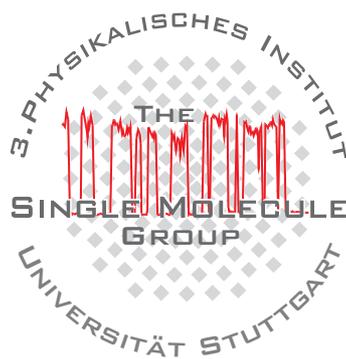


Spektroskopische Untersuchungen an einzelnen Lichtsammelkomplexen des Purpurbakteriums *R. rubrum*

Uwe Gerken



Spektroskopische Untersuchungen an einzelnen Lichtsammelkomplexen des Purpurbakteriums *R. rubrum*

Von der Fakultät Physik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Uwe Gerken
aus Aachen

Hauptberichter:	Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter:	Prof. Dr. Gert Denninger
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Udo Seifert
Tag der mündl. Prüfung:	23.06.2003

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart
2003

Inhaltsverzeichnis

Summary	1
1 Einleitung	7
2 Experimenteller Aufbau und Probenpräparation	9
2.1 Grundlagen der konfokalen Mikroskopie	9
2.2 Experimenteller Aufbau	13
2.2.1 Messungen bei Raumtemperatur	13
2.2.2 Messungen bei tiefen Temperaturen	14
2.2.3 Messung der Autokorrelationsfunktion	16
2.3 Probenpräparation	17
3 Struktur der Photosyntheseeinheit	24
3.1 Allgemeines	24
3.2 Struktur des LH1-Komplexes von <i>R. rubrum</i>	26
3.3 Struktur des RC-LH1-Komplexes von <i>R. rubrum</i>	29
4 Exzitonische Struktur des LH1-Komplexes und Exzitonendynamik	32
4.1 Exzitonen	32
4.1.1 Diagonale Unordnung	37
4.1.2 Elliptische Deformation	40
4.1.3 Quadratische Deformation	44
4.2 Lokalisation der Anregung	46
4.2.1 Kohärenzlänge	46
4.2.2 Polaron-Modell	48
4.3 Proteindynamik und spektrale Diffusion	49

5	Optische Spektroskopie	51
5.1	Fluoreszenzspektren einzelner Komplexe	53
5.1.1	LH1-Komplex	53
5.1.2	RC-LH1-Komplex	61
5.1.3	Zusammenfassung	64
5.2	Fluoreszenz-Anregungsspektren einzelner Komplexe	64
5.2.1	LH1-Komplex	65
5.2.2	RC-LH1-Komplex	69
5.2.3	Zusammenfassung	75
6	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)	76
6.1	Die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$	76
6.1.1	$g^{(2)}(\tau)$ für einzelne Quantensysteme	77
6.1.2	$g^{(2)}(\tau)$ für Diffusionsprozesse	79
6.2	Fluoreszenzdynamik im μs -Bereich: Diffusion in der Membran	82
6.2.1	Das Saffman-Delbrück-Modell	82
6.2.2	Diffusion des LH1-Komplexes	84
6.2.3	Diffusion der Lipide	87
6.2.4	Zusammenfassung	90
6.3	Fluoreszenzdynamik im ns-Bereich: Übergangsraten	91
6.3.1	Zusammenfassung	99
7	Zusammenfassung und Ausblick	101
A	Autokorrelationsfunktion eines 3-Niveau-Systems	104
	Literaturverzeichnis	108

Summary

Spectroscopy on individual light-harvesting complexes from the purple bacterium *R. rubrum*

1. INTRODUCTION

In this work the effect of the environment and the reaction center (RC) upon the geometrical arrangement of the bacteriochlorophyll a (BChla) molecules in the light-harvesting 1 (LH1) complex from *Rhodospirillum (R.) rubrum* has been examined using single molecule spectroscopy. We performed fluorescence spectroscopy as well as fluorescence excitation spectroscopy on single LH1 and RC-LH1 complexes at $T=1.8\text{ K}$ using a home-built confocal microscope. The particular optical properties, resulting from the circular arrangement of the 32 BChla molecules, serve as an extremely sensitive probe for deformation or disorder present in the ring. These properties will be described in the sec. 3.

Individual complexes were studied in two different environments: (1) solubilized in the phospholipid detergent 1,2 diheptanoyl-*sn*-phosphatidylcholine (DHPC) and (2) reconstituted into a membrane bilayer composed of the phospholipid dioleoyl-*rac*-phosphatidylcholine (DOPC). Both types of samples were immobilized on a freshly cleaved mica surface.

For the membrane-reconstituted complexes we determined the lateral diffusion coefficient for the lipids as well as for the LH1 complexes in the DOPC bilayer by using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) at room temperature. With the same technique, we measured non-classical effects like photon antibunching and photon bunching of the fluorescence photons from single complexes at room temperature as well as at $T=1,8\text{ K}$. Both effects open the possibility to study dynamic processes such as the energy transfer from the BChla to the carotinoids at the single molecule level.

2. THE PHOTOSYNTHETIC UNIT

The photosynthetic process in purple bacteria is carried out in photosynthetic units which are located in the inner membrane of the bacterium. The high efficiency of

light capture is mediated by the membrane-bound light-harvesting (LH) complexes, designated as LH1 and LH2. Some purple bacteria produce an additional complex, sometimes designated as LH3. The absorbed light energy is passed from the LH2 to the LH1 complex by ultrafast energy transfer and, subsequently, the energy will be transferred to the reaction center (RC) initiating the charge separation, the first step in the photosynthetic process. The LH complexes are composed of two small non-identical polypeptide chains, α and β , which show significant homologies between different species and bind the pigments bacteriochlorophyll *a* (BChl*a*) or BChl*b* and carotenoids (Car). The membrane-spanning part of the α and β chains possess an α -helix structure. A sketch of the photosynthetic unit from *R. rubrum* is shown in fig. 3.1.

In recent years, the structure of the LH2 complexes of *Rhodospseudomonas (Rps.) acidophila* [McD95] and *R. molischianum* [Koe96] have been elucidated at atomic resolution by X-ray crystallography. Both complexes are assemblies of a basic building block, the $\alpha\beta$ heterodimer, arranged in a ring containing 9 and 8 heterodimers for *Rps. acidophila* and *R. molischianum*, respectively. Each heterodimer contains three BChl*a* and one Car, non-covalently bound to the protein scaffold.

The structure of the LH1 complex is not known at atomic resolution at present time but medium resolution projections at 0.85 nm have been obtained by cryoelectron-microscopy (cryoEM) on 2D crystals of the LH1 complex from *R. rubrum* in the absence [Kar95] and in the presence of the RC [Jam02]. Both projections showed clearly a ring-like symmetry of 32 transmembrane α -helices, assigned to α - and β -polypeptides, analogue to the structural organization of the LH2 complex (see figs. 3.2 and 3.3). Each $\alpha\beta$ heterodimer binds two BChl*a* and one Car molecule. Due to small distances between the BChl*a* molecules of about 1 nm, these pigments presumably are strongly coupled. The projections obtained in the presence of the RC showed also that the RC is located in the center of the LH1 ring. However, studies on RC-LH1 complexes using either cryoEM on 2D crystals [Jam02] and single particles from *R. rubrum* [Sta98] or AFM on natural membranes from *Rps. viridis* [Sch03] revealed also the possibility of elliptical and quadratic distortion of the LH1 complex.

3. EXCITON MODEL

The ring-like arrangement of the BChl*a* molecules and their strong coupling among each others give rise to specific electronic structure and optical properties, respec-

tively. The energy level diagram of the first excited state of the LH1 ring is calculated by using the effective Hamiltonian for Frenkel excitons [Hu97]:

$$\hat{H} = \sum_{n=1}^{32} E_0 |n\rangle \langle n| + \sum_{\substack{n,m=1 \\ n \neq m}}^{32} W_{nm} |n\rangle \langle m|$$

where $|n\rangle$ is the product state of 32 two-level molecules where only the n -th molecule is in the excited state with the energy E_0 and W_{nm} is the coupling strength among the states $|m\rangle$ and $\langle n|$. As the distances between all non-neighbouring BChla molecules are large enough we used the dipole-dipole approximation, the coupling strength is:

$$W_{nm} = C_3 \left(\frac{\vec{d}_n \cdot \vec{d}_m}{r_{nm}^3} - 3 \frac{(\vec{r}_{nm} \cdot \vec{d}_n)(\vec{r}_{nm} \cdot \vec{d}_m)}{r_{nm}^5} \right)$$

The atomic positions were taken from a structural model of the LH1 complex of *R. rubrum* [Aut02] where \vec{d}_n are the unit vectors of the BChla dipole moments corresponding to the Q_y transition and \vec{r}_{nm} are the vectors connecting the Mg atoms of the BChla molecules. The coupling strength of the next but one pigments W_{13} were set to $W_{13} = -102 \text{ cm}^{-1}$. This value was obtained previously for the BChla molecules in the LH2 complex from *R. molischianum* using the collective electronic oscillator approach (CEO) [Tre00]. For the coupling strengths among the intra- and interdimeric pigments the CEO calculation led to values of $\nu_1 = 363 \text{ cm}^{-1}$ and $\nu_2 = 320 \text{ cm}^{-1}$, respectively. Figure 4.2 shows a calculated energy level spectrum of the first excited state of the BChla ring consisting of 32 levels designated as $|k\rangle$ arranged in two so-called exciton bands as a consequence of the dimeric structural organization. In each band all states except the lowest and the highest level are 2-fold degenerate due to the circular arrangement. For the case of perfect circular symmetry, only the lowest degenerated states $|k = \pm 1\rangle$ carry almost all oscillator strength with orthogonal dipole moments whereas the lowest state $|k = 0\rangle$ carries none. This prevents the appearance of fluorescence at low temperature, when only the lowest state is occupied. This disagreement between experimental results ([Ket02] and this work) and the theory is overcome by assuming that the BChla molecules in the ring are distributed with a so-called diagonal disorder σ , which corresponds to the FWHM of a Gaussian distribution of excitation energies about E_0 . The diagonal disorder leads to lifting of the degeneracies and a shift of the oscillator strengths, mainly to the state $|k = 0\rangle$, which is shown for the four lowest states in fig. 4.5 (A)

and (B). This lifting of degeneracies manifests in a splitting (ΔE) of the $|k = \pm 1\rangle$ states in the fluorescence absorption spectrum of a single complex.

The splitting ΔE is also enhanced by a reduction of symmetry of the ring of BChla molecules, which in its simplest form could correspond to an elliptical deformation of the ring, thereby enhancing C_2 -symmetry of the pigments [van99]. The elliptical deformation is characterized by the eccentricity ε :

$$\varepsilon = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$$

where a and b are the major and minor axes of the ellipse, respectively. The effect of ellipticity upon the energy levels and the oscillator strengths is shown for the four lowest states in fig. 4.9 (A) and (B).

4. RESULTS

Fluorescence emission spectra of single complexes. For both, membrane-reconstituted and detergent-solubilized LH1 and RC-LH1 complexes, the fluorescence spectra showed the same properties including a predominantly linear polarization of the fluorescence light. Despite the fact that excitation was performed at 865 nm, corresponding to the absorption maximum of the special pair, no spectral features are visible in the fluorescence spectra of the RC-LH1 complexes which differ from those obtained for LH1 complexes alone.

Some spectra showed a sharp zero phonon line (ZPL) on the short wavelength edge followed by a broad phonon side band (PSB). In other spectra the ZPL could not be resolved because it is merged with the PSB (see figs. 5.3 and 5.9). The maximum of the distribution of the spectral position of the ZPL or the blue edges, respectively, is in the region of 900 nm (for both type of samples) as shown in figs. 5.5 and 5.10. The appearance of low temperature fluorescence emission indicates that a distortion of the BChla ring must be present.

Fluorescence excitation spectra of single LH1 complexes. Excitation spectra were obtained by stepwise scanning the linear polarized laser over the region of the $|k = \pm 1\rangle$ absorption bands detecting simultaneously the fluorescence at each step. To determine a possible splitting of the states $|k = \pm 1\rangle$, a series of spectra was recorded, where the polarization was turned by 30° between consecutive scans.

Fig. 5.11 shows four typical fluorescence excitation spectra of the $|k = \pm 1\rangle$ states

for detergent solubilized (A,B) as well as for membrane-reconstituted LH1 complexes (C,D). The spectra measured with orthogonal polarization of the exciting light are shown in red and blue, respectively. Approximately 70% of all membrane-reconstituted complexes exhibited comparable excitation spectra consisting of one broad absorption band between 860 and 900 nm. Its spectral position showed no dependence upon the polarization of the exciting light (fig. 5.11 (C)). These spectra could be simulated by considering only a moderate diagonal disorder of $\sigma = 150 \text{ cm}^{-1}$. Thus, the membrane-reconstituted complexes show predominantly a radial symmetry. In contrast to this, the excitation spectra of detergent-solubilized complexes in many cases consisted of two separate bands, which were linearly polarized and orthogonal to each other (fig. 5.11 (A,B)). We determined splittings ΔE between these bands up to 300 cm^{-1} . To simulate such large splittings an elliptical distortion of the BChla ring had to be taken into account in addition to a diagonal disorder. The experimentally observed splittings of the states $|k = \pm 1\rangle$ are shown in fig. 5.13. The results show that the membrane environment is essential for conservation of the circular arrangement of the LH1 ring.

Fluorescence excitation spectra of single RC-LH1 complexes. The excitation spectra for single RC-LH1 complexes were obtained as described before. Fig. 5.14 (A-D) shows four typical excitation spectra of the $|k = \pm 1\rangle$ states for membrane-embedded as well as for detergent-solubilized RC-LH1 complexes. Independent of the environment of the complexes, their excitation spectra showed similar behaviour. Nearly 70% of all investigated membrane-reconstituted and 90% of all detergent-solubilized complexes, exhibited a single broad absorption band with a peak maximum around 880 nm. The other complexes showed two separate, linearly polarized bands with orthogonal polarization. The splittings of these bands were in the range of $\Delta E = 30-85 \text{ cm}^{-1}$. The observed splittings of the $|k = \pm 1\rangle$ states for both type of samples are compatible with a diagonal disorder of $\sigma \leq 150 \text{ cm}^{-1}$. These data show unambiguously that the circular symmetry of the LH1 complex from *R. rubrum* is stabilized by the interaction with the RC.

Fluorescence correlation spectroscopy. The diffusion coefficients for lateral diffusion of lipids as well as for the LH1 complex in DOPC membranes were measured at room temperature on immobilized membranes placed in a home-built liquid cell. The measured fluorescence autocorrelation function $g^{(2)}(\tau)$ was fitted using the standard autocorrelation function for 2-dimensional diffusion (eqn. 6.5) to determine the diffusion coefficient D .

Autocorrelation functions from diffusing LH1 complexes in DOPC membranes were recorded using the autofluorescence of the complex itself as a fluorescent label and we obtained a mean value of $\overline{D} = 4,9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ (fig. 6.6) for this process. With this value the membrane microviscosity could be estimated to $\eta \approx 7 \text{ P}$ using the Saffman–Delbrück model [Saf75].

For measuring the lipid diffusion coefficient we used the rhodamine B–labeled lipid phosphatidylethanolamine (RhoB–PE) as a fluorescent probe in the DOPC membrane. The result were two sets of diffusion coefficients with mean values of $\overline{D} = 1,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ and $\overline{D} = 1,5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectively (fig. 6.12). Whereas the higher value of both corresponds the lipid diffusion (expected value $\sim 1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$) we assigned the lower value to the diffusion of a LH1 complex attached to RhoB–PE molecules.

Measurements of the autocorrelation function on a ns–timescale demonstrated the non–classical effects of photon antibunching and photon bunching for pigment protein complexes. These experiments were done with single membrane-embedded LH1 complexes at $T=1,8 \text{ K}$ (fig. 6.16) as well as with detergent–solubilized complexes in a buffer solution at room temperature (fig. 6.19). The autocorrelation functions for both samples showed comparable rising and decay times for the antibunching and bunching term, respectively, and could be fitted with a function calculated for a 3–level–system as shown in fig. 6.14. The calculated parameters, the energy transfer rate and the fluorescence rate, are in good agreement with previously published values deduced from time–resolved bulk experiments.

Kapitel 1

Einleitung

Im Jahre 1989 gelangen den Arbeitsgruppen von M. Orrit [Orr90] und W. Moerner [Moe89] unabhängig voneinander der optische Nachweis einzelner Pentazen-Moleküle in *p*-Terphenyl. Ein Jahr später wies die Gruppe von R.A. Keller einzelne Moleküle in Flüssigkeit nach [She90]. Das daraus hervorgegangene wissenschaftliche Gebiet der Einzelmolekülspektroskopie hat sich seitdem rasant entwickelt. Es wurden immer neue Anwendungsbereiche, auch abseits der Physik, gefunden. Beginnend mit der Untersuchung einzelner in Matrizen eingebetteter Chromophore bei tiefen Temperaturen werden die Methoden der Einzelmolekülspektroskopie mittlerweile auch dazu benutzt, um biologische Systeme sowie Vorgänge in lebenden Zellen zu untersuchen. Durch die Möglichkeit des gezielten Arbeitens mit einzelnen Quantensystemen wird die Einzelmolekülspektroskopie auch auf dem sehr modernen Gebiet der Quantenkryptographie und des Quantencomputings eingesetzt.

Die Einzelmolekülspektroskopie erlaubt den Zugang zu atomaren bzw. molekularen Parametern, die an einem Ensemble nicht meßbar sind, da sie durch den Mittelungsprozeß verschwinden würden. So lassen sich z. B. die Quanteneigenschaften Photonantibunching [Bas92] und Photonbunching [Ber93] der Fluoreszenzphotonen einzelner Moleküle mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) nachweisen. Durch die Anwendung der ODMR-Technik auf einzelne Moleküle wurden ebenfalls auch schon einzelne Spins nachgewiesen [Wra93] [Kö93]. Messungen von „klassischen“ Eigenschaften wie den Polarisations-eigenschaften der Absorption und Emission lassen bei entsprechender Probenpräparation Schlüsse auf die Orientierung des Dipols im Molekül zu [Sic00].

Durch den Einsatz hochempfindlicher und rauscharmer CCD-Kameras in Verbindung mit Weitfeld-Mikroskopieverfahren ist es weiterhin möglich geworden, Bewe-

gungen einzelner Moleküle zu beobachten, sowie Prozesse in lebenden Zellen direkt zu verfolgen. Zu den wohl spektakulärsten Ergebnissen, die mit dieser Methode erzielt wurden, zählen dabei der Nachweis der schrittweisen Drehung der F_1 -ATPase um 120° [Noj97] durch die Arbeitsgruppe von K. Kinosita und das Beobachten des Eindringens eines Virus in eine menschliche Zelle [Sei01] durch die Gruppe von W. Bräuchle.

