

II. Grundlagen

II.1 Kinetische Primärprozesse in der Photosynthese

Die Funktionsweise photosynthetischer Antennen- und Reaktionzentrenkomplexe beruht im Wesentlichen auf der Wechselwirkung von Chromophoren, deren Eigenschaften stark von der sie umgebenden Proteinmatrix (Lage der Energieniveaus elektronischer Zustände) und dem Abstand von benachbarten Chromophoren (z. B. Ausbildung von exzitonisch gekoppelten Dimeren) abhängt. Im Folgenden sollen die wichtigsten Prozesse kurz diskutiert werden.

II.1.1 Elektronentransfer

Die Funktionsweise der primären Schritte der Photosynthese beruht auf dem Lichteinfang, der Energieweiterleitung und Umwandlung in ein elektrisches Potential, mit der Reaktionen wie z. B. die Wasserspaltung gestartet werden können. Die Umwandlung in ein elektrisches Potential setzt einen intermolekularen Elektronentransfer voraus. Marcus (1957) entwickelte eine klassische Theorie zur Erklärung des Elektronentransfers für nicht-adiabatische Fälle, also für schwach gekoppelte Moleküle. Sie wurde von Jortner (1976) u. a. mit quantenmechanischen Aspekten erweitert. Eine umfassende Behandlung des Themas findet in [Marcus und Sutin (1985)] statt. Hier wird noch einmal kurz auf den klassischen Fall der Marcustheorie eingegangen. Über Fermis goldene Regel und die Born- Oppenheimer Näherung für nicht-adiabatische Reaktionen (Franck- Condon Prinzip: nukleare Koordinaten ändern sich nicht während des Elektronentransfers) folgt:

$$k_{ET} = \frac{2P}{\hbar} V_R^2 \cdot FC \quad (\text{II-1})$$

mit

$$FC = \frac{1}{\sqrt{4P} k_B T} \exp\left(-\frac{(I - \Delta G)^2}{4I k_B T}\right) \quad (\text{II-2})$$

$$V_R^2 = V_0^2 \exp(-bR)$$

k_{ET} – Elektronentransferrate; k_B – Boltzmannkonstante; T – Temperatur; FC – Franck-Condon-Faktor; λ – Reorganisationsenergie; ΔG – freie Enthalpiedifferenz zwischen Ausgangs- und Endzustand; V_R^2 – elektronische Kopplung der Donor- und Akzeptor- Wellenfunktion; V_0^2 – maximale Kopplung; R – Rand zu Rand Abstand von Donor und Akzeptor

Der Franck-Condon-Faktor ist der Überlapp der Ausgangs- und der Produktwellenfunktionen der Kerne in der klassischen Näherung. Dabei wird für die Kernkoordinaten ein harmonisches

Potential sowohl für den Ausgangszustand als auch den Endzustand angenommen. Dabei stellt die Reorganisationsenergie λ die Energie dar, die ohne Elektronentransfer benötigt wird, um die Nuklearkoordinaten des Ausgangszustandes so stark zu ändern, das sie in der Geometrie des Produktes sind. $(\lambda - \Delta G)^2 / 4\lambda$ ist die Aktivierungsenergie, die für den Elektronentransfer aufgebracht werden muß. Bei bakteriellen Reaktionszentren ist die Aktivierungsenergie für die primäre Ladungstrennung nahezu Null [Shuvalov und Klevanik (1983)]. Aus Gleichung (II-2) folgt eine Ladungstrennungsrate, die i. W. unabhängig von der Temperatur ist. Die elektronische Kopplung V_R^2 gibt die Wahrscheinlichkeit des Elektronentransfers bei Erreichen der Reaktionskoordinate des Übergangs an, d. h. den Überlapp der Wellenfunktionen, der exponentiell vom Abstand abhängt.

II.1.2 Energietransfer

Der Energietransfer ist der grundlegende Prozeß in der Antenne eines photosynthetischen Systems, die Weiterleitung elektronischer Anregungsenergien zum Reaktionszentrum. Wird ein System aus zwei Molekülen angeregt und besteht eine Wechselwirkung dieser Moleküle, so ergibt sich in Abhängigkeit von der Zeit und der Stärke der Wechselwirkung eine Anregungswahrscheinlichkeit der einzelnen Moleküle, die durch eine Pauli- Master- Gleichung beschrieben werden kann [Kenkre und Knox (1974)].

Die Typen des Energietransfers werden über die Größe des Resonanzintegrals $\beta = \langle \Psi_{D^*A} | V | \Psi_{DA^*} \rangle$ unterschieden, mit Ψ_{D^*A} und Ψ_{DA^*} als Ausgangs- und Produktwellenfunktion und dem Wechselwirkungsoperator V . In der Diskussion des Energietransfers in photosynthetischen Systemen werden zwei Fälle in Betracht gezogen:

- $\beta \sim kT$, schwache Wechselwirkung: Förster- und Dextertransfer
- $\beta \gg kT$, starke Wechselwirkung: Anregungsdelokalisierung

Schwache Wechselwirkung:

Bei den meisten biologischen Energietransferprozessen handelt es sich um eine schwache Wechselwirkung. Dabei wird folgende Betrachtung angestellt: Der Wechselwirkungsoperator V sei das Coulombpotential, und es wird ein Zwei-Elektronen-Modell der beiden beteiligten Moleküle betrachtet. Bei der Aufstellung des Resonanzintegrals treten zwei Wechselwirkungsterme auf, ein klassischer Coulomb-Term und ein quantenmechanischer, sogenannter Austauschterm.

Der Förster-Energietransfer [Förster (1965)] beschreibt die Wechselwirkung als eine schwache Dipol-Dipol Kopplung zwischen zwei Molekülen, die sich im Abstand R voneinander befinden (erstes Glied der Multipolentwicklung des Coulombterms). Dabei sind die Di-

polmomente die Übergangsdipolmomente zwischen Grund- und angeregtem Zustand. Die Übergangsratenkonstante k_{AD} zwischen Donator D und Akzeptor A ist bestimmt durch:

$$k_{AD} = \frac{9\kappa^2 \ln 10}{128\mathbf{p}^5 n^4 N_A \mathbf{t}_D} \cdot \frac{1}{R_{DA}^6} \int f_D(\tilde{\mathbf{n}}) \mathbf{e}_A(\tilde{\mathbf{n}}) \frac{d\tilde{\mathbf{n}}}{\tilde{\mathbf{n}}^4} \quad (\text{II-3})$$

κ – Orientierungsfaktor zwischen den Übergangsdipolmomenten; n – Brechungsindex der Umgebung; N_A – Avogadro- Konstante; R_{DA} – Abstand von Donor und Akzeptor; τ_D – strahlende Lebensdauer des Donors; f_D – normiertes Fluoreszenzspektrum des Donors; ϵ_A – Extinktionskoeffizient des Akzeptors; $\tilde{\mathbf{n}}$ – Wellenzahl.

Das Integral wird durch die gemeinsame Fläche des Fluoreszenzspektrums des Donors und Absorptionsspektrum des Akzeptors bestimmt und spektrales Überlappungsintegral genannt. Durch die R^{-6} - Abhängigkeit der Ratenkonstante braucht mit guter Näherung nur Energietransfer zwischen benachbarten Molekülen berücksichtigt werden. Der Energietransfer wird hier als statistischer, diffusiver Prozeß betrachtet, wobei die Anregung zu jedem Zeitpunkt auf einem Molekül lokalisiert ist. Weiterhin kann dieser Energietransfer nur als Singulett-Singulett Energietransfer wegen der Erhaltung des Gesamtspins auftreten.

Der Austauschterm ist der „nichtklassische“ Term der Coulombwechselwirkung, der beim sogenannten Dexter- Transfer [Dexter (1952)] herangezogen wird. Die Wechselwirkung nimmt exponentiell mit dem Abstand R zwischen Donor und Akzeptor entsprechend dem räumlichen Überlapp der Wellenfunktionen ab. Es ergibt sich für die Ratenkonstante folgende Abhängigkeit:

$$k_{AD} \propto \frac{1}{\mathbf{t}_D} \exp[-\gamma(R - R_0)] \quad (\text{II-4})$$

τ_D – strahlende Lebensdauer von D; γ – Proportionalitätskonstante; R – Abstand zwischen D und A; R_0 – Reichweite der Kopplung, bei der die internen Energiedissipationen gleich wahrscheinlich sind wie der Energietransfer zu A.

Der Triplett-Triplett Transfer kann auf Grund des Pauliprinzips kein Förster-, sondern nur ein Dextertransfer sein.

Starke Wechselwirkung:

Für den Fall, daß das Resonanzintegral $\beta \gg kT$ ist, findet eine Delokalisierung der Energie, d. h. die Bildung eines gemeinsamen Anregungszustandes über mehrere Moleküle statt. Diese exzitonische Kopplung zwischen zwei Molekülen D und A (Dimer) führt zu einer Verschiebung der Lage der Energieniveaus in Abhängigkeit von der exzitonischen Kopplung der beiden Moleküle. [Kasha (1965)] Das Absorptionsspektrum ist dann nicht mehr die Überlagerung der reinen Absorptionsspektren von D und A wie bei keiner Kopplung und wie bei schwacher Kopplung, abgesehen von etwas Verbreiterung und Verschiebung. Bei identischen

Molekülen kommt es dabei zu einer Aufhebung der Entartung mit jeweils einem niederenergetischen und einem höherenergetischen Energieniveau im Vergleich zum entarteten Fall. Ein Beispiel in der Photosynthese ist zum Beispiel die B820-Untereinheit der LH1-Antenne von photosynthetischen Purpurbakterien, ein proteingebundenes BChl *a* Dimer. [Van Mourik *et al.* (1991)] Die exzitonische Kopplung und damit die Delokalisierung ist allerdings nicht allgemein auf zwei Moleküle beschränkt. So wird seit einiger Zeit für das Reaktionszentrum von PS II eine Delokalisierung der Anregungsenergie des primären Donators auf 3 und mehr Pigmente [z. B. Durrant *et al.* (1995)] im Gegensatz zum Dimer im bakteriellen Reaktionszentrum [z. B. Angerhofer und Bittl (1996)] diskutiert.

Die hier benutzten Untersuchungsmethoden haben eine Zeitauflösung im Pikosekundenbereich, einzelne Energietransferschritte in der Antenne laufen im Zeitbereich von 100 fs ab, sind also nicht einzeln auflösbar. Es können somit maximal globale Äquilibrierungszeiten der Anregungsenergie in der Antenne beobachtet werden.

II.1.3 Annihilation

Bei Auftreten von gleichzeitig mehreren Anregungen in gekoppelten Systemen, wie den Antennensystemen in der Photosynthese, können die Anregungen miteinander wechselwirken und es tritt Annihilation, insbesondere die Singulett-Singulett Annihilation, auf. Eine ausführliche Behandlung des Themas speziell für photosynthetische Systeme findet man in [Den Hollander *et al.* (1983)]. Triplett-Triplett und Singulett-Triplett Annihilationen werden auf Grund der geringen Triplettkonzentration in den Antennen nicht weiter diskutiert.

Dabei geht eines der beiden angeregten Elektronen in den Grundzustand über, während das andere Elektron in einen höher energetischen Singulettzustand S_n angehoben wird, aus dem es wieder durch Relaxation unter Abgabe von thermischer Energie Δ in das erste angeregte Singulettniveau S_1 übergeht:



Dieser Prozeß ist nicht mit einer linearen Differentialgleichung beschreibbar, da die Wahrscheinlichkeit der Annihilation proportional zu n_i^2 (n_i - Anregungsbesetzungsdichte des Chromophores i) ist. Die erweiterte Differentialgleichung für den Zustand i lautet:

$$\frac{dn_i}{dt} = n_0(\lambda)p(t) + \sum_j k_{ij}n_j - n_i(k_a + \sum_j k_{ji}) - \frac{1}{2}\xi n_i^2 \quad (\text{II-5})$$

$n_0(\lambda)p(t)$ – Anregungsfunktion; $\sum k_{ij}n_j$ – Energietransfer benachbarter Chromophore j nach i ;
 $n_i \sum k_{ji}$ – Energietransfer von i zu benachbarten Chromophoren j ; k_a – Deaktivierungsrate von i ;
 ξ – Annihilationskonstante.

Unter Vernachlässigung der Transferterme und unter Annahme einer δ -förmigen Anregung ergibt sich folgende Lösung [Geacintov und Breton (1986)]:

$$n_i(t) = \frac{n_0 \exp(-k_a t)}{\mathbf{x} \frac{n_0}{k_a} \cdot [1 - \exp(-k_a t)] + 1} \quad (\text{II-6})$$

Daraus folgt, daß Kinetiken mit Einflüssen von Annihilation nicht mit gekoppelten linearen Differentialgleichungen beschrieben werden können und damit die Auswertung extrem erschweren. Daher ist es das Ziel, die Anregungsenergie so niedrig zu halten, daß das Auftreten von zwei Anregungen in einem Antennensystem und damit von Annihilationsprozessen zu vernachlässigen sind. Dies stellt wiederum große Anforderungen an das Rauschniveau der benutzten Untersuchungsmethoden, um trotz der geringen Anregungsenergien ein genügend großes Signal/Rausch Verhältnis zu erreichen. Bei der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung stellt dies kein Problem dar, da durch das Meßverfahren intrinsisch nur geringe Anregungsenergien zum Einsatz kommen, bei transienten Absorptionsexperimenten ist die Anregungsenergie aber der limitierende Faktor für die Signalgröße und damit für das Signal/Rausch Verhältnis.

II.1.4 Boltzmanngleichgewicht

Stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gekoppelten Zuständen ein, so sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände durch das Boltzmanngleichgewicht beschrieben. So ergibt sich die Besetzungsverteilung p der Anregung eines Antennensystems nach Äquilibration:

$$p_i = \frac{N_i \exp(-\frac{E_i}{k_B T})}{\sum_{j=1}^n N_j \exp(-\frac{E_j}{k_B T})} \quad (\text{II-7})$$

N_i – Anzahl der energetisch entarteten Chromophore bei der Energie E_i ; $\sum N_j$ – Gesamtanzahl der Chromophore).

Energie- und Ladungstransferreaktionen in photosynthetischen Systemen sind Gleichgewichtsreaktionen zwischen energetisch gleichen oder ähnlichen elektronischen Zuständen. Die Ratenkonstanten k_1 und k_{-1} geben die Übergangswahrscheinlichkeit der Hin- und der Rückreaktion an. Die Zahl der Übergänge ist das Produkt der Übergangswahrscheinlichkeit und der Besetzungsdichte der Zustände. Da bei einer Gleichgewichtsreaktion die Zahl der Übergänge in beiden Richtungen gleich ist, folgt aus der Boltzmannverteilung der Zustandsbesetzung die Gleichung:

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right) \quad (\text{II-8})$$

k_B – Boltzmannkonstante; T – Temperatur.

Aus der Formel ist zu ersehen, daß für $\Delta G \approx k_B T$ die Rückraten die gleichen Größenordnungen haben wie die Vorwärtsraten.

II.2 Grundlegende Bemerkungen zur transienten Absorptionsspektroskopie

Die Transiente Absorptionsspektroskopie untersucht das Absorptionsverhalten angeregter Molekülzustände. Dabei handelt es sich um eine Meßmethode, die nach dem Pump- Probe Prinzip der Blitzphotolyse funktioniert [Norish und Porter (1949), Porter (1950)]. Die zu untersuchende Probe wird mit einem intensiven Pumpuls zum Zeitpunkt $t=0$ in einen angeregten Zustand versetzt. Zu einer definierten Zeit t nach dem Pumpuls wird die Transmission (T_{An}) eines lichtschwächeren Testpulses gemessen und mit der Grundzustandstransmission (T_{Gr}) verglichen. Daraus ergibt sich die Änderung der optischen Dichte $\Delta OD(\lambda, t)$:

$$\Delta OD(I, t) = -\log \frac{T_{An}(I, t)}{T_{Gr}(I)} = OD_{An}(I, t) - OD_{Gr}(I) \quad (\text{II-9})$$

OD_{An} , OD_{Gr} – Optische Dichte des angeregten und des Grundzustandes.

Die optische Dichte ist definiert als $OD = -\log T$ und hängt mit dem Absorptionsquerschnitt σ [cm^2] und dem dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ [$l/(M \cdot \text{cm})$] über das Lambert- Beer- sche Gesetz zusammen:

$$OD(I) = \epsilon(I) \cdot c \cdot d = \frac{1}{\ln 10} \sigma(I) \cdot N \cdot d \quad (\text{II-10})$$

c [M] – Konzentration der Probe; d [cm] – Länge; N [cm^{-3}] – Teilchenzahldichte.

Das Grundzustandsabsorptionsspektrum $S_1 \leftarrow S_0$ eines Moleküls mit einer Besetzungsdichte des Grundzustands $[S_0] = N$ setzt sich wie folgt zusammen

$$OD(I) = \frac{1}{\ln 10} \sum_{i=1}^n \sigma_{S_i \leftarrow S_0}(I) \cdot [S_0] d \quad (\text{II-11})$$

Um die Einflüsse der verschiedenen Beiträge der Absorptionsdifferenzspektren zu verdeutlichen, werden sie an einem einfachen Modell diskutiert, in dem nur die Niveaus S_0 und S_1 populiert werden, d. h. die Lebensdauern aller anderen Niveaus und demnach auch ihre Besetzungsdichten sind sehr klein. Für dieses Modell mit der Gesamtanzahl $N = [S_0] + [S_1]$, in der S_1 durch einen Pumpuls besetzt wird, gilt: nach einer festen Verzögerungszeit Δt nach dem Pumpuls sind die Niveaus S_0 und S_1 mit den Besetzungsdichten $[S_0](t)$ und $[S_1](t)$ okkupiert. Das ΔOD Signal ergibt sich dann aus:

$$\Delta OD(\mathbf{I}, t) = \frac{d}{\ln 10} \left[\begin{array}{l} \sum_{i=1}^{\infty} [S_0](t) \mathbf{s}_{S_i \leftarrow S_0}(\mathbf{I}) + \sum_{i=2}^{\infty} [S_1](t) \mathbf{s}_{S_i \leftarrow S_1}(\mathbf{I}) \\ - [S_1](t) \mathbf{s}_{S_0 \leftarrow S_1}(\mathbf{I}) - \sum_{i=1}^{\infty} ([S_0](t) + [S_1](t)) \mathbf{s}_{S_i \leftarrow S_0}(\mathbf{I}) \end{array} \right] \quad (\text{II-12})$$

Der erste Summand beschreibt die Absorption der noch im Grundzustand S_0 verbliebenen Moleküle. Der zweite Summand stellt die nun mögliche Absorption aus dem S_1 -Zustand in höhere Zustände S_i dar. Die stimulierte Emission aus dem S_1 in den S_0 -Zustand geht negativ ein, da sie das Meßlicht verstärkt. Der letzte Summand ist entsprechend Gleichung (II-9) die abzuziehende Grundzustandsabsorption der nicht angeregten Probe. ΔOD kann zu drei Summanden zusammengefaßt werden:

$$\begin{aligned} \Delta OD(\mathbf{I}, t) &= \frac{d}{\ln 10} [S_1](t) \left[\sum_{i=2}^{\infty} \mathbf{s}_{S_i \leftarrow S_1}(\mathbf{I}) - \mathbf{s}_{S_0 \leftarrow S_1}(\mathbf{I}) - \sum_{i=0}^{\infty} \mathbf{s}_{S_i \leftarrow S_0}(\mathbf{I}) \right] \\ &= \frac{d}{\ln 10} [S_1](t) [\mathbf{s}_{Abs}(\mathbf{I}) - \mathbf{s}_{SE}(\mathbf{I}) - \mathbf{s}_{Gr}(\mathbf{I})] \end{aligned} \quad (\text{II-13})$$

σ_{Abs} – Absorptionsquerschnitt des angeregten Zustands; σ_{SE} – Querschnitt der stimulierten Emission; σ_{Gr} – Absorptionsquerschnitt des Grundzustands.

Die drei Terme stehen für die induzierte (*excited state*) Absorption aus dem angeregten Zustand, der induzierten Verstärkung und der teilweisen Grundzustandsabsorptionssättigung. Da alle drei Prozesse sowohl zeit- als auch spektral abhängig sind, können sie teilweise getrennt werden. Komplexere Absorptionsdifferenzspektren mit n transient besetzten Zuständen X_i lassen sich äquivalent zu dem einfachen Zwei-Niveau-Schema als Summe darstellen:

$$\Delta OD(\mathbf{I}, t) = \frac{d}{\ln 10} \sum_{i=1}^n [X_i](t) [\mathbf{s}_{Abs,i}(\mathbf{I}) - \mathbf{s}_{SE,i}(\mathbf{I}) - \mathbf{s}_{Gr,i}(\mathbf{I})] \quad (\text{II-14})$$

Die einzelnen Summanden werden auch *Species associated difference spectra* (SADS) genannt, da sie spektral spezifisch für einen bestimmten transienten Zustand X_i sind. Diese SADS und die Zeitentwicklung der transienten Zustände X_i , deren kinetische Verknüpfung untereinander oft das Ziel der Auswertung ist, siehe Kapitel über die Datenanalyse.

Es gilt, außer für den ersten angeregten Singulettzustand S_1 , für das Produkt aus der stimulierten Emission und der Besetzungsdichte $\sigma_{SE,i}^* [S_i(t)] = 0$ näherungsweise für alle Zustände. (Ausnahmen ist z. B. die sogenannte S_2 -Fluoreszenz bei einigen Porphyrinen, doch gilt $\sigma_{SE,S_2}^* [S_2(t)] \ll \sigma_{SE,S_1}^* [S_1(t)]$ [Kurabayashi et.al. (1984), Rimke (1996)]). Die Berechnung von σ_{SE,S_1} ist aus dem Fluoreszenzspektrum möglich. Der Einsteinkoeffizient A für die spon-

tane Emission, der die Übergangsrate der Fluoreszenz bestimmt, ist mit dem Einsteinkoeffizienten B für die stimulierte Emission über die Beziehung

$$A = 8\pi h n^3 \left(\frac{n}{c}\right)^3 B \quad (\text{II-15})$$

gekoppelt [Strickler und Berg (1962)]. Umformungen [Hüttmann (1992)] ergeben:

$$s_{SE}(I) = \frac{I^4 n}{8\pi} \cdot \frac{\Phi_{Fl}}{\tau_{Fl}} \frac{g(I)}{\int g(I) dI} \quad (\text{II-16})$$

Φ_{Fl} – Fluoreszenzquantenausbeute; τ_{Fl} – Fluoreszenzlebensdauer; $g(\lambda)$ – normierte Linienform des Fluoreszenzübergangs; n – Brechungsindex, c – Vakuumlichtgeschwindigkeit.

Damit kann der Beitrag der stimulierten Emission an einem Absorptionsdifferenzspektrum oder SADS berechnet werden.

Korrelation der Methoden der transienten Absorption und der zeitaufgelösten Fluoreszenz

Die transiente Absorption ist in ihrem Signal/Rausch Verhältnis limitiert durch die Forderung nach Annihilationsfreiheit der Messung an photosynthetischen Systemen. Andererseits sind nach Gleichung (II-14) sämtliche intermediäre Zustände der Reaktionskinetik, wie die verschiedenen ladungstrennten Zustände oder die Anregung der Antenne, soweit für sie nicht $\sigma_{Abs} - \sigma_{SE} - \sigma_{Gr} = 0$ für den gemessenen Spektralbereich gilt, an $\Delta OD(\lambda, t)$ beteiligt. Die Fluoreszenzkinetik $I(t, \lambda)$, gemessen durch TCSPC, hat durch ihr hohes Signal/Rausch Verhältnis und ihren großen Dynamikbereich sowohl in Zeit als auch in Amplitude⁷ eine größere Auflösung als sie bei den transienten Absorptionsmessungen erreicht werden. Weiterhin sind bei Fluoreszenzzerfallsmessungen nur die Besetzungszustände von strahlenden Niveaus sichtbar, in photosynthetischen Systemen sind dies die Anregungen im S_1 -Zustand, also überwiegend die angeregte Antenne. Energietransferprozesse sind über den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz identifizierbar. Ladungstrennte Zustände können aber nicht direkt beobachtet werden, da sie nicht fluoreszieren. Daher ermöglicht die Kombination der beiden Meßmethoden eine genauere Identifizierung der an der Kinetik beteiligten Zustände und das Aufstellen von kinetischen Modellen. Sie erhöht damit die Zuverlässigkeit der Datenanalyse⁸.

⁷ Siehe Abschnitt III.3.3 und III.4.

⁸ Datenanalyse siehe Abschnitt III.4.