_F - n_C}$$

aufweisen, wobei n_D , n_F und n_C den Brechzahlen des jeweiligen Materials bei den Wellenlängen der D-, F-, und C-Fraunhoferlinien (589,2 nm, 486,1 nm und 656,3 nm) entsprechen. Im Allgemeinen wird eine konvexe Linse aus Kronglas und eine konkave Linse aus Flintglas verwendet. An ihrer Kontaktfläche können die Linsen entweder verkittet sein, oder einen dünnen Luftspalt bilden, der im Idealfall als zusätzliche Luftlinse zur Korrektur weiterer optischer Aberrationen genutzt wird. Einem achromatischen Linsensystem gelingt die Beseitigung der chromatischen Aberration in zwei Farben. Der verbleibende Farbfehler wird sekundäres Spektrum genannt. Dieses kann durch Einbringen eines dritten Linsenmaterials ebenfalls eliminiert werden. Eine solche Linsenkonstruktion, die alle Lichtfarben in einen gemeinsamen Punkt fokussiert, wird apochromatisch genannt. Zur Anschauung sind in der Abbildung 3.4 beide Objektiventypen in ihrem prinzipiellen Aufbau gegenübergestellt. Im Apochromaten werden Gläser mit außergewöhnlichen Eigenschaften, wie Langkronglas (Fluorkronglas und Kalziumfluorid) und spezielles Kurzflintglas, verwendet.

Für die Nutzung der konfokalen Mikroskopie als Nachweismethode für die Fluoreszenz einzelner Moleküle steht neben dem hohen Anspruch geringer optischer Aberrationen noch eine weitere Anforderung an das Objektiv an oberster Stelle. Die Emission eines einzelnen Moleküls besitzt im Allgemeinen keine Vorzugsrichtung, so dass in alle drei Raumrichtungen gleichermaßen abgestrahlt wird. Da die Anzahl emittierter Photonen eines einzelnen Chromophors im Vergleich zu einem Ensemble aus üblicherweise größenordnungsmäßig $10^{17} - 10^{19}$ Molekülen pro Küvette ohnehin relativ geringfügig ist, wird von dem Objektiv verlangt, einen möglichst großen Raumwinkelbereich abzudecken. Wie

3 Experiment

bereits in der Einleitung erwähnt, stellt sich daraus an das Objektiv die Maßgabe einer möglichst großen numerischen Apertur. Bei einem Öffnungswinkel von $\varphi \simeq 70^\circ$ wird das optische Limit erreicht. Für Anwendungen bei Raumtemperatur kann mit Hilfe von Immersionsöl daraus eine numerische Apertur von $NA = 1,45$ realisiert werden. Wie bereits eingangs erwähnt wurde, wird in Verbindung mit Spezialdeckgläschen und einem speziell darauf korrigierten Objektiv sogar eine NA von 1,65 erreicht. Für unseren Raumtemperaturaufbau wurde das Objektiv mit dem besten Preis/Leistungsverhältnis gewählt (Olympus PLAPO60XO3). Seine numerische Apertur liegt bei $NA = 1,40$. Der genaue Aufbau des Objektivs unterliegt einem strengen Firmengeheimnis. Jedoch weiß man, dass mehr als 15 Einzellinsen verbaut sind, wobei diverse Zwischenräume gekittet sind. Die Abbildungseigenschaften dieses Planapochromats erfüllen die höchsten Ansprüche, so dass beim Messen der Fluoreszenz von einzelnen Molekülen bei Raumtemperatur keinerlei optische Aberrationen hinsichtlich des Objektivs ins Gewicht fallen. Insbesondere gibt es keine mit unseren Mitteln messbare chromatische Aberration. Zusammengefasst begünstigen sowohl die große numerische Apertur als auch die geringen optischen Aberrationen das Einzelmolekül-Experiment. Jedoch kann dieses Objektiv nur bei Raumtemperatur und mit Immersionsöl benutzt werden. Bei tiefen Temperaturen sind Objektive aus verschiedenen Materialien starken mechanischen Spannungen ausgesetzt. Nach unseren Erfahrungen übersteht ein gekitteter Achromat nicht einmal einen Kältezyklus. Ein herkömmlicher Apochromat kommt demzufolge nicht in Betracht und eine Einzelanfertigung ohne Garantie, dass die Konstruktion auch nur einen Kältezyklus verträgt, ist preislich unerschwinglich. Ein unverkitteter Achromat vom Hersteller Microthek hat sich im Experiment bei tiefer Temperatur bewährt. Das Objektiv ist plan- und auf unendlich korrigiert und hat eine 60-fache Vergrößerung. Die Konstruktion dieses preiswerten Objektivs hält erstaunlicherweise mehr als 50 Kaltzyklen durch, ohne dabei in der Qualität beeinträchtigt zu werden. Auch die numerische Apertur liegt mit $NA = 0,85$ nahe dem erreichbaren Maximum von $NA = 0,95$ für Luftobjektive. Da der Brechungsindex von suprafluiden Helium (He-II) in der Nähe von $n \simeq 1$ liegt, ist dieser Wert für Experimente im He-II relevant. Dennoch sind die optischen Eigenschaften dieses Achromaten im Vergleich zu denen des verwendeten Raumtemperaturobjektivs eingeschränkt. Um die optischen Aberrationen möglichst gering zu halten, nutzt man möglichst Probenabschnitte, die sich nahe der optischen Achse befinden. Die gesamte sichtbare Fläche in der Probenebene beläuft sich auf ca. $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. Im Experiment bei tiefen Temperaturen wird jedoch effektiv nur eine Fläche in der Mitte von insgesamt maximal $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ ausgeschöpft, wobei diese in kleineren Teilbereichen abgearbeitet wird.

3.1.6 Badkryostat und Pumpensystem

Zur Messung von Proben bei tiefer Temperatur wurde ein vorhandener Helium-Badkryostat restauriert und modifiziert. In Abbildung 3.5 kann sein Aufbau betrachtet werden. Der Probenraum umfasst ca. sieben Liter und hat eine Länge von ca. einem Meter. Der

3.1 Aufbau des konfokalen Spektrometers



Abbildung 3.5: Photographische Darstellung der einzelnen Elemente des verwendeten Helium-Badkryostaten in zerlegtem Zustand. An den Rumpfteilen erkennt man einige der mit Indium gedichteten Quarzglasfenster. Der Rumpfbereich wird durch einen kupfernen Strahlungsschild, der eine gute Wärmeanpassung an das Stickstoffreservoir besitzt, weitgehend vor Wärmeeinträgen geschützt. Im oberen Bereich befinden sich ebenfalls Strahlungsschilde aus Kupfer, die an den Stickstofftank angeschlossen, damit die Innenraumwände möglichst keiner Fläche mit Raumtemperatur zugeneigt sind.

optische Zugang zur Probe wird von vier Quarzglasfenstern am Rumpf ermöglicht. Eine Röhre aus Epoxidharz-Glasfilament-Gewebe (HGW2375 Hesselmann) bildet die Mimik zur Halterung eines Umlenkspiegels und des Tieftemperatur-Objektivs im flüssigen Helium. Dieses steht senkrecht mit der Beobachtungsrichtung nach obenweisend. Auf diese Weise kann konzentrisch zur ersten Röhre der Probenstab eingeführt werden, um die Probe über dem Objektiv in das konfokale Volumen zu positionieren. Zur Feinjustage der Probenhöhe kann der Probenstab mit Hilfe einer Motorvorrichtung schrittweise gefahren werden. Das Kernstück dieser Vorrichtung besteht in einem Schiebepult der Firma Micos mit einem angeflanschten Faulhaber-Motor mit spielarmem Stirnradgetriebe und Inkrementscheibe als Impulsgeber. Dieser ermöglicht die Kontrollierbarkeit der tatsächlich mit dem Probenstab gefahrenen Wege. Zur Justage des Kryostaten im Strahlengang dient ein speziell angefertigter Manipulator, mit dessen Hilfe der gesamte Kryostat in x -, y - und z -Richtung verschoben und auch um die eigene Längsachse gedreht werden kann. Zum Messen wird der gesamte Innenraum des Kryostaten mit Helium geflutet. Die Befüllung erfolgt über einen zwei Meter langen, starren Heber mit zwei teleskopischen Enden. Da das siedende Helium ($T = 4,21$ K) den optischen Weg zur Probe stark beeinträchtigt, kann nur in der suprafluiden Phase gemessen werden. Um den Lambdapunkt $T_\lambda = 2,17$ K zu passieren, wird das gesamte Helium des Innenraums mit Hilfe eines zweistufigen Pumpensystems der Firma BOC Edwards expandiert. Den Vordruck liefert eine große Drehschieberpumpe (El/2M40). Für eine entscheidende Steigerung des Durchsatzes von bis zu 225 m³ pro Stunde sorgt schließlich eine Roots-pumpe (EH250), deren Funktionsprinzip in der Abbildung 3.6 verdeutlicht wird. Um der Anregung von Eigenschwingungen des Gebäudes vorzubeugen, ist das gesamte System federnd in einer Raumecke gelagert. Der hohen Pumpleistung zu Folge wird der Lambdapunkt innerhalb von fünf Minuten unterschritten. Bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Temperatur stabil bleibt, vergehen weitere ca. 10–15 Minuten. Die typische Messtemperatur liegt unterhalb von $T = 1,45$ K. Gemäß der Dampfdruckkurve für ⁴He beträgt der Druck im Kryostaten-

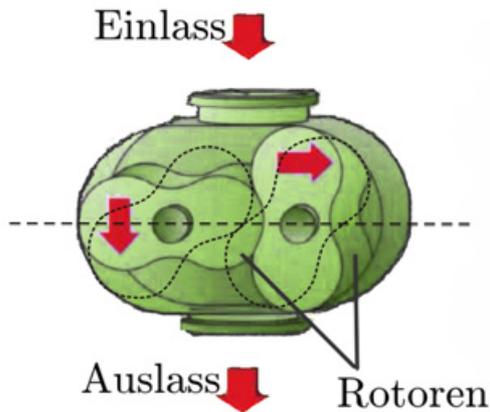


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Roots-pumpe. Zwei Rotoren drehen in entgegengesetzter Richtung zueinander in einem Stator. Während sich die Rotoren in der Mitte permanent tangieren, so dass im Betrieb zwischen ihnen kein wesentliches Gasvolumen eingeschlossen wird, löst sich nach einer viertel Umdrehung im Wechsel ein Rotor von der Wand des Stators unten ab, entlässt das zwischen Rotor und Stator eingeschlossene Gas und setzt oben wieder an, so dass ohne interne Kompression effektiv Gas vom Einlass zum Auslass befördert wird.

innenraum dann ca. $p = 2$ mbar. Bei vollem Kryostaten stehen ca. vier Stunden Messzeit zur Verfügung. Beim Abpumpen bildet das Helium an der Kryostateninnenwand einen Meniskus. Die Gasatome werden durch die van der Waals Kraft von der Wand angezogen und erzeugen einen dünnen Film, dessen Schichtdicke von der Sauberkeit, insbesondere dem Wassergehalt, an den Wänden abhängt. Der Film kriecht bis zu einer Höhe, bei der die Temperatur der Sprungtemperatur für den Phasenübergang entspricht $T = T_\lambda$. Die tiefste erreichbare Temperatur wird durch das Filmkriechen bestimmt, so dass die Sauberkeit des Kryostateninneren für die Effektivität des Abpumpens ausschlaggebend ist.

Innerhalb des Probenstabes in unmittelbarer Nähe zur Probe ist eine kalibrierte Siliziumdiode (Lakeshore DT-670-SD) als Temperatursensor montiert. Sie besitzt im Temperaturbereich von 1,4 – 10K eine Präzision von ± 12 mK. Auf der Strecke durch das flüssige Helium bilden vier induktionsfreie Phosphor-Bronze Drähte (Lakeshore *Quad-Lead Cryogenic Wire* QL-36) ihre Verbindung bis zum Außenraum. Zur Ansteuerung dient eine Temperatur-Steuereinheit (Lakeshore Model 332), die gleichsam mit einem ihrer Heizausgänge an einen Keramikwiderstand angeschlossen ist, der sich im unteren Bereich des Probenraums im flüssigem Helium befindet. Mit seiner Hilfe kann im Bedarfsfall Druck von Innen her aufgebaut werden. Dies ist immer dann erforderlich, wenn bei kaltem Kryostat ein vorhandener Unterdruck im Probenraum ausgeglichen werden soll. Üblicherweise kann während einer Messung nicht verhindert werden, dass die Heliumgasleitung einfriert und somit einige KF-Dichtungen in sehr geringem Maße Fremdgase durchlassen. Daher führt ein Druckausgleich mit Heliumgas durch die Leitung dazu, dass der Probenraum und insbesondere der Umlenkspiegel beschlagen. Auch die großen Flansche auf der Oberseite des Kryostaten werden üblicherweise mit O-Ring-Dichtungen aus Fluor-Kautschuk (Viton) abgedichtet. Somit entstehen auch hier sowohl beim Befüllen mit Helium als auch beim Abpumpen des Heliums undichte Stellen, wenn ein Einfrieren der Flansche nicht permanent durch kontrollierte Wärmezufuhr verhindert wird. Ein Eindringen von Fremdgasen an einem dieser Flansche führt unweigerlich dazu, dass die Messung abgebrochen werden muss. Um dieser Schwachstelle dauerhaft zu begegnen, wurde von mir eine neuar-

tige Indiumdichtung vorgeschlagen, die trotz der großen Abmessungen insbesondere bei tiefen Temperaturen den Kryostaten ausreichend abdichtet. Sie besteht aus einem Edelstahlring mit jeweils einer versetzten Einkerbung auf jeder Seite, in die ein Indiumdraht eingelassen wird. Diese Neuerung bewirkt, dass die Flansche an der Kryostatenoberseite auch bei völligem Einfrieren die Messung nicht gefährden und somit äußerst pflegeleicht sind.

3.1.7 Die Lochblende

Ein weiteres Kernstück des konfokalen Mikroskops ist die Lochblende, englisch: *pinhole*. Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben wurde, dient sie dazu, Streulicht und Fluoreszenzlicht von außerhalb des konfokalen Volumens abzublocken. Der entscheidende Kontrastvorteil gegenüber einem herkömmlichen Lichtmikroskop rührt hauptsächlich von der stark gesteigerten axialen Auflösung durch die Lochblende her. Je kleiner man die Lochblende wählt, desto geringer wird das Hintergrundrauschen. Allerdings wird gleichzeitig das Signal reduziert. Idealerweise wird die Lochblende in der Größe ausgesucht, die der vollen Halbwertsbreite des Airy-Beugungsmusters an der Stelle der Lochblende entspricht. Unter der Voraussetzung, dass ein kollimierter Anregungsstrahl mit Gaußschem Strahlprofil verwendet wird, sind die optischen Eigenschaften des Objektivs und der Linse vor der Lochblende maßgeblich. Die Vergrößerung der benutzen Objektive beträgt sowohl für den Raum- als auch den Tieftemperaturteil $V = 60$. Dabei wird von den Herstellern von einer Tubuslänge von 160 mm ausgegangen. Die vor der Lochblende positionierte Linse besitzt jedoch nur eine Fokusslänge von 60 mm. Daraus ergibt sich eine Vergrößerung von $V = 22,5$ für das gesamte System. Bei Annahme einer Fokusgröße des Objektivs am Beugungslimit von ca. $1 \mu\text{m}$ erhält man also an der Position der Lochblende eine ungefähre Größe der Airy-Scheibe von $20 \mu\text{m}$. Da jedoch bei kleinem Strahldurchmesser die numerische Apertur der Linse vor der Lochblende sehr klein wird, fällt ihr Beugungslimit stark ins Gewicht und die Rechnung muss korrigiert werden. Bei einem realistischen Strahldurchmesser von ca. 2 mm ergibt sich die numerische Apertur der Linse zu $NA = 1/60$. Im uns interessierenden Wellenlängenbereich der Fluoreszenz von ca. $\lambda \simeq 700 \text{ nm}$ erhöht in Folge dessen die begrenzte Auflösung der Linse von $r \simeq 26 \mu\text{m}$ den Durchmesser der Airy-Scheibe beträchtlich. In der Praxis hat sich für die Detektion einzelner Moleküle eine Lochblendengröße von ca. $d_{\text{pinhole}} = 50 \mu\text{m}$ als am besten geeignet herausgestellt. Daraus resultiert ein konfokales Volumen von ungefähr einem Femtoliter. Um Streulicht zu minimieren wird eine schwarze Lochblende (OptoSigma) verwendet. Zur Feinjustage seiner Position dient ein hochpräziser xy-Manipulator, dessen Stellschrauben eine Genauigkeit von 100 nm erlauben.

3 Experiment

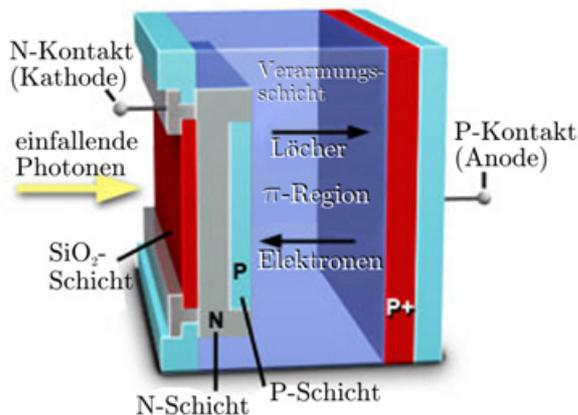


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung einer *Avalanche-Photodiode* für nahes Infrarot (*reach-through type*). Die positive Hochspannung liegt an der N-Schicht an, so dass die elektrischen Feldlinien in Richtung der Anode weisen. Beim Einfall von Photonen werden in der π -Region Elektron-Loch-Paare generiert. Bei genügend starker Beschleunigung entstehen durch Stoßionisation weitere Paare. Die zugrunde liegende Abbildung stammt aus Ref. [Spr00a].

3.1.8 Optisches Filtersystem

Die rückgestreute Laserintensität wird durch den dichroitischen Strahlteiler nicht vollständig abgeschnitten (AHF z680rdc für $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 680$ bzw. z633rdc für $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 640$). Daher ist eine zusätzliche Filterung notwendig. Zu diesem Zweck steht ein Kantenfilter (AHF Langpass HQ695LP für $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 680$ bzw. HQ645LP für $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 640$ jeweils mit $OD = 6$) im Detektionskanal. Zur Aufnahme von Spektren mit der CCD-Kamera trennt der vorgeschaltete Spektrograph die Laserrückstreuung ohnehin von dem interessierenden Wellenlängenbereich der Fluoreszenz ab. Jedoch verhindert der Kantenfilter die Sättigung und starke Überstrahlung der betroffenen Pixel, die sich andernfalls über viele Pixel fortpflanzt und letztlich die Nutzbarkeit des gesamten CCD-Chips unterbindet. Im Gegensatz dazu zählt die Avalanche Photodiode (APD) die ankommenden Photonen ohne zu selektieren, so dass zwischen Laserrückstreuung und Fluoreszenzsignal nicht unterschieden werden kann. Demzufolge ist zur Lokalisierung der einzelnen Moleküle unerlässlich, dass Streulicht vom Laser möglichst vollständig abgeblockt wird. Hierfür befindet sich noch ein Kantenfilter (Alphafilter $OD = 4$) im Strahlengang vor der APD. Zur weiteren Kontraststeigerung kann noch ein dritter Kantenfilter (AHF Bandpass HQ750/100 $OD = 6$) hinzugefügt werden, um insbesondere zurückgestreute langwellige Lumineszenz der Laserdiode abzublocken. Beim Wechsel des Bereichs der Anregungswellenlänge wird auch der gesamte Filtersatz inklusive dem dichroitischen Strahlteiler gewechselt.

3.1.9 Lawinenphotodiode und Spektrometer mit CCD-Kamera

Zum Nachweis von Fluoreszenz-Photonen existiert eine ganze Reihe an verschiedenen Detektortypen. Hier wird kurz geschildert, welche Ansprüche an einen Detektor für ein Einzel-Molekül-Experiment gestellt werden. Des Weiteren wird ein knapper Einblick in das Funktionsprinzip der verwendeten Detektoren gewährt. Da einzelne, fluoreszierende Moleküle nur eine sehr begrenzte Anzahl an Photonen pro Sekunde emittieren können, ist eine hohe Quanteneffizienz des Detektors grundlegend erforderlich. Dazu ist ebenso

wichtig, dass er nur ein sehr geringes Dunkelrauschen aufweist. Generell kommen als Detektoren zwei verschiedene Systeme in Betracht: zum einen die *Photo Multiplier Tube* (PMT) und zum anderen die Lawinenphotodiode oder auch *Avalanche photodiode* (APD). Als Flächendetektor eignet sich ein *Charge Coupled Device* (CCD). Alle drei Detektoren können vom nahen Ultraviolett bis zum nahen Infrarot eingesetzt werden. Jedoch liegt die Quantenausbeute der PMT insbesondere im roten bis infraroten Spektralbereich nur bei ca. 20 %. Dafür besitzt die PMT ein äußerst geringes Dunkelrauschen und zudem eine sehr kurze Reaktionszeit, so dass sie im blauen Spektralbereich mit einer Quanteneffizienz von bis zu ca. 40 % durchaus zum Nachweis einzelner Moleküle bestens geeignet ist. Gleichwohl übertreffen die APD und auch die CCD im uns interessierenden, roten Spektralbereich die PMT deutlich in der Quantenausbeute bei ebenfalls adäquatem Dunkelrauschen. Daher werden in unserem Aufbau eine APD (PerkinElmer SPCM-AQR-15) und eine CCD (Princeton Instruments Spec10:100BR (*back-illuminated, deep depletion*)) als Nachweisinstrumente betrieben. Die Werte für die Quanteneffizienz betragen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 700$ nm bei der verwendeten APD ca. 65 % und bei der verwendeten CCD ca. 85 %. Zur Veranschaulichung der prinzipiellen Funktionsweise einer APD dient die Abbildung 3.7. Bei Lichteinfall werden Elektron-Loch-Paare erzeugt, vorausgesetzt, dass die eingestrahlte Energie ausreicht, damit die Bandlücke im Halbleiter überwunden werden kann. Diese beträgt bei Raumtemperatur bei Silizium 1,12 eV, so dass Licht mit geringerer Wellenlänge als $\lambda = 1100$ nm absorbiert wird. Über der Verarmungsschicht liegt eine Hochspannung in Sperrrichtung an. Demzufolge werden die Elektronen in Richtung der N-Schicht mit positivem Potential beschleunigt und die Löcher entgegengesetzt in Richtung der P-Schicht. Ab einer gewissen Feldstärke werden Kollisionen mit dem Kristallgitter immer wahrscheinlicher, so dass sich eine mittlere Driftgeschwindigkeit einstellt. Bei weiterem Anstieg der Feldstärke besitzen einige Ladungsträger, die noch nicht mit dem Gitter kollidiert sind, genügend hohe Energie, um über Stoßionisation weitere Elektron-Loch-Paare zu bilden. Diese wiederum bekommen teilweise ebenfalls eine ausreichend hohe Energie übertragen, so dass sie nicht rekombinieren können. Die Anzahl an Ladungsträgern im Leitungsband steigt somit exponentiell an. Der bei dieser Feldstärke auftretende Effekt wird Lawinen- oder *Avalanche*-Durchbruch genannt. Wie bei allen Verstärkungsprozessen entsteht auch beim *Avalanche*-Effekt ein Hintergrundrauschen. Der durch thermisches Rauschen fließende Dunkelstrom in Verbindung mit dem statistischen Schrotrauschen generiert in der Summe bei der verwendeten APD insgesamt ein Dunkelrauschen von weniger als 27 Zählereignissen pro Sekunde.

Im nun folgenden Abschnitt wird kurz auf die CCD-Kamera und den ihr vorgeschalteten Spektrograph eingegangen. Die ursprüngliche Idee bei der Entwicklung des ersten CCD in den späten 1960er Jahren war, eine neue Art von Speicherbaustein für Computer zu erhalten. Später erkannte man, dass er aufgrund seiner Fähigkeit Ladungen zu übertragen und seiner photoelektrischen Wechselwirkung mit Licht, eher für die Signalverarbeitung und Bildgebung geeignet ist. Ein CCD besteht aus einer dichten Matrix aus Photodioden, den so genannten Pixeln, die eine integrierte Schaltung bilden. Als Basismaterial dient Silizium. Bei Lichteinfall wird durch den inneren photoelektrischen Effekt die Pho-

3 Experiment

tonenenergie in elektrische Ladungstrennung umgewandelt. Dabei werden die Elektronen in einem Potentialwall, in einer tief im Silizium gelegenen Verarmungsschicht, gespeichert. Nach der Belichtung werden die Elektronen schrittweise über den Chip durch ein Register geschoben. Auf diese Weise erreicht ein Ladungspaket nach dem anderen den Ausleseverstärker und es entsteht aus dem ursprünglich parallel aufgenommenen Bild ein seriellles Ausgangssignal. Die ausgegebene Spannung ist proportional zur eingefangenen Lichtmenge des jeweiligen Pixels. Die in unserem Aufbau verwendete CCD-Kamera weist gegenüber einer herkömmlichen CCD-Kamera allerdings einige Besonderheiten auf. Zum einen wird der CCD-Chip mit flüssigem Stickstoff gekühlt, wobei die Chip-Temperatur durch Gegenheizen auf ca. -120°C gehalten wird. Dadurch wird das Dunkelrauschen minimiert. Zum anderen wird der Chip von der äußerst lichtempfindlichen Rückseite her beleuchtet, wodurch eine insgesamt deutlich gesteigerte Quanteneffizienz erreicht wird, wobei sich der Effekt insbesondere im blauen Spektralbereich stark auswirkt. Zusätzlich dazu besitzt der Chip eine besonders tiefe Verarmungsschicht, so dass sich in der Kombination die Quantenausbeute auch in dem uns interessierenden, roten Spektralbereich drastisch erhöht. Die nutzbare Fläche des CCD-Chips beinhaltet 1340×100 Pixel. In Verbindung mit der selbst geschriebenen Steuerungssoftware liegt der Wert der typischen Auslesezeit für die durchgeführten Messungen zwischen $0,1 - 0,2$ s. Demzufolge beträgt z.B. die Messzeit einer Sequenz aus 100 Spektren mit je 1 s Akkumulationszeit ca. 112 s. Die gesamte CCD-Kamera mit ihrem Stickstofftank ist fest an einen Gitterspektrographen (Princeton Instruments Acton300i) montiert. In diesem befindet sich ein Drehkreuz für bis zu drei Gitter, deren Ausleuchtung über zwei große Parabolspiegel bewerkstelligt wird. Die Brennweite beträgt 300 mm. In unserem Spektrometer werden bislang zwei verschiedene Gitter verwendet: eins mit 300 Linien/mm und eins mit 1200 Linien/mm, beide mit einer *blaze*-Wellenlänge² von 750 nm. Die *blaze*-Wellenlänge ist so gewählt, dass der Reflexionsgrad dieser Gitter auf den uns interessierenden Spektralbereich optimiert ist, so dass die aufgenommenen Spektren so wenig wie möglich verfälscht sind. Beim 300er-Gitter reicht der Wert der Reflektivität für s-polarisiertes Licht von 92 % bei 700 nm bis 86 % bei 800 nm und für p-polarisiertes Licht von 83 % bei 700 nm bis 75 % bei 800 nm. Bei Verwendung dieses Gitters entspricht ein CCD-Pixel 0,206 nm. Das 1200er-Gitter besitzt für Licht beider Polarisationsrichtungen bei 700 nm eine Reflektivität von ca. 80 %. Zu größeren Wellenlängen hin driften die beiden Werte jedoch etwas auseinander. Die Auflösung beträgt mit diesem Gitter 0,041 nm pro Pixel. Vor dem Eintrittsspalt des Spektrographen ist eine Linse positioniert. Bei optimaler Justage wird die Fluoreszenz der Probe, die die Lochblende passiert, genau so auf den Eintrittsspalt fokussiert, dass bei der Gitterstellung der nullten Ordnung weniger als 5×5 Pixel belichtet werden. Der Großteil des Lichts verteilt sich dabei auf eine Fläche, die kleiner als 3×3 Pixel ist.

²Die Gitter-Rillen eines *blaze*-Gitters bilden eine Stufenstruktur. Der *blaze*-Winkel ist der Winkel zwischen der Gitternormalen und der Stufennormalen. Durch die Form der Gitterelemente ist das Gitter auf die Beugung einer bestimmten Kombination von Wellenlänge (*blaze*-Wellenlänge) und Beugungsordnung optimiert.

3.1.10 Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz der Apparatur hängt von sehr vielen Faktoren ab und kann nicht präzise berechnet werden. Für den Fall einer isotrop emittierenden Punktlichtquelle kann sie zumindest abgeschätzt werden. Einen erheblichen Einfluss nimmt die numerische Apertur des Objektivs. Bei einem Wert von $NA = 0,85$ und dem zugehörigen Öffnungswinkel von ca. 60° entspricht die Lichtausbeute S_{Obj} auf den vollen Raumwinkel bezogen ca. 25 %. Ferner führen sämtliche optische Komponenten zu weiteren Verlusten der Fluoreszenz. Das Tieftemperatur-Objektiv lässt ca. $T_{\text{Obj}} \simeq 65\%$ des Fluoreszenzlichts im Spektralbereich von 700 – 750 nm durch. Der dichroitische Strahlteiler sowie der Kantenfilter im Strahlengang vor dem Spektrometer transmittieren ca. $T_{\text{Dichro}} \simeq T_{\text{Filt}} \simeq 95\%$. Alle Glasflächen im Strahlengang weisen eine spezielle Antireflexions-Beschichtung (Linos NIR ARB2) für nahes Infrarot auf. Daher werden pro Fläche nur maximal 0,5 % des Signals reflektiert, d.h. bei den beschichteten Linsen liegt der Transmissionswert bei mindestens $T_{\text{Linse}} \geq 99\%$ bzw. $T_{\text{Tele}} \geq 98\%$ und bei den beschichteten Quarzglasfenstern des Kryostaten bei $T_{\text{Kryo}} \geq 98\%$. Demgegenüber reflektieren die verwendeten Silberspiegel in dem Spektralbereich alle um die $\sim 98\%$, d.h. $R_{\text{Kryo}} \simeq 98\%$ und $R_{\text{Scan}} \simeq 96\%$. Schließlich lässt die Lochblende von dem Beugungsmuster nur die Airy-Scheibe passieren, die ca. $T_{\text{Pin}} \simeq 80\%$ der Intensität beinhaltet. Die Quanteneffizienz der CCD-Kamera liegt bei $QE_{\text{CCD}} \simeq 85\%$, wobei noch der Reflexionsgrad $T_{\text{Spektr}}_{\text{Spektro}}$ des Spektrographen von 80 – 92 % je nach Gitterauswahl berücksichtigt werden muss. Insgesamt ergibt sich daraus theoretisch für die Detektionseffizienz des konfokalen Mikroskops bei tiefer Temperatur als Abschätzung

$$\begin{aligned}
 DE_{\text{gesamt}} &\simeq S_{\text{Obj}} \cdot T_{\text{Obj}} \cdot R_{\text{Kryo}} \cdot T_{\text{Kryo}} \cdot T_{\text{Tele}} \cdot R_{\text{Scan}} \cdot T_{\text{Dichro}} \\
 &\quad \cdot T_{\text{Linse}} \cdot T_{\text{Pin}} \cdot T_{\text{Linse}} \cdot T_{\text{Filt}} \cdot T_{\text{Linse}} \cdot R_{\text{Spektr}}_{\text{Spektro}} \cdot QE_{\text{CCD}} \\
 &\simeq 0,25 \cdot 0,65 \cdot 0,98 \cdot 0,98 \cdot 0,98 \cdot 0,96 \cdot 0,95 \\
 &\quad \cdot 0,99 \cdot 0,80 \cdot 0,99 \cdot 0,95 \cdot 0,99 \cdot 0,80 \cdot 0,85 \\
 &\simeq 0,07.
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Die Abstrahlcharakteristik eines Dipols ist jedoch in der Regel anisotrop. Demzufolge beeinflusst seine Orientierung stark, wie viel des emittierten Lichts vom Objektiv eingesammelt wird. Darüber hinaus kann sich auch die Umgebung auf die Abstrahlcharakteristik des Dipols auswirken. Die Ausbreitung in Richtung optischer Medien mit höherem Brechungsindex ist begünstigt. So beträgt z.B. der Anteil der abgestrahlten Leistung bei einer Immobilisierung des emittierenden Moleküls auf Quarzglas ca. 70 % [Luk79]. In unserem Fall wird die Quanteneffizienz durch diesen Effekt gesteigert. Die reale Quanteneffizienz kann jedoch auch durch Faktoren, wie z.B. Staub auf den optischen Komponenten, verringert werden. Daher wird als vernünftige Abschätzung der experimentellen Quanteneffizienz ein Wert von $DE_{\text{gesamt}} \simeq 5\%$ angenommen.

3.1.11 Computergestützte Datenakquisition

Der gesamte Messvorgang wird von einem Linux-Rechner aus gesteuert. Die verwendete Software besteht aus einem auf C basierenden Interpreter (FSC2) [Tör07], in den die Treiber der einzelnen Komponenten implementiert sind. Die Programme zur Bedienung des gesamten Experiments und zur Datenakquisition wurden von mir erstellt. Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, werden die Galvano-Spiegeldreher über eine Digital-Analog-Wandler-Karte (Meilhaus ME-6000) angesteuert. Dieselbe Karte kontrolliert außerdem den klappbaren Spiegel vor der APD und die Frequenzverstimmung der verwendeten Laser, sowie die Fahrimpulse für die Dreheinrichtung, von der ein Polarisator vor dem Schlitz des Spektrographen gedreht werden kann. Die TTL-Zählimpulse der APD werden von einer *Counter*-Karte (National Instruments 6601 GPCT) gezählt. Zur Datenübertragung von Spektren besitzt die CCD-Kamera ein eigenes Steuergerät, das mit einer zugehörigen Karte im Rechner verbunden ist.

3.2 Präparation der Proben

3.2.1 Einführung

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden einzelne Moleküle dadurch selektiert, dass sie mit Hilfe des aufgebauten konfokalen Mikroskops räumlich von einander getrennt detektiert wurden. Hierfür ist eine sehr starke Verdünnung der Probe notwendig. Gemäß der Auflösung der Apparatur, die im Abschnitt 2.3.3 ausführlich behandelt wird, ist ein Mindestabstand der einzelnen Moleküle von 10 – 20 μm erforderlich, damit die Detektion von immer nur einem Molekül zur Zeit sichergestellt ist. Zur Realisierung des Experiments muss die Probenebene optisch zugänglich im konfokalen Volumen positioniert werden. Dazu wurden verschiedene Verfahren und zugehörige Probenhalter entwickelt. In den folgenden Abschnitten werden Details über die Auswahl an PS I-Proben und die verschiedenen Präparationsprozeduren mit den dafür eigens konstruierten Probenhaltern ausgeführt.

3.2.2 Photosystem I-Proben

Zur Untersuchung standen PS I-Komplexe verschiedener Cyanobakterien zur Verfügung. Eine wichtige Quelle stellt die thermophile Spezies *T. elongatus* dar. Die Isolierung von stabilen PS I-Komplexen dieser Spezies wurde mit Hilfe von stereochemisch reiner β -Dodecylmaltoside in der Arbeitsgruppe von Eberhard Schlodder durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung dieser Präparation liefert Ref. [Fro98]. Das Verfahren bringt isolierte PS I-Partikel von sowohl trimerer Form als auch eine kleine Fraktion Monomere hervor, die ebenfalls untersucht wurden. Des Weiteren wurden ebenfalls von Eberhard

Schlodder PS I-Trimere der mesophilen Spezies *Synechocystis* sp. PCC 6803 bezogen. Das PS I dieses Organismus ist mit dem von *T. elongatus* hochgradig sequenzhomolog [Nak02]. PS I-Komplexe einer dritten, weniger bekannten Spezies, *Synechococcus* sp. PCC 7002, stammen aus der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von John Golbeck. Hier lag ein beinahe kompletter Satz von Mutanten vor, bei denen jeweils eine Proteinuntereinheit fehlte. Im Bestand befanden sich PS I-PsaC, -PsaE, -PsaF, -PsaI, -PsaJ, -PsaK, -PsaL und -PsaM. Die typische Chlorophyll a-Konzentration der Stammlösungen lag im millimolaren Bereich.

3.2.3 Lösungsmittel zur Verdünnung der Probe

Um einzelne Moleküle selektieren zu können, ist eine starke Verdünnung der Proben-Stammlösung erforderlich, wie bereits einleitend erwähnt. Die Standard-Lösung dafür enthielt Tricine (20 mM) als Puffersubstanz, wobei ein pH-Wert von 7,5 eingestellt wurde. Zudem benötigen Proteine eine gewisse Ionenstärke, um nicht zu aggregieren. Dem Puffer wurde Magnesiumdichlorid (25 mM) als Salz hinzugefügt. Eine ebenfalls sehr wichtige Komponente für die Stabilität und Isolierung der einzelnen PS I-Komplexe ist ihre Detergenzhülle [Muh05]. Hierfür wurde das Detergenz n-Dodecyl- β -D-Maltoside (0,4 mM) beigefügt. Außerdem enthielt der Puffer noch Natrium-Ascorbat zur Vorreduktion von P700. Die Verdünnung der millimolaren PS I-Stammlösung erfolgte in mehreren Stufen und führte zu einer Endkonzentration im Bereich von 20 pM PS I (in monomerer Form). Zur Präparation von teildeutierten Proben wurde jeder einzelne Verdünnungsschritt mit einem Puffer ausgeführt, in dem statt Wasser schweres Wasser verwendet wurde. Die Probe wurde für ca. 15 Minuten inkubiert. Bei bestimmten Proben wurde je nach gewünschter Konsistenz der Lösung im letzten Schritt alternativ Polyvinylalkohol (1 % (w/v)), Glycerin (60 % (v/v)) oder Gelatine (6 – 7 % (w/v)) dem Puffer beigemischt. Über die verschiedenen Anordnungen der Probe wird im folgenden Abschnitt berichtet.

3.2.4 Anordnung der Probe

Die Standard-Methode der Probenpräparation besteht darin, eine geringe Menge Probe ($< 1 \mu\text{l}$) zwischen zwei Deckgläschen zu platzieren. Dafür wurden runde Gläschen mit einem Durchmesser von $\varnothing = 5 \text{ mm}$ und einer Dicke $< 0,2 \text{ mm}$ verwendet. Gewöhnliches Schichtsilikatglas erwies sich insbesondere für Messungen bei tiefer Temperatur aufgrund starker Streueffekte als ungeeignet. Daher wurden spezielle Gläschen aus Suprasil-Quarzglas [Min06] angefertigt. Auf der linken Seite der Abbildung 3.8 ist der Probenhalter abgebildet, der zur Aufnahme der Gläschen dient. Dieser Probenhalter kann darüber hinaus auch in einen eigens dafür gebauten Rotationsbeschichter (*spin coater*) geschraubt werden. Bei einer Probe mit einem Anteil von 1 % Polyvinylalkohol können auf diese Weise dünne Filme produziert werden. Direkt nach Auftragung der Probe wurde der

3 Experiment



Abbildung 3.8: Photographische Darstellung zweier verwendeter Probenhalter. **Links oben:** Standard-Probenhalter für Dünnschichtproben zwischen zwei Deckgläschen. Das untere Gläschen wird mit Vakuum-Silikonfett befestigt, während das obere von der Probenflüssigkeit selbst gehalten wird. Bei einer mittels Rotationsbeschichter hergestellten Filmprobe befindet sich diese auf der Oberseite und wird nicht durch ein zweites Deckgläschen abgedeckt. **Rechts oben:** Probenhalter zum Gelpressen in vertikaler Richtung. Bei aufgeschraubtem Deckel wird das Gel zwischen zwei Deckgläschen von einem Vierkant von unten her aufeinandergepresst. Man beachte die Luftauslässe am Deckel. Der zweite Deckel mit seinen beiden Presswerkzeugen wird auf einen hier nicht abgebildeten Probenhalter geschraubt. Die beiden Presswerkzeuge werden zwischen zwei Deckgläschen mit dem Gel in ihrer Mitte mit Hilfe einer M1-Madenschraube von der Seite her aufeinandergedrückt, so dass das eingeschlossene Gel horizontal gequetscht wird. Auch hier sind Luftauslässe erforderlich.

Probenstab in den auf tiefe Temperaturen vorgekühlten Kryostaten eingeführt. Bei diesem Prozess wird die Probe schockgefroren.

Bei einer weiteren Art der Präparation wird die Probe in einem gepressten Gel teilorientiert. Dazu wurden spezielle Titanprobenhalter konstruiert und gefertigt, die ebenfalls in der Abbildung 3.8 zu sehen sind. Die umfangreichen Messungen an teilorientierten PS I-Proben und deren Auswertungen werden in dieser Schrift nur kurz im Ausblick erwähnt, da ihre Berücksichtigung den Gesamtumfang der Arbeit zu sehr strecken würden.

3.3 Messbedingungen

Zur Spektroskopie einzelner Moleküle wird zunächst ein Rasterbild der Probe erstellt, um die Moleküle zu lokalisieren. Dann kann ein beliebiges Molekül selektiert werden, um seine Fluoreszenz gezielt zu untersuchen. In diesem Abschnitt wird kurz auf einige Details des Experiments eingegangen.

3.3.1 Experimentelle Auflösung bei tiefer Temperatur

Die präzise Abrasterung der Probe mittels Spiegeldreher erfolgt in lateraler Richtung. In axialer Richtung kann die Probenschicht mit der im Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Motorsteuerung schrittweise durch das konfokale Volumen bewegt werden. Aufgrund des Unterdrucks im Kryostaten und den Dichtungen am Probenstab treten jedoch zu große Kräfte auf, um mit der Motorvorrichtung präzise in axialer Richtung zu rastern, so dass die axiale Auflösung experimentell nicht bestimmt wurde. Folglich wird hier nur die laterale Auflösung der Apparatur ermittelt. Auf der linken Seite der Abbildung 3.9 ist dafür

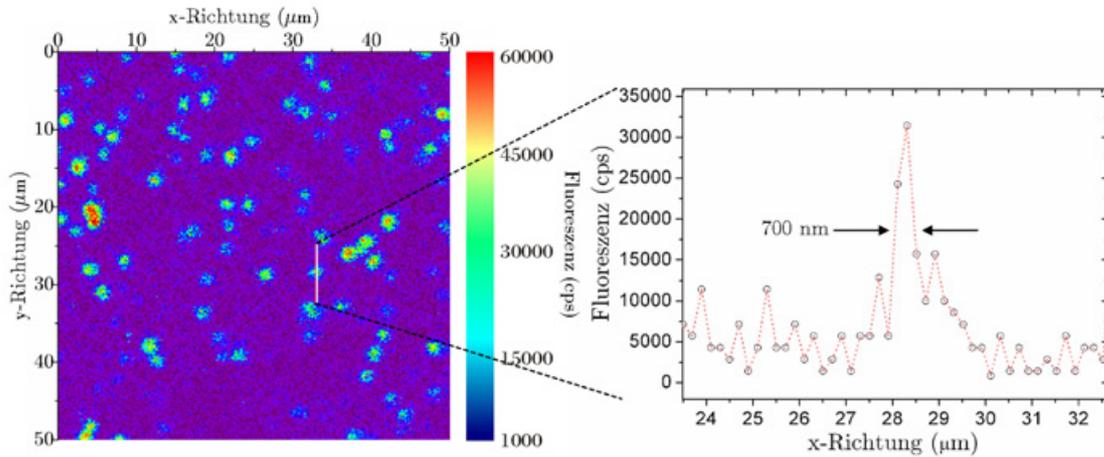


Abbildung 3.9: Links: Digitales Rasterbild einzelner PS I-Trimere des Cyanobakteriums *Synechocystis*. Die Punkte hoher Intensität markieren die Positionen der Moleküle. Rechts: Profil des links eingezeichneten Schnitts entlang der y-Richtung. Anhand der Abbildungsgröße eines um Größenordnungen in der Ausdehnung geringeren Emitters als das Beugungslimit kann die Auflösung abgeschätzt werden. Das verhältnismäßig schwache Signal-zu-Rausch-Verhältnis entsteht durch die schnelle Rastergeschwindigkeit von 0,9 s pro Pixel.

ein Rasterbild einer hochverdünnten PS I-Probe vom Cyanobakterium *Synechocystis* dargestellt. Die Größe der abgerasterten Fläche beträgt $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ mit einer Auflösung von 150 Rasterschritten in beiden Richtungen. Jeder Punkt hoher Intensität zeigt die Position eines PS I-Partikels an. Dabei ist anzumerken, dass selbst wenn es sich bei dem Partikel um ein Aggregat handeln sollte, seine räumliche Ausdehnung dennoch Größenordnungen von der theoretisch erreichbaren Auflösung entfernt liegt und daher seine Emissionen für die Bestimmung der Auflösung geeignet sind. Im rechten Bild ist der links eingezeichnete Schnitt in y-Richtung durch einen Punkt dargestellt. Dem Profil wird eine Auflösung von $\Delta x_{\text{exp}} \simeq 700 \text{ nm}$ (FWHM) entnommen. Diese laterale Punkt-Dimension erscheint im Vergleich zur Abschätzung der theoretisch möglichen Auflösung von $\Delta x_{\text{theo}} \simeq 300 \text{ nm}$ für eine Wellenlänge von $\lambda = 700 \text{ nm}$ (gemäß Gl. (2.39)) vernünftig, insbesondere unter Berücksichtigung der zusätzlichen Abbildungsfehler des Objektivs bei tiefen Temperaturen. Δx_{exp} hängt von der Fluoreszenzintensität ab. Diese Abhängigkeit fällt jedoch bei den im SMS-Experiment aufgetretenen Intensitäten nicht ins Gewicht. Das verhältnismäßig schwache Signal-zu-Rausch-Verhältnis beruht auf einer schnellen Rastergeschwindigkeit von 0,9 s pro Pixel. Die Wahl einer so kurzen Zeitspanne ist sinnvoll, damit zum einen so wenig Messzeit wie möglich auf die Lokalisierung der Moleküle verwendet wird und zum anderen damit die Lichtbelastung der Probe so gering wie möglich gehalten wird, um vorzeitigem Photobleichen vorzubeugen.

3 Experiment

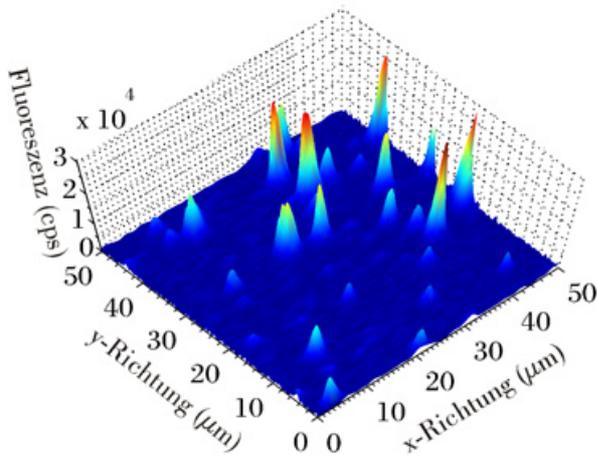


Abbildung 3.10: Digitales Rasterbild. Die Aufnahme zeigt die Fluoreszenzintensität eines $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ großen Ausschnitts von einer dünnen Probenschicht, die einzelne PS I-Trimere vom Cyanobakterium *T. elongatus* enthält. Die Auflösung beträgt 150×150 Pixel bei einer Akkumulationszeit von 0,9 s pro Pixel. Jedes Maximum markiert die Position eines individuellen PS I-Komplexes. Die Probenkonzentration lag bei ca. 20 pM PS I und die Schichtdicke des Anregungsvolumens wird auf $\sim 4 \mu\text{m}$ abgeschätzt.

3.3.2 Nachweis für die Detektion einzelner Moleküle

Als Voraussetzung für weitere Untersuchungen ist wichtig, dass die Punkte hoher Intensität von einzelnen Molekülen stammen und nicht alternativ von Molekülclustern. In Abbildung 3.10 wird ein Rasterbild einer Probe vom PS I der Spezies *T. elongatus* gezeigt. Die PS I-Konzentration liegt gemäß der Anleitung aus Abschnitt 3.2.3 bei ca. $20/3 \text{ pM}^3$ PS I (in trimerer Form). Die abgerasterte Fläche umfasst $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ und die Schichtdicke des Anregungsvolumens wird gemäß Gl. 2.41 auf grob $4 \mu\text{m}$ abgeschätzt, was einem Detektionsvolumen von $10^4 \mu\text{m}^3$ entspricht. Das Produkt aus Probenkonzentration und abgerastertem Volumen beträgt demnach $\sim 0,4 \cdot 10^{25} \cdot 10^{-12} \text{ l}^{-1} \cdot 10^{-11} \text{ l} = 40$. Die Anzahl der sichtbaren Punkte hoher Intensität in Abbildung 3.10 liegt bei ca. 30 – 40. Diese qualitative Korrespondenz spricht für die Detektion einzelner PS I-Komplexe.

3.3.3 Verwendete Anregungsleistung

Die übliche Anregungsleistung zur Beleuchtung von PS I-Komplexen in trimerer Form betrug vor dem telezentrischen System ca. $100 \mu\text{W}$. Daraus resultiert im Tieftemperatur-Aufbau eine Anregungsintensität von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ im Fokuspunkt, was bei $\lambda = 680 \text{ nm}$ als Anregungswellenlänge $1,0 \cdot 10^{22}$ Photonen $(\text{cm}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ entspricht. Dabei wurde die Verlustrate an den optischen Elementen bis zur Probenebene berücksichtigt (s. Abschnitt 3.1.10) und ein Fokusedurchmesser von $1,5 \mu\text{m}$ angenommen. Um der Frage nachzugehen, wie viele Photonen unter diesen Bedingungen ein einzelner PS I-Komplex absorbiert, werden im Folgenden zwei verschiedene Abschätzungen gegeben: 1. über die Anregungsleistung und den Wirkungsquerschnitt und 2. über die detektierte Zählrate der Fluoreszenz.

³Es sei darauf hingewiesen, dass bei der Probe aus Abbildung 3.9 eine höhere Konzentration verwendet wurde.

1. Der Wirkungsquerschnitt für das PS I-200⁴ bei Soret-Anregung (436 nm) wurde auf 668 \AA^2 bestimmt [Zip91]. Wie im Abschnitt 1.2.1 erwähnt wurde, liegt das PS I von höheren Pflanzen im Gegensatz zum PS I von Cyanobakterien in monomere Form vor. Allgemein ist der Wirkungsquerschnitt proportional zur Absorption. Im Vergleich zur Soret-Bande absorbiert PS I im Bereich der Q_x - und Q_y -Bande schwächer. Zudem enthält ein cyanobakterieller PS I-Monomer nur ca. halb so viele Chlorophyll-Moleküle wie ein PS I-200-Partikel. Daraus wird die obere Grenze des Wirkungsquerschnitts eines cyanobakteriellen PS I-Monomers bei $\lambda \simeq 680 \text{ nm}$ grob auf $\sim 3 \text{ nm}^2$ abgeschätzt. Folglich ergibt sich ein Photonenfluss von $\sim 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, der von einem einzelnen Monomer absorbiert wird. Für die Energie-Äquilibration von den Antennenpigmenten bis zu den roten Chlorophyllen benötigt das PS I von *Synechocystis* 2 – 5 ps [Has94, Has95, Tur96, Mel00, Sav00]⁵ und das PS I von *T. elongatus* 8-15 ps [Tur93, Byr00], d.h. der Energietransfer bis zu den roten Zuständen erfolgt ca. 100 mal schneller als die Fluoreszenzlebensdauer eines Chl a ($\sim 1,5 \text{ ns}$) [Byr00]. Bei der Annahme, dass sieben Chl a-Moleküle zu den roten Zuständen beitragen [Zaz02b], und unter Berücksichtigung, dass ca. 50 % der Anregungsenergie bei 5 K die roten Zustände erreichen [Pål98, Gob01a], liegt die Anregungsrate der roten Chlorophylle bei $k_{\text{Anreg}} \simeq 2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ pro Chl a. Für den Fall, dass nur ein einziges Chl a die gesamte Anregung erhält, liegt der Wert bei $k_{\text{Anreg}} \simeq 1,4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$.
2. Bei PS I-Trimeren und obiger Anregungsleistung wurden im Mittel ca. $7,5 \cdot 10^4$ Photonen pro Sekunde⁶ beobachtet. Unter der Annahme einer Detektionseffizienz von 5 % beträgt die reale Emissionsrate $1,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, was einer mittleren Zeit von $\tau_{\text{Emiss}} \simeq 6,7 \cdot 10^{-7} \text{ s}$ zwischen zwei Fluoreszenzphotonen entspricht. Entnimmt man nun Ref. [Pål98] für die Zerfallsrate des angeregten Zustands durch die photochemische Falle $k_p \simeq (30 \text{ ps})^{-1}$ und für die Rate aller Verluste $k_v \simeq (2 \text{ ns})^{-1}$, woraus eine Quantenausbeute der Ladungstrennung von 98,5 % folgt, dann erhält man als obere Grenze der Fluoreszenzquantenausbeute bei Raumtemperatur $\Phi_{\text{RT}} \leq 1,5 \text{ \%}$. Die Größe der Verluste durch strahlungslose Kanäle ist unbekannt. Für die weitere Betrachtung wird ein Anteil von 50 % angenommen. Bei 5 K wurde experimentell eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{TT} um Faktor 20 für PS I mit offenem Reaktionszentrum (RC) und um Faktor zehn für PS I mit geschlossenem RC⁷ ermittelt [Byr00]. In unserem Fall liegt die Anregungsrate viel höher als die Rekombinationsrate des Phylloquinon-Akzeptors A_1^- . Demzufolge hält sich das Elektron die meiste Zeit beim Akzeptor A_1 auf, d.h. wir haben geschlossenes PS I gemessen. Daraus kann grob ein Wert von $\Phi_{\text{TT}} \simeq 8 \text{ \%}$ abgeschätzt werden, und man erhält für

⁴Präparation, bei der PS I mittels Detergenz isoliert wurde (gemäß Ref. [Mul80]) und ca. 200 Chl a+b/P700 enthält.

⁵Bei tiefer Temperatur (77 K) wurden geringfügig längere Zeiten ermittelt [Mel01b].

⁶Entspricht der über ein Spektrum ($t = 1 \text{ s}$) integrierten Intensität vom PS I von *T. elongatus* in trimerer Form

⁷Das RC wird bei reduziertem primären Donator (P700) als offen bezeichnet und bei oxidiertem (P700⁺) als geschlossen.

3 Experiment

die Anregungsrate unter Berücksichtigung, dass ca. 80 % der Fluoreszenz bei 5 K von den roten Chlorophyllen emittiert wird [Pål98], $\sim 2,3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, was unter der Annahme der Beteiligung von sieben roten Chlorophyllen zu einer Anregungsrate von $k_{\text{Anreg}} \simeq 3,4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ pro Chl a führt.

Beide Abschätzungen führen zu dem Ergebnis, dass die Anregungsrate k_{Anreg} mindestens eine Größenordnung von der reziproken Fluoreszenzlebensdauer von Chl a entfernt liegt. Daher sind Doppelanregungen sehr unwahrscheinlich. Die Diskrepanz zwischen den beiden abgeschätzten Werten für k_{Anreg} von ca. einem Faktor sechs wird auf die ungenaue Abschätzung von unbekanntem Größen zurückgeführt, wie z.B. der Verlustrate durch strahlungslose Kanäle bei der Abschätzung der Fluoreszenzquantenausbeute.

3.3.4 Hintergrundsignal bei der Aufnahme eines Spektrums

Das mittlere Hintergrundsignal, das von dem CCD-Chip im Spektralbereich zwischen 700 – 800 nm aus dem konfokalen Volumen im Tieftemperatur-Aufbau detektiert wurde, lag bei einer Standard-Messung⁸ bei ca. 0,8 cps pro vertikal zusammengefasster Pixel⁹. In vertikaler Richtung wurden 21 Pixel vom Chip verwendet, die zu drei sogenannten Superpixeln zusammengefasst wurden, was einem *binning* von sieben Pixeln entspricht. Obiger Wert bezieht sich auf diese Einstellungen. In horizontaler Richtung wurde der gesamte Chip ohne *binning* genutzt. Bei Messungen mit Polarisator muss beachtet werden, dass $\sim 50 \%$ weniger Intensität beim Chip ankommt und üblicherweise 3 s pro Spektrum akkumuliert wurde, d.h. das Hintergrundsignal lag in dem Fall bei ca. 1,2 Zählereignissen pro Spektrum pro Pixel. Das Hintergrundsignal hängt empfindlich von der Art der Probe ab, d.h. z.B. die Zugabe von Glycerin zum Lösungsmittel erhöht das Hintergrundsignal.

Bei ausgeschaltetem Laser beträgt der Dunkelstrom der Kamera typischerweise 1 Elektron/Pixel/s. Bei einer Akkumulationszeit von 1 s liegt das gemessene Gesamttrauschen pro oben genanntem Superpixel bei ca. 3 – 4 Zählereignissen. Nach den Herstellerangaben ergeben unsere typischen Messeinstellungen ein Ausleserauschen von 3 Elektronen/Pixel/s und ein Dunkelrauschen von 0,04 Elektronen/Pixel/s. Die in dieser Arbeit dargestellten Spektren wurden sowohl auf den Dunkelstrom der Kamera als auch auf das Hintergrundsignal der Probe sowie auf den von Hardware und Software gesetzten Ausgleich korrigiert, d.h. bei Spektren mit absoluten Zahlenangaben auf der Intensitätsachse wurde die Null auf das Hintergrundsignal der Probe unter Berücksichtigung des genannten Gesamtausgleichs gelegt.

⁸Beinhaltet: Anregung bei 680 nm mit $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ im Fokuspunkt, wässrige Probe zwischen zwei Deckgläschen aus Suprasil-Quarzglas

⁹Eine vertikale Reihe von Pixeln verläuft senkrecht zur Richtung der spektralen Aufspaltung des Spektrographen.

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

4.1 Einleitung

Viele Details der im PS I enthaltenen roten Chlorophylle sind noch immer ungeklärt. Aus den Ergebnissen der konventionellen Ensemble-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse, von denen einige wichtige im Abschnitt 1.3 genannt wurden, besteht in der Literatur keine Einigkeit darüber, wie viele Chlorophylle oder Chlorophyll-Verbände zu den roten Zuständen gehören und welche spektralen Beiträge sie im Einzelnen liefern. Günstigerweise wird die Fluoreszenzquantenausbeute der roten Chlorophylle bei kryogener Temperatur stark angehoben [Pål98], wodurch die Einzelmolekül-Spektroskopie Zugang zum System findet [Jel00]. Als erstes werden in diesem Kapitel allgemeine spektrale Eigenschaften in der Fluoreszenz einzelner PS I-Komplexe dreier verschiedener Cyanobakterien, *T. elongatus*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7002, vorgestellt und miteinander verglichen. Anschließend wird untersucht, ob die spektrale Struktur der beobachteten Fluoreszenzbanden zeitabhängig ist. Ferner wurde die Fluoreszenz individueller PS I-Komplexe hinsichtlich ihrer Polarisierung analysiert, mit der Hoffnung, verschiedene Emissionsbanden voneinander unterscheiden zu können und so die Anzahl der roten Zustände bestimmen zu können. Zum Schluss wird geprüft, in wie weit die Summe über mehrere Einzelmolekül-Spektren die entsprechenden Ensemble-Spektren aus der Literatur erzeugen kann.

4.2 Stationäre Fluoreszenzspektren individueller PS I-Trimere

Zunächst werden stationäre Fluoreszenzspektren individueller cyanobakterieller PS I-Trimere der drei Spezies *T. elongatus*, *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002 diskutiert. Die gewählten Akkumulationszeiten bewegen sich auf der Minutenskala. In der Regel zeigt sich im am weitesten rotverschobenen Spektralbereich eine breite Bande und im Bereich zwischen dem Maximum dieser Bande und dem Bereich um 700 nm Linien.