Eine Übersicht über die Methoden der Einzelmolekülspektroskopie sowie die Ergebnisse von Experimenten bei tiefen Temperaturen sind in einem Übersichtsartikel von Ph. Tamarat *et al.* [Tam00] sowie in einem Lehrbuch von Th. Basché *et al.* [Bas97] zusammengefaßt.

In dieser Arbeit wird der Lichtsammelkomplex LH1 sowie der Kernkomplex RC-LH1 des Purpurbakteriums *Rhodospirillum (R.) rubrum* untersucht. Der LH1-Komplex ist ein ringförmiger Pigment-Protein-Komplex, der 32 stark gekoppelte Bakteriochlorophyll *a* Moleküle enthält. Die starke Kopplung führt zur Ausbildung exzitoner Zustände, die sehr empfindlich auf Störungen energetischer und struktureller Art reagieren.

Das Spektrum des ersten angeregten Zustandes wird theoretisch berechnet und der Einfluß von Störungen auf die Lage der Energieniveaus simuliert. Experimentell wird die Lage der exzitonen Zustände mit polarisationsabhängiger Anregungsspektroskopie bei tiefen Temperaturen untersucht, um Informationen über eventuelle Störungen des LH1-Komplexes zu erhalten. Diese Art von Untersuchungen am LH1-Komplex [Ket02] von sowie an dem strukturell ähnlichen LH2-Komplex von *Rhodopseudomonas acidophila* [van99] [Ket01] [Mat01] wurden bereits in der Arbeitsgruppe von J. Köhler durchgeführt, wobei die Komplexe in einer Polymermatrix immobilisiert waren. In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal LH1-Komplexe in künstlichen, der natürlichen Umgebung der Komplexe ähnlichen Lipiddoppelschichten untersucht.

Weiterhin werden mit FCS die Diffusionskonstanten des Lichtsammelkomplexes und der Lipide in der Membran bestimmt und Messungen des Photon-Antibunching an einzelnen Lichtsammelkomplexen bei Raumtemperatur sowie bei $T=1,8\text{ K}$ präsentiert.

Kapitel 2

Experimenteller Aufbau und Probenpräparation

2.1 Grundlagen der konfokalen Mikroskopie

Um die Abbildungseigenschaften von Lichtmikroskopen zu verbessern, wurde 1957 von Marvin Minsky das Prinzip des konfokalen Mikroskops vorgeschlagen. Die Idee dabei ist, die Probe punktförmig zu beleuchten und allein das Licht aus dem Beleuchtungsvolumen auf einen Detektor ebenfalls punktförmig abzubilden und Licht, das von außerhalb des eigentlichen Beleuchtungsvolumens kommt, durch eine Lochblende (*Pinhole*) abzublocken.

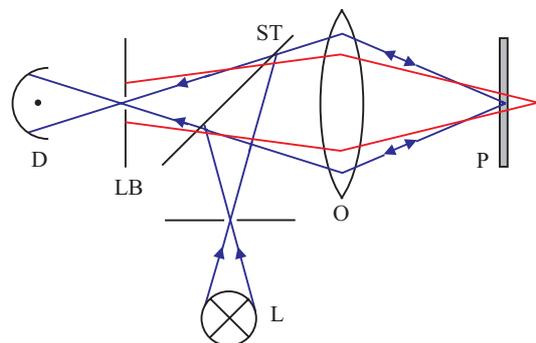


Abbildung 2.1: Prinzipieller Aufbau eines konfokalen Mikroskopes. D Detektor, LB Lochblende, O Objektiv, ST Strahlteiler, L Lichtquelle, P Proben- und Fokalebene. Nur Licht aus der Proben-ebene P (blaue Linie) gelangt auf den Detektor D, Licht von einer dahinter liegenden Ebene (rote Linie) wird durch die Lochblende LB unterdrückt.

Der optische Aufbau eines konfokalen Mikroskopes ist in Abb. 2.1 gezeigt. Das Licht aus einer punktförmigen Lichtquelle wird durch das Mikroskopobjektiv auf die Probe fokussiert. Der Fokus bildet das sog. Anregungsvolumen. Das von der Probe aus diesem Anregungsvolumen zurückgestreute Licht wird von demselben Objektiv eingesammelt und auf die Lochblende abgebildet, hinter der sich der Detektor befindet. Lichtstrahlen, die von außerhalb der Brennebene herkommen (Streulicht), werden durch das Objektiv nicht auf die Lochblende fokussiert, sondern haben ihre Brennpunkte hinter bzw. vor der Lochblende. Durch die richtige Wahl der Linse und des Durchmessers der Lochblende kann dieses Streulicht effektiv unterdrückt werden. Um ein vollständiges Bild zu erhalten, ist es wegen der punktförmigen Beleuchtung bzw. Detektion notwendig, die Probe abzurastern. Mit diesem konfokalen Rastermikroskop ist es z.B. möglich, optische Schnitte transparenter Proben anzufertigen (siehe Abb. 2.2) und sie anschließend zu 3D-Bildern zusammenzusetzen.

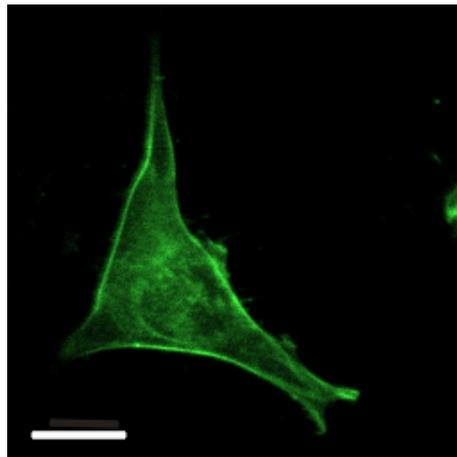


Abbildung 2.2: Konfokale Aufnahme einer angefärbten HeLa-Zelle (*cervix carcinom*). Die Färbung mit Rhodamin-Phalloidin ist spezifisch für Actin, so daß nur die Actin-Filamente des Cytoskeletts fluoreszieren. Skalierungsbalken $20\ \mu\text{m}$.

Das laterale Auflösungsvermögen wird i. allg. durch das Rayleigh-Kriterium definiert. Dieses Kriterium besagt für ein konventionelles Mikroskop (Fernfeldmikroskop), daß zwei Punkte gleicher Helligkeit als aufgelöst betrachtet werden, wenn das Maximum der Abbildungsfunktion des einen Punktes in das erste Minimum der Abbildungsfunktion des anderen Punktes fällt. Das entspricht einem Intensitätsabfall von 26% im Minimum zwischen den beiden Maxima. Die Abbildungsfunktion (auch *point-spread-function* PSF) einer Linse bzw. eines Mikroskopobjektives ist durch die Airy-Funktion

$$p(\rho) = 2J_1^2(\rho)/\rho^2 \quad (2.1)$$

gegeben. Dabei steht J_1 für die sphärische Besselfunktion erster Ordnung und ρ für den generalisierten Radius

$$\rho = \frac{2\pi r}{\lambda} \cdot \text{NA} , \quad (2.2)$$

wobei NA die numerische Apertur des optischen Systems darstellt und r für den Abstand zur optischen Achse steht. Die Airy-Funktion (2.1) ist in Abb. 2.3 (A) dargestellt. Das laterale Auflösungsvermögen Δr eines konventionellen Mikroskopes ergibt sich damit zu

$$\Delta r = 0,61 \frac{\lambda}{\text{NA}} . \quad (2.3)$$

Aufgrund des speziellen Aufbaus eines konfokalen Mikroskopes, d.h. punktförmige Anregung und Detektion, hat die PSF für den konfokalen Fall die Form [Web97]

$$p_{\text{conf}}(\rho) = p(\rho) \times p(\rho) , \quad (2.4)$$

und ist in Abb.2.3 (B) dargestellt. Im Vergleich zur PSF in (2.1) führt das Quadrieren zu einem steileren Anstieg der Funktion und zu einem schnelleren Abfall der Nebenmaxima. Der 26%-ige Abfall im Minimum ergibt sich nun schon bei kleineren Abständen. Das laterale Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskopes bestimmt sich zu

$$\Delta r_{\text{conf}} = 0,44 \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (2.5)$$

und ist damit geringer als im konventionellen Fall.

In axialer Richtung hat die PSF im konfokalen Fall die Form

$$p(\zeta) = \left(\frac{\sin \frac{\zeta}{4}}{\frac{\zeta}{4}} \right)^2 , \quad (2.6)$$

mit der generalisierten z-Richtung

$$\zeta = \frac{2\pi z}{\lambda n} \cdot \text{NA}^2 . \quad (2.7)$$

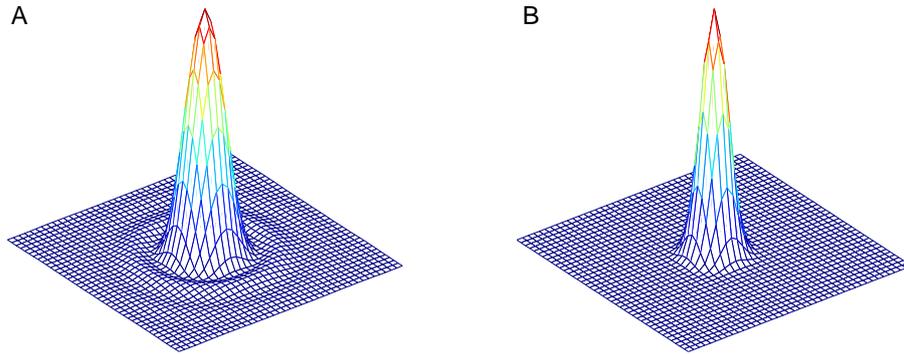


Abbildung 2.3: Abbildungsfunktionen (PSF) für (A) ein konventionelles und für (B) ein konfokales Mikroskop. Beide Funktionen sind normiert.

Mit demselben Kriterium wie bei der lateralen Auflösung bekommt man für die axiale Auflösung Δz_{conf} den Ausdruck

$$\Delta z_{\text{conf}} = 1,5 \frac{\lambda n}{\text{NA}^2} \quad (2.8)$$

der ungefähr von derselben Größe ist wie die laterale Auflösung (2.5). Erst mit dem axialen Auflösungsvermögen zeigt sich der echte Vorteil eines konfokalen Mikroskopes gegenüber einem konventionellen.

Streng genommen gelten die Ableitungen des konfokalen Auflösungsvermögens nur für den Fall kleiner NA, aber die sich daraus ergebenden Unterschiede in den numerischen Werten für das Auflösungsvermögen sind nur gering [Web97]. Die Theorie und Funktion konfokaler Mikroskope wird äußerst umfassend im *Handbook of Biological Confocal Microscopy* [Paw91] behandelt.

Die Lochblende eines konfokalen Mikroskopes sollte so gewählt werden, daß möglichst viel Signal auf den Detektor gelangt, aber das Streulicht dennoch effektiv unterdrückt wird. Bei einer Gesamtvergrößerung V des Mikroskopes ist es ein guter Kompromiß, den Radius der Lochblende gleich

$$R_{\text{pinhole}} = 0,61 \frac{\lambda}{\text{NA}} V \quad (2.9)$$

zu setzen. Das ist der Radius der Abbildungsfunktion (2.4) bis zu ihrer ersten Nullstelle am Ort der Lochblende. So wird erreicht, daß das zentrale Maximum und somit 98% der Intensität auf den Detektor gelangt. Wie man aus Abb. 2.1 erkennt, bestimmt die Größe der Lochblende zusätzlich die axiale Ausdehnung des Volumens in der Probenebene, aus dem noch Licht auf den Detektor gelangen

kann (Nachweisvolumen). Eine Verringerung des Nachweisvolumens kann z.B. für die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) von Nutzen sein. Durch die Verwendung von hochaperturigen Objektiven in Verbindung mit kleinen Lochblendendurchmessern läßt sich das Volumen aufgrund von Beugungseffekten nicht beliebig verkleinern. Eine Abschätzung besagt, daß die axiale Ausdehnung des Fokus eines konfokalen Mikroskopes nicht kleiner als $1\ \mu\text{m}$ werden kann [Rig93]. Durch Anwendung des STED (*stimulated emission depletion*)–Konzeptes ist es der Arbeitsgruppe von S.W. Hell allerdings gelungen, das Anregungsvolumen eines konfokalen Mikroskopes deutlich zu verkleinern. Mit dieser Technik läßt sich, verglichen mit einem herkömmlichen konfokalen Mikroskop, ein 18–fach kleineres Fokalvolumen erhalten [Hel00].

Die Observable der Einzelmolekülspektroskopie ist die Fluoreszenz der Moleküle. Aufgrund des geringen Fokalvolumens des konfokalen Aufbaus in der Größenordnung von $1\text{p}\ell$ kann die unerwünschte Hintergrundemission (Fluoreszenz, Raman–Streuung etc.) der Umgebungsmoleküle klein gehalten werden. Deshalb ist das konfokale Mikroskop das Standardwerkzeug für den Nachweis einzelner Moleküle. Weiterhin begrenzt die punktförmige Anregung eine vorzeitige Zerstörung der Proben durch photochemische Prozesse. Die hohe axiale Auflösung ermöglicht ebenfalls die Untersuchung von räumlich ausgedehnten Proben wie z. B. lebenden Zellen oder Farbzentren in Kristallen.

2.2 Experimenteller Aufbau

2.2.1 Messungen bei Raumtemperatur

Für Untersuchungen an einzelnen Molekülen bei Raumtemperatur wurde ein selbstgebautes konfokales Mikroskop verwendet. Sein prinzipieller Aufbau ist in Abb.2.4 dargestellt.

Die Probe ist dabei auf einem 3D-Scanner (P 517.3, Physik Instrumente) befestigt, der es erlaubt, einen Bereich von $100\times 100\times 10\ \mu\text{m}^3$ abzurastern (*sample-scanning*). Die Beleuchtung der Probe erfolgt epiaxial über einen unbeschichteten Strahlteiler, der ca. 10% des Anregungslichtes in das Objektiv ($100\times/\text{NA } 1,3$ Öl, Olympus) reflektiert, die Fluoreszenz der Probe wird so kaum abgeschwächt, bevor sie auf den Filter gelangt. Dieser dient dazu, die eigentliche Fluoreszenz von dem auf der Probe reflektierten Anregungslicht zu trennen. Als Filter wurden holographi-

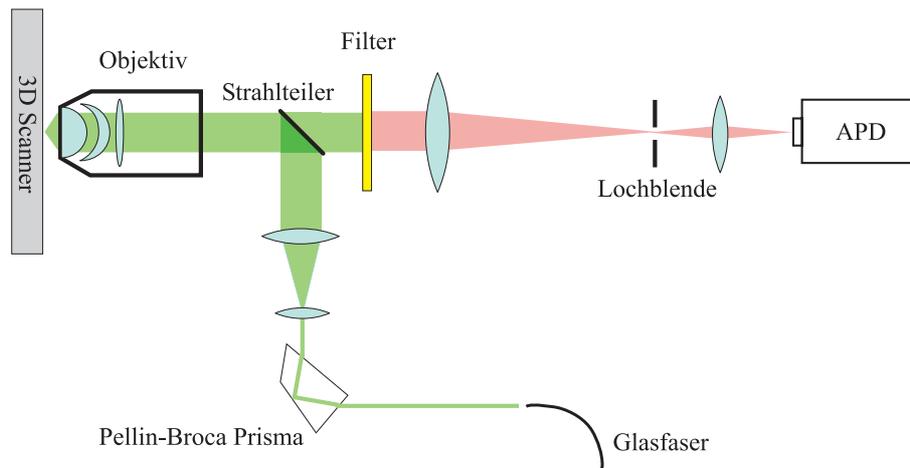


Abbildung 2.4: Aufbau des konfokalen Mikroskopes für Messungen bei Raumtemperatur.

sche Notch-Filter (Kaiser Optical Systems) sowie Bandpassfilter (Omega) verwendet. Der Nachweis der Fluoreszenz erfolgt mit einer Avalanche Photodiode (APD, EG&G SPCM-AQ 200), die eine Nachweisempfindlichkeit von bis zu 70% im roten Spektralbereich besitzt.

Als Lichtquelle für die Anregung des LH1-Komplexes wurde ein, von einem Ar^+ -Laser (Coherent, Innova 300 multi-line VIS) gepumpter Ti:Saphir-Laser (Spectra Physics, 3900-S) verwendet. Der Ti:Saphir-Laser konnte mittels eines Lyot-Filters über einen Wellenlängenbereich von 780–920 nm durchgestimmt werden. Die Linienbreite des Lasers beträgt nach Herstellerangaben $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$. Der Farbstoff RhodaminB (s. Kap. 6.1.2) wurde mit der 514 nm Linie des Ar^+ -Laser angeregt.

Das Licht wurde mittels polarisationserhaltenden Glasfasern und den entsprechenden Ein- und Auskoppereinheiten (Newport) zu dem Versuchsaufbau geleitet. Nach dem Auskoppler passiert der Strahl ein Pellin-Broca-Prisma [McC73], um das Anregungslicht von unerwünschter Fluoreszenz aus dem Laser und der Faser zu trennen.

2.2.2 Messungen bei tiefen Temperaturen

Der Aufbau für Messungen bei tiefen Temperaturen (siehe Abb. 2.5) gleicht prinzipiell mit dem in Kap. 2.2.1 beschriebenen Aufbau für Messungen bei Raumtemperatur [Tie01]. Die Probe und das Objektiv ($63\times/0,85$ Melles-Griot) befinden sich jedoch im Kryostaten (He-Badkryostat, Janis), was den Einsatz von Piezoelementen für das Abrastern erschwert.

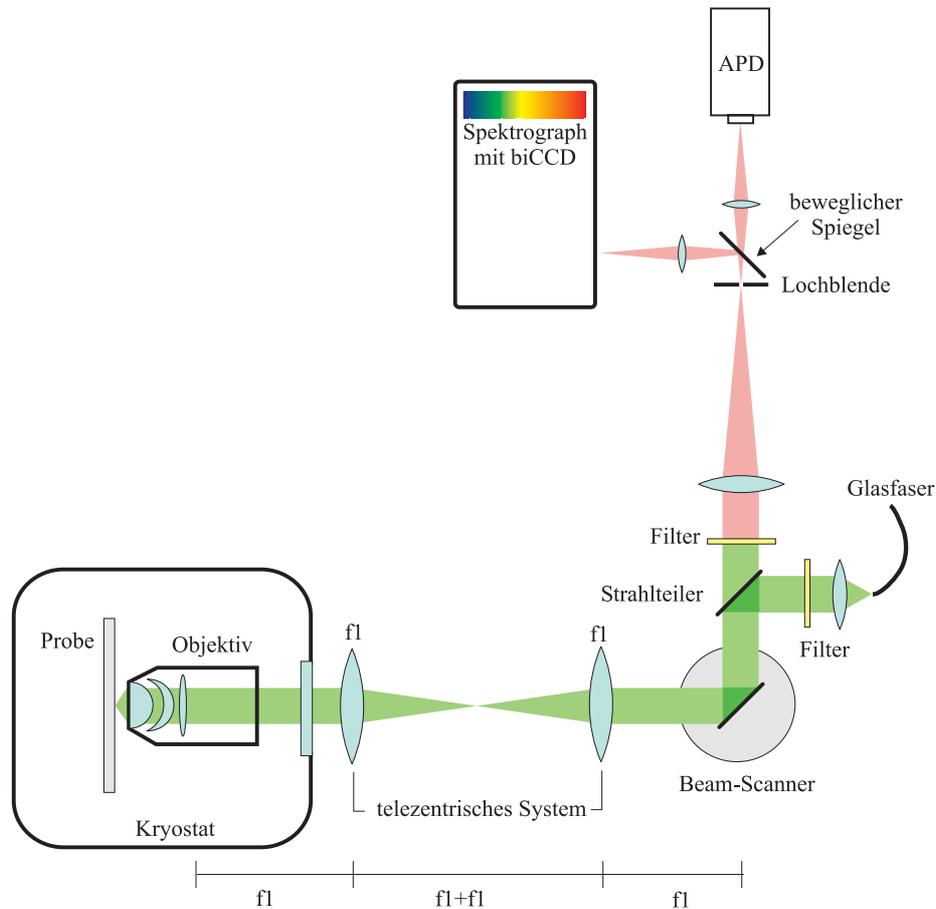


Abbildung 2.5: Aufbau des konfokalen Mikroskopes für Messungen bei tiefen Temperaturen. Die für das *beam-scanning* relevanten Abstände des Linsensystems (Brennweiten jeweils f_1) sind eingezeichnet.

Als Rastermethode wird bei diesem Aufbau deshalb das sog. *beam-scanning* verwendet. Dabei wird der Anregungsstrahl im hinteren Brennpunkt eines telezentrischen Linsensystems (siehe Abb. 2.5) aus der optischen Achse ausgelenkt. Durch das Linsensystem wird nun erreicht, daß der Strahl das Objektiv, das sich im vorderen Brennpunkt befindet, nicht mehr senkrecht durchleuchtet. Durch die Verkipfung wandert nun der Fokus des Objektivs über die Probe. Die Auslenkung des Strahls am Ort des Objektivs ist dabei proportional zur Auslenkung im vorderen Brennpunkt und wird durch die Vergrößerung des Linsensystems festgelegt [Ame97]. Die Auslenkung des Strahls erfolgt über zwei auf Galvo-Scannern (GSI Lumonics) befestigten Spiegeln. Die kontrollierte Verkipfung der Spiegel ermöglicht so das Abrastern der Probe. Mit dem hier benutzten Aufbau ist es möglich, eine Fläche von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ abzurastern. Über den Probenhalter, der es erlaubt den Abstand

zwischen Probe und Objektiv mit μm -Genauigkeit zu verändern, erfolgt die Fokussierung.

Auf der Nachweisseite befindet sich zusätzlich zur APD ein Gitterspektrograph (Acton Research, SP-275) dessen Eintrittsspalt über einen Spiegel beleuchtet werden kann. Der Spektrograph besitzt eine LN_2 gekühlte CCD-Kamera (Spec10:400BR, Roper Scientific), die es aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit ($\geq 90\%$ bei 550 nm) und geringen Dunkelzählrate ($\sim 1 \frac{\text{count}}{\text{h-pixel}}$) ermöglicht, Spektren einzelner Moleküle aufzunehmen.

Als Anregungslichtquelle steht dasselbe Lasersystem wie für die Messungen bei Raumtemperatur zur Verfügung.

2.2.3 Messung der Autokorrelationsfunktion

Mit beiden, in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Aufbauten wurden auch Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen (s. Kap. 6.1) gemessen. Die Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktion ist das normierte Histogramm der Zeitdifferenzen $\tau = t_1 - t_2$ detektierter Photonenpaare (normierte Koinzidenzrate).

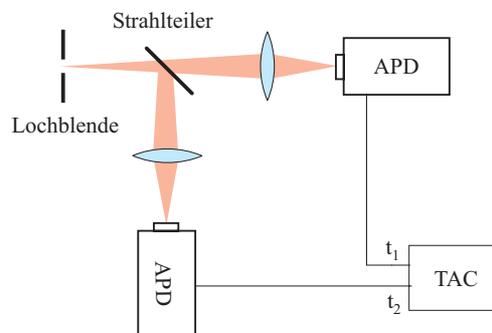


Abbildung 2.6: 2-Detektor-Aufbau zur Messung der Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktion.

Wegen der Pulsbreiten der verwendeten Photodetektoren von ca. 30 ns und Totzeiten von ca. 40 ns ist es nicht möglich, mit nur einem Detektor Zeitdifferenzen im ns-Bereich zu messen. Um dennoch Korrelationen in diesem Zeitbereich aufnehmen zu können, wurde ein 2-Detektor-Aufbau (*Hanbury-Brown & Twiss Set-up*) verwendet (s. Abb. 2.2.3). Dabei wurden die jeweiligen Aufbauten um einen Detektor erweitert und das Licht nach der Lochblende über einen 50:50-Strahlteiler auf die beiden Detektoren verteilt.

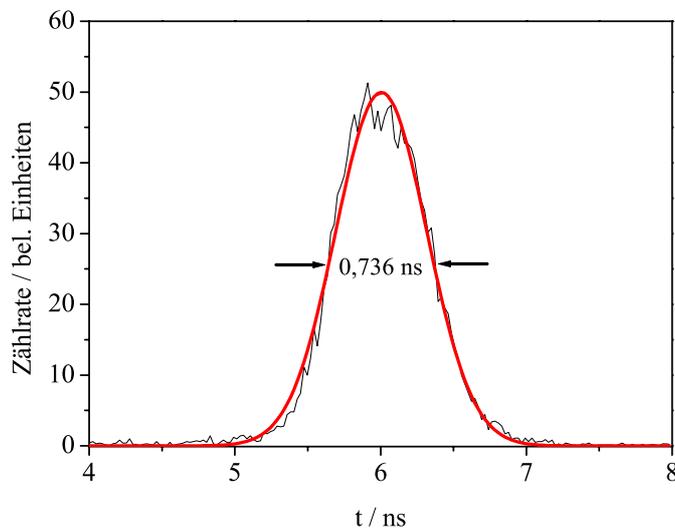


Abbildung 2.7: Gemessene Antwortfunktion (schwarze Kurve) des 2-Detektor-Aufbaus und deren Anpassung mit einer Gauss-Kurve (rote Kurve). Die volle Halbwertsbreite der Gauss-Kurve beträgt 0,736 ns.

Die Zeitdifferenz τ der Signale beider Photodetektoren wurde mit einer *Time-to-Amplitude-Converter* (TAC)-Einheit (Becker & Hickl, SPC-630) bestimmt und die Koinzidenzrate der Photonen von der Software der TAC-Einheit berechnet. Das zeitliche Auflösungsvermögen ist durch die Antwortfunktion des Aufbaus bestimmt. Diese wurde mit Hilfe eines gepulsten Lasers (Coherent, Mira 900 F) mit fs-Pulsbreite bestimmt und ist in Abb. 2.7 dargestellt. Die gemessene Funktion entspricht einer Gauss-Kurve mit einer vollen Halbwertsbreite von 0,736 ns.

Die Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen im μs bis ms-Bereich wurde aus dem Signal nur eines Photodetektors mit einem Hardwarekorrelator (ALV Lasertriebssgesellschaft mbH, ALV-5000) bestimmt. Die Zeitaufösung des Korrelators liegt nach Herstellerangaben bei 200 ns.

Alle hier präsentierten Messungen wurden mit Hilfe von Origin[®] (OriginLab Corp.) Version 6.1 ausgewertet.

2.3 Probenpräparation

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Robin Ghosh (Biologisches Institut der Universität Stuttgart, Abt. Bioenergetik) hergestellt. Die Isolierung und Aufreinigung der LH1 und der RC-LH1-Komplexe sind in [Gho93], [Bra01] bzw. [Sta98] beschrieben. Bei dem LH1-Komplex handelte

es sich um den Lichtsammelkomplex des Carotinoid-Mutanten *Rhodospirillum (R.) rubrum* ST4 [Kom98]. Gegenüber dem Carotinoid des Wildtyps (Spirilloxanthin) weist das Carotinoid dieses Mutanten zwei Doppelbindungen weniger auf (3, 4, 3', 4'-Tetrahydrospirilloxanthin). Das führt zu einer Rotverschiebung der Absorptionsbande des Carotinoids um ca. 25 nm (s. Abb.2.9). Der Kernkomplex hingegen stammt vom Wildtyp *R. rubrum* S1.

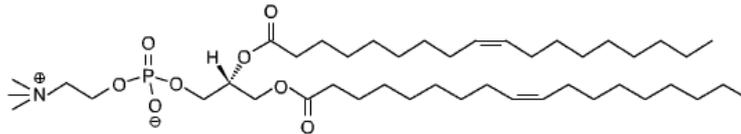


Abbildung 2.8: DOPC-Struktur. Der Lipidkopf bestehend aus der negativ geladenen Phosphatidyl- und der positiv geladenen Cholingruppe ist ein Zwitterion.

In dieser Arbeit wurden Messungen an den Lichtsammelkomplexen in zwei verschiedenen Umgebungen durchgeführt: (i) Detergens-solubilisiert mit dem als Detergens wirkenden Phospholipid 1,2-Diheptonaoyl-*sn*-Phosphatidylcholin (DHPC) und (ii) rekonstituiert in Vesikel aus Dioleoyl-*rac*-Phosphatidylcholin (DOPC), dessen Struktur in Abb. 2.8 gezeigt ist. Die Phasenübergangstemperatur von DOPC liegt bei $T_c = -20^\circ\text{C}$ [Jos82]. Dies stellt sicher, daß sich die Membran bei der Probenpräparation bei Raumtemperatur in der flüssigkristallinen Phase befindet. Die DOPC-Membran ähnelt so der natürlichen Membranumgebung der Lichtsammelkomplexe im Bakterium.

Nach jeder neuen Isolation wurde die Qualität, d.h. die Integrität der LH1-Komplexe, anhand eines Absorptionsspektrums überprüft. Wären neben intakten Komplexen auch komplett oder teilweise dissoziierte Komplexe vorhanden, so würde sich das in einem zusätzlichen Absorptionsmaximum bei 820 nm bemerkbar machen [Gho88] [Bra01]. Diese Bande entsteht durch die Absorption der bei der Dissoziation des Komplexes entstehenden Untereinheiten. Diese auch als B820-Komplexe bezeichneten Untereinheiten bestehen wahrscheinlich aus zwei Polypeptidketten, α und β , und zwei BChla-Molekülen. Ob es sich bei diesen Komplexen um die in Kap. 3.2, Abb. 3.2 beschriebenen $\alpha\beta$ -Untereinheiten handelt, ist zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion. Abbildung 2.9 zeigt Absorptionsspektren für Detergens-solubilisierte LH1 und RC-LH1-Komplexe bei Raumtemperatur. Man erkennt die starke als Q_y bezeichnete und die schwächere als Q_x bezeichnete Absorption der BChla-Moleküle bei ungefähr 880 nm bzw. 575 nm sowie die Absorptionsbanden der Carotinoide. Zusätz-

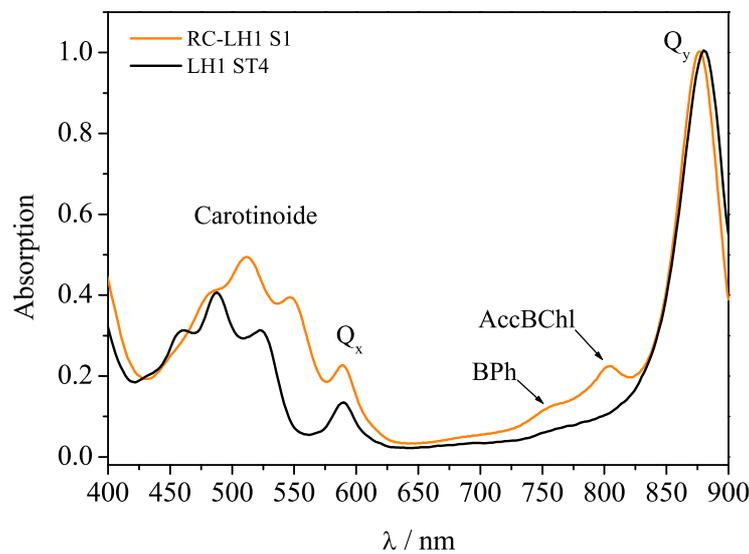


Abbildung 2.9: Normierte Absorptionsspektren für Detergens-solubilisierete (siehe Text) LH1 und RC-LH1-Komplexe bei $T=300\text{K}$. Die Q_y und die Q_x -Banden der Chlorophyllringe sind gekennzeichnet, ebenso die Carotinoidbanden. Zusätzlich sieht man im Spektrum des Kernkomplexes eine vom Reaktionszentrum stammende Bande des Bakteriopheophytins (BPh) und eine der *accessory chlorophylls* (AccBChl). Die Absorption des *special pair* liegt bei 880 nm unterhalb der Q_y -Bande [Ber00].

lich sind im Spektrum des Kernkomplexes noch die Absorptionen der Pigmente des Reaktionszentrums sichtbar.

Um die LH1-Komplexe zu solubilisieren, wurden $4\ \mu\text{l}$ einer Lösung bestehend aus $0,32\text{ mg}$ Protein auf 1 ml Wasser in $968\ \mu\text{l}$ Pufferlösung, 50 mM NH_4HCO_3 , $\text{pH}=8$, (50NC), und $34\ \mu\text{l}$ $2,5\%$ -iger DHPC-Lösung gelöst. Dies entspricht einer Detergenkonzentration von $0,085\%$. Es wurde dieses spezielle Detergens gewählt, da sich gezeigt hat, daß DHPC den Komplex in seiner Gesamtheit löst und sich kein nennenswerter Anteil an dissoziiertem LH1 bildet [Sta98]. Die hohe Detergenkonzentration soll sicherstellen, daß alle Komplexe vereinzelt vorliegen. Für die Messungen an dem RC-LH1 Komplex wurde anstatt 50NC8 eine Pufferlösung aus 10 mM Tris, 200 mM NaCl , 3 mM MgCl und 2 mM DHPC (entsprechend einer Detergenkonzentration von $0,096\%$) gewählt.

Für die Einzelmolekülmessungen wurden die Lösungen nochmals ca. 100 -fach mit den entsprechenden Puffern verdünnt und ca. $100\ \mu\text{l}$ auf eine frisch abgezogene Glimmeroberfläche (Kaliumaluminium-Silikat, Goodfellow) einer Größe von ca. $5\times 5\text{ mm}^2$ pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von ein paar Sekunden wurde der Glimmer dann

mit $3\ \mu\text{l}$ frischer Pufferlösung abgespült. Mit dieser Immobilisierungsmethode ließen sich für die Einzelmolekülspektroskopie geeignete Proben herstellen.

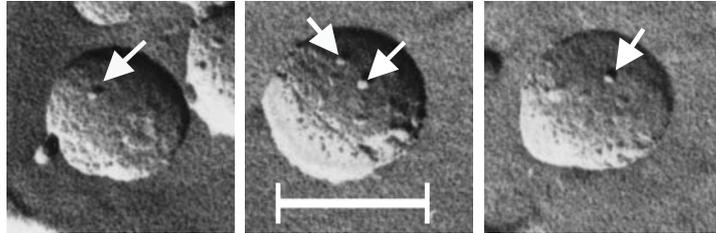


Abbildung 2.10: Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahme von rekonstituierten LH1-Komplexen (Pfeile). Die Komplexe sind deutlich voneinander getrennt und zeigen keine Aggregation. Das molare Verhältnis betrug 1 LH/400 DOPC. Skalierungsbalken 200 nm.

Die Präparation der Vesikel und die Rekonstitution der Proteine sind in [Ger03a] bzw. [Sta98] beschrieben und sollen hier nicht näher ausgeführt werden. Man erhielt nach der Rekonstitution uni-lamellare, im Durchmesser wenige hundert Nanometer große Vesikel, die die Lichtsammelkomplexe in einem molaren Protein/Lipid-Verhältnis von ungefähr 1 LH1/64000 DOPC enthalten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vesikeln mit einem Protein/Lipid-Verhältnis von 1 LH1/400 DOPC (s. Abb.2.10) zeigen bereits, daß die Komplexe vereinzelt vorliegen und keine Aggregation zeigen. Daraus läßt sich schließen, daß die Wahrscheinlichkeit, mehr als einen Komplex pro Vesikel zu finden für die in dieser Arbeit verwendeten Proben gering ist.

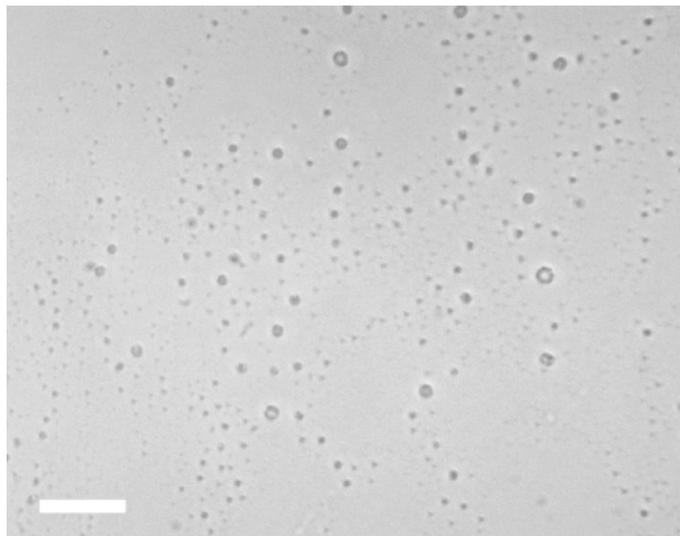


Abbildung 2.11: Lichtmikroskopische Aufnahme auf Glimmer immobilisierter Vesikel (Skalierungsbalken $10\ \mu\text{m}$).

Die Immobilisierung der Vesikel erfolgte mit der bereits für die Detergens-solubilierten Proteine beschriebenen Methode auf Glimmer. Aufgrund der zwitterionischen Kopfgruppe des Lipids DOPC haften die Vesikel auf der frisch abgezogenen und somit negativ geladenen Glimmeroberfläche. Abbildung 2.11 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme einer auf Glimmer immobilisierten Vesikelprobe. Die Vesikel sind deutlich als blasenartige Gebilde unterschiedlicher Größe zu erkennen. Die aus dieser Aufnahme ermittelte Größenverteilung ist in Abb. 2.12 gezeigt. Das dazu benutzte Verfahren ist in [Gö01] beschrieben. Man erkennt aus der Verteilung, daß die Mehrzahl der Vesikel Durchmesser von ≤ 600 nm besitzen. Aufgrund des Auflösungsvermögens eines Lichtmikroskops von ca. 250 nm wurden alle Vesikel mit dieser oder einer geringeren Größe als ungefähr gleich groß bestimmt. Da es sich bei Vesikeln um transparente und somit für ein Lichtmikroskop kontrastschwache Objekte handelt, bleiben Vesikle mit einer deutlich geringeren Größe als die geschätzten 275 nm unsichtbar. Dies erklärt, daß die in Abb. 2.12 gezeigte Verteilung bei 250 nm abbricht.

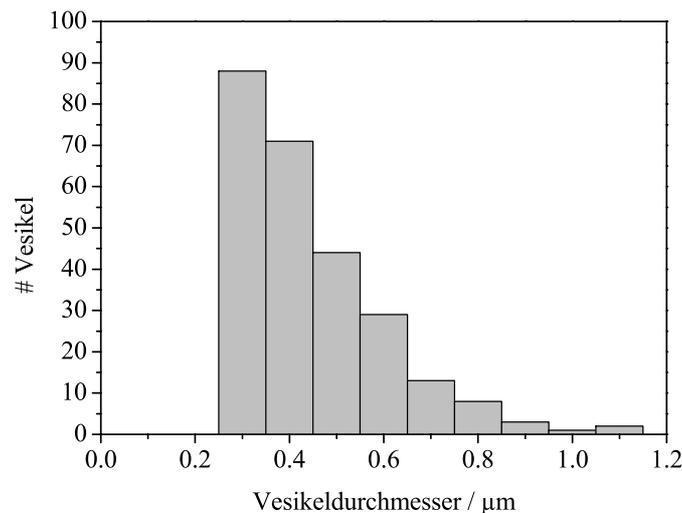


Abbildung 2.12: Größenverteilung der Durchmesser der in Abb.2.11 gezeigten immobilisierten Vesikel.

Für die Tieftemperaturmessungen wurden die auf Glimmer immobilisierten Proben sofort nach der Präparation in den kalten Kryostaten ($T \leq 77$ K) überführt. Dieses schnelle Einfrieren soll sicherstellen, daß die Phospholipidmembran nicht in die Gelphase (L_β) überführt wird [Par84]. Stattdessen wird erwartet, daß man eine Momentaufnahme der ungeordneten flüssigkristallinen Phase erhält.

Für die Messung der Diffusionskoeffizienten in Kap. 6.2 wurden Farbstoff-markierte Lipide in die Membran eingebracht. Als Fluoreszenzmarker wurden dabei Rho-

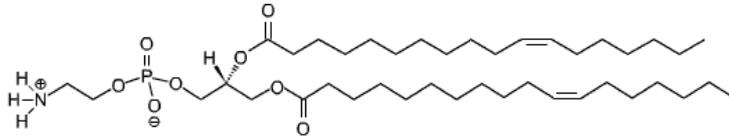


Abbildung 2.13: Struktur des *E.coli*-PE. Die Unterschiede zu dem in Abb. 2.8 gezeigten DOPC sind die unterschiedlichen Positionen der Doppelbindungen der Kohlenwasserstoffketten sowie die Aminogruppe am Lipidkopf.

daminB-Isothiocyanat (RhoB-ITC, Sigma) markierte Lipide aus der Zellmembran des Bakteriums *Escherichia (E.) coli* verwendet. Das Lipid wurde dazu in der AG von Prof. Ghosh isoliert. Dieses Lipid ist dem DOPC sehr ähnlich (s. Abb. 2.13) und wird im weiteren wegen seiner Phosphatidylethanolamin (PE)-Gruppe nur noch als PE bezeichnet. Der Farbstoff RhoB ist über seine Isothiocyanatgruppe kovalent an die Aminogruppe des *E. coli*-PE gebunden und befindet sich daher außerhalb der Membranebene.

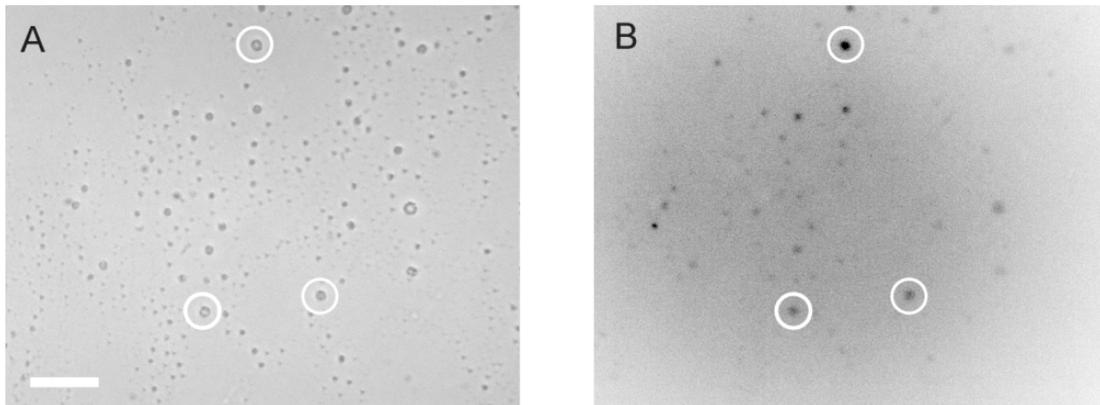


Abbildung 2.14: Aufnahme mit einem Lichtmikroskop von auf Glimmer immobilisierten RhoB-markierten Vesikeln. (A) Durchlichtaufnahme (Skalierungsbalken $10\ \mu\text{m}$) und (B) Fluoreszenzbild (Negativ) desselben Bereiches. Zur besseren Orientierung sind auf beiden Bildern jeweils drei Vesikel markiert (Kreis).

Mit dieser Präparationsmethode ist es nicht möglich, alle erhaltenen Vesikel gleichmäßig zu markieren. Abbildung 2.14 (A) zeigt immobilisierte, RhoB-markierte Vesikel in einer Durchlichtaufnahme und (B) denselben Bildausschnitt als Fluoreszenzbild. Man erkennt deutlich, daß nicht alle in (A) sichtbaren Vesikel auch eine entsprechende Fluoreszenz in (B) zeigen. Ebenfalls ist die Intensität, d.h. die Schwärzung, der einzelnen Punkte in Bild (B) unterschiedlich. Die Messungen der

Proben bei Raumtemperatur wurden in einer selbstgebauten Flüssigkeitszelle [Gö01] durchgeführt, in der die Proben von Puffer umgeben waren. Zur Herabsetzung des Sauerstoffgehalts im Puffer, um somit das Photobleichen zu reduzieren, wurden der Lösung die Enzyme Glukoseoxidase (GO), Katalase (KA) sowie Glukose zugesetzt. Auf 1 ml Puffer kamen dabei 15 μl einer Lösung von 50 mg GO in 1 ml Puffer, 30 μl einer Lösung von 1 mg KA in 1 ml Puffer sowie 0,8 μl 0,3 M Glukose. Die Enzyme und die Glukose waren Produkte des Sigma–Aldrich GmbH.

Kapitel 3

Struktur der Photosyntheseeinheit

3.1 Allgemeines

Die photosynthetischen Membranen von Purpurbakterien enthalten i. allg. drei unterschiedliche Lichtsammelkomplexe: die beiden Komplexe LH1 und LH2, sowie das Reaktionszentrum (RC). Einige wenige Purpurbakterien besitzen zusätzlich noch einen mit LH3 bezeichneten dritten Lichtsammelkomplex. Eine Ausnahme stellt jedoch das Bakterium *Rhodospirillum (R.) rubrum* dar, dessen Membranen nur den Lichtsammelkomplex LH1 und das Reaktionszentrum enthalten. Abbildung 3.1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Anordnung der Lichtsammelkomplexe in der photosynthetischen Membran von *R. rubrum* und des Energietransfers zwischen den Komplexen nach Absorption eines Photons.

Die Lichtsammelkomplexe LH1, LH2 und LH3 haben die Aufgabe, Licht zu absorbieren und die daraus gewonnene Anregungsenergie an das Reaktionszentrum weiterzuleiten. Die dort absorbierte Energie führt zu einer Ladungstrennung innerhalb des Reaktionszentrums, die den ersten Schritt der Photosynthese darstellt. Der LH1-Komplex ist dabei direkt mit dem Reaktionszentrum verbunden, so daß die Anregungsenergie vom LH1 auf das Reaktionszentrum übertragen wird. Dieser gemeinsame LH1-RC-Komplex wird auch als Kernkomplex bezeichnet. Die LH2-Komplexe sind in der Membran um die Kernkomplexe herum angeordnet und haben die Aufgabe, die lichtabsorbierende Fläche in der Membran zu vergrößern und die Energie an den Kernkomplex weiterzuleiten. Der Energietransfer $\text{LH2} \rightarrow \text{LH1} \rightarrow \text{RC}$ besitzt dabei eine Effizienz von 95% und läuft schneller als 100 ps ab [Pul96a].

Die Strukturen der LH2-Komplexe von *Rhodospseudomonas (Rps.) acidophila* und *R. molischianum* konnten bereits mit atomarer Auflösung bestimmt werden [McD95]

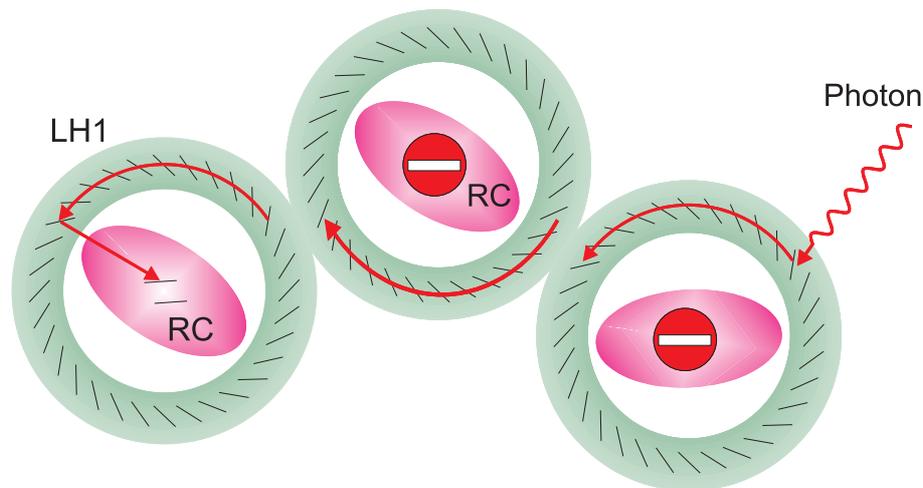


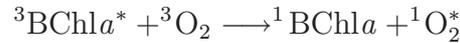
Abbildung 3.1: Vereinfachte Darstellung der Anordnung der Lichtsammelkomplexe (LH1) in der Photosynthetischen Membran von *R. rubrum*. Die zeigen den Weg des Energietransfers zum Reaktionszentrum (RC) an. Die Reaktionszentren benötigen für den Vorgang der Ladungstrennung eine gewisse Zeit, während der sie keine Energie absorbieren können (in der Abb. als „gesperrtes“ RC dargestellt). Die Energie wird so lange weitertransferiert, bis sie zu einem „offenen“ Reaktionszentrum gelangt.

[Koe96]. Der LH2-Komplex ist demnach ein ringförmiges Aggregat, das bei *Rps. acidophila* aus neun und bei *R. molischianum* aus acht identischen Untereinheiten zusammengesetzt ist. Jede Untereinheit besteht aus zwei leicht unterschiedlichen Polypeptidketten, die als α - und β -Untereinheiten bezeichnet werden. Die membranspannenden Domänen beider Polypeptidketten sind als α -Helices ausgebildet. Das Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, wird auch als $\alpha\beta$ -Untereinheit bezeichnet. An dieses Proteingerüst sind die Pigmente, drei Bakteri-ochlorophyll *a* (BChla)-Moleküle sowie ein Carotinoidmolekül (Car), nicht-kovalent gebunden. Allgemein wird angenommen, daß die LH2-Komplexe von Purpurbakterien verschiedener Spezies aus funktionellen Gründen alle ringförmige Aggregate sind.

Der LH1-Komplex ist ebenfalls ein Aggregat aus $\alpha\beta$ -Untereinheiten und den Pigmenten BChla und Carotinoiden. Der Komplex ist ähnlich modular aufgebaut wie der LH2-Komplex (siehe Kap.3.2), aber eine bei allen Spezies einheitliche geschlossene, ringförmige Struktur scheint der LH1-Komplex nicht zu besitzen. So wurden sowohl geschlossene, ringförmige Komplexe bei *R. rubrum*, *Rps. viridis*, *Rps. marina* [Kar95], als auch offene, C-förmige dimerische Strukturen in Membranen von *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* beobachtet [Jun99]. Auch scheinen weitere offene

Strukturen möglich, da aus Pigmentanalysen Spezies bekannt sind, die zu wenige $\alpha\beta$ -Untereinheiten enthalten, um damit das Reaktionszentrum vollständig zu umschließen (s. Kap. 3.3).

Die BChla-Moleküle stellen in allen drei Lichtsammelkomplexen die wichtigsten Absorber dar. Die stärkste Absorption des BChla, die sog. Q_y -Bande, liegt abhängig von der Proteinumgebung, zwischen 790 und 1050 nm (siehe auch Abb. 2.9). Das ermöglicht den Purpurbakterien in ihren Lebensräumen, auf dem Grund von Seen oder auch in Gewässern, eine optimale Ausnutzung des dort vorhandenen NIR-Lichtes. Die Carotinoide haben die Aufgabe, die Erzeugung von molekularem Singulett-Sauerstoff zu verhindern, da durch die extrem große Interkombinationsrate des BChla ($k_{ISC} \simeq (2,6 - 5,1 \text{ ns})^{-1}$ [Lim98]) in Verbindung mit dem Austauschprozeß



(in Abwesenheit der Carotinoide) hoch reaktiver, für den Organismus toxischer Singulett-Sauerstoff entstehen kann. Durch einen Energietransfer zum Carotinoid



wird dies verhindert. Mit einer Rate von $k \simeq (12 - 25 \text{ ns})^{-1}$ ist dieser Energietransfer zum Carotinoid etwa um drei Größenordnungen schneller als der Austauschprozess mit dem Sauerstoff [Mon76]. Die energetisch niedrigere Lage des Carotinoidtripletts verglichen mit der des Sauerstoffes verhindert einen möglichen weiteren Austauschprozeß mit dem Sauerstoff.

Aufbau und Funktion der photosynthetischen Membranen von Purpurbakterien werden u.a. ausführlich in den Übersichtsartikeln von X. Hu *et al.* [Hu02] und K. Schulten [Fra99] beschrieben.

3.2 Struktur des LH1-Komplexes von *R. rubrum*

Die Struktur des LH1-Komplexes von *R. rubrum* konnte mittels Cryoelektronenmikroskopie an 2D-Kristallen mit einer Auflösung von 0,85 nm bestimmt werden [Kar95]. Die daraus ermittelte Elektronendichteverteilung ist in Abb. 3.2 (A) zu sehen. Es zeigte sich, daß der LH1-Komplex von *R. rubrum* ein ringförmiges Aggregat ist, bestehend aus 16 identischen Untereinheiten. Der äußere Durchmesser des Ringes beträgt 11,6 nm und der innere 6,8 nm. Der gesamte Komplex besitzt eine C_{16} Symmetrie senkrecht zur Molekülebene.

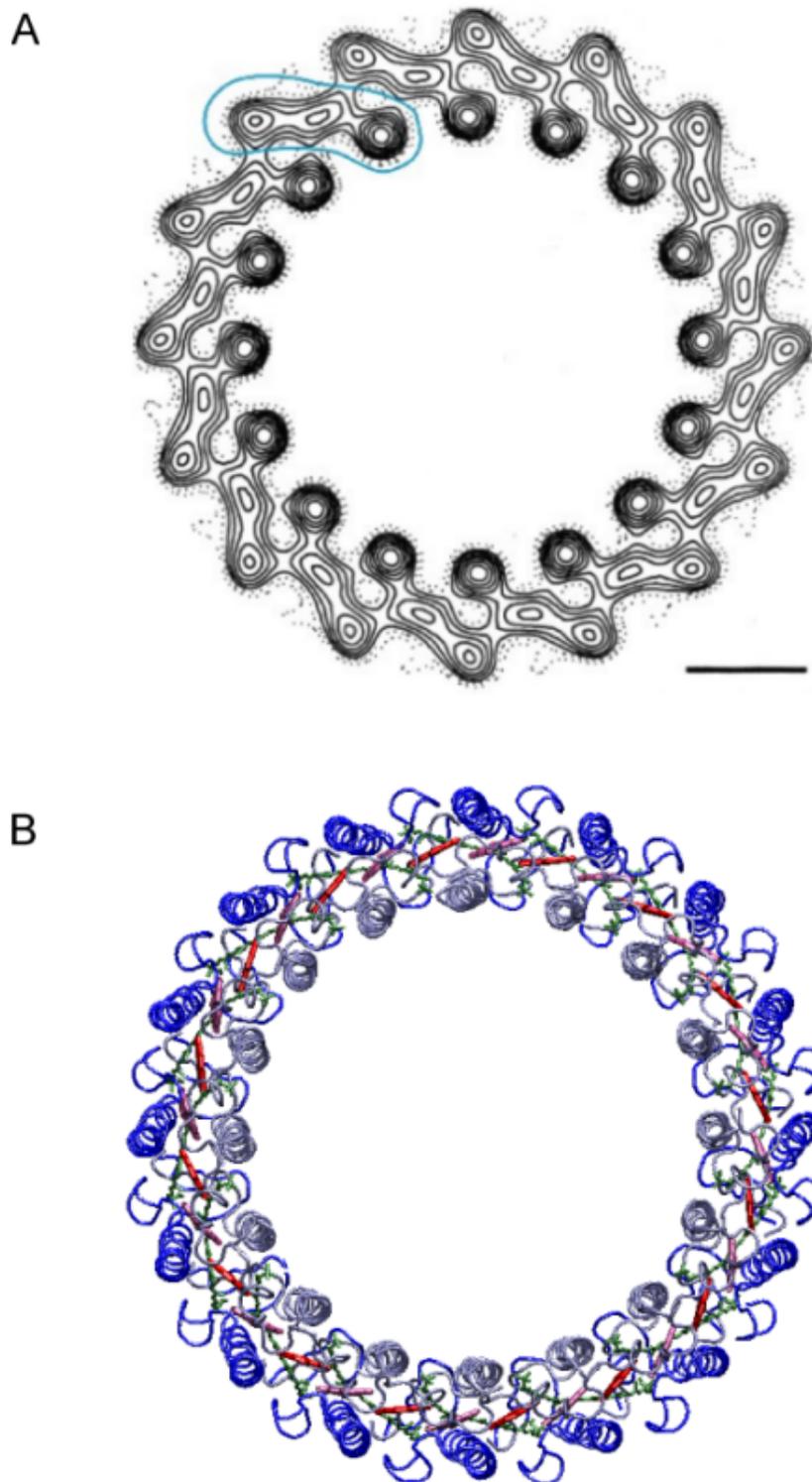


Abbildung 3.2: (A) Elektronendichteverteilung im LH1-Komplex von *R. rubrum* [Kar95]. Zur Veranschaulichung ist eine Untereinheit blau umrandet dargestellt. Skalierungsbalken 2 nm. (B) Strukturmodell des LH1-Komplexes von *R. rubrum* [Aut02]: $\alpha\beta$ -Untereinheit (blau, grau), Car-Moleküle (grün) und BChla-Moleküle (rosa, rot). (Bild B wurde mit VMD erstellt [Hum96]).

Die Untereinheiten bestehen aus den beiden Polypeptidketten α und β , die jeweils 52 und 54 Aminosäuren groß sind. Die membranspannenden Domänen beider Polypeptidketten sind ca. 4,5 nm lang und stehen nahezu senkrecht zur Ringebene bzw. Zellmembran. Jede $\alpha\beta$ -Untereinheit enthält zwei BChla-Moleküle, die zwischen den Polypeptidketten nicht-kovalent gebundenen sind. Zusätzlich ist noch ein Molekül des Carotinoids Spirilloxanthin (Spx) in jeder Untereinheit enthalten. Die Gesamtmasse des LH1-Komplexes beträgt somit 266 kDa. Messungen des linearen Dichroismus zeigten, daß die Ebenen der Porphyrinringe der BChla-Moleküle dabei parallel zueinander und senkrecht zur Membranebene orientiert sein müssen [Kra84].

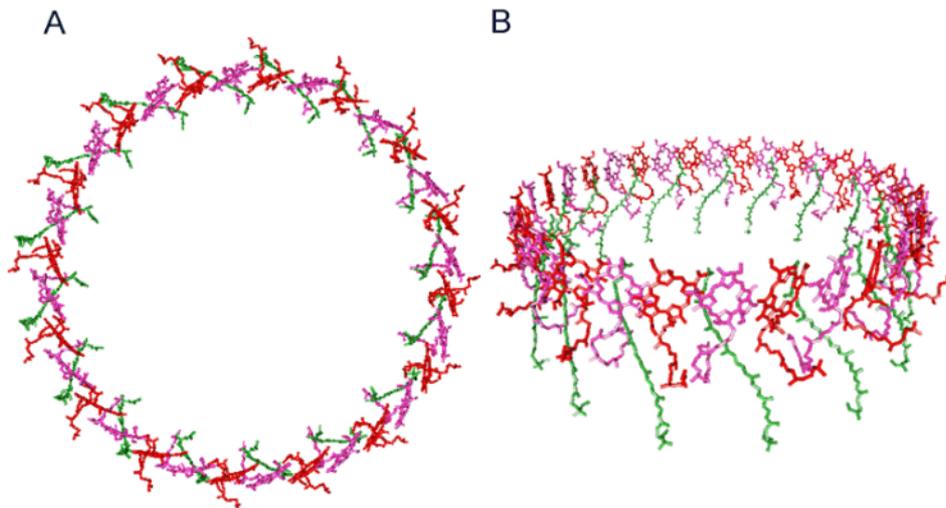


Abbildung 3.3: Anordnung der Pigmente im LH1-Ring in Aufsicht (A) und in Seitenansicht (B) [Aut02]. Die BChla-Moleküle sind rosa bzw. rot und die Carotinoide grün dargestellt. In der Seitenansicht ist die cytoplasmatische Seite die Unterseite des Ringes. (Dieses Bild wurde mit VMD erstellt [Hum96].)

Aufgrund der relativ groben Auflösung von 0,85 nm konnte jedoch keine genaue Aussage über die Orientierung des BChla-Dimers in der Untereinheit getroffen werden. Das gleiche gilt für die Abstände (Mg–Mg) der BChla-Moleküle in einem Dimer (intradimer) sowie zwischen zwei benachbarten Dimeren (interdimer). Modellrechnungen für den LH1-Komplex von *Rb. sphaeroides* und *R. rubrum* ergaben einen intradimeren Abstand von 0,92 nm und einen interdimeren von 0,93 nm [Hu97] bzw. 0,83 nm und 1,02 nm [Aut02]. Das daraus hervorgegangene Strukturmodell für den LH1-Komplex von *R. rubrum* ist in Abbildung 3.2 (B) dargestellt. Diese geringen

Abstände lassen auf eine starke Kopplung der BChla-Moleküle schließen, die zur Bildung von Exzitonen führt (siehe Kap. 4.1). Die genaue Anordnung der Pigmente ist nochmal in Abb. 3.3 zu sehen. Aufgrund des Absorptionsmaximums der BChla-Moleküle bei 880 nm, der sog. Q_y-Bande, wird dieser Ring auch als B880 bezeichnet.

3.3 Struktur des RC-LH1-Komplexes von *R. rubrum*

Neben dem Lichtsammelkomplex LH2 konnte auch die Struktur des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* [Dei85] und von *Rb. sphaeroides* [All87] [Erm94] mit atomarer Auflösung bestimmt werden. Das Reaktionszentrum besteht danach, wie in Abb. 3.4 (A) gezeigt, aus drei Proteinuntereinheiten, die als L (Light), M (Medium) und H (Heavy) bezeichnet werden. Die Untereinheiten L und M haben eine homologe Struktur und sind im Reaktionszentrum so angeordnet, daß sie eine zweizählige Pseudosymmetrieachse aufweisen (siehe auch Abb. 3.4 (C)). An diese Untereinheiten sind wiederum die Pigmente, vier BChla-Moleküle, ein Carotinoidmolekül, zwei Bakteriopheophytine und zwei Quinone, nicht-kovalent gebunden. Die Anordnung der Pigmente ist in Abb. 3.4 (B) gezeigt. Zwei der BChla-Moleküle bilden dabei einen dimerischen Komplex, das sog. *special pair* (SP). Die Anregung des SP, durch Absorption eines Photons oder durch Energietransfer vom LH1-Ring, ist der Ausgangspunkt für die anschließende schrittweise Ladungstrennung



Dabei wird ein Elektron des angeregten SP innerhalb von Pikosekunden auf das Bakteriopheophytin H_A und nach ungefähr 200 ps dann auf das Quinonmolekül Q_A übertragen. Nach weiteren 200 μs wird das Elektron auf das zweite Quinonmolekül Q_B transferiert, das danach als Semiquinonradikal Q_B⁻ vorliegt [Woo94] [Hu02]. Nach zwischenzeitlicher Reduktion des SP⁺ und erneuter Anregung endet der Prozeß der Ladungstrennung damit, daß das Quinonmolekül Q_B nach zweifacher Reduktion und Protonierung als Quinol (H₂Q) vorliegt. Trotz der Ähnlichkeit der beiden „Äste“ des Reaktionszentrums erfolgt die Ladungstrennung nur entlang des Astes A (in Abb. 3.4 (B) und in Gl. (3.1) durch die Indices „A“ gekennzeichnet).

Untersuchungen an Kernkomplexen von *R. rubrum* ergaben, daß der LH1-Ring genau ein Reaktionszentrum umschließt und die Stöchiometrie des LH1 dabei unbeein-

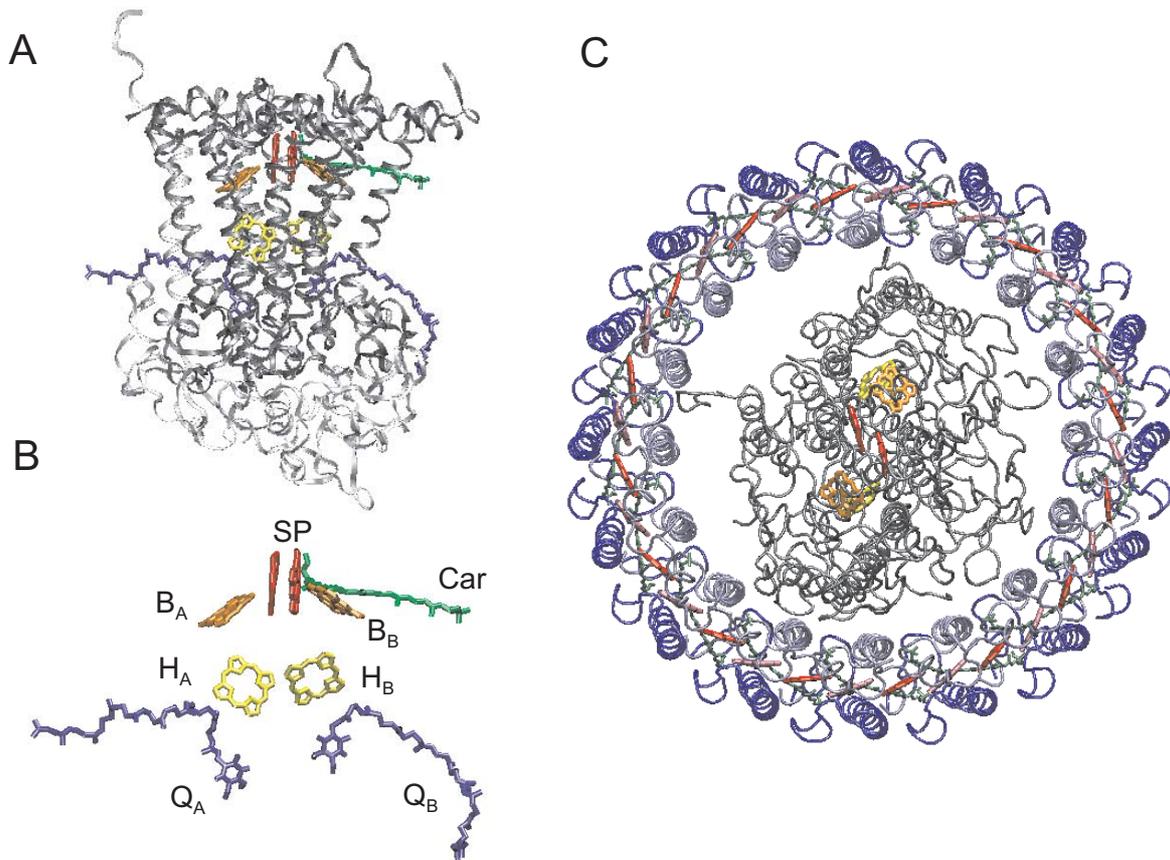


Abbildung 3.4: Modell des Reaktionszentrums von *Rb. sphaeroides*. (A) Proteingerüst mit den Untereinheiten M, L und H und den Pigmenten. (B) Anordnung der Pigmente: *special pair* (SP, rot), *accessory chlorophylls* (B_A, B_B, orange), Bakteriopheophytin (H_A, H_B, gelb), Quinon (Q_A, Q_B, blau) und dem Carotinoid (Car, grün). (C) Modell eines ringförmigen Kernkomplexes mit Blick von der periplasmatischen Seite. Der Übersichtlichkeit wegen sind als Pigmente nur die Bakteriopheophytine (gelb), die *accessory chlorophylls* (orange) und das SP (rot) dargestellt. (Dieses Bild wurde mit VMD erstellt [Hum96].)

flußt bleibt [Wal97] [Jam02]. Ob auch die kreisförmige Struktur erhalten bleibt, läßt sich mit den Daten der Strukturanalyse nicht endgültig beantworten. Es wurden z. B. von Stahlberg *et al.* bei carotinoidlosen LH1-Mutanten Hinweise auf eine quadratische Deformation des Ringes in Anwesenheit des Reaktionszentrums, sowohl bei Untersuchungen an 2D-Kristallen als auch bei Einzelpartikelanalyse, gefunden [Sta98]. Neueste Untersuchungen von Jamieson *et al.* [Jam02] der Struktur des Kernkomplexes des Wildtyps von *R. rubrum* ergaben, daß der Kernkomplex keine quadratische Deformation aufweist. Diese Studie zeigte auch, daß die Form des LH1-Komplexes von den Kristallisationsbedingungen abhängt. So wurden 2D-Kristalle erzeugt, in denen der Kernkomplex kreisförmig bzw. elliptisch verzerrt ist. Ein Mo-

dell für RC-LH1 von *R. rubrum* mit einem kreisförmigen LH1-Komplex ist in Abb. 3.4 (C) dargestellt. Wegen des Fehlens von Strukturdaten des Reaktionszentrums von *R. rubrum* wurde das Modell des Reaktionszentrums von *Rb. sphaeroides* in den LH1-Ring von *R. rubrum* eingebettet.

Kapitel 4

Exzitonische Struktur des LH1–Komplexes und Exzitonendynamik

4.1 Exzitonen

Wird ein Aggregat aus identischen, stark gekoppelten Molekülen angeregt, so wird das angeregte Elektron aufgrund der Ununterscheidbarkeit der Moleküle nicht mehr an dem Ort eines einzelnen Moleküls lokalisiert sein. Vielmehr wird die Anregung über das gesamte Aggregat delokalisiert sein. Ein solcher Anregungszustand wird als Exziton bezeichnet. In den spektroskopischen Eigenschaften macht sich eine starke Kopplung zwischen Molekülen u.a. durch eine spektrale Verschiebung in der Absorption gegenüber den ungekoppelten Molekülen bemerkbar. Aufgrund des geringen Abstandes der BChla–Moleküle im LH1–Ring ($\simeq 0,9$ nm) und der beobachteten Rotverschiebung [MB85] läßt sich auch die elektronische Struktur von LH1 mittels Exzitonen beschreiben.

Einen einfach angeregten Zustand eines Aggregates aus N Molekülen läßt in der Heitler–London–Näherung durch die Basis

$$|n\rangle = |1\rangle|2\rangle \dots |n^*\rangle \dots |N\rangle \quad (4.1)$$

beschrieben [Hu97] [Kö00]. Dies sind die Produktzustände aus den ungekoppelten Zuständen $|1\rangle \dots |N\rangle$, bei denen das n -te Molekül einfach angeregt ist und sich die restlichen Moleküle in ihrem Grundzustand befinden. Der Hamilton–Operator für

ein solches System hat dann in dieser Basis die Form

$$\hat{H} = \sum_{n=1}^N E_0 |n\rangle \langle n| + \sum_{\substack{n,m=1 \\ n \neq m}}^N W_{nm} |n\rangle \langle m|. \quad (4.2)$$

Dabei steht E_0 für die Anregungsenergien der ungekoppelten Moleküle und W_{nm} beschreibt die Wechselwirkung zwischen den Molekülen n und m . Aus der Diagonalisierung des Hamilton-Operators ergeben sich dann die N neuen, mit $|k\rangle$ bezeichneten exzitonischen Zustände

$$|k\rangle = \sum_{n=1}^N c_{nk} |n\rangle \quad (4.3)$$

Die in Gl. (4.3) auftretenden Koeffizienten c_{nk} (Aufenthaltswahrscheinlichkeitsamplituden (AWA)) sind ein Maß dafür, daß angeregte Elektron auf dem n -ten BChla-Molekül anzutreffen. Mit diesen Koeffizienten lassen sich nun aus den Dipolmomenten \vec{d}_n der ungekoppelten Moleküle die Dipolmomente \vec{D}_k der exzitonischen Zustände $|k\rangle$ berechnen. Diese ergeben sich zu

$$\vec{D}_k = \sum_{n=1}^N c_{nk} \vec{d}_n \quad (4.4)$$

der Zustände $|k\rangle$. Die Wechselwirkung zwischen allen nicht direkt benachbarten BChla-Molekülen im LH1-Ring ist aufgrund der Abstände in guter Näherung durch die Dipol-Dipol-Wechselwirkung

$$W_{nm} = C_3 \left(\frac{\vec{d}_n \cdot \vec{d}_m}{r_{nm}^3} - 3 \frac{(\vec{r}_{nm} \cdot \vec{d}_n)(\vec{r}_{nm} \cdot \vec{d}_m)}{r_{nm}^5} \right) \quad (4.5)$$

beschrieben. Dabei ist \vec{d}_n der Einheitsvektor des Dipolmoments des n -ten Moleküls und r_{nm} der Abstand (Mg-Mg) zwischen den Molekülen n und m . Es werden Einheitsvektoren verwendet, da die absoluten Größen der Dipolmomente aufgrund der unbekanntenen Dielektrizitätskonstante der Proteinumgebung nicht berechnet werden können. Um das Problem der unbekanntenen Dielektrizitätskonstanten zu umgehen, wird der Parameter C_3 eingeführt, mit dem der Wert für W_{13} an einen Literaturwert angepasst werden kann. Als Literaturwert wird hier der von Tretiak *et. al* [Tre00] berechnete Wert von $W_{13} = -102 \text{ cm}^{-1}$ verwendet. Aus derselben Arbeit wurden auch

die Kopplungsstärken der Chlorophylle im Dimer (intradimer) ν_1 und benachbarter Chlorophylle zweier Dimere (interdimer) ν_2 entnommen. Diese werden dort mit $\nu_1 = 363 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu_2 = 320 \text{ cm}^{-1}$ angegeben. Die Parameter ν_1 , ν_2 und W_{13} wurden mit dem *collective electronic oscillator* (CEO)-Verfahren sowie den Kristallstrukturdaten des LH2-Komplexes von *R. molischianum* berechnet. Aufgrund der Ähnlichkeit des Aufbau der LH2- und LH1-Komplexe ist die Annahme gerechtfertigt, daß die für den LH2-Komplex berechneten Werte mit denen des LH1-Komplexes vergleichbar sind.

Der Hamilton-Operator (4.2) für den LH1-Komplex ($N = 32$) hat in der Matrixschreibweise die Gestalt

$$\hat{H} = \begin{pmatrix} E_0 & \nu_1 & W_{1,3} & \cdots & W_{1,31} & \nu_2 \\ \nu_1 & E_0 & \nu_2 & \cdots & W_{2,31} & W_{2,32} \\ W_{3,1} & \nu_2 & E_0 & \cdots & W_{3,31} & W_{3,32} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ W_{31,1} & W_{31,2} & W_{31,3} & \cdots & E_0 & \nu_1 \\ \nu_2 & W_{32,2} & W_{32,3} & \cdots & \nu_1 & E_0 \end{pmatrix}. \quad (4.6)$$

Die für die Berechnungen der Kopplungsstärken mit Gl. (4.5) verwendeten Koordinaten wurden einer modellierten Struktur des LH1-Komplexes von *R. rubrum* entnommen [Aut02]. Als Dipolmomente \vec{d}_n wurden die Einheitsvektoren zwischen den beiden Stickstoffatomen N_B und N_D der Porphyrinringe der BChla-Moleküle genommen (s. Abb.4.1). Die Dipolmomente entsprechen somit dem Q_y -Übergang des Moleküls.

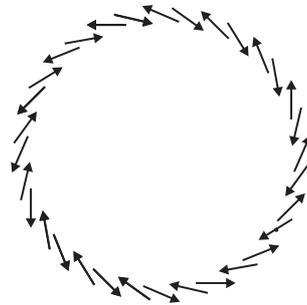


Abbildung 4.1: Anordnung der 32 Dipolmomente der Q_y -Übergänge der BChla-Moleküle im LH1-Ring.

Ein mit diesen Parametern berechnetes Spektrum für die Q_y -Bande des LH1-Komplexes ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Wahl des Parameters E_0 ist insoweit beliebig, da durch E_0 nur die absolute Position des Spektrums auf der Energieachse festgelegt wird. E_0 wird in dieser Arbeit so angepasst, daß die Energie der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ mit dem Q_y -Absorptionsmaximum bei 880 nm (siehe Kap. 2.3, Abb. 2.9) von LH1 übereinstimmt. Daraus ergibt sich ein Wert von $E_0 = 12290 \text{ cm}^{-1}$.

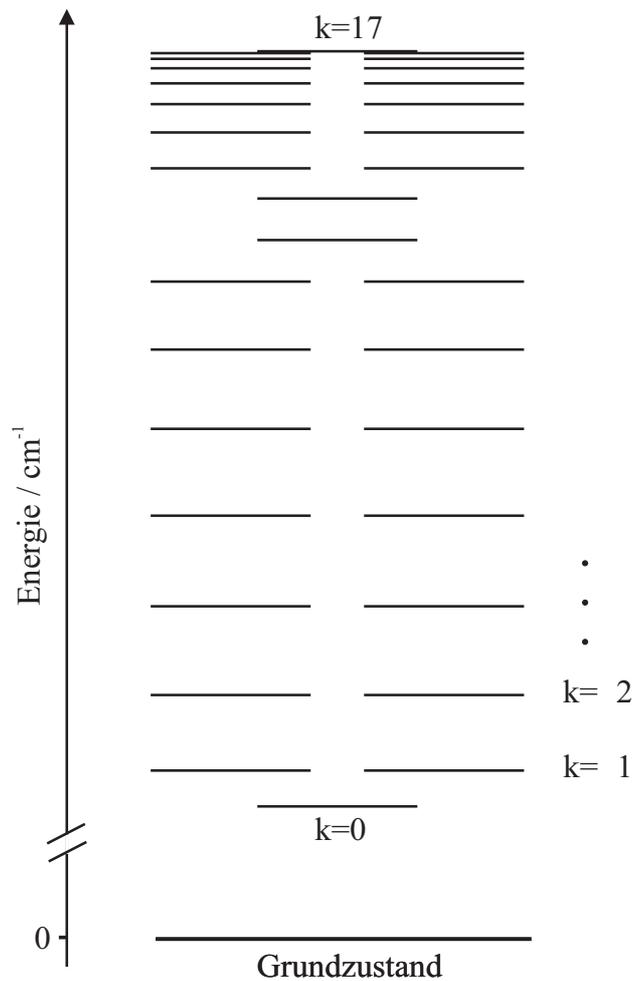


Abbildung 4.2: Berechnetes Energieniveauschema für den ersten angeregten Zustand des LH1-Komplexes. Die Energien der einzelnen Niveaus sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt

Man erkennt in Abb. 4.2, daß sich der erste angeregte Zustand aus 32 exzitonischen Zuständen zusammensetzt, die sich in 2 Bänder gruppieren. Jedes Band enthält 16 Zustände, von denen jeweils nur der unterste und oberste Zustand nicht entartet sind. Diese Aufspaltung in zwei Bänder ist die direkte Folge der Dimerisierung und

der daraus entstehenden C_{16} -Symmetrie des BChla-Ringes. Der Gesamtspin der Elektronen ergibt Null, daher werden der Grundzustand und der erste angeregte Zustand auch als S_0 bzw. S_1 bezeichnet.

Zustand $ k\rangle$	Energie / cm^{-1}	f_k
0	11285	0
± 1	11359	15,993
± 2	11511	0
± 3	11691	0
± 4	11875	0
± 5	12051	0
± 6	12210	0
± 7	12346	0
8	12432	0
9	12514	0
± 10	12576	0
± 11	12649	0
± 12	12707	0
± 13	12745	0
± 14	12779	0
± 15	12799	0
± 16	12810	0,007
17	12813	0
		$\Sigma f_k = 32$

Tabelle 4.1: Berechnete Energien und Oszillatorenstärken $f_k = |\vec{D}_k|^2$ der exzitonischen Zustände des Q_y -Bandes des LH1-Komplexes von *R. rubrum*.

Die Berechnung der AWA ergibt, daß sie für das untere Exzitonband alternierende Vorzeichen besitzen. Für den tiefsten Zustand besitzen die AWA zusätzlich noch gleiche Beträge. Das hat zur Folge, daß der tiefste Zustand $|k=0\rangle$ kein Dipolmoment besitzt. Weiterhin zeigt sich, daß die Zustände $|k=\pm 1\rangle$ beinahe das gesamte Dipolmoment besitzen und diese senkrecht zueinander polarisiert sind. Dieses Ergebnis ist nochmal anschaulich in Abb. 4.3 dargestellt.

Die Energien und Oszillatorenstärken $f_k = |\vec{D}_k|^2$ von allen Zuständen sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt. Die Summe der Oszillatorenstärken ergibt 32, da die Dipolmomente der ungekoppelten Moleküle als Einheitsvektoren angenommen wurden.

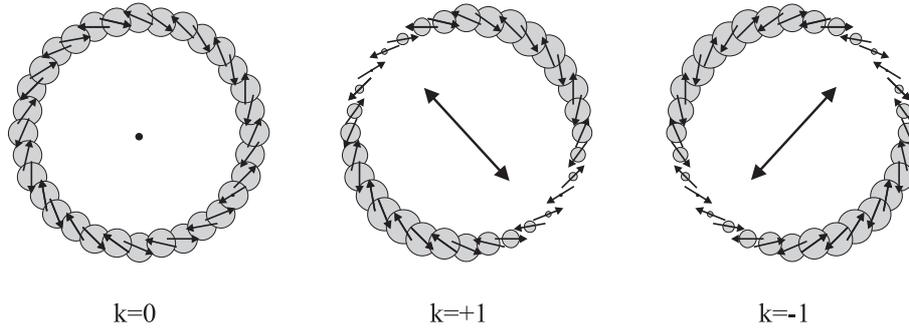


Abbildung 4.3: Verteilung der Beträge der Aufenthaltswahrscheinlichkeitsamplituden (AWA) (graue Kreise) des Elektrons für die Zustände $|k = \pm 0\rangle$ und $|k = \pm 1\rangle$ bei $T=300\text{ K}$. Die Pfeile innerhalb und auf dem Umfang der Ringe stellen die Dipolmomente der exzitonischen Zustände bzw. einzelnen BChla-Moleküle dar. Der Zustand $|k = \pm 0\rangle$ besitzt kein Dipolmoment.

4.1.1 Diagonale Unordnung

Die Verteilung der gesamten Oszillatorenstärke auf den ersten entarteten Zustand $|k = \pm 1\rangle$ ist eine allgemeine Eigenschaft von ringförmigen Aggregaten mit perfekter Symmetrie. Dies hat zur Folge, daß der Zustand $|k = 0\rangle$ bei tiefen Temperaturen eine Falle darstellen würde und das Molekül nicht fluoreszieren kann. Aber jede Störung der perfekten Symmetrie, energetisch oder strukturell, führt zu einer Umverteilung der Oszillatorenstärke auf die anderen Zustände, so daß auch der Zustand $|k = 0\rangle$ fluoreszieren kann. Aus Untersuchungen an LH1-Komplexen von *Rb. sphaeroides* [Goe72][Mon97] sowie an LH2-Komplexen von *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* [Ket01] [Mat01] [van99] [Tie01] ist bekannt, daß solche Störungen vorliegen, mit denen sich die beobachtete Fluoreszenz bei tiefen Temperaturen erklären läßt.

Die sog. diagonale Unordnung stellt eine statische energetische Störung dar, bei der die Diagonalelemente des Hamiltonoperators (4.6) eine inhomogene Verbreiterung erfahren. Diese Verbreiterung wird durch eine Gauß-Verteilung der Breite w der BChla-Anregungsenergien um den Wert E_0 beschrieben

$$g(E_0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi w}} e^{-\frac{(E-E_0)^2}{2w^2}}. \quad (4.7)$$

Mit der diagonalen Unordnung schreibt sich der Hamilton-Operator (4.2) als

$$\hat{H} = \sum_{n=1}^N (E_0 - \Delta E_n) |n\rangle \langle n| + \sum_{\substack{n,m=1 \\ n \neq m}}^N W_{nm} |n\rangle \langle m|. \quad (4.8)$$

mit $\Delta E_n = (E_0 - E)$, wobei E einen für jedes n zufällig gewählten Wert aus der

Verteilung (4.7) darstellt.

Die Einführung einer solchen Störung ist damit begründet, daß für jedes einzelne BChla-Molekül die direkte Proteinumgebung im Komplex auf molekularer Ebene leicht anders „aussieht“ und dadurch eine Veränderung der Wechselwirkungsenergie und damit der Anregungsenergie E_0 hervorgerufen wird.

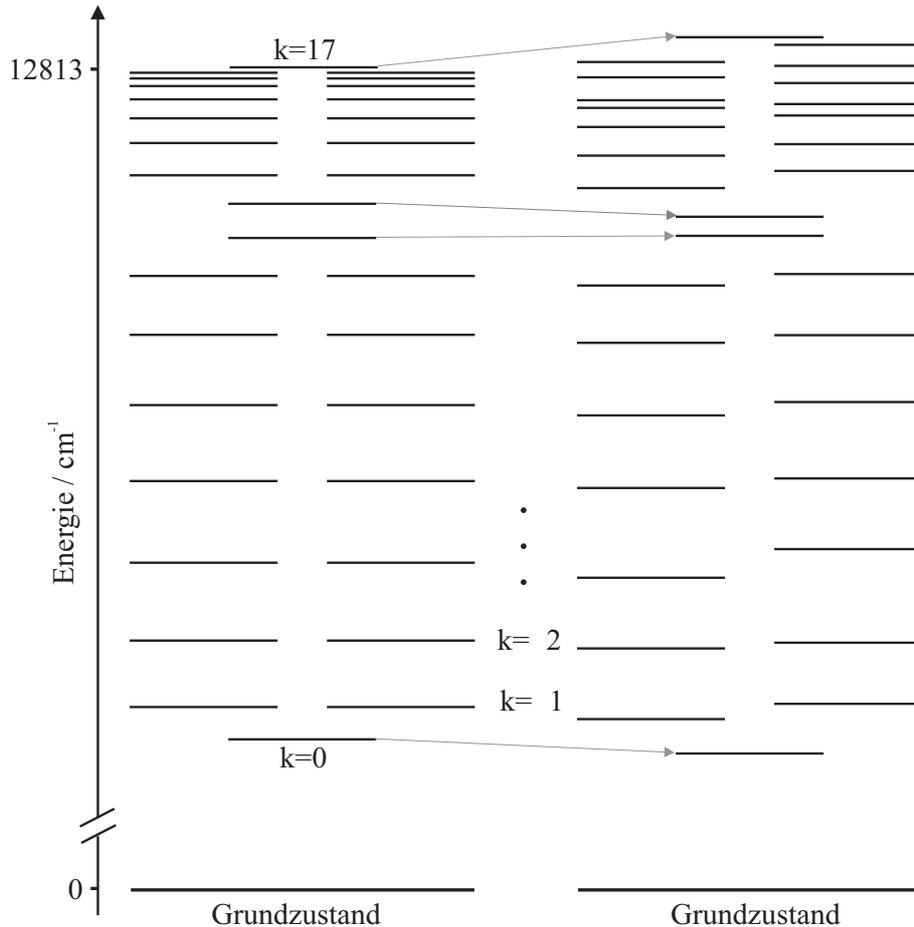


Abbildung 4.4: Einfluß einer diagonalen Unordnung auf die Lage der Energieniveaus des LH1-Komplexes. Das linke Spektrum zeigt nochmal die ungestörte Lage der Energieniveaus, während das rechte mit einer Unordnung von $w = 175 \text{ cm}^{-1}$ berechnet wurde.

Der Einfluß einer diagonalen Unordnung $w = 175 \text{ cm}^{-1}$ auf das komplette Energieniveauschema des LH1-Komplexes ist in Abb. 4.4 dargestellt. Man erkennt, daß eine solche Störung die Aufhebung der Entartungen bewirkt. Eine diagonale Unordnung führt weiterhin zu einer Absenkung der Energien der Zustände im unteren Band sowie zu einer Verbreiterung des oberen Exzitonbandes. Eine Umverteilung der Oszillatorenstärke findet ebenfalls statt.

Eine Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Elektrons auf dem LH1-Ring für diese Unordnung ist in Abb. 4.5 gezeigt. Die Dipolmomente der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ sind weiterhin orthogonal.

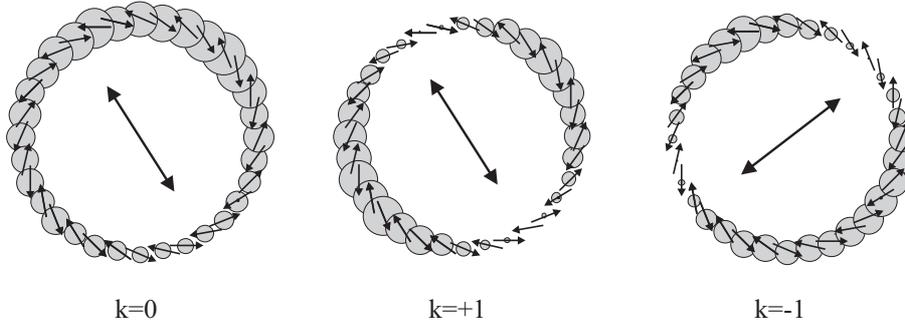


Abbildung 4.5: Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten (graue Kreise) des Elektrons im angeregten Zustand für die Zustände $|k = \pm 0\rangle$ und $|k = \pm 1\rangle$ für eine diagonale Unordnung von $w = 175 \text{ cm}^{-1}$ bei $T = 300 \text{ K}$. Die Pfeile innerhalb und auf dem Umfang der Ringe stellen die Dipolmomente der exzitonischen Zustände bzw. einzelnen BChla-Moleküle dar. Der Zustand $|k = \pm 0\rangle$ besitzt nach Einführung der diagonalen Unordnung nun auch ein Dipolmoment.

Die Ergebnisse einer numerischen Simulation für die Verschiebung sowie der Umverteilung der Oszillatorenstärke für die Zustände $|k = 0\rangle$ bis $|k = \pm 3\rangle$ sind in Abb. 4.6 dargestellt. Die Berechnungen wurden für ein Ensemble von 500 Aggregaten durchgeführt. Von den aus der Diagonalisierung erhaltenen Energieeigenwerten und Oszillatorenstärken wurde anschließend der Mittelwert gebildet und gegen die energetische Unordnung w aufgetragen. Man erkennt in Abb. 4.6 (A) deutlich die Aufspaltung der vorher entarteten Niveaus mit zunehmender Störung. Abbildung 4.6 (B) zeigt die Umverteilung der Oszillatorstärke von $|k = \pm 1\rangle$ auf die Zustände $|k = 0\rangle$ bis $|k = \pm 3\rangle$. Man erkennt, daß ein deutlicher Abfall der Oszillatorenstärke von $|k = \pm 1\rangle$ erst bei einer Unordnung von ca. 75 cm^{-1} anfängt. Der größte Teil verteilt sich auf den Zustand $|k = 0\rangle$, so daß dieser ebenfalls fluoreszieren bzw. absorbieren kann. Alle anderen Zustände besitzen bis $w = 500 \text{ cm}^{-1}$ Oszillatorenstärken $f_k \leq 0,2$ und sind in der Abbildung nicht dargestellt.

Für die Größe der diagonalen Unordnung des LH1-Komplexes und seiner B820-Untereinheit werden in der Literatur Werte zwischen 200 cm^{-1} und 400 cm^{-1} angegeben [Mon97] [Vis96] [Pul95]. Beim Wert für die Unordnung des strukturell ähnlichen LH2-Komplexes gibt es eine deutlich größere Unsicherheit, es lassen sich in der Literatur Werte zwischen 125 cm^{-1} und 700 cm^{-1} finden [van99] [Pol00].

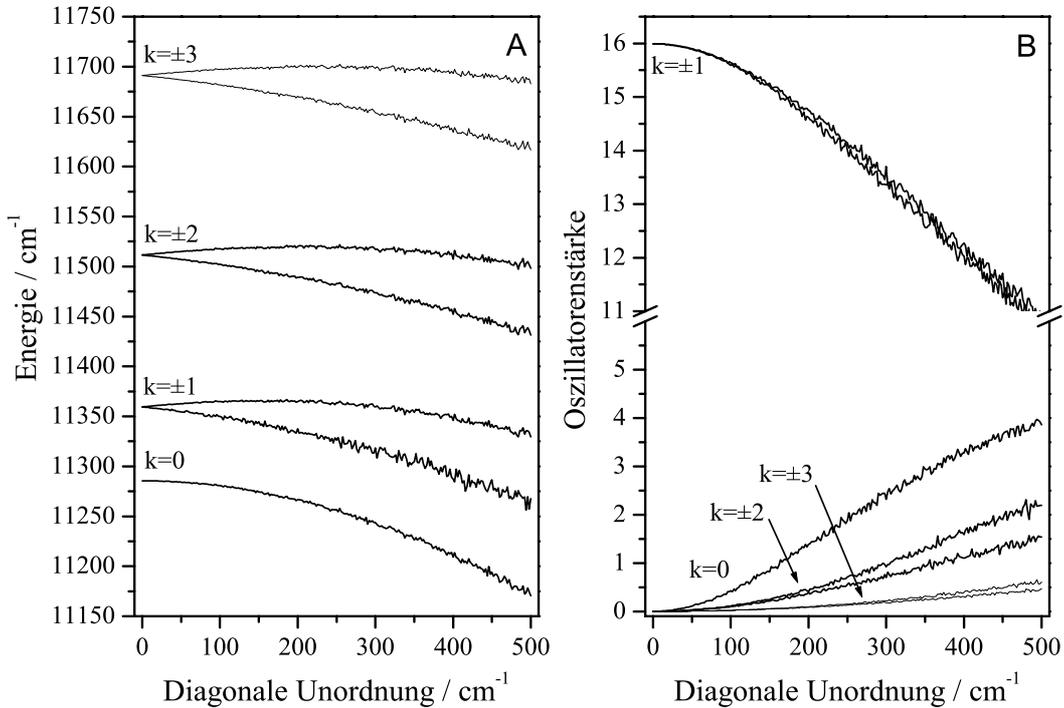


Abbildung 4.6: Simulation (A) der Aufspaltung der vier niedrigsten Energieniveaus und (B) deren Oszillatorenstärken in Abhängigkeit von der diagonalen Unordnung.

4.1.2 Elliptische Deformation

Wie bereits erwähnt, führen auch strukturelle Störungen, das sind z. B. Änderungen in der Geometrie, zu einer Änderung in den photophysikalischen Eigenschaften. Aus spektroskopischen Untersuchungen an einzelnen LH1- und LH2-Komplexen [Ket01] [Mat01] [van99] [Tie99] ist bekannt, dass diese kreisförmigen Komplexe eine elliptische Deformation aufweisen können. Auch aus kristallographischen Daten ist ersichtlich, daß der Kernkomplex von *R. rubrum* elliptisch deformiert vorliegen kann [Jam02].

Um den Einfluß einer solchen Störung auf die Energieniveaus des Komplexes zu berechnen, müssen die Koordinaten der BChla-Moleküle auf eine Ellipse transformiert werden. Es wird hier ein Modell verwendet, bei dem die BChla-Moleküle des ungestörten Ringes entlang ihres Radiusvektors verschoben werden, bis sie sich auf dem Umfang einer Ellipse befinden [Tie01]. Dies führt dazu, daß die Abstände der Moleküle in Richtung der langen Achse größer bzw. in Richtung der kurzen Halb- achse kleiner werden. Das Aussehen einer solchen Deformation ist stark übertrieben

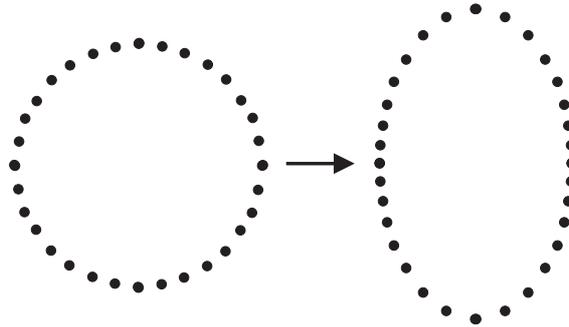


Abbildung 4.7: Modell für die elliptische Deformation des LH1-Komplexes. Das Verhältnis der Achsen beträgt für den verzerrten Komplex 1,6. Dies entspricht einer Exzentrizität von $\varepsilon = 0,78$.

in Abb. 4.7 gezeigt. Da sich bei dieser Deformation die Abstände zwischen den Pigmenten ändern, kann man die Kopplungsstärken ν_1 und ν_2 nicht mehr als konstant betrachten. Es wird stattdessen auch die Dipol–Dipol–Wechselwirkung zur Berechnung der Kopplungsstärken zwischen benachbarten BChla–Molekülen benutzt. Dies ist gerechtfertigt, da sich gezeigt hat, daß diese Näherung auch für Abstände, die kleiner als der Makrocycle sind, gute Ergebnisse liefert [Sch91]. Als Parameter C (siehe Gl.(4.5)) wurden hier $C_1 = 192400 \text{ \AA}^3 \text{ cm}^{-1}$ und $C_2 = 168800 \text{ \AA}^3 \text{ cm}^{-1}$ verwendet, so daß für den Fall keiner Deformation die alten Werte für ν_1 und ν_2 erreicht werden. Als Maß für die Abweichung von der eigentlichen, kreisförmigen Gestalt des LH1-Komplexes wurde die Exzentrizität ε gewählt. Sie ist definiert als

$$\varepsilon = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2} \quad \text{für} \quad a \geq b, \quad (4.9)$$

wobei a und b die Längen der langen bzw. kurzen Halbachse der Ellipse darstellen. Nach der Definition (4.9) liegen die Werte für ε zwischen 0 und 1. Die elliptische Deformation des Komplexes bzw. dessen Reduzierung auf eine C_2 -Symmetrie bewirkt wiederum eine Aufspaltung der Energieniveaus sowie eine Umverteilung der Oszillatorenstärke. Dies ist für die Zustände $|k=0\rangle$ bis $|k=\pm 3\rangle$ in Abb. 4.8 dargestellt. Eine diagonale Unordnung ist bei den Berechnungen nicht berücksichtigt worden. Man sieht in Abb. 4.8 (A) sehr deutlich eine Aufspaltung des $|k=\pm 1\rangle$ Zustandes bereits ab geringen Exzentrizitäten von $\varepsilon > 0,2$, während die anderen Zustände erst bei höheren Exzentrizitäten anfangen aufzuspalten. Insgesamt führt diese Störung zu einer Aufweitung der Exzitonenzonen. Aus Abb. 4.8 (B) erkennt man, daß in

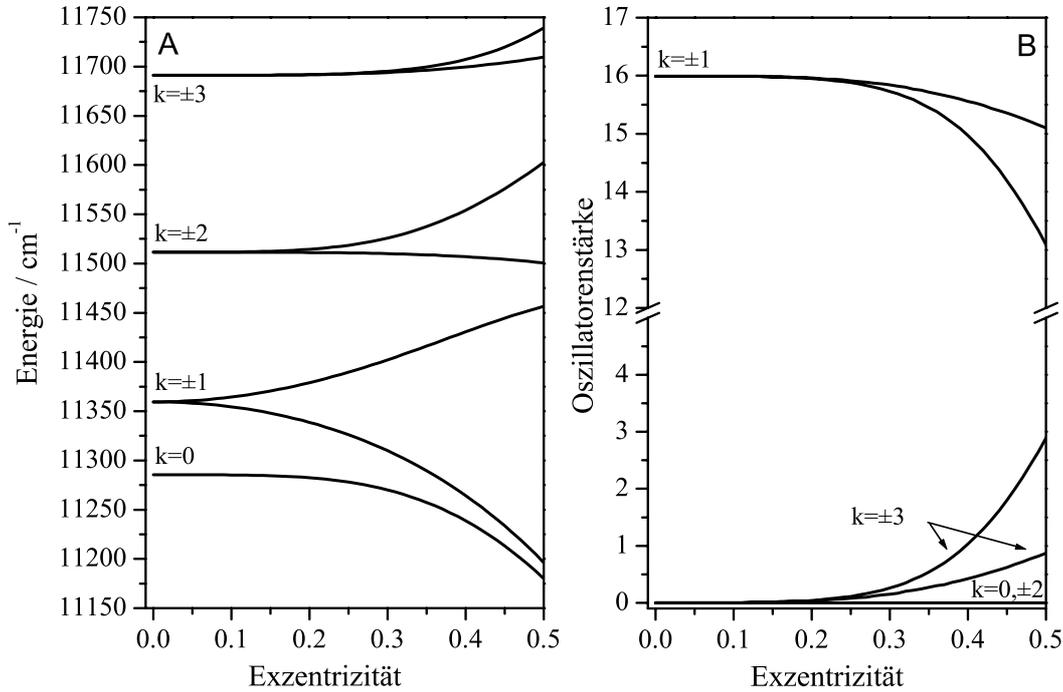


Abbildung 4.8: Simulation (A) der Aufspaltung der vier niedrigsten Energieniveaus und (B) deren Oszillatorenstärken in Abhängigkeit von der Exzentrizität. Die Berechnungen wurden bis $\varepsilon = 0,5$, was einem Achsenverhältnis von $a/b \approx 7/6$ entspricht, und ohne diagonale Unordnung durchgeführt.

dem hier dargestellten Bereich bis $\varepsilon = 0,5$ beinahe nur der Zustand $|k = \pm 3\rangle$ Oszillatorenstärke erhält. Alle anderen Zustände erhalten in diesem Bereich nur eine Oszillatorenstärke $f_k \leq 0,02$. Eine Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Elektrons auf dem deformierten Ring ist in Abb. 4.9 für die Zustände $|k = 0\rangle$ bis $|k = \pm 1\rangle$ wiedergeben, ebenso deren Dipolmomente. Eine elliptische Deformation hat demnach keinen Einfluß auf die Polarisation der Zustände $|k = \pm 1\rangle$, sie sind weiterhin orthogonal polarisiert.

Um ein möglichst vollständiges Bild der Eigenschaften eines elliptisch deformierten Komplexes zu erhalten, muß natürlich auch die diagonale Unordnung berücksichtigt werden. Ob eine Deformation einen zusätzlichen Einfluss auf eine vorhandene diagonale Unordnung besitzt, ist nicht bekannt. Was die Einführung einer Unordnung von $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ bewirkt, ist in Abb. 4.10 für die Zustände $|k = 0\rangle$ bis $|k = \pm 3\rangle$ dargestellt. In Abb. 4.10 (A) erkennt man beim Vergleich mit Abb. 4.8 (A) die zusätzliche, durch die diagonale Unordnung hervorgerufene Aufspaltung der Zustände. Die Größe

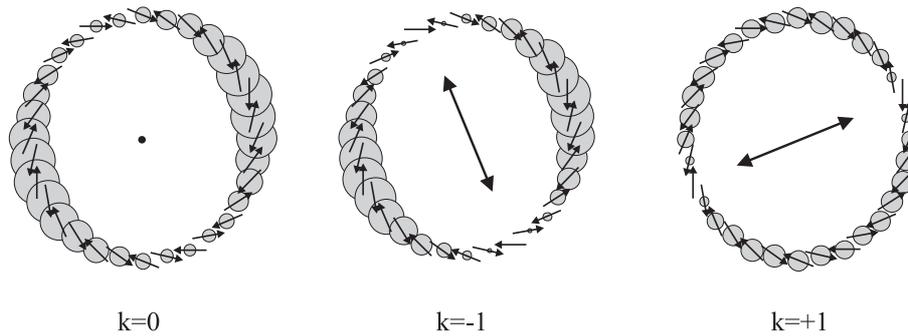


Abbildung 4.9: Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten (graue Kreise) des Elektrons für die Zustände $|k = 0\rangle$ bis $|k = ±1\rangle$ für eine Exzentrizität von $\varepsilon = 0,4$ bei $T=300\text{ K}$. Die Pfeile innerhalb der Ringe stellen das Dipolmoment des jeweiligen Zustandes dar. Der Zustand $|k = ±0\rangle$ besitzt kein Dipolmoment.

der Aufspaltung bei $\varepsilon = 0$ entspricht den in Kap. 4.1.2 berechneten Aufspaltungen für $w = 200\text{ cm}^{-1}$ (Abb. 4.8 (A)).

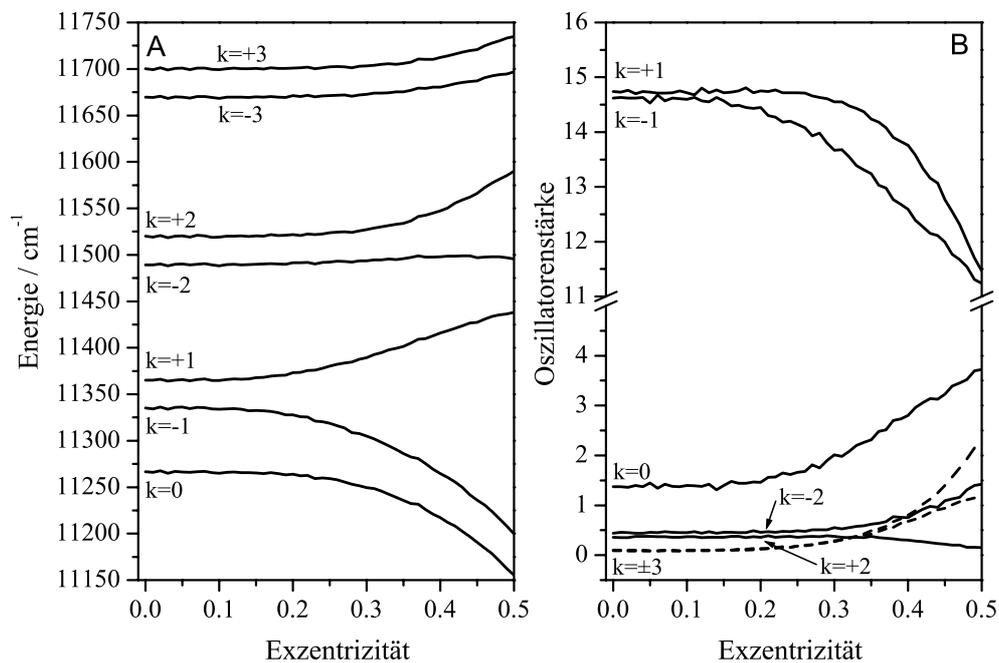


Abbildung 4.10: Simulation (A) der Aufspaltung der vier niedrigsten Energieniveaus und (B) deren Oszillatorenstärken bei einer diagonalen Unordnung von $w = 200\text{ cm}^{-1}$ in Abhängigkeit von der Exzentrizität. Bei den Berechnungen wurde über 1000 Aggregate gemittelt.

Der qualitative Verlauf der Zustandsenergien bei zunehmender Exzentrizität bleibt unverändert. Der in Abb. 4.8 (B) dargestellte Verlauf der Oszillatorenstärken zeigt,

daß die Zustände $|k=0\rangle$, $|k=\pm 2\rangle$ und $|k=\pm 3\rangle$ durch die diagonale Unordnung bei $\varepsilon = 0$ endliche Oszillatorenstärken besitzen. Die Werte der Oszillatorenstärken bei $\varepsilon = 0$ entsprechen den in Kap. 4.1.2 berechneten Werten für $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 4.8 (B)). Mit zunehmender Exzentrizität findet wiederum eine Umverteilung der Oszillatorenstärke von $|k=\pm 1\rangle$ auf alle anderen Zustände außer $|k=+2\rangle$ statt. Die Oszillatorenstärke des Zustandes $|k=+2\rangle$ bleibt bis ungefähr $\varepsilon = 0,25$ konstant und nimmt anschließend gleichmäßig ab.

4.1.3 Quadratische Deformation

Aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von 2D-Kristallen und aus Einzelpartikelanalysen des Kernkomplexes von *R. rubrum* wurde gefolgert, daß der RC-LH1-Komplex eine quadratische Deformation aufweisen könnte [Sta98]. Deshalb wird hier kurz der Einfluß einer solchen Deformation beschrieben.

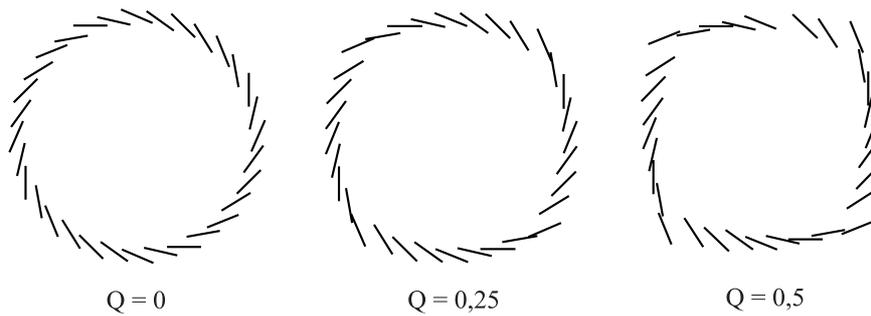


Abbildung 4.11: Modell für die quadratische Deformation des LH1-Komplexes. Dargestellt sind Deformationen für drei verschiedene Werte des Parameters Q . Die Lage der BChla-Moleküle im Ring wird durch die schwarzen Striche wiedergegeben

Auf die genaue mathematische Formulierung des Parameters Q , der die Stärke der quadratischen Deformation beschreibt, soll hier nicht weiter eingegangen werden. Wie sich die Deformation in dem hier benutzten Modell in Abhängigkeit von Q darstellt, ist aus Abb. 4.11 zu entnehmen.

Der Einfluß dieser quadratischen Deformation auf die Lage der Zustände $|k=0\rangle$ bis $|k=\pm 1\rangle$ und deren Oszillatorenstärke ist in Abb. 4.12 gezeigt. Man erkennt in Abb. 4.12 (A), daß von den ersten vier Zuständen nur der Zustand $|k=\pm 2\rangle$ eine Aufspaltung erfährt. Generell erfahren bei zunehmender Deformation nur die entarteten Zustände $|k=\pm n\rangle$ mit geradem n eine Aufspaltung, diese erhalten aber keine Oszillatorenstärke (Abb. 4.12 (B)).

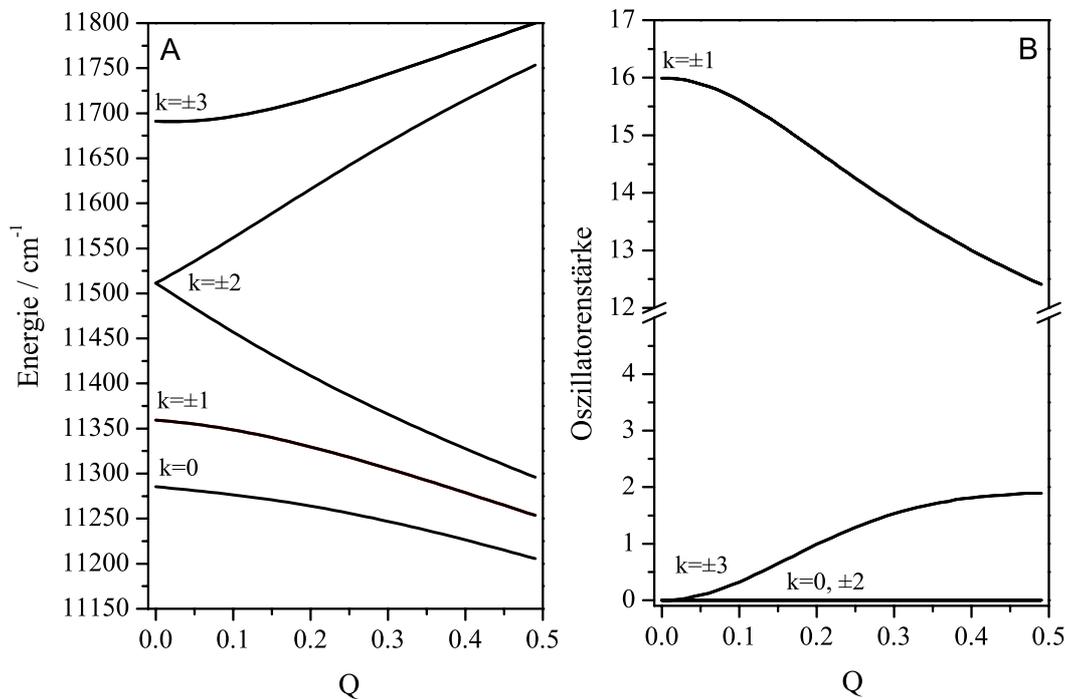


Abbildung 4.12: Simulation (A) der Aufspaltung der vier niedrigsten Energieniveaus und (B) deren Oszillatorenstärken in Abhängigkeit von der quadratischen Deformation Q (siehe Text).

Diese geht vom Zustand $|k = \pm 1\rangle$ nur auf die Zustände $|k = \pm n\rangle$ mit ungeradem n über. In Abb. 4.13 ist der Verlauf der Lage der Zustandsenergien und der Oszillatorenstärken in Abhängigkeit von der quadratischen Deformation Q wiedergegeben, wenn bei den Berechnungen zusätzlich noch eine diagonale Unordnung von $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ berücksichtigt wird. In Abb. 4.13 (A) erkennt man die durch die diagonale Unordnung hervorgerufene Aufspaltung der Zustände. Ansonsten bleibt der qualitative Verlauf der Zustandsenergien mit zunehmender quadratischer Deformation unverändert. Aus Abb. 4.13 (B) ist ersichtlich, daß durch die zusätzliche energetische Störung eine Umverteilung der Oszillatorenstärke von $|k = \pm 1\rangle$ auch auf die Zustände $|k = \pm 2\rangle$ und $|k = 0\rangle$ stattfindet (vgl. Abb. 4.12 (A)4). Die Größe der Aufspaltungen bzw. der Oszillatorenstärken bei $Q=0$ entsprechen den in Kap. 4.1.2 berechneten Werten für $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 4.8 (B)).

Sicherlich sind noch andere Arten der quadratischen Deformation als die in Abb. 4.11 dargestellte möglich. Die in Abb. 4.12 gezeigte Aufspaltung der Zustände und Umverteilung der Oszillatorenstärke sind aber eine generelle Eigenschaft der dem

LH1-Komplex aufgezwungenen C_4 -Symmetrie. Der genaue Verlauf der Aufspaltung ist jedoch von der exakten Anordnung der Pigmente bei der Deformation abhängig.

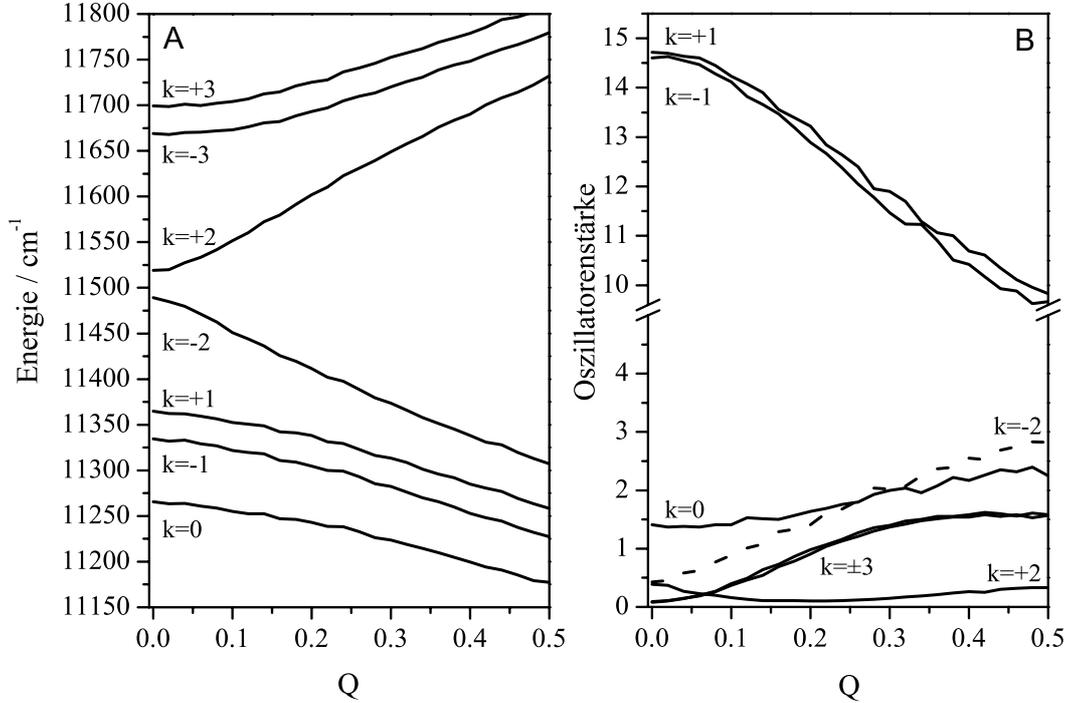


Abbildung 4.13: Simulation (A) der Aufspaltung der vier niedrigsten Energieniveaus und (B) deren Oszillatorenstärken in Abhängigkeit von der quadratischen Deformation Q bei einer diagonalen Unordnung von $w = 200 \text{ cm}^{-1}$. Bei den Berechnungen wurde über 500 Aggregate gemittelt.

4.2 Lokalisation der Anregung

4.2.1 Kohärenzlänge

In einem ungestörten Komplex besitzt die Wahrscheinlichkeit $P_n = \sum_k |c_{nk}|^2$, das Elektron am Ort des n -ten BChla-Moleküls anzutreffen, für alle n denselben Wert. Man sagt, das Elektron bzw. das Exziton ist vollständig delokalisiert. Durch die Einführung diagonalen Unordnung w oder Verzerrung verändern sich die Werte von P_n , so daß sich nun Bereiche finden lassen, in denen sich die Wahrscheinlichkeit, das Elektron zu finden, erhöht bzw. erniedrigt hat. Man spricht hierbei auch von einer Lokalisation des Exzitons. Generell fällt die Kohärenzlänge des Exzitons mit größer werdender Störung ab. Für den Grenzfall $w \rightarrow \infty$ gilt $N_{\text{coh}} = 1$ (vollständige

Entkopplung der Moleküle).

Um ein Maß für die Lokalisation bzw. Delokalisation zu besitzen, wurde der Begriff der Kohärenzlänge N_{coh} eingeführt, die eine mittlere Anzahl kohärent gekoppelter Moleküle des Aggregates angibt. In der Literatur lassen sich verschiedene Definitionen der Kohärenzlänge finden. Sehr häufig wird N_{coh} über die sog. *inverse participation ratio* $1/R$ definiert [Fid91] [Mon97]:

$$N_{\text{coh}}(E) = \frac{1}{R(E)} = \frac{\langle \sum_k \delta(E - E_k) \rangle}{\langle \sum_k \delta(E - E_k) \sum_n c_{nk}^4 \rangle}, \quad (4.10)$$

wobei E_k die Energie des k -ten exzitonischen Zustandes darstellt. Die spitzen Klammern bedeuten, daß über das Ensemble gemittelt wurde. Für ein einzelnes Aggregat vereinfacht sich Gl.(4.10) zu

$$N_{\text{coh}}(E_k) = \frac{1}{R(E_k)} = \frac{1}{\sum_n c_{nk}^4}, \quad (4.11)$$

Aus den Gln. (4.10) bzw. (4.11) erhält man die Kohärenzlängen der einzelnen Zustände $|k\rangle$ unabhängig davon, ob sie besetzt sind oder nicht. Um eine absolute, d.h. von $|k\rangle$ unabhängige Kohärenzlänge zu berechnen, werden die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten $|c_{nk}|^2$ mit der Boltzmann-Verteilung gewichtet [Tie01]. Daraus folgt

$$N_{\text{coh}}(T) = \frac{1}{\sum p_n(T)^2} \quad (4.12)$$

mit

$$p_n(T) = \frac{1}{Z} \sum_{k=0}^{N-1} |c_{nk}|^2 e^{-\frac{(E_k - E_0)}{k_B T}}. \quad (4.13)$$

Z bezeichnet hierbei die für die Normierung notwendige Zustandssumme $Z = \sum_n p_n$. Neben den hier vorgestellten Definitionen der Kohärenzlänge, gibt es, wie schon erwähnt, in der Literatur noch weitere Methoden zur Berechnung von N_{coh} [Mon97], so daß die Ergebnisse abhängig von der benutzten Definition sind. Es wird erwartet, daß die Kohärenzlänge mit abnehmender Temperatur steigt, da Störungen, die zur Lokalisation führen (z.B. dynamische Deformationen der Ringstruktur) bei tiefen Temperaturen geringer werden.

Experimentell wird die Kohärenzlänge aus der Modellierung der Ergebnisse z.B.

von Messungen der Superfluoreszenz oder der Anisotropie der transienten Absorption bestimmt. So ergaben Messungen der Superfluoreszenz bei Raumtemperatur eine Kohärenzlänge von $N_{\text{coh}} = 3-4$ für LH1 und LH2 [Mon97], und Messungen der transienten Absorption (ebenfalls bei Raumtemperatur) zeigten für den LH2-Komplex eine Kohärenzlänge von $N_{\text{coh}} = 4 \pm 2$ [Pul96b]. Aus Messungen der transienten Absorption bei tiefen Temperaturen ($T=77$ K) ergab sich für den LH1-Komplex eine Kohärenzlänge von $N_{\text{coh}} = 8$ [vG01]. Eine andere Messung bei $T=4$ K ergab für LH1 in Membranen einen Wert von $N_{\text{coh}} = 6$ [Wes98]

Es wurde weiterhin festgestellt, daß die gemessene Kohärenzlänge des Exzitons von der vergangenen Zeit nach Anregung des Exzitons abhängt [Boo00]. Experimente von Leupold *et al.* [Leu96] an LH2-Komplexen zeigten, daß das Exziton direkt nach der Anregung über den ganzen Ring delokalisiert ist, jedoch bei der Fluoreszenz eine Kohärenzlänge von $N_{\text{coh}} = 2$ besitzt. Für die Zeiten, die das Exziton zur Lokalisation benötigt, werden in der Literatur Werte in der Größe von 500 fs–1 ps angegeben. Die Lokalisation der Anregung ist damit um ungefähr drei Größenordnungen schneller als der strahlende Zerfall des Exzitons. Eine Modellierung des LH1-Komplexes von Leegwater [Lee96] ergab außerdem, daß neben der diagonalen Unordnung auch Phononen die Lokalisation beeinflussen. So fiel die Kohärenzlänge von $N_{\text{coh}} = 9, 7$ auf $N_{\text{coh}} = 4, 14$, wenn bei der Berechnung eine Elektron-Phonon-Wechselwirkung berücksichtigt wird (siehe auch Kap. 4.2.2).

Elektron-Phonon-Kopplung ist auch die Ursache dafür, daß sich das lokalisierte Exziton entlang des Ringes bewegen kann. Diese Bewegung wird durch die Zeit τ_{hop} (*hopping time*) beschrieben, in der das Exziton eine Distanz entsprechend seiner Kohärenzlänge zurückgelegt hat. In der Literatur werden für den LH1-Komplex Zeiten von $\tau_{\text{hop}} = 1, 2$ ps [vG01] und $\tau_{\text{hop}} < 1$ ps [Wes98] [Bra95] angegeben.

4.2.2 Polaron-Modell

Das in Kap. 4 beschriebene Exzitonen-Modell wurde bereits erfolgreich angewandt, um die Absorptionsspektren der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände der Q_y -Banden einzelner LH1- und LH2-Lichtsammelkomplexe zu beschreiben [Ger03a] [Ger03b][van99] [Mat01] [Ket02]. Auch der Zustand $|k = 0\rangle$, der in den Absorptionsspektren ebenfalls beobachtet wurde, scheint bezüglich seiner Lage relativ zum Absorptionsmaximum der $|k = \pm 1\rangle$ Bande durch das Modell vorhergesagt zu werden [Ket02] [Ger03b]. Die bei beiden Komplexen beobachtete große Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz bei tiefen Temperaturen [Tie99][vD88] kann mit diesem einfachen Modell jedoch nicht

erklärt werden. Computersimulationen der Messergebnisse transienter Absorption an LH2 von Polivka *et al.* [Pol00] zeigten ebenfalls, daß das Exzitonen-Modell nicht ausreicht, um die Ergebnisse anzupassen. Aus diesem Grund wurde von denselben Autoren vorgeschlagen, daß das delokalisierte Exziton mit der Proteinmatrix ein sog. Polaron ausbildet.

Der aus der Festkörperphysik stammende Begriff Polaron bezeichnet hierbei ein angeregtes Elektron das von einer dauerhaften Deformation der es umgebenden Matrix begleitet wird. Die Deformation entsteht durch eine lokale Wechselwirkung des Elektrons mit der Matrix (Elektron-Phonon-Wechselwirkung). Aufgrund der Wechselwirkung mit der Umgebung ist die Bildung eines Polarons mit einer Absenkung der Energie des angeregten Zustandes verbunden.

Das Modell von Polivka *et al.* beschreibt, daß die Bildung eines Polarons in einem einzelnen Lichtsammelkomplex zu einer starken Lokalisation der Anregung führt. Deshalb vermuten die Autoren, daß die an LH1 und LH2 gemessene starke Exzitonalokalisation eine direkte Folge der Polaronbildung darstellt. Die mit der Polaronbildung verbundene Absenkung der Energie ist dann der Grund für die bereits erwähnte Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz. Allerdings wird in der Arbeit von Polivka *et al.* keine Angabe über die erwartete Größe der Elektron-Phonon-Kopplung bzw. des Huang-Rhys-Faktors S (s. Kap. 5.1.1) gemacht.

4.3 Proteindynamik und spektrale Diffusion

Native Proteine besitzen eine wohldefinierte tertiäre bzw. quaternäre Struktur und weisen vielfach auch Strukturen auf, wie sie sonst nur in kristallinen Systemen anzutreffen sind. Doch im Gegensatz zu Kristallen sind Proteine keine statischen, sondern flexible, dynamische Systeme. Sie können viele voneinander leicht unterschiedliche, durch Energiebarrieren getrennte Konformationen (*conformational substates*, CS) annehmen. Die Energiebarrieren werden dabei entweder durch thermische Aktivierung oder Tunnelprozesse überwunden. Aus Untersuchungen der Reaktionskinetik von CO und Myoglobin von Frauenfelder *et al.* ließ sich folgern, daß in Proteinen die verschiedenen CS hierarchisch angeordnet sind, so daß die CS, die durch hohe Energiebarrieren getrennt sind, jeweils andere CS beinhalten, die durch kleinere Barrieren voneinander getrennt sind [Ans85] [Fra91]. Die CS, die durch vergleichbare Barrieren getrennt sind, werden als CS gleichen Ranges (engl. *rank* oder *tier*) bezeichnet. Die Höhe des Ranges ist dabei abhängig von den Energiebarrieren. Je höher der Rang, desto niedriger die Barriere zwischen den CS. Diese hierarchische

Organisation der CS unterscheidet Proteine von anderen komplexen Systemen wie z. B. Gläsern, bei denen die Energiebarrieren eine zufällige Anordnung besitzen. Die Frequenzen optischer Übergänge von an Proteine gebundenen Pigmenten sind wiederum abhängig von ihrer direkten Umgebung. Jede Änderung des CS des Proteins führt somit zu einer Änderung der Übergangsfrequenz. Dieses durch die Änderung des CS hervorgerufene „Springen“ von Absorptions- bzw. Emissionslinien wird als spektrale Diffusion bezeichnet.

Aus Lochbrenn-Experimenten an bakteriellen und pflanzlichen Lichtsammelkomplexen ist bekannt, daß spektrale Diffusion erst für Beobachtungszeiten von $t_D \geq 300$ ms einen Einfluß auf die gemessenen Linienbreiten hat [dH99]. Unterhalb von t_D wird die Linienbreite durch schnelle, lokale Fluktuationen des Proteins bestimmt, es liegt somit eine reine Dephasierung des Übergangs vor. Für den B820-Komplex ergaben diese Messungen einen Wert von $t_D \geq 100$ ms [Stö98][dH99].

Es zeigte sich auch, daß mit zunehmender Masse des Proteins die Zeit t_D abnimmt, d.h. schwere Moleküle zeigen weniger spektrale Diffusion als leichte. Aus dieser Massenabhängigkeit der spektralen Diffusion wird geschlossen, daß das ganze oder zumindest ein großer Teil des Proteins durch die Änderung des CS betroffen ist [dH99].

Kapitel 5

Optische Spektroskopie

Das in Kap. 4.1 vorgestellte Exzitonenmodell für den LH1-Komplex sagt einen energetischen Abstand von 74 cm^{-1} zwischen $|k=0\rangle$ und den nächst höherliegenden Zuständen $|k=\pm 1\rangle$ voraus. Bei tiefen Temperaturen ist dann gemäß der Boltzmann-Statistik nur der Zustand $|k=0\rangle$, der in einem ungestörten Komplex keine Oszillatorenstärