

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

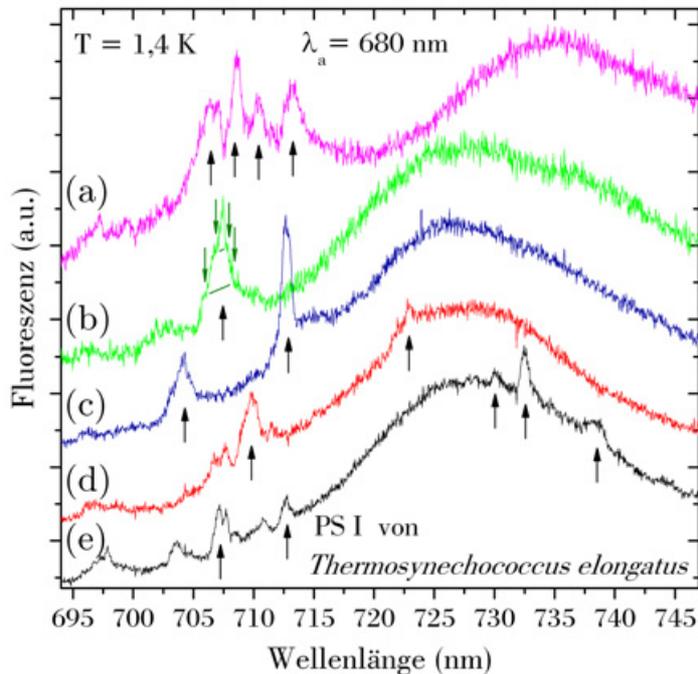


Abbildung 4.1: Einzelmolekül-Spektren individueller PS I-Trimere von *T. elongatus* in der Emission bei tiefer Temperatur. Die Messzeit beträgt jeweils 200 s, außer beim Spektrum (e); seine Messdauer beträgt 400 s. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca.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

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

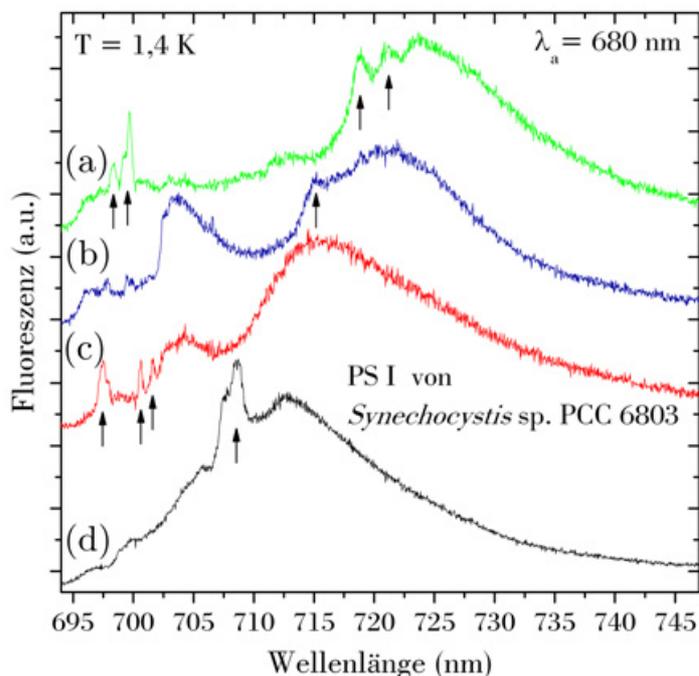


Abbildung 4.2: Einzelmolekül-Spektren individueller PS I-Trimere von *Synechocystis* in der Emission bei tiefer Temperatur. Die Messzeit beträgt jeweils länger als 150 s. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

$\lambda = 727$ 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

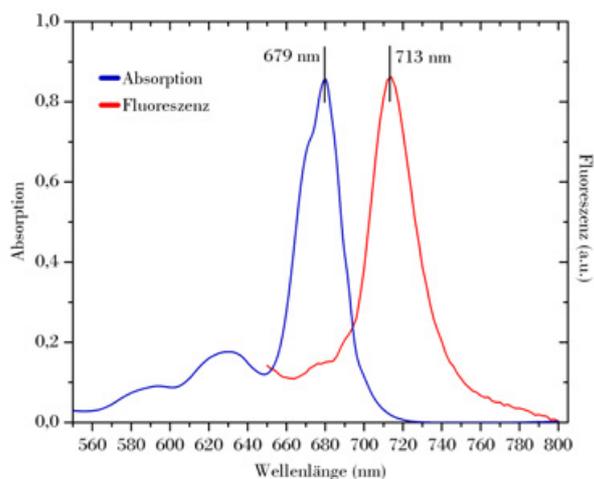


Abbildung 4.3: Ensemble-Spektren vom PS I von *Synechococcus* sp. PCC 7002 bei 77 K. Eingetragen sind in blau die Absorption und in rot die Fluoreszenz, wobei mit 450 nm angeregt wurde. Die Messung stammt von Eberhard Schlodder am Max-Volmer-Laboratorium Berlin.