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

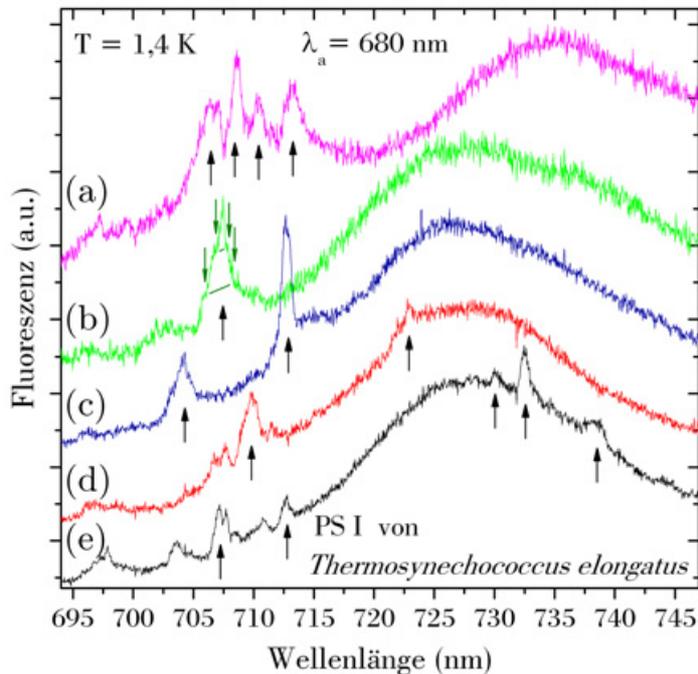


Abbildung 4.1: Einzelmolekül-Spektren individueller PS I-Trimere von *T. elongatus* in der Emission bei tiefer Temperatur. Die Messzeit beträgt jeweils 200 s, außer beim Spektrum (e); seine Messdauer beträgt 400 s. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

4.2.1 Individuelle PS I-Trimere von *T. elongatus*

Die Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch fünf Einzelmolekül-Spektren (a) – (e) individueller PS I-Komplexe des Cyanobakteriums *T. elongatus*. Als Lösungsmittelansatz diente die für PS I üblicherweise verwendete Puffer-Zusammensetzung, wie sie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben wurde. Die Einzelmolekül-Probe wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ angeregt. Wie sich diese Leistungsdichte im einzelnen PS I-Komplex auswirkt, wird gesondert im Abschnitt 3.3.3 behandelt. Die Aufnahmezeit für die Spektren (a)-(d) beträgt 200 s und die von Spektrum (e) 400 s. Um die Spektren besser vergleichen zu können, sind sie auf die gleiche Größe skaliert. Zwischen den Emissionsspektren der einzelnen Komplexe herrscht starke Heterogenität. Dennoch verbinden die Fluoreszenzspektren aller untersuchten PS I-Komplexe der Spezies *T. elongatus* gewisse Grundmerkmale, die im Folgenden charakterisiert werden: Innerhalb des spektralen Bereichs von $\lambda = 695$ nm bis ca. $\lambda = 713$ nm emittiert jedes einzelne PS I-Trimer mindestens an einer individuellen Position eine Linie. Ihre Proportionen können von Fall zu Fall variieren, d.h. teils ist die spektrale Struktur insgesamt relativ schmalbandig, wie z.B. im Spektrum (c) die Linie bei ca. $\lambda = 713$ nm mit einer Breite von ca. $\Delta\lambda = 1$ nm (FWHM) und teils scheint die Form aus verschiedenartigen Elementen zusammengesetzt, wie z.B. im Spektrum (b) die Linie bei ca. $\lambda = 707,5$ nm, in der mehrere Schultern erkennbar sind. Sie sind jeweils durch die grünen Pfeile und Linien angedeutet, wobei alle drei Teile verschiedene Linienbreiten aufweisen. Ferner weisen alle Spektren eine breite, asymmetrische Bande auf. Das Maximum dieser Bande liegt beim größten Teil der untersuchten PS I-Komplexe dieser Spezies im spektralen Bereich von

4.2 Stationäre Fluoreszenzspektren individueller PS I-Trimere

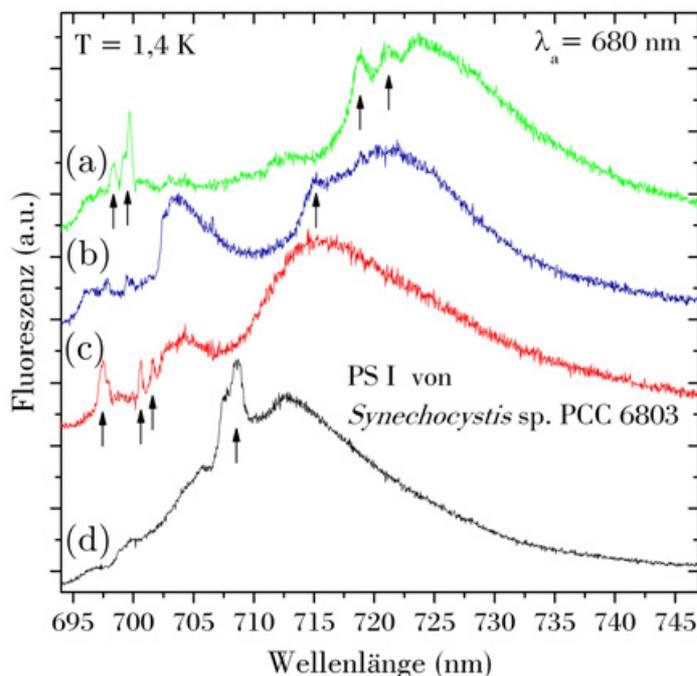


Abbildung 4.2: Einzelmolekül-Spektren individueller PS I-Trimere von *Synechocystis* in der Emission bei tiefer Temperatur. Die Messzeit beträgt jeweils länger als 150 s. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

$\lambda = 727$ nm bis $\lambda = 729$ nm, wie bei den hier gezeigten Spektren (b) – (e). Das Spektrum (a) belegt, dass die breite Bande ihr Maximum auch außerhalb dieser 2 nm haben kann. Dieses Verhalten wird jedoch nur von einer Minderheit gezeigt. Die mittlere Position liegt bei Miteinbeziehen aller untersuchten PS I-Komplexe von *T. elongatus* bei $\lambda_M = (727 \pm 1)$ nm. Üblicherweise besitzt die Bande eine so große Ausdehnung, dass der untere Teil der niederenergetischen Flanke die Linien im Bereich < 713 nm überschneidet. In der spektralen Region von $\lambda = 713$ nm bis ca. $\lambda = 720$ nm tritt nur in einem von 46 Spektren eine Linie auf. Dieser Bereich wird also, abgesehen von der einen Ausnahme, ausschließlich von der strukturlosen Intensität der breiten roten Bande geprägt. Im von dort aus weiter rotverschobenen Spektralbereich ab $\lambda > 720$ nm treten bei zehn von 46 untersuchten PS I-Partikeln Linien auf, die sich von der breiten Bande deutlich abheben. In der Abbildung 4.1 repräsentieren die beiden Spektren (d) und (e) Fälle dieser Art. Die Linie im Spektrum (d) besitzt ihr Maximum bei $\lambda = 723$ nm. Beim PS I-Komplex (e) treten an drei weit rotverschobenen Positionen Linien auf: bei $\lambda = 730$ nm, bei $\lambda = 732,5$ nm und bei $\lambda = 738$ nm.

4.2.2 Individuelle PS I-Trimere von *Synechocystis* sp. PCC 6803

In der Abbildung 4.2 sind vier repräsentative Einzelmolekül-Spektren (a) – (d) individueller PS I-Komplexe des Cyanobakteriums *Synechocystis* gegenübergestellt. Als Lösungsmittel wurde auch hier der übliche Puffer für PS I-Präparationen verwendet, dessen Zusammensetzung im Abschnitt 3.2.3 angegeben wurde. Die Einzelmolekül-Probe wurde, wie im Abschnitt zuvor die des PS I der Spezies *T. elongatus*, bei einer Wellenlänge von

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

$\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ angeregt. Die Aufnahmezeit für die Spektren (a) – (c) beträgt ca. 130 s und die von Spektrum (d) 220 s. Die Spektren sind für einen besseren Vergleich in der Größe einander angeglichen. Auch die Emissionen des PS I der Spezies *Synechocystis* zeigen eine große spektrale Heterogenität zwischen den individuellen PS I-Komplexen. Im Unterschied zum PS I von *T. elongatus* gibt es hier weniger gemeinsame Grundmerkmale. Alle vier Spektren (a) – (d) der Abbildung 4.2 enthalten eine breite, asymmetrische Bande. Die Verteilung der Maxima bei unterschiedlichen PS I-Komplexen ist jedoch viel ausgedehnter als beim PS I von *T. elongatus*. Im Spektrum (a) befindet sich das Maximum bei ca. $\lambda = 724$ nm, im Spektrum (b) bei ca. $\lambda = 721$ nm, im Spektrum (c) bei ca. $\lambda = 716$ nm und im Spektrum (d) bei ca. $\lambda = 713$ nm, d.h. die Position kann von Komplex zu Komplex über 10 nm weit variieren. Die mittlere Maximum-Position der breiten Bande liegt unter Berücksichtigung aller untersuchten Komplexe von *Synechocystis* bei $\lambda_M = (715 \pm 3)$ nm. Zusätzlich zur breiten Bande treten auch beim PS I dieser Spezies Emissionslinien auf. Ihr spektraler Bereich erstreckt sich von $\lambda < 700$ nm bis zu $\lambda > 720$ nm. Im Bereich $\lambda > 720$ nm sind sie jedoch nur eine Ausnahmeerscheinung. Hierin liegt ein weiterer Unterschied zwischen den PS I der beiden Spezies *T. elongatus* und *Synechocystis*. Hingegen besitzt die spektrale Form der Linien zwischen den individuellen Komplexen von *Synechocystis* eine ebenso große Vielfalt wie beim PS I von *T. elongatus*, d.h. häufig treten Schultern innerhalb einer Linie auf, die sie in verschiedene Segmente zu teilen scheinen. Beispiele hierfür treten bei allen vier abgebildeten Spektren auf: beim Spektrum (a) bei $\lambda = 700$ nm, beim Spektrum (b) bei $\lambda = 704$ nm, beim Spektrum (c) bei $\lambda = 697,5$ nm und beim Spektrum (d) bei $\lambda = 708$ nm. Ferner fallen beim PS I von *Synechocystis* spitzzulaufende schmale Banden von mehreren Nanometern Breite auf, wie z.B. im Spektrum (b) bei $\lambda = 704$ nm zu sehen ist. Jedoch treten ebenso auch schmale Linien auf wie z.B. im Spektrum (c) bei $\lambda = 701$ nm. Die Linien werden meistens von der breiten Bande überschritten. Generell besitzt die breite Bande weite Ausläufer und ist zudem häufig sehr stark asymmetrisch.

4.2.3 Individuelle PS I-Trimere von *Synechococcus* sp. PCC 7002

Über das PS I des Cyanobakteriums *Synechococcus* sp. PCC 7002 ist wesentlich weniger bekannt als über die PS I der beiden Spezies *T. elongatus* und *Synechocystis*. Aus den einzigen in der Literatur aufgeführten Fluoreszenz-Spektren von der RubA Mutante und den Pseudo-Wildtyp WTREm Stämmen geht hervor [She02], dass die PS I-Emission bezüglich P700 weniger stark rotverschoben zu sein scheint als bei den anderen beiden Spezies. Zur Verifizierung werden in Abbildung 4.3 Absorptions- und Emissionsspektrum vom PS I-Ensemble präsentiert. Die Messung wurde freundlicherweise von Eberhard Schlodder am Max-Volmer-Laboratorium durchgeführt. Das ermittelte Emissionsmaximum liegt bei ca. 713 nm und somit um ca. 6 nm blauverschoben gegenüber dem entsprechenden Wert vom PS I von *Synechocystis*.

Die Abbildung 4.4 zeigt fünf Einzelmolekül-Spektren (a) – (e) individueller PS I-Kom-

4.2 Stationäre Fluoreszenzspektren individueller PS I-Trimere

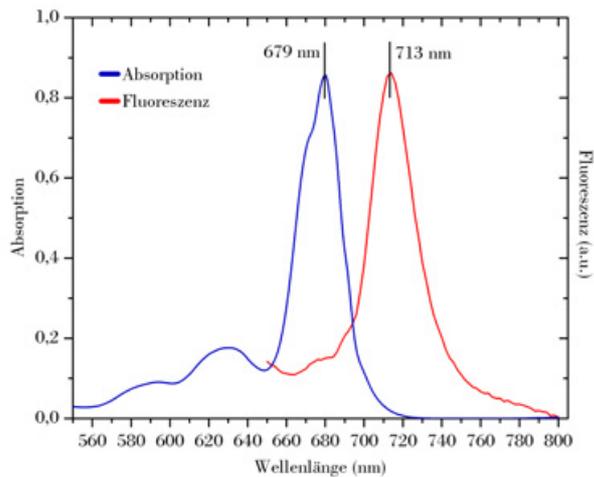


Abbildung 4.3: Ensemble-Spektren vom PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 bei 77 K. Eingezeichnet sind in blau die Absorption und in rot die Fluoreszenz, wobei mit 450 nm angeregt wurde. Die Messung stammt von Eberhard Schlodder am Max-Volmer-Laboratorium Berlin.

plexe vom Organismus *Synechococcus* sp. PCC 7002. Die Probe wurde aufgrund der schwachen Rotverschiebung zusätzlich zur Wellenlänge $\lambda_a = 680$ nm (Spektrum (a) und (b)) mit der Wellenlänge $\lambda_a = 640$ nm (Spektrum (c), (d) und (e)) angeregt, um den detektierbaren spektralen Bereich in Richtung höherer Energie auszudehnen. In beiden Fällen wurde eine Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ verwendet. In das Lösungsmittel der Probe wurden zum üblichen Puffer-Ansatz zusätzlich 50 Volumenprozent Glycerin zugegeben, wie im Abschnitt 3.2.3 als Variante beschrieben wurde. Die Aufnahmezeit für die Spektren (a), (c) und (d) beträgt um 150 s und die der Spektren (b) und (e) ca. 300 s. Die Spektren sind zur besseren Vergleichsmöglichkeit auf die gleiche Größe skaliert. Auch bei dieser Spezies wird zwischen den einzelnen PS I-Komplexen eine starke spektrale Heterogenität gefunden. Diese ist in Relation zu der beim PS I von *Synechocystis* noch ausgeprägter.

Bei allen fünf Spektren (a) – (e) taucht eine breite rote Bande auf, die in ihrer Position stark variiert. In den Spektren (a) und (b) befindet sich ihr jeweiliges Maximum bei ca. $\lambda = 707$ nm, im Spektrum (c) bei $\lambda = 710$ nm, im Spektrum (d) bei $\lambda = 703$ nm und im Spektrum (e) bei $\lambda = 705$ nm. Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Messungen an dieser Spezies kann sich die spektrale Position zwischen den einzelnen PS I-Komplexen um mehr als $\lambda = 10$ nm verschieben. Die mittlere Maximum-Position liegt bei $\lambda_M = (704 \pm 4)$ nm. Somit emittieren einzelne PS I-Komplexe von *Synechococcus* sp. PCC 7002 in der Summe weniger rotverschoben als das entsprechende Ensemble. Der Unterschied zu einzelnen PS I-Komplexen der beiden zuvor beschriebenen Spezies beträgt mehr als $\Delta\lambda \geq 10$ nm. Außer der breiten Bande werden auch beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 Emissionslinien beobachtet. Bei ihnen werden die gleichen Merkmale festgestellt, wie bei denen der PS I der beiden Spezies aus den vorangegangenen Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2. Wie beim PS I von *T. elongatus* können die Linien auf beiden Flanken der breiten Bande auftreten. Trotz der vergleichsweise schwachen Rotverschiebung des spektralen Schwerpunkts treten dennoch stark rotverschobene Linien auf, wie z.B. im Spektrum (d) bei $\lambda = 732$ nm und $\lambda = 735$ nm. Bei dieser Spezies scheinen

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

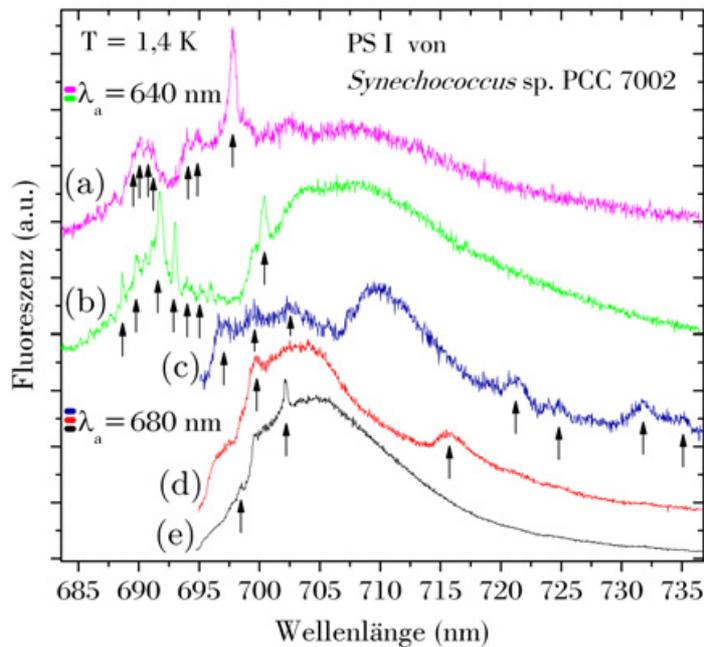


Abbildung 4.4: Einzelmolekül-Spektren individueller PS I-Trimere von *Synechococcus* sp. PCC 7002 in der Emission bei tiefer Temperatur. Die Messzeit beträgt jeweils länger als 150 s. Angeregt wurde bei den Wellenlängen $\lambda_a = 680 \text{ nm}$ und $\lambda_a = 640 \text{ nm}$ mit einer Leistung von jeweils ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

die Linien in einigen Fällen einen verhältnismäßig großen Anteil der Gesamtintensität zu tragen, wie sich z.B. in den Spektren (a) – (c) zeigt. Das Phänomen, dass sich Emissionsbanden scheinbar aus mehreren Linien zusammensetzen, tritt häufig auf, wie z.B. beim Spektrum (a) um $\lambda = 691 \text{ nm}$ und beim Spektrum (b) um $\lambda = 692 \text{ nm}$.

4.3 Spektrale Dynamik in der Fluoreszenz

Am Ende des letzten Abschnitts wurden Emissionsbanden betrachtet, die sich scheinbar aus mehreren Linien zusammensetzen. Für dieses Phänomen kommen zwei Ursachen in Betracht. Zum einen nimmt man anhand von Messungen aus der Ensemble-Spektroskopie an, dass PS I pro Monomer je nach Spezies zwischen ca. 4 – 10 rote Chlorophylle besitzt [Gob94, Pål96, Zaz02b]. Demnach könnte die beobachtete spektrale Bandenstruktur eine Folge von inhomogener Verbreiterung sein, d.h. die Ursache liegt im Beitrag mehrerer Emittoren, die sich aufgrund ihrer verschiedenartigen Bindungen an unterschiedlichen Orten im Protein in ihren lokalen optischen Übergangsenergien unterscheiden. Zum anderen könnte es sich um einen oder nur wenige Emittoren handeln, die in ihrer Übergangsenergie nicht stabil sind. Demzufolge könnte die Bande konstruiert werden, indem eine oder wenige homogene Linien innerhalb der Messzeit einer starken spektralen Dynamik unterliegen. Im folgenden Abschnitt wird die Ursache der Verbreiterung untersucht.

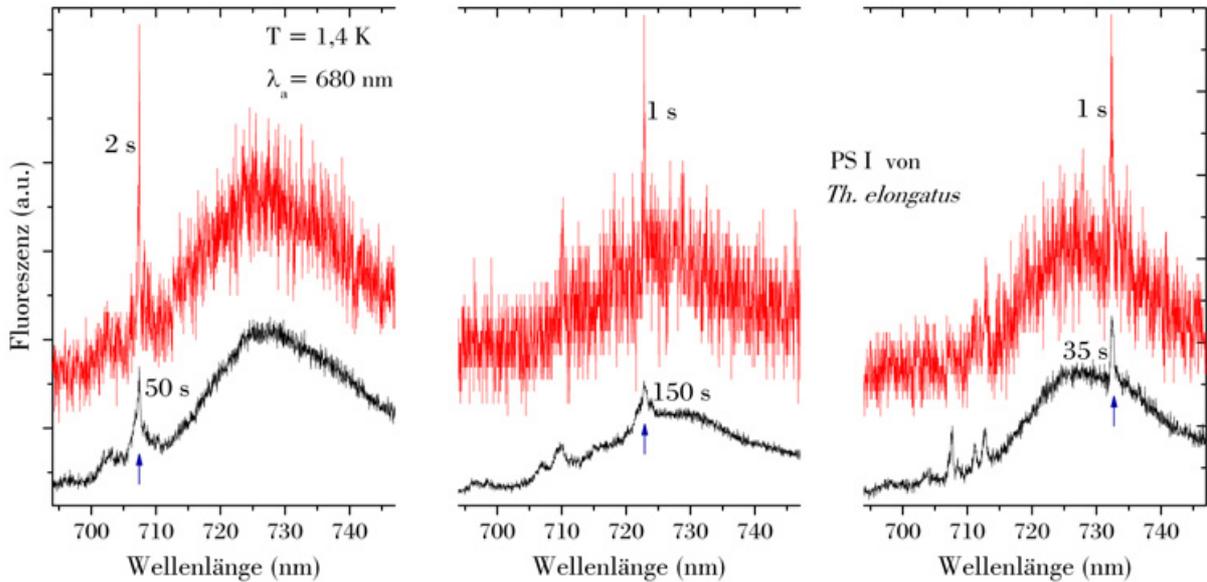


Abbildung 4.5: Abhängigkeit der Einzelmolekül-Emissionsspektren individueller PS I-Komplexe von der Zeit. Die PS I stammen von der Spezies *T. elongatus*. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Die oberen, rot eingefärbten Spektren sind jeweils in 1 – 2 s aufgenommen und bei den unteren, schwarz eingefärbten reicht die Akquisitionszeit von 35 – 150 s. Letztere Zeiten richten sich danach, wie lange die entsprechende Linie bei annähernd gleichbleibender Intensität in dem jeweiligen Spektralbereich detektiert wurde, um ein möglichst gutes, vergleichbares Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen. Die jeweils interessierende spektrale Position wird von den blauen Pfeilen markiert. Sie erstrecken sich über den roten Spektralbereich von $\lambda = 708$ nm über $\lambda = 723$ nm bis $\lambda = 733$ nm. Bei jeder der drei Banden erkennt man deutlich einen Verbreiterungsprozess in der Zeit.

4.3.1 Zeitabhängigkeit der Linienbreite

Die Abbildung 4.5 zeigt Fluoreszenzspektren von drei individuellen PS I-Komplexen, von denen jeweils zwei Spektren unterschiedlicher Akkumulationszeit dargestellt sind. Die oberen Spektren wurden innerhalb von 1 – 2 s und die darunter innerhalb von 35 – 150 s aufgenommen. Das Augenmerk liegt jeweils bei den durch die blauen Pfeile markierten spektralen Positionen. Man erkennt deutlich, dass alle drei Komplexe jeweils innerhalb der kurzen Aufnahmezeit scharfe Linien emittiert haben. Die zugehörigen Linienbreiten zu den spektralen Positionen bei $\lambda = 708$ nm, $\lambda = 723$ nm und $\lambda = 733$ nm betragen $\Delta\lambda \leq 0,08$ nm, $\Delta\lambda \leq 0,06$ nm und $\Delta\lambda \leq 0,07$ nm (FWHM) und liegen somit nahe der Auflösungsgrenze des Spektrometers von $\Delta\lambda \geq 0,04$ nm. Auch die Intensitäten sind miteinander vergleichbar. Verlängert man nun bei allen drei PS I-Komplexen die Akkumulationszeit, setzt offenbar bei jedem einzelnen ein Verbreiterungsprozess ein. Demzufolge verbreitert sich die Linie bei $\lambda = 708$ nm in 50 s auf $\Delta\lambda = 0,60 \pm 0,05$ nm, die Linie bei $\lambda = 723$ nm in 150 s auf $\Delta\lambda = 0,80 \pm 0,05$ nm und die Linie bei $\lambda = 733$ nm in 35 s auf $\Delta\lambda = 0,70 \pm 0,05$ nm.

Um die spektrale Dynamik erfassen zu können, wurden Sequenzen von Spektren über die

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

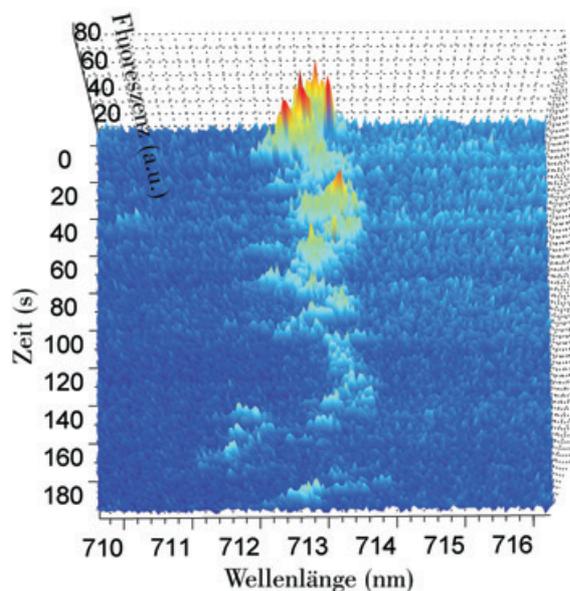


Abbildung 4.6: Spektrale Diffusion einer scharfen Emissionslinie. Gezeigt wird eine Abfolge von Fluoreszenzspektren, die an einem individuellen PS I-Trimer von *T. elongatus* bei 1,4 K aufgenommen wurde. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Die Akkumulationszeit pro Spektrum beträgt 1 s.

Zeit aufgenommen. Die kürzest mögliche Messzeit für jedes einzelne Emissionsspektrum innerhalb einer Sequenz wird durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis begrenzt. Die am häufigsten gewählte Zeit war 1 s, da sich hier üblicherweise scharfe Linien vom Rauschen sicher trennen lassen. In Ausnahmefällen wurde auch schneller gemessen, bis zu 0,1 s pro Spektrum. Eine Verkürzung der Akkumulationszeit führt jedoch zu einer Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Dies kann durch Herabsetzen der spektralen Auflösung verbessert werden, was jedoch die Präzision der spektralen Positionsbestimmung einer Linie beeinträchtigt. Daher wurde diese Messeinstellung nur bei wenigen Molekülen vorgenommen.

Die Spektren aus Abbildung 4.5 wurden aus solchen Spektrensequenzen ausgewählt. Für die unteren wurden mehrere zusammenhängende Spektren aufaddiert. Aufgrund der variierenden Längen des Auftretens der Linien wurden dabei die unterschiedlich langen Zeiten ausgesucht. Allgemein besitzen verbreiterte Emissionslinien aus Spektren, die ohne Selektion über längere Zeit ermittelt wurden, in Abhängigkeit ihrer spektralen Lage unterschiedliche Intensitäten. Linien im spektralen Bereich zwischen ca. $\lambda \leq 700$ nm und $\lambda \leq 713$ nm tragen meistens einen größeren Anteil an der Gesamtintensität als die Linien in der Region $\lambda \geq 720$ nm. Hierin liegt einer der Gründe dafür, dass im stark rotverschobenen Spektralbereich $\lambda \geq 720$ nm in stationären Emissionsspektren weniger häufig scharfe Linien beobachtet werden als in der Region $\lambda \leq 713$ nm. Eine weitere Ursache besteht darin, dass die scharfen Linien im roten Bereich $\lambda \geq 720$ nm innerhalb einer Messzeit von $t \geq 100$ s häufig kürzer auftreten als die scharfen Linien im Spektralbereich $\lambda \leq 713$ nm. Dieses Verhalten kann jedoch nur aufgedeckt werden, wenn die zeitliche Entwicklung eines Spektrums durch Aufnahme einer Spektrensequenz registriert wird, wie sie in Abbildung 4.6 gezeigt wird. Die Emissionen stammen von einem einzelnen PS I-Komplex vom Cyanobakterium *T. elongatus*. Man erkennt deutlich eine scharfe Emissionslinie,

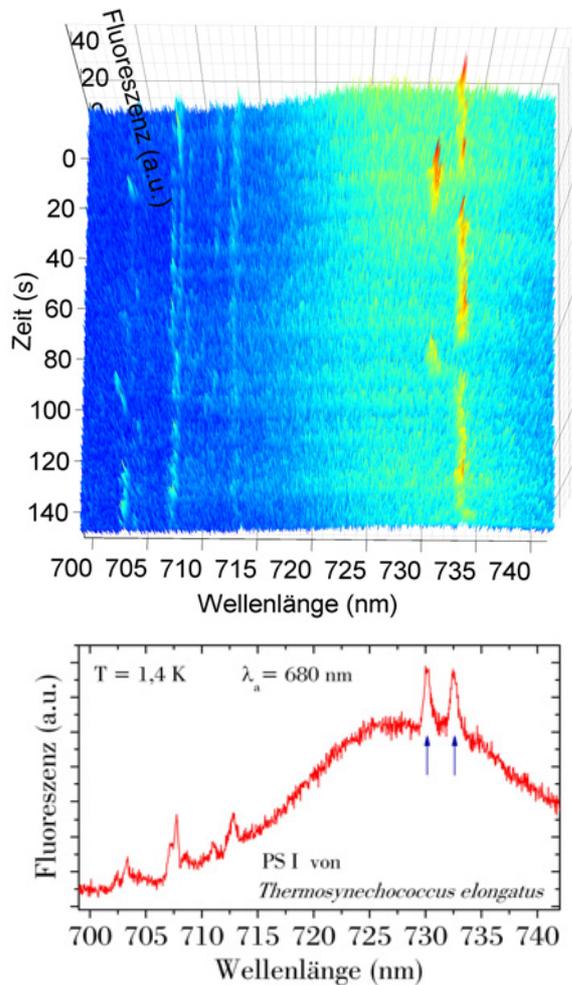


Abbildung 4.7: Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Komplexes von *T. elongatus*. **Oben:** Selektierte Sequenz über 150 Spektren mit einer jeweiligen Akkumulationszeit von $t = 1$ s. **Unten:** Zeitliche Projektion der Sequenz darüber. Durch das Aufsummieren der 150 Spektren erhält man ein stationäres Spektrum, in dem die Informationen über die spektrale Dynamik verloren gegangen sind. Daher kann anhand des 2D-Spektrums z.B. nicht festgestellt werden, ob die beiden mit den blauen Pfeilen gekennzeichneten Emissionslinien simultan auftreten oder zeitversetzt. Hingegen zeigt die 3D-Darstellung deutlich die Antikorrelation der beiden unterschiedlichen Linienpositionen.

die sich innerhalb der dargestellten knapp 200 s um eine mittlere spektrale Position von $\lambda = 713$ nm bewegt. Ihre Intensität lässt über die Zeit nach. Dieses Verhalten konnte im Spektralbereich $\lambda \leq 716$ nm relativ häufig beobachtet werden. Eine ausführliche Untersuchung der spektralen Diffusion in der Fluoreszenz einzelner PS I-Komplexe findet im Kapitel 5 statt.

4.3.2 Emissionslinien mit mehreren diskreten Realisierungen

Die Abbildung 4.7 zeigt oben in einer Abfolge von 150 Spektren die Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Komplexes von *T. elongatus*. Die Akkumulationszeit pro Spektrum beträgt $t = 1$ s. Darunter ist die zeitliche Projektion dargestellt. Das Augenmerk liegt auf den beiden durch die blauen Pfeile markierten scharfen Emissionslinien bei ca. $\lambda = 730$ nm und $\lambda = 732,5$ nm. Anhand des unteren stationären Spektrums kann nicht festgestellt werden, ob die Emissionslinien gleichzeitig emittiert werden oder zeitlich versetzt auftreten. Die darüber dargestellte Sequenz hingegen enthält diese Information. Man erkennt

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

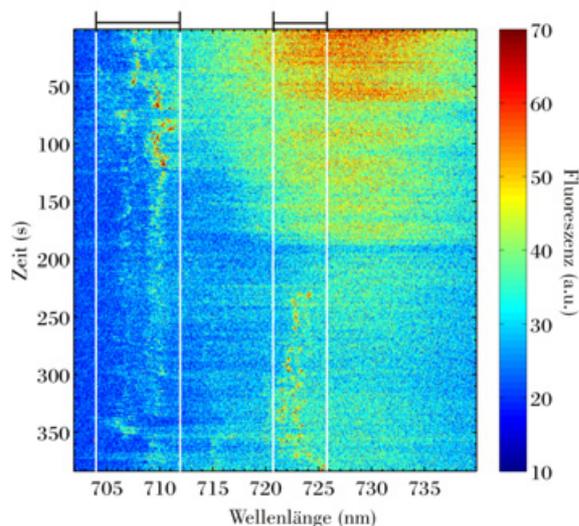


Abbildung 4.8: Bestimmung der spektralen Aufenthaltsbereiche von scharfen Emissionslinien. Die Darstellung illustriert an einem Beispiel, wie die Balken aus Abb. 4.9 ermittelt wurden. Die Spektrensequenz stammt von einem individuellen PS I-Komplex von *T. elongatus*, der in Abb. 4.9 oben links unter der Nummer 14 verzeichnet ist. Die Fluoreszenzintensität ist als dritte Dimension in Falschfarben dargestellt.

deutlich, dass die Emissionen auf den beiden Linienpositionen antikorrelieren. Demnach handelt es sich also um eine Emissionslinie, die zwei Realisierungen besitzt. Zwischen diesen beiden Realisierungen wird auf einer über mehrere Sekunden dauernden Zeitskala hin- und hergewechselt, so dass dieser Prozess direkt zugänglich ist. Durch einen zweiten schnelleren Prozess wird die scharfe Emissionslinie in beiden Positionen verbreitert. Auch dieser Prozess kann bei dem hier untersuchten Komplex bis nahe der spektralen Auflösungsgrenze des Spektrometers nachvollzogen werden, wie aus dem Abschnitt 4.3.1 hervorging. Die Abbildung 4.5 zeigt rechts die Fluoreszenz desselben Komplexes. Häufig sind jedoch sowohl die kleinen als auch die großen spektralen Sprünge schneller als die kürzest mögliche Akkumulationszeit, so dass nur noch eine breite Bande oder zwei oder mehrere Emissionslinien festgestellt werden können. In solchen Fällen kann über einen gemeinsamen Ursprung der Emissionslinien oder entsprechend einer Emissionsbande nur spekuliert werden.

4.3.3 Energiebereiche der Emissionslinien

Bei dem größten Teil der PS I-Komplexe aller drei untersuchten Spezies wurden scharfe Emissionslinien im Spektralbereich der roten Chlorophylle beobachtet. Die spektrale Dynamik der Linien wird in den Spektrensequenzen sichtbar, wie z.B. eine in Abbildung 4.8 dargestellt ist. Alle Sequenzen dieser Art zeigen, dass der Spektralbereich, in dem sich jede einzelne scharfe Emissionslinie innerhalb des Zeitfensters unserer Aufnahmen aufhalten kann, auf Areale mit definierter Ausdehnung auf der Nanometer-Längenskala begrenzt ist. In Abbildung 4.8 bewegen sich z.B. Linien in den zwei Regionen bei ca. $704 \text{ nm} \leq \lambda \leq 712 \text{ nm}$ und $721 \text{ nm} \leq \lambda \leq 726 \text{ nm}$. Im ersteren Bereich deutet sich an, dass sich in ihm zwei Emissionslinien aufhalten. Da die Intensitäten nicht klar getrennt werden können, wurde ihnen ein Bereich zugeteilt. Auf der Grundlage der ermittelten Zeitabfolgen von Spektren wurde von jedem einzelnen PS I-Komplex die individuellen

4.3 Spektrale Dynamik in der Fluoreszenz

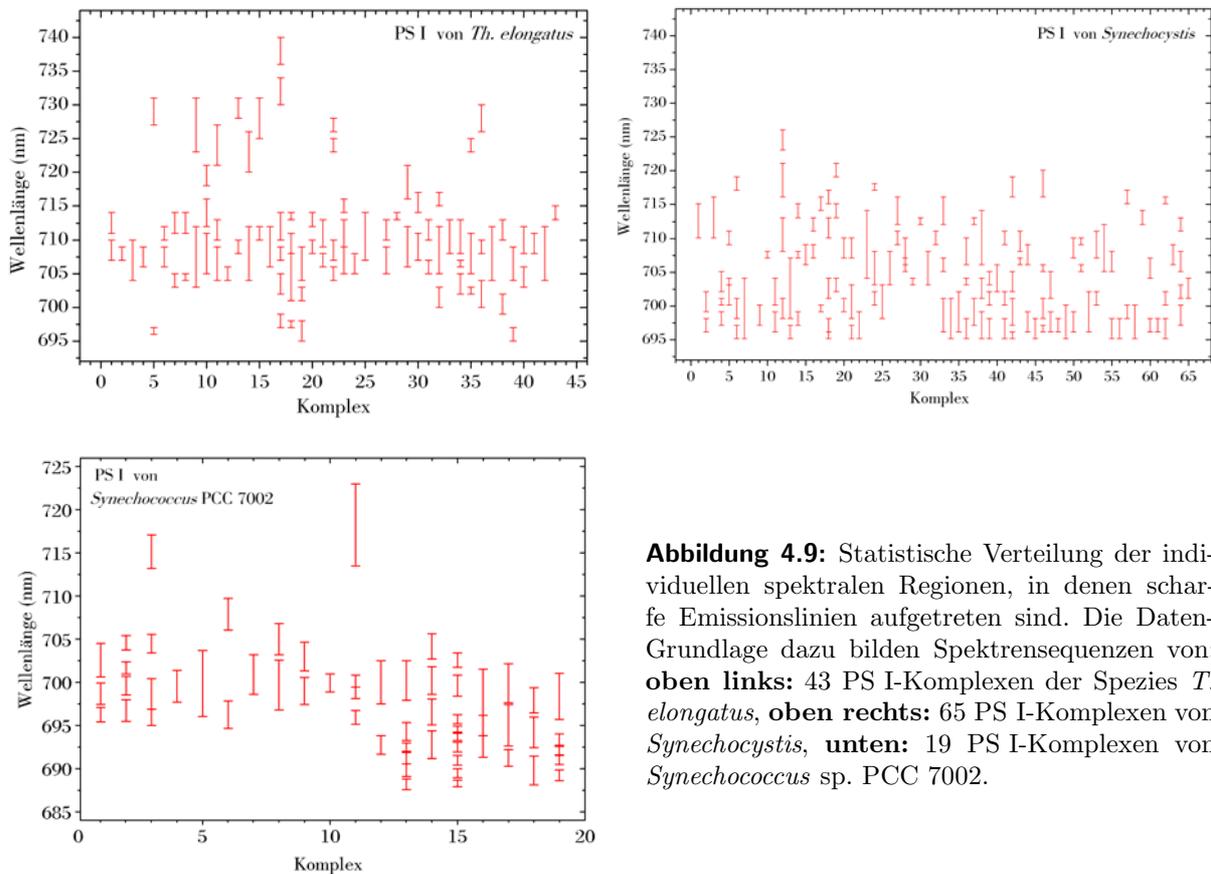


Abbildung 4.9: Statistische Verteilung der individuellen spektralen Regionen, in denen scharfe Emissionslinien aufgetreten sind. Die Daten-Grundlage dazu bilden Spektrensequenzen von: **oben links:** 43 PS I-Komplexen der Spezies *T. elongatus*, **oben rechts:** 65 PS I-Komplexen von *Synechocystis*, **unten:** 19 PS I-Komplexen von *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Aufenthaltsbereiche der jeweils aufgetretenen Emissionslinien erfasst und in Balkendiagrammen zusammengestellt. Die nach der jeweiligen Spezies sortierten Resultate sind in der Abbildung 4.9 dargestellt. Das Diagramm oben links zeigt die statistische Verteilung der individuellen spektralen Regionen von einzelnen PS I-Komplexen der Spezies *T. elongatus*, das rechts daneben die vom PS I von *Synechocystis* und das unten die vom PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002. Das Beispiel aus Abbildung 4.8 ist im Diagramm oben links unter der Nummer 14 aufgeführt. Jeder einzelne der eingetragenen PS I-Komplexe hat scharfe Linien mit individuellem Verhalten bzgl. der spektralen Dynamik emittiert. Bei Überschneidungen von spektralen Aufenthaltsbereichen wurde wie in obigem Beispiel ein breiter Balken zugeordnet. Bei den gut voneinander separierten Regionen wurde hingegen jeder Linie jeweils ein Balken zugeteilt. Wie aus dem Abschnitt 4.3.2 hervorging, bedeuten jedoch hier zwei von einander getrennte Balken im Diagramm, die zwei separierten Arealen eines Komplexes konsequent zugeordnet wurden, keineswegs zwangsläufig, dass der Ursprung der Linien in zwei verschiedenen Emitttern liegt. Vielmehr besteht in diesen Fällen die Möglichkeit, dass eine Emissionslinie zwei oder mehrere spektrale Realisierungen besitzt, die innerhalb der möglichen Zeitaufösung nicht voneinander getrennt werden können.

Bei Betrachtung der Teilabbildung der PS I-Komplexe von *T. elongatus* fällt unmittelbar

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

auf, dass sich die Aufenthaltsbereiche von scharfen Emissionslinien bei dieser Spezies in zwei deutlich voneinander abgegrenzte Bänder aufteilen. Das eine Band liegt energetisch oberhalb von ca. $\lambda = 716$ nm und das zweite unterhalb von ca. $\lambda = 723$ nm. In beiden Bändern findet man sowohl Emissionslinien, die sich nur in einem stark begrenzten Gebiet von $1 \text{ nm} \leq \Delta\lambda \leq 2 \text{ nm}$ bewegen können, als auch welche, deren Aufenthaltsbereiche auf mehrere Nanometer bis hin zu ca. $\Delta\lambda = 9$ nm ausgedehnt sind. Im kürzerwelligen Band wurde beim größten Teil aller untersuchten Komplexe mindestens eine Linien-Region beobachtet. In dieser Bande fällt auf, dass sich ein spektraler Kernbereich von $703 \text{ nm} \leq \lambda \leq 713 \text{ nm}$ abgrenzt, in dem der Großteil der Linien der Bande aufgetreten sind. Innerhalb der anderen Bande traten hingegen nur bei elf von 43 PS I-Komplexen überhaupt Emissionslinien auf. Vereinzelt wurde festgestellt, dass PS I-Komplexe dieser Spezies sehr stark rotverschobene scharfe Linien oberhalb von $\lambda = 730$ nm bis hin zu $\lambda = 740$ nm emittieren. Im Vergleich zum PS I von *T. elongatus* bietet sich beim PS I von *Synechocystis* in der Teilabbildung oben rechts der Abbildung 4.9 ein anderes Verhalten. Man erkennt unmittelbar, dass sich keine zwei separaten Banden voneinander abspalten. Auch bildet sich kein bevorzugter Aufenthaltsbereich für Emissionslinien heraus. Die Verteilung der Linien-Regionen ist vielmehr spektral stark heterogen, so dass im gesamten roten Spektralbereich keine Systematik erkennbar ist. Der rote Spektralbereich liegt bei dieser Spezies verglichen mit *T. elongatus* blauverschoben. Er erstreckt sich von der Grenzwellenlänge des Filters bei ca. $\lambda = 695$ nm bis ca. $\lambda = 720$ nm, wobei mögliche scharfe Linien vor $\lambda \leq 695$ nm aufgrund der Sperrung durch den Kantenfilter nicht erfasst wurden. Oberhalb von $\lambda = 721$ nm wurde nur in einem Fall von 65 untersuchten Komplexen eine scharfe Emissionslinien beobachtet. Im Vergleich zum PS I von *T. elongatus* traten mehr Linien zwischen $\lambda = 695$ nm und $\lambda = 700$ nm auf. Bezüglich der Variation ihrer spektralen Ausdehnung weisen die Regionen insgesamt keinen markanten Unterschied zu denen vom *T. elongatus* auf, d.h. auch beim PS I von *Synechocystis* liegt der Bewegungsrahmen der Linien aller Komplexe statistisch verteilt zwischen $\Delta\lambda = 1$ nm bis $\Delta\lambda = 9$ nm bzw. in einem Fall bis $\Delta\lambda = 10$ nm. Ein ähnliches Bild zeigt sich beim PS I von *Synechococcus sp.* PCC 7002. Jedoch liegt hier die rote Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen beiden Spezies deutlich blauverschoben. Daher wurde neben $\lambda = 680$ nm zusätzlich eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 640$ nm verwendet. Die Linienregionen der mit dieser Laserwellenlänge vermessenen PS I-Komplexe sind in Abbildung 4.9 im Diagramm unten ab dem Komplex Nummer zwölf eingetragen. Die meisten aufgetretenen Emissionslinien haben sich ausschließlich unterhalb von $\lambda = 706$ nm aufgehalten. Nur vier von 18 Molekülen haben bei kleineren Energien emittiert. Der energetisch kleinste Wert liegt bei $\lambda = 723$ nm.

4.3.4 Spektrale Diffusion von breiten Emissionsbanden

In der Abbildung 4.10 sind die Fluoreszenzemissionen zweier individueller PS I-Komplexe von *Synechocystis* über jeweils 93 s dargestellt. Beide PS I-Komplexe zeigen den größten

4.3 Spektrale Dynamik in der Fluoreszenz

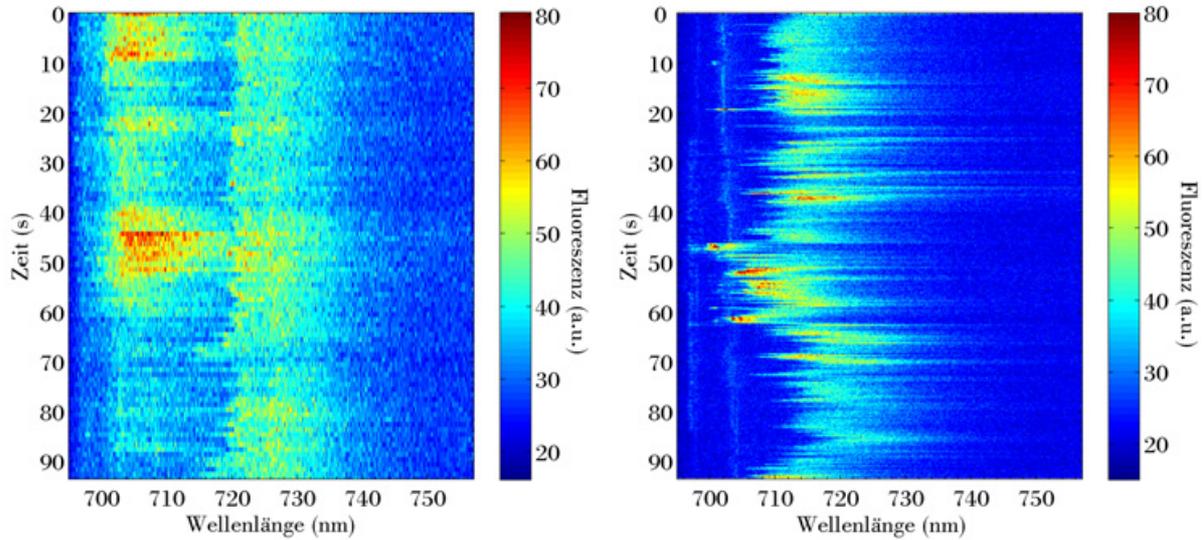


Abbildung 4.10: Fluoreszenzemissionen zweier einzelner PS I-Komplexe von *Synechocystis* in Pufferlösung mit 50 Volumenprozent Glycerin. **Links:** Sequenz über 93 Spektren (Akkumulationszeit $t = 1$ s). **Rechts:** Abfolge über 310 Spektren von einem anderen Komplex (Akkumulationszeit $t = 0,3$ s).

Anteil ihrer Intensität im spektralen Bereich zwischen ca. $\lambda = 700$ nm und $\lambda = 730$ nm. Der gravierende Unterschied liegt in der Dynamik. Im linken Bild zeichnen sich zwei scheinbar voneinander getrennte Banden ab: Die erste reicht von ca. $\lambda = 700$ nm bis $\lambda = 716$ nm und die zweite von ca. $\lambda = 719$ nm bis über $\lambda \geq 730$ nm. Beide Emissionsbanden tauchen innerhalb der Messzeit von jeweils $t = 1$ s pro Einzelspektrum stets simultan auf. Auffällig sind dabei starke Intensitätsschwankungen, wobei insbesondere die höherenergetische der beiden nach ca. 60 s insgesamt deutlich an Intensität verliert. Bei dem anderen Komplex, dessen Fluoreszenz ausschnittsweise im rechten Bild gezeigt wird, zeigt sich ein ganz anderes Verhalten: Man beobachtet zunächst nur eine Emissionsbande, die jedoch schrittweise ihre Position variiert. Dieser Prozess kann verfolgt werden, da er langsamer abläuft als die Messzeit, die zur Steigerung der zeitlichen Auflösung hier mit $\tau_{\text{exp}} = 0,3$ s möglichst kurz gewählt wurde. Das Sprungverhalten ähnelt dem aus einer SMS-Studie am LH2 vom Purpurbakterium *Rhodospseudomonas acidophila* bei Raumtemperatur [Rut05]. In dieser wurden ebenfalls mittels der Aufnahme von Spektrensequenzen Fluktuationen einer breiten Emissionsbande verfolgt. Durch die Verschiebung der Bande aus dem rechten Bild der Abbildung 4.10 wurden zeitweise die spektralen Lagen beider Banden des anderen PS I-Komplexes eingenommen. Dabei traten die Emissionen jedoch niemals gleichzeitig auf beiden spektralen Positionen auf. Demnach kann zumindest diesem Komplex nur genau eine Emissionsbande zugeordnet werden, die sich in ihrer Gesamtheit spektral verschiebt. Zusätzlich treten noch zwei scharfe Emissionslinien um $\lambda = 697$ nm und $\lambda = 703$ nm auf. Beim anderen Komplex, dessen Fluoreszenzemissionen ausschnittsweise im linken Bild zu sehen sind, konnte auf der Zeitskala $0,1 \text{ s} \leq \tau_{\text{exp}} \leq 1 \text{ s}$

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

nicht festgestellt werden, ob die beiden beobachteten Banden gleichzeitig emittiert werden und somit unterschiedlicher Herkunft sind oder es sich ebenfalls um nur genau eine, jedoch schneller springende, Emissionsbande handelt.

4.4 Separation von Fluoreszenzbanden

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Fluoreszenz einzelner PS I-Komplexe verschiedener Spezies zunächst spektral und anschließend spektral und zeitlich aufgelöst untersucht. Dabei wurden im gegenüber P700 rotverschobenen Spektralbereich sowohl scharfe Linien als auch breitere Banden festgestellt, die mitunter eine starke spektrale Diffusion zeigen. Häufig beobachtet man in den Spektrensequenzen scheinbar Durchmischungen verschiedener Banden, die sich dann nicht trennen lassen. Allein anhand verschiedener spektraler Diffusions-Eigenschaften von Fluoreszenzbanden kann nicht klar abgeschätzt werden, wie viele Emitter zu den roten Zuständen beitragen. Um dieser Frage nachzugehen, muss insbesondere beachtet werden, dass die bislang vorgestellten Einzelmolekül-Daten an PS I-Trimeren gemessen wurden, d.h. die gezeigten Komplexe der drei untersuchten Spezies beinhalten jeweils drei gleiche Monomere. Bisher ist ungeklärt, ob die drei Monomere untereinander gekoppelt sind. Denkbar ist sowohl ein Austausch, der dazu führt, dass nur ein energetisch tiefster Zustand als Falle für einen Großteil der Anregungsenergie des Trimers wirkt [Kar99a, Kar99b, Kar04], als auch eine Isolation, so dass alle drei Monomere ihre eigene rote Falle mit Energie speisen [vdL93, Gob94]. Damit die Anzahl der Emitter wirksam abgeschätzt werden kann, wird neben der spektralen und zeitlichen Auflösung bei der Fluoreszenzdetektion noch ein weiterer Parameter der Fluoreszenz benötigt. Dieser findet sich in deren Polarisierung. In diesem Abschnitt werden polarisationsabhängige Messungen präsentiert. Zu Beginn wird erstmals über Einzelmolekül-Messungen an PS I-Monomeren berichtet. Da entsprechende Messungen an Trimeren immer mehrere Deutungsmöglichkeiten eröffnen, sind die Messungen an Monomeren für zuverlässige Aussagen entscheidend.

4.4.1 PS I-Monomere von *T. elongatus*

Anknüpfend an die zuvor gezeigten Ergebnisse aus den Trimer-Studien, werden in diesem Abschnitt Untersuchungen an einzelnen PS I-Monomeren des Cyanobakteriums *T. elongatus* vorgestellt. Die verwendete Probe wurde von Eberhard Schlodder zur Verfügung gestellt. Im Vergleich zur Detektion einzelner PS I-Trimere stellten sich für die Messung einzelner PS I-Monomere erschwerte Bedingungen heraus: Zum einen geben sie weniger Licht ab und zum anderen fallen sie bei gleicher Anregungsleistung wesentlich schneller in einen Dunkelzustand, d.h. bei der typischerweise bei Trimeren verwendeten Anregungsleistung photobleichen die meisten Monomere nach weniger als $t \leq 10$ s auf weniger als die halbe Anfangsintensität. Die nach 1 – 2 s ermittelte anfängliche Intensität beträgt

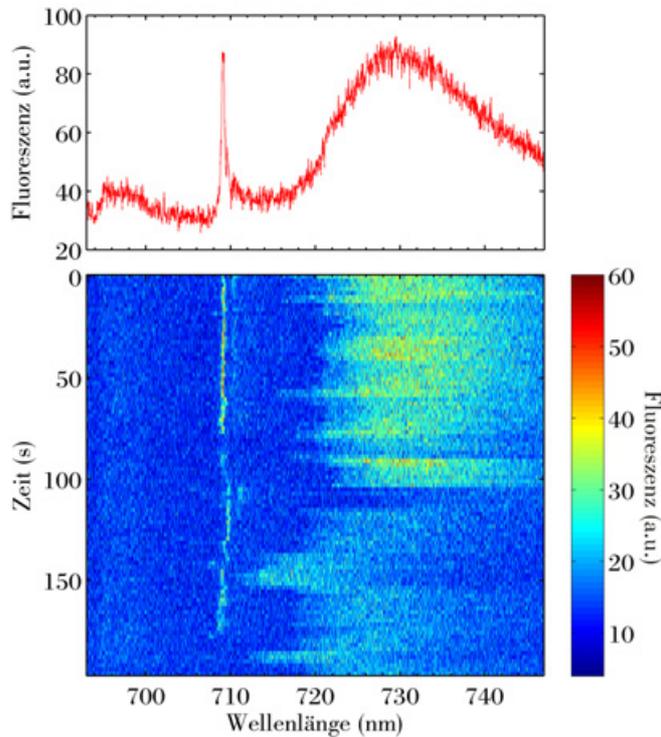


Abbildung 4.11: Fluoreszenz von einem einzelnen PS I-Monomer aus *T. elongatus*. Im **unteren Teil** wird die spektrale Entwicklung in der Zeit in Falschfarbendarstellung gezeigt. Die Auflösung beträgt 2 s für ein Spektrum. **Oben** ist die zeitliche Projektion als Summenspektrum aufgetragen. Man erkennt deutlich eine scharfe Linie bei ca. $\lambda \simeq 709$ nm und eine breite Bande mit mittlerer Lage bei ca. $\lambda \simeq 730$ nm, die sich nach etwa $t \geq 100$ s wenige Nanometer blauverschiebt.

bei den mit dieser Leistung bestrahlten Monomeren ca. ein Drittel der entsprechenden typischen Signalstärke von Trimeren. Bei einer Reduktion der Anregungsleistung um 80 – 90 % wird das Photobleichverhalten stark verzögert, so dass zwar 80 – 90 % weniger Fluoreszenzlicht pro Sekunde gesammelt werden kann, jedoch über einen sinnvollen Zeitraum dem Nachweis zur Verfügung steht. Im oberen Teil der Abbildung 4.11 ist analog zu den entsprechenden Trimer-Spektren aus Abschnitt 4.2.1 ein stationäres Emissionsspektrum eines einzelnen PS I-Monomers dargestellt. Darunter wird der spektrale Zeitverlauf gezeigt, aus dem das Spektrum durch Aufsummieren gebildet wurde. Die spektralen Charakteristika des PS I von *T. elongatus* sind auch in der monomeren Form klar zu erkennen, d.h. bei dem in Abbildung 4.11 dargestellten Spektrum eine scharfe Linie im Bereich um $\lambda \simeq 709$ nm und eine breitere Bande mit ihrem Maximum bei $\lambda \simeq 730$ nm. Im Spektralbereich um $\lambda \simeq 708$ nm wurden wie bei den Trimeren mitunter auch mehrere Linien oder breitere Strukturen beobachtet, jedoch seltener. Die rote breite Bande im Bereich um $\lambda \simeq 728$ nm liegt bei den Monomeren im Mittel wenige Nanometer blauverschoben. Die mittlere Lage des spektralen Schwerpunkts verschiebt sich um 2 nm auf ca. $\lambda_M = (725,5 \pm 1)$ nm. Die spektrale Dynamik kann aufgrund der schwächeren Signalstärke nur undeutlich oder auf längerer Zeitskala beobachtet werden. Die spektrale Heterogenität zwischen den einzelnen Monomeren übersteigt tendenziell die vom PS I in trimerer Form.

Nachdem nun die spektralen Eigenschaften von PS I-Monomeren beschrieben wurden, wird im nächsten Schritt die Polarisation ihrer Fluoreszenz analysiert. Die Abbildung 4.12

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

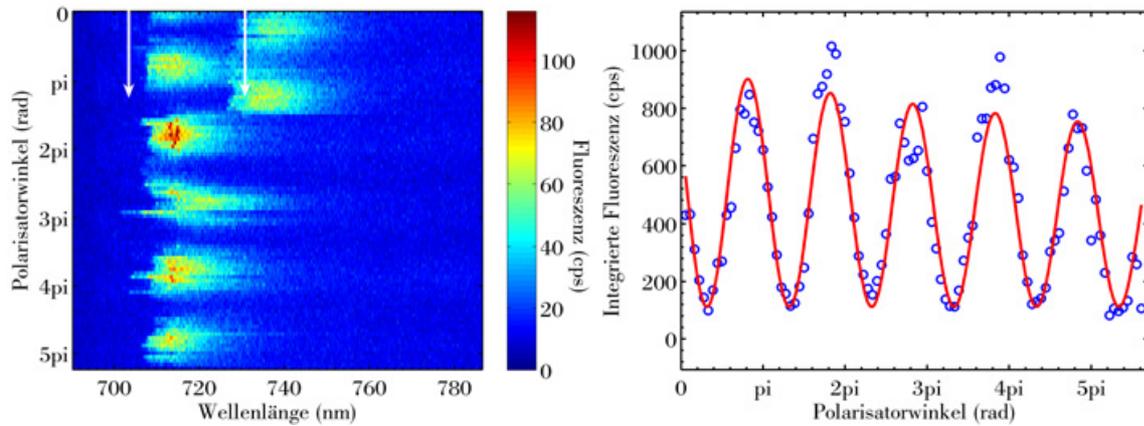


Abbildung 4.12: Links: Polarisations-selektierte Spektrenfolge der Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Monomers von *T. elongatus*. Die Winkelauflösung beträgt 10° . Unter jeder Polarisatorstellung wurde 3 s akkumuliert. Die Messung wird von dem Prozess der zeitlichen spektralen Entwicklung zwangsläufig begleitet. Während die Bande bei $\lambda \simeq 715$ nm über fünf Perioden (~ 280 s) leuchtet, fällt die Bande bei $\lambda \simeq 735$ nm nach ca. eineinhalb Perioden (~ 80 s) in einen Dunkelzustand. Beide Banden werden mit Hilfe der polarisations-selektiven Methode gut voneinander separiert. Der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Emittier in Projektion auf die zur optischen Achse senkrechten Ebene liegt zwischen ca. $\sim 80^\circ - 90^\circ$. Rechts: Die blau eingezeichneten Ringe markieren die jeweils integrierte Intensität über den mit den weißen Pfeilen im linken Bild gekennzeichneten Spektralbereich. Die rote, durchgezogene Linie stellt eine Anpassung der Form $y_0 + A \cdot \sin^2((\pi \cdot \varphi/\omega) - \varphi_{\text{anf}}) \cdot (\varphi_{\text{end}} - \varphi^\alpha)$ dar, mit y_0 dem Hintergrundsignal, A der Amplitude, ω die Polarisatorschrittweite, φ_{anf} dem Anfangswinkel, φ_{end} dem Endwinkel und α einem Faktor. Die Modulationstiefe erreicht annähernd das Hintergrundsignal, auf das die Null gelegt wurde.

zeigt auf der linken Seite eine polarisations-selektierte Spektrenfolge eines individuellen PS I-Monomers. Man erkennt deutlich zwei in verschiedene Richtungen linear polarisierte Emissionsbanden. Die eine reicht von ca. $705 \text{ nm} \leq \lambda \leq 725 \text{ nm}$ und die andere von ca. $730 \text{ nm} \leq \lambda \leq 750 \text{ nm}$. Der Winkel zwischen den zugehörigen Übergangsdipolmomenten der beiden Emittier liegt nahe $\sim 90^\circ$. Genauer gesagt, wird in dem Messverfahren der Winkel zwischen den auf die zur optischen Achse senkrechten Ebene projizierten emittierenden Momenten bestimmt. Der Winkel in drei Dimensionen kann nicht ermittelt werden. Die Polarisationsanalyse ermöglicht eine klare Separierung der beiden spektral überlagerten Banden aufgrund des Versatzes ihrer Polarisationsrichtungen. In der rechten Teilabbildung ist die Modulation der mit den pinken Pfeilen markierten Bande aus dem linken Bild aufgetragen. Dabei kennzeichnen die blauen Ringe die jeweils pro Spektrum innerhalb der markierten Grenzen integrierte Intensität. Der Kurvenverlauf wurde mittels *least squares*-Methode über die Funktion

$$y_0 + A \cdot \sin^2((\pi \cdot \varphi/\omega) - \varphi_{\text{anf}}) \cdot (\varphi_{\text{end}} - \varphi^\alpha) \quad (4.1)$$

angepasst, wobei y_0 dem Hintergrund, A der Amplitude, ω die Polarisatorschrittweite, φ_{anf} dem Anfangswinkel, φ_{end} dem Endwinkel und α einem Faktor entsprechen. Der

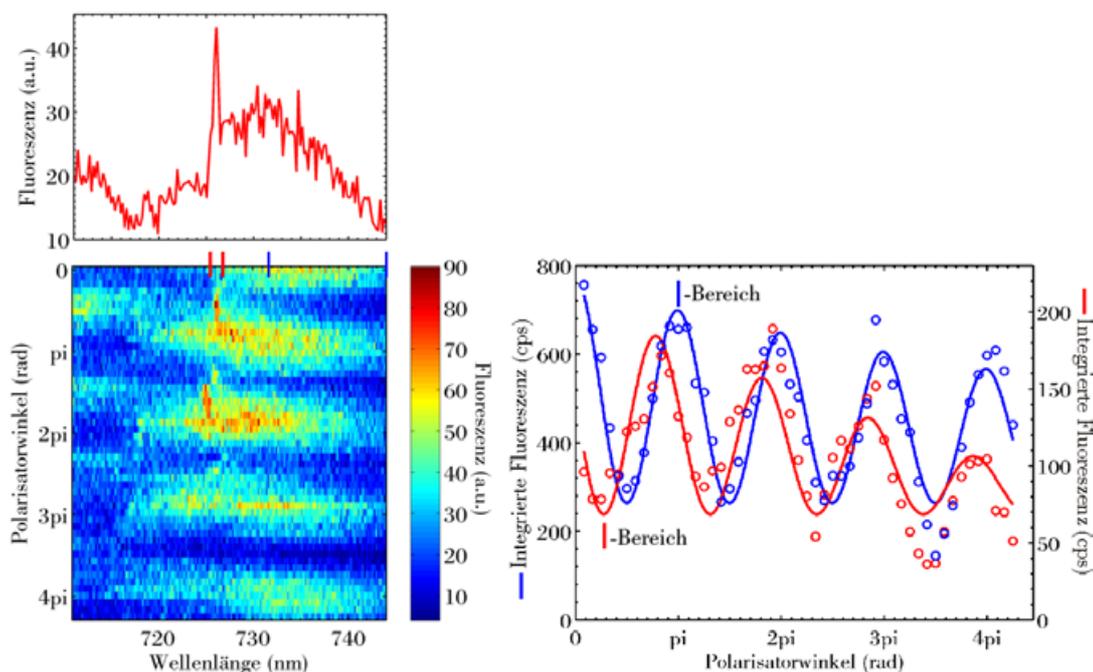


Abbildung 4.13: Fluoreszenz eines individuellen PS I-Monomers von *T. elongatus*. **Oben** wird ein stationäres Spektrum gezeigt, das ohne Polarisator aufgenommen wurde. Die Akkumulationszeit beträgt $t = 7$ s. Im Bild **links unten** ist die zugehörige polarisations-selektierte Spektrenfolge dargestellt. Die Winkelauflösung beträgt $7,5^\circ$ und unter jeder Polarisatorstellung wurde 3 s akkumuliert. Im **rechten Teil** geben die eingezeichneten Datenpunkte in der entsprechenden Farbe die jeweils über die im linken Bild gekennzeichneten Bereiche integrierte Intensität wieder. Die beiden Signale sind für einen besseren Vergleich auf zwei unterschiedlichen Skalen aufgetragen. Wie in Abb. 4.12 wurde die Null auf das Hintergrundsignal gelegt. Die Modulation ist verglichen mit der aus Abb. 4.12 weniger tief. Für die mit durchgezogener Linie eingezeichnete Anpassung wurde die Funktion Gl. 4.1 verwendet.

\sin^2 ist sinnvoll, da Polarisatorstellungen mit der Drehwinkeldifferenz von 180° messtechnisch nicht unterschieden werden können und die Periodenlänge π beträgt. Der Ausdruck $(\varphi_{\text{end}} - \varphi^\alpha)$ erfüllt den Zweck, den üblichen Photobleichprozess zu erfassen und in der Anpassung zu berücksichtigen. Die Fluoreszenzbande ist in hohem Maße linear polarisiert, was insbesondere anhand der großen Modulationstiefe etwa bis hin zum Hintergrundrauschen festgestellt werden kann. Die Modulationstiefe der anderen Bande oberhalb von $\lambda \geq 727$ nm wird durch die spektrale Überschneidung mit der vorderen Bande verringert. Nichtsdestoweniger lässt sich mit der Polarisationsanalyse für die am meisten rotverschobenen Bande genau ein Beitrag feststellen.

Auch polarisations-selektive Messungen unterliegen der Fluoreszenzdynamik, die den Messprozess zwingend überlagert. Während die vordere Bande bei ca. $\lambda \simeq 715$ nm über fünf Perioden fluoresziert, d.h. über eine Messzeit von mindestens ~ 280 s, fällt die hintere Bande bei ca. $\lambda \simeq 735$ nm nach ungefähr eineinhalb Perioden, d.h. nach einer Zeit von ~ 80 s, in einen Dunkelzustand oder in einen Zustand, der energetisch außerhalb des spektralen Detektionsbereichs liegt.

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

Tabelle 4.1: Statistik über die Anzahl der Polarisationsbeiträge in der roten Fluoreszenz pro PS I-Monomer. Die Fluoreszenz von 81 PS I-Monomeren der Spezies *T. elongatus* wurde daraufhin untersucht, wie viele linear polarisierte Beiträge jeweils mindestens nötig sind, um die individuellen polarisations-selektierten Spektrenfolgen zu reproduzieren, d.h. das Ergebnis ist eine untere Abschätzung. "Anz." steht für die Anzahl der Komplexe, "bB." für breite Bande und "m. ZPL", "o. ZPL" für mit bzw. ohne begleitende ZPL gleicher Polarisationsrichtung. Denkbare Kombinationen von "spektralen Formen", die nicht aufgeführt sind, wurden nicht beobachtet.

Beiträge	Anz.	spektr. Form	Anz.	Region in (nm)	Anz.	
1	15	o.ZPL	11	<716	3	
				>716	8	
		m.ZPL	4	<716	1	
				>716	3	
2	42	ZPL/bB	9	<716/>716	8	
				>716/<716	1	
		bB/bB	33	<716/>716	o.ZPL	18
					m.ZPL	8
				>716/>716	7	
3	24	ZPL/ZPL/bB	3	<716/<716/>716	2	
				<716/>716/>716	1	
		ZPL/bB/bB	18	<716/<716/>716	1	
				<716/>716/>716	17	
				<716/>716/>716	3	

Bei den 81 auf die Polarisations-eigenschaften ihrer Fluoreszenz untersuchten PS I-Monomeren ergibt sich häufig ein ähnlich eindeutiges Bild wie in Abbildung 4.12. Bei über einem Drittel der Monomere setzen sich rote Fluoreszenzbanden aus Beiträgen mit mehr als einer Polarisationsrichtung zusammen. In Abbildung 4.13 wird ein anderes Beispiel dafür gezeigt. Im oberen Teil ist ein Emissionsspektrum eingezeichnet, das ohne Polarisator aufgenommen wurde. Aus der am weitesten rotverschobenen Bande ragt bei ca. $\lambda \simeq 726$ nm eine scharfe Linie heraus. Im Bild darunter wird die polarisations-selektierte Spektrenfolge gezeigt. Aus dieser geht hervor, dass die Linie bei $\lambda \simeq 726$ nm interessanterweise anders polarisiert ist als die breite Bande. Im Bereich $\lambda \leq 720$ nm zeigt sich eine weitere Bande mit schwächerer Intensität, die sich ebenfalls in der Polarisationsrichtung unterscheidet. Am oberen Rand sind zwei spektrale Bereiche in den Farben rot und blau markiert. Der rot markierte Bereich erfasst insbesondere die scharfe Linie, während der blau markierte die Linie ausschließt. Die über diese Bereiche integrierte Intensität ist im rechten Bild über dem Polarisatorwinkel aufgetragen. Die einzelnen Datenpunkte sind durch Ringe der entsprechenden Farbe gekennzeichnet. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassungen der Funktion Gl. 4.1. Der Phasenunterschied im Polari-

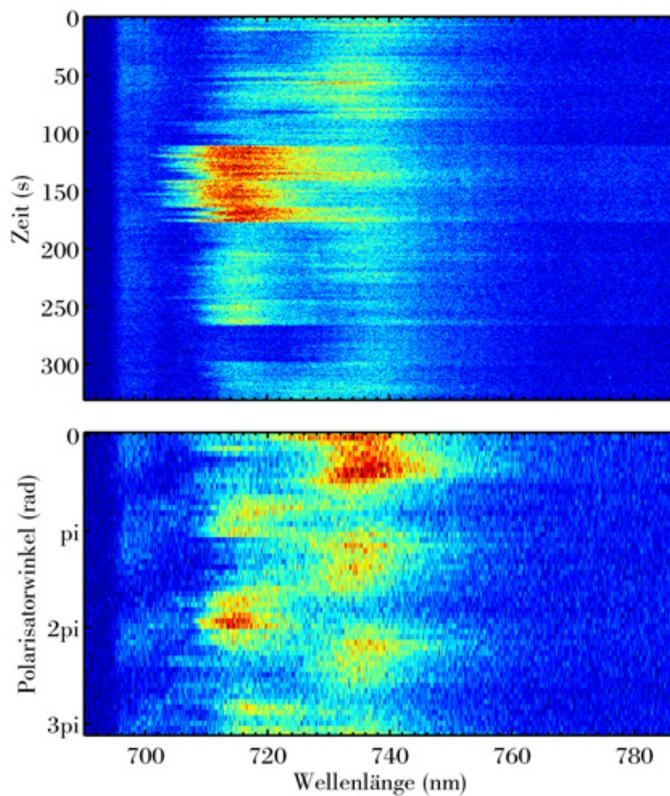


Abbildung 4.14: Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Trimers von *T. elongatus* in Falschfarbendarstellung. **Oben:** Anhand der Abfolge von Spektren lässt sich die spektrale Entwicklung in der Zeit verfolgen. Die Akkumulationszeit per Spektrum beträgt $t = 1$ s. Zusätzlich zur starken spektralen Diffusion zeigen sich starke lokale Intensitätsschwankungen. **Unten:** Aus der polarisations-selektierten Spektrenfolge wird klar ersichtlich, dass in der Hauptintensität mindestens zwei verschiedene Polarisationsrichtungen enthalten sind. Die beiden spektral aneinandergrenzenden bis sich überschneidenden Beiträge zeigen linear polarisiertes Licht mit einem Winkerversatz der beiden Richtungen von ca. $\sim 90^\circ$ zueinander. Die Winkelauflösung der Messung beträgt 10° und die Akkumulationszeit unter jeder Polarisatorstellung 3 s. Zur Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde bei den Messungen mit Polarisator die spektrale Auflösung verringert.

satorwinkel zwischen den beiden Spektralbereichen beträgt ca. 38° , d.h. die Polarisationsrichtung des vorderen Bereichs, der die scharfe Emissionslinie beinhaltet, weicht klar von der Polarisationsrichtung der restlichen Bande ab.

Gemäß Tabelle 4.1 lassen sich beim PS I in monomerer Form im stark rotverschobenen Spektralbereich bei 28 von 81 Monomeren zwei verschiedene Beiträge feststellen. In Tabelle 4.1 ist für 81 Monomere zusammengestellt, wie viele Beiträge jeweils mindestens nötig sind, um die individuellen polarisations-selektierten Spektrenfolgen zu reproduzieren. Die Tabelle ist so aufgebaut, dass die Details von links nach rechts zunehmen. Im rechten Teil wird zwischen spektralen Beiträgen < 716 nm und > 716 nm unterschieden, wobei die Einfärbung zur schnelleren Übersicht die Größe der Rotverschiebung signalisieren soll. Insgesamt beinhalten ca. 82 % der Monomere 2 – 3 Polarisationsbeiträge in ihrer bezüglich P700 rotverschobenen Fluoreszenz.

4.4.2 PS I in trimerer Form

Die Fluoreszenz der roten Chlorophylle eines PS I-Trimers ist im Vergleich zu der eines Monomers in der Regel vielfältiger. Im Bereich um $\lambda = 708$ nm tauchen häufiger mehrere scharfe Linien auf, und auch im stark rotverschobenen Spektralbereich beobachtet man mehr spektrale Dynamik und Intensitätsfluktuationen in der Zeit. Gelegentlich erwecken lokale Veränderungen in der roten breiten Bande den Anschein, dass sich mehrere

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

Beiträge spektral überschneiden. In Abbildung 4.14 wird ein entsprechender Fall präsentiert. Der PS I-Komplex stammt von der Spezies *T. elongatus*. Im oberen Teil ist eine Abfolge von Emissionsspektren dargestellt. Die Akkumulationszeit per Spektrum beträgt $t = 1$ s. Die Hauptintensität liegt in einer breiten Bande, die von ca. $\lambda \geq 700$ nm bis ca. $\lambda \leq 760$ nm reicht. Sie unterliegt sowohl einer starken spektralen Diffusion als auch starken lokalen Intensitätsschwankungen. Betrachtet man nur die ersten 100 s der Messung, gewinnt man den Eindruck, dass nur eine stark rotverschobene Bande vorherrscht, die große spektrale Fluktuationen zeigt. Die Messung über die gesamte Länge $t \geq 300$ s vermittelt ein ganz anderes Bild, das eher zwei Beiträge vermuten lässt. Der vordere Teil der Bande $700 \text{ nm} \leq \lambda \leq 726 \text{ nm}$ fällt mehrmals in einen transienten Dunkelzustand oder springt aus dem spektralen Detektionsbereich, nach ca. $t = 15$ s und $t = 265$ s über mehr als 20 s, während der hintere Teil $\lambda \geq 726$ nm stets weiterleuchtet. Insbesondere dieses Verhalten deutet verstärkt darauf hin, dass mehrere Emittoren zur Bande beitragen. Die darunter abgebildete polarisations-selektierte Spektrenfolge liefert schließlich den klaren Beweis, denn die Hauptintensität beinhaltet mindestens zwei verschiedene Polarisationen. Dies lässt sich so eindeutig feststellen, da die beiden Beiträge zwar spektral aneinander grenzen, sich sogar teilweise überschneiden, jedoch keineswegs vollständig überlagern. Zusätzlich beträgt der Winkelversatz ihrer beiden linearen Polarisationsrichtungen ca. $\sim 90^\circ$, wodurch sich die Banden deutlich voneinander trennen lassen. Aufgrund dessen, dass sich die beiden Emissionen teilweise dynamisch spektral überschneiden, erreicht die Modulationstiefe nicht das Hintergrundrauschen, wie es bei den Monomeren häufig der Fall ist. Durch die spektralen Überschneidungen von Banden bei einzelnen PS I-Trimeren entstehen häufig spektrale Strukturen, die mitunter auch nicht anhand einer Polarisationsanalyse klar aufgeschlüsselt werden können. Liegt z.B. der Fall vor, dass zwei gleich intensive Banden und einem Winkelversatz der Polarisationsrichtungen von 90° zueinander vollständig spektral überlappen, erwartet man eine nur schwache Modulation von 30 % vom Maximum. In der Praxis lassen sich auch bei Komplexen mit ungünstigen Bedingungen zumindest an den Rändern der Banden Modulationen feststellen (s. Abb. 4.16).

Auch die Fluoreszenz zwischen einzelnen PS I-Trimeren des Cyanobakteriums *Synechocystis* ist spektral stark heterogen. In Abbildung 4.15 ist die Emission eines ausgewählten Exemplars dargestellt. Im oberen Teil wird die spektrale Entwicklung in der Zeit präsentiert. Man erkennt eine scharfe Linie bei ca. $\lambda \simeq 702$ nm, die bis zu $\Delta\lambda \leq 2$ nm springt, und eine breite Bande im Bereich von $\lambda \geq 702$ nm bis ca. $\lambda \leq 732$ nm. Nach knapp $t \geq 75$ s bleicht ein Teil dieser Bande, so dass insbesondere ab $\lambda \geq 725$ nm die Intensität bis auf das Grundrauschen abfällt. Die Informationen der spektralen Entwicklung allein lassen keine klare Abschätzung über die Anzahl der Beiträge zu. Mit Hilfe der zugehörigen polarisations-selektierten Spektrenfolge, die nach dem oben erwähnten Bleichprozess im Anschluss an die ca. $t \simeq 150$ s aufgenommen wurde, können zwei sich teilweise spektral überschneidende Banden anhand ihrer um ca. $\sim 90^\circ$ verschiedenen Polarisationsrichtungen separiert werden. Eine erstreckt sich über ca. $700 \text{ nm} \leq \lambda \leq 720 \text{ nm}$ und die andere über ca. $709 \text{ nm} \leq \lambda \leq 730 \text{ nm}$. Erstere zeigt im Bereich von $700 \text{ nm} \leq \lambda \leq 704 \text{ nm}$

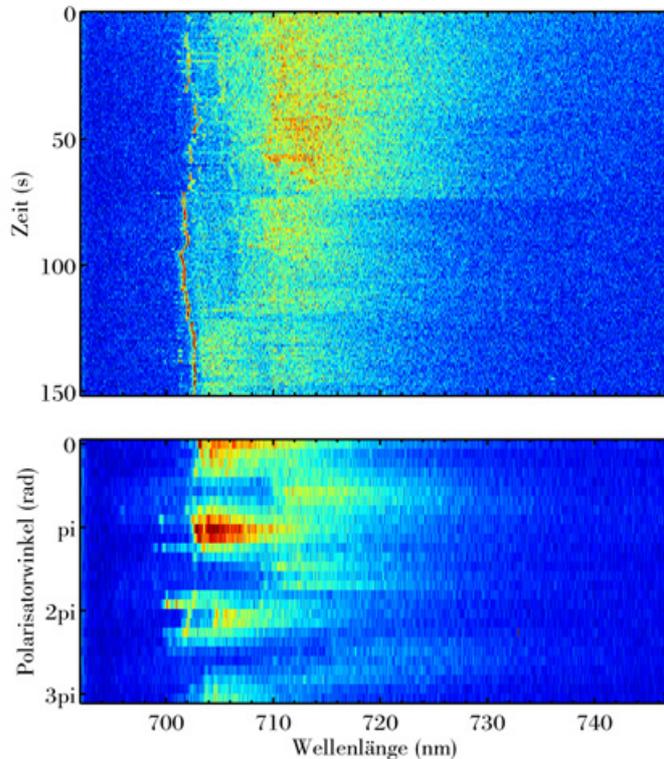


Abbildung 4.15: Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Trimers der Spezies *Synechocystis*. **Oben:** Analog zur Abb. 4.14 ist eine Spektrensequenz dargestellt. Die Akkumulationszeit per Spektrum beträgt wieder $t = 1$ s. Nach knapp $t \geq 75$ s bleicht ein Teil der breiten roten Bande, so dass insbesondere ab $\lambda \geq 725$ nm die Intensität bis auf das Grundrauschen abfällt. **Unten:** Gezeigt wird die zugehörige polarisations-selektierte Spektralfolge, die nach dem Bleichprozess aufgenommen wurde. Die Methode enthüllt mindestens zwei verschiedene Polarisationsrichtungen der Fluoreszenz, wobei der Winkelversatz der Beiträge ca. $\sim 90^\circ$ beträgt. (Winkelauflösung und Akkumulationszeit wie zuvor (10° und 3 s)).

bei π und 2π leicht ausgeprägte Intensitätslücken, so dass eine Doppelstruktur innerhalb einer Periode (π) entsteht. Dieses Verhalten deutet auf zwei Beiträge unterschiedlicher Polarisationsrichtung innerhalb der vorderen Bande $700 \text{ nm} \leq \lambda \leq 720 \text{ nm}$ hin. Der Bleichprozess hat sich während der polarisations-selektiven Messung weiter fortgesetzt, so dass die hintere Bande $709 \text{ nm} \leq \lambda \leq 730 \text{ nm}$ sich nach mehreren Perioden kaum noch vom Hintergrundrauschen abhebt. Anhand der vorliegenden Messdaten lassen sich nicht mehr als ein Beitrag an dieser Bande feststellen.

Die Fluoreszenz einzelner PS I-Trimere weist nicht nur eine starke spektrale Heterogenität auf, sondern verfügt ebenso über die unterschiedlichsten Polarisations-Merkmale. Um einen Eindruck zu vermitteln, sind in Abbildung 4.16 polarisations-selektierte Spektrenfolgen zweier individueller PS I-Komplexe zusammengestellt. Beide Trimere stammen von der Spezies *T. elongatus*. Im linken Bild sieht man im Bereich $704 \text{ nm} \leq \lambda \leq 707 \text{ nm}$ eine, später zwei simultan auftretende, scharfe Linien. In der gesamten Region $707 \text{ nm} \leq \lambda \leq 746 \text{ nm}$ bewegt sich eine breite rote Bande. Sämtliche Strukturen sind in hohem Maße linear polarisiert, wobei zusätzlich eine einheitliche Polarisationsrichtung vorliegt. Die Modulationstiefe reicht bis zum Grundrauschen. Der Komplex im rechten Bild verhält sich anders: Bei $\lambda \simeq 710 \text{ nm}$ taucht eine linear polarisierte scharfe Linie auf, die auf beiden Seiten von schwächerer Intensität gleicher Polarisationsrichtung begleitet wird. Eine breite rote Bande geht in diese Intensität über und reicht auf der niederenergetischen Seite bis $\lambda \geq 746 \text{ nm}$. Während die scharfe Linie bis auf das Hintergrundrauschen moduliert, kann bei der breiten Bande über eineinhalb Polarisatordrehungen nur eine sehr schwa-

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

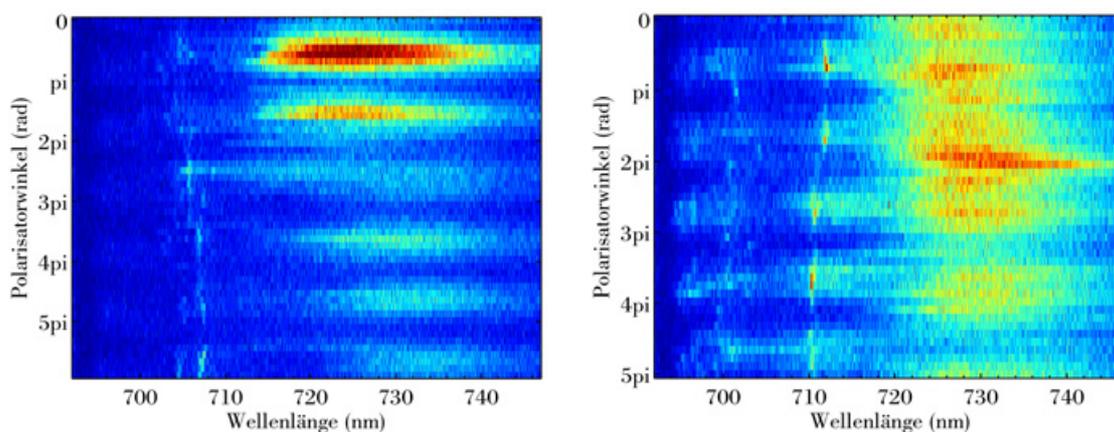


Abbildung 4.16: Polarisations-selektierte Spektrenfolgen der Fluoreszenz zweier PS I-Trimere von *T. elongatus*. Die Winkelauflösung beträgt 10° und unter jeder Polarisatorstellung wurde 3 s akkumuliert. **Links:** Die Modulationstiefe der breiten roten Bande erreicht in etwa das Hintergrundrauschen. Die Polarisationsrichtung aller Strukturen ist im Wesentlichen einheitlich. **Rechts:** Bis nach eineinhalb Polarisatordrehungen zeigt die breite rote Bande keine klare Modulation. Erst ab 3π stellt sich eine Modulation ein. Die Ursache liegt im Photobleichen einer der beiden Beiträge in diesem Spektralbereich.

che Modulation festgestellt werden, die zudem von Intensitätsfluktuationen überlagert wird. Nach einem Drehwinkel von 3π gewinnt die Bande deutlich an Modulationstiefe. Das spricht dafür, dass der oben erläuterte Fall vorliegt: Zwei fast vollständig spektral überlagerte Beiträge mit sich um nahezu 90° unterscheidenden Polarisationsrichtungen bewirken, dass keine tiefe Modulation beobachtet wird. Nach den eineinhalb Polarisatordrehungen photobleicht der eine Beitrag wesentlich stärker als der andere, so dass sich eine wachsende Modulationstiefe ergibt.

4.5 Vergleich der Fluoreszenz einzelner Komplexe mit der eines Ensembles

Ein interessanter Aspekt der Untersuchung einzelner PS I-Komplexe besteht darin, ob aus der Summe von mehreren Einzelmolekül-Spektren von isolierten PS I-Partikeln das Emissionsspektrum des entsprechenden PS I-Ensembles produziert werden kann. Dazu sind in der Abbildung 4.17 verschiedene Fluoreszenzspektren gegenübergestellt. Alle dort gezeigten Spektren sind bei tieferen Temperaturen als 5 K aufgenommen worden. Die Graphen auf der linken Seite stammen von PS I-Proben der Spezies *T. elongatus* und die der rechten von der Spezies *Synechocystis*. Mit schwarzer Linienfarbe sind jeweils die entsprechenden Ensemble-Spektren aus der Literatur aufgetragen. Genaue Angaben der verwendeten Parameter werden in der Bildunterschrift gegeben. Um festzustellen, ob die mit unserem konfokalen Aufbau gemessenen Spektren sich nicht stark von den aus der Literatur entnommenen Spektren unterscheiden, werden mit blauer Linienfarbe zum di-

4.5 Vergleich der Fluoreszenz einzelner Komplexe mit der eines Ensembles

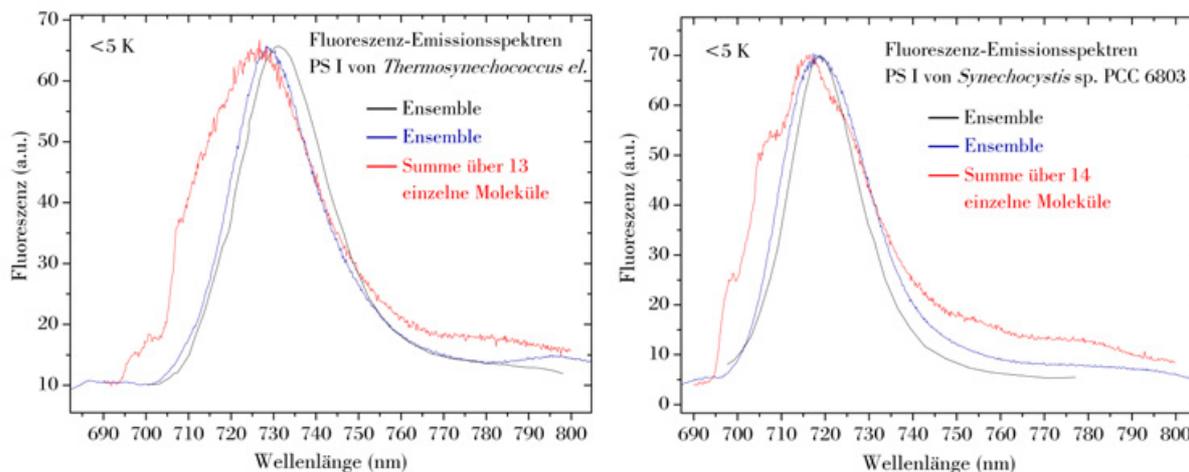


Abbildung 4.17: Fluoreszenzspektren vom cyanobakteriellen Photosystem I. Bei der Darstellung wurde jeweils auf das Maximum normalisiert. **Links:** von *T. elongatus* Trimeren. Die Spektren sind anhand ihrer Linienfarben wie folgt zugeordnet: schwarz: Ensemble-Spektrum aus Pålsson *et al.* (1996) [Pål96], gemessen bei 4 K mit einer Anregungswellenlänge von 696 nm. Blau: Ensemble-Spektrum, aufgenommen mit unserer Apparatur mit einer Anregungswellenlänge von 636 nm bei 1,4 K. Rot: Summe über die Einzelmolekül-Spektren von 13 verschiedenen PS I-Komplexen bei einer mittleren Aufnahmezeit von jeweils ca. 120 s und einer Anregungswellenlänge von 678 nm bei 1,4 K. **Rechts:** von *Synechocystis*. Hier sind folgende Spektren dargestellt: schwarz: Ensemble-Spektrum von PS I-Monomeren aus Gobets *et al.* (1994) [Gob94], gemessen bei 4 K mit einer Anregungswellenlänge von 693,5 nm. Blau: Ensemble-Spektrum von PS I-Trimeren, aufgenommen mit unserer Apparatur mit einer Anregungswellenlänge von 636 nm bei 1,4 K. Rot: Summe über die Einzelmolekül-Spektren von 14 verschiedenen PS I-Trimeren bei einer mittleren Aufnahmezeit von jeweils ca. 100 s und einer Anregungswellenlänge von 678 nm bei 1,4 K.

rekten Vergleich Ensemble-Spektren präsentiert, die mit unserer Apparatur aufgenommen wurden. Die Konzentration der Probe lag bei ca. 20 nM PS I. Das Rasterbild einer solchen Probe zeigt gut voneinander separierte Punkte hoher Intensität (bis zu 10^7 cps). Bei dieser Konzentration haben die PS I-Komplexe scheinbar teilweise größere Aggregate gebildet. Die Anzahl der sich im konfokalen Volumen befindlichen PS I-Komplexe wird auf > 130 abgeschätzt. Dieser Wert liegt erfahrungsgemäß viele Größenordnungen unterhalb der Teilchenzahlen von den in der Literatur gezeigten Spektren. Bei Berücksichtigung eines Messfehlers der absoluten spektralen Position von max. ± 1 nm werden nichtsdestotrotz keine größeren Abweichungen beobachtet. Beim PS I von *T. elongatus* ist einzig die absolute spektrale Lage um ca. 2 – 3 nm verschoben, und beim PS I von *Synechocystis* wurde von uns eine um ca. 4 nm erhöhte Linienbreite gemessen. Im Gegensatz zu diesen geringfügigen Abweichungen fällt beim Betrachten der beiden jeweiligen Summen von Einzelmolekül-Spektren, in roter Linienfarbe eingezeichnet, unmittelbar eine signifikante Diskrepanz zu den Ensemble-Spektren auf. Diese besteht in einer deutlich größeren Intensität auf der vom Maximum ausgehenden energetisch höher gelegenen Seite. Um zu Verstehen, woher diese zusätzliche Intensität stammt, benötigt man einen Einblick in alle Einzelspektren über die jeweils aufsummiert wurde. Die Summenspektren beider Spezies

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

sind entstanden, indem jeweils bei 13 bzw. 14 einzelnen, isolierten PS I-Komplexen im Mittel mehr als 100 Spektren über je 1 s aufgenommen wurden. Bei jedem individuellen Einzelmolekül-Spektrum werden ZPLs beobachtet, die eine starke spektrale Diffusion zeigen. Erfahrungsgemäß nehmen die einzelnen Linien während eines Zeitraums von mehr als 100 s in der Regel alle Positionen ein, die von der jeweiligen Linie unter den gegebenen Messbedingungen eingenommen werden können, bevor die Fluoreszenz aufgrund von Photobleich-Prozessen nicht mehr zugänglich ist. Bei dem Aufsummieren der Spektren über mehrere PS I-Komplexe überlagern und erweitern sich die spektralen Bereiche, in denen sich ZPLs aufhalten. Da die Intensität der scharfen Linien bei jedem einzelnen Spektrum im Vergleich zur restlichen beobachteten Intensität ins Gewicht fallen, ändert sich auch bei Hinzunahme der Einzelmolekül-Spektren von weiteren PS I-Komplexen an der spektralen Form des jeweiligen Summenspektrums nichts grundlegend, d.h. die spektrale Verteilung der Intensität konvergiert bereits nach der Berücksichtigung weniger Komplexe. Daher stellt sich die Frage, warum beim PS I-Ensemble keine ZPLs auftreten, die energetisch zwischen P700 und dem am weitesten rotverschobenen Zustand liegen. Der einzige Unterschied zwischen dem Ensemble und der Summe mehrerer isolierter Partikel besteht in der räumlichen Nähe. Da bereits bei der Isolation der PS I-Komplexe aus der Membran und der weiteren Präparation der PS I-Stammlösung mit Hilfe eines Detergenz gearbeitet wird, das sich wie eine Schutzhülle um jeden einzelnen PS I-Komplex anordnet, erscheint eine Aggregation sehr unwahrscheinlich. Gegen die Ausbildung von Aggregaten spricht auch, dass durch starke Verdünnung eine Lösung mit gut verteilten voneinander isolierten Molekülen entsteht (s. Abschnitt 3.3.2). Dies ist nicht selbstverständlich, da auch einige wenige PS I-Stammlösungen einer anderen Spezies vorhanden waren, bei denen die kritische Löslichkeits-Konzentration (CSC) [Muh05] unterschritten war. Die Verdünnung dieser Proben führte zu einigen wenigen Molekül-Clustern, so dass beim Abrastern der Probe mit dem konfokalen Mikroskop über große Bereiche ($> 100 \times 100 \mu\text{m}^2$) kein Fluoreszenzsignal gefunden wurde. Jedoch konnte bei einer solchen Probe mit geringer Wahrscheinlichkeit ein einzelner Punkt mit einer durch die Auflösung begrenzten lateralen Ausdehnung entdeckt werden, von dem eine um einige Größenordnungen höhere Intensität ausging als von einem einzelnen PS I-Komplex. Dieses Verhalten tritt jedoch bei einer akkurat präparierten Probe nicht auf. Daher erscheint insgesamt ein direkter intermolekularer Austauschmechanismus sehr unwahrscheinlich und kann somit auch nicht die Ursache für die effiziente Auslöschung der Emission von ZPLs im diskutierten spektralen Bereich sein.

Eine Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen den zwar voneinander isolierten jedoch dicht beieinander gelegenen PS I-Komplexen im Ensemble besteht im Überlapp von Absorption und Emission. In der Literatur wird diesbezüglich mittels Ensemble-Spektroskopie am PS I-LHC I-Superkomplex der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ein ähnlicher Effekt festgestellt [Gib05]. Bei Anregung einer Probe der Verdünnung $\text{OD}_{679 \text{ nm}} = 0,11 \text{ cm}^{-1}$ in die Soret-Bande bei 4 K wird das spektrale Maximum der Fluoreszenz bei $\lambda = 712,6 \text{ nm}$ beobachtet. Eine Erhöhung der Konzentration auf $\text{OD}_{679 \text{ nm}} = 5,5 \text{ cm}^{-1}$ führt zu einer energetischen Verschiebung des Maximums auf ca. $\lambda \simeq 715 \text{ nm}$, was die Autoren

4.5 Vergleich der Fluoreszenz einzelner Komplexe mit der eines Ensembles

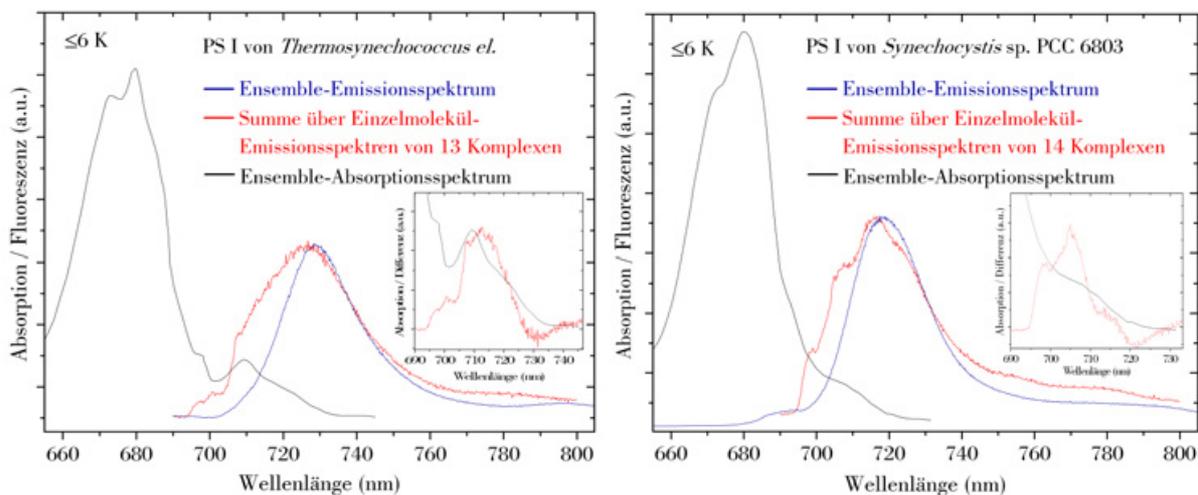


Abbildung 4.18: Emissions- und Absorptionsspektren vom cyanobakteriellen PS I, **links:** von *T. elongatus* und **rechts:** von *Synechocystis*. Die Spektren in roter und blauer Linienfarbe sind erneut die jeweiligen Summen der Einzelmolekül-Emissionsspektren und die ebenfalls von uns gemessenen Ensemble-Emissionsspektren wie in Abbildung 4.17. Die schwarz eingezeichneten Spektren stellen hier die Absorption des jeweiligen PS I-Ensembles dar. Die Absorptionsspektren sind aus [Gob01a] entnommen und bei 6 K gemessen worden. Zur besseren Sichtbarmachung der Absorption im roten Spektralbereich wurden die Absorptionsspektren im Maximum bei ca. 680 nm auf den doppelten Wert auf der Intensitätsskala der Emission vom jeweiligen Emissionsmaximum angehoben. **Einfügungen:** Differenz-Spektren der jeweiligen Emissionsspektren in roter Linienfarbe und der entsprechende Ausschnitt aus den Absorptionsspektren in schwarzer Linienfarbe.

auf eine Selbst-Absorption und Wieder-Emission zurückführen. Um diese Variante in unserem Fall zu überprüfen, sind in der Abbildung 4.18 noch einmal die jeweiligen Summen der Einzelmolekül-Emissionsspektren und die ebenfalls von uns gemessenen Ensemble-Emissionsspektren dargestellt. Zusätzlich sind jeweils zugehörige Ensemble-Absorptionsspektren aus der Literatur mit eingezeichnet. Insbesondere beim PS I von *T. elongatus*, hier erneut auf der linken Seite abgebildet, ist deutlich erkennbar, dass die spektrale Lage des roten Absorptionsmaximums akkurat mit der Position der größten Aufenthaltswahrscheinlichkeit von den ZPLs, die im Ensemble nicht auftauchen, zusammenfällt. In dem eingefügten Bild wird hierzu das Differenzspektrum von dem Summenspektrum der Einzelmolekül-Emissionsspektren und dem Ensemble-Emissionsspektrum dargestellt, um die Günstigkeit des Überlapps mit der roten Absorption noch deutlicher herauszustellen. Auch beim PS I der Spezies *Synechocystis* sind die Gegebenheiten des entsprechenden spektralen Überlapps günstig. Daher wird der Mechanismus der Reabsorption als Ursache der Auslöschung der ZPLs im besagten spektralen Bereich als wahrscheinlich erachtet. Es wurden auch einige Messungen an verschieden großen PS I-Agglomeraten durchgeführt. Die relative Größe der Agglomerate kann dabei anhand der jeweiligen Intensität abgeschätzt werden. Auffällig bei diesen Messungen ist, dass bei kleineren Agglomeraten sich häufig ansatzweise breite Linien im mittleren roten Spektralbereich aus dem Rauschen abzeichnen, während die größeren Agglomerate schließlich spektrale Verläufe

wie ein Ensemble aufzeigen. In diesem Segment haben nur qualitative Untersuchungen stattgefunden. Dennoch wird obiger Lösungsansatz durch diese Messungen gestützt.

4.6 Diskussion

Analog zum Ergebnis aus der konventionellen Ensemble-Spektroskopie (s. Abb. 4.17) unterscheiden sich auch die Einzelmolekül-Spektren der roten Chlorophylle vom PS I verschiedener Spezies voneinander. Im Abschnitt 4.2 wurden stationäre Emissionsspektren individueller PS I-Komplexe bei 1,4 K von drei verschiedenen Cyanobakterien vorgestellt: *T. elongatus*, *Synechocystis* und der bislang spektroskopisch wenig untersuchten Spezies *Synechococcus* sp. PCC 7002. Der jeweils mittlere spektrale Schwerpunkt schiebt von *T. elongatus* über *Synechocystis* bis *Synechococcus* sp. PCC 7002 auf weniger rotverschobene Positionen, d.h. von $\lambda_M = (727 \pm 1)$ nm über $\lambda_M = (715 \pm 3)$ nm bis $\lambda_M = (704 \pm 4)$ nm. Eine neue Information, die Ensemble-Methoden verborgen bleibt, liegt in der starken spektralen Heterogenität zwischen den einzelnen PS I-Partikeln einer Spezies. In den Abbildungen 4.1, 4.2 und 4.4 werden jeweils einige Fluoreszenzspektren individueller PS I-Trimere präsentiert. Man erkennt, dass nicht nur der spektrale Schwerpunkt in der Lage variiert, sondern auch spektrale Merkmale sich verändern. Insbesondere tauchen schmale Emissionslinien auf, die sich in Gestalt, spektraler Position und Intensität unterscheiden. Dieses Phänomen der Inhomogenität wird bei verschiedenen Proteinmolekülen mit identischer Primärsequenz erwartet. Der Unterschied liegt in der Tertiärstruktur des Proteins. Einen guten Übersichtsartikel findet man in Ref. [Fra99]. Parallel zum PS I haben Rutkauskas *et al.* am LH2 anhand der spektralen Diffusion des Fluoreszenzmaximums die natürliche konformative Entwicklung bei physiologischer Temperatur verfolgt [Rut06]. Nach Anregung relaxiert der Proteinkomplex zurück in einen natürlichen Gleichgewichtszustand. Bei einem Viertel der Partikel endet die konformative Entwicklung in der Ausbildung eines anderen spektroskopischen Zustands. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen fanden bei 1,4 K statt. Wie im Abschnitt 3.2.4 beschrieben, wurden die Proben schockgefroren. Durch diesen Prozess werden von Molekül zu Molekül unterschiedliche Konformationen des Proteinrückgrats festgehalten. Der jeweils eingefrorene Mikrozustand hängt dabei von der Vorgeschichte ab. Im Einfrieren verschiedener Konformationssubzustände, deren Energiebarrieren bei 1,4 K nicht überwunden werden, liegt die Ursache für die beobachtete Heterogenität verschiedener PS I-Komplexe einer Spezies (vergl. Abschnitt 1.2.3).

Bei starker Verkürzung der Akkumulationszeit von der Minutenskala auf die Sekundenskala zeigen die Fluoreszenzspektren der PS I aller drei untersuchten Spezies scharfe Linien. Sie tauchen hauptsächlich in den Bereichen der Spektren auf, in denen sich bei langer Akkumulation schmale Emissionsbanden bis ca. 200 cm^{-1} ($\hat{=} \sim 10 \text{ nm}$) Breite ausbilden, die mitunter auch auf breitere Banden aufgesetzt sind. Dieses Phänomen zeigt sich insbesondere bei ca. einem Viertel der untersuchten PS I-Komplexe von *T. elongatus*

im Bereich der am weitesten rot verschobenen Fluoreszenzbande. Die ermittelte Zeitabhängigkeit des Verbreiterungsprozesses von der Sekunden- auf die Minutenskala führt beim PS I von *T. elongatus* in allen drei untersuchten Spektralbereichen von $\lambda = 708$ nm über $\lambda = 723$ nm bis $\lambda = 733$ nm auf einen Faktor von ~ 10 . Entsprechende Beispielspektren werden in Abbildung 4.5 gezeigt. Die Zeitabhängigkeit der Linienbreite beweist, dass spektrale Diffusion die wesentliche Ursache der Linienverbreiterung ist. In der Regel wird nach einer Zeitspanne von ca. einer Minute eine Sättigung der Verbreiterung erreicht, d.h. der zugängliche Energiebereich des abstrahlenden Zustands ist begrenzt. Der zugehörige Koordinatenbereich in der Energielandschaft besitzt demnach an den Rändern Energiebarrieren, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht überwunden werden können. Energiebarrieren innerhalb dieser begrenzten Region hingegen können offenbar passiert werden. Das zeigt, dass bei einer Temperatur von 1,4 K „kleinere“ Konformationsänderungen stattfinden können, d.h. das Maß an Freiheitsgraden im Protein wird durch die niedrige Temperatur eingeschränkt aber nicht gänzlich eingefroren. Im Abschnitt 5.3 wird später gezeigt, dass die Fluktuationen lichtinduziert sind.

In einigen auf der Minutenskala akkumulierten Spektren treten zwei oder mehr Linien nebeneinander im Abstand weniger Nanometer zueinander auf. Mittels der Aufnahme einer Sequenz von kurz akkumulierten Spektren von ca. 1 s Länge klärt sich, ob die Linien auch auf der Sekundenskala simultan auftauchen. Häufig ergibt sich dabei das in Abbildung 4.7 oben dargestellte Bild, dass die Signale auf den verschiedenen spektralen Positionen antikorrelieren. Dieses Verhalten deutet daraufhin, dass die Linien von einem einzigen Emitter erzeugt werden. Eine andere Variante wäre, dass zwei verschiedene Emitter abwechselnd über den Energietransfer versorgt werden. Dabei muss ein Kanal vollständig geschlossen sein, während der andere aktiv ist. Diese Möglichkeit wird als unwahrscheinlich erachtet, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Falls die Sprungrate einer Linie größer als die inverse Akkumulationszeit von $t > 1$ s ist, kann anhand der Datenlage nicht entschieden werden, ob die Emissionen der beiden Positionen korrelieren und somit auf jeden Fall mindestens zwei Emitter verantwortlich sind. Auch dieses Verhalten wurde häufig beobachtet.

In Abbildung 4.9 sind die Energiebereiche der scharfen Linien für die untersuchten PS I-Komplexe der drei Spezies zusammengestellt. Beim PS I von *T. elongatus* zeichnen sich zwei voneinander separierte Bänder ab. Das eine liegt bei ca. $703 \text{ nm} \leq \lambda \leq 713 \text{ nm}$ und das zweite bei größeren Wellenlängen als $\lambda \geq 723 \text{ nm}$. Im Spektralbereich zwischen 716 nm und 723 nm wurde keine scharfe Linie ermittelt. Zum Band $\lambda \geq 723 \text{ nm}$ trägt nur ca. ein Viertel der zum anderen Band beisteuernden Komplexe bei. Scharfe Linien in der Region um 712 nm wurden am einzelnen PS I von *T. elongatus* zum ersten Mal von Jelezko *et al.* in Fluoreszenzanregung und Fluoreszenz nachgewiesen [Jel00]. Die Autoren haben die Linien Null-Null-Übergängen zugeschrieben, d.h. die Linien als Null-Phononen-Linien (ZPLs) interpretiert. Der spektralen Lage zufolge wurden die ZPLs dem roten Chlorophyll-Verband C708 aus [Pål96, Pål98] zugeordnet. Die Existenz der ZPLs in der Region um 708 nm wird durch das in dieser Arbeit systematisch gemessene Band

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

703 nm $\leq \lambda \leq$ 713 nm in der Emission verifiziert. In der Darstellung von Abbildung 4.9 erkennt man, dass ein einzelner PS I-Komplex allein in seinem eingefrorenen übergeordneten Konformationszustand nur einen Teil zum Band 703 nm $\leq \lambda \leq$ 713 nm beiträgt. Die gesamte spektrale Spanne der Bande wird aus den Emissionen mehrerer individueller PS I-Komplexe ersichtlich. Die ZPLs, von denen das zweite Band $\lambda \geq$ 723 nm aufgespannt wird, halten sich in der spektralen Region des von Pålsson *et al.* als C719 deklarierten roten Chlorophyll-Verbands auf [Pål96, Pål98]. Im Energiebereich des von Zazubovich *et al.* zusätzlich angegebenen C715 aus [Zaz02b] wurden keine scharfen Linien beobachtet.

In Ref. [Ril07] wird behauptet, dass einzelne PS I-Komplexe von *Synechocystis* nur eine breite strukturlose Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei ca. 720 nm zeigen. Aus dem Fehlen von ZPLs in der Region des in [Hay00] als C706 bezeichneten Chlorophyll-Verbands wird auf einen effektiven Energietransfer zwischen den Verbänden C706 und C714 aus [Rät00, Hay00] geschlossen, wobei eine Transferzeit von \sim 5 ps angegeben wird. Entgegen diesen Mutmaßungen sehen wir scharfe ZPLs in der Fluoreszenz vom PS I von *Synechocystis*. Die zugehörigen spektralen Energiebereiche sind in Abbildung 4.9 oben rechts eingetragen. Die Emissionen enthalten keine spektrale Lücke wie die vom PS I von *T. elongatus*, so dass, falls verschiedene rote Chlorophyll-Verbände beteiligt sind, sich ihre Bänder spektral überschneiden. Die ZPLs in der Region um $\lambda \simeq$ 706 nm bzw. $\lambda \simeq$ 708 nm liegen im Bereich des von Gobets *et al.* eingeführten Verbands C708 [Gob94], der von Rätsep *et al.* verifiziert wurde [Rät00] und, wie oben erwähnt, von Hayes *et al.* als C706 bezeichnet wurde [Hay00]. Im für das PS I dieser Spezies stark rotverschobenen Energiebereich $\lambda \geq$ 715 nm wurden nur bei ca. 20 % der Komplexe scharfe ZPLs beobachtet. Die Fluoreszenz in dieser Region zeigt vorwiegend bis zu 20 nm breite Banden, bei denen häufig eine starke spektrale Diffusion festgestellt wurde, wie in Abbildung 4.10 im rechten Beispiel zu sehen ist. Diese Eigenschaft scheint für diesen Spektralbereich, ähnlich wie beim PS I von *T. elongatus*, charakteristisch zu sein. Im Vergleich ist sie beim PS I von *Synechocystis* stärker ausgeprägt, d.h. im stark rotverschobenen Bereich werden weniger häufig scharfe ZPLs festgestellt und die spektrale Diffusion ist größer. Die Bande aus Abbildung 4.10 rechts springt insgesamt bis zu ca. $\Delta\lambda \leq$ 20 nm. Dabei erstreckt sich die Region der Bewegung über den gesamten Emissionsbereich eines anderen Komplexes, dessen Fluoreszenz im Bild links daneben dargestellt ist. Dieser zweite Komplex zeigt bei unserer Zeitauflösung zwei simultan auftretende breite Banden. Ob die beiden Signale antikorrelieren, kann nicht entschieden werden. Daher ist unklar, wie viele Emittter die beiden Banden erzeugen. Beim erstgenannten Komplex hingegen fluktuiert eine einzelne vollständige Bande innerhalb der Zeitauflösung. Dass bei 1,4 K eine spektrale Verschiebung über knapp 400 cm⁻¹ ($\hat{=}$ \sim 20 nm) von einer weit entfernt stattfindenden Störung ausgelöst wird, ist unwahrscheinlich. Unter der Annahme einer lokalen Störung spricht das beobachtete Verhalten dafür, dass die Fluoreszenz der Bande von einem einzigen Emittter stammt. Denn bei zwei Beiträgen ist kein spektrales Springen einer in sich geschlossenen Bande zu erwarten, sondern vielmehr eine zumindest überlagerte Fluktuation der spektralen Ausdehnung der Bande. Insgesamt konnten in der Region beider aus der Ensemble-Spektroskopie bekannten roten Chlorophyll-Verbände C706/C708 und C714

ZPLs nachgewiesen werden. Der Grund dafür, dass die Autoren aus Ref. [Ril07] keine ZPLs beobachtet haben, liegt in der Wahl ungeeigneter Messparameter, wie zu niedriger Anregungsleistung und zu langen Akkumulationszeiten, wobei vermutlich zusätzlich das Auflösungsvermögen ihrer Messapparatur nicht ausreichend ist.

Auch in der Fluoreszenz der roten Chlorophylle des PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 wurden ZPLs beobachtet. Ihre Rotverschiebung gegenüber P700 fällt mit $\lambda \leq 705$ nm bei den meisten Komplexen im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Spezies gering aus. Bei ca. 10 % der untersuchten Partikel wurden scharfe Linien im Bereich $712 \text{ nm} \leq \lambda \leq 723$ nm beobachtet, d.h. trotz der kleineren Rotverschiebung der Fluoreszenz insgesamt zeigen sich zumindest in Ausnahmefällen stärker rotverschobene ZPLs. Beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 gibt es in der Literatur keine spektrale Einordnung der roten Chlorophylle. Der größte Teil der aufgetretenen ZPLs bildet ein Band mit mittlerer Lage bei $\lambda \simeq 698$ nm. Im Vergleich zu den beiden anderen in dieser Arbeit untersuchten Organismen wurden beim PS I dieser Spezies die stärksten spektralen Fluktuationen festgestellt und, dass sich die unterschiedlichen Emissionsbanden auch stärker gegenseitig durchmischen.

Die Untersuchung der Fluoreszenz von PS I-Monomeren hilft, die spektrale Vielfalt zu reduzieren. Das spektrale Grundmuster unterscheidet sich nicht von dem der PS I-Trimere, was auf eine Intaktheit der Monomerprobe hinweist. Der mittlere spektrale Schwerpunkt liegt um ~ 1 nm blauverschoben bei ca. $\lambda_M = (726 \pm 1)$ nm. Da im Monomer nur ein Satz roter Chlorophyll-Verbände vorliegt, kann das Durchmischen von jeweils drei gleichen Beiträgen eines Verbandes zum Fluoreszenzspektrum, wie beim Trimer erwartet, ausgeschlossen werden. Diese Eigenschaft ist ausschlaggebend, um einzelne Beiträge zur Fluoreszenz anhand ihrer Polarisation zu isolieren. Nur Monomere bieten die Möglichkeit, die Anzahl der Emissionsbeiträge sinnvoll zu bestimmen und Merkmale zu ordnen, d.h. welche Charakteristika wie häufig in welchem Spektralbereich vorkommen. In Tabelle 4.1 sind Ergebnisse aus einer systematischen Polarisationsanalyse zusammengestellt. Die größte gefundene Anzahl von Polarisationsbeiträgen in der gegenüber P700 rotverschobenen Region ist drei und die kleinste eins. Letztere Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass nicht bei jedem PS I-Komplex in seinem individuell eingefrorenen übergeordneten Konformationszustand alle enthaltenen roten Chlorophyll-Verbände abfluoreszieren, da entweder bestimmte Energietransferkanäle bevorzugt bzw. andere gestört werden oder die gesamte Anregungsenergie ungehindert bis zum energetisch tiefsten Zustand laufen kann. Dies wäre auch ein Hinweis darauf, dass zwischen den roten Pigment-Verbinden ein effektiver Energietransfer stattfinden kann. Das Ergebnis von maximal drei Beiträgen lässt darauf schließen, dass pro PS I-Monomer von *T. elongatus* genau drei Emittter zur roten Fluoreszenz beisteuern. Dieses Resultat stimmt dem Ergebnis aus Ref. [Zaz02b] zu, in der ebenfalls von drei roten Zuständen ausgegangen wird, die sich aus zwei exzitonisch gekoppelten Dimeren und einem exzitonisch gekoppelten Trimer von Chl a-Molekülen zusammensetzen. Die Anzahl von sieben Chl a wurde mittels Dekonvolution von Ensemble-Absorptionsspektren mit Gaußkomponenten bestimmt.

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

Die Autoren gingen von insgesamt 96 Chl a pro Monomer aus [Jor01], während in der Studie [Pål96] noch von 110 Chl a ausgegangen wurde. Die dort gefundene untere Grenze von neun roten Pigmenten ist somit mit dem Ergebnis in [Zaz02b] verträglich. Mit dem Einzelmolekül-Experiment ist über die Berechnungen aus den Ensemble-Experimenten hinaus der direkte Nachweis von drei roten Zuständen gelungen. Zusätzlich können direkt Informationen über die Eigenschaften der Emitter gewonnen werden. Dabei spielt die spektrale Dynamik eine entscheidende Rolle. Die einzelnen Emissionen eines Komplexes lassen sich anhand ihrer spektralen Form in die beiden Kategorien „scharfe ZPL“ und „breite Bande“ einteilen. Beide Typen sind in ihrer spektralen Dynamik zwischen den individuellen Komplexen heterogen und kommen sowohl im Spektralbereich $\lambda \leq 716$ nm als auch in der Region $\lambda \geq 716$ nm vor. Mögliche Kombinationen werden aus Tabelle 4.1 ersichtlich. Im stark rotverschobenen Bereich wurden bei knapp 35 % der Monomere zwei breite Banden gefunden. In ca. 14 % der Fälle wurde eine breite rote Bande von einer ZPL gleicher Polarisationsrichtung begleitet. In einem Fall von 81, der in Abbildung 4.13 gezeigt wurde, besitzt die ZPL eine andere Polarisationsrichtung als die breite Bande. Dieses Ergebnis zeigt direkt, dass in der Region des C719-Verbands mindestens zwei der drei zur Verfügung stehenden Zustände emittieren können. Daher erscheint eine pauschale Zuordnung eines in Ref. [Jor01] vorgeschlagenen Kandidaten zum C719 eventuell nicht sinnvoll. Der mit 65 % größte Teil der Komplexe zeigt in dem Bereich nur einen oder keinen Beitrag. Dies könnte darauf hindeuten, dass zumindest ein roter Kandidat existiert, der bevorzugt den energetisch tiefsten Zustand bildet. Jedoch gibt es an dieser Stelle keinen Hinweis darauf, dass ein wesentlicher Teil der 65 % von ein und demselben Pigment innerhalb PS I herrührt.

Im Gegensatz zu der Fluoreszenz der Monomere zeigt die der PS I-Trimere häufig mehr als drei Polarisationsbeiträge im gegenüber P700 rotverschobenen Spektralbereich. In der Region $\lambda \geq 716$ nm tauchen bei mehr als 90 % der Komplexe zwei oder mehr Beiträge auf. Für die restlichen < 10 %, bei denen nur ein oder kein tiefster Zustand abfluoresziert hat (vergl. Abb. 4.16 links), liefert folgendes Phänomen eine Erklärungsmöglichkeit. Häufig wird beobachtet, dass einer der roten Zustände nach einer gewissen Messzeit in einen Dunkelzustand fällt oder in einen Zustand, der energetisch außerhalb des spektralen Detektionsbereichs liegt, wie in Abbildung 4.12 am Beispiel eines Monomers und in Abbildung 4.16 am Beispiel eines Trimers nachvollzogen werden kann, so dass danach ein Polarisationsbeitrag fehlt. Geschieht dies von Beginn der Messung an, sind ein oder mehrere Emitter für die Messung nicht nachweisbar. Ein weiterer Erklärungsansatz besteht in einer bestimmten Orientierung der betreffenden Komplexe gegenüber der optischen Achse des Mikroskops. Kürzlich wurde von Schlodder *et al.*, basierend auf Ergebnissen der Methode des Lineardichroismus in Kombination mit in Gel gepresster Probe, vorgeschlagen, dass die Übergangsdipolmomente aller roten Chlorophyll-Verbände innerhalb der Membranebene ausgerichtet liegen [Sch05]. Unter dieser Voraussetzung kann von jedem individuellen PS I-Trimer, der aus der Membranebene an beliebiger Position betrachtet wird, einheitlich linear polarisiertes Licht erwartet werden. Das Verhalten des weitaus größten Anteils (> 90 %) der Trimere deutet gemäß der Studien [vdL93, Gob94] nicht

darauf hin, dass bei der Trimerisierung des PS I der Spezies *T. elongatus* und *Synechocystis* bevorzugt ein gemeinsamer am meisten rotverschobener Zustand gebildet wird, wie für die Spezies *Arthrospira* vorgeschlagen wurde [Kar99a, Kar99b, Kar04].

4.7 Zusammenfassung

Die Fluoreszenzemissionen einzelner PS I-Komplexe wurden dazu genutzt, um spektrale Eigenschaften und Anzahl der roten Chlorophyll-Verbände zu bestimmen. Als Probedienten cyanobakterielle PS I-Trimere der Spezies *T. elongatus*, *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002, wobei vom Organismus *T. elongatus* zusätzlich auch Komplexe in monomerer Form untersucht wurden, die für eine zuverlässige Bestimmung der Anzahl von roten Emittlern im PS I von *T. elongatus* maßgebend waren.

Die Rotverschiebung der Position des jeweils mittleren spektralen Schwerpunkts der roten Emissionen verringert sich von *T. elongatus* über *Synechocystis* bis *Synechococcus* sp. PCC 7002. Bei den PS I aller drei Spezies wurden im Spektralbereich der jeweiligen roten Chlorophylle scharfe Null-Phononen-Linien (ZPLs) beobachtet. Im Fall vom PS I von *Synechocystis* werden hierdurch die Schlussfolgerungen aus der kürzlich veröffentlichten Ref. [Ril07] widerlegt, in der das Auftreten von ZPLs bestritten wurde. ZPLs wurden sowohl im Bereich des in Ref. [Gob94, Rät00] als C708 bzw. C706 deklarierten Pigment-Verbands als auch in dem des in Ref. [Rät00, Hay00] vorgeschlagenen C714 beobachtet. Beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 liegt der größte Teil der aufgetretenen ZPLs in einem Band mit mittlerer Lage bei $\lambda \simeq 698$ nm. Der zugehörige Chlorophyll-Verband wurde daher als F698 bezeichnet. Die ZPLs vom PS I von *T. elongatus* bilden zwei spektral voneinander getrennte Bänder in den Regionen, die zu den zentralen Lagen der in Ref. [Pål96] vorgeschlagenen Chlorophyll-Verbände C708 und C719 passen. Eine weitere gemeinsame spektrale Charakteristik der untersuchten PS I besteht in einer breiten Bande, die häufig in der jeweils am stärksten rotverschobenen Region auftritt und deren Gestalt zwischen den individuellen Komplexen stark variiert. Beide spektralen Strukturen zeigen in der Regel eine starke Dynamik. Durch Aufsummieren der Spektren mehrerer Komplexe kann das entsprechende Ensemble-Spektrum aus der Literatur im Wesentlichen reproduziert werden. Eine Abweichung besteht darin, dass im jeweiligen Bereich, in dem am häufigsten ZPLs auftreten, bei den Summenspektren mehr Intensität auftrat als bei den Ensemble-Spektren, was auf eine Selbst-Absorption und Wieder-Emission beim Ensemble, wie in [Gib05] untersucht wurde, zurückgeführt wird.

Mit Hilfe einer spektral aufgelösten Polarisationsanalyse der Fluoreszenz einzelner Monomere ist am PS I von *T. elongatus* die Bestimmung der Anzahl von roten Emittlern gelungen. Pro Monomer sind drei rote Chlorophyll-Verbände enthalten. Dieses Resultat stimmt dem Ergebnis aus der Ensemble-Studie [Zaz02b] zu, in der aus einer Abschätzung der Anzahl der beitragenden Pigmente und der Oligomerisierung der ausgewählten Kandidaten (aus Ref. [Jor01]) von drei roten Zuständen ausgegangen wird. Die Wellen-

4 Spektrale Gliederung der roten Chlorophyll-Verbände

längenbereiche der Emissionen variieren stark und überschneiden sich häufig. Mindestens einer dieser roten Zustände kann je nach selektiertem Komplex im Spektralbereich des C708- oder des C719-Verbands emittieren. Somit erscheint eine pauschale Zuordnung der aus der Studie [Jor01] bekannten Kandidaten eventuell nicht sinnvoll. Eine Zuordnung könnte eher anhand spektraler Charakteristika, wie z.B. dem individuellen Diffusionsverhalten, erfolgen.

Der größte Teil der PS I-Trimere zeigt im gegenüber P700 rotverschobenen Spektralbereich mehr als drei Polarisationsbeiträge und insbesondere in der am weitesten rotverschobenen Region zwei oder mehr Beiträge. Diese Eigenschaft weist nicht darauf hin, dass bei der Trimerisierung des PS I der Spezies *T. elongatus* und *Synechocystis* bevorzugt ein gemeinsamer am meisten rotverschobener Zustand gebildet wird, wie für die Spezies *Arthrospira* vorgeschlagen wurde [Kar99a, Kar99b, Kar04].

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

5.1 Einleitung

In diesem Kapitel werden Eigenschaften der Proteinumgebung der roten Zustände untersucht. Konformationsänderungen im Protein sind gleichzusetzen mit Reorganisationen der Atome. Die eingelagerten Pigmente erfahren diese Veränderungen als Fluktuationen in den lokalen Kopplungen, die stark abstandsabhängig sind. Dadurch werden die lokalen optischen Übergangsenergien verändert, was die Pigmente zu empfindlichen Sonden für Proteindynamik macht. In der Natur spielt dieser Mechanismus für einen Pigment-Protein-Komplex eine wichtige Rolle, um Funktionen zu modulieren oder Prozesse zu regulieren. Im Kapitel 4 wurde bereits festgestellt, dass die Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Komplexes auch bei 1,4 K eine starke spektrale Dynamik zeigt. Diese wird in den folgenden Abschnitten eingehend untersucht. Da der Messaufbau Null-Null-Übergänge mit guter Genauigkeit spektral erfassen kann, wurde die spektrale Diffusion der emittierten ZPLs dazu genutzt, direkt Veränderungen in der lokalen optischen Übergangsenergie von roten Zuständen in ihrer Proteinbindungstasche zu verfolgen. Zunächst wird anhand individueller PS I-Komplexe untersucht, wie die Energieabstände der beteiligten Niveaus der roten Zustände mit entsprechenden Fluktuationsraten korrelieren. Anschließend wird gezeigt, dass die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz durch die eingestrahlte Anregungsenergie beeinflusst wird. Im letzten Teil werden Lösungsmittelleffekte auf die einzelnen PS I-Komplexe analysiert.

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

5.2.1 PS I von *T. elongatus*

Die Dynamik in der Fluoreszenz eines einzelnen Emitters aus einem der roten Chlorophyll-Verbände kann dazu genutzt werden, über die individuelle Umgebung Informationen zu erhalten. Eine elementare Voraussetzung besteht darin, dass der Messprozess genügend schnell ist, um die Dynamik zumindest teilweise zu erfassen. In Abbildung 5.1 oben

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

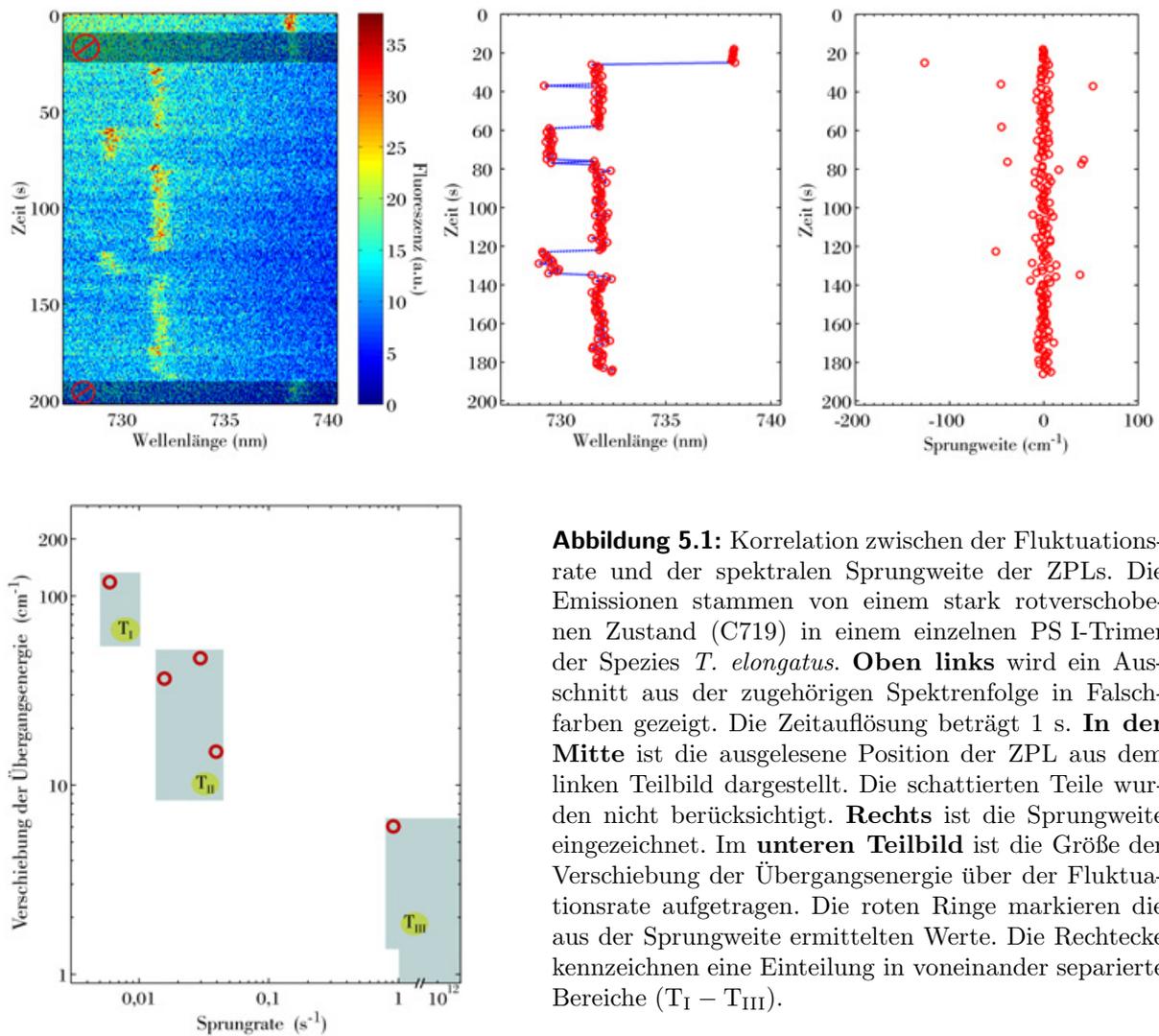


Abbildung 5.1: Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs. Die Emissionen stammen von einem stark rotverschobenen Zustand (C719) in einem einzelnen PS I-Trimer der Spezies *T. elongatus*. **Oben links** wird ein Ausschnitt aus der zugehörigen Spektrenfolge in Falschfarben gezeigt. Die Zeitauflösung beträgt 1 s. **In der Mitte** ist die ausgelesene Position der ZPL aus dem linken Teilbild dargestellt. Die schattierten Teile wurden nicht berücksichtigt. **Rechts** ist die Sprungweite eingezeichnet. Im **unteren Teilbild** ist die Größe der Verschiebung der Übergangsenergie über der Fluktuationsrate aufgetragen. Die roten Ringe markieren die aus der Sprungweite ermittelten Werte. Die Rechtecke kennzeichnen eine Einteilung in voneinander separierte Bereiche ($T_I - T_{III}$).

links wird auszugsweise der spektrale Zeitverlauf einer emittierten Null-Phononen-Linie (ZPL) eines einzelnen PS I-Trimers von *T. elongatus* gezeigt, die zur Fluoreszenz des C719-Verbands beiträgt. Die Intensität wird durch Falschfarben wiedergegeben. Wie im Abschnitt 4.3.3 beschrieben, wurden nur bei ca. 25 % der untersuchten Komplexe ZPLs beobachtet, die zur Fluoreszenz des C719 beisteuern. In der mittleren Teilabbildung sind die ausgelesenen spektralen Positionen aufgetragen. Jeder rot eingezeichnete Ring spiegelt dabei die mittlere Wellenlänge des Maximums der ZPL im Zeitintervall des entsprechend akkumulierten Spektrums wieder. Die schattierten Bereiche im linken Bild wurden aufgrund des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht berücksichtigt. Im rechten Bild ist die Energieänderung in cm^{-1} aufgetragen, die sich von Position zu Position ergibt. Unterteilt man nun die Sprungweite in zehn Bereiche gleicher Energie und ordnet alle Sprünge ein, dann ergibt sich das unten dargestellte Bild. Die Auftragung zeigt, mit welcher Häufigkeit Sprünge im entsprechenden Energieintervall aufgetreten sind. Die ge-

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

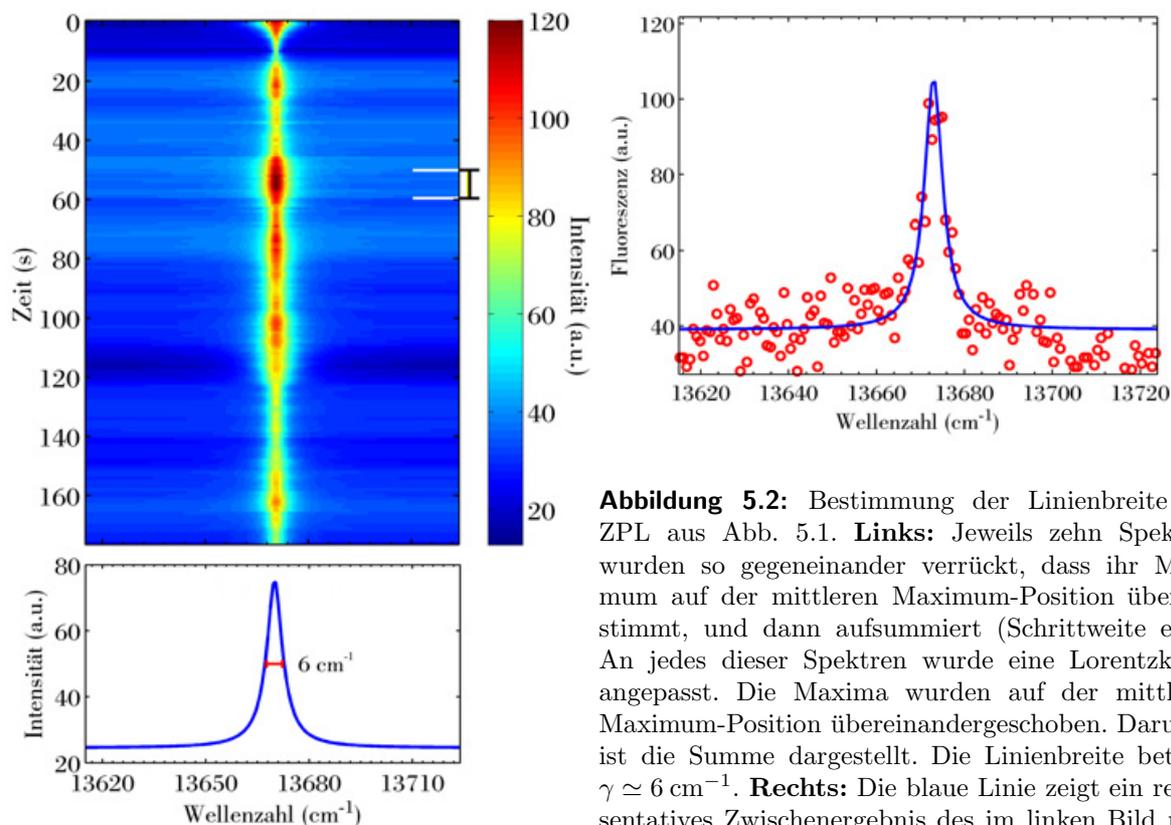


Abbildung 5.2: Bestimmung der Linienbreite der ZPL aus Abb. 5.1. **Links:** Jeweils zehn Spektren wurden so gegeneinander verrückt, dass ihr Maximum auf der mittleren Maximum-Position übereinstimmt, und dann aufsummiert (Schrittweite eins). An jedes dieser Spektren wurde eine Lorentzkurve angepasst. Die Maxima wurden auf der mittleren Maximum-Position übereinandergeschoben. Darunter ist die Summe dargestellt. Die Linienbreite beträgt $\gamma \simeq 6 \text{ cm}^{-1}$. **Rechts:** Die blaue Linie zeigt ein repräsentatives Zwischenergebnis des im linken Bild markierten Bereichs. Zusätzlich sind die Datenpunkte des zugehörigen Summenspektrums eingezeichnet.

wählten Achsenskalierungen sind logarithmisch. Analog zur Studie am LH2 von Hofmann *et al.* [Hof03] wurde eine Gliederung entsprechend der spektralen Sprungweite in voneinander separierte Bereiche vorgenommen. Sie sind als $T_I - T_{III}$ gekennzeichnet. Bei einer Verfeinerung der Einteilung auf z.B. 20 oder 30 Energiebereiche ergibt sich kein grundlegend anderes Bild, d.h. lediglich die Ausdehnung und Lage der eingezeichneten Bereiche werden leicht beeinflusst.

Die spektrale Diffusion, die schneller stattfindet als ein Messprozess, kann nicht direkt erfasst werden, d.h. in unserem Fall bei der hauptsächlich verwendeten Akkumulationszeit von 1 s sind die Sprünge betroffen, die häufiger als einmal pro Sekunde geschehen. Dieser Wert stellt eine untere Grenze der „schnellen“ Sprungrate dar. Die zugehörige obere Grenze der Sprungweite wird von der größten Linienbreite aller einzelnen Messprozesse gebildet. Im unteren Teil der Abbildung 5.1 wird dieser Punkt durch die linke obere Ecke des unteren Rechtecks T_{III} gekennzeichnet. Die obere Grenze der Sprungrate kann über die Frequenz-Zeit-Unschärfe anhand der Linienbreite γ abgeschätzt werden. Die Bestimmung von γ für obige ZPL wird in Abbildung 5.2 gezeigt. Um zunächst das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurde ein Fenster à zehn Spektren mit einer Schrittweite von eins über den Zeitverlauf bewegt. Bei jedem Schritt wurden die Spektren

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

so gegeneinander verschoben, dass ein gemeinsames mittleres Maximum der ZPL gebildet wurde. Das neu entstandene Fenster wurde jeweils zu einem Spektrum aufsummiert. An jedes dieser Summenspektren wurde eine Lorentzkurve angepasst. Die Maxima aller Lorentzkurven wurden ebenfalls auf eine mittlere Position verrückt. Das Ergebnis ist in Falschfarben dargestellt. Im unteren Teil kann aus der Projektion $\Delta\nu = \gamma \simeq 6,0 \text{ cm}^{-1}$ abgelesen werden, was einer maximalen Sprungrate von ca. $6/33 \text{ THz} \sim 10^{12} \text{ s}^{-1}$ entspricht. Im Zeit-Regime $t < 1 \text{ s}$ kann nicht zwischen kleinen spektralen Sprüngen langsamer Rate und schneller Rate unterschieden werden. Jedoch kann zumindest festgestellt werden, dass große spektrale Sprünge bei schneller Rate innerhalb des gewählten Messfensters nicht beobachtet wurden.

Zusätzlich zu schnellen Fluktuationen innerhalb $t < 1 \text{ s}$ wurden auch Sprünge mit Energieänderungen $\Delta\nu \leq 6 \text{ cm}^{-1}$ mit einer zugehöriger Rate von ca. $0,9 \text{ s}^{-1}$ festgestellt, d.h. spektrale Sprünge mit Energieänderungen, die der Linienbreite entsprechen, finden den schnellen Fluktuationen überlagert mit einer Häufigkeit nahe der Geschwindigkeit des Messprozesses statt. Diese werden durch einen Datenpunkt in dem als T_{III} deklarierten Bereichs repräsentiert. Sprünge mit einer Energieänderung zwischen ca. $\Delta\nu \geq 16 \text{ cm}^{-1}$ und $\Delta\nu \leq 48 \text{ cm}^{-1}$ treten mit einer Rate von ca. $1,5 \cdot 10^{-2} - 4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf und werden dem Bereich T_{II} zugeordnet. Eine Energieänderung von $\Delta\nu \simeq 120 \text{ cm}^{-1}$ tritt mit der Rate von $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ auf.

Die Abbildung 5.3 zeigt den spektralen Energiebereich, der häufig unter den gegebenen Messbedingungen roten Zuständen, die im Bereich um 708 nm fluoreszieren, zugänglich ist. Oben links ist ein Ausschnitt des spektralen Verlaufs einer ZPL der mittleren Wellenlänge von ca. $\lambda \simeq 706 \text{ nm}$ in Falschfarben dargestellt. Analog zur Abbildung 5.2 wird in der rechten Teilabbildung die mittlere Linienbreite auf ca. $\gamma \simeq 6,0 \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Die Werte γ der beiden hier gezeigten ZPLs aus verschiedenen Spektralbereichen stimmen demnach überein. Die untere Darstellung wurde mit dem gleichen Auswerteverfahren erstellt, wie in Abbildung 5.1 erklärt wurde. Auch für diesen Emittiererscheint eine Gliederung der Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche $T_{\text{I}} - T_{\text{III}}$ sinnvoll. Eine obere Abschätzung der Rate innerhalb T_{III} wird gemäß obiger Rechnung anhand der Linienbreite gegeben. Die untere Abschätzung liefert ein Datenpunkt bei einer Energie von ca. 3 cm^{-1} mit zugehöriger Rate von ca. $0,8 \text{ s}^{-1}$, d.h. die Sprungweite der Fluktuationen mit $t \geq 1 \text{ s}$ in T_{III} beträgt nur die Hälfte der Linienbreite und des entsprechenden Wertes beim im Bereich $> 719 \text{ nm}$ emittierenden Zustand bei leicht geringerer Rate. Die übrigen Bereiche liegen verglichen mit der Einteilung des Zustands aus Abbildung 5.1 dichter zusammen, d.h. der Energiebereich, der unter den Messbedingungen von dem emittierenden Zustand erschlossen wird, ist stärker begrenzt und die Sprunghäufigkeit innerhalb der Bereiche T_{I} und T_{II} ist höher. Zum mittleren Bereich T_{II} trägt ebenfalls nur ein Datenpunkt bei. Er entspricht einer Energie von ca. 9 cm^{-1} mit zugehöriger Rate von ca. $9 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Dem Bereich T_{I} sind Sprünge einer Energieänderung von ca. $15 \text{ cm}^{-1} \leq \Delta\nu \leq 50 \text{ cm}^{-1}$ zugeordnet. Die zugehörige Rate liegt zwischen ca. $5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $2,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

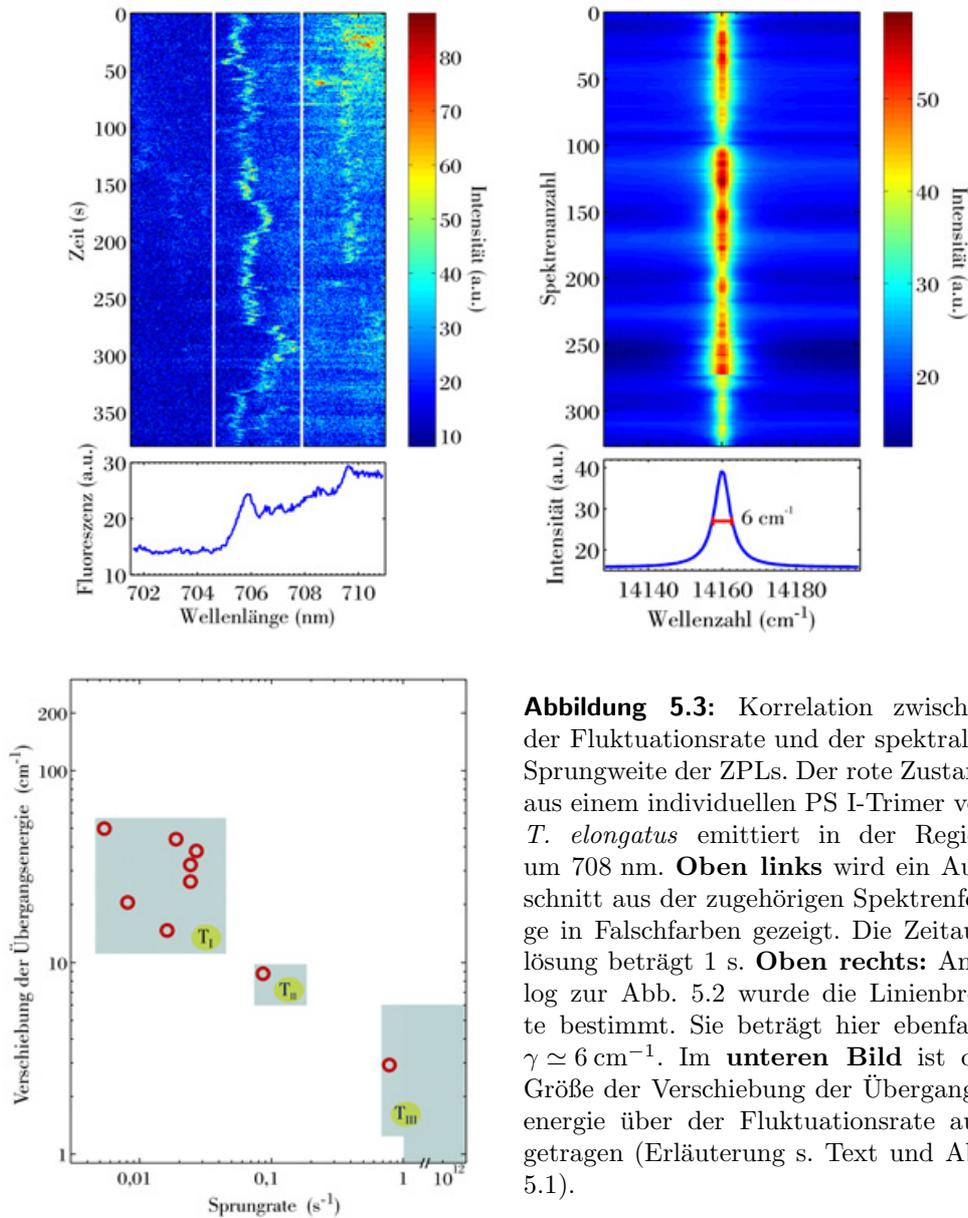


Abbildung 5.3: Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs. Der rote Zustand aus einem individuellen PS I-Trimer von *T. elongatus* emittiert in der Region um 708 nm. **Oben links** wird ein Ausschnitt aus der zugehörigen Spektrenfolge in Falschfarben gezeigt. Die Zeitauflösung beträgt 1 s. **Oben rechts:** Analog zur Abb. 5.2 wurde die Linienbreite bestimmt. Sie beträgt hier ebenfalls $\gamma \simeq 6 \text{ cm}^{-1}$. Im **unteren Bild** ist die Größe der Verschiebung der Übergangsenergie über der Fluktuationsrate aufgetragen (Erläuterung s. Text und Abb 5.1).

5.2.2 PS I von *Synechocystis*

An den vorangegangene Abschnitt anknüpfend wird im Folgenden analog die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs der roten Chlorophyll-Verbände des PS I vom Cyanobakterium *Synechocystis* untersucht. In Abbildung 5.4 links wird auszugsweise der spektrale Zeitverlauf zweier emittierter ZPLs gezeigt. Die spektralen Fluktuationen beider Linien korrelieren nicht miteinander. Die Linie mit der mittleren spektralen Lage bei ca. $\bar{\lambda} \simeq 704 \text{ nm}$ steuert zur Fluoreszenz des C706/C708-Verbands bei und die bei ca. $\bar{\lambda} \simeq 713 \text{ nm}$ zu der des C714-Verbands. Beim PS I der Spezies

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

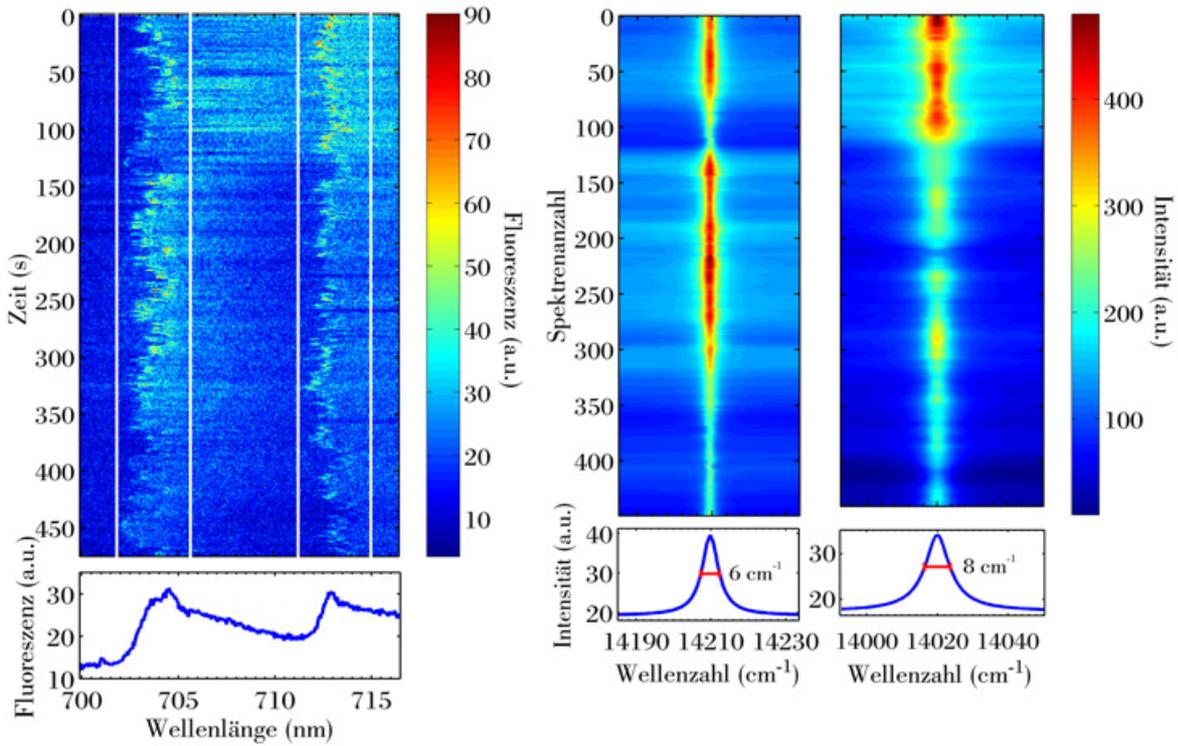


Abbildung 5.4: Fluktuation und Linienbreite zweier ZPLs in der Fluoreszenz eines individuellen PS I-Trimers der Spezies *Synechocystis*. Die spektralen Fluktuationen der Linien sind unkorreliert zueinander, d.h. die Linien werden zwei verschiedenen Emittlern zugeschrieben. Die Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm trägt zur Fluoreszenz des roten Chlorophyll-Verbands C706/C708 bei und die bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm zu der des C714. **Links** wird ein Ausschnitt aus der zugehörigen Spektrenfolge in Falschfarben gezeigt. Die Zeitauflösung beträgt 1 s. Der **rechte** Teil zeigt die Bestimmung der jeweiligen Linienbreite analog zum Verfahren in Abb. 5.2, wobei einzelne Spektren aufgrund schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht berücksichtigt wurden. Die Linienbreite der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm beträgt $\gamma \simeq 6$ cm^{-1} und die der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm liegt bei $\gamma \simeq 8$ cm^{-1} (FWHM).

Synechocystis wurden scharfe ZPLs, die über längere Zeiträume als $t \geq 200$ s stabil emittiert wurden, selten beobachtet. Die Fluktuationen von Linien über $t \geq 100$ s im Bereich zwischen 700 nm und 708 nm verhielten sich bei drei weiteren Stichproben von verschiedenen Komplexen ähnlich. In den beiden rechten Darstellungen der Abbildung 5.4 wurden, wie zuvor im Abschnitt 5.2.1 erklärt, die Linienbreiten auf $\gamma \simeq 6$ cm^{-1} für $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm und $\gamma \simeq 8$ cm^{-1} für $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm bestimmt. Über die Frequenz-Zeit-Unschärfe kann daraus die Größenordnung der oberen Grenze der Sprungrate auf $\sim 10^{12}$ s^{-1} abgeschätzt werden.

In Abbildung 5.5 sind für die beiden ZPLs jeweils die Sprungweite über der Fluktuationsrate aufgetragen. Wie für die einzelnen Emittter der roten Chlorophylle des PS I von *T. elongatus* wurden die Gesamtenergiebereiche der Sprungweiten in je zehn gleichgroße Bereiche eingeteilt, in die jeweils alle spektralen Sprünge einsortiert wurden. In der linken Teilabbildung wird das Ergebnis des zum C706/C708-Verband beitragenden Emitters ge-

5.2 Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Energieänderung

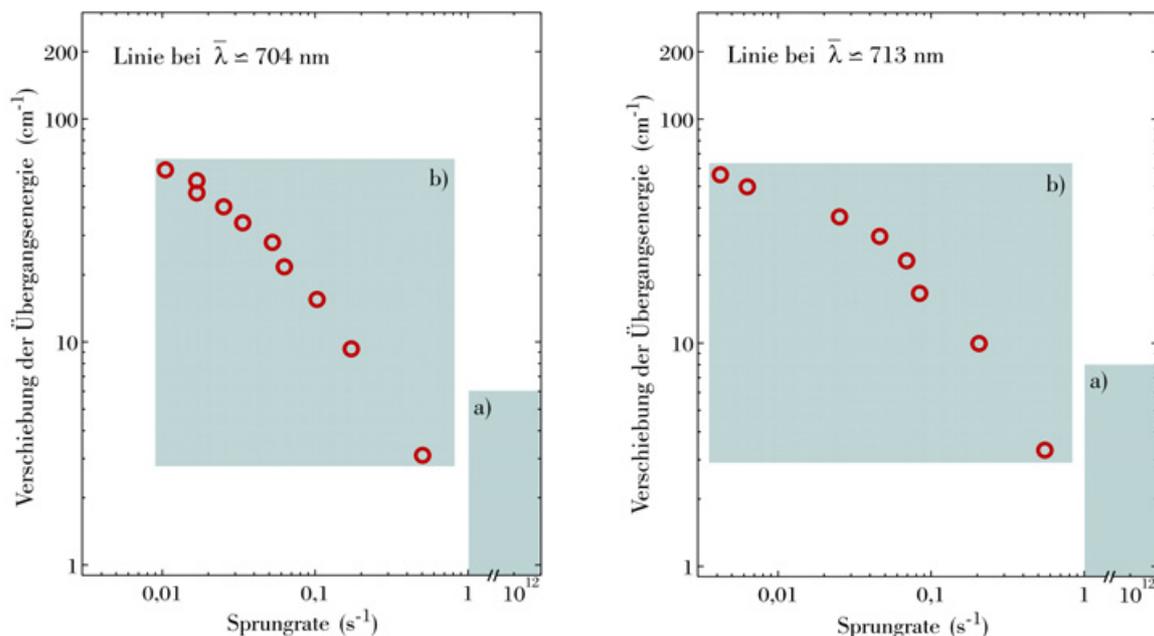


Abbildung 5.5: Auftragung der Sprungweite über der Fluktuationsrate für die beiden ZPLs aus Abb. 5.4. Wie im Abschnitt zuvor wurden die Gesamtenergiebereiche in je zehn gleichgroße Intervalle eingeteilt, in die jeweils alle spektralen Sprünge einsortiert wurden. Das **linke** Bild gehört zu der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm und das **rechte** zu der bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm. Im Vergleich zum Ergebnis der roten Chlorophylle des PS I von *T. elongatus* ergibt sich hier bei gleicher Gliederung eine eher fortlaufende Besetzung der Energiebereiche b), d.h. in der Verteilung zeichnen sich keine deutlich voneinander getrennten Bereiche ab. Die eingezeichneten Rechtecke a) basieren auf den in Abb. 5.4 bestimmten Linienbreiten (s. Abschnitt 5.2.1).

zeigt und in der rechten das entsprechende des zum C714-Verband beitragenden Emitters. Die schattierten Rechtecke a) basieren auf obiger Abschätzung aus den Linienbreiten. In den Rechtecken b) sind die aus den Linien sprüngen ermittelten Datenpunkte eingezeichnet. Für die Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 704$ nm ergibt sich eine Kurve, deren Werte für den Energiebereich von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 60 cm^{-1} reichen, mit einer zugehörigen Sprungrate von ca. $0,5 \text{ s}^{-1}$ bis ca. 10^{-2} s^{-1} . Die Datenpunkte der Linie bei $\bar{\lambda} \simeq 713$ nm liegen auf einer davon leicht abweichenden Kurve. Sie verläuft von ca. $0,4 \text{ s}^{-1}$ bis ca. $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ mit den dazugehörigen Energiebereichen von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 55 cm^{-1} . Im Vergleich zur Korrelation zwischen Fluktuationsrate und Sprungweite der ZPLs beim PS I von *T. elongatus* ergibt sich hier bei gleicher Gliederung eine fortlaufende Besetzung der Energiebereiche, d.h. in der Verteilung lassen sich keine deutlich voneinander getrennten Bereiche ausmachen, wie bei den roten Pigmenten des PS I von *T. elongatus*, bei dem jeweils auch bei dreimal feinerer Gliederung eine Separierung noch sinnvoll erscheint.

5.3 Auslöser der Fluoreszenzdynamik bei tiefer Temperatur

Trotz der vorherrschenden 1,4 K Probertemperatur zeigt die Fluoreszenz der roten Chlorophylle im PS I eine starke spektrale Diffusion. In der Abbildung 5.6 sind von oben nach unten Sequenzen von Fluoreszenzspektren dreier verschiedener, einzelner PS I-Trimere von *Synechocystis* dargestellt. Bei dem oberen und mittleren linken Bild befinden sich jeweils auf der rechten Seite die entsprechenden, eingezeichneten Ausschnittsvergrößerungen. Die Aufnahmen weisen horizontale, dunkle Bereiche auf, die sich jeweils über verschieden lange Zeiten einiger Sekunden erstrecken. Diese Bereiche stammen daher, dass die Anregung während dieser Zeiten jeweils vollständig unterbrochen wurde. Während der Beleuchtungszeiten treten deutlich sichtbare spektrale Sprünge der emittierten Null-Phononen-Linien (ZPLs) auf, die in der Ausschnittsvergrößerung oben rechts exemplarisch mit Hilfe von weißen Pfeilen markiert sind. Die senkrechten, roten Pfeile markieren jeweils die spektralen Linienpositionen vor dem Abschalten der Anregungsbeleuchtung und nach dem Wiedereinschalten. Bemerkenswert dabei ist, dass die Linien bei allen daraufhin untersuchten PS I-Komplexen (> 20) nach der Anregungspause wieder an der gleichen spektralen Position im Rahmen von maximal ca. $\pm 0,2$ nm angesetzt haben. Dabei ist wichtig zu beachten, dass die Dunkelphasen in der zeitlichen Länge variiert wurden. Die oben links abgebildete Spektrensequenz ist in dieser Hinsicht ein interessantes Beispiel. Von der betrachteten ZPL dieses PS I-Komplexes wird die spektrale Position bei ca. 696 nm stark bevorzugt. Die energetisch höher gelegene Position $< 695,6$ nm wird im Vorfeld nur wenige Male und für maximal 15 s eingenommen. Die drei Phasen, in denen der Laser ausgeschaltet war, dauerten jedoch jeweils länger als 25 s an. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass bei 1,4 K ohne die Zuführung von Anregungsenergie energetische Veränderungen der emittierenden Zustände von mehr als 4 cm^{-1} nicht stattfinden. Ein direkter Beweis ist nicht möglich, da ohne Anregung keine Fluoreszenzemission gemessen werden kann. Ferner führt eine sehr geringe Anregungsleistung bei erforderlicher kurzer Messdauer zu einem ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Insofern liefern die durchgeführten Experimente, bei denen der Laser jeweils für einige Sekunden abgeschaltet wurde, einen guten Kompromiss. Besonders eindrucksvoll erscheint dabei, dass bei einigen Komplexen beobachtet werden konnte, wie ein roter Zustand im offenbar ungünstigeren Energiezustand gefangen wurde. Dazu betrachte man beispielsweise den Ausschnitt oben rechts in der Abbildung 5.6. Hier wurde, ähnlich wie in [Rut06], der Laserstrahl immer dann unterbrochen, wenn die beobachtete ZPL gerade in eine höherenergetische Position gesprungen war. Beim Wiedereinschalten des Lasers erkennt man gerade noch, dass die spektrale Position erhalten blieb, bevor die Linie schließlich wieder aus einem niederenergetischeren Zustand emittiert wird.

5.3 Auslöser der Fluoreszenzdynamik bei tiefer Temperatur

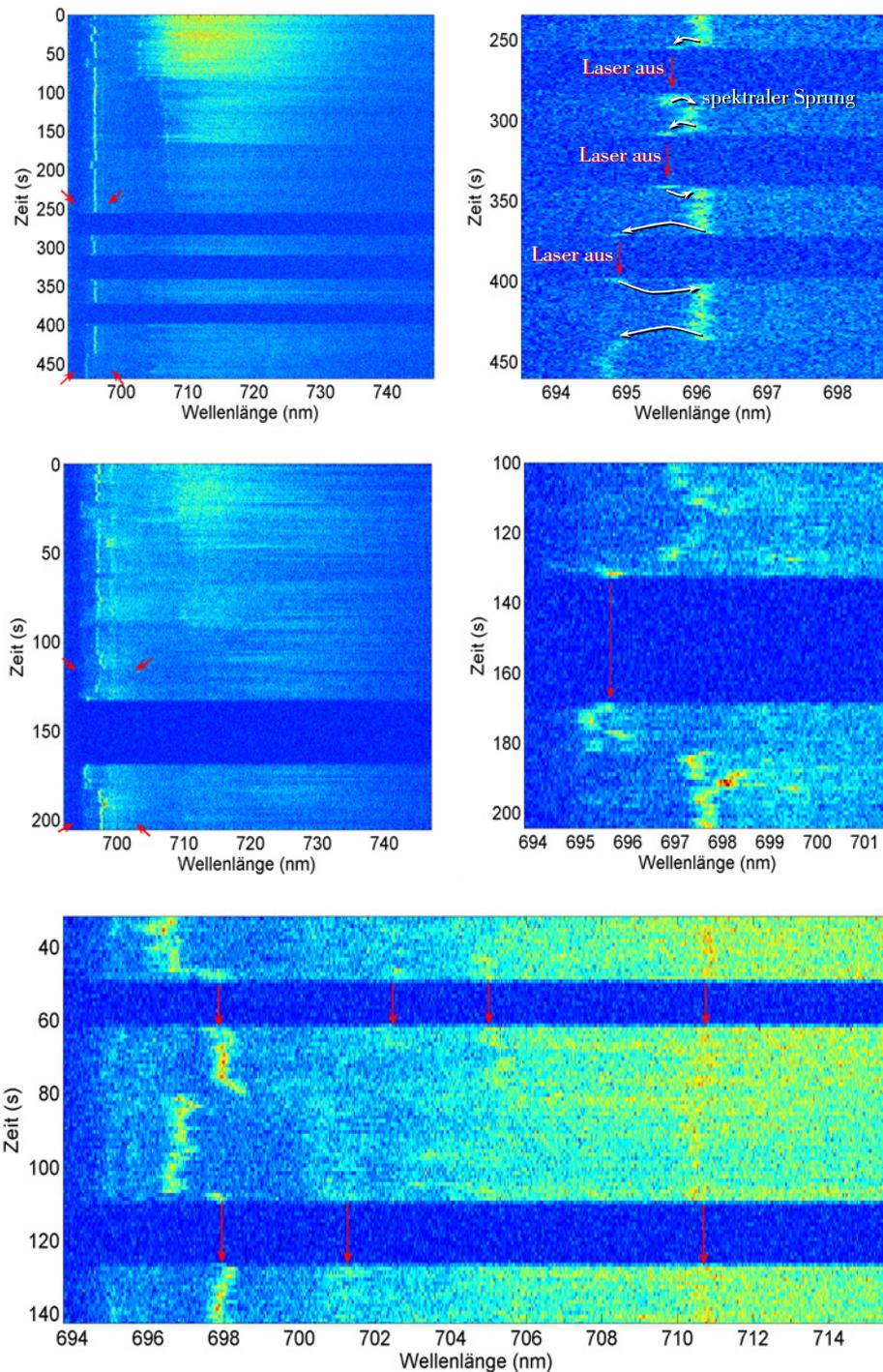


Abbildung 5.6: Einfluss der Anregung auf die Fluoreszenzdynamik einzelner PS I-Trimere von *Synechocystis*. Während der Spektren-Akquisition wurde die Anregung jeweils für mehrere Sekunden unterbrochen (horizontale, dunkle Bereiche). Bei dem Molekül oben und dem in der Mitte werden rechts jeweils die Ausschnittsvergrößerungen gezeigt. Die vertikalen roten Pfeile markieren jeweils die spektralen Linienpositionen vor dem Abschalten der Anregungsbeleuchtung und nach dem Wiedereinschalten. Deutlich zu erkennen ist, dass die jeweilige Linienposition nach der Anregungspause stets erhalten bleibt.

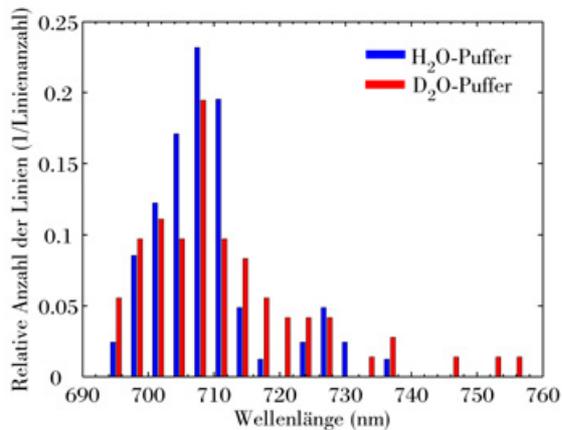


Abbildung 5.7: Statistik über die Anzahl der aufgetretenen Null-Phononen-Linien (ZPLs) im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *T. elongatus* in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die blauen Balken resultieren aus den Messungen in H₂O-Puffer und die roten gehören zu Messungen in D₂O-Puffer (s. Abschnitt 3.2.3). Die Verteilung wurde auf die Anzahl der insgesamt beobachteten Linien relativiert.

5.4 Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel

In der Spektroskopie an Proteinkomplexen kann man sich zu Nutze machen, dass an bestimmten Gruppen in Proteinen ein Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium erfolgen kann, wodurch Eigenschaften des Proteins gezielt beeinflusst werden. In Proteinen sind die NH₂- und COOH-Gruppen wegen der Peptidbindung nicht titrierbar, so dass der Aminosäurerest für das Säure-Base-Verhalten entscheidend ist. Bei der Seitenkette hängt das Verhalten davon ab, ob sie selbst wieder als Protonenakzeptor oder -donator wirken kann. Aminosäuren mit titrierbarer Seitenkette sind z.B. Cystein, Tyrosin, Lysin, Arginin, Histidin. Rein theoretisch ist zunächst bei allen nicht an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatomen ein Austausch gegen Deuterium nicht auszuschließen. Ob z.B. an einer bestimmten OH-Gruppe das Wasserstoffatom tatsächlich austauschen kann, hängt auch empfindlich vom pH-Wert der Lösung ab und davon, wie lange inkubiert wird. Ein Austausch, der bei der Präparation von PS I-Proben in D₂O-Puffer mit Sicherheit stattfindet, ist der Austausch von gebundenem Wasser. Das Ziel der Experimente mit Proben in D₂O-Puffer war, eine Veränderung der strukturellen Fluktuationen über eine Auswirkung auf die Fluoreszenzdynamik der roten Zustände als Sonde beobachten zu können.

5.4.1 Deuteriumeffekt beim PS I von *T. elongatus*

Die Fluoreszenz im spektralen Bereich der roten Chlorophylle wird durch Variation des Lösungsmittels, in dem die einzelnen PS I-Komplexe eingebettet sind, beeinflusst. Im Folgenden werden Ergebnisse in H₂O- und in D₂O-Puffer vorgestellt. In der Abbildung 5.7 wird die spektrale Verteilung der aufgetretenen ZPLs im interessanten Spektralbereich des PS I von *T. elongatus* gezeigt. Dafür wurden sämtliche beobachtete ZPLs in ein spektrales Raster eingeteilt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Verteilung wurde auf die jeweils aufgetretene Gesamtlinienanzahl relativiert. Man erkennt, dass sich bei den PS I-Komplexen in D₂O-Puffer insbesondere die Lücke im Spektralbereich

5.4 Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel

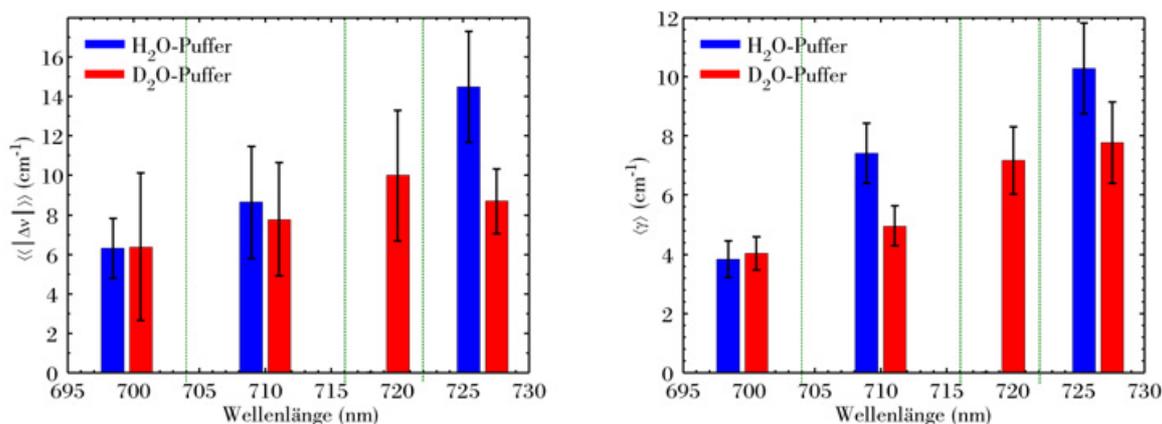


Abbildung 5.8: Statistik über das Sprungverhalten von ZPLs im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *T. elongatus* in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Im **linken** Bild sind die absoluten Sprungweiten der ZPLs in den durch die gestrichelten Linien gekennzeichneten Spektralbereichen in einem Balkendiagramm aufgetragen. Dabei wurde jeweils über die mittleren Werte aller Moleküle gemittelt. Im **rechten** Bild wird eine entsprechende Darstellung der mittleren Linienbreiten in den verschiedenen Spektralbereichen gezeigt. Dafür wurde eine Lorentzkurve an jede ZPL auf den unterschiedlichen spektralen Positionen angepasst, wobei einige Spektren aufgrund ungünstigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Linie nicht berücksichtigt wurden (s. Abschnitt 5.2.1). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

716 nm $\leq \lambda \leq$ 723 nm füllt (vergl. Abb. 4.9) und einige Linien im stark rotverschobenen Bereich dazukommen. Dabei ist anzumerken, dass bei den PS I-Komplexen in H₂O-Puffer in der Region 716 nm $\leq \lambda \leq$ 723 nm häufig Fluoreszenzintensität gemessen wurde, die jedoch Teil einer breiten Bande darstellt. Der Quotient aus dem Verhältnis aus Linienanzahl n_L zu Molekülanzahl n_M bei der Probe in H₂O-Puffer und dem entsprechenden Verhältnis bei der Probe in D₂O-Puffer beläuft sich auf 1,12/1,43, d.h. bei letzterer Probe treten insgesamt deutlich mehr Linien auf.

In Abbildung 5.8 wird das Sprungverhalten der ZPLs hinsichtlich ihres unter den gegebenen Versuchsbedingungen zugänglichen Energiebereichs zusammengefasst. Um das linke Balkendiagramm zu erhalten, wurde für jede über einen Zeitraum von mindestens $t \geq 70$ s aufgetretene ZPL die mittlere absolute Sprungweite

$$\langle |\Delta\nu| \rangle = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^{N-1} |\nu_j - \nu_{j+1}|$$

ermittelt, wobei die ν_j für die N spektralen ZPL-Positionen der entsprechenden Messsequenz stehen. Die einzelnen Linienpositionen für jedes Spektrum wurden von einem Algorithmus ermittelt, der nach einem lokalen Maximum sucht. Die Linienform der scharfen Emissionslinien ist in der Regel sehr symmetrisch und bei der Anpassung einer Lorentzlinie weicht dessen Mitte nur in Ausnahmefällen vom gefundenen Maximum

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

ab. Als obere Grenze wird ein relativer Fehler der Methode von 10 % abgeschätzt. Alle untersuchten Linien wurden hinsichtlich ihrer mittleren Position in vier feste spektrale Regionen $\lambda^{(1)} \leq 704 \text{ nm}$, $704 \text{ nm} \leq \lambda^{(2)} \leq 716 \text{ nm}$, $716 \text{ nm} \leq \lambda^{(3)} \leq 722 \text{ nm}$ und $\lambda^{(4)} \geq 722 \text{ nm}$ eingeteilt. Der Bereich $\lambda^{(2)}$ beinhaltet ZPLs, die dem C708-Verband zugeschrieben werden, und der Bereich $\lambda^{(4)}$ ZPLs, die dem C719-Verband zugeordnet werden. Im Bereich $\lambda^{(3)}$ befinden sich nach Abbildung 4.9 bei der Probe in H_2O -Puffer keine scharfen Linien. Nach dieser Einteilung wurde jeweils über alle Linien innerhalb eines Intervalls gemittelt. Die aufgetragenen Balkenhöhen entsprechen also den über die mittleren absoluten Sprungweiten $\langle |\Delta\nu| \rangle$ in cm^{-1} der Linien innerhalb der markierten spektralen Bereiche gemittelten Werte $\langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle$. Die blauen Balken gehören wie oben zu den Messergebnissen der PS I-Proben in H_2O -Puffer und die roten zu denen in D_2O -Puffer. Die Fehlerbalken beschreiben die jeweils zugehörigen Standardabweichungen

$$\sigma(\langle\langle |\Delta\nu_j| \rangle\rangle) = \sqrt{\frac{1}{n_L - 1} \sum_{j=1}^{n_L - 1} (\langle |\Delta\nu_j| \rangle - \langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle)^2}$$

der entsprechenden Spektralbereiche. In der Region $\lambda^{(1)}$ betragen die mittleren absoluten Sprungweiten $\langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle$ der ZPLs bei den PS I in beiden Lösungsmitteln zwischen 6 cm^{-1} und 7 cm^{-1} . Bei den ZPLs im Bereich $\lambda^{(2)}$ liegt der Wert um 8 cm^{-1} . Im Spektralbereich $\lambda^{(3)}$ wird beim PS I in D_2O -Puffer ein Wert von 10 cm^{-1} festgestellt. Oberhalb der beim PS I in H_2O -Puffer vorhandenen spektralen Lücke für scharfe Linien im Bereich $\lambda^{(4)}$ liegen die Werte für $\langle\langle |\Delta\nu| \rangle\rangle$ für die beiden Lösungsmittel mit ca. 8 cm^{-1} für D_2O -Puffer und ca. 14 cm^{-1} für H_2O -Puffer weiter auseinander. Bei Berücksichtigung der jeweils mittleren Standardabweichung beträgt der Unterschied ca. 1 cm^{-1} .

Die Sprünge, deren Sprungrate τ_{fluk}^{-1} viel höher lag als die Messrate τ_{exp}^{-1} , wurden analog zum Auswerteverfahren in Abschnitt 5.2.1 indirekt über die Linienbreite erfasst. Dazu wurden bei jeder ZPL die Spektren gegeneinander auf ein gemeinsames lokales Maximum verschoben. Dann wurden jeweils 20 Spektren aufaddiert, wobei die Schrittweite eins betrug. An jedes dieser Spektren wurde eine Lorentzkurve angepasst und jeweils die Breite FWHM notiert. Anschließend wurde für jede Linie die mittlere Breite bestimmt und in obiges spektrales Raster eingegliedert. Das Ergebnis wird in Abbildung 5.8 auf der rechten Seite präsentiert. Die Ausgleichskurven stimmten in der Regel gut mit den Summenspektren überein. Ausnahmefälle mit schwachem Signal-zu-Rausch-Verhältnis innerhalb weniger Sequenzen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Der Wert der mittleren Linienbreite $\langle\gamma\rangle$ für PS I in beiden Lösungsmitteln liegt im Spektralbereich $\lambda^{(1)}$ bei ca. 4 cm^{-1} . In den Regionen $\lambda^{(2)}$ und $\lambda^{(4)}$ wurden leichte Unterschiede zwischen den entsprechenden Werten in verschiedenen Lösungsmitteln festgestellt. Die Werte $\langle\gamma\rangle$ für PS I in H_2O -Puffer liegen um 7 cm^{-1} und 10 cm^{-1} und die für PS I in D_2O -Puffer um 5 cm^{-1} und 8 cm^{-1} . Bei letzteren Werten überschneiden sich die jeweiligen Standardabweichungen. Im Bereich des C708 beträgt die Abweichung bei Berücksichtigung der Standardabweichung ca. 1 cm^{-1} .

5.4 Auswirkung von schwerem Wasser im Lösungsmittel

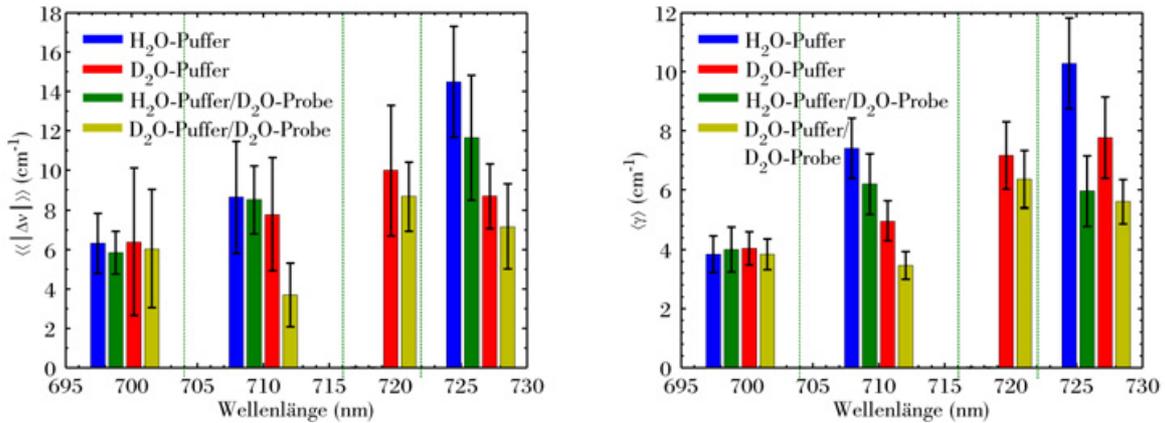


Abbildung 5.9: Statistik über das Sprungverhalten von ZPLs beim PS I von *T. elongatus*. Die Balkendiagramme sind analog zu denen aus Abb. 5.8, jedoch sind hier zusätzlich Ergebnisse einer volldeutერიerten PS I-Probe eingetragen: Die grünen Balken gehören zur volldeutერიerten Probe in H₂O-Puffer und die gelben Balken zur volldeutერიerten Probe in D₂O-Puffer.

Vom PS I des Cyanobakteriums *T. elongatus* stand auch eine volldeutერიerte Probe zur Verfügung. Bei dieser Probe befinden sich auch an Bindungsplätzen von Wasserstoffatomen, die durch die Präparation mit D₂O-Puffer nicht austauschbar sind, stattdessen Deuteriumatome. Die Dynamik in der Fluoreszenz dieser speziellen Probe wurde analog zur Auswertung oben untersucht. In Abbildung 5.9 sind die zugehörigen Ergebnisse zusammengetragen, wobei zum Vergleich nochmals die zuvor präsentierten Ergebnisse aus Abbildung 5.8 aufgeführt sind. Die mittlere absolute Sprungweite sowie die mittlere Linienbreite der ZPLs im Bereich $\lambda \leq 704$ nm beim volldeutერიerten PS I zeigen sowohl in H₂O- als auch in D₂O-Puffer nur geringe Abweichungen von der protonierten Probe. Die entsprechenden Werte liegen um ca. 6 cm^{-1} und 4 cm^{-1} . Im Spektralbereich des C708 weichen die Werte der volldeutერიerten Probe in D₂O-Puffer am deutlichsten von den anderen Werten ab. Sowohl $\langle\langle|\Delta\nu|\rangle\rangle$ als auch $\langle\gamma\rangle$ betragen weniger als 4 cm^{-1} . In der Region $\lambda^{(3)}$ fällt auf, dass auch die volldeutერიerte PS I-Probe in H₂O-Puffer dort keine scharfen Linien zeigt. Im Bereich des C719 sind die Werte der volldeutერიerten Probe im Vergleich zu denen der protonierten Probe kleiner. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen beträgt die Differenz zwischen den Linienbreiten für H₂O-Puffer knapp 2 cm^{-1} . Im Bereich der Verbände C708 und C719 nimmt die Sprunggeschwindigkeit der ZPLs der volldeutერიerten Probe in D₂O-Puffer im Vergleich zur protonierten Probe in H₂O-Puffer ab.

5.4.2 Deuteriumeffekt beim PS I von *Synechocystis*

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Fluoreszenzdynamik der roten Chlorophylle des PS I von *T. elongatus* auf Veränderungen hin untersucht, die durch den Austausch

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

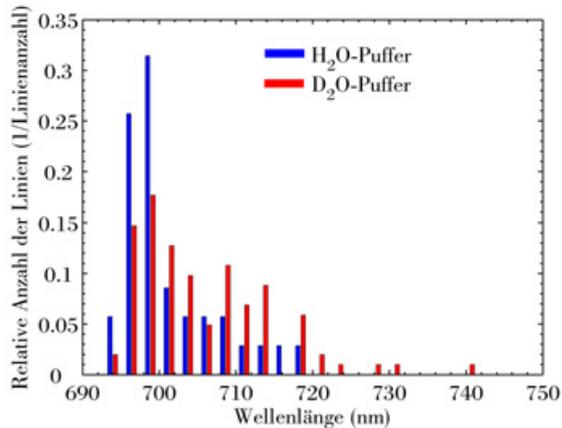


Abbildung 5.10: Statistik über die Anzahl der aufgetretenen Null-Phononen-Linien (ZPLs) im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *Synechocystis* in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die blauen Balken resultieren aus den Messungen in H₂O-Puffer und die roten gehören zu Messungen in D₂O-Puffer (s. Abschnitt 3.2.3). Die Verteilung wurde auf die Anzahl der insgesamt beobachteten Linien relativiert.

von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel entstehen. Daran anknüpfend werden nun nach dem gleichen Auswerteverfahren die Messdaten vom PS I von *Synechocystis* analysiert. Am PS I dieser mesophilen Spezies tritt der Effekt einer Verringerung der spektralen Diffusion, der im vorangegangenen Abschnitt am PS I der thermophilen Art *T. elongatus* vorgestellt wurde, in ausgeprägterer Form auf. In der Abbildung 5.10 wird die spektrale Verteilung der vorgekommenen ZPLs im spektralen Bereich der roten Chlorophylle gezeigt. Im gegenüber P700 rotverschobenen Spektralbereich $\lambda \geq 700$ nm wurden in D₂O-Puffer mehr als doppelt so häufig ZPLs beobachtet wie in H₂O-Puffer. Insbesondere treten in D₂O-Puffer in der Region $\lambda \geq 720$ nm scharfe Linien auf, wo in H₂O-Puffer nur Fluoreszenzintensität in der Form einer breiten Bande beobachtet wurde. Für den gesamten dargestellten Bereich beträgt der Quotient aus dem Verhältnis aus Linienanzahl zu Molekülanzahl bei der Probe in H₂O-Puffer und dem entsprechenden Verhältnis bei der Probe in D₂O-Puffer 0,79/1,07.

In Abbildung 5.11 wird, wie im Abschnitt 5.4.1 für das PS I von *T. elongatus* beschrieben wurde, das Sprungverhalten der ZPLs hinsichtlich ihres unter den gegebenen Versuchsbedingungen zugänglichen Energiebereichs zusammengefasst. In den vier eingeteilten spektralen Bereichen zeichnet sich eine Abnahme der entsprechenden Werte bei der Probe in D₂O-Puffer ab. Bei den ZPLs in der Region vor $\lambda \leq 703$ nm liegt die mittlere absolute Sprungweite beim PS I in H₂O-Puffer bei ca. 11 cm⁻¹. Im D₂O-Puffer ist der Wert mit ca. 5 cm⁻¹ auf weniger als die Hälfte reduziert. Im Spektralbereich bis $\lambda \leq 710,5$ nm liegen die entsprechenden Werte näher beieinander. Sie betragen ca. 8 cm⁻¹ und ca. 7 cm⁻¹. Bei den ZPLs im Bereich $\lambda \leq 718$ nm nehmen die Werte von ca. 15 cm⁻¹ auf ca. 8 cm⁻¹ ab und im Bereich $\lambda \geq 718$ nm von ca. 16 cm⁻¹ auf ca. 10 cm⁻¹. Im Vergleich zur Abbildung 5.8 stellt man beim PS I von *Synechocystis* fest, dass sich die spektrale Diffusion, insbesondere auch unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel stärker verringert.

Im rechten Teil der Abbildung 5.11 wird die mittlere Linienbreite der einzelnen ZPLs präsentiert. In den beiden Bereichen vor $\lambda \leq 710,5$ nm verringert sich die Linienbreite durch die Präparation in D₂O-Puffer von ca. 5 cm⁻¹ auf ca. 3 cm⁻¹ und von ca. 7 cm⁻¹

5.5 Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen

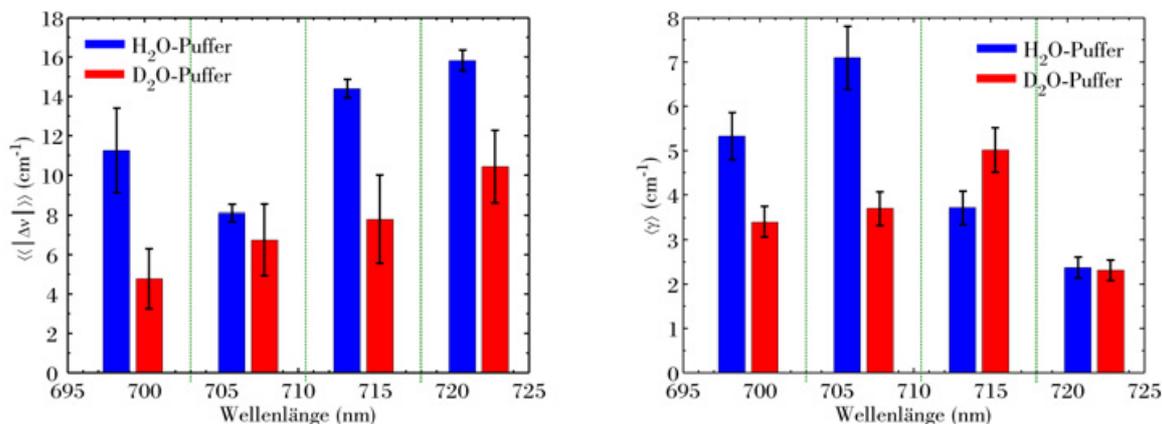


Abbildung 5.11: Statistik über das Sprungverhalten von ZPLs im spektralen Bereich der roten Chlorophylle beim PS I von *Synechocystis* in unterschiedlichen Lösungsmitteln in Analogie zur Abb. 5.8. Im **linken** Bild sind die mittleren absoluten Sprungweiten der ZPLs in den durch die gestrichelten Linien gekennzeichneten Spektralbereichen in einem Balkendiagramm aufgetragen. Im **rechten** Bild wird ein entsprechendes Diagramm der mittleren Linienbreiten in den verschiedenen Spektralbereichen gezeigt. Aufgetragen sind mittlere Lorentzbreiten (FWHM). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

auf ca. 4 cm^{-1} . Bei den ZPLs im spektralen Intervall $710,5 \leq \lambda \leq 718 \text{ nm}$ wurde ein umgekehrtes Verhalten ermittelt. Der zugehörige Wert erhöht sich durch die Präparation in D_2O -Puffer von ca. 4 cm^{-1} auf ca. 5 cm^{-1} . In der Region $\lambda \geq 718 \text{ nm}$ wurden im Verhältnis die kleinsten mittleren Linienbreiten gefunden, wobei sich die Werte im Bereich von knapp über 2 cm^{-1} für beide Lösungsmittel im Rahmen der Standardabweichungen decken.

5.5 Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass sich insbesondere beim PS I der Spezies *Synechocystis* eine Präparation in D_2O -Puffer stark auf die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz der roten Chlorophyll-Verbände auswirkt. Daher bietet sich an, die Untersuchungen aus Abschnitt 5.2.2 zu wiederholen, um zu prüfen, ob die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs bei der modifizierten Proteinumgebung voneinander separierte Bereiche erkennen lässt. Dazu wird in Abbildung 5.12 die Fluoreszenz eines stark rotverschobenen Zustands präsentiert. Beim PS I in H_2O -Puffer wurden in diesem Energiebereich keine scharfen Linien gefunden, wie im Abschnitt 5.4.2 gezeigt wurde. Beim PS I in D_2O -Puffer stellen ZPLs in dieser Region keine Ausnahme dar. Zudem ist bei diesen Proben das Auftreten von zwei oder drei parallelen Linien im Abstand weniger Nanometer besonders auffällig. Dieses Phänomen wird im gesamten roten Spektralbereich häufig beobachtet. Im rechten Teil der Abbildung sind

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

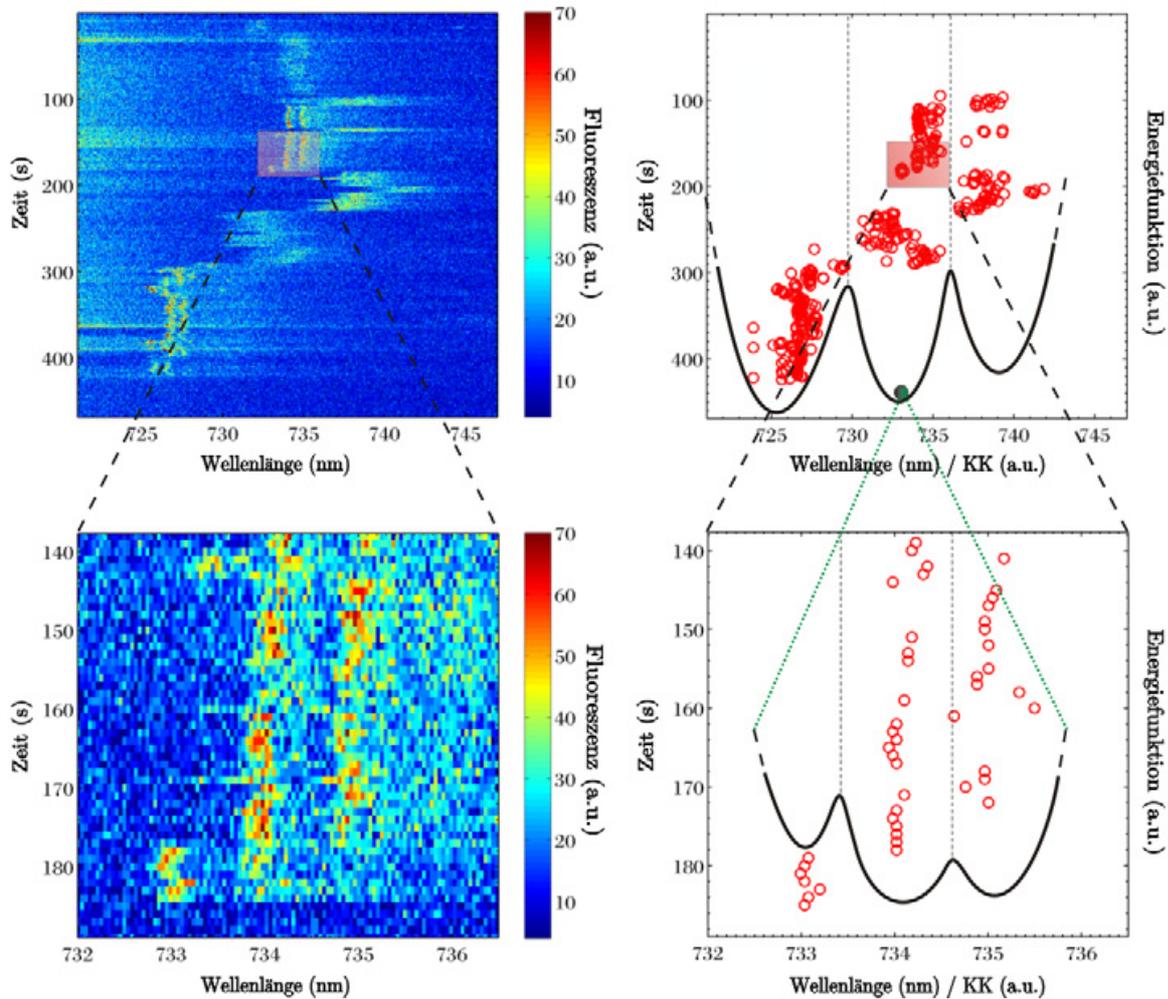


Abbildung 5.12: Darstellung der Fluoreszenz eines roten Pigments, in der sich die Konformationsänderungen (CCs) seiner Proteinumgebung widerspiegeln. Die Emissionen stammen von einem individuellen PS I-Trimer der Spezies *Synechocystis* in D₂O-Puffer. **Links oben** wird ein Ausschnitt der zugehörigen Abfolge von Spektren gezeigt. Die Akkumulationszeit betrug 1 s. **Links unten** wird der oben markierte Bereich vergrößert dargestellt. **Rechts** sind die ausgelesenen lokalen Maximumpositionen der ZPLs aufgetragen. Dem überlagert sind fiktive Energiefunktionen eingezeichnet. Die Barrierenhöhe richtet sich nach der Häufigkeit, mit der sie unter den Versuchsbedingungen überwunden wird, d.h. die Sprungweite sagt zunächst nichts über die Barrierenhöhe aus. Dennoch erkennt man in den Spektren direkt eine Hierarchie in der Größe der CCs, d.h. die selteneren CCs sind auch mit größeren Energieänderungen im Spektrum verbunden. Im oberen Teil ist der höchste Rang zu sehen, der beobachtet werden kann; darunter der zweithöchste. Bei der Bestimmung eines dritten und evtl. vierten Ranges stößt man an die Grenze der Auflösung des Spektrometers, so dass der in diesem Regime große relative Fehler die Feststellung diskreter CCs verhindert.

5.5 Direkte Beobachtung von hierarchischen Rängen

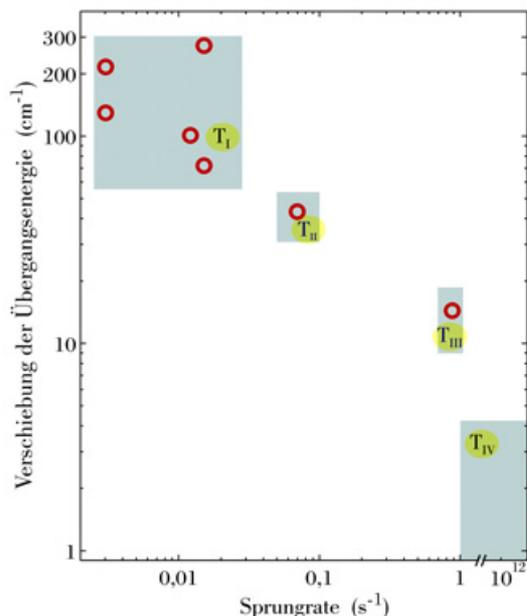


Abbildung 5.13: Auftragung der Sprungweite über der Fluktuationsrate für die ZPL aus Abb. 5.12. Die Darstellung wurde analog zum Verfahren in Abschnitt 5.2.1 erstellt. Im Vergleich zur Abb. 5.5 zeichnen sich bei einer in D₂O-Puffer präparierten PS I-Probe von *Synechocystis* hierarchische Ränge ab.

die ausgelesenen spektralen Positionen der lokalen Maxima der ZPL aufgetragen. Dabei wurde das im Abschnitt 5.2.2 beschriebene Verfahren angewendet. Man erkennt deutlich drei voneinander abgetrennte Aufenthaltsbereiche, deren mittlerer Abstand zwischen 5 – 6 nm beträgt. Aus dem unteren Teil der Abbildung wird klar ersichtlich, dass innerhalb des mittleren Bereichs wieder drei voneinander separierte Aufenthaltsbereiche der ZPL zu finden sind. Der mittlere Abstand beträgt jeweils ca. knapp 1 nm. Das System aus drei parallelen Linien wird in ähnlicher Form auf der höherenergetischen Position, in der Spektrensequenz nach ca. 290 s, beobachtet. Im niederenergetischen Bereich, in der Spektrensequenz nach ca. 190 s, wird eine schnellere Fluktuation festgestellt, die zur spektralen Vermischung der Linien führt, so dass die Linien teilweise nicht eindeutig voneinander separiert werden können. Schnellere Fluktuationen ereigneten sich in stärkerer Form auch im mittleren Spektralbereich nach ca. 240 s. Währenddessen sind keine klaren Linienpositionen mehr erkennbar. Anscheinend unterliegt das sensible Gesamtsystem noch einem weiteren überlagerten Prozess, der sich jedoch nur zeitweilig auswirkt und in der folgenden Betrachtung nicht berücksichtigt wird.

In die Darstellung ist eine fiktive Energiefunktion eingezeichnet, die qualitativ die Änderung der optischen Übergangsenergie des roten Emitters unter den gegebenen Versuchsbedingungen beschreibt. Die Barrierenhöhe richtet sich nach der Häufigkeit, mit der sie unter den Versuchsbedingungen überwunden wird, d.h. die Sprungweite sagt zunächst nichts über die Barrierenhöhe aus. Dennoch erkennt man in den Spektren direkt eine Hierarchie in der Größe der Konformationsänderungen, d.h. die selteneren Konformationsänderungen sind auch mit größeren Energieänderungen im Spektrum verbunden. Offenbar bewirkt die Präparation in D₂O-Puffer, dass sich in der Korrelation zwischen

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

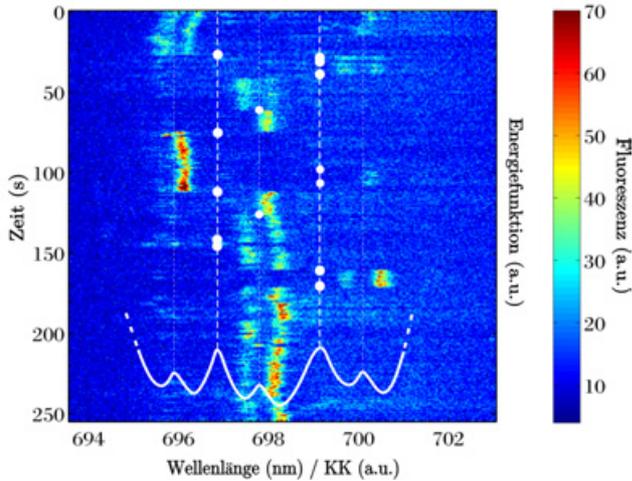


Abbildung 5.14: Ausschnitt aus den Fluoreszenzemissionen eines individuellen PS I-Trimers der Spezies *Synechocystis* in D₂O-Puffer. Die zeitliche Auflösung beträgt 1 s. Überlagert eingezeichnet ist eine fiktive Energiefunktion, die zwei hierarchische Ränge enthält. Man erkennt eine Bistabilität innerhalb einer Tristabilität. Letztere ist mit größeren Energieänderungen im Spektrum verbunden. Auf den gestrichelten Linien sind klar erkennbare Übergänge zwischen verschiedenen Linienpositionen markiert.

der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs voneinander separierte Bereiche abzeichnen. Diese Veränderung des Fluktuationsverhaltens wird auch nochmal in Abbildung 5.13 gezeigt. Hier ist die Sprungweite über der Fluktuationsrate für die ZPL aus Abbildung 5.12 aufgetragen. Insgesamt ergibt sich ein Bild, dass dem aus Abschnitt 5.2.1 vom PS I von *T. elongatus* in H₂O-Puffer ähnelt. Die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite konnte in vier hierarchische Ränge $T_I - T_{IV}$ gegliedert werden. Dem obersten Rang T_I sind Sprünge einer Energieänderung von ca. $70 \text{ cm}^{-1} \leq \Delta\nu \leq 280 \text{ cm}^{-1}$ zugeordnet. Die zugehörige Rate liegt zwischen ca. $3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Zum zweiten und dritten Rang trägt jeweils nur ein Datenpunkt bei. Sie entsprechen einer Energie von ca. 40 cm^{-1} und 14 cm^{-1} mit den zugehörigen Raten von ca. $7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $0,9 \text{ s}^{-1}$. Der unterste Rang wird durch die mittlere Linienbreite von $\gamma \simeq 4,2 \text{ cm}^{-1}$ analog zur Vorgehensweise in Abschnitt 5.2.1 abgeschätzt.

In Abbildung 5.14 wird die Fluoreszenz eines Zustands aus einem anderen spektralen Bereich gezeigt. Die mittlere Position liegt bei knapp 698 nm, also nahe der Absorption von P700. Man erkennt ein System aus zwei parallelen ZPLs im Abstand von ca. 0,5 nm, das zwischen drei spektralen Positionen fluktuiert, die jeweils ca. 2 nm voneinander entfernt liegen. Während die ZPLs innerhalb des Systems auf den beiden Positionen teilweise antikorrelieren und teilweise korrelieren, zeigt sich zwischen den Intensitäten auf den drei Positionen des Systems ausschließlich eine Antikorrelation. Die Abweichung innerhalb des Systems wird auf die Zeitauflösung des Messprozesses zurückgeführt, d.h. die Fluktuationen innerhalb des Systems haben eine höhere Rate als 1 s^{-1} , während die Rate der größeren Sprünge von ca. 2 nm bei Werten $\ll 1 \text{ s}^{-1}$ liegt. In die Darstellung ist eine fiktive Energiefunktion eingezeichnet, die zwei hierarchische Ränge enthält. Der obere Rang entspricht einer Tristabilität, die der Pigment-Verband durch spektrale Sprünge mit einer Weite von ca. 40 cm^{-1} widerspiegelt. Der untere Rang beinhaltet eine Bistabilität, die im spektralen Verlauf schnelle Fluktuationen einer spektralen Verschiebung von ca. 10 cm^{-1} bewirkt. Innerhalb beider Ränge wurden die Zustände mit unterschied-

5.6 Entstehung der breiten roten Fluoreszenzbande

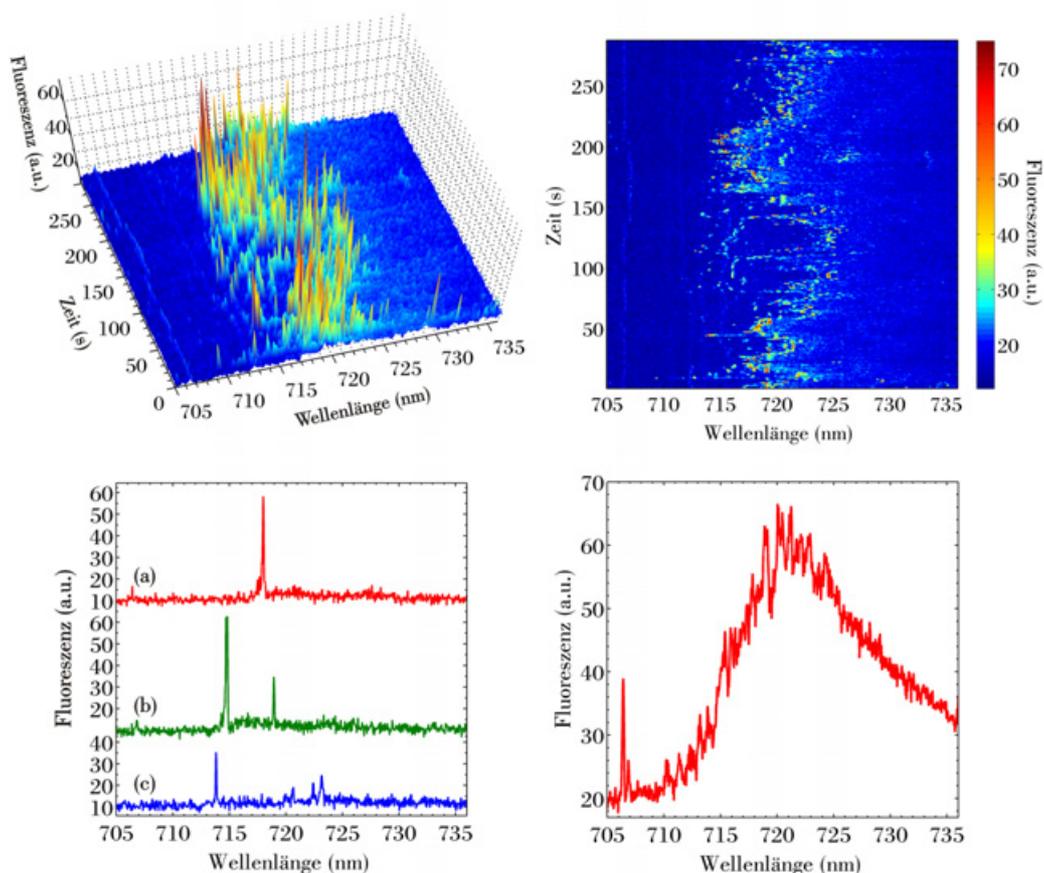


Abbildung 5.15: Die Formung der breiten roten Fluoreszenzbande. Die Emissionen stammen von einem individuellen PS I-Trimer von *Synechocystis* in D₂O-Puffer. Die Akkumulationszeit betrug 1 s. **Links oben** wird die Spektrensequenz ausschnittsweise in einer 3D-Darstellung gezeigt. **Rechts oben** ist die zugehörige 2D-Kontur dargestellt und **rechts unten** ihre zeitliche Projektion. **Links unten** sind drei selektierte Spektren über 1 s aus der Sequenz aufgetragen. Die Positionen sind (a) 23 s, (b) 203 s und (c) 98 s.

lichen Wahrscheinlichkeiten besetzt. Im oberen Rang war der Zustand begünstigt, der im Spektrum einen Aufenthalt der ZPL im mittleren Bereich bewirkt hat. Innerhalb der Bistabilität wurde der Zustand bevorzugt, der die niederenergetischere Linienposition zur Folge hatte.

5.6 Entstehung der breiten roten Fluoreszenzbande

Im Abschnitt 5.4.2 wurde berichtet, dass die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel beim PS I von *Synechocystis* markant herabgesetzt wurde. Bei einigen individuellen Komplexen (ca. 10 %)

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

wurden durch diesen Effekt in der breiten Fluoreszenzbande im stark rotverschobenen Spektralbereich scharfe ZPLs beobachtet. Dabei zeigten die ZPLs in der Regel selbst eine starke spektrale Diffusion innerhalb der jeweiligen Region der Bande. In einem Fall von insgesamt 62 untersuchten PS I-Komplexen konzentriert sich die Intensität fast vollständig in einer oder mehreren ZPLs, so dass in einem Spektrum mit einer Akkumulationszeit von 1 s keine breite Bande erkennbar ist. Die Emissionen dieses Trimers sind in Abbildung 5.15 dargestellt. Man erkennt deutlich eine „S“-förmige Diffusionsbewegung der Hauptintensität über den Zeitraum von über 280 s, die eine spektrale Ausdehnung von über 13 nm bzw. 250 cm^{-1} im Bereich von ca. 714 – 727 nm besitzt. Aus diesem Grundmuster finden viele spektrale Ausreißer der ZPLs statt, die den gesamten überstrichenen Spektralbereich erfassen. Links unten sind drei Beispielspektren dargestellt, die aus der Sequenz darüber entnommenen wurden. Die Gesamtintensität bleibt im Wesentlichen unverändert, wobei die Anzahl der spektralen Aufenthaltsorte der Linien variiert. Das Spektrum (c) zeigt mindestens vier ZPLs. Im Spektrum (a) hingegen wird nur eine ZPL, bzw. im Spektrum (b) werden zwei ZPLs beobachtet. Die Addition über alle 287 Spektren ergibt das mittlere Spektrum im Bild rechts unten. Man erkennt eine breite rote Bande mit einem spektralen Schwerpunkt bei ca. $\lambda_M = (721 \pm 1) \text{ nm}$ wie bei dem Spektrum (b) aus Abbildung 4.2, d.h. um ca. 6 nm rotverschoben gegenüber der über alle Komplexe gemittelten Lage. Die spektrale Form der Bande entspricht der typischen Struktur der breiten roten Bande, die insbesondere an den PS I-Komplexen von *Synechocystis* in H_2O -Puffer häufig beobachtet wurde (vergl. Abb. 4.2).

5.7 Diskussion

Experimente mit der Methode des spektralen Lochbrennens in Kombination mit einer Hochdruckzelle haben am LH2 von *Rhodospseudomonas acidophila* ergeben, dass relative Abstandsänderungen $\Delta R/R$ von ca. 0,01 % bis ca. 1 % zu spektralen Verschiebungen der B800-Absorption von $1 - 100 \text{ cm}^{-1}$ führen [Zaz02a]. Durch diesen experimentellen Befund gestützt, interpretieren wir die spektrale Diffusion in der Fluoreszenz der roten Chlorophyll-Verbände einzelner PS I-Komplexe als Folge von Modulationen der Pigment-Protein-Wechselwirkungen in der Umgebung der einzelnen roten Pigment-Verbände. Dabei spielt die wechselnde Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen, eine entscheidende Rolle [Fow92, Ols94]. Am LH2-Komplex wurde mit der Methode der Einzelmolekül-Spektroskopie in Fluoreszenzanregung eine ähnliche spektrale Dynamik auf längerer Zeitskala festgestellt [Hof03]. Die Zeit für ein gerastertes Spektrum betrug 15 s. Hofmann *et al.* haben zur Erklärung den im Abschnitt 1.2.3 erläuterten Ansatz des Modells der Energielandschaft aus [Fra91] angewendet. In Abbildung 1.8 wurde eine solche Energielandschaft vereinfacht dargestellt, wobei eine willkürliche Konformationskoordinate gewählt wurde. Beim PS I von *Synechocystis* in D_2O -Puffer konnte teilweise direkt in den Spektrensequenzen beobachtet werden, dass sich die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche aufteilen lässt.

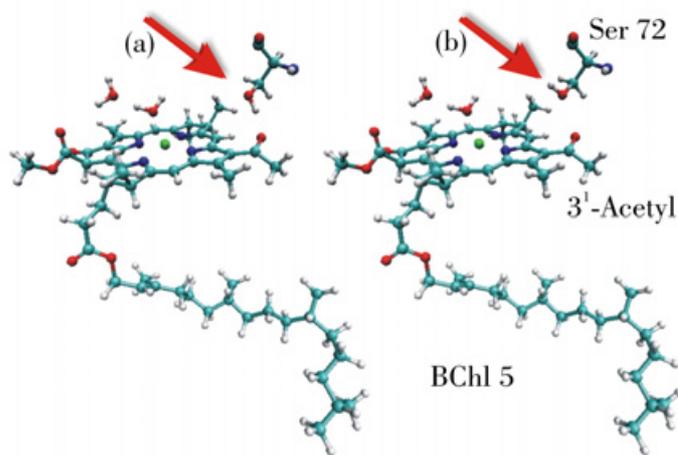


Abbildung 5.16: Teil der Proteinbin- dungstasche von dem Bakteriochloro- phyll (BChl 5) im Fenna-Matthews- Olson-Protein (FMO) [Fen75]. Im Fall (a) bildet das Ser 72 eine Wasserstoff- brücke zum 3¹-Acetyl. Im Fall (b) ist das markierte Proton „umgeklappt“ und die Bindung aufgebrochen. Die Darstellung stammt von Thomas Ren- ger.

In den Abbildungen 5.12 und 5.14 ist jeweils ein Beispiel dargestellt. Man erkennt deut- lich, dass ein System, innerhalb dem eine ZPL zwischen zwei oder drei Linienpositionen wechselt, im Ganzen auf verschiedene spektrale Positionen springt. Zwischen den Raten der beiden unterschiedlichen Prozesse liegen Größenordnungen. Dieses Ergebnis passt sehr schön zum Bild einer in hierarchischen Rängen organisierten Energielandschaft, in der die mittlere Barrierenhöhe von oben nach unten abnimmt, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde.

Energielandschaft der roten Pigmente im PS I von *T. elongatus*

Zunächst werden die Ergebnisse vom PS I der Spezies *T. elongatus* diskutiert. Die Ab- bildungen 5.2 und 5.3 zeigen die Relationen zwischen den erschlossenen Energiebereichen der Null-Null-Übergänge und den zugehörigen Zeitskalen für einen roten Zustand in der Region > 719 nm und einen in der um 708 nm von zwei individuellen PS I-Komplexen. Wir vermuten, dass das Sprungverhalten der ZPLs die „Abtastung“ eines Ausschnitts der Energielandschaft der Proteinumgebung widerspiegelt. Der beobachtbare Ausschnitt wird unter anderem durch die gegebenen Versuchsbedingungen begrenzt. In den aufgetragenen Datenpunkten beider roter Zustände zeichnet sich eine Hierarchie von Rängen ab, in der die durchschnittliche Höhe der Energiebarrieren von oben nach unten abnimmt. Beim Emitter im Bereich > 719 nm fallen in den obersten und zweitobersten Rang Sprünge zwischen wenigen diskreten spektralen Positionen, wie in Abbildung 5.1 zu sehen ist. Wir vermuten, dass ihm spezielle Konstellationen der Proteinatome zugrunde liegen. In die- sem Fall bildet die Proteinumgebung eine Bi- bzw. Tristabilität aus. Übergänge zwischen diesen Niveaus bewirken im Fluoreszenzspektrum energetische Verschiebungen von bis zu mehr als 115 cm^{-1} im obersten bzw. von ca. $16 - 50 \text{ cm}^{-1}$ im zweitobersten Rang und treten unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit einer Rate von ca. $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. ca. $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf.

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

In Abbildung 5.16 ist ein Szenario einer Bistabilität dargestellt, das eine große Verschiebung in der lokalen optischen Übergangsenergie des Chromophors in seiner Proteinbindungstasche bewirkt. Bei dem abgebildeten Molekül handelt es sich allerdings nicht um ein Chlorophyll a (Chl a) innerhalb von PS I, sondern um das Bakteriochlorophyll BChl 5 im Fenna-Matthews-Olson-Protein (FMO) [Fen75]. An diesem System wurden kürzlich bislang unveröffentlichte Rechnungen in der Arbeitsgruppe von Thomas Renger durchgeführt. Unter alleiniger Berücksichtigung der Elektrostatik ergaben sich für das markierte Proton an der OH-Gruppe der Aminosäure Serin Ser 72 zwei stabile Minima, die durch eine Barriere voneinander getrennt sind. Aufgrund der Höhe dieser Barriere wird das eingezeichnete „Umklappen“ des Protons für sehr unwahrscheinlich gehalten. Nichtsdestotrotz wurde der Unterschied in der zugehörigen optischen Übergangsenergie für dieses Beispiel ausgerechnet. Er beträgt über 300 cm^{-1} . Das Dimer A38-A39, das gemäß unserer Vermutung in Ref. [Bre07] in der Region $> 719 \text{ nm}$ emittiert, befindet sich innerhalb des PS I in einer ganz ähnlichen Situation. Über den Sauerstoff an der Ketogruppe des Chl a A38 besteht eine Wasserstoffbrücke zur OH-Gruppe des Ser 426. Eine Möglichkeit wäre, dass sich die Bindungslänge zwischen Proton und Wasserstoffbrückendonator ändert, d.h. dass das Proton auf der Verbindungslinie zwischen den beiden Sauerstoffatomen seine Position verändert. Auch bei diesem Mechanismus sind Veränderungen der optischen Übergangsenergie in der Größenordnung von 100 cm^{-1} denkbar. Gegenwärtig existieren jedoch keine konkreten Zahlen, so dass eine Zuordnung des roten Zustands aus Abbildung 5.1, der ein auffällig diskretes Sprungverhalten mit hoher Energiedifferenz zeigt, zu einem der Kandidaten aus Ref. [Jor01], wie z.B. dem Dimer A38-A39, nicht möglich ist.

Die Überwindung von Barrieren des untersten Rangs bewirkt im Pigment Veränderungen der optischen Übergangsenergie von bis zu ca. 6 cm^{-1} . In diesem Regime finden sowohl schnelle spektrale Sprünge innerhalb $t \leq 1 \text{ s}$ als auch langsame mit einer Rate nahe der reziproken Akkumulationszeit von 1 s^{-1} statt. Die durch schnelle Konformationsänderungen ausgelösten spektralen Verschiebungen wurden indirekt anhand der Linienbreite der ZPLs nach oben abgeschätzt. Die zugehörige Rate wurde mittels der Energie-Zeit-Unschärfe auf 10^{12} s^{-1} taxiert. Der Wechsel zwischen den zugehörigen Mikrozuständen der Proteinumgebung wirkt sich schwächer auf die optischen Übergangsenergie aus und spiegelt somit nicht Fluktuationen in der Stärke einer Wasserstoffbrückenbindung wieder, wie z.B. der aus Abbildung 5.16 oder der zwischen der Aminosäure Threonin β -Thr-23 und der C_2 -Acetyl-Gruppe im BChl a [Ger93]. Von elektrostatischen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen oder anderen polaren Gruppen in einiger Entfernung von der Chl a-Bindungstasche kann angenommen werden, dass sie die spektralen Eigenschaften des Pigments aufgrund ihrer starken Abstandsabhängigkeit sehr schwach beeinflussen. Folglich sind entweder nicht unmittelbar angrenzende oder lokale andersartige strukturelle Veränderungen für diese spektralen Fluktuationen des roten Zustands verantwortlich.

Auch die Energielandschaft der Proteinumgebung der roten Zustände in der spektralen Region um 708 nm lässt eine Hierarchie von Rängen erkennen. Im Vergleich zu den stark rotverschobenen Zuständen ist die spektrale Weite der Fluktuationen geringer und die Ra-

te höher, so dass die Ränge dichter beieinander liegen. Die größte Sprungweite im obersten Rang beträgt nur etwa 50 cm^{-1} , und die Rate reicht bis über $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Aufgrund der kleineren Abstufungen und der höheren Raten sind in den zeitlichen Verläufen der ZPLs keine diskreten spektralen Positionen zu erkennen. Die Energielandschaften in den beiden Spektralbereichen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Barrierenhöhen und haben verschieden großen Einfluss auf die optischen Übergangsenergie des jeweiligen Emitters.

Eine statistische Auswertung des spektralen Sprungverhaltens der ZPLs zeigt, dass sowohl langsame Fluktuationen, deren Rate τ_{fluk}^{-1} kleiner als die Messrate τ_{exp}^{-1} von ca. 1 s^{-1} ist, als auch die schnellen Fluktuationen mit $\tau_{\text{fluk}}^{-1} > \tau_{\text{exp}}^{-1}$ der Emissionen im Bereich $\lambda > 719 \text{ nm}$ größer sind als in der Region um 708 nm . Dieses über alle Komplexe gemittelte Ergebnis spricht dafür, dass die Proteinumgebung eines Zustands, der im Bereich $\lambda > 719 \text{ nm}$ emittiert, im Mittel größere Verschiebungen der optischen Übergangsenergie bewirkt als die eines Zustands, der im Bereich um 708 nm emittiert. Das kann entweder bedeuten, dass die Pigment-Protein-Kopplung ersterer roter Zustände stärker ist, oder dass die Schwingungsfreiheitsgrade in der Umgebung eines Emitters aus dem C708-Verband stärker eingeschränkt sind.

Die gleiche Auswertung an einer in D_2O -Puffer präparierten Probe hat ergeben, dass der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel im Mittel eine Verkleinerung der Fluktuationen bewirkt. Bei den ZPLs im Spektralbereich um 708 nm ist der Effekt bei den Fluktuationen mit $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$ jedoch vernachlässigbar gering im Rahmen der Standardabweichungen. In der Region $716 \text{ nm} < \lambda < 722 \text{ nm}$, in der in H_2O -Puffer nur unstrukturierte Fluoreszenz beobachtet wurde, bewirkte der Austausch das Auftreten von ZPLs. Insgesamt wird angenommen, dass nur in manchen Komplexen ein effektbringender Austausch von austauschbarem Wasser gegen schweres Wasser stattgefunden hat. Dabei könnten auch zufällig nur ein oder mehrere Spektralbereiche betroffen sein. Bei einer volldeuterierten PS I-Probe in D_2O -Puffer wird ein gesteigerter Effekt der Verkleinerung der Fluktuationen festgestellt. Der Deuteriumeffekt ist auf die größere Masse eines Deuterons im Vergleich zu der eines Protons zurückzuführen. Die Veränderung der dadurch bedingten strukturellen Fluktuationen spiegelt sich in der Veränderung der Fluktuationen der optischen Übergangsenergien der roten Zustände wider. Offenbar spielen Positionsänderungen von Protonen für die beobachteten Fluktuationen eine wichtige Rolle.

Im Kapitel 4 wurde festgestellt, dass pro PS I-Monomer drei rote Zustände emittieren und dass bei verschiedenen individuellen Komplexen im Bereich beider prognostizierter Verbände C708 und C719 zwei Emissionsbeiträge auftreten können. Während im spektralen Bereich um 708 nm häufig scharfe ZPLs beobachtet wurden, zeigten sich in der Region des C719 nur ca. bei einem Viertel der Komplexe scharfe ZPLs, stattdessen jedoch häufig eine breite Bande. Bei einigen Komplexen überlagerten sich beide spektralen Formen der Emissionen. Dies trat bei unterschiedlichen Komplexen sowohl im Bereich um 708 nm als auch im stark rotverschobenen Bereich auf. Die gewonnenen Informationen über die Energielandschaft des im Bereich $> 719 \text{ nm}$ fluoreszierenden Emitters beziehen sich

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

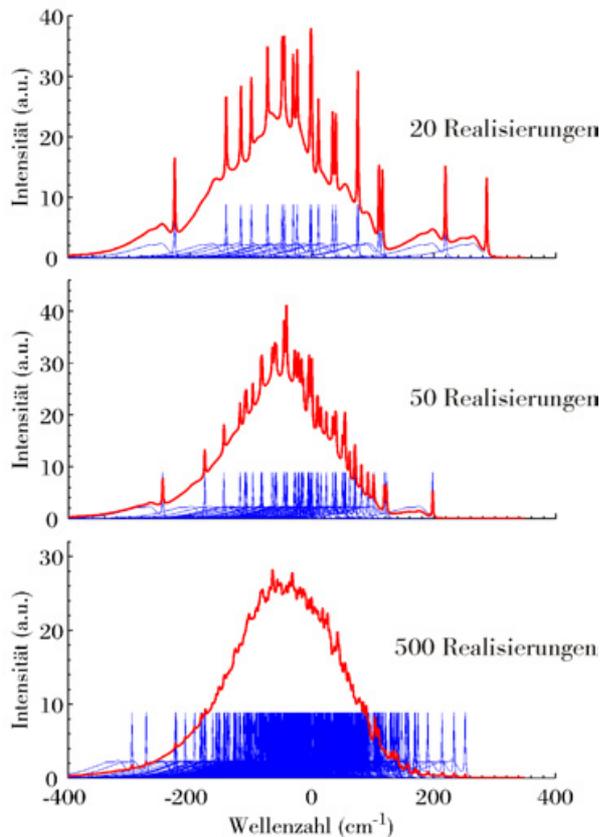


Abbildung 5.17: Simulation zur Entstehung einer breiten Fluoreszenzbande. Die Linienform der blau eingezeichneten Einzelspektren wurde gemäß der Theorie aus Abschnitt 2.2.4 ausgerechnet. Dafür wurde ein Huang-Rhys-Faktor von $S = 2$ und eine mittlere Schwingungsfrequenz von $\omega_m = 20 \text{ cm}^{-1}$ mit zugehöriger Phononbreite von $\Gamma = 20 \text{ cm}^{-1}$ angenommen. Dieser Huang-Rhys-Faktor entspricht dem in der Literatur für den C714 im PS I von *Synechocystis* vorgeschlagenen Wert [Zaz02b]. Die Realisierungen der Einzelspektren sind spektral jeweils zufällig normalverteilt. Die rot eingezeichneten Summenspektren wurden jeweils antiproportional zur Anzahl der Linienpositionen normalisiert. (Im Spektralbereich der roten Pigmente entsprechen 200 cm^{-1} ca. 10 nm .)

nur auf rote Zustände, von denen scharfe Linien detektiert wurden. Die Energielandschaft eines roten Zustandes, der eine breite Bande emittiert, bleibt unzugänglich. Um die Entstehung der breiten Bande zu verstehen, wird an dieser Stelle ein Ergebnis vom PS I von *Synechocystis* verwendet. Beim PS I dieser Spezies ist der Deuteriumeffekt ausgeprägter als beim PS I von *T. elongatus*, d.h. die spektrale Diffusionsgeschwindigkeit der Fluoreszenz wird stärker reduziert. In einem exemplarischen Fall von 62 Komplexen konnte die Bildung einer typischen breiten Bande schrittweise auf der Sekundenzeitskala verfolgt werden. Der Prozess wird in Abbildung 5.15 gezeigt. Vermutlich setzt sich ein Großteil der Fluoreszenz aus einer ZPL mit mehreren diskreten Realisierungen zusammen, deren Emissionen sich innerhalb der Akkumulationszeit von 1 s überlagern, wie im Abschnitt 4.3.2 erläutert wurde. Dafür sprechen die drei aus der Sequenz entnommenen Beispielspektren in der Teilabbildung unten links. Die Gesamtintensität bleibt im Wesentlichen unverändert, wobei die Anzahl der ZPLs variiert. Das Spektrum (c) zeigt mindestens vier Aufenthaltsorte. Im Spektrum (a) hingegen wird nur eine ZPL, bzw. im Spektrum (b) werden zwei ZPLs beobachtet. Eine Zusammensetzung aus jeweils z.B. vier ZPLs ist unwahrscheinlich, wobei die Beiträge von 2 – 3 ZPLs nicht ausgeschlossen werden können. Dies gilt insbesondere, da es sich bei der Probe um PS I in trimerer Form handelt. Aus Kapitel 4 ging jedoch hervor, dass der tiefste Zustand in einem Monomer auch wenig rotverschoben emittieren oder sich in einem Dunkelzustand befinden kann, so dass eben-

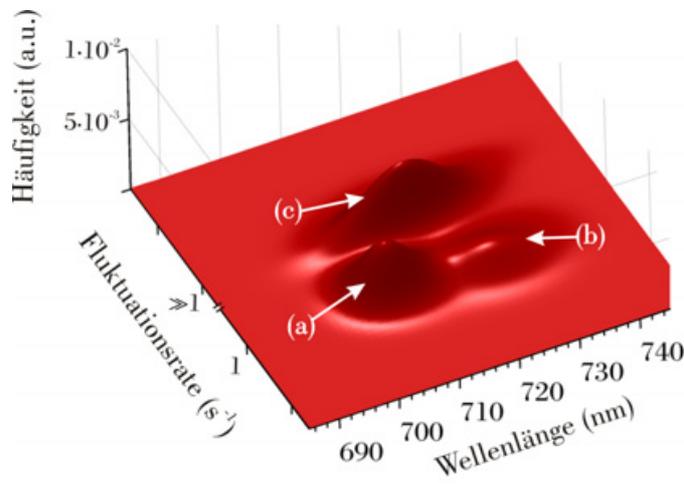


Abbildung 5.18: 3D-Schema für einen möglichen Zusammenhang zwischen den spektralen Regionen der roten Zustände und den zugehörigen Fluktuationsgeschwindigkeiten der Fluoreszenz im PS I von *T. elongatus*. Die Verteilung bei (a) spiegelt das typische Verhalten im Bereich um 708 nm wieder. Der Großteil der Fluktuationen findet dort im Sekunden-Regime statt. Diese Region wird jedoch auch von der Verteilung (c) erfasst, die schnelle Fluktuationen mit Raten $\gg 1 \text{ s}^{-1}$ beinhaltet. Sie reicht von ca. 700 nm bis $>735 \text{ nm}$. Die Verteilung bei (b) umfasst langsame Fluktuationen im stark rotverschobenen Spektralbereich, die dort seltener auftreten als im Bereich um 708 nm.

so die Möglichkeit besteht, dass die Bande von nur einer einzigen ZPL aufgebaut wird. Der angenommene Verbreiterungsprozess für den Fall der Beteiligung von nur einer ZPL wird in Abbildung 5.17 in drei Beispielen simuliert. Man erkennt, dass bei der Annahme eines Huang-Rhys-Faktors von $S = 2$, wie in Ref. [Zaz02b] für den C714 des PS I von *Synechocystis* angegeben wird, bereits < 500 Realisierungen ausreichen, um eine ähnliche breite Bande zu produzieren, wie sie in typischen PS I-Spektren gemessen wurde (vergl. Abb. 4.1, 4.2 und 5.15).

Die durch den Deuteriumeffekt am PS I von *Synechocystis* über die breite Emissionsbande gewonnenen Erkenntnisse werden nun im nächsten Schritt auf die Fluoreszenz des PS I von *T. elongatus* übertragen, d.h. auch hier wird erwartet, dass breite Banden durch schnell fluktuierende Emissionen mit Raten $\gg 1 \text{ s}^{-1}$ entstehen, deren Profile sich aus ZPL und PSB zusammensetzen. Dabei zeigt das Bsp. aus Abbildung 5.15, dass die PSB keinen großen Anteil an der Gesamtintensität beinhalten muss. In Abbildung 5.18 wird ein 3D-Schema gezeigt, das den angenommenen Zusammenhang zwischen den spektralen Regionen der roten Zustände des PS I von *T. elongatus* und den zugehörigen Fluktuationsgeschwindigkeiten der Fluoreszenz veranschaulicht. Aufgetragen ist die Häufigkeit oder Intensität über der Wellenlänge und der Fluktuationsrate. An der Verteilung bei (a) kann abgelesen werden, dass im Bereich um 708 nm der Großteil der Fluktuationen auf der Sekundenzeitskala stattfindet. Die Verteilung (c) überschneidet diesen Spektralbereich zusätzlich, d.h. mit geringerer Häufigkeit tritt dort Fluoreszenz mit schnellen Fluktuationen mit Raten $\gg 1 \text{ s}^{-1}$ auf. Im stark rotverschobenen Spektralbereich überwiegen schnelle Fluktuationen, wobei auch Fluktuationen mit Raten $< 1 \text{ s}^{-1}$ vorkommen, die von der Verteilung (b) wiedergespiegelt werden. Welche der drei Emitter sich in welchem Bereich aufhalten können, bleibt unklar.

Energielandschaft der roten Pigmente im PS I von *Synechocystis*

Im Vergleich zum PS I von *T. elongatus* wird in der Energielandschaft der roten Chlorophylle vom PS I von *Synechocystis* keine klar abgestufte Hierarchie von Rängen festgestellt. In Abbildung 5.5 sind die Relationen zwischen den erschlossenen Energiebereichen der Null-Null-Übergänge und den zugehörigen Zeitskalen für einen roten Zustand in der spektralen Region des C706- bzw. C708-Verbands und einen in der des C714-Verbands dargestellt. Man erkennt bei gleicher Einteilung jeweils eine fortlaufende Besetzung der Intervalle. Für die ZPL in der spektralen Region des C706- bzw. C708-Verbands ergibt sich eine Kurve, deren Werte für den Energiebereich von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 60 cm^{-1} reichen mit einer zugehörigen Sprungrate von ca. $0,5 \text{ s}^{-1}$ bis ca. 10^{-2} s^{-1} . Bei der ZPL im spektralen Bereich des C714-Verbands wird eine leicht davon abweichende Kurve ermittelt, die von ca. 3 cm^{-1} bis ca. 55 cm^{-1} mit einer Rate von ca. $0,4 \text{ s}^{-1}$ bis ca. $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ verläuft.

Im Mittel treten unter den gleichen Bedingungen beim PS I der Spezies *Synechocystis* im Bereich $\lambda > 695 \text{ nm}$ weniger ZPLs auf als beim PS I von *T. elongatus*. Die Verhältnisse von Linienanzahl zu Molekülanzahl betragen 0,79 und 1,12. Eine statistische Auswertung des Sprungverhaltens der ZPLs, die analog zu der beim PS I von *T. elongatus* durchgeführt wurde, zeigt, dass ZPLs im Spektralbereich des C714-Verbands mit Raten $\leq 1 \text{ s}^{-1}$ stärker fluktuieren als in der Region des C706- bzw. C708-Verbands, während sich für die Fluktuationen mit Raten $\geq 1 \text{ s}^{-1}$ das umgekehrte Verhalten ergibt. Ein Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel bewirkt, dass die Fluktuationen kleiner werden. Als Folge nimmt die Zahl der aufgetretenen ZPLs, insbesondere der im stark rotverschobenen Bereich, auf insgesamt im Mittel 1,07 Linien pro Molekül zu, wie in Abbildung 5.11 gezeigt wurde. Das wird so gedeutet, dass Fluoreszenz, die beim PS I in H_2O -Puffer als breite Bande detektiert wird, häufiger als scharfe ZPL zeitlich aufgelöst werden kann. Die mittleren absoluten Sprungweiten der ZPLs nehmen im Spektralbereich $\lambda > 700 \text{ nm}$ ab. Bei den in der Linienbreite enthaltenen Fluktuationen mit Raten $\geq 1 \text{ s}^{-1}$ zeigt sich in der Region des C706- bzw. C708-Verbands ebenfalls eine Reduktion, während im Bereich des C714-Verbands nur ein schwacher Effekt festgestellt wird, wobei die Linienbreite leicht zunimmt.

Da der Deuteriumeffekt die spektrale Diffusion von ZPLs teilweise stark verringert hat, wurde die Energielandschaft individueller PS I-Komplexe auch in D_2O -Puffer untersucht. Die Ergebnisse wurden in Abschnitt 5.5 präsentiert. Die Reduktion der Fluktuationen bewirkt, dass eine Hierarchie von Rängen beobachtet wird, die der bei den roten Chlorophyllen vom PS I von *T. elongatus* in H_2O -Puffer ähnelt. Der stark rotverschobene Zustand aus Abbildung 5.12 verschiebt dabei seine optischen Übergangsenergie bis zu $\leq 280 \text{ cm}^{-1}$. Im höchsten und im zweithöchsten Rang zeigen sich jeweils drei Konformationssubzustände. Bei dem Emitter aus Abbildung 5.14 im Bereich um 700 nm beinhaltet der höchste Rang ebenfalls drei Mikrozustände, von denen jeder in zwei Mikrozustände des zweithöchsten Rangs aufspaltet. Ein interessanter Bestandteil des Deuteriumeffekts

beim PS I von *Synechocystis* besteht in der häufigen Bildung von Bi- und Tristabilitäten. Vermutlich spielt der Austausch von Protonen durch Deuteronen an den polaren Aminosäureseitenketten in der Umgebung der roten Chlorophylle die entscheidende Rolle für die spektrale Veränderung. Einen möglichen Ansatz zur Erklärung einer Bistabilität (Tristabilität) bietet folgende Annahme: Ausgangspunkt ist ein Zwei-Niveau-System (*two level system*: TLS), wie in Abbildung 5.19 gezeigt wird. Die zugrundeliegende Situation in der Proteinbindungstasche könnte z.B. ähnlich wie bei dem in Abbildung 5.16 dargestellten (BChl 5) sein. Ein Proton geht über eine Wasserstoffbrücke eine Bindung mit einem in der Nähe koordinierten Sauerstoff ein. Ganz in der Nähe befindet sich noch ein zweiter Sauerstoff, so dass das Proton zwischen zwei möglichen Koordinationen wechseln kann. Die Barriere in der Potentialhyperfläche für den elektronischen Grundzustand Φ_G ist jedoch bei tiefer Temperatur unüberwindbar. Hingegen kann die Barriere in der Potentialhyperfläche für den elektronisch angeregten Zustand Φ_A durch Anregung höherer Schwingungsniveaus überwunden werden, wie der Pfeil (p_1) andeutet. Außer einer durch Einstrahlung Arrhenius-aktivierten Ladungsverschiebung im Protein sind auch Tunnelprozesse denkbar. Über Protonen-Tunneln in einem Enzym wird erstmals in Ref. [Cha89] berichtet. Im Fall der in Abbildung 5.19 gezeigten Potentialhyperfläche für Φ_A wird nun angenommen, dass die Tunnelwahrscheinlichkeit für das Proton hoch ist, so dass sich die ursprüngliche Konformation wieder einstellt, wie der Pfeil (p_2) andeutet. Das lokale Minimum der Gesamtenergie für Φ_A ist nicht stabil. Ein elektronischer Übergang mit der Energie β ist sehr unwahrscheinlich. In Abschnitt 1.2.3 wurden die Auswirkungen beim Austausch des Protons durch ein Deuteron beschrieben. Gemäß Gleichung 1.2 hängt die Tunnelwahrscheinlichkeit reziprok exponentiell von der Wurzel der Masse des tunnelnden Teilchens ab. Ist nun an der Stelle des Protons stattdessen ein Deuteron koordiniert, wird die Tunnelwahrscheinlichkeit für den durch den Pfeil (p_2) markierten Prozess so stark herabgesetzt, dass elektronische Übergänge der Energie β wahrscheinlich werden. Nach erneuter elektronischer Anregung kann durch Anregung höherer Schwingungszustände die Barriere im Zustand Φ_A vom Deuteron überwunden werden, so dass wieder elektronische Übergänge mit der Energie α stattfinden können. Im Spektrum wird dadurch eine Doppellinie bewirkt, wobei eine der Positionen stärker bevorzugt sein kann, wie z.B. beim roten Zustand aus Abbildung 5.14 zu sehen ist.

Die nachgewiesenen zeitabhängigen Veränderungen der optischen Übergangsenergien der roten Chlorophylle zeigt, dass bei einer Proben temperatur von 1,4 K Konformationsänderungen stattfinden können, d.h. dass ein bestimmtes Maß an Freiheitsgraden im Protein erhalten bleibt. Im Abschnitt 5.3 wurde am PS I von *Synechocystis* untersucht, was unter kryogenen Bedingungen die starke spektrale Fluoreszenzdynamik mit Fluktuationen von bis zu $\sim 280 \text{ cm}^{-1}$ hervorruft. Die beobachtete Dynamik ähnelt der aus einer Einzelmolekül-Studie am bakteriellen Lichtsammelkomplex LH2 unter physiologischen Bedingungen [Rut05]. In dieser wurden spektrale Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums beobachtet, deren Weite und Häufigkeit linear von der Anregungsleistung abhängen. Die Autoren führen die Sprünge auf lichtinduzierte Konformationsänderungen des Proteins zurück. Da die Sprünge in den meisten Fällen reversibel waren, also keine

Wahrscheinlichkeit für die inverse Konformationsänderung stark erhöht, so dass diese nach kurzer Zeit stattfindet. Das System nimmt in diesem Fall wieder seine Ausgangsenergie ein. Bei den in Abbildung 5.6 dargestellten Fällen genügt die Wahrscheinlichkeit jeweils, damit auf der Sekundenzeitskala eine Konformationsänderung stattfindet. Da in der Fluoreszenzdynamik der roten Chlorophylle in keinem Fall auf größere Fluktuationen als 10 cm^{-1} ($\hat{=} 0,5 \text{ nm}$) ohne Anregungsenergie geschlossen werden kann, scheinen Tunnelprozesse von Protonen in der Proteinumgebung der roten Pigmente ohne elektronische Anregung keine ausschlaggebende Rolle zu spielen. Anders als beim Elektronen-Tunneln ist der Nachweis von Protonen-Tunneln im Protein stark eingeschränkt [Scr99].

5.8 Zusammenfassung

Die bereits im Kapitel 4 festgestellte spektrale Diffusion der ZPLs wurde systematisch untersucht. Sie wird auf strukturelle Fluktuation in der Proteinbindungstasche der roten Chlorophylle zurückgeführt, die zu Veränderungen in der Stärke der lokalen Wechselwirkungen führen und somit zu Fluktuationen der optischen Übergangsenergie. Beim PS I von *T. elongatus* wurde sowohl im Bereich um 708 nm als auch in der Region oberhalb $> 719 \text{ nm}$ festgestellt, dass sich die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche aufteilen lässt. Das Ergebnis passt zum Bild einer in hierarchischen Rängen organisierten Energielandschaft, in der die mittlere Barrierenhöhe von oben nach unten abnimmt, wie z.B. in Ref. [Fra91] beschrieben wird. Im direkten Vergleich wurden hingegen beim PS I der Spezies *Synechocystis* zunächst keine voneinander separierten Bereiche in der Korrelation zwischen Fluktuationsrate und spektraler Sprungweite der ZPLs gefunden. Bei den PS I beider Organismen nimmt die mittlere spektrale Sprungweite der ZPLs mit wachsender Rotverschiebung zu.

Der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel hat bei den PS I beider Organismen zu einem signifikanten Deuteriumeffekt geführt. Er äußerte sich in einer Verringerung der spektralen Fluktuationen in der Fluoreszenz. Vom PS I von *T. elongatus* wurden zusätzlich volldeuterierte Proben untersucht. Dabei wurde eine Steigerung des Effekts beobachtet. Die Auswirkung des Austauschs spricht dafür, dass die Positionsänderung von Protonen einer der Hauptprozesse ist, mit denen im PS I die lokalen optischen Übergangsenergien der Pigmente feinabgestimmt werden. Ein interessanter Bestandteil des Deuteriumeffekts beim PS I von *Synechocystis* ist die häufige Erzeugung von Bi- bzw. Tristabilitäten. Diese können durch die herabgesetzte Tunnelwahrscheinlichkeit eines Deuterons im Vergleich zu der eines Protons erklärt werden. Durch einen indirekten Nachweis wurde gezeigt, dass spektrale Sprünge von ZPLs über 10 cm^{-1} bei 1,4 K erst durch die Einstrahlung von Energie wahrscheinlich werden. Daher scheinen unter kryogenen Bedingungen Tunnelprozesse von Protonen in der unmittelbaren Proteinumgebung der roten Pigmente ohne äußere Anregung sehr unwahrscheinlich. Durch den Austausch

5 Energielandschaft der Proteinumgebung

von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel ließ sich beim PS I von *Synechocystis* die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs, wie beim PS I von *T. elongatus* ohne entsprechenden Austausch, in voneinander separierte Bereiche aufteilen.

Unter Ausnutzung des Deuteriumeffekts konnte beim PS I von *Synechocystis* zeitlich aufgelöst werden, wie eine breite Fluoreszenzbande durch die Fluktuation von einer oder mehreren ZPLs schrittweise erzeugt wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Fluktuationen ein wichtiger Faktor für die Form und Breite von den typischerweise auf der Sekundenskala beobachteten breiten Banden sind. Mit Hilfe dieser Information konnte für das PS I von *T. elongatus* ein 3D-Schema entwickelt werden, das für die drei roten Zustände einen möglichen Zusammenhang zwischen spektralem Emissionsbereich und der Zeitskala der spektralen Fluktuationen herstellt. Danach sind im gesamten Spektralbereich der roten Zustände sowohl langsame ($< 1 \text{ s}^{-1}$) als auch schnelle Fluktuationen ($\gg 1 \text{ s}^{-1}$) mit einer von der spektralen Lage abhängigen Wahrscheinlichkeit möglich.

6 Charakterisierung der roten Zustände

6.1 Einleitung

Die Einzelmolekül-Spektroskopie bietet die einmalige Gelegenheit, Chromophore frei von der Mittelung über die Inhomogenität eines Ensembles zu studieren. Wie im Kapitel 5 ausführlich behandelt wurde, führen jedoch Veränderungen in der Umgebung des Chromophors zu Variationen der lokalen Wechselwirkungen, was Fluktuationen der optischen Übergangsenergie bewirkt. Das Einzelmolekül-Signal ist daher nur frei von Mittelungen, wenn jeder einzelne Emissionsakt unter exakt den gleichen Bedingungen stattfindet, was bei einem an eine Proteinmatrix gebundenen Chromophor nach Abschnitt 5.3 unmöglich erscheint. Die Fluktuationen erschweren die Bestimmung der homogenen Linienform. Bei der vielfach zur Untersuchung von Photosynthese-Aggregaten angewendeten Methode des nicht-photochemischen Lochbrennens (NPHB) wird nicht nur über ein Ensemble gemittelt, sondern zusätzlich auch über die Zeit. Die bisher in der Literatur gesammelten Informationen über die Elektron-Phonon-Kopplung der roten Zustände im PS I stammen aus Simulationen an NPHB-Spektren. Eine Übersicht über die Methode bietet die Ref. [Jan93]. Zur Beschreibung wurde das in Abschnitt 2.2.4 skizzierte Modell benutzt. Danach setzt sich die Linienform eines gebundenen Pigments bei tiefer Temperatur aus einer schmalen Linie, die vom rein elektronischen Übergang herrührt und Null-Phononen-Linie (ZPL) genannt wird, und einer begleiteten breiteren Bande zusammen, die durch die Kopplung des elektronischen Übergangs an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins zustande kommt und als Schwingungsseitenbande (PSB) bezeichnet wird [Reb70]. Als Maß für die Elektron-Phonon-Kopplungsstärke wird aus den Simulationen der Huang-Rhys-Faktor S gewonnen. Aus ihm lassen sich mögliche Mechanismen ableiten, die für die starke Rotverschiebung der roten Zustände im PS I verantwortlich sind. Um die in der Literatur mit der Zeit häufig korrigierten Werte für S , wie z.B. in den Ref. [Gob98, Rät00], zu überprüfen, wird in den folgenden Abschnitten ein Auswerteverfahren zum Ausgleich von spektraler Diffusion dazu genutzt, um aus Spektrensequenzen einzelner PS I-Komplexe spektrale Profile von roten Zuständen nahe der homogenen Linienformen zu exzerpieren. Diese werden dann, basierend auf dem Modell aus Abschnitt 2.2.4, simuliert. Die überraschenden Ergebnisse bei den PS I von *T. elongatus*, *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002 werden anschließend hinsichtlich möglicher Kopplungsmechanismen

interpretiert. Im zweiten Teil wird anhand des Korrelationsverhaltens zwischen Emissionsbanden in verschiedenen gegenüber P700 rotverschobenen Regionen untersucht, ob die unterschiedlichen roten Chlorophyll-Verbände über Energietransfer (ET) miteinander in Verbindung stehen. Mittels einer Polarisationsanalyse werden am PS I der Spezies *T. elongatus* zusätzlich die Winkel der zugehörigen Übergangsdipolmomente zueinander bestimmt. Die Winkelbeziehung bietet Aufschluss darüber, ob ein direkter ET zwischen zwei roten Zuständen innerhalb eines Monomers mit den Ergebnissen aus Ref. [Pål96] vereinbar ist. Dort wurde festgestellt, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit einer Wellenlänge von ~ 708 nm die Polarisation der Fluoreszenz einen großen Anteil enthält, der nicht der Polarisation des eingestrahnten Lichts entspricht.

6.2 Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform

Aus der homogenen Linienform eines Emitters können wichtige Parameter bestimmt werden, die sowohl Eigenschaften der Proteinbindungstasche enthalten als auch die Kopplungsstärke zwischen dem optischen Übergang des Pigments und den vibronischen Freiheitsgraden des Proteins. Im Abschnitt 5.3 wurde gezeigt, dass die Anregung von PS I-Komplexen durch Lichteinstrahlung zu einer Verstärkung der spektralen Diffusion führt. Diese Dynamik verhindert, dass in der Fluoreszenz direkt die homogene Linienform eines roten Zustands ermittelt werden kann. Ein größeres Problem stellt die spektrale Durchmischung der Emissionsbeiträge von mehreren roten Zuständen dar. Bei den betroffenen Komplexen kann nicht entschieden werden, welcher Fluoreszenzanteil zu einer ZPL gehört, d.h. die Spektren dieser Komplexe sind zur Bestimmung der homogenen Linienform ungeeignet. Glücklicherweise ergab sich bei einigen Komplexen, dass nach einer gewissen Belichtungszeit einer der roten Zustände in einen Dunkelzustand fiel, so dass die einem zweiten roten Zustand überlagerten Emissionen ausblieben. Zudem konnte die spektrale Dynamik, deren Fluktuationsrate τ_{fluk}^{-1} kleiner als die Messrate τ_{exp}^{-1} war, messtechnisch direkt erfasst werden, wie aus Kapitel 5 ausführlich hervorging. In Abbildung 6.1 wird erklärt, wie dieser „langsame“ Teil der spektralen Diffusion einer ZPL nachträglich eliminiert werden kann, denn das Signal-zu-Rausch-Verhältnis eines einzigen über $\tau_{\text{exp}} = 1$ s akkumulierten Spektrums bietet nicht die Möglichkeit für eine eindeutige Simulation. Der oben links gezeigte Ausschnitt einer Spektrensequenz eines individuellen PS I-Komplexes von *Synechocystis* zeigt eine springende ZPL bei $\bar{\lambda} \simeq 720,5$ nm, die nach dem Photo-bleichen einer breiten überlagerten Fluoreszenzbande übrig geblieben ist. Die durch die spektrale Diffusion verbreiterte ZPL ist aus der zeitlichen Projektion darunter ersichtlich. Mittels des im Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Algorithmus wurde in der Spektrensequenz nach lokalen Maxima gesucht. Dabei wurde für diese Anwendung das Kriterium steiler Flanken auf beiden Seiten des jeweiligen ZPL-Maximums verschärft, so dass nur Spektren mit möglichst schmaler ZPL selektiert wurden. Die selektierten Spektren wurden

6.2 Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform

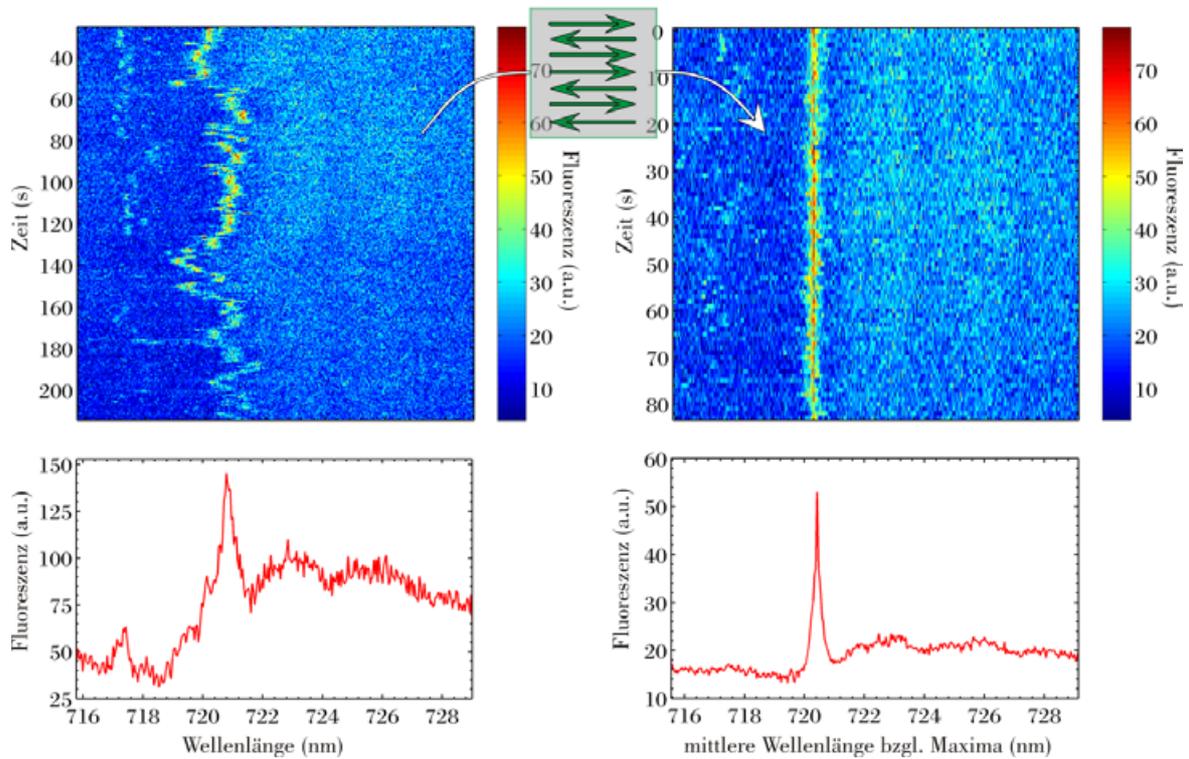


Abbildung 6.1: Methode zur Eliminierung der spektralen Diffusion mit $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$, um einen spektralen Verlauf möglichst nahe der natürlichen Linienform der ZPLs zu erhalten. **Links:** Ausschnitt aus einer Spektrensequenz der Emission eines einzelnen PS I-Komplexes von *Synechocystis*. Darunter ist die zugehörige zeitliche Projektion dargestellt. **Rechts:** Mittels des in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Algorithmuses wurde in der Spektrensequenz nach lokalen Maxima gesucht, auf deren mittleren spektralen Position die selektierten Spektren übereinander geschoben wurden. Darunter wird das resultierende Summenspektrum gezeigt.

auf der mittleren spektralen Maximum-Position der ZPLs übereinander geschoben. In der darunter dargestellten zeitlichen Projektion wird durch dieses Verfahren eine spektrale Linienform erzielt, die der homogenen Linienform des roten Zustands bei gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis am nächsten liegt.

6.2.1 Elektron-Phonon-Kopplung beim PS I von *T. elongatus*

Individuelle ZPLs wurden aus den Spektrensequenzen einzelner PS I-Komplexe der Spezies *T. elongatus* selektiert, die möglichst spektral von anderen Fluoreszenzbanden isoliert auftraten. Die einzelnen Spektren wurden nach dem im einleitenden Abschnitt erläuterten Verfahren gegeneinander verschoben, um den Teil der spektralen Diffusion mit $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$ zu eliminieren, wobei die spektrale Linienform in den einzelnen Spektren unverändert blieb. In Abbildung 6.2 werden sechs solcher Datensätze von Linien in der spektralen Region um 708 nm gezeigt, die sich in ca. 15 % der Fälle exzerpieren lassen.

6 Charakterisierung der roten Zustände

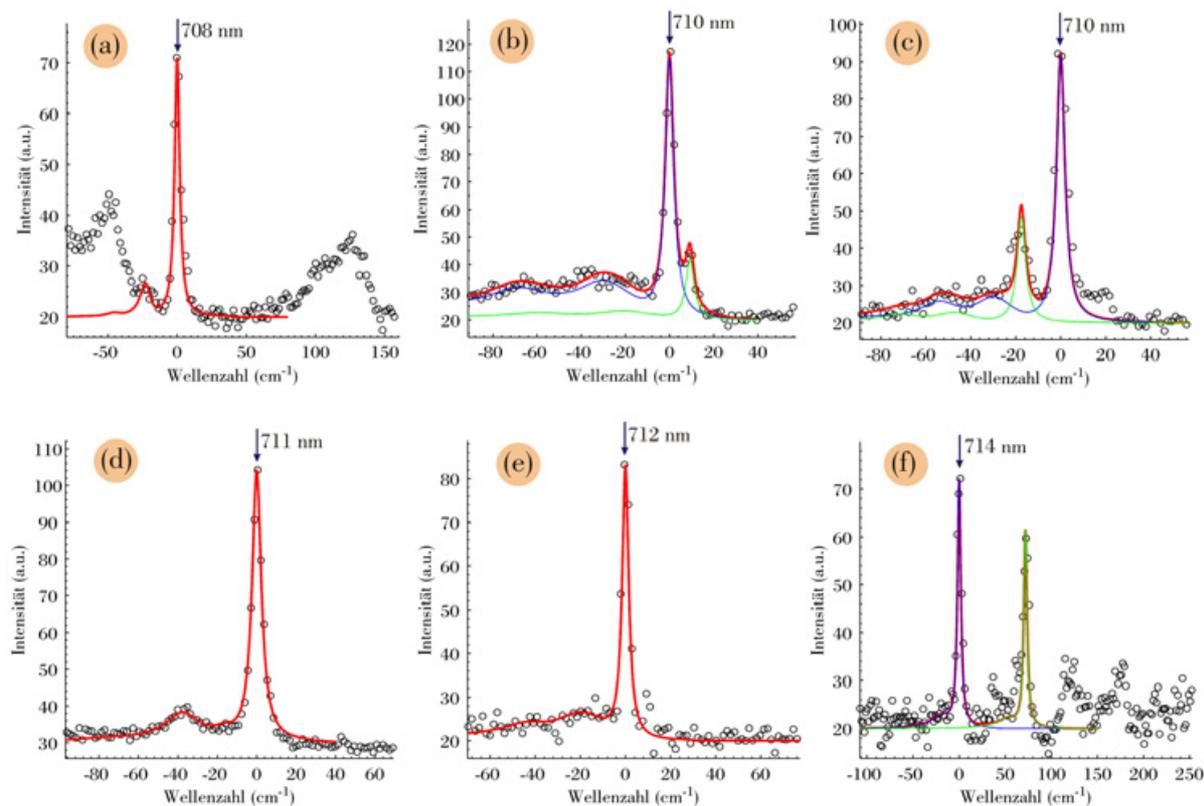


Abbildung 6.2: Simulationen der Linienformen verschiedener ZPLs im spektralen Bereich um 708 nm beim PS I von *T. elongatus*. Die Datensätze wurden durch das im einleitenden Abschnitt erläuterte Verfahren selektiert und bearbeitet. Aufgetragen wurde jeweils die Intensität im Energieabstand vom Maximum in Wellenzahlen. Die durchgezogenen, farbigen Linien markieren jeweils Simulationen, die gemäß der Theorie im Abschnitt 2.2.4 zur Linienform berechnet wurden. Der verwendete Algorithmus wurde von Prof. V. Zazubovich zur Verfügung gestellt.

Die mittleren Wellenlängen der Maxima der ZPLs sind eingetragen. Aufgetragen wurde jeweils die Intensität im Energieabstand vom Maximum in Wellenzahlen. Die durchgezogenen, farbigen Linien markieren jeweils Simulationen. Im Abschnitt 2.2.4 wurde hierfür ausführlich vorgerechnet, wie man in linearer Näherung unter Berücksichtigung der vibronischen Bewegung im Protein mit der Annahme einer lorentzförmigen Spektraldichte eine iterative Lösung für die Linienform erhält. Unter den gleichen Annahmen ist in der Arbeitsgruppe von Prof. F. G. Small ein Simulationsalgorithmus zur Beschreibung der Linienform von Lochbrennspektren vom PS I entstanden. Der Original-Quellcode wurde mir freundlicherweise von Prof. V. Zazubovich zur Verfügung gestellt. Dieses Programm wurde mit nur einigen leichten Modifikationen zur Simulation der durch das Verschiebungsverfahren erhaltenen Einzelmolekül-Spektren verwendet, so dass ein direkter Vergleich von resultierenden Ergebnissen mit publizierten Ergebnissen, die mit der Methode des Lochbrenns erzielt wurden, sinnvoll erscheint.

6.2 Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform

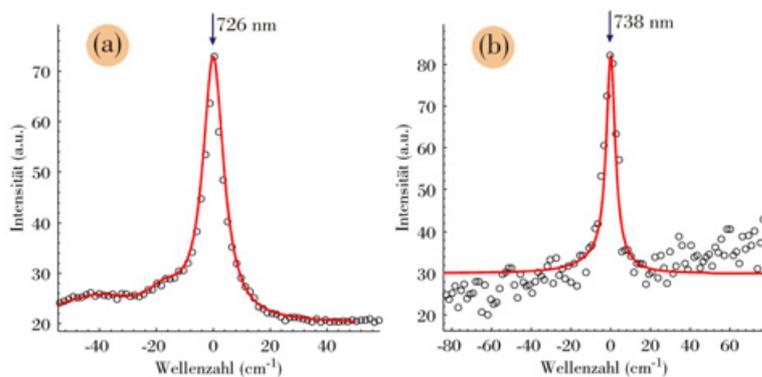


Abbildung 6.3: Simulationen der Linienformen verschiedener ZPLs in der spektralen Region > 719 nm beim PS I von *T. elongatus*. Die Abbildung wurde analog zur Beschreibung in Abb. 6.2 erstellt.

Die Datensätze (b) und (d) stammen von Proben in D_2O -Puffer. In den Datensätzen (b), (c) und (f) wurden jeweils zwei Realisierungen der ZPLs angenommen und in der Simulation berücksichtigt. Alle Parameter der Simulationen für beide Realisierungen sind jeweils identisch. Der Unterschied besteht ausschließlich in verschiedenen Gewichtungen. Die Spektren in den Bildern (c), (e) und (f) zeigen noch weitere Realisierungen bei höheren Energien, die in der Simulation vernachlässigt wurden. In Auftragung (a) werden auf beiden Seiten der ZPL um -55 cm^{-1} und 125 cm^{-1} breitere Strukturen beobachtet, die jeweils spitz zulaufen. Bei diesen bleibt unklar, ob derselbe rote Zustand sie emittiert oder zu ihnen beigetragen hat, d.h. spektrale Fluktuationen der Linienform aus ZPL und PSB zu beiden Seiten sind denkbar. Bei beiden fällt eine Asymmetrie auf, dass jeweils die höherenergetische Flanke steiler ist. Das Einbeziehen der Bande bei -50 cm^{-1} in die Simulation führt zu untypischen Parametern, die nicht sinnvoll erscheinen, d.h. eine zweite stärker fluktuierende Realisierung der ZPL oder Bande anderen Ursprungs wird als wahrscheinlicher angenommen als die Zugehörigkeit zur Schwingungsseitenbande (PSB). Die Parameter der Simulationen (a) – (f) sind im oberen Abschnitt der Tabelle 6.1 zusammengestellt. Die Huang-Rhys-Faktoren $S = S_1 + S_2$ der Zustände, die in der Region um 708 nm emittieren, liegen im Bereich zwischen $0,2 - 1,1$. Je größer der Huang-Rhys-Faktor, desto mehr Intensität fällt auf die PSB ab. Der mittlere Huang-Rhys-Faktor beträgt hier $S = 0,54$. Der Wert $\bar{\omega}_1$ gibt die mittlere Frequenz der breiten Verteilung von niederfrequenten Vibronen im Protein an, auf die die Kopplung des elektronischen Übergangs begrenzt ist [Red92, Hay94, May00]. $\bar{\omega}_1$ variiert zwischen $17 - 30$ cm^{-1} . Der optische Übergang koppelt zusätzlich an eine Mode $\bar{\omega}_2$ an, die der Modulation der Pigment-Pigment-Wechselwirkung durch die intermolekulare Schwingungsbewegung zugeordnet wird [Red93]. Sie liegt zwischen $20 - 70$ cm^{-1} . Die Breiten beider PSB-Profile Γ_1 und Γ_2 nehmen Werte zwischen $5 - 25$ cm^{-1} an. Die Größe L aus der letzten Spalte der Tabelle gibt die Breite einer Lorentzkurve an, mit der die simulierte Linienform zusätzlich insgesamt gefaltet wurde. Die Notwendigkeit dieser Faltung wird durch die schnellen Fluktuationen mit Raten > 1 s^{-1} begründet, die das gesamte Linienprofil innerhalb der Akkumulationszeit eines einzelnen Spektrums spektral verschieben. Diese Verschiebungen sind lorentzförmig verteilt, d.h. im Ergebnis werden die Datenpunkte gut durch eine zusätzliche Lorentzverbreiterung beschrieben, während die Annahme einer Gaußverbrei-

6 Charakterisierung der roten Zustände

Tabelle 6.1: Zusammenstellung der Parameter der Simulationen aus den Abbildungen 6.2 und 6.3. Der Huang-Rhys-Faktor ergibt sich jeweils zu $S = S_1 + S_2$. $\bar{\omega}_1$ entspricht der mittleren Schwingungsfrequenz, γ der Linienbreite der ZPL, Γ_1 der Breite des PSB-Profiles, $\bar{\omega}_2$ der Frequenz der *special pair* kennzeichnenden Mode, Γ_2 der zugehörigen Breite und L der Breite einer Lorentzkurve, mit der die Linienform zusätzlich insgesamt gefaltet wurde. (s. Text für Details.)

ZPL	$\bar{\lambda}$ (nm)	S_1	γ (cm ⁻¹)	$\bar{\omega}_1$ (cm ⁻¹)	Γ_1 (cm ⁻¹)	S_2	$\bar{\omega}_2$ (cm ⁻¹)	Γ_2 (cm ⁻¹)	L (cm ⁻¹)
(a)	708	0,22	0,5	23	5	%	%	%	4,0
(b)	710	0,70	0,5	30	25	0,40	70	25	4,0
(c)	710	0,30	0,5	30	15	0,25	54	15	4,1
(d)	711	0,04	0,5	17	6	0,45	38	15	5,0
(e)	712	0,50	0,5	20	20	0,20	20	20	3,0
(f)	714	0,20	0,5	20	20	%	%	%	4,0
(a)	726	0,12	0,5	18	7	0,33	41	27	8,0
(b)	738	0,20	0,5	5	20	%	%	%	5,0

terung zu keiner guten Anpassung führt. Die Parameter der in D₂O-Puffer präparierten Probe zeigen keine auffälligen Abweichungen.

Die Abbildung 6.3 zeigt in Analogie zur Abbildung 6.2 entsprechende Simulationen für zwei rote Zustände, die in der Region > 719 nm emittiert haben. In diesem Spektralbereich sind nur ca. 5 % der ZPLs zur Bestimmung der Linienform geeignet, weshalb sich die Auswertung auf zwei Spektren konzentriert. Die ZPL im Bild (a) stammt von einer Probe in D₂O-Puffer und zeigt ihr Maximum bei 726 nm. Der zugehörige Huang-Rhys-Faktor beträgt $S = 0,45$. Der Datensatz im Bild (b) stammt aus der Spektrensequenz in Abbildung 5.1. Die für die Simulation genutzten Spektren wurden aus dem Zeitbereich der ersten 10 s selektiert. Die mittlere spektrale Position der ZPL befindet sich in dieser Zeit bei 738 nm. Der zugehörige Huang-Rhys-Faktor liegt bei maximal $S = 0,20$. Alle Parameter der beiden Simulationen (a) und (b) sind in Tabelle 6.1 im unteren Abschnitt aufgeführt. Im Fall (b) wird die kleine mittlere Schwingungsfrequenz $\bar{\omega}_1 = 5$ cm⁻¹ und der von Null verschiedene Huang-Rhys-Faktor dazu genutzt, um die leichte Asymmetrie der Linienform der ZPL auszugleichen. Bei der Wahl eines typischen Werts für $\bar{\omega}_1$ von ca. ~ 20 cm⁻¹ wird die beste Anpassung der Simulation durch $S = 0$ erreicht. Insbesondere auch im stark rotverschobenen Bereich werden demnach elektronische Übergänge gefunden, die nur schwach an die vibronischen Freiheitsgrade im Protein koppeln.

6.2.2 Elektron-Phonon-Kopplung beim PS I von *Synechocystis*

Analog zur Prozedur im vorigen Abschnitt wurden für individuelle ZPLs aus Spektrensequenzen einzelner PS I-Komplexe der Spezies *Synechocystis* Datensätze herausgearbei-

6.2 Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform

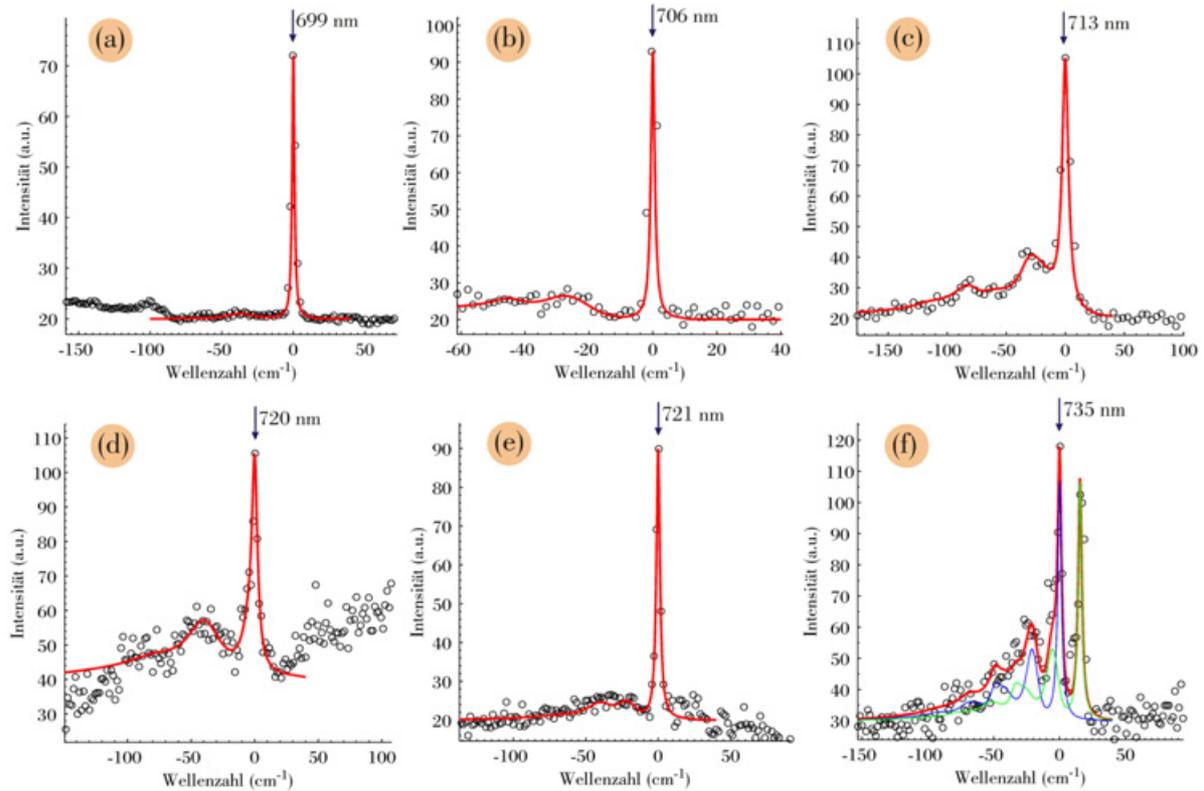


Abbildung 6.4: Simulationen der Linienformen verschiedener ZPLs im spektralen Bereich von 699 – 735 nm beim PS I von *Synechocystis*. Die Datensätze wurden durch das im einleitenden Abschnitt erläuterte Verfahren selektiert und bearbeitet. Aufgetragen wurde jeweils die Intensität im Energieabstand vom Maximum in Wellenzahlen. Die durchgezogenen, farbigen Linien markieren jeweils Simulationen, die gemäß der Theorie im Abschnitt 2.2.4 zur Linienform berechnet wurden. Der verwendete Algorithmus wurde von Prof. V. Zazubovich zur Verfügung gestellt.

tet, um die spektrale Linienform zu bestimmen. In Abbildung 6.4 sind sechs Datensätze dargestellt, bei denen die mittleren Wellenlängen der Maxima der ZPLs weit über den gesamten roten Spektralbereich streuen. Im Gegensatz zum PS I von *T. elongatus* sind die Spektren vom PS I von *Synechocystis* in H₂O-Puffer aufgrund der stärkeren spektralen Dynamik und den häufigen spektralen Überschneidungen von Fluoreszenzbeiträgen zur Simulation der Linienform schlechter geeignet. Die dargestellten Datensätze (a) – (f) stammen daher von Proben in D₂O-Puffer. Die Simulationen sind mit farbigen Linien eingezeichnet. Im Datensatz (f) wurden in der Simulation zwei Realisierungen der ZPL berücksichtigt. Die zugehörige Spektrenfolge wird in Abbildung 5.12 gezeigt, wobei die selektierten Spektren aus dem vergrößert dargestellten Zeitbereich stammen.

In Abbildung 6.5 werden die gegeneinander verschobenen Spektren gezeigt, die in ihren zeitlichen Projektionen die Datensätze (c), (e) und (f) ergeben. Die Spektren im Bild (f) wurden aus der Sequenz in Abbildung 5.15 selektiert. Zwischen 716 – 720 nm sind weitere Realisierungen der ZPL markiert, die in der Projektion (e) zwischen 0 – 90 cm⁻¹

6 Charakterisierung der roten Zustände

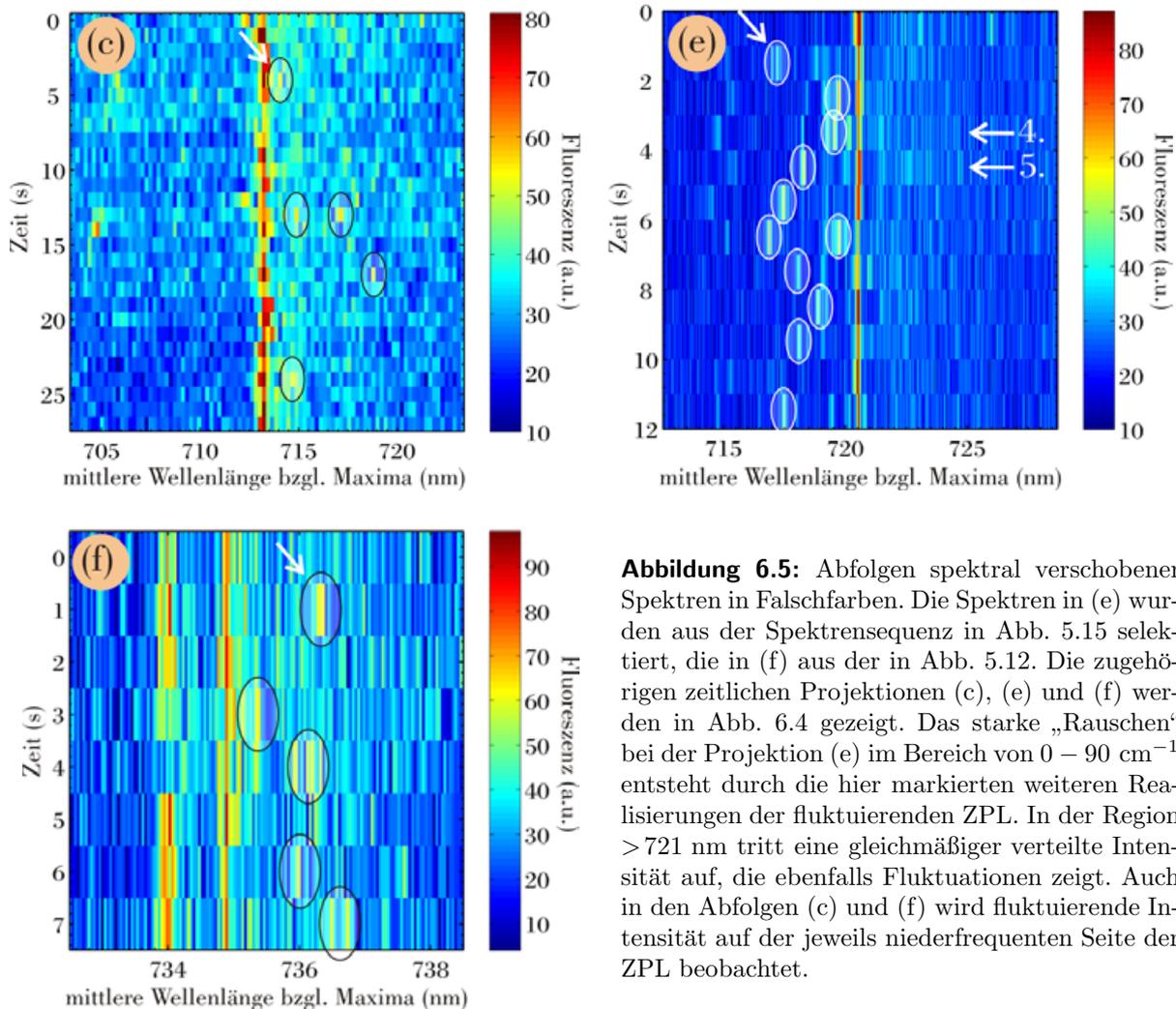


Abbildung 6.5: Abfolgen spektral verschobener Spektren in Falschfarben. Die Spektren in (e) wurden aus der Spektrensequenz in Abb. 5.15 selektiert, die in (f) aus der in Abb. 5.12. Die zugehörigen zeitlichen Projektionen (c), (e) und (f) werden in Abb. 6.4 gezeigt. Das starke „Rauschen“ bei der Projektion (e) im Bereich von $0 - 90 \text{ cm}^{-1}$ entsteht durch die hier markierten weiteren Realisierungen der fluktuierenden ZPL. In der Region $> 721 \text{ nm}$ tritt eine gleichmäßiger verteilte Intensität auf, die ebenfalls Fluktuationen zeigt. Auch in den Abfolgen (c) und (f) wird fluktuierende Intensität auf der jeweils niederfrequenten Seite der ZPL beobachtet.

einen stark unebenen spektralen Verlauf hervorrufen. Ohne diese zusätzlichen Aufenthalte der ZPL innerhalb der Akquisitionszeit wäre der Verlauf der zugehörigen Projektion in dieser Region glatt wie z.B. der im Bild (a) der Abbildung 6.4. Betrachtet man nun den Bereich $> 721 \text{ nm}$, fällt ebenfalls eine spektrale Dynamik auf. Die Intensität in dieser Region ist jedoch gleichmäßiger verteilt. Die Form der Schwingungsseitenbande (PSB) in der Projektion (e) entsteht durch die zeitliche Mittelung über diese Fluktuationen. Vergleicht man z.B. das vierte mit dem fünften Spektrum im Bild (e) der Abbildung 6.5, wird ersichtlich, dass sich die im Bereich $> 721 \text{ nm}$ gemessene Intensitätsverteilung ändert und auch der Abstand vom Maximum der Verteilung zur ZPL variiert. Ein ähnliches Verhalten wird auch bei den Datensätzen (b), (c) und (f) festgestellt, wobei die Abfolgen von gegeneinander verschobenen Spektren, die den Projektionen (c) und (f) zugrunde liegen, ebenfalls in der Abbildung 6.5 gezeigt werden. Durch die zeitliche Mittelung über jeweils mehrere Spektren wird die Dynamik in der PSB bei den Simulationen berücksichtigt. Keine oder zu kurze Mittelung führt zu „ausgedünnten“ Datensätzen, aus deren

6.2 Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform

Tabelle 6.2: Zusammenstellung der Parameter der Simulationen aus Abb. 6.4. Der Huang-Rhys-Faktor ergibt sich jeweils zu $S = S_1 + S_2$. $\bar{\omega}_1$ entspricht der mittleren Schwingungsfrequenz, γ der Linienbreite der ZPL, Γ_1 der Breite des PSB-Profiles, $\bar{\omega}_2$ der Frequenz der *special pair* kennzeichnenden Mode, Γ_2 der zugehörigen Breite und L der Breite einer Lorentzkurve, mit der die Linienform zusätzlich insgesamt gefaltet wurde. (s. Abschnitt 6.2.1 für Details.)

ZPL	$\bar{\lambda}$ (nm)	S_1	γ (cm ⁻¹)	$\bar{\omega}_1$ (cm ⁻¹)	Γ_1 (cm ⁻¹)	S_2	$\bar{\omega}_2$ (cm ⁻¹)	Γ_2 (cm ⁻¹)	L (cm ⁻¹)
(a)	699	%	0,5	%	%	0,20	37	18	1,5
(b)	706	0,90	0,5	27	18	0,35	45	12	1,0
(c)	713	0,80	0,5	30	25	0,28	83	14	6,0
(d)	720	0,25	0,5	5	5	1,10	39	25	5,0
(e)	721	0,23	0,5	22	12	0,35	40	18	2,5
(f)	735	0,80	0,5	21	8	0,25	49	6	3,0

Simulation insbesondere abweichende Parameter für $\bar{\omega}_1$, Γ_1 , $\bar{\omega}_2$ und Γ_2 hervorgehen.

In Tabelle 6.2 sind die Parameter der Simulationen (a) – (f) zusammengestellt. Eine Übersicht über die einzelnen Größen wurde im Abschnitt 6.2.1 gegeben. Die Parameter im oberen Teil gehören zu ZPLs in der Region < 714 nm. Beim Datensatz (a) lässt sich im typischen Energieabstand von bis zu 30 cm^{-1} von der ZPL keine PSB feststellen, d.h. der Huang-Rhys-Faktor S_1 ist Null oder nahezu Null bzw. die Kopplung des elektronischen Übergangs an niederfrequente Schwingungen des Proteins ist vernachlässigbar gering. Dabei ist anzumerken, dass die ZPL innerhalb der Messzeit von ca. 250 s nur dreimal gesprungen ist: zweimal auf eine Position bei ca. $\bar{\nu}_{\text{ZPL}} + 10 \text{ cm}^{-1}$ und einmal auf eine bei ca. $\bar{\nu}_{\text{ZPL}} - 10 \text{ cm}^{-1}$, wobei die Positionen jeweils für ca. 3 s eingenommen wurden. Im Abstand von 37 cm^{-1} befindet sich das Maximum einer schwachen Bande, die durch einen kleinen Huang-Rhys-Faktor S_2 von maximal 0,2 beschrieben wird. Im Fall (b) und (c) mit ZPLs bei 706 nm und 713 nm ergeben sich Huang-Rhys-Faktoren von $S = 1,25$ und $S = 1,08$. Im unteren Teil der Tabelle sind die Parameter der ZPLs in der Region > 714 nm aufgeführt. Der zum Datensatz (d) zugehörige Huang-Rhys-Faktor beträgt $S = 1,35$. Bei der Simulation wurde der Anteil mit $\bar{\omega}_1$ nur zum Ausgleich der Asymmetrie der ZPL verwendet. Des Weiteren ist unklar, in wie weit das Linienprofil von einem weiteren Fluoreszenzbeitrag beeinflusst wird. Für die Simulation der Linienform im Bild (e) wurde $S = 0,58$ gesetzt. Beim Datensatz (f) ergibt sich bei der dargestellten Simulation für $S = 1,05$. Insbesondere in der Darstellung (f) in Abbildung 6.5 kann der Entstehung der durch die Simulation beschriebenen PSB mit ihrem Maximum bei -21 cm^{-1} ($\hat{=} -\bar{\omega}_1$) verfolgt werden. In wie weit zusätzlich Fluktuationen der ZPL zur Intensität der PSB beitragen bleibt unklar.

6 Charakterisierung der roten Zustände

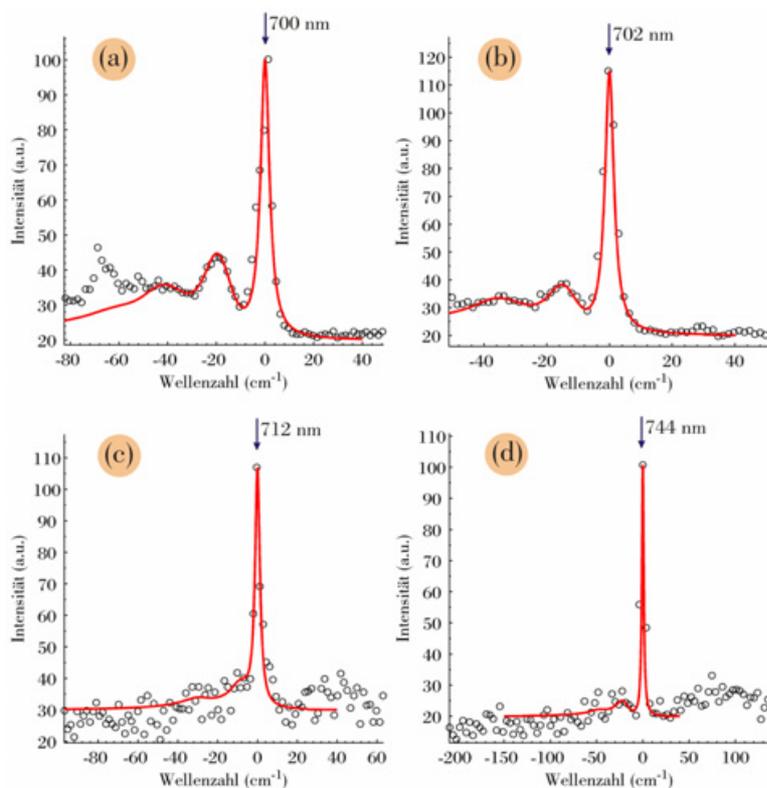


Abbildung 6.6: Simulationen der Linienformen verschiedener ZPLs im spektralen Bereich von 700 – 744 nm beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002. Die Datensätze wurden durch das im einleitenden Abschnitt erläuterte Verfahren selektiert und bearbeitet. Aufgetragen wurde jeweils die Intensität im Energieabstand vom Maximum in Wellenzahlen. Die durchgezogenen, roten Linien markieren jeweils Simulationen, die gemäß der Theorie im Abschnitt 2.2.4 zur Linienform berechnet wurden. Der verwendete Algorithmus wurde von Prof. V. Zazubovich zur Verfügung gestellt.

6.2.3 Elektron-Phonon-Kopplung beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002

Wie zuvor für die PS I der Spezies *T. elongatus* und *Synechocystis* wurden für individuelle ZPLs aus Spektrensequenzen einzelner PS I-Komplexe des Organismus *Synechococcus* sp. PCC 7002 Datensätze herausgearbeitet, um die spektrale Linienform zu beschreiben. In Abbildung 6.6 werden vier Datensätze mit ZPLs der mittleren Wellenlängen bei 700 nm, 702 nm, 712 nm und 744 nm gezeigt. Bei der Probe handelt es sich um PS I-Monomere, bei denen die sich an der Trimerisierungsachse befindliche Proteinuntereinheit PsaL fehlt. Beim Vergleich der Monomer-Spektren mit Trimer-Spektren des entsprechenden Wildtyps fällt kein eklatanter Unterschied auf, was für eine intakte Monomer-Probe spricht. Aufgrund der starken spektralen Dynamik der Probe in H₂O-Puffer wurden wie beim PS I von *Synechocystis* ausschließlich Messungen an einer Probe in D₂O-Puffer verwendet. Die an den Datensätzen (a) – (d) durchgeführten Simulationen sind mit durchgezogenen, roten Linien eingezeichnet.

In Abbildung 6.7 werden zwei Simulationen an einer weiteren ZPL in der spektralen Region um 700 nm gezeigt. Man erkennt in der Spektrensequenz im rechten Teil, dass ein zur Fluoreszenz im Bereich um 700 nm beitragender Emitter nach 130 s in einen Dunkelzustand fällt oder in einen Zustand, der energetisch außerhalb des spektralen Detektionsbereichs liegt. Aus den Zeitbereichen vor und nach diesem Prozess wurden jeweils gemäß

6.2 Bestimmung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke aus der Linienform

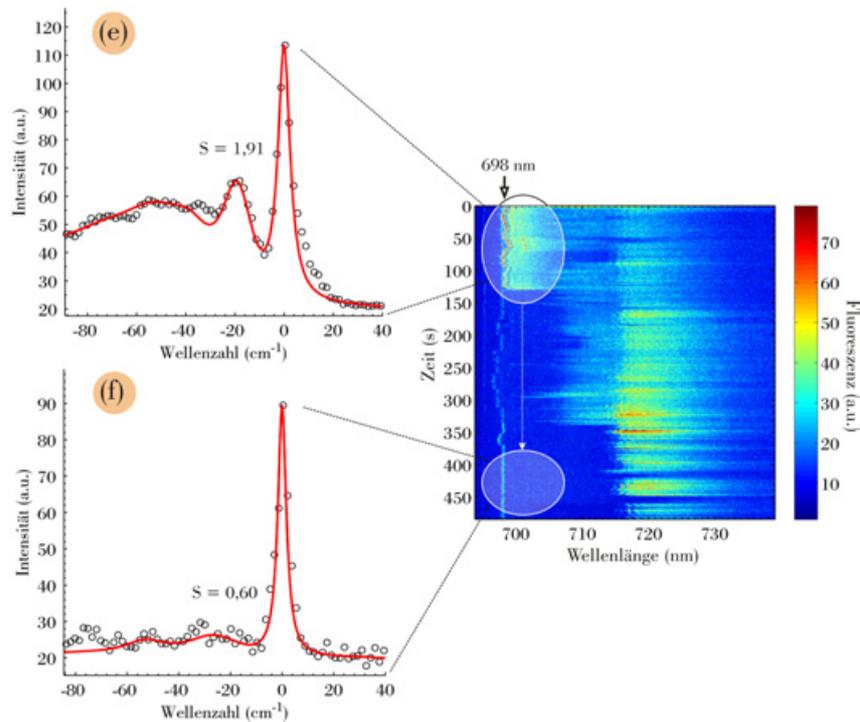


Abbildung 6.7: Variation der Linienform einer ZPL. Die mittlere Wellenlänge der ZPL beträgt 698 nm. In beiden markierten Zeitbereichen wurden gemäß dem im einleitenden Abschnitt geschilderten Verfahren Spektren selektiert und gegeneinander verschoben. Im linken Teil sind die zugehörigen Projektionen (e) und (f) dargestellt. In der Spektrensequenz beobachtet man, dass ein zur Fluoreszenz in der Region um 700 nm beitragender Emittor in einen Dunkelzustand fällt oder in einen Zustand, der energetisch außerhalb des spektralen Detektionsbereichs liegt. Die Simulation der beiden Datensätze (e) und (f) führt dadurch zu verschiedenen Parametern. Die Huang-Rhys-Faktoren sind eingezeichnet.

dem im einleitenden Abschnitt geschilderten Verfahren Spektren selektiert und gegeneinander verschoben. Die Bereiche sind markiert. Die resultierenden Datensätze (e) und (f) werden auf der linken Seite gezeigt. Beide Profile wurden simuliert. Im Bild (a) weicht die Simulation an zwei Stellen von den Datenpunkten ab. In der Region um 10 cm^{-1} kann die Asymmetrie der ZPL nicht erfasst werden und im Bereich -33 cm^{-1} liegen Datenpunkte über der simulierten Kurve, die nicht simultan berücksichtigt werden können, d.h. ohne die Annahme weiterer Realisierungen oder einer überlagerten zweiten Fluoreszenzbande. Im Zeitbereich zwischen 48 – 69 s wird eine zweite ZPL oder Realisierung bei ca. 701 nm beobachtet, deren Intensität im Datensatz (e) bei 19 cm^{-1} eine Bande produziert, die bei der Simulation als wesentlicher Bestandteil der Schwingungsseitenbande (PSB) einbezogen wurde. Im Zeitbereich, aus dem der Datensatz (f) erstellt wurde, fehlt der größte Teil der überlagerten Fluoreszenzbeiträge, während die ZPL bei 698 nm weiterhin emittiert wurde. Dadurch entfällt auf den Spektralbereich, in dem eine PSB erwartet wird, eine wesentlich geringere Intensität, wobei ein spektral „wellenförmiger“ Rest der Fluoreszenz übrigbleibt. Die Deutung der Fluoreszenzbeiträge im Datensatz (e) als zur PSB zuge-

6 Charakterisierung der roten Zustände

Tabelle 6.3: Zusammenstellung der Parameter der Simulationen aus den Abbildungen 6.6 und 6.7. Der Huang-Rhys-Faktor ergibt sich jeweils zu $S = S_1 + S_2$. $\bar{\omega}_1$ entspricht der mittleren Schwingungsfrequenz, γ der Linienbreite der ZPL, Γ_1 der Breite des PSB-Profiles, $\bar{\omega}_2$ der Frequenz der *special pair* kennzeichnenden Mode, Γ_2 der zugehörigen Breite und L der Breite einer Lorentzkurve, mit der die Linienform zusätzlich insgesamt gefaltet wurde. (s. Abschnitt 6.2.1 für Details.)

ZPL	$\bar{\lambda}$ (nm)	S_1	γ (cm ⁻¹)	$\bar{\omega}_1$ (cm ⁻¹)	Γ_1 (cm ⁻¹)	S_2	$\bar{\omega}_2$ (cm ⁻¹)	Γ_2 (cm ⁻¹)	L (cm ⁻¹)
(a)	700	0,80	0,5	20	11	0,35	45	21	4,0
(b)	702	0,50	0,5	15	9	0,48	37	17	3,0
(c)	712	0,30	0,5	9	9	0,20	30	15	2,5
(d)	744	0,35	0,5	22	15	0,10	50	18	2,0
(e)	698	0,95	0,5	19	10	0,96	50	27	5,5
(f)	698	0,40	0,5	27	20	0,20	53	13	3,5

hörige Intensität führt in der Simulation zu einem mindestens um Faktor drei größeren Huang-Rhys-Faktor.

In Tabelle 6.3 sind die Parameter der Simulationen aus den Abbildungen 6.6 und 6.7 zusammengestellt. An einem Beispiel wurde explizit vorgeführt, dass im Spektralbereich der PSB Fluoreszenzbeiträge die Intensität anheben können, die höchstwahrscheinlich nicht zum untersuchten Linienprofil dazugehören. Vermutlich charakterisiert demnach eher der Parametersatz der Simulation (f) ein Profil nahe der homogenen Linienform der entsprechenden ZPL bei 698 nm aus der Spektrenfolge in Abbildung 6.7. Der Huang-Rhys-Faktor beträgt $S = 0,6$. Bei den Datensätze (a) und (b) ist unklar, ob im Bereich der in der Simulation berücksichtigten PSB nicht zugehörige Fluoreszenzbeiträge eingeflossen sind, so dass die bestimmten Huang-Rhys-Faktoren von $S = 1,15$ und $S = 0,98$ obere Abschätzungen darstellen. Die Simulationen an den Datensätzen (c) und (d) zeigen, dass eine ZPL bei 712 nm und sogar eine im stark rotverschobenen Bereich bei 744 nm als obere Abschätzung durch kleine Huang-Rhys-Faktoren von $S = 0,50$ bzw. $S = 0,45$ beschrieben werden.

6.3 Korrelation zwischen verschiedenen roten Zuständen

Zum Verständnis der Dynamik in der Fluoreszenz der roten Zustände einzelner PS I-Komplexe spielen zwei Prozesse eine entscheidende Rolle: zum einen die im Kapitel 5 ausführlich behandelte spektrale Diffusion der verschiedenen roten Zustände und zum anderen der resonante Energietransfer (ET) innerhalb PS I. Die roten Zustände beziehen ihre Anregungsenergie über ET von den Antennenpigmenten. Dabei ist noch nicht endgültig geklärt, ob innerhalb eines Komplexes zwischen verschiedenen roten Chlorophyll-

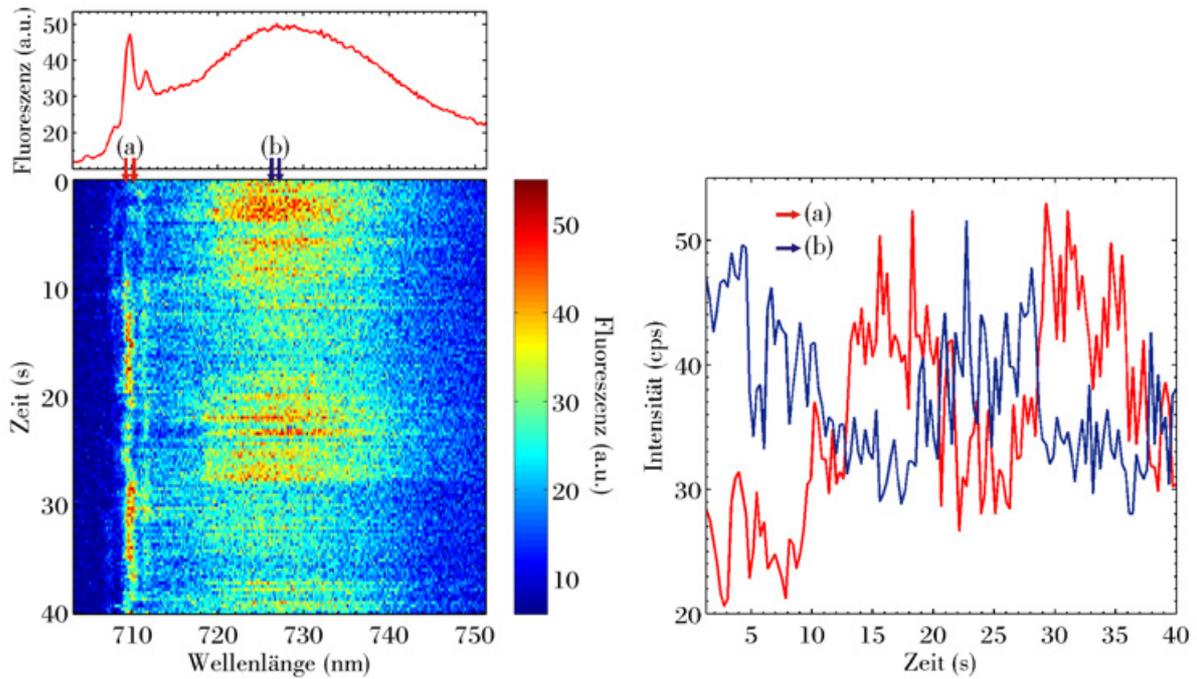


Abbildung 6.8: Antikorrelation in der Fluoreszenz eines individuellen PS I-Trimers von *T. elongatus*. Im **linken Bild** wird eine Spektrensequenz über 40 s gezeigt. Die Akkumulationszeit beträgt 0,3 s pro Spektrum. Im oberen Teil ist die zugehörige zeitliche Projektion dargestellt. Betrachtet werden die Intensitätsverlagerungen zwischen der ZPL und der breiten Bande. Im **rechten Bild** wird die jeweils über die Bereiche (a) und (b) integrierte Intensität als Funktion der Zeit gezeigt. Der empirische Korrelationskoeffizient beträgt $\rho_{xy} = -0,5$.

Verbänden ein direkter ET stattfindet. Um aus dem Korrelationsverhalten unterschiedlicher Fluoreszenzbeiträge Informationen ableiten zu können, müssen zugrundeliegende Fluktuationsprozesse langsamer ablaufen als der Messprozess, d.h. $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$ muss gelten. Die Rate τ_{fluk}^{-1} variiert von Komplex zu Komplex. Für den Fall $\tau_{\text{fluk}}^{-1} \gg \tau_{\text{exp}}^{-1}$ ist das ermittelbare Korrelationsverhalten willkürlich, d.h. mit keinem Informationsgewinn verbunden.

6.3.1 Änderungen im Energietransfer

In Abbildung 6.8 wird ein individuelles Beispiel am PS I von *T. elongatus* gezeigt, bei dem die Bedingung $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$ erfüllt ist. Im linken Teil ist die zugehörige Spektrensequenz dargestellt. Man erkennt eine ZPL bei ca. 710 nm und eine breite Bande mit ihrem Maximum bei ca. 728 nm. Im Zeitbereich $t < 9$ s ist die ZPL intensitätsschwach, so dass sie kaum als ZPL identifiziert werden kann, während die breite Bande viel Intensität zeigt. In der Region $9 \text{ s} \leq t \leq 20 \text{ s}$ hat sich die Intensität der breiten Bande auffällig auf die ZPL im Spektralbereich (a) verlagert. Die umgekehrte Intensitätsverschiebung geschieht nach

6 Charakterisierung der roten Zustände

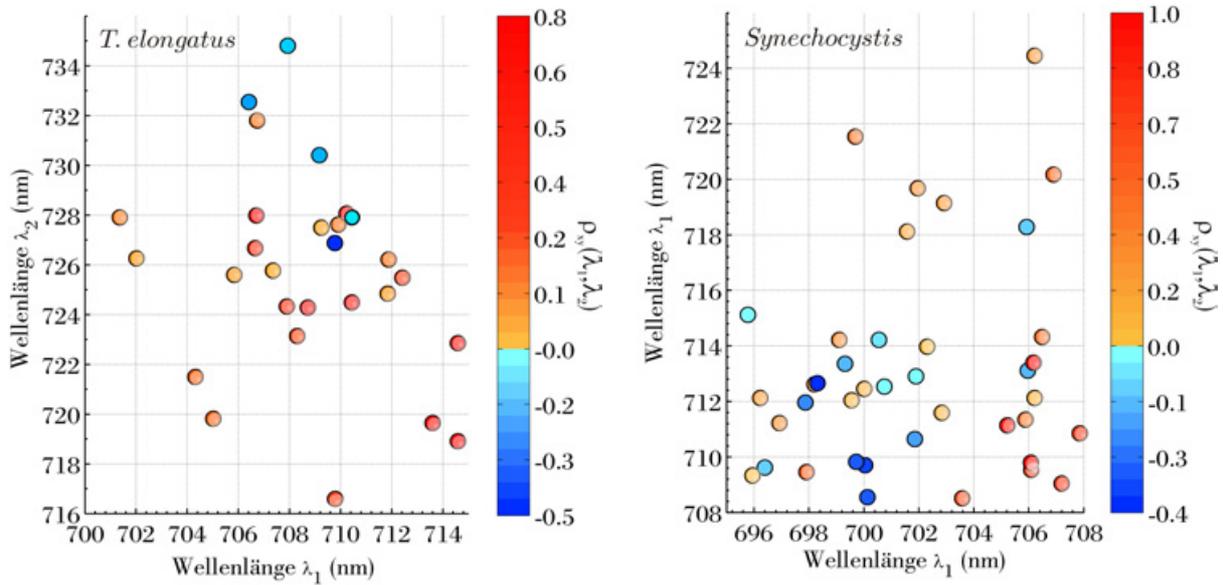


Abbildung 6.9: Statistik über das lineare Korrelationsverhalten von Fluoreszenzbanden roter Zustände in einzelnen PS I-Komplexen der Organismen (**links:**) *T. elongatus* und (**rechts:**) *Synechocystis*. Aufgetragen sind die empirischen Korrelationskoeffizienten ρ_{xy} zwischen jeweils zwei Zeitspuren aus den Spektrensequenzen mit den mittleren spektralen Positionen λ_1 und λ_2 , wobei die Werte durch Falschfarben angezeigt werden. Jeder Punkt gehört zu einem individuellen Komplex. λ_1 kennzeichnet für jeden einzelnen Komplex die Position des Maximums der ZPL im zugehörigen Summenspektrum. Entsprechend markiert λ_2 die Position des Maximums der zugehörigen breiten Bande. Zur Berechnung der Zeitspuren wurde jeweils über eine spektrale Breite um λ_1 und λ_2 von 2 – 9 nm aufsummiert.

20 s, jedoch bleibt die ZPL deutlich zu erkennen. Ein erneuter Wechsel nach 28 s lässt die ZPL intensiv aufleuchten, während die breite Bande an Intensität verliert. Im rechten Teil der Abbildung 6.8 sind die jeweils über die Bereiche (a) und (b) integrierten Intensitäten als Funktion der Zeit aufgetragen. Man erkennt deutlich die Antikorrelation zwischen den beiden Fluoreszenzsignalen. Beim genaueren Betrachten fällt auf, dass außer den drei Intensitätswechseln nach jeweils ca. 10 s auch schnellere Fluktuationen geschehen. Größtenteils wird auch in diesem Zeitregime eine klare Antikorrelation zwischen den beiden Signalen festgestellt.

Im Folgenden wird das Korrelationsverhalten der Emissionsbanden aus den verschiedenen spektralen Regionen statistisch untersucht. Um die einzelnen Ergebnisse besser zu quantifizieren, wurde für jeden einzelnen Komplex der empirische Korrelationskoeffizient

$$\rho_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (6.1)$$

zwischen zwei Zeitspuren ermittelt, wobei x_i den zugehörigen Intensitäten des i -ten Spek-

trums und \bar{x} dem empirischen Erwartungswert

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

der einen Zeitspur bei λ_1 entsprechen und y_i, \bar{y} analog den Werten der anderen bei λ_2 . n entspricht der Spektrenanzahl der zugehörigen Spektrensequenz. Die spektrale Lage der Zeitspuren wurde, analog zum Beispiel aus Abbildung 6.8, auf die jeweiligen Maxima der Summenspektren gelegt. Dabei wurde beim PS I von *T. elongatus* jeweils die eine Position λ_1 aus dem Bereich $\lambda \leq 715$ nm und die andere λ_2 aus dem Bereich $\lambda > 715$ nm ermittelt. Beim PS I von *Synechocystis* lag die entsprechende Grenze der beiden spektralen Bereiche bei $\lambda = 708$ nm. Zur Berechnung der Zeitspuren wurde jeweils über eine spektrale Breite um λ_1 und λ_2 von 2 – 9 nm aufsummiert. In Abbildung 6.9 sind die empirischen Korrelationskoeffizienten ρ_{xy} in zwei Diagrammen jeweils über den mittleren Wellenlängen λ_1 und λ_2 der zugehörigen Zeitspuren aufgetragen. Das linke Bild zeigt das Ergebnis einzelner PS I-Komplexe der Spezies *T. elongatus* und das rechte Bild das einzelner PS I-Komplexe der Spezies *Synechocystis*. Jeder Datenpunkt spiegelt durch seine zugeordnete Falschfarbe das individuelle Korrelationsverhalten in je einem einzelnen Komplex wider. Der zu dem Komplex aus Abbildung 6.8 gehörige Datenpunkt liegt bei $\lambda_1 \simeq 710$ nm und $\lambda_2 \simeq 727$ nm. Der empirische Korrelationskoeffizient beträgt $\rho_{xy} = -0,5$. Insgesamt sind beim PS I von *T. elongatus* fünf von 28 Werten negativ. Beim PS I von *Synechocystis* liegen 14 von 40 Werten im negativen Bereich. Wie bereits einleitend erwähnt wurde, können Antikorrelationen nur festgestellt werden, wenn die Bedingung $\tau_{\text{fluk}}^{-1} < \tau_{\text{exp}}^{-1}$ erfüllt ist. Bei den Punkten mit positivem Wert kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Korrelation oder eine Antikorrelation vorliegt. Da diese Punkte also keine Informationen enthalten, wurden sie durch weiße Schattierung abgedeckt. Hingegen zeigen die Punkte mit negativen Werten, dass die Fluoreszenz verschiedener Banden zumindest in einigen Fällen antikorreliert aufgetreten ist, d.h. das Beispiel aus Abbildung 6.8 ist kein Einzelfall. Beim PS I von *Synechocystis* wurden Komplexe in D₂O-Puffer untersucht, um den Deuteriumeffekt einer kleineren Fluktuationsrate auszunutzen.

6.3.2 Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten

Ein möglicher Energietransferpfad zwischen verschiedenen roten Chlorophyll-Verbänden innerhalb eines Monomers benötigt eine exzitonische Kopplung zwischen den Zuständen. Diese hängt vom Winkel der zugehörigen Übergangsdipolmomente zueinander ab. Um die Wahrscheinlichkeit für eine direkte ET-Verbindung von Emittlern im spektralen Bereich des C708 mit Emittlern in der stark rotverschobenen Region des C719 einschätzen zu können, wurde eine statistische Untersuchung der Phasendifferenzen der Polarisationen von verschiedenen Emissionsbanden vorgenommen. In dem Diagramm der Abbildung 6.10 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Dafür wurde die Funktion Gl. 4.1 bei allen Monomeren an die Modulationen der verschiedenen Banden angepasst, wie als Beispiel

6 Charakterisierung der roten Zustände

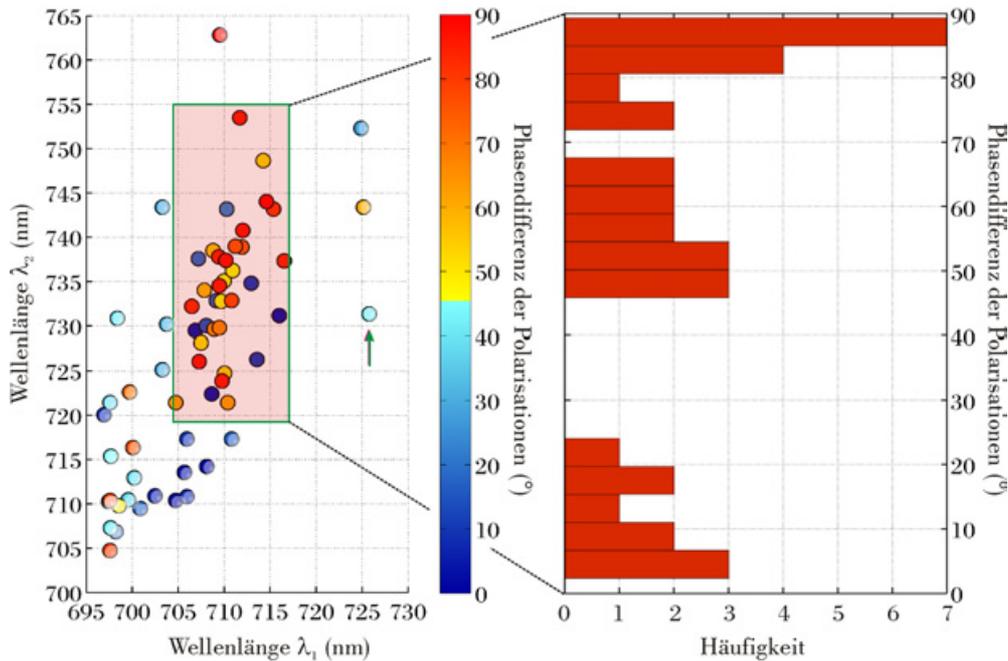


Abbildung 6.10: Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten roter Zustände in einzelnen PS I-Monomeren der Spezies *T. elongatus*. Wie in Abb. 4.13 wurde die Funktion Gl. 4.1 bei jedem Komplex an die Modulationen der verschiedenen Banden angepasst. Pro Komplex werden daraus bis zu drei Phasenlagen φ_{anf} und somit bis zu drei Phasendifferenzen $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ ermittelt, d.h. jeder Monomer trägt zum Diagramm bis zu drei Datenpunkte bei. Die zugeordneten Falschfarben geben die Größen der Winkel $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ an. Der markierte Datenpunkt gehört zum Monomer aus Abb. 4.13. Der hervorgehobene Bereich beinhaltet die interessierenden Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten von Emitttern aus den Bereichen des C708 und C719 zueinander. Ihre Verteilung wird im Histogramm rechts gezeigt.

in Abbildung 4.13 gezeigt wurde. Die im Kapitel 4 bestimmte Anzahl von drei roten Pigment-Verbänden pro Monomer des PS I von *T. elongatus* führt zu bis zu drei Phasenlagen φ_{anf} der Modulationen der Banden eines Monomers. Daraus ergeben sich bis zu drei Phasendifferenzen $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ pro Monomer, die in dem Diagramm durch zugehörige Datenpunkte berücksichtigt wurden. Die spektralen Positionen λ_1 und λ_2 sind möglichst nah am jeweiligen Maximum der zugehörigen Fluoreszenzbande gewählt. Abweichungen wurden im Fall von spektralen Überschneidungen verschiedener Banden erforderlich. Anhand der zugeordneten Falschfarben können die Größen der Winkel $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ abgelesen werden. Für Winkel $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ oberhalb 90° wurde der relevante Winkel gemäß $180^\circ - \Delta\varphi_{\text{anf}}$ berechnet. Bei den ermittelten Werten $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ handelt es sich jedoch nicht um den Raumwinkel zwischen den beitragenden Übergangsdipolmomenten, sondern um dessen Projektion auf die zur optischen Achse senkrechten Ebene. Da die einzelnen Komplexe bei der Messung willkürlich orientiert waren, spiegelt das Ergebnis bei der Annahme eines festen Raumwinkels φ_{fest} eine Verteilung um φ_{fest} wider. Im Anhang B werden in Abbildung 6.13 für ausgewählte φ_{fest} simulierte Verteilungen gezeigt, für die eigens ein Algorithmus entwi-

ckelt wurde, dessen Theorie im Anhang B kurz vorgestellt wird. Danach bildet sich beim Winkel φ_{fest} stets das klare Maximum der Verteilung aus. Der in Abbildung 6.10 hervorgehobene Bereich mit $\sim 704 \text{ nm} < \lambda_1 < 717 \text{ nm}$ und $719 \text{ nm} < \lambda_2 < 755 \text{ nm}$ beinhaltet die interessanten Winkel $\Delta\varphi_{\text{anf}}$ zwischen den Übergangsdipolmomenten von Emittlern, die hauptsächlich den Chlorophyll-Verbänden C708 und C719 zugeordnet werden. Von den 35 Winkeln sind 26 größer als 45° , von denen 14 sogar oberhalb 75° liegen. Die restlichen neun Winkel liegen im Bereich $< 15^\circ$, davon drei nahe 0° . Bei diesen Winkeln ist nicht klar, ob die zugehörigen Banden nicht von demselben Emitter stammen. Die meisten Winkel außerhalb des hervorgehobenen Bereichs betragen weniger als 45° . Es wird angenommen, dass insbesondere dort einige der zugehörigen Banden von demselben Emitter stammen. Die Punkte außerhalb des hervorgehobenen Bereichs können nicht eindeutig den Chlorophyll-Verbänden C708 und C719 zugeordnet werden und wurden daher nicht berücksichtigt.

6.4 Diskussion

Ein Maß für die Kopplung eines elektronischen Übergangs in einem gebundenen Chromophor an die inter- und intramolekularen vibronischen Freiheitsgrade ist der in Abschnitt 2.2.2 eingeführte Huang-Rhys-Faktor S . Die gebräuchlichen Werte für S von roten Chlorophyllen im PS I aus der neueren Literatur wurden mittels der Spektroskopiemethode des nicht-photochemischen Lochbrennens (NPHB) bestimmt. (Eine Kurzübersicht über NPHB bietet Anhang C.) Beim NPHB wird nicht nur über ein Ensemble gemittelt, sondern auch über die Fluktuationen innerhalb jedes einzelnen Moleküls, die eine Zeitabhängigkeit der einzelnen optischen Übergangsenergien bewirken. Der Brennprozess am PS I entvölkert teilweise die elektronischen Grundzustände der roten Pigmente des Ensembles, deren Null-Null-Übergänge eine stark bevorzugte spektrale Position an der Stelle der Brennfrequenz ω_B besitzen. Diese roten Pigmente absorbieren beim Auslesen an einer anderen spektralen Stelle, die im Spektrum als „*antihole*“ bezeichnet wird. Bei der Position von ω_B wird im Auslese-Spektrum ein Loch beobachtet, das Null-Phononen-Loch (ZPH) genannt wird. Das ZPH wird zusätzlich von einem breiten Loch mit dem charakteristischen Abstand ω_M zwischen den beiden Maxima begleitet. Dieses wird in der einschlägigen Literatur mit der einhergehenden Löschung von zugehörigen Übergängen in vibronische Niveaus des angeregten elektronischen Zustands erklärt. Eine gute Übersicht bietet Ref. [Jan93]. Die Theorie, wie in Abschnitt 2.2.4 skizziert, beschreibt dieses breite begleitende Loch als Schwingungsseitenbande (PSB). Auch das Einzelmolekül-Experiment, wenn auch frei von der Ensemble-Mittelung, kann eine zeitliche Mittelung nicht vermeiden. Ihr Ausmaß hängt von dem Zusammenspiel aus Zeitverhalten der Probe und der Zeitauflösung der Apparatur ab. Wie aus Kapitel 5 hervorgeht, liegen die Raten τ_{fluk}^{-1} eines Großteils der Fluktuationen unterhalb der Messrate τ_{exp}^{-1} , d.h. für diesen Teil ist die Bedingung $\tau_{\text{fluk}}^{-1} \ll \tau_{\text{exp}}^{-1}$ erfüllt. Eine spezielle Analyse von Einzelmolekül-Spektren vom PS I hat die Möglichkeit erschlossen, diesen Teil der spektralen Diffusion zu eliminieren

6 Charakterisierung der roten Zustände

Tabelle 6.4: Parameter der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke. Aus Simulationen der Linienformen wurden Huang-Rhys-Faktoren S_{SMS} roter Zustände aus den PS I dreier Organismen, *T. elongatus*, *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002, bestimmt. Die untere Zeile gibt die aus NPHB-Experimenten gewonnenen Werte für S an ((*) aus Ref. [Zaz02b], (+) aus Ref. [Hay00, Rät00]).

	<i>T. elongatus</i>		<i>Synechocystis</i>		<i>Synechococcus</i>	
	C708	C719	C706	C714	F698	C708
S_{SMS}	0,2–1,1	0,2–0,5	0,2–1,3	0,6–1,4	0,6–1,2	0,5
S_{NPHB}	%	2,2*	1,2–1,3 ⁺	2,0*	%	%

und so die zeitliche Mittelung des Signals auf ein Minimum zu reduzieren. Dadurch werden die Vorzüge der optischen Einzelmolekül-Spektroskopie voll ausgenutzt. Aus den Emissionen der PS I dreier Organismen, *T. elongatus*, *Synechocystis* und *Synechococcus* sp. PCC 7002, konnten spektrale Profile roter Zustände isoliert werden, die in einigen Fällen den homogenen Linienformen nahe kommen, da sie weniger spektralen Überlagerungen und Fluktuationen unterlagen. Die Linienprofile wurden, wie im Abschnitt 6.2.1 beschrieben, mit einem auf der im Abschnitt 2.2.4 erläuterten Theorie basierenden Algorithmus simuliert, der freundlicherweise von Prof. V. Zazubovich zur Verfügung gestellt wurde. Bei den PS I aller drei Spezies wurde überraschend festgestellt, dass die Emissionen von ca. 1 – 15 % der roten Zustände nur mit der Annahme sehr kleiner Huang-Rhys-Faktoren S erklärt werden konnten. Das gilt insbesondere auch für stark rotverschobene Zustände. Die entsprechenden aus Lochbrenn-Experimenten ermittelten Werte für S liegen für diese Zustände wesentlich höher.

Alle ermittelten Wertebereiche für S sind in der Tabelle 6.4 zusammen mit vorhandenen Literaturwerten aufgeführt. Die Simulationen der Linienformen für die untersuchten Zustände beim PS I von *T. elongatus*, die im Bereich des C708 emittiert haben, ergaben Werte für S zwischen 0,20 (f) und 1,10 (b). Letzterer Wert liegt in der Nähe des mit der NPHB-Methode bestimmten Werts von 1,2 – 1,3 für den Huang-Rhys-Faktor des C708 aus dem PS I von *Synechocystis* [Hay00, Rät00]. Für die Emitter der Banden im Bereich des C719 liegt der Wert für S zwischen 0,20 – 0,45. Der entsprechende mittels NPHB-Experimenten ermittelte Wert liegt bei $S = 2,2$ [Zaz02b].

Beim PS I von *Synechocystis* wurden für die Emitter im Bereich des C706 bzw. C708 Huang-Rhys-Faktoren zwischen 1,08 – 1,25 ermittelt. Diese Werte stimmen somit gut mit obigen Werten aus [Hay00, Rät00] überein. Beim Datensatz (a) der Abbildung 6.4 zeigt sich, dass der zugehörige Wert für S eines Zustands, der bei 699 nm seine ZPL emittiert hat, nahe Null liegt. Auffällig dabei ist, dass sie trotz des Energieeintrags über die gesamte Messzeit von ca. 250 s ungewöhnlich frequenzstabil war. Dem roten Zustand aus Bild (e), der in der spektralen Region des C714 emittiert hat, wird ein maximaler Wert von $S = 0,58$ zugeordnet. Der größte ermittelte Wert für einen roten Zustand, der

in der Region des C714 emittiert hat, liegt bei $S = 1,35$. Der entsprechende Wert aus der Literatur liegt bei $S = 2,0$ [Zaz02b].

Auch bei den roten Chlorophyll-Verbänden der Spezies *Synechococcus* sp. PCC 7002 werden teilweise kleine Huang-Rhys-Faktoren festgestellt. Bei einer stark rotverschobenen ZPL mit mittlerer Lage bei 744 nm wird der maximale Wert von S auf 0,45 bestimmt. Am Beispiel einer ZPL bei 698 nm wurde in Abbildung 6.7 gezeigt, wie sich die Linienform verändert, wenn ein Emitter, der spektral überlagert zur Bande beiträgt, in einen Dunkelzustand fällt oder in einen Zustand, der energetisch außerhalb des spektralen Detektionsbereichs liegt. Das Simulationsergebnis für S verändert sich durch den Prozess von 1,91 auf 0,60.

Aus den mittels NPHB-Experimente bestimmten Huang-Rhys-Faktoren wurde bisher angenommen, dass eine starke Elektron-Phonon-Kopplung ein wichtiger Faktor für die große Rotverschiebung der roten Pigmente ist [Hay00, Zaz02b, Iha03]. In der Literatur wird eine starke Elektron-Phonon-Kopplung üblicherweise mit dem Beimischen von Ladungstransferzuständen zu den exzitonischen Zuständen verbunden [Lat94, Hay00]. Durch die langreichweitige Wechselwirkung des entstehenden Dipols wird die Proteinumgebung polarisiert, woraus eine starke Kopplung des optischen Übergangs an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins resultiert. Die zugehörigen Potentialkurven des Grund- und ersten angeregten elektronischen Zustands, für die in Abbildung 2.2 zwei Beispiele skizziert wurden, sind entsprechend stark um $2g\xi$ versetzt. Im optischen Spektrum ruft die Elektron-Phonon-Kopplung eine ausgeprägte vibronische Seitenbande hervor.

Als Ursache für die starke Rotverschiebung kommt noch eine weitere Möglichkeit in Betracht. In den nicht-Diagonalelementen der Kopplungsmatrix des exzitonisch gekoppelten Systems stehen die Kopplungsbeiträge aus Förster- und Dexterenergieübertrag. Ein erhöhter Beitrag des Dextermechanismus kann zu einer Anhebung der exzitonischen Aufspaltung führen und somit ebenfalls zu einer starken Rotverschiebung, ohne dass ein Ladungstransferzustand beimischt. In dem Fall wird die Proteinumgebung durch den elektronischen Übergang nicht polarisiert und die Kopplung an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins ist gering. Auf die Weise kann ein kleiner Huang-Rhys-Faktor als Maß der entsprechenden Kopplungsstärke erklärt werden.

Aus den stark streuenden Huang-Rhys-Faktoren, auch jeweils in den gleichen Spektralbereichen, geht hervor, dass zwischen den roten Chlorophyllen verschiedener PS I-Komplexe eine starke Heterogenität in der Elektron-Phonon-Kopplungsstärke herrscht. Vermutlich führten die im Abschnitt 6.2 genannten Kriterien, nach denen aus allen aufgenommenen Spektrensequenzen nur wenige selektiert wurden, aus denen individuelle Linienprofile isoliert wurden, dazu, dass insbesondere rote Zustände mit nur schwachem Ladungstransfercharakter berücksichtigt wurden. Denn von der zugehörigen Fluoreszenz wird erwartet, dass ihre Linienform sich durch eine ausgeprägte ZPL mit nur schwachen spektralen Fluktuationen auszeichnet, da Konformationsänderungen, die spektrale Diffusion bewirken würden, unter den gegebenen Messbedingungen (bei 1,4 K) Energieeintrag benötigen, wie im Abschnitt 5.3 gezeigt wurde. Eine schöne Demonstration wird durch die Frequenz-

6 Charakterisierung der roten Zustände

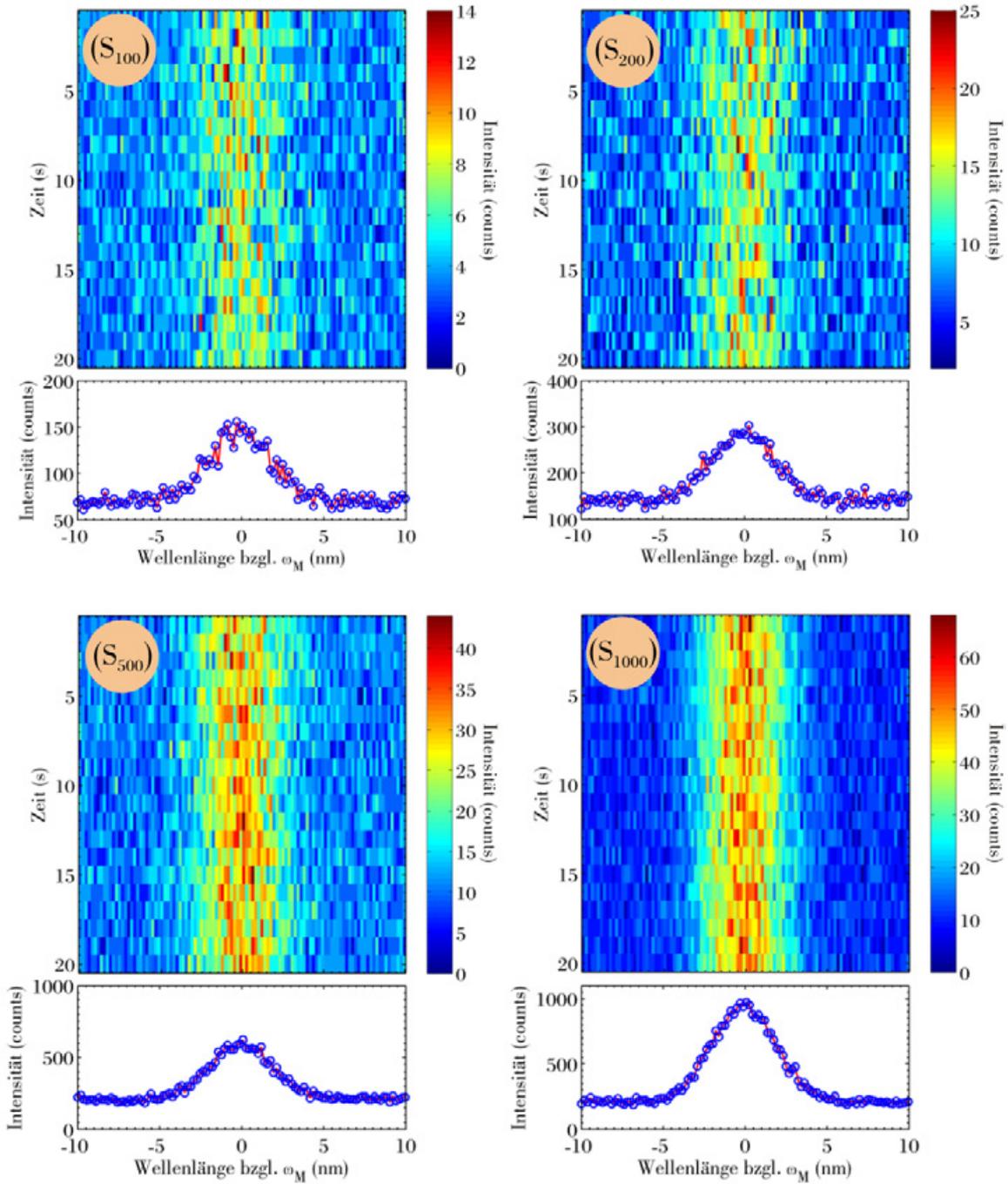


Abbildung 6.11: Simulation der Detektion eines spektral gaußverteilten Signals mit wenigen Photonen. Die spektrale Auflösung entspricht dem experimentell verwendeten Detektionskanal aus Gitterspektrograph (300 Linien/mm) und CCD-Chip. Im Bild S_{100} wurden 100 Photonen pro simuliertem Spektrum gezählt (100 counts/s). Die entsprechenden Zählraten der anderen drei Sequenzen S_{200} , S_{500} und S_{1000} betragen 200, 500 und 1000 counts/s. Bei allen vier Simulationen erkennt man deutlich einen Effekt durch die "Photonen-Ausdünnung": Die jeweiligen Banden erscheinen nicht frequenzstabil. Die Summenspektren werden demnach durch die zeitliche Mittelung über spektrale Fluktuationen aufgebaut. (Parameter: $\Gamma_{\text{Gauß}} \simeq 90 \text{ cm}^{-1}$; Zum Signal wurde weißes Rauschen addiert mit maximal ± 4 counts bei S_{100} , ± 8 counts bei S_{200} , ± 12 counts bei S_{500} und ± 12 counts bei S_{1000} und ein zusätzlicher Offset.)

Stabilität der ZPL aus dem Datensatz (a) der Abbildung 6.4 geboten. Der Huang-Rhys-Faktor des zugehörigen Zustands liegt, wie bereits oben erwähnt, nahe Null. Bei starkem Beimischen von Ladungstransferzuständen zu exzitonischen Zuständen sorgen zwei Effekte dafür, dass die Linienform schwer zugänglich wird: Zum einen verliert die ZPL stark an Intensität, während die PSB an Intensität gewinnt, zum anderen treten durch die höhere thermische Energie stärkere Fluktuationen auf, die bewirken, dass die Linienform im zeitlich begrenzt aufgelösten Spektrum in einer zeitlich gemittelten Verteilung untergeht. Der größte ermittelte Huang-Rhys-Faktor beträgt $S = 1,35$ von einem Emitter des C714-Verbands vom PS I von *Synechocystis*. Bei den roten Zuständen wird angenommen, dass der erfasste Ausschnitt aus der Verteilung der Elektron-Phonon-Kopplungsstärken den unteren Bereich widerspiegelt, d.h. bei den in Tabelle 6.4 zusammengefassten Werten für S ist wichtig anzumerken, dass insbesondere breite Banden, deren Herkunft innerhalb τ_{exp} nicht eindeutig hervorgeht, von roten Zuständen mit größerem Huang-Rhys-Faktor abstammen könnten. Der in seiner optischen Übergangsenergie stark fluktuierende Emitter aus Abbildung 5.15 stellt diesbezüglich eine Ausnahmeerscheinung dar. Vermutlich wird die Fluktuationsrate durch eine außergewöhnlich schwache Kopplung an die vibronischen Schwingungsfreiheitsgrade des Proteins reduziert. Der zugehörige Huang-Rhys-Faktor wurde auf $S = 0,58$ bestimmt (Abb. 6.4 Bild (f)).

Bei der Analyse der Spektrensequenzen wurde ein interessanter Effekt beobachtet, der ausschließlich für einzelne Quantensysteme charakteristisch ist. In der Abbildung 6.5 wurden drei Beispiele selektierter Fluoreszenzspektren roter Zustände vom PS I von *Synechocystis* gezeigt. Im spektralen Bereich der jeweiligen PSB wird festgestellt, dass die detektierte Intensität spektral fluktuiert, d.h. die PSB wird erst durch eine zeitliche Mittelung über mehrere Spektren aufgebaut. Während der Akkumulationszeit von $\tau_{\text{exp}} = 1$ s für ein Spektrum erfolgen gemäß der Abschätzung aus Abschnitt 3.3.3 $1,5 \cdot 10^6$ strahlende Übergänge in den roten Chlorophyllen. Gemäß Abschnitt 3.1.10 werden ca. 5 % der Fluoreszenz detektiert, wobei die detektierte integrierte Intensität einer scharfen ZPL zwischen ca. $10^2 - 10^3$ cps beträgt. Dieses Szenario wurde unter der vereinfachten Annahme einer gaußförmigen PSB simuliert. Das Ergebnis wird in der Abbildung 6.11 gezeigt. Man erkennt deutlich, dass selbst bei einer (simulierten) Zählrate von 1000 cps eine starke spektrale Dynamik auftritt. Bei jedem einzelnen Fluoreszenzakt wird ein spezieller Schwingungszustand angeregt. Aufgrund des geringen Photonennflusses, der innerhalb τ_{exp} auf den CCD-Chip einfällt, wird pro Spektrum jeweils nur ein Teil der Schwingungszustände detektiert. Die ganze PSB wird erst bei der Summierung über mehrere Spektren erfasst. Die beobachteten Fluktuationen im Bereich der PSB werden also auf einen statistischen Effekt zurückgeführt.

Im nun folgenden Abschnitt werden die Möglichkeiten einer Kopplung zwischen verschiedenen roten Chlorophyll-Verbindungen diskutiert. Der Försterradius im PS I variiert zwischen $65 - 85 \text{ \AA}$ [Col73, vG85, Byr02]. Pigmente oder Systeme aus 2 - 3 stark exzitonisch gekoppelten Pigmenten mit diesem räumlichen Abstand zueinander, die in einer Förstertransfer-Kette verschaltet sind, können bis zu 50 % der Anregungsenergie weiter-

6 Charakterisierung der roten Zustände

geben. Die restliche Energie wird größtenteils in Form von Fluoreszenz freigesetzt. In der Abbildungen 6.8 wird an einem Beispiel eines individuellen PS I-Komplexes von *T. elongatus* gezeigt, wie eine ZPL im Bereich des C708-Verbands mit der Fluoreszenzbande in der Region > 719 nm antikorreliert. Dieses Phänomen lässt sich durch zwei verschiedene Mechanismen erklären: Fall (A): Entweder sind beide Emittierer direkt über einen Energietransferpfad miteinander verbunden, so dass die Anregungsenergie vom Antennensystem zunächst zum Zustand im Bereich des C708 gelangt und von dort entweder abfluoresziert oder zu dem Zustand in der Region > 719 nm weitertransferiert wird, oder Fall (B): Von einem Pigment-Verband aus den Antennenpigmenten existiert zu beiden roten Zuständen jeweils ein Energietransferpfad. Zwei Faktoren bestimmen die Effizienz des Energietransfers (ET): zum einen die Stärke der exzitonischen Kopplung und zum anderen der spektrale Überlapp. Die Verlagerung der Abstrahlung zwischen den verschiedenen Banden wie sie in der Abbildung 6.8 zu sehen ist, könnte auf einer Veränderung der exzitonischen Kopplung beruhen. In der Punkt-Dipol-Näherung hängt die Stärke der Kopplung von r^{-3} und dem Winkel $\Delta\varphi$ zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donator und Akzeptor ab, wobei r dem Abstand entspricht. Bei 1,4 K sind die geometrischen Freiheitsgrade im Protein stark eingeschränkt, d.h. der Abstand wird sich nicht markant ändern. Aber beim Winkel $\Delta\varphi$ besteht die Möglichkeit, dass er sich in Relation zu den Fluktuationen in der optischen Übergangsenergie der beteiligten Zustände leicht verändert. Aus Gleichung 1.1 geht hervor, dass in einem exzitonisch gekoppelten Dimer der Betrag der Übergangsdipolmomente der einzelnen ungekoppelten Zustände die Richtung der exzitonischen Zustände des Dimers beeinflusst. Verändert sich nun durch Fluktuationen in der Proteinumgebung die lokale optische Übergangsenergie eines der beiden Zustände, so wird sich auch die Richtung des Übergangsdipolmoments vom Dimer ändern. Auf diese Weise kann $\Delta\varphi$ beeinflusst werden und damit auch der ET zwischen Dimeren. Einen vermutlich wesentlich größeren Effekt trägt jedoch der Einfluß der Fluktuationen der optischen Übergangsenergien auf den spektralen Überlapp von Donator und Akzeptor. Die Resonanzbedingung für den ET hängt empfindlich von den optischen Übergangsenergien der beteiligten Pigmente ab, so dass bereits moderate Veränderungen der optischen Übergangsenergien den ET signifikant modulieren können. Die Verlagerung der Abstrahlung zwischen den Intensitäten bei (a) und (b) in Abbildung 6.8 geschieht, ohne dass simultan deutliche spektrale Sprünge festgestellt werden. Im Fall, dass die beiden beteiligten Zustände direkt gekoppelt sind, folgt daraus, dass diese kleinen Sprünge genügen, um die beobachtete Intensitätsverschiebungen zu verursachen. Bei der Existenz von verschiedenen ET-Pfaden von den Antennenpigmenten zu beiden Zuständen ist denkbar, dass die optischen Übergangsenergien der zugehörigen Donatoren stärker fluktuieren. Dieser Spektralbereich wurde vom Experiment nicht erfasst.

An einzelnen PS I-Monomeren des Organismus *T. elongatus* hat eine umfangreiche Polarisationsanalyse an den verschiedenen Emissionsbanden ergeben, dass das Maximum der Verteilung der Winkel $\Delta\varphi$ zwischen den Übergangsdipolmomenten von Zuständen, die im Bereich des C708-Verbands emittiert haben und denen, die in der Region > 719 nm emittiert haben, in der Projektion auf die zur optischen Achse senkrechten Ebene nahe

90° liegt. Mit Hilfe der theoretischen Betrachtungen im Anhang B kann daraus abgeleitet werden, dass der entsprechende räumliche Winkel $\Delta\varphi$ ebenfalls nahe einem rechten Winkel liegt. Die Winkelkonstellation zwischen den Übergangsdipolmomenten bewirkt in Gleichung 1.1, dass der erste Term vernachlässigbar klein wird. Bei einem Winkel $\Delta\varphi$ von genau 90° ergibt sich für die Energie der exzitonischen Kopplung

$$V_{12} = -3 \frac{\mu_1 \mu_2 \cos \vartheta \sin \vartheta}{r^3},$$

wobei ϑ dem Winkel zwischen $\vec{\mu}_1$ und \vec{r} entspricht. Für eine Konstellation mit $\vartheta = 45^\circ$ wird V_{12} maximal, während sie unter einem Winkel von $\vartheta = 0^\circ$ bzw. $\vartheta = 90^\circ$ verschwindet, dem sogenannten „magic angle“. Eine Anisotropieuntersuchung am PS I von *T. elongatus* in trimerer Form hat ergeben, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit einer Wellenlänge von ~ 712 nm die Polarisation der Fluoreszenz einen großen Anteil enthält, der nicht der Polarisation des eingestrahnten Lichts entspricht [Pål96]. Die Emissionsanisotropie beträgt unter Anregung bei 712 nm ca. 0,10. Sie steigt mit wachsender Anregungswellenlänge über 0,20 bei 724 nm bis 0,35 bei > 730 nm, d.h. die Polarisationskomponente senkrecht zur Anregungspolarisation variiert stark beim Durchstimmen der Anregungswellenlänge, was für einen großen Winkel $\Delta\varphi$ spricht. Dieses Experiment wurde nicht an Monomeren durchgeführt, bzw. zumindest nicht in der Literatur erwähnt. Daher kann ein ET zwischen Emitttern des C708 und denen des C719 im Trimer über die einzelnen Monomergrenzen hinweg nicht ausgeschlossen werden. Das Ergebnis dieser Arbeit lässt im Falle eines direkten ETs zwischen C708 und C719 innerhalb eines Monomers darauf schließen, dass sich bei Anregung mit einer Wellenlänge von ~ 712 nm die Polarisationen von Emission und eingestrahlttem Licht deutlich unterscheiden. Dieses Ergebnis passt sehr gut mit dem Ergebnis der Anisotropiestudie zusammen. Anhand des festgestellten Antikorrelationsverhalten wird auf einen effizienten direkten ET zwischen roten Zuständen des C708 und C719 geschlossen. Weiter wird nach dem Ergebnis aus der Polarisationsanalyse an einzelnen Monomeren in Verbindung mit der Anisotropieuntersuchung aus Ref. [Pål96] angenommen, dass dieser ET insbesondere innerhalb eines Monomers stattfindet.

Auch das Korrelationsverhalten bei individuellen PS I-Trimeren von *Synechocystis* lässt erkennen, dass verschiedene rote Zustände entweder in der Form (A) oder in der Form (B) über ET miteinander in Verbindung stehen. Gemäß ähnlicher Anisotropiestudien [vdL93, Gob94] wird ein Transfer zwischen den Emitttern des C708 und des C714 als sehr unwahrscheinlich angenommen. Im Monomer müssten dafür die beteiligten Übergangsdipolmomente parallel ausgerichtet sein, da sich beim Durchstimmen der Anregungswellenlänge im Bereich > 704 nm kein Unterschied in den Polarisationen von Emission und eingestrahlttem Licht zeigt [Gob94]. Das gleiche Ergebnis wurde an Trimeren erzielt [Gob94]. Das spricht dafür, dass kein ET zwischen den Monomeren innerhalb eines Trimers stattfindet, da aufgrund der 120°-Winkel zwischen den Monomeren das Ergebnis der Studie nur durch eine Parallelstellung der Übergangsdipolmomente aller roten

6 Charakterisierung der roten Zustände

Chlorophyll-Verbände erklärt werden könnte. Das ist jedoch gemäß der Studie [Sch05] unwahrscheinlich, in der angenommen wird, dass zumindest beim PS I von *T. elongatus* alle Übergangsdipolmomente der roten Chlorophyll-Verbände eher senkrecht zur Membranebene ausgerichtet sind. Die Autoren der NPHB-Studien [Hsi04, Ril07] schlussfolgern wiederum, dass der ET zwischen den Zuständen C706 und C714 im PS I von *Synechocystis* in trimerer Form auftritt und bestimmen die Transferzeit auf ~ 6 ps. Die momentane Datenlage dieser Arbeit und der Literatur lassen keinen eindeutigen Schluss zu.

6.5 Zusammenfassung

Ein Auswerteverfahren zum Ausgleich von spektraler Diffusion wurde dazu genutzt, um einen großen Teil der zeitlichen Mittelung im Fluoreszenzsignal einzelner PS I-Komplexe zu eliminieren. Dadurch konnten aus den Spektrensequenzen der PS I der drei Spezies *T. elongatus*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7002 spektrale Profile von roten Zuständen nahe der homogenen Linienformen exzerpiert werden. Basierend auf dem Modell aus Abschnitt 2.2.4 wurden die Profile simuliert. Bei den PS I aller drei Organismen wurden selbst für stark rotverschobene Zustände überraschend kleine Huang-Rhys-Faktoren festgestellt, was bedeutet, dass die elektronischen Übergänge nur schwach an die inter- und intramolekularen vibronischen Freiheitsgrade koppeln. Dieses Ergebnis erweitert das Bild der roten Zustände auf die Weise, dass für ihre starke Rotverschiebung keine ausgeprägte Elektron-Phonon-Kopplung notwendig ist. Als alternative Ursache wurde die Anhebung der exzitonischen Aufspaltung durch einen hohen Beitrag des Dextermechanismus diskutiert. Die Heterogenität in der Elektron-Phonon-Kopplung zwischen verschiedenen individuellen Komplexen schließt die Existenz roter Zustände ein, in die Ladungstransferzustände stärker einmischen. Die Detektion der Schwingungsseitenbande (PSB) eines einzelnen selektierten roten Zustands hat die Möglichkeit zur Beobachtung eines interessanten Nebeneffekts geboten, der ausschließlich für einzelne Quantensysteme charakteristisch ist. Durch den geringen Photonenfluss, der innerhalb der Akkumulationszeit von 1 s auf den CCD-Chip einfiel, zeigt jedes Spektrum für sich nur einen Teil der PSB, d.h. der Prozess der Zusammensetzung der PSB aus einzelnen Fluoreszenzaktiven mit der Anregung spezieller Schwingungszustände konnte nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob verschiedene rote Zustände innerhalb eines PS I-Komplexes über Energietransfer (ET) miteinander in Verbindung stehen, wurde das Korrelationsverhalten der Fluoreszenz von unterschiedlichen roten Emitttern analysiert. Mehrfach aufgetretene Antikorrelationen bei sowohl dem PS I von *T. elongatus* als auch dem PS I von *Synechocystis* weisen darauf hin, dass die roten Zustände jeweils entweder direkt über ET miteinander verbunden sind, oder dass sie getrennt voneinander über ET mit einem Pigment-Verband aus den Antennenpigmenten verbunden sind. Auch eine Mischung aus beiden Konfigurationen ist denkbar. Beim PS I von *T. elongatus* wurde zusätzlich mittels

einer Polarisationsanalyse an einzelnen Monomeren festgestellt, dass die Übergangsdipolmomente der Emitter vom C708 und C719 in einem Winkel nahe 90° zueinander stehen. Demnach würde man im Falle eines direkten ETs zwischen den beiden Verbänden erwarten, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit einer Wellenlänge von ~ 712 nm die Polarisation der Fluoreszenz einen großen Anteil enthält, der nicht der Polarisation des eingestrahlten Lichts entspricht. Dieses Verhalten geht aus einer Anisotropiestudie am Ensemble hervor [Pål96]. Daher wird ein effizienter direkter ET zwischen Zuständen des C708- und C719-Verbands innerhalb eines Monomers für wahrscheinlich gehalten. Beim PS I von *Synechocystis* deuten entsprechende Anisotropieuntersuchungen [Gob94] daraufhin, dass die unterschiedlichen roten Chlorophyll-Verbände innerhalb eines Monomers eher jeweils durch verschiedene ET-Ketten mit den Antennenpigmenten verschaltet sind, ohne dass ein effizienter direkter ET zwischen ihnen stattfindet. Hierzu existieren in der Literatur auch kontroverse Meinungen [Hsi04, Ril07]. Die momentane Datenlage dieser Arbeit und der Literatur lassen beim PS I von *Synechocystis* keinen eindeutigen Schluss zu.

6 Charakterisierung der roten Zustände

Zusammenfassung

Im Antennensystem von Photosystem I (PS I) existiert eine kleine Gruppe Chlorophylle, deren optische Übergangsenergien gegenüber der erforderlichen Anregungsfrequenz des Reaktionszentrums (RC) rotverschoben liegen. Sie werden daher allgemein als „rote Chlorophylle“ bezeichnet. Sie übernehmen eine Schlüsselrolle in der PS I-Forschung. Weder ihre Funktion in der Natur, noch der Mechanismus, der zu ihrer Rotverschiebung führt, sind endgültig geklärt. Bei kryogener Temperatur stellen die roten Chlorophylle für die Anregungsenergie eine Falle dar, denn zum Energieübertrag auf das RC fehlt die vibronische Energie in der Proteinmatrix, die unter physiologischen Bedingungen genutzt wird. Die Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute ermöglicht der Einzelmolekülspektroskopie (SMS) den Zugang zum System. Ihr Vorteil gegenüber konventionellen Spektroskopiemethoden besteht darin, dass die Mittelung über ein Ensemble vermieden wird. Um mit SMS die roten Pigmente im PS I zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konfokales Spektrometer aufgebaut, das die Fluoreszenz einzelner Moleküle bei 1,4 K messen kann. Als Proben für die Ergebnisse in dieser Schrift dienten cyanobakterielle PS I-Komplexe der Organismen *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*), *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7002. In der Literatur wurden die roten Chlorophylle der PS I von *T. elongatus* und *Synechocystis* mittels Gaußscher Zerlegung der Ensemble-Absorptionsspektren in Pigment-Verbände unterteilt. Entsprechend den spektralen Positionen der Maxima bei 708 nm und 719 nm wurden die Verbände im PS I von *T. elongatus* als C708 und C719 bezeichnet und analog im PS I von *Synechocystis* als C706/C708 und C714. Ein Ergebnis dieser Arbeit ist die Bestimmung der Anzahl der roten Emitter im PS I von *T. elongatus*. Diese konnte mit Hilfe einer spektral aufgelösten Polarisationsanalyse der Fluoreszenz von Monomeren auf drei festgelegt werden. Mindestens einer dieser roten Zustände kann je nach selektiertem Komplex im Spektralbereich des C708- oder des C719-Verbands emittieren. Bei den PS I aller drei Spezies wurden im Spektralbereich der jeweiligen roten Chlorophylle scharfe Null-Phononen-Linien (ZPLs) beobachtet. Demnach konnten erstmals ZPLs beim PS I von *Synechocystis* beobachtet werden. Dadurch wurden die Schlussfolgerungen einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der das Auftreten von ZPLs bestritten wurde, widerlegt. Während die ZPLs vom PS I von *T. elongatus* zwei spektral voneinander getrennte Bänder in den spektralen Regionen der Verbände C708 und C719 bilden, treten die ZPLs vom PS I von *Synechocystis* in den Bereichen der Verbände C706/C708 und C714 auf, ohne klare Separation voneinander. Beim PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 liegt der größte Teil der aufgetretenen ZPLs in einem Band mit mittlerer Lage bei $\lambda \simeq 698$ nm.

Zusammenfassung

Der zugehörige Chlorophyll-Verband wurde daher als F698 bezeichnet. Für die ZPLs der PS I aller drei Spezies ist eine starke spektrale Diffusion charakteristisch. Sie wird auf strukturelle Fluktuation in der Proteinbindungstasche der roten Chlorophylle zurückgeführt, die zu Veränderungen in der Stärke der lokalen Wechselwirkungen führen und somit zu Fluktuationen der optischen Übergangsenergien. Beim PS I von *T. elongatus* wurde festgestellt, dass sich die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs in voneinander separierte Bereiche aufteilen lässt. Dieses Ergebnis passt zum Bild einer in hierarchischen Rängen organisierten Energielandschaft, in der die mittlere Barrierenhöhe von oben nach unten abnimmt. Im Vergleich wurden hingegen beim PS I der Spezies *Synechocystis* zunächst keine voneinander separierten Bereiche in der Korrelation zwischen Fluktuationsrate und spektraler Sprungweite der ZPLs gefunden. Der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel hat bei den PS I beider Organismen zu einem signifikanten Deuteriumeffekt geführt. Er äußerte sich in einer Verringerung der spektralen Fluktuationen in der Fluoreszenz. Das spricht dafür, dass die Positionsänderung von Protonen einer der Hauptprozesse ist, mit denen im PS I die lokalen optischen Übergangsenergien der Pigmente feinabgestimmt werden. Ein interessanter Bestandteil des Deuteriumeffekts beim PS I von *Synechocystis* ist die häufige Erzeugung von Bi- bzw. Tristabilitäten. Diese können durch die herabgesetzte Tunnelwahrscheinlichkeit eines Deuterons im Vergleich zu der eines Protons erklärt werden. Durch einen indirekten Nachweis wurde gezeigt, dass spektrale Sprünge von ZPLs über 10 cm^{-1} bei 1,4 K erst durch die Einstrahlung von Energie wahrscheinlich werden. Daher scheinen unter kryogenen Bedingungen Tunnelprozesse von Protonen in der unmittelbaren Proteinumgebung der roten Pigmente ohne äußere Anregung sehr unwahrscheinlich. Durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Lösungsmittel ließ sich interessanterweise beim PS I von *Synechocystis* die Korrelation zwischen der Fluktuationsrate und der spektralen Sprungweite der ZPLs, wie beim PS I von *T. elongatus* ohne entsprechenden Austausch, in voneinander separierte Bereiche aufteilen. Ein Auswerteverfahren zum Ausgleich von spektraler Diffusion wurde dazu genutzt, um einen großen Teil der zeitlichen Mittelung im Fluoreszenzsignal einzelner PS I-Komplexe zu eliminieren. Dadurch konnten aus den Spektrensequenzen der PS I aller drei Spezies spektrale Profile von roten Zuständen nahe der homogenen Linienformen exzerpiert werden. Theoretisch lässt sich die Linienform eines Pigments in einem Proteinkomplex durch die Spektraldichte beschreiben. Zur Simulation der Linienform wurde ein Algorithmus verwendet, der die Pigment-Protein-Kopplung mit der Näherung, dass die Fluktuation der Übergangsenergie linear von der Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage abhängt, und mit der Annahme einer lorentzförmigen Spektraldichte iterativ berechnet. Bei den PS I aller drei oben genannten Spezies wurden selbst für stark rotverschobene Zustände überraschend kleine Huang-Rhys-Faktoren festgestellt, was bedeutet, dass die elektronischen Übergänge nur schwach an die inter- und intramolekularen vibronischen Freiheitsgrade koppeln. Dieses Ergebnis erweitert das Bild der roten Zustände auf die Weise, dass für ihre starke Rotverschiebung keine starke Elektron-Phonon-Kopplung notwendig ist. Als alternative Ursache wurde die Anhebung der exzitonischen Aufspaltung

durch einen hohen Beitrag des Dextermechanismus vorgeschlagen. Um zu untersuchen, ob verschiedene rote Zustände innerhalb eines PS I-Komplexes über Energietransfer (ET) miteinander in Verbindung stehen, wurde das Korrelationsverhalten der Fluoreszenz von unterschiedlichen roten Emitttern analysiert. Mehrfach aufgetretene Antikorrelationen bei sowohl dem PS I von *T. elongatus* als auch dem PS I von *Synechocystis* weisen darauf hin, dass die roten Zustände jeweils entweder direkt über ET miteinander verbunden sind, oder dass sie getrennt voneinander über ET mit einem Pigment-Verband aus den Antennenpigmenten verbunden sind. Auch eine Mischung aus beiden Konfigurationen ist denkbar. Beim PS I von *T. elongatus* wurde zusätzlich mittels einer Polarisationsanalyse an einzelnen Monomeren festgestellt, dass die Übergangsdipolmomente der Emitter vom C708 und C719 in einem Winkel nahe 90° zueinander stehen. Demnach würde man im Falle eines direkten ETs zwischen den beiden Verbänden erwarten, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit einer Wellenlänge von ~ 712 nm die Polarisation der Fluoreszenz einen großen Anteil enthält, der nicht der Polarisation des eingestrahlten Lichts entspricht. Dieses Verhalten geht aus einer Anisotropiestudie am Ensemble hervor. Daher wird ein effizienter direkter ET zwischen Zuständen des C708- und C719-Verbands innerhalb eines Monomers für wahrscheinlich gehalten.

Zusammenfassung

Ausblick

Mit Hilfe des aufgebauten Einzelmolekül-Spektrometers wurden im Rahmen meiner Arbeit eine Reihe weiterer Experimente durchgeführt, die in dieser Schrift keine Berücksichtigung fanden. Insbesondere drei davon werden hier vorab kurz erwähnt:

- In Abschnitt 3.2.4 wurden zwei spezielle Probenhalter vorgestellt, die für orientierungsabhängige Einzelmolekül-Messungen entwickelt wurden. Ähnlich wie am Ensemble [vA88, Sch05] wird eine Teilorientierung der Probe durch Zusammenpressen eines Gels erreicht. Messungen mit Komprimierungs-Richtung parallel und senkrecht zur optischen Achse wurden an einzelnen PS I-Trimeren der Spezies *T. elongatus* durchgeführt. Die Auswertung dieser Experimente hat ergeben, dass die Probe, bei der die optische Achse bevorzugt in der Membranebene liegt, im Mittel deutlich kleinere Winkel $\ll 90^\circ$ zwischen den Übergangsdipolmomenten verschiedener Emitter aufweist als die Probe, bei der die optische Achse bevorzugt senkrecht auf die Membranebene zeigt. Bei dieser wurden häufig Winkel nahe 90° ermittelt. In Ref. [Sch05] wird aus Experimenten mittels Lineardichroismus darauf geschlossen, dass die Übergangsdipolmomente der roten Chlorophylle in der Membranebene ausgerichtet sind. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis meiner Arbeit.
- Bei NPHB-Experimenten wurde unter Ausnutzung des Stark-Effekts an den roten Chlorophyllen die Lochbreite in Abhängigkeit von der äußeren Feldstärke bestimmt. Um eine Stark-Verschiebung beim Einzelmolekül-Experiment nachzuweisen, wurde eine spezielle Mimik eines Probenhalters gestaltet, bei dem das Feld zwischen einer Drahtspitze hinter der Probe und dem Objektiv angelegt wurde. Die Versuche sind an der Bildung von Funkenstrecken durch das suprafluide Helium gescheitert, d.h. die erreichten Feldstärken bis zur Zerstörung des Objektivs und der Probe waren zu gering, um einen Effekt zu messen.
- Durch Einstrahlen einer resonanten Mikrowelle kann eine Änderung der effektiven Triplet-Zerfallsrate bewirkt werden, was zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität führt. Ein solches ODMR-Experiment (Optisch Detektierte Magnetische Resonanz) kann an bestimmten Systemen auch am einzelnen Molekül einen Effekt nachweisen [JK93, JW93]. Dafür wurde eigens ein Probenstab für die Einspeisung von Mikrowellen in die Probe entwickelt, der den Kältezyklus von Raumtemperatur bis 1,4 K schadlos und zuverlässig übersteht. Am PS I wurde kein eindeuti-

Ausblick

ger Effekt beobachtet. Vermutlich ist die Triplettausbeute zu gering, um mit der ODMR-Methode am einzelnen PS I-Komplex einen Effekt zu messen.

Die Polarisationsanalyse an einzelnen Monomeren aus Abschnitt 4.4.1 hat erstmals eine direkte und zuverlässige Bestimmung der Anzahl von roten Emitttern im PS I von *T. elongatus* ermöglicht. Für ein klares Ergebnis sind Komplexe in monomerer Form notwendig. Interessant wären ähnliche Studien an PS I-Monomeren anderer Organismen, um z.B. insbesondere quantitativ zu klären, wieviel weniger rote Emitter das PS I von *Synechocystis* enthält und wieviel mehr das PS I von *Arthrospira*. Am PS I von *Synechocystis* in monomerer Form würde eine Polarisationsanalyse zusätzlich aufdecken, ob die Übergangsdipolmomente der zu den Verbänden C706/C708 und C714 gehörigen Emitter parallel zueinander stehen. Daraus ließe sich ableiten, ob die Schlussfolgerung aus den Ref. [Hsi04, Ril07], dass ein effizienter direkter Energietransfer zwischen C706 und C714 stattfindet, mit den Messungen aus Ref. [Gob94] vereinbar sind. Dort wird in einer Anisotropieuntersuchung festgestellt, dass bei einer Anregung mit linear polarisiertem Licht mit Wellenlängen von > 704 nm die Polarisation der Fluoreszenz im Wesentlichen der Polarisation des eingestrahlten Lichts entspricht.

In einer Studie am LH2 wurden Messungen an einzelnen Komplexen in Abhängigkeit von der Anregungsleistung bei Raumtemperatur durchgeführt [Rut05]. Danach nimmt die Häufigkeit und die Größe der Bewegung des Fluoreszenzmaximums linear mit der Anregungsintensität zu. Beim PS I sind sowohl die spektralen Eigenschaften als auch das Photobleichverhalten stark heterogen. Eine Untersuchung des Sprungverhaltens in Abhängigkeit von der Anregungsintensität fand in dieser Arbeit nur qualitativ an wenigen Komplexen statt. Eine systematische Studie dieses Zusammenhangs erscheint lohnend.

Summary

In this thesis the red-most absorbing chlorophylls of cyanobacterial Photosystem I (PS I) have been investigated using single-molecule spectroscopy. The excitation energy of these red-shifted chlorophyll spectral forms is lower than that of the primary donor P700 where the charge separation starts. At low temperatures, the red-most chlorophylls act as a trap for the excitation energy due to a lack of vibrational energy for an uphill energy transfer to P700. Under these conditions their fluorescence quantum yield is adequate for single-molecule detection. A confocal spectrometer for low temperatures with sufficient efficiency to detect single-molecule fluorescence was built in the course of this work for this purpose. PS I samples from the species *Thermosynechococcus elongatus* (*T. elongatus*), *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7002 were probed. In earlier studies based on ensemble techniques, the red-most chlorophylls were assigned to different pools according to their absorption maximum. For PS I from *T. elongatus* pools were found at 708 nm and 719 nm, denoted C708 and C719, while for PS I from *Synechocystis* pools were identified at 708 nm (706 nm) and 714 nm, denoted C708 (C706) and C714. In this thesis a fluorescence polarization analysis on single PS I monomers from *T. elongatus* shows that three pigment pools contribute to the red-shifted emission. From this analysis it can be concluded that at least one of these states is able to emit either in the spectral region of the C708 or C719 pool, varying from complex to complex. The PS I from all three species exhibit intense zero-phonon lines (ZPLs) in the spectral regions of their red-most chlorophylls. Thus, for the first time ZPLs of PS I from *Synechocystis* could be observed, in contrast to an earlier proposition arguing against their existence. While the ZPLs of PS I from *T. elongatus* form two spectrally separated bands corresponding to the spectral ranges of the C708 and C719 pool, the ZPLs of PS I from *Synechocystis* occur without a gap in between in the range of the C706/C708 and the C714 pools. The PS I from *Synechococcus* sp. PCC 7002 mainly shows ZPLs in a band with center wavelength at 698 nm, thus denoted as F698. A characteristic feature of all observed ZPLs is intense spectral diffusion. This is ascribed to structural fluctuations in the vicinity of the corresponding pigment pools which lead to changes of the local interaction strengths and concomitantly to fluctuations of the site energies. For PS I from *T. elongatus* the correlation between fluctuation rates and associated site energy changes shows separated regions. This finding supports the concept of a protein energy landscape organized in hierarchical tiers in which the average height of the energy barriers decreases from top to bottom. However, for PS I from *Synechocystis* in the correlation between fluctuation rates and associated site energy changes no clearly separated regions were found. The substi-

Summary

tution of hydrogen for deuterium in the solvent led to significant reduction of spectral fluctuations in the fluorescence of PS I from all three species. This suggests that proton displacement is one of the main processes responsible for fine-tuning of site energies in PS I. An intriguing feature of the deuterium effect on PS I from *Synechocystis* consists in the creation of bi- and tristabilities. These can be explained by the decreased likelihood for deuterium tunneling in contrast to proton tunneling. The occurrence of spectral jumps of ZPLs above 10 cm^{-1} in absence of external excitation was proved to be highly unlikely at 1.4 K. Consequently, at cryogenic temperatures proton tunneling in the vicinity of the red pools is very unlikely without excitation. Interestingly, after substitution of hydrogen for deuterium in the solvent in the correlation between fluctuation rates and associated site energy changes a similar separation into regions was found in PS I from *Synechocystis* as in native PS I from *T. elongatus*. An analysis coping with the effect of spectral diffusion was applied to suppress temporal averaging in the fluorescence signal. This permits to extract spectral profiles of the red-most states close to their homogeneous line shapes. The line shapes of various red-most states were simulated, based on an algorithm that calculates the pigment-protein coupling in linear approximation assuming a Lorentzian spectral density. Surprisingly, even for far red-shifted states of the PS I from all of the three above-mentioned species small Huang-Rhys factors were found, implying only a weak coupling of the electronic transition to the bath of vibrational modes. This finding sheds light on properties of the red-most states by indicating that no distinct electron-phonon coupling is necessary for the strong redshift of these states. The increase of the excitonic splitting by a large contribution of the Dexter mechanism is proposed as an alternative for the strong redshift. To investigate the energy transfer pathway between different states the correlation behavior between their fluorescence bands was analyzed. The repeated observation of anticorrelations for PS I from *T. elongatus* as well as from *Synechocystis* indicate that either direct energy transfer between different pools of red-most chlorophylls occurs or different red-most states are fed independently by one parent excited state. Also a combination of both is possible. By a polarization analysis on single PS I monomers from *T. elongatus* the angles between the transition dipole moments of emitters from C708 and C719 were determined to be near 90° . Hence, in case of direct energy transfer between different red-most states one expects that on linear polarized excitation at $\sim 712\text{ nm}$ the polarization of the fluorescence would change. Exactly this behavior occurred in an earlier anisotropy study on bulk PS I. An efficient direct energy transfer between states belonging to the pools C708 and C719 is thought to be likely.

Anhang

Anhang A

Beweis durch vollständige Induktion

Induktionsvoraussetzung: $\Theta_j(\omega) = S^j \frac{\frac{j\gamma}{2\pi}}{(\omega - j\omega_m)^2 + \left(\frac{j\gamma}{2}\right)^2}$

Induktionsanfang: $j = 1$ $\Theta_1(\omega) = S \frac{\frac{\gamma}{2\pi}}{(\omega - \omega_m)^2 + \left(\frac{\gamma}{2}\right)^2}$

Induktionsbehauptung: $\Theta_{j+1}(\omega) = S^{j+1} \frac{\frac{(j+1)\gamma}{2\pi}}{(\omega - (j+1)\omega_m)^2 + \left(\frac{(j+1)\gamma}{2}\right)^2}$

Induktionsbeweis:

$$\text{es gilt } \Theta_{j+1}(\tilde{\omega}) = \int_0^{\tilde{\omega}} d\omega_2 J(\omega_2) \Theta_j(\tilde{\omega} - \omega_2)$$

gemäß der in Abschnitt 2.2.4 eingeführten Funktion Θ_j . Die Fouriertransformation in den Zeitraum ergibt:

$$\Theta_{j+1}(\tilde{\omega}) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt \Theta_{j+1}(t) e^{-i\tilde{\omega}t} .$$

Gemäß dem Faltungssatz entspricht die Faltung zweier Funktionen dem Produkt der Fouriertransformierten, somit gilt: $\Theta_{j+1}(t) = J(t) \Theta_j(t)$.

$$\text{Daraus folgt } \Theta_{j+1}(\tilde{\omega}) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt J(t) \Theta_j(t) e^{-i\tilde{\omega}t} .$$

Die Spektraldichte wurde als lorentzförmig angenommen:

$$J(\omega) = S \frac{\frac{\gamma}{2\pi}}{(\omega - \omega_m)^2 + \left(\frac{\gamma}{2}\right)^2} .$$

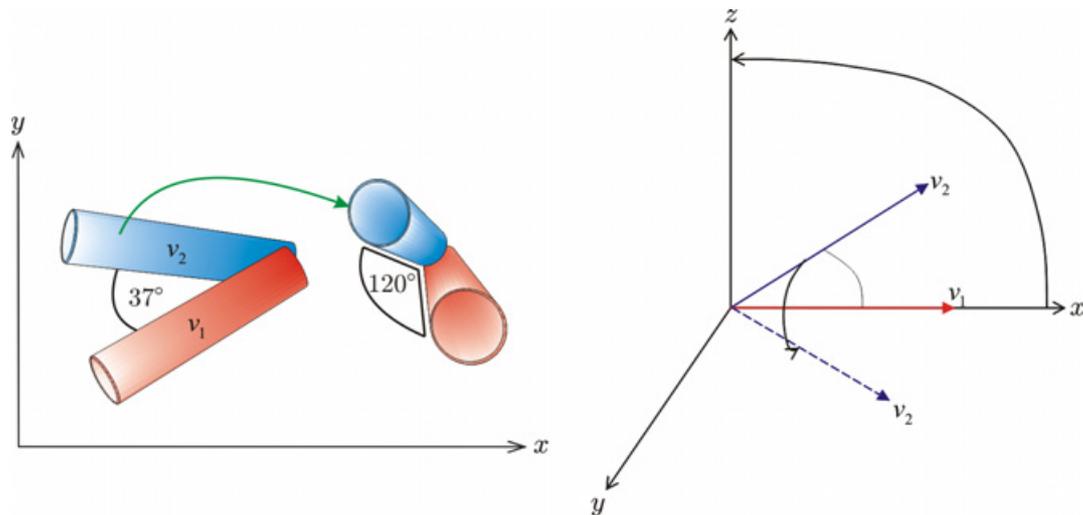


Abbildung 6.12: Links: Aufsicht bzw. Projektion zweier Vektoren im festen Winkel zueinander. Der Winkel zwischen den beiden Vektoren ν_1 und ν_2 beträgt als Bsp. 37° . Nach einer Änderung der Orientierung des Systems aus ν_1 und ν_2 verkürzen sich die Beträge der Vektoren, und der Projektionswinkel liegt bei 120° . Rechts: Schema zum Modell, mit dem die Winkelverteilung willkürlich orientierter Systeme aus zwei Vektoren wie ν_1 und ν_2 im festen Winkel zueinander berechnet wurde. ν_1 verläuft entlang der x-Achse. ν_2 wird um 180° um die x-Achse gedreht. Nach jeder dieser Drehungen wird das Koordinatensystem schrittweise um die y-Achse gedreht. Die Gesamtdrehung um die y-Achse beträgt 90° .

Um die Faltung durchzuführen, wird zunächst J fouriertransformiert:

$$J(t) = S e^{i\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}|t|}$$

$$\begin{aligned} \text{Daraus erhält man: } \Theta_{j+1}(\tilde{\omega}) &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt S e^{i\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}|t|} S^j e^{ij\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}j|t|} e^{-i\tilde{\omega}t} \\ &= \frac{1}{2\pi} S^{j+1} \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{i(j+1)\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}(j+1)|t|} e^{-i\tilde{\omega}t} \\ &= \frac{S^{j+1}}{2\pi} \frac{\gamma(j+1)}{(\tilde{\omega} - (j+1)\omega_m)^2 + \left(\frac{\gamma}{2}(j+1)\right)^2} \quad \text{q.e.d.} \end{aligned}$$

Anhang B

Es seien \vec{v}_1 und \vec{v}_2 zwei Vektoren mit festem Winkel zueinander, wie in Abbildung 6.12 gezeigt wird. Beide sollen denselben Ursprung haben und der Einfachheit halber der Länge nach eins sein. Zur Beschreibung der Vektoren eignen sich räumliche Polarkoordinaten. Um das Problem weiterhin zu vereinfachen wird der Vektor \vec{v}_1 in Richtung der x-Achse

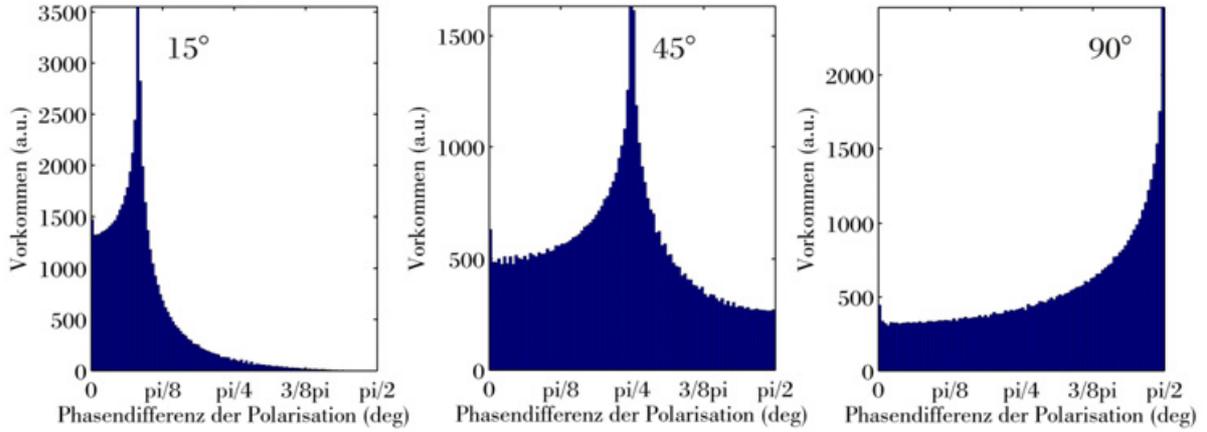


Abbildung 6.13: Die Winkelverteilung willkürlich orientierter Systeme aus zwei im festen Winkel zueinander stehender Vektoren in Projektion. Die festen Winkel zwischen den Vektoren betragen 15° , 45° und 90° . Zur Berechnung wurde das im Text erklärte und in Abb. 6.12 veranschaulichte Modell verwendet. Das Maximum der Verteilungen liegt stets beim festen Winkel.

festgelegt. Der Vektor \vec{v}_2 wird nun zunächst so dargestellt, dass er um die x -Achse, gleichbedeutend mit \vec{v}_1 , um den Winkel φ rotieren kann und dabei stets seinen Winkel α zum Vektor \vec{v}_1 beibehält

$$\vec{v}_2 = \hat{D}_{yz} \begin{pmatrix} \cos \alpha \\ 0 \\ \sin \alpha \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \varphi & -\sin \varphi \\ 0 & \sin \varphi & \cos \varphi \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \alpha \\ 0 \\ \sin \alpha \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \alpha \\ -\sin \alpha \sin \varphi \\ \sin \alpha \cos \varphi \end{pmatrix} .$$

Zusätzlich soll sich das gesamte System um die y -Achse um den Winkel ϑ drehen können, während die Drehung um die x -Achse vollführt wird

$$\hat{D}_{xz} \vec{v}_2 = \begin{pmatrix} \cos \vartheta & 0 & -\sin \vartheta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \vartheta & 0 & \cos \vartheta \end{pmatrix} \vec{v}_2 = \begin{pmatrix} \cos \alpha \cos \vartheta - \sin \alpha \sin \vartheta \cos \varphi \\ -\sin \alpha \sin \varphi \\ \cos \alpha \sin \vartheta + \sin \alpha \cos \varphi \cos \vartheta \end{pmatrix} .$$

Aus Symmetriegründen genügt es, φ von 0 bis π und ϑ von 0 bis $\pi/2$ laufen zu lassen, um die vollständige Verteilung sämtlicher möglicher Winkel in der Projektion auf die x - y -Ebene zu erhalten. Der in der Projektion gesehene Winkel γ ergibt sich zu

$$\cos \gamma = \frac{\cos \alpha \cos \vartheta - \sin \alpha \sin \vartheta \cos \varphi}{\sqrt{(\cos \alpha \cos \vartheta - \sin \alpha \sin \vartheta \cos \varphi)^2 + (-\sin \alpha \sin \varphi)^2}} .$$

Im Algorithmus wurde berücksichtigt, dass bestimmte Orientierungen von Übergangsdipolmomenten in der Messung nicht gesehen werden können, da die Beträge der Vektoren in Projektion zu klein sind, d.h. die räumliche Abstrahlung der Energie, der Poynting-

Anhang

vektor \vec{S} , ist bei einem Dipol proportional

$$|\vec{S}| = \epsilon_0 c E^2 \sim \sin^2 \Theta ,$$

wobei ϵ_0 der Dielektrizitätskonstanten, c der Lichtgeschwindigkeit und E der elektrischen Feldstärke entsprechen und Θ in dem Fall den Winkel zur Dipolrichtung beschreibt. In den Beispiel-Verteilungen der Abbildung 6.13 wurde angenommen, dass weniger als 20 % der zum Dipol senkrechten Abstrahlung ($\Theta = 90^\circ$) eines einzelnen Übergangsdipolmoments nicht mehr detektiert werden können. Die Werte dieser Grenze beeinflussen die Verteilung jedoch nicht.

Anhang C

Skizzierung vom NPHB-Mechanismus:

Betrachtet werden zwei Potentialhyperflächen, eine für den elektronischen Grundzustand und die andere für den ersten elektronisch angeregten Zustand in einem Chromophor. Die Barriere im elektronischen Grundzustand kann nicht überwunden werden. Durch die externe Energiezufuhr der Frequenz ω_B erfolgt eine elektronische Anregung. Das betroffene Elektron relaxiert zunächst vibronisch ins nächstgelegene Minimum des elektronisch angeregten Zustands, welches dem Huang-Rhys-Faktor entsprechend auf der Kernkoordinate verschoben liegt. Die Reorganisationsenergie beim Bakteriochlorophyll als Ansatz beträgt dabei ca. 40 cm^{-1} . Durch die Schwingungsrelaxation kann eine Barriere im elektronisch angeregten Zustand, die als flacher angenommen wird, überwunden werden, so dass nach elektronischer Relaxation ein anderer elektronischer Grundzustand eingenommen wird. Beim Auslesen fehlt schließlich ein Anteil der „gebrannten“ Frequenz im Spektrum.

Literaturverzeichnis

- [Amb94] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.C. Martin und R.A. Keller. *Alterations of Single-Molecule Fluorescence Lifetimes in Near-Field Optical Microscopy*. Science **265**, 5170, (1994) 364-367.
- [Amu07] A. Amunts, O. Drory und N. Nelson. *The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution*. Nature **447**, (2007) 58-63.
- [Ans85] A. Ansari, J. Berendzen, S.F. Bowne, H. Frauenfelder, I.E. Iben, T.B. Sauke, E. Shyamsunder und Young R.D. *Protein states and proteinquakes*. Proc Natl Acad Sci USA **82**, 15, (1985) 5000-5004.
- [Bal06] J.B. Ballard, E.S. Carmichael, D. Shi, J.W. Lyding und M. Gruebele. *Laser-absorption scanning tunneling microscopy of carbon nanotubes*. Nano Letters **6**, (2006) 45-49.
- [Bas97] Th. Basché, W.E. Moerner, M. Orrit und U.P. Wild. *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. Verlag Chemie, Weinheim (1997) .
- [Bay05] C. Baysal und A.R. Atilgany. *Relaxation Kinetics and the Glassiness of Native Proteins: Coupling of Timescales*. Biophysical Journal **88**, (2005) 1570-1576.
- [Bed76] G.S. Beddard und G. Porter. *Concentration Quenching in Chlorophyll*. Nature **260**, 2, (1976) 366-367.
- [Bet93] E. Betzig und R.J. Chichester. *Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy*. Science **262**, 5138, (1993) 1422-1425.
- [Boe87] E.J. Boekema, J.P. Dekker, M.G. van Heel, M. Rogner, W. Saenger, I. Witt und H.T. Witt. *Evidence for a Trimeric Organization of the Photosystem-I Complex from the Thermophilic Cyanobacterium Synechococcus Sp.* Febs Letters **217**, 2, (1987) 283-286.
- [Boe90] E.J. Boekema, R.M. Wynn und R. Malkin. *The Structure of Spinach Photosystem-I Studied by Electron-Microscopy*. Biochimica Et Biophysica Acta **1017**, 1, (1990) 49-56.
- [Bop99] Sytnik A. Howard T. D. Cogdell R. J. Bopp, M. A. und R. M. Hochstrasser. *The Dynamics of Structural Deformations of Immobilized Single Light-harvesting Complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, (1999) 11271-11276.

Literaturverzeichnis

- [Bow67] P.G. Bowers und G. Porter. *Quantum yields of triplet formation in solutions of chlorophyll*. Proc. R. Soc. London, Ser. A **296**, (1967) 435-441.
- [Bra85] G.J. Brakenhoff, H.T.M. van de Voort, E.A. van Spronsen, W.A. Linnemans und N. Nanninga. *Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy*. Nature **317**, (1985) 748-749.
- [Bre97] K. Brettel. *Electron Transfer and Arrangement of the Redox Cofactors in Photosystem I*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1318**, 3, (1997) 322-373.
- [Bre07] M. Brecht, H. Studier, A.F. Elli, F. Jelezko und R. Bittl. *Assignment of Red Antenna States in Photosystem I from Thermosynechococcus elongatus by Single-Molecule Spectroscopy*. Biochemistry **46**, 3, (2007) 799-806.
- [Bry92] D.A. Bryant. *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier (1996), Kap. 13, 501–550.
- [Byr00] M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik und T.A. Roelofs. *Decay Kinetics and Quantum Yields of Fluorescence in Photosystem I from Synechococcus Elongatus with P700 in the Reduced and Oxidized State: are the Kinetics of Excited State Decay Trap-Limited Or Transfer-Limited?* Biophys J **79**, 2, (2000) 992-1007.
- [Byr02] M. Byrdin, P. Jordan, N. Krauss, P. Fromme, D. Stehlik und E. Schlodder. *Light Harvesting in Photosystem I: Modeling Based on the 2.5-A Structure of Photosystem I from Synechococcus Elongatus*. Biophys J **83**, 1, (2002) 433-57.
- [Car07] E.S. Carmichael, J.B. Ballard, J.W. Lyding und M. Gruebele. *Frequency-modulated single molecule absorption spectroscopy*. J. Phys. Chem., in press (2007).
- [Cha89] Y. Cha, C.J. Murray und J.P. Klinman. *Hydrogen tunneling in enzyme reactions*. Science **243**, (1989) 1325-1330.
- [Chi91] A.K. Chibisov, T.D. Slavnova und H. Gorner. *Effect of macromolecules and Triton X-100 on the triplet of aggregated chlorophyll in aqueous solution*. J. Photochem. Photobiol. .
- [Col73] K. Colbow. *Energy transfer in photosynthesis*. Biochim. Biophys. Acta. **314**, (1973) 320-327.
- [Com00] A. Cometta, G. Zucchelli, N.V. Kavapetyan, E. Engelmann, F.M. Garlaschi und R.C. Jennings. *Thermal Behavior of Long Wavelength Absorption Transitions in Spirulina Platensis Photosystem I Trimers*. Biophysical Journal **79**, 6, (2000) 3235-3243.

- [Dam02] A. Damjanovic, H.M. Vaswani, P. Fromme und G.R. Fleming. *Chlorophyll Excitations in Photosystem I of Synechococcus elongatus*. J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 10251-10262.
- [Dex53] D.L. Dexter. *A Theory of Sensitized Luminescence in Solids*. J. Phys. Chem. **21**, 5, (1953) 836-850.
- [Dex69] D.L. Dexter, R.S. Knox und Th. Förster. *The Radiationless Transfer of Energy of Electronic Excitation between Impurity Molecules in Crystals*. Physica status solidi (b) **34**, 2, (1969) K159-K162.
- [dH99] F.T.H. den Hartog, C. van Papendrecht, U. Störkel und S. Völker. *Protein Dynamics in Photosystem II Complexes of Green Plants Studied by Time-Resolved Hole-Burning*. J. Phys. Chem. B **103**, (1999) 1375-1380.
- [Dil97] K.A. Dill und H.S. Chan. *From Levinthal to Pathways to Funnels: The "New View" of Protein Folding Kinetics*. Nature Struct. Biol. **4**, (1997) 10-19.
- [Doy97] R. Doyle, K. Simons, H. Qian und D. Baker. *Local Interactions and the Optimization of Protein Folding*. Prot. Struct. Funct. Genet. **29**, (1997) 282-291.
- [Elli06] A.F. Elli, F. Jelezko, C. Tietz, H. Studier, M. Brecht, Robert Bittl und J. Wrachtrup. *Red Pool Chlorophylls of Photosystem I of the Cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus: A Single-Molecule Study*. Biochemistry **45**, (2006) 1454-1458.
- [Eng01] E. Engelmann, T. Tagliabue, N.V. Karapetyan, F.M. Garlaschi, G. Zucchelli und R.C. Jennings. *Cd Spectroscopy Provides Evidence for Excitonic interactions involving Red-Shifted Chlorophyll Forms in Photosystem I*. FEBS Lett **499**, 1-2, (2001) 112-115.
- [Fen75] R.E. Fenna und B.W. Matthews. *Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from Chlorobium limicola*. Nature **258**, (1975) 573-577.
- [Fen02] P.W. Fenimore, H. Frauenfelder, B.H. McMahon und F.G. Parak. *Slaving: Solvent Fluctuations Dominate Protein Dynamics and Functions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**, 25, (2002) 16047-16051.
- [Fen04] P.W. Fenimore, H. Frauenfelder, B.H. McMahon und R.D. Young. *Bulk-Solvent and Hydration-Shell Fluctuations, Similar To Alpha- and Beta-Fluctuations in Glasses, Control Protein Motions and Functions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**, 40, (2004) 14408-14413.

Literaturverzeichnis

- [Fey63] R.P. Feynman, R.B. Leighton und M. Sands. *The Feynman Lectures on Physics*. Addison Wesley, Reading **Vol. I**, (1963) Chap. 3.
- [Fle97] G.R. Fleming und R. van Grondelle. *Femtosecond Spectroscopy of Photosynthetic Light-harvesting Systems*. Current Opinion in Structural Biology **7**, (1997) 738-748.
- [Fow92] G.J.S. Fowler, R.W. Visschers, G.G. Grief, R. van Grondelle und C.N. Hunter. *Genetically modified photosynthetic antenna complexes with blueshifted absorbency bands*. Nature **355**, (1992) 848-850.
- [För46] T. Förster. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik **2**, 1-2, (1946) 55-75.
- [Fra79] H. Frauenfelder, G.A. Petsko und D. Tsernoglou. *Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics*. Nature **280**, (1979) 558-563.
- [Fra88] H. Frauenfelder, F. Parak und R.D. Young. *Conformational Substates In Proteins*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry **17**, (1988) 451-479.
- [Fra91] H. Frauenfelder, S.G. Sligar und P.G. Wolynes. *The Energy Landscapes and Motions of Proteins*. Science **254**, 5038, (1991) 1598-1603.
- [Fra99] H. Frauenfelder, P.G. Wolynes und R.H. Austin. *Biological Physics*. Reviews of Modern Physics **71**, 2, (1999) S419-S430.
- [Fri96] K. Fritsch, J. Friedrich, F. Parak und J.L. Skinner. *Spectral Diffusion and the Energy Landscape of a Protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**, 26, (1996) 15141-15145.
- [Fro98] P. Fromme und H.T. Witt. *Improved Isolation and Crystallization of Photosystem I for Structural Analysis*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1365**, 1-2, (1998) 175-184.
- [Fro01] P. Fromme, P. Jordan und N. Krauss. *Structure of Photosystem I*. Biochim Biophys Acta **1507**, 1-3, (2001) 5-31.
- [Fuj97] K. Fujimoto, T. Noda und T. Fujimoto. *A simple and reliable quick-freezing/freezing-freezing procedure*. Histochem. Cell Biol. **107**, (1997) 81-84.
- [Ger93] L. Germeroth, F. Lottspeich, B. Robert und H. Michel. *Unexpected Similarities of the B800-850 Light-Harvesting Complex from Rhodospirillum rubrum to the B870 Light-Harvesting Complexes from Other Purple Photosynthetic Bacteria*. Biochemistry **31**, 32, (1993) 5615-5621.

- [Ger02] M. Germano, A.E. Yakushevskaya, W. Keegstra, H.J. van Gorkom, J.P. Dekker und E.J. Boekema. *Supramolecular organization of photosystem I and light-harvesting complex I in Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett. **525**, (2002) 121-125.
- [Ger03] Lupo D. Tietz C. Wrachtrup J. Gerken, U. und R. Ghosh. *Circular Symmetry of the Light-harvesting I Complex from Rhodospirillum rubrum is not Perturbed by Interaction with the Reaction Center*. Biochemistry **42**, (2003) 10354-10360.
- [Gib05] K. Gibasiewicz, A.Szrajner, J.A. Ihalainen, M. Germano, J.P. Dekker und R. van Grondelle. *Characterization of Low-Energy Chlorophylls in the PSI-LHCI Supercomplex from Chlamydomonas reinhardtii. A Site-Selective Fluorescence Study*. J. Phys. Chem. B **109**, (2005) 21180-21186.
- [Gob94] B. Gobets, H. van Amerongen, R. Monshouwer, J. Kruip, M. Rogner, R. van Grondelle und J.P. Dekker. *Polarized Site-Selected Fluorescence Spectroscopy of Isolated Photosystem-I Particles*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1188**, 1-2, (1994) 75-85.
- [Gob98] B. Gobets, J.P. Decker und R. van Grondelle. In: G. Garab (Editor). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Vol. 1, Kluwer, Dordrecht (1998) 503-508.
- [Gob01a] B. Gobets und R. van Grondelle. *Energy Transfer and Trapping in Photosystem I*. Biochim Biophys Acta **1507**, 1-3, (2001) 80-99.
- [Gob01b] B. Gobets, I.H. van Stokkum, M. Rogner, J. Kruip, E. Schlodder, N.V. Karapetyan, J.P. Dekker und R. van Grondelle. *Time-Resolved Fluorescence Emission Measurements of Photosystem I Particles of Various Cyanobacteria: a Unified Compartmental Model*. Biophys J **81**, 1, (2001) 407-424.
- [Gob02] B. Gobets. *The life and times of Photosystem I - excitation energy transfer and trapping unravelled*. Doktorarbeit (2002).
- [Gol91] J.H. Golbeck und D.A. Bryant. *Current Topics in Bioenergetics: Light Driven Reaction in Bioenergetics*. New York: Academic Press (1991), Kap. 16, 83-177.
- [Gru07] M. Gruebele, J. Lyding, E. Carmichael und J. Ballard. *Single molecule absorption spectroscopy*. Materials Today, submitted (2007).
- [Has94] G. Hastings, F.A.M. Kleinherenbrink, S. Lin und R.E. Blankenship. *Time-Resolved Fluorescence and Absorption-Spectroscopy of Photosystem-I*. Biochemistry **33**, 11, (1994) 3185-3192.
- [Has95] G. Hastings, S. Hoshina, A.N. Webber und R.E. Blankenship. *Universality of Energy and Electron-Transfer Processes in Photosystem-I*. Biochemistry **34**, 47, (1995) 15512-15522.

- [Hay94] J.M. Hayes, P.A. Lyle und G.J. Small. *A Theory for the Temperature-Dependence of Hole-Burned Spectra*. Journal of Physical Chemistry **98**, 30, (1994) 7337-7341.
- [Hay00] J.M. Hayes, S. Matsuzaki, M. Ratsep und G.J. Small. *Red Chlorophyll a Antenna States of Photosystem I of the Cyanobacterium Synechocystis Sp Pcc 6803*. Journal of Physical Chemistry B **104**, 23, (2000) 5625-5633.
- [Häd99] D.-P. Häder. *Photosynthese*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999) .
- [Her04] L. Herenyi, K. Szigeti, J. Fidy, T. Temesvari, J. Schlichter und J. Friedrich. *Aging Dynamics in Globular Proteins: Summary and Analysis of Experimental Results and Simulation by a modified Trap Model*. Eur. Biophys. J. **33**, 1, (2004) 68-75.
- [Hir76a] T. Hirschfeld. *Optical Microscopic Observation of Single Small Molecules*. Applied Optics **15**, 12, (1976) 2965-2966.
- [Hir76b] T. Hirschfeld, M.J. Block und W. Mueller. *Virometer - Optical Microscopic Instrument For Visual Observation, Measurement and Quantitation of Individual Viruses*. Federation Proceedings **35**, 3, (1976) 812-812.
- [Hän90] P. Hänggi, P. Talkner und M. Borkovec. *Reaction-rate theory: Fifty years after Kramers*. Rev. Mod. Phys. **62**, (1990) 251-341.
- [Hof91] A.J. Hoff und J. Amesz. In: H. Scheer (Editor). *Visible absorption spectroscopy of chlorophylls*. Chlorophylls, CRC Press, Boca Raton, FL (1991) 723-738.
- [Hof03] C. Hofmann, T.J. Aartsma, H. Michel und J. Köhler. *Direct observation of tiers in the energy landscape of a chromoprotein: A single-molecule study*. Proc Natl Acad Sci USA **100**, 26, (2003) 15534-15538.
- [Hof05] C. Hofmann, H. Michel, M. van Heel und J. Köhler. *Multivariate Analysis of Single-Molecule Spectra: Surpassing Spectral Diffusion*. PRL **94**, (2005) 195501(1-4).
- [Hol93] A.R. Holzwarth, G. Schatz, H. Brock und E. Bittersmann. *Energy-Transfer and Charge Separation Kinetics in Photosystem-I.1. Picosecond Transient Absorption and Fluorescence Study of Cyanobacterial Photosystem-I Particles*. Biophysical Journal **64**, 6, (1993) 1813-1826.
- [Hsi04] T.M. Hsin, V. Zazubovich, J.M. Hayes und G.J. Small. *Red Antenna States of PS I of Cyanobacteria: Stark Effect and interstate Energy Transfer*. Journal of Physical Chemistry B **108**, 29, (2004) 10515-10521.
- [Hua50] K. Huang und A. Rhys. *A Theory of Light-Absorption and non-Radiative Transitions in F-Centers*. Proc. Roy. Soc. London **A204**, (1950) 406-423.

- [Hum96] W.F. Humphrey, A. Dalke und K. Schulten. *VMD - Visual Molecular Dynamics*. J. Mol. Graphics **14**, (1996) 33-38.
- [Iha03] J.A. Ihalainen, M. Ratsep, P.E. Jensen, H.V. Scheller, R. Croce, R. Bassi, J.E.I. Korppi-Tommola und A. Freiberg. *Red Spectral Forms of Chlorophylls in Green Plant PS I - a Site-Selective and High-Pressure Spectroscopy Study*. Journal of Physical Chemistry B **107**, 34, (2003) 9086-9093.
- [Jan93] R. Jankowiak, J.M. Hayes und G.J. Small. *Spectral Hole-Burning Spectroscopy in Amorphous Molecular-Solids and Proteins*. Chemical Reviews **93**, 4, (1993) 1471-1502.
- [Jea92] J.M. Jean, R.A. Friesner und G.R. Fleming. *Application of a multilevel Red-field theory to electron transfer in condensed phases*. The Journal of Chemical Physics **96**, 8, (1992) 5827-5842.
- [Jel00] F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup und R. Bittl. *Single-Molecule Spectroscopy on Photosystem I Pigment-Protein Complexes*. Journal of Physical Chemistry B **104**, 34, (2000) 8093-8096.
- [JK93] M.C.J.M. Donckers E.J.J. Groenen J. Schmidt W.E. Moerner J. Köhler, J.A.J.M. Disselhorst. *Magnetic resonance of a single molecular spin*. Nature **363**, 9, (1993) 242-244.
- [Jon96] T. Jonsson, M.H. Glickman, S. Sun und J.P. Klinman. *Experimental evidence for extensive tunneling of hydrogen in the lipxygenase reaction: implications for enzyme catalysis*. J. Am. Chem. Soc. **118**, (1996) 10319-10320.
- [Jor01] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger und N. Krauss. *Three-Dimensional Structure of Cyanobacterial Photosystem I at 2.5 Å Resolution*. Nature **411**, 6840, (2001) 909-17.
- [JW93] J. Bernard M. Orrit R. Brown J. Wrachtrup, C. von Borczyskowski. *Optical detection of magnetic resonance in a single molecule*. Nature **363**, 9, (1993) 244-245.
- [Kar83] M. Karplus und J.A. McCammon. *Dynamics of proteins: Elements and function*. Ann. Rev. Biochem. **52**, (1983) 263-300.
- [Kar99a] N.V. Karapetyan, A.R. Holzwarth und M. Rogner. *The Photosystem I Trimer of Cyanobacteria: Molecular Organization, Excitation Dynamics and Physiological Significance*. FEBS Lett **460**, 3, (1999) 395-400.
- [Kar99b] N.V. Karapetyan, V.V. Shubin und R.J. Strasser. *Energy Exchange between the Chlorophyll Antennae of Monomeric Subunits within the Photosystem I Trimeric Complex of the Cyanobacterium Spirulina*. Photosynthesis Research **61**, 3, (1999) 291-301.

Literaturverzeichnis

- [Kar04] N.V. Karapetyan. *Interaction of Pigment-Protein Complexes within Aggregates Stimulates Dissipation of Excess Energy*. *Biochemistry-Moscow* **69**, 11, (2004) 1299-1304.
- [Ken07] J.P. Kenmeyer, N. Marmé und J.D. Hoheisel. *Spectrally Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM) - an Appropriate Method for Imaging of Single Molecules in Living Cells*. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, (2007) 37-40.
- [Ket02] Hofmann C. Köhler J. Howard T. D. Cogdell R. J. Schmidt J. Ketelaars, M. und T. J. Aartsma. *Spectroscopy on Individual Light-harvesting I Complexes of Rhodospseudomonas acidophila*. *Biophys. J.* **83**, (2002) 1701-1715.
- [Köh89] W. Köhler und J. Friedrich. *Probing of Conformational Relaxation Processes of Proteins by Frequency Labeling of Optical States*. *Journal of Chemical Physics* **90**, 2, (1989) 1270-1273.
- [Kla00] T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner und S.W. Hell. *Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 15, (2000) 8206-8210.
- [Kne03] J.P. Knemeyer, D.P. Herten und Sauer M. *Detection and Identification of Single Molecules in Living Cells Using Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM)*. *Anal. Chem.* **75**, 9, (2003) 2147-2153.
- [Kno03] R.S. Knox und B.Q. Spring. *Dipole Strengths in the Chlorophylls*. *Photochemistry and Photobiology* **77**, 5, (2003) 497-501.
- [Koe98] B. Koehne und H.-W. Trissl. *The Cyanobacterium Spirulina platensis Contains a Long Wavelength Absorbing Pigment C735 (F76077K) at Room Temperature*. *Biochemistry* **37**, (1998) 5494-5500.
- [Kub55] R. Kubo und Y. Toyozawa. *Application of the Method of Generating Function to Radiative and Non-Radiative Transitions of a Trapped Electron in a Crystal*. *Prog. Theor. Phys.* **13**, (1955) 160-182.
- [Lat94] E.J.P. Lathrop und R.A. Friesner. *Vibronic Mixing in the Strong Electronic Coupling Limit. Spectroscopic Effects of Forbidden Transitions*. *J. Phys. Chem.* **98**, (1994) 3050-3055.
- [Lax52] M. Lax. *The Franck-Condon Principle and Its Application to Crystals*. *Journal of Chemical Physics* **20**, 11, (1952) 1752-1760.
- [Lee95a] D.T. Leeson und D.A. Wiersma. *Looking into the energy landscape of myoglobin*. *Nature Structural Biology* **2**, 10, (1995) 848-851.

- [Lee95b] D.T. Leeson und D.A. Wiersma. *Real Time Observation of Low-Temperature Protein Motions*. Phys. Rev. Lett. **74**, 11, (1995) 2138-2141.
- [Lev69] C. Levinthal. *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems*. Hrsg. von P. Debrunner, J. Tsibris und E. Münck, University of Illinois Press, Urbana, Illinois (1969) 22.
- [Luk79] W. Lukosz. *Light-emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. 3. Radiation-patterns of dipoles with arbitrary orientation*. J. Opt. Soc. Am. **69**, (1979) 1495-1503.
- [Mac96] J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris und L.E. Brus. *Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface*. Science **272**, 5259, (1996) 255-258.
- [Mal96] R. Malkin. *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers (1996), Kap. 16, 313–332.
- [May00] V. May und O. Kühn. *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems*. WILEY-VCH-Verlag, Berlin (2000) .
- [Mel98] A.N. Melkozernov, S. Lin und R.E. Blankenship. In: G. Garab (Editor). *Energy Equilibration in the Antenna of Photosystem I from Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands (1998) 405–408.
- [Mel00] A.N. Melkozernov, S. Lin und R.E. Blankenship. *Excitation Dynamics and Heterogeneity of Energy Equilibration in the Core Antenna of Photosystem I from Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. Biochemistry **39**, (2000) 1489-1498.
- [Mel01a] A.N. Melkozernov. *Excitation Energy Transfer in Photosystem I from Oxygenic Organisms*. Photosynthesis Research **70**, 2, (2001) 129-153.
- [Mel01b] A.N. Melkozernov, S. Lin, R.E. Blankenship und L. Valkunas. *Spectral inhomogeneity of Photosystem I and Its influence on Excitation Equilibration and Trapping in the Cyanobacterium Synechocystis Sp Pcc6803 at 77 K*. Biophysical Journal **81**, 2, (2001) 1144-1154.
- [Mel05] A.N. Melkozernov und R.E. Blankenship. *Structural and functional organization of the peripheral light-harvesting system in Photosystem I*. Photosynthesis Research **85**, (2005) 33-50.
- [Min57] M. Minsky. Das erste Patent für konfokale Mikroskopie [USPatent: 3013467] (1957).

Literaturverzeichnis

- [Min88] M. Minsky. *Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope*. Scanning **10**, 4, (1988) 128-138.
- [Min06] A. Minardo, R. Bernini, F. Mottola und L. Zeni. *Optimization of metal-clad waveguides for sensitive fluorescence detection*. Optics Express **14**, 8, (2006) 3512-3527.
- [Moe89] W.E. Moerner und L. Kador. *Optical-Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid*. Physical Review Letters **62**, 21, (1989) 2535-2538.
- [Moe97] W.E. Moerner. *Perspectives Polymer Luminescence: Those Blinking Single Molecules*. Science **277**, 5329, (1997) 1059-1060.
- [Moe02] W.E. Moerner. *A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics and chemistry and and biophysics*. J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 910-927.
- [Moe03] W.E. Moerner und D.P. Fromm. *Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy*. Review of Scientific Instruments **74**, 8, (2003) 3597-3619.
- [Muh05] F. Muh und A. Zouni. *Extinction Coefficients and Critical Solubilisation Concentrations of Photosystems I and II from Thermosynechococcus Elongatus*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1708**, 2, (2005) 219-228.
- [Muk90] I. Mukerji und K.M. Sauer. In: M. Baltscheffsky (Editor). *Current Research in Photosynthesis, Vol. 2*. Kluwer, Dordrecht **40**, 1, (1990) 21-34.
- [Mul80] J.E. Mullet, J.J. Burke und C.J. Arntzen. *Chlorophyll proteins of photosystem I*. Plant Physiol. **65**, (1980) 814-822.
- [Nak02] Y. Nakamura, T. Kaneko, S. Sato, M. Ikeuchi, H. Katoh, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada und S. Tabata. *Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus BP-1*. DNA Res. **9**, 4, (2002) 123-130.
- [Niz05] A.P. Nizovtsev, S.Y. Kilin, F. Jelezko, T. Gaebel, I. Popa, A. Gruber und J. Wrachtrup. *A Quantum Computer Based on Nv Centers in Diamond: Optically Detected Nutations of Single Electron and Nuclear Spins*. Optics and Spectroscopy **99**, 2, (2005) 233-244.
- [Ols94] J.D. Olsen, G.D. Sockalingum, B. Robert und C.N. Hunter. *Modification of a hydrogen-bond to a bacteriochlorophyll-a molecule in the light-harvesting 1-antenna of Rhodobacter-sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**, (1994) 7124-7128.

- [Orr90] M. Orrit und J. Bernard. *Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a Para-Terphenyl Crystal*. Physical Review Letters **65**, 21, (1990) 2716-2719.
- [Orr93] M. Orrit, J. Bernard und R.I. Personov. *High-resolution spectroscopy of organic molecules in solids: from fluorescence line narrowing and hole burning to single molecule spectroscopy*. J. Phys. Chem. **97**, 40, (1993) 10256-10268.
- [Par02] F.G. Parak und G.U. Nienhaus. *Myoglobin, a paradigm in the study of protein dynamics*. Chemphyschem **3**, 3, (2002) 249-254.
- [Paw91] J.B. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Zweite Auflage, Plenum, New-York (1991).
- [Per18] J. Perrin. *La Fluorescence*. An. Phys. **9**, (1918) 133.
- [Pål96] L.-O. Pålsson, J.P. Dekker, E. Schlodder, R. Monshouwer und R. van Grondelle. *Polarized Site-Selective Fluorescence Spectroscopy of the Long-Wavelength Emitting Chlorophylls in Isolated Photosystem I Particles of Synechococcus Elongatus*. Photosynthesis Research **48**, 1-2, (1996) 239-246.
- [Pål98] L.-O. Pålsson, C. Flemming, B. Gobets, R. van Grondelle, J.P. Dekker und E. Schlodder. *Energy Transfer and Charge Separation in Photosystem I: P700 Oxidation upon Selective Excitation of the Long-Wavelength Antenna Chlorophylls of Synechococcus Elongatus*. Biophys J **74**, 5, (1998) 2611-22.
- [Pol94] W.T. Pollard und R.A. Friesner. *Solution of the Redfield equation for the dissipative quantum dynamics of multilevel systems*. J. Chem. Phys. **100**, (1994) 5054-5065.
- [Pop82] M. Pope und C.E. Swenberg. *Electronic Processes in Organic Crystals*. Oxford University Press, New York (1982) Chapter 1D.
- [Pul95] T. Pullerits, R. Monshouwer, F. van Mourik und R. van Grondelle. *Temperature dependence of electron-vibronic spectra of photosynthetic systems. Computer simulations and comparison with experiment*. Chemical Physics **194**, (1995) 395-407.
- [Reb70] K.K. Rebane. *Impurity Spectra of Solids: Elementary Theory of Vibrational Structure*. Plenum Press, New York, London (1970).
- [Red57] A.G. Redfield. *On the theory of relaxation processes*. IBM J. Res. Dev. **1**, (1957) 19-31.
- [Red65] A.G. Redfield. *On the theory of relaxation processes*. Adv. Magn. Reson. (überarbeitete Fassung) **1**, (1965) 1-32.

Literaturverzeichnis

- [Red92] N.R.S. Reddy, P.A. Lyle und G.J. Small. *Applications of Spectral Hole Burning Spectroscopies to Antenna and Reaction Center Complexes*. Photosynthesis Research **31**, 3, (1992) 167-194.
- [Red93] N.R.S. Reddy, S.V. Kolaczowski und G.J. Small. *Nonphotochemical Hole Burning of the Reaction Center of Rhodospseudomonas viridis*. Journal of Physical Chemistry **97**, (1993) 6934-6940.
- [Rei01] T. Reinot, V. Zazubovich, J.M. Hayes und G.J. Small. *New insights on Persistent Nonphotochemical Hole Burning and Its Application to Photosynthetic Complexes*. Journal of Physical Chemistry B **105**, 22, (2001) 5083-5098.
- [Ren02] T. Renger und R.A. Marcus. *On the relation of protein dynamics and exciton relaxation in pigment-protein complexes: An estimation of the spectral density and a theory for the calculation of optical spectra*. J. Chem. Phys. **116**, 22, (2002) 9997-10019.
- [Ren06] X. Ren, Z. Yang und T. Kuang. *Solvent-induced changes in photochemical activity and conformation of photosystem I particles by glycerol*. Biol. Chem. **387**, (2006) 23-29.
- [R.H75] Austin R.H., K.W. Beeson, L. Eisenstein, Frauenfelder H. und Gunsalus I.C. *Dynamics of ligand binding to myoglobin*. Biochemistry **14**, 24, (1975) 5355-5373.
- [Ric94] R. Richert und A. Blumen. *Disorder Effects on Relaxation Processes*. Springer Verlag, Berlin (1994) .
- [Rig93] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren und P. Kask. *Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low-Background - Analysis of Translational Diffusion*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters **22**, 3, (1993) 169-175.
- [Rig01] R. Rigler, M. Orrit und Th. Basché. *Single Molecule Spectroscopy - Nobel Conference Lectures*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2001) .
- [Ril07] K.J. Riley, T. Reinot, R. Jankowiak, P. Fromme und V. Zazubovich. *Red Antenna States of Photosystem I from Cyanobacteria Synechocystis PCC 6803 and Thermosynechococcus elongatus: Single-Complex Spectroscopy and Spectral Hole-Burning Study*. J. Phys. Chem. B **111**, (2007) 286-292.
- [Riv99] A. Rivadossi, G. Zucchelli, F.M. Garlaschi und R.C. Jennings. *The Importance of PS I Chlorophyll Red Forms in Light-Harvesting by Leaves*. Photosynthesis Research **60**, 2-3, (1999) 209-215.

- [Rät00] M. Rätsep, T.W. Johnson, P.R. Chitnis und G.J. Small. *The Red-Absorbing Chlorophyll a Antenna States of Photosystem I: a Hole-Burning Study of Synechocystis Sp PCC 6803 and Its Mutants*. Journal of Physical Chemistry B **104**, 4, (2000) 836-847.
- [Rut05] D. Rutkauskas, V. Novoderezhkin, R.J. Cogdell und R. van Grondelle. *Fluorescence Spectroscopy of Conformational Changes of Single LH2 Complexes*. Biophysical Journal **88**, (2005) 422-435.
- [Rut06] D. Rutkauskas, R.J. Cogdell und R. van Grondelle. *Conformational Relaxation of Single Bacterial Light-Harvesting Complexes*. Biochemistry **45**, (2006) 1082-1086.
- [Sav98] S. Savikhin, D.R. Buck, W.S. Struve, R.E. Blankenship, A.S. Taisova, V.I. Novoderezhkin und Z.G. Fetisova. *Excitation Delocalization in the Bacteriochlorophyll c Antenna of the Green Bacterium Chloroflexus aurantiacus as Revealed by Ultrafast Pump-Probe Spectroscopy*. FEBS Lett. **430**, (1998) 323-326.
- [Sav00] S. Savikhin, W. Xu, P.R. Chitnis und W.S. Struve. *Ultrafast Primary Processes in PS I from Synechocystis sp.: Roles of P700 and A0*. Biophys. J. **79**, (2000) 1573-1586.
- [Sch91] H. Scheer. *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, Florida (1991) .
- [Sch97] W.D. Schubert, O. Klukas, N. Krauss, W. Saenger, P. Fromme und H.T. Witt. *Photosystem I of Synechococcus elongatus at 4 Angstrom Resolution: Comprehensive Structure Analysis*. Journal of Molecular Biology **272**, 5, (1997) 741-769.
- [Sch98] E. Schlodder, K. Falkenberg, M. Gergeleit und K. Brettel. *Temperature Dependence of Forward and Reverse Electron Transfer from A(1)(-), the Reduced Secondary Electron Acceptor in Photosystem I*. Biochemistry **37**, 26, (1998) 9466-9476.
- [Sch05] E. Schlodder, M. Cetin, M. byrdin, I.V. Terekhova und N.V. Karapetyan. *P700+- and 3p700-induced Quenching of the Fluorescence at 760 nm in Trimeric Photosystem I Complexes from the Cyanobacterium Arthrospira Platensis*. Biochim Biophys Acta **1706**, 1-2, (2005) 53-67.
- [Scr99] N.S. Scrutton, J. Basran und M.J. Sutcliffe. *New insights into Enzyme Catalysis - Ground State Tunnelling Driven by Protein Dynamics*. European Journal of Biochemistry **264**, 3, (1999) 666-671.
- [Sen02] M.K. Sener, D.Y. Lu, T. Ritz, S. Park, P. Fromme und K. Schulten. *Robustness and Optimality of Light Harvesting in Cyanobacterial Photosystem I*. Journal of Physical Chemistry B **106**, 32, (2002) 7948-7960.

Literaturverzeichnis

- [Set92] P. Setif. *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier (1992), Kap. 12, 471–499.
- [She02] G. Shen, J. Zhao, S.K. Reimer, M.L. Antonkine, Q. Cai, S.M. Weiland, J.H. Golbeck und D.A. Bryant. *Assembly of Photosystem I, I. Inactivation of the RubA Gene Encoding a Membrane-Associated Rubredoxin in the Cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 Causes a Loss of Photosystem I Activity*. The Journal of Biological Chemistry **277**, 23, (2002) 20343-20354.
- [Shu91] V.V. Shubin, S.D.S Murthy, N.V. Karapetyan und P. Mohanty. *Origin of the 77-K Variable Fluorescence at 758-Nm in the Cyanobacterium Spirulina-Platensis*. Biochimica et Biophysica Acta **1060**, 1, (1991) 28-36.
- [Shu93] V.V. Shubin, V.L. Tsuprun, I.N. Bezmertnaya und N.V. Karapetyan. *Trimeric Forms of the Photosystem-I Reaction-Center Complex Pre-Exist in the Membranes of the Cyanobacterium Spirulina-Platensis*. FEBS Letters **334**, 1, (1993) 79-82.
- [Shu95] V.V. Shubin, I.N. Bezmertnaya und N.V. Karapetyan. *Efficient Energy-Transfer from the Long-Wavelength Antenna Chlorophylls to P700 in Photosystem-I Complexes from Spirulina-Platensis*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **30**, 2-3, (1995) 153-160.
- [Ski99] J.L. Skinner, J. Friedrich und J. Schlichter. *Spectral Diffusion in Proteins: a Simple Phenomenological Model*. Journal of Physical Chemistry A **103**, 14, (1999) 2310-2311.
- [Spr98] K.R. Spring, H.E. Keller und M.W. Davidson. *Optical Microscopy Primer: Microscope Objectives*. <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/anatomy/objectives.html> (1998).
- [Spr00a] K.R. Spring und M.W. Davidson. *Optical Microscopy Primer: Avalanche Photodiodes*. <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/digitalimaging/concepts/avalanche.html> (2000).
- [Spr00b] K.R. Spring und M.W. Davidson. *Optical Microscopy Primer: Electronic Imaging Detectors*. <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/digitalimaging/digitalimagingdetectors.html> (2000).
- [Str95] L. Stryer. *Biochemistry*. 4. Auflage, New York, W.H. Freeman and Company (1995) .
- [Tam00] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis und M. Orrit. *Ten Years of Single-Molecule Spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A **104**, 1, (2000) 1-16.

- [Tie99] C. Tietz, O. Chekhlov, A. Drabenstedt, J. Schuster und J. Wrachtrup. *Spectroscopy on Single Light-Harvesting Complexes at Low Temperature*. Journal of Physical Chemistry B **103**, 30, (1999) 6328-6333.
- [Tie01] C. Tietz, F. Jelezko, U. Gerken, S. Schuler, A. Schubert, H. Rogl und J. Wrachtrup. *Single Molecule Spectroscopy on the Light-Harvesting Complex Ii of Higher Plants*. Biophysical Journal **81**, 1, (2001) 556-562.
- [Tin00] P. Tinnefeld, V. Buschmann, D.P. Hertel, J.P. Knemeyer und Sauer M. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) on the Single Molecule Level*. Laser Applications to Chemical and Environmental Analysis **3**, (2000) 5-7.
- [Tör07] J. Törring. *FSC2*. <http://www.physik.fu-berlin.de/toerring/fsc2/> (1989-2007) .
- [Tra94] J.K. Trautman, J.J. Macklin, L.E. Brus und E. Betzig. *Near-Field Spectroscopy of Single Molecules at Room-Temperature*. Nature **369**, 6475, (1994) 40-42.
- [Tri93a] H.W. Trissl. *Long-Wavelength Absorbing Antenna Pigments and Heterogeneous Absorption-Bands Concentrate Excitons and Increase Absorption Cross-Section*. Photosynthesis Research **35**, 3, (1993) 247-263.
- [Tri93b] H.W. Trissl, B. Hecks und K. Wulf. *Invariable Trapping Times in Photosystem-I upon Excitation of Minor Long-Wavelength-Absorbing Pigments*. Photochemistry and Photobiology **57**, 1, (1993) 108-112.
- [Tri93c] H.W. Trissl und C. Wilhelm. *Why do Thylakoid Membranes from Higher Plants Form Grana Stacks?* Trends Biochem. Sci. **18**, 11, (1993) 415-419.
- [Tso72] Baldwin R.L. McPhie P. Tsong, T.Y. und E.L. Elson. *A sequential model of nucleation-dependent protein folding: Kinetic studies of ribonuclease A*. J. Mol. Biol. **63**, (1972) 453-475.
- [Tur93] S. Turconi, G. Schweitzer und A.R. Holzwarth. *Temperaturedependence of Picosecond Fluorescence Kinetics of a Cyanobacterial Photosystem I Particle*. Photochem. Photobiol. **57**, (1993) 113-119.
- [Tur96] S. Turconi, J. Kruij, G. Schweitzer, M. Rögner und A.R. Holzwarth. *A Comparative Fluorescence Kinetics Study of Photosystem I Monomers and Trimers from Synechocystis sp. PCC 6803*. Photosynth. Res. **49**, (1996) 263-268.
- [vA88] H. van Amerongen, H. Vasmel und R. van Grondelle. *Linear Dichroism of Chlorosomes from Chloroflexus Aurantiacus in Compressed Gels and Electric Fields*. Biophysical Journal **54**, 2, (1988) 65-76.

Literaturverzeichnis

- [vdL93] J. van der Lee, D. Bald, S.L.S. Kwa, R. van Grondelle, M. Rogner und J.P. Dekker. *Steady-State Polarized-Light Spectroscopy of Isolated Photosystem-I Complexes*. Photosynthesis Research **35**, 3, (1993) 311-321.
- [vG85] R. van Grondelle. *Excitation energy transfer, trapping, annihilation in photosynthetic systems*. Biochim. Biophys. Acta. **811**, (1985) 147-195.
- [vG88a] R. van Grondelle, H. Bergström, V. Sundström, R.J. van Dorssen, M. Vos und S. Scheider (Editors) C.N. Hunter. In: H. Scheer. *Photosynthetic Light-Harvesting Systems*. de Gruyter, Berlin (1988) 519-530.
- [vG88b] R. van Grondelle und S. Scheider (Editors) V. Sundström. In: H. Scheer. *Photosynthetic Light-Harvesting Systems*. de Gruyter, Berlin (1988) 403-438.
- [vG94] R. van Grondelle, J.P. Dekker, T. Gillbro und V. Sundstrom. *Energy-Transfer and Trapping in Photosynthesis*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1187**, 1, (1994) 1-65.
- [vO99] A.M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T.J. Aartsma und J. Schmidt. *Unraveling the Electronic Structure of Individual Photosynthetic Pigment-Protein Complexes*. Science **285**, (1999) 400-402.
- [Voe95] D. Voet und J.G. Voet. *Biochemistry*. 2. Auflage, New York, J. Wiley & Sons (1995).
- [Web96] R.H. Webb. *Confocal Optical Microscopy*. Reports on Progress in Physics **59**, 3, (1996) 427-471.
- [Wei99] S. Weiss. *Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules*. Science **283**, 5408, (1999) 1676-1683.
- [Wei00] S. Weiss. *Measuring Conformational Dynamics of Biomolecules by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*. Nature Structural Biology **7**, 9, (2000) 724-729.
- [Wer92] M. Werst, Y. Jia, L. Mets und G.R. Fleming. *Comparison of the LH2 Antenna Complexes of Rhodospseudomonas Acidophila (Strain 10050) and Rhodobacter Sphaeroides by High-Pressure Absorption, High-Pressure Hole Burning, and Temperature-Dependent Absorption Spectroscopies*. Biophysical Journal **61**, (1992) 868-878.
- [Wit92] B.P. Wittmershaus, V.M. Woolf und W.F.J. Vermaas. *Temperature-Dependence and Polarization of Fluorescence from Photosystem-I in the Cyanobacterium Synechocystis sp PCC-6803*. Photosynthesis Research **31**, 2, (1992) 75-87.
- [Wol95] Onuchic J.N. Wolynes, P.G. und D. Thirumalai. *Navigating the folding routes*. Science **267**, (1995) 1619-1620.

- [Wol99] P.G. Wolynes und W.A. Eaton. *The physics of Protein Folding*. Physics World **12**, (1999) 39-44.
- [Xie94] X.S. Xie und R.C. Dunn. *Probing Single-Molecule Dynamics*. Science **265**, 5170, (1994) 361-364.
- [You91] R.D. Young und R. Scholl. *Proteins as complex systems*. Journal of Non-Crystalline Solids **131-133**, (1991) 302-309.
- [Zan02] Ch. Zander, J. Enderlein und R.A. Keller. *Single Molecule Detection in Solution*. WILEY-VCH-Verlag, Berlin (2002) .
- [Zaz02a] V. Zazubovich, R. Jankowiak und G.J. Small. *A High-Pressure Spectral Hole Burning Study of Correlation between Energy Disorder and Excitonic Couplings in the LH 2 Complex from Rhodospseudomonas Acidophila*. J. Phys. Chem. B **106**, (2002) 6802-6814.
- [Zaz02b] V. Zazubovich, S. Matsuzaki, T.W. Johnson, J.M. Hayes, P.R. Chitnis und G.J. Small. *Red Antenna States of Photosystem I from Cyanobacterium Synechococcus Elongatus: a Spectral Hole Burning Study*. Chemical Physics **275**, 1-3, (2002) 47-59.
- [Zip91] W. Zipfel und T.G. Owens. *Calculation of absolute photosystem I absorption cross-sections from P700 photo-oxidation kinetics*. Photosynthesis Research **29**, (1991) 23-35.

Literaturverzeichnis

Publikationen

Alexandra F. Elli, Fedor Jelezko, Carsten Tietz, Hauke Studier, Marc Brecht, Robert Bittl and Jörg Wrachtrup. *Red Pool Chlorophylls of Photosystem I of the Cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus: A Single-Molecule Study*. *Biochemistry* **45**, (2006) 1454-1458.

Marc Brecht, Hauke Studier, Alexandra F. Elli, Fedor Jelezko and Robert Bittl. *Assignment of Red Antenna States in Photosystem I from Thermosynechococcus elongatus by Single-Molecule Spectroscopy*. *Biochemistry* **46**, (2007) 799-806.

Marc Brecht, Jana B. Nieder, Hauke Studier, Eberhard Schlodder and Robert Bittl. *Red Antenna States of Photosystem I from Synechococcus sp. strain PCC 7002*. *Photosynthesis Research* **94**, (2007) (in press).

Publikationen

Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Robert Bittl für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe dabei mitwirken zu können, ein neues, interessantes Projekt anzufangen, auch für offene Ohren und entscheidende Hinweise, wann immer *schwierige* Probleme auftraten;

Prof. Paul Fumagalli für die Übernahme des Zweitgutachtens;

Marc Brecht für die lehrreiche Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre dabei, für viele tatenreiche „Blitzlösungen“ im Labor, für die auch mal die Flex in luftiger Höhe verwendet wurde, für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen über SMS am PS I sowie auch für philosophische Diskussionen allgemein;

Fedor Jelezko für schier unerschöpfliche Hilfsbereitschaft, Geduld und Freundlichkeit, für wichtige Hilfestellungen zum experimentellen Aufbau, dafür von seiner beeindruckenden fachlichen und technischen Kompetenz lernen zu dürfen;

Thomas Renger für seine unermüdliche Bereitschaft, mir in theoretischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und mich auf angenehme Art zu motivieren;

Frank Müh für das zur Verfügung stellen seiner Monomerprobe und für hilfreiche Diskussionen, insbesondere bei speziellen Fragen zum PS I;

Volker Radics für die eine oder andere im Rahmen seiner Diplomarbeit geschickt durchgeführte Messung und natürlich für seine Gelassenheit;

Jana Nieder, Christian Teutloff und der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche und umgängliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft;

Jens Törring für den hervorragenden Interpreten „fsc2“ und die gewissenhafte Einbindung unserer Hardwarekomponenten und die genauso gewissenhafte Unterstützung bei allen programmrelevanten Fragen;

Eberhard Schlodder für die Bereitstellung von Proben, Ensemble-Messungen am PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 und einigen hilfreichen Diskussionen;

Prof. Valter Zazubovich für das zur Verfügung stellen des Simulationsprogramms;

Prof. John Golbeck für das zur Verfügung stellen der PS I-Proben von *Synechococcus* sp. PCC 7002;

Joseph Thiel für den großartigen Kryostaten mit vielen raffinierten Detaillösungen und die aufopfernde Fürsorge, diesen in einem funktionsfähigen Zustand zu halten;

Danksagung

Thomas Hänsel, Detlef Müller und dem Team der Feinwerktechnik für die Erstellung zahlreicher mechanischer Bauteile;

dem Team der TTL für die zuverlässige Heliumversorgung und insbesondere Hans Streuber für die beispiellose Lösung delikater feinwerktechnischer Probleme;

dem Team der Elektronikwerkstatt für die Erstellung und Reparatur diverser elektronischer Geräte, insbesondere Marian Luft für seine geistvollen Ideen und ihre professionelle Umsetzung, wie z.B. der Steuereinheit für den Polarisator;

Prof. Martin Wolf für einige Dauerleihgaben, wie z.B. vier Isolatoren;

Roswitha Brunn für das gewissenhafte Einwiegen von Chemikalien in zahllose Eppendorfgefäße;

meinen Eltern für ihre fortwährende und vorbehaltlose Unterstützung in allen Belangen;

meiner Freundin Jasmin dafür, dass sie immer für mich da war und mich unterstützt hat, wo sie nur konnte und für ihr Verständnis für die ausgedehnten Arbeitszeiten der letzten Jahre.