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

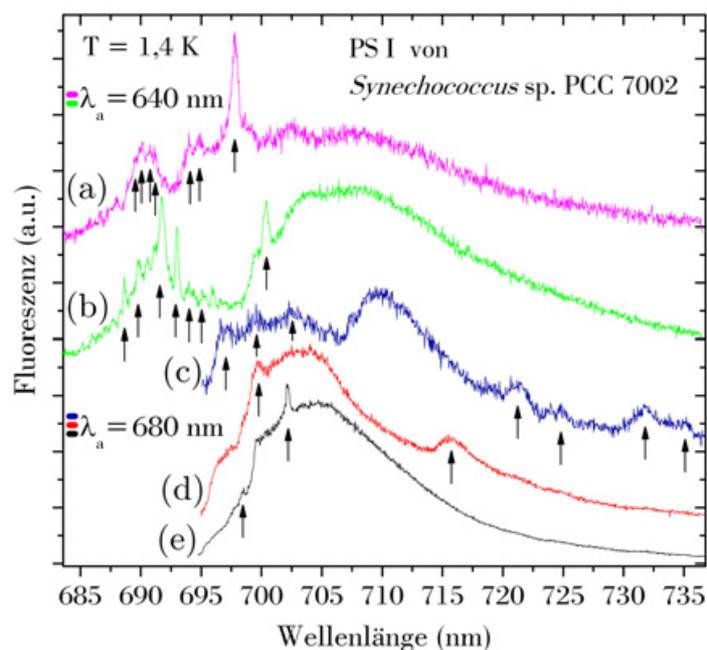


Abbildung 4.4: Einzelmolekül-Spektren individueller PS I-Trimere von *Synechococcus* sp. PCC 7002 in der Emission bei tiefer Temperatur. Die Messzeit beträgt jeweils länger als 150 s. Angeregt wurde bei den Wellenlängen $\lambda_a = 680 \text{ nm}$ und $\lambda_a = 640 \text{ nm}$ mit einer Leistung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

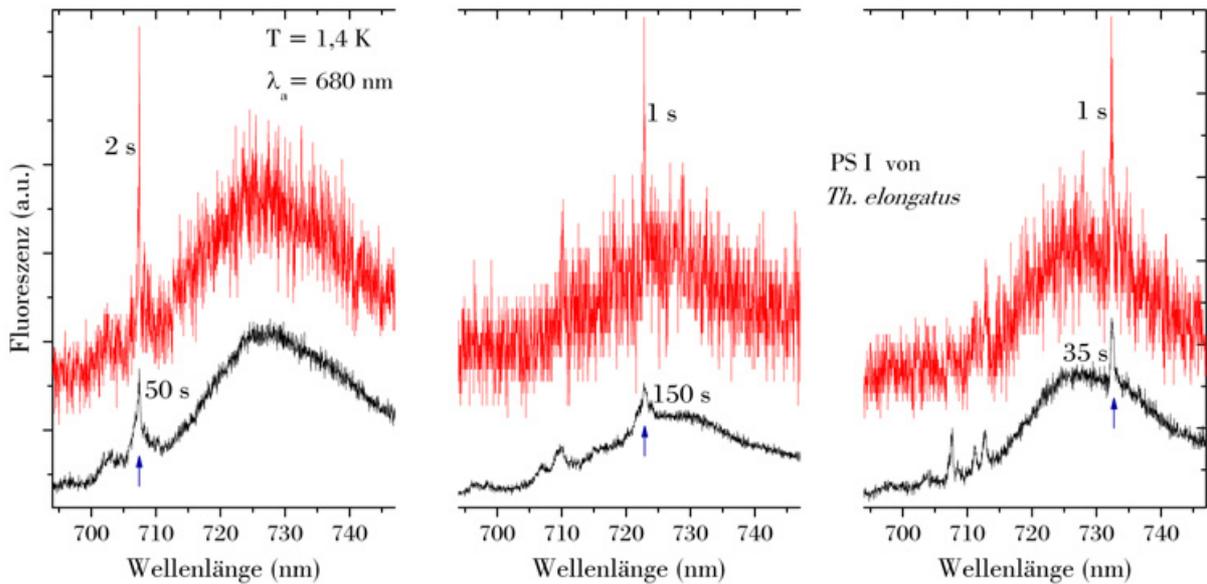


Abbildung 4.5: Abhängigkeit der Einzelmolekül-Emissionsspektren individueller PS I-Komplexe von der Zeit. Die PS I stammen von der Spezies *T. elongatus*. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Die oberen, rot eingefärbten 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

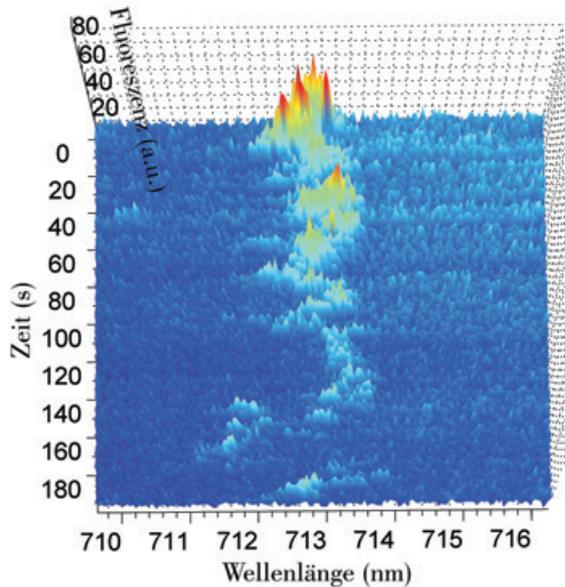


Abbildung 4.6: Spektrale Diffusion einer scharfen Emissionslinie. Gezeigt wird eine Abfolge von Fluoreszenzspektren, die an einem individuellen PS I-Trimer von *T. elongatus* bei 1,4 K aufgenommen wurde. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_a = 680$ nm mit einer Leistung von ca. $3\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$.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

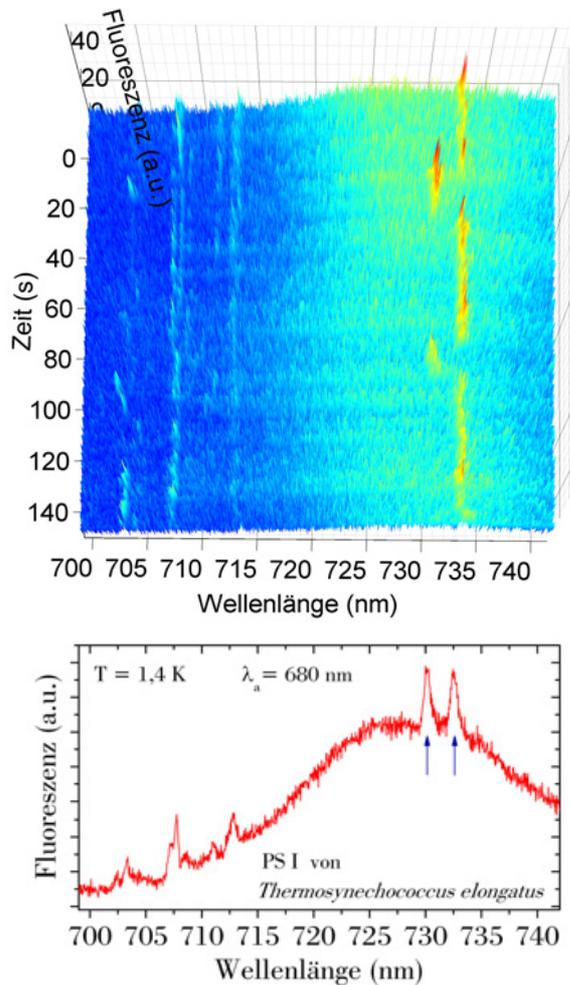


Abbildung 4.7: Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Komplexes von *T. elongatus*. **Oben:** Selektierte Sequenz über 150 Spektren mit einer jeweiligen Akkumulationszeit von $t = 1 \text{ s}$. **Unten:** Zeitliche Projektion der Sequenz darüber. Durch das Aufsummieren der 150 Spektren erhält man ein stationäres 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 $\lambda = 713 \text{ nm}$ bewegt. Ihre Intensität lässt über die Zeit nach. Dieses Verhalten konnte im Spektralbereich $\lambda \leq 716 \text{ nm}$ 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 $t = 1 \text{ s}$. Darunter ist die zeitliche Projektion dargestellt. Das Augenmerk liegt auf den beiden durch die blauen Pfeile markierten scharfen Emissionslinien bei ca. $\lambda = 730 \text{ nm}$ und $\lambda = 732,5 \text{ nm}$. 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

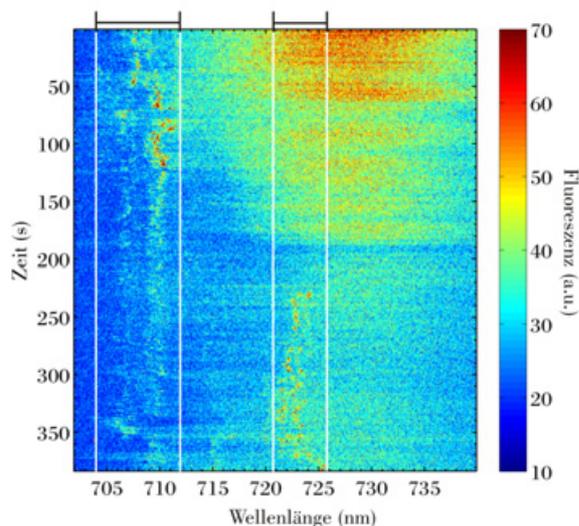


Abbildung 4.8: Bestimmung der spektralen Aufenthaltsbereiche von scharfen Emissionslinien. Die Darstellung illustriert an einem Beispiel, wie die Balken aus Abb. 4.9 ermittelt wurden. Die Spektrensequenz stammt von einem individuellen PS I-Komplex von *T. elongatus*, der in Abb. 4.9 oben links unter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

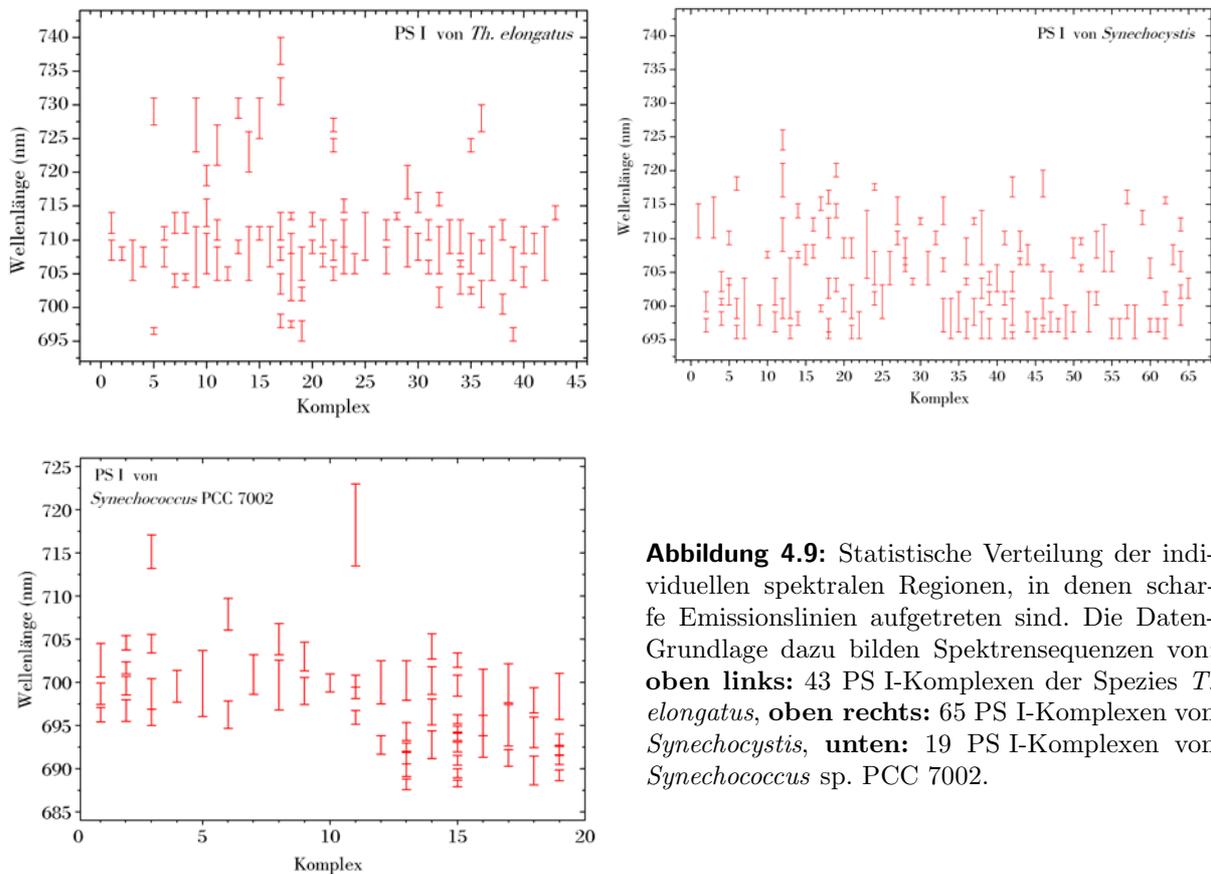


Abbildung 4.9: Statistische Verteilung der individuellen spektralen Regionen, in denen scharfe Emissionslinien aufgetreten sind. Die Daten-Grundlage dazu bilden Spektrensequenzen von: **oben links:** 43 PS I-Komplexen der Spezies *T. elongatus*, **oben rechts:** 65 PS I-Komplexen von *Synechocystis*,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

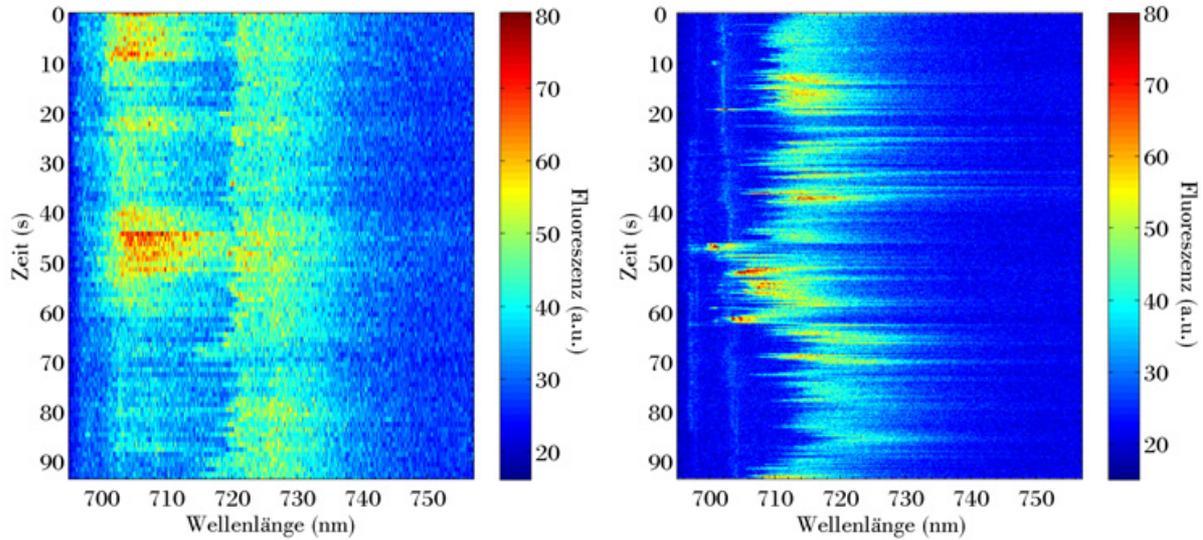


Abbildung 4.10: Fluoreszenzemissionen zweier einzelner PS I-Komplexe von *Synechocystis* in Pufferlösung mit 50 Volumenprozent Glycerin. **Links:** Sequenz über 93 Spektren (Akkumulationszeit $t = 1$ s). **Rechts:** Abfolge über 310 Spektren von einem anderen Komplex (Akkumulationszeit $t = 0,3$ s).

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

4.4 Separation von Fluoreszenzbanden

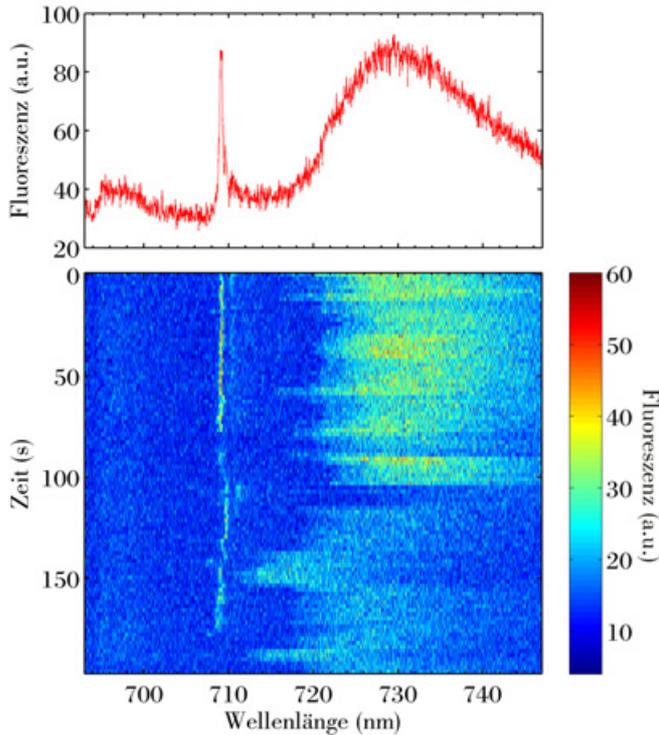


Abbildung 4.11: Fluoreszenz von einem einzelnen PS I-Monomer aus *T. elongatus*. Im **unteren Teil** wird die spektrale Entwicklung in der Zeit in Falschfarbendarstellung gezeigt. Die Auflösung beträgt 2 s für ein Spektrum. **Oben** ist die zeitliche Projektion als Summenspektrum aufgetragen. Man erkennt 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

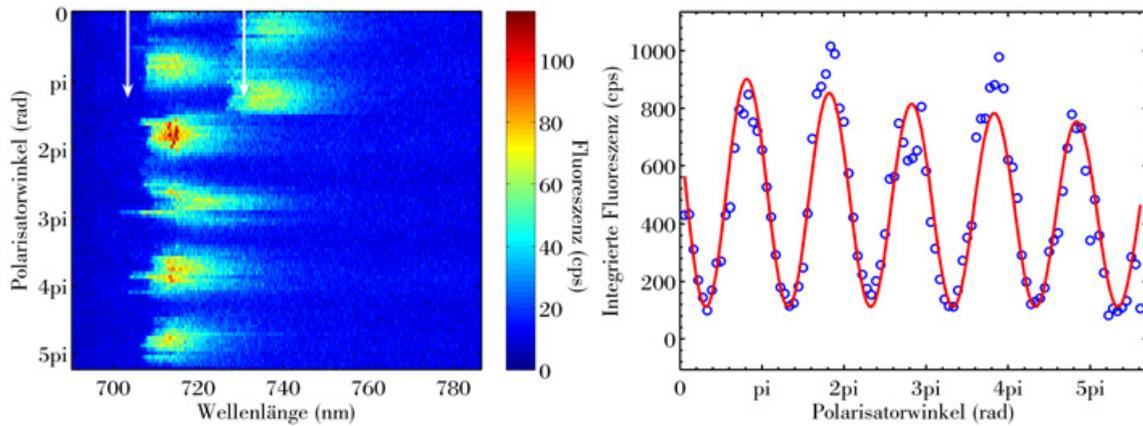


Abbildung 4.12: Links: Polarisations-selektierte Spektrenfolge der Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Monomers von *T. elongatus*. Die Winkelauflösung beträgt 10° . Unter jeder Polarisatorstellung wurde 3 s akkumuliert. Die Messung wird von dem Prozess der zeitlichen spektralen Entwicklung zwangsläufig 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 Emitter 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 Emitter 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

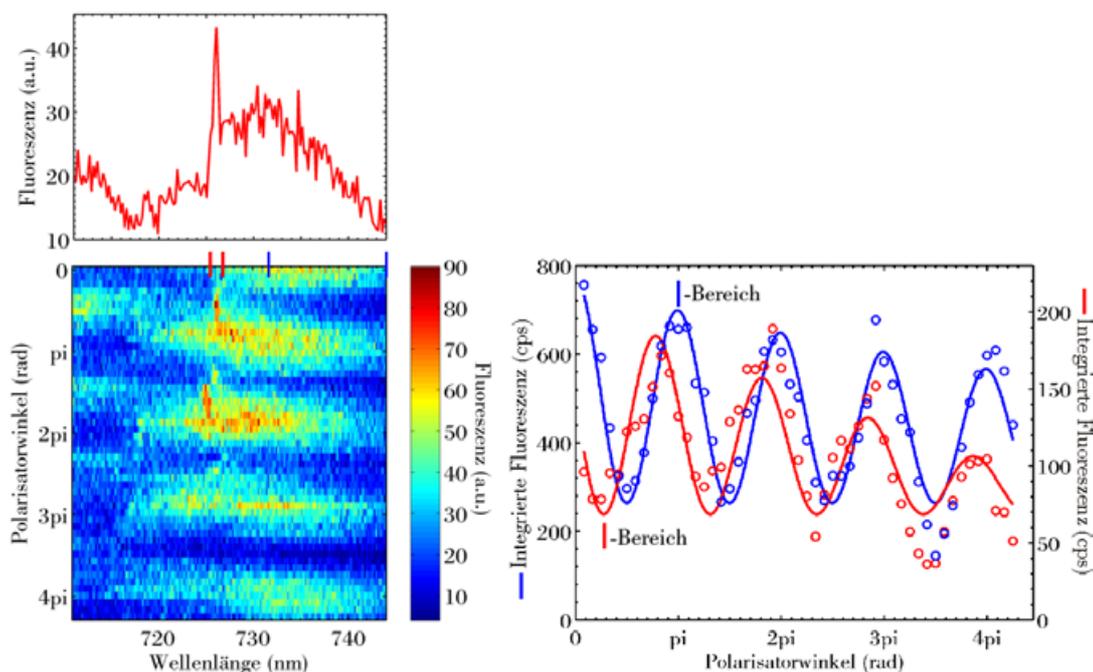


Abbildung 4.13: Fluoreszenz eines individuellen PS I-Monomers von *T. elongatus*. **Oben** wird ein stationäres Spektrum gezeigt, das ohne Polarisator aufgenommen wurde. Die Akkumulationszeit beträgt $t = 7$ s. Im Bild **links unten** ist die zugehörige polarisations-selektierte Spektrenfolge dargestellt. 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-

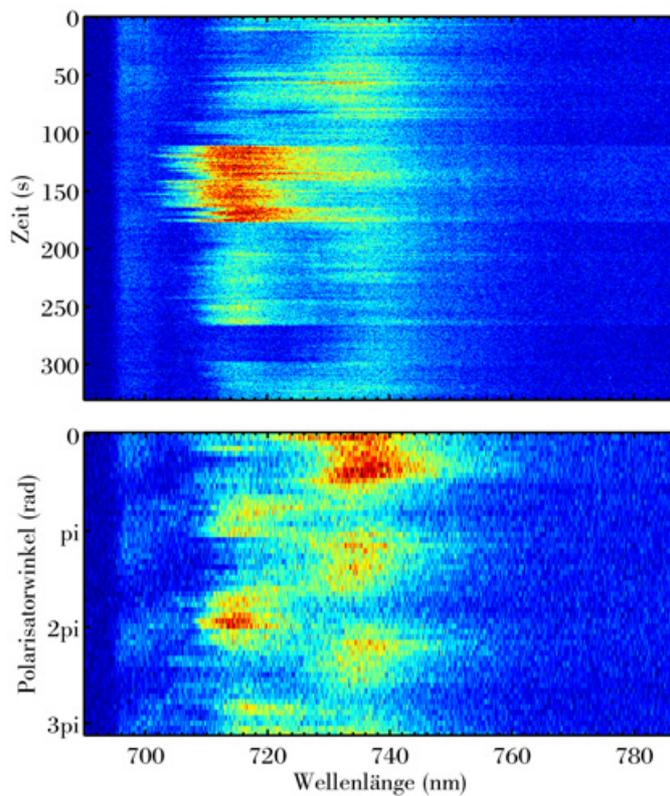


Abbildung 4.14: Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Trimers von *T. elongatus* in Falschfarbendarstellung. **Oben:** Anhand der Abfolge von Spektren lässt sich die spektrale Entwicklung in der Zeit verfolgen. Die Akkumulationszeit per Spektrum beträgt $t = 1$ s. Zusätzlich zur starken spektralen Diffusion 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. $700 \text{ nm} \leq \lambda \leq 720$ nm und die andere über ca. $709 \text{ nm} \leq \lambda \leq 730$ nm. Erstere zeigt im Bereich von $700 \text{ nm} \leq \lambda \leq 704$ nm

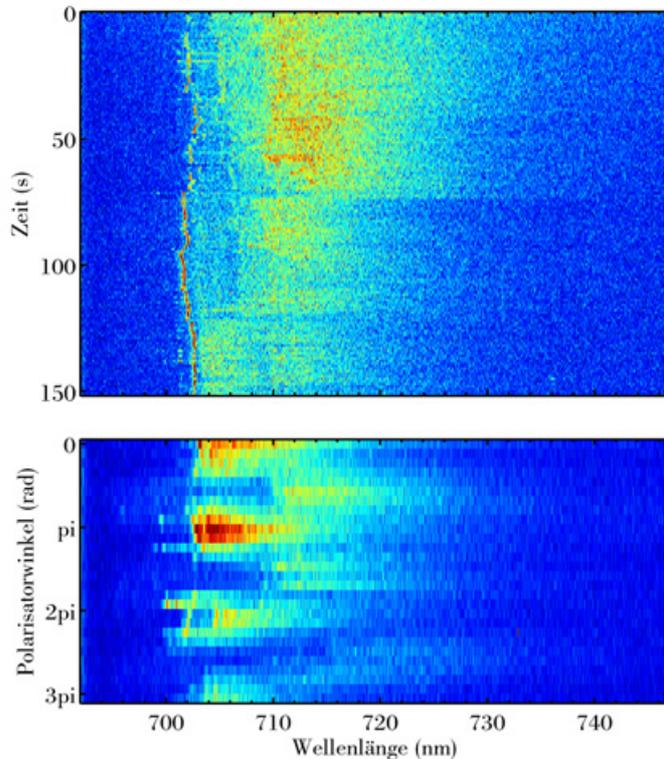


Abbildung 4.15: Fluoreszenz eines einzelnen PS I-Trimers der Spezies *Synechocystis*. **Oben:** Analog zur Abb. 4.14 ist eine Spektrensequenz dargestellt. Die Akkumulationszeit per Spektrum beträgt wieder $t = 1$ s. Nach knapp $t \geq 75$ s bleicht ein Teil der breiten roten Bande, so dass insbesondere ab $\lambda \geq 725$ nm die Intensität bis auf das Grundrauschen abfällt. **Unten:** Gezeigt wird die zugehörige polarisations-selektierte Spektrenfolge, 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

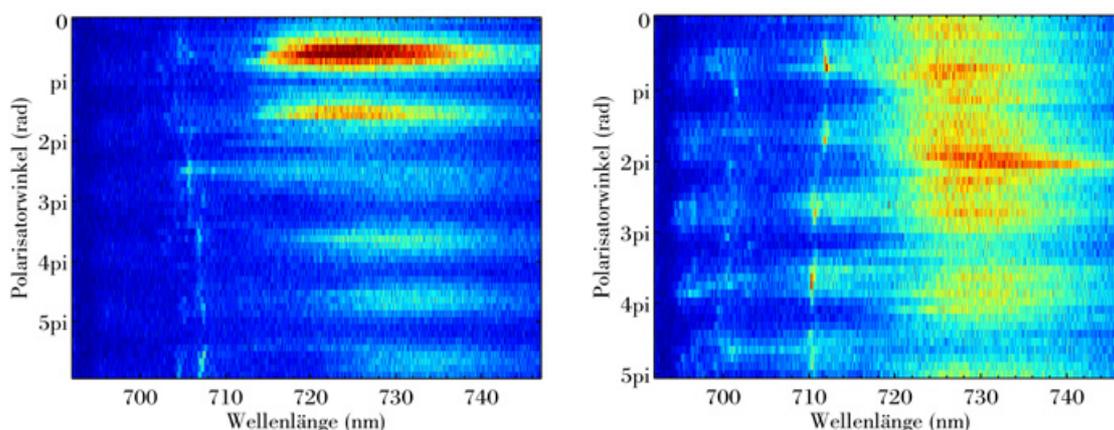


Abbildung 4.16: Polarisations-selektierte Spektrenfolgen der Fluoreszenz zweier PS I-Trimere von *T. elongatus*. Die Winkelauflösung beträgt 10° und unter jeder Polarisatorstellung wurde 3 s akkumuliert. **Links:** Die Modulationstiefe der breiten roten Bande erreicht in etwa das Hintergrundrauschen. Die Polarisationsrichtung aller Strukturen ist im Wesentlichen einheitlich. **Rechts:** Bis nach eineinhalb Polarisatorstellungen 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 Polarisatorstellungen 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

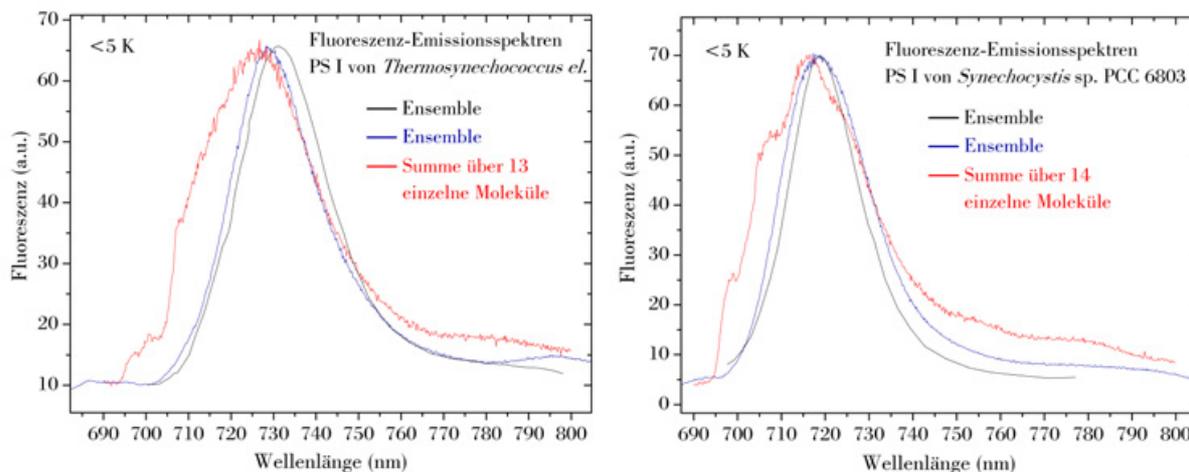


Abbildung 4.17: Fluoreszenzspektren vom cyanobakteriellen Photosystem I. Bei der Darstellung wurde jeweils auf das Maximum normalisiert. **Links:** von *T. elongatus* Trimeren. Die Spektren sind anhand ihrer Linienfarben wie folgt zugeordnet: schwarz: Ensemble-Spektrum aus Pålsson *et al.* (1996) [Pål96], 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 Ab-rastern 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

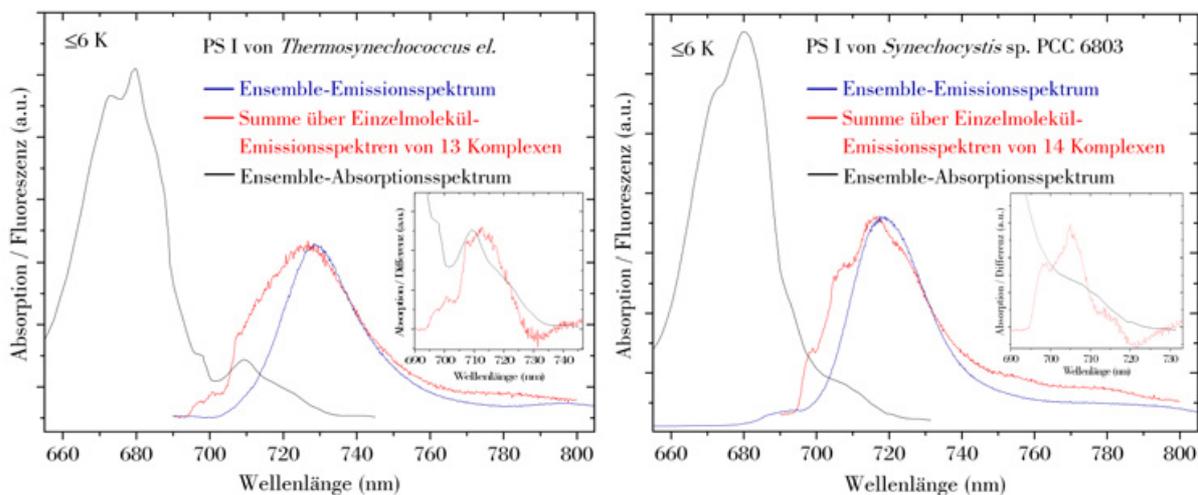


Abbildung 4.18: Emissions- und Absorptionsspektren vom cyanobakteriellen PS I, **links:** von *T. elongatus* und **rechts:** von *Synechocystis*. Die Spektren in roter und blauer Linienfarbe sind erneut die jeweiligen Summen der Einzelmolekül-Emissionsspektren und die ebenfalls von uns gemessenen Ensemble-Emissionsspektren 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} ($\hat{=}$ ~ 10 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 ~ 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} ($\hat{=}$ ~ 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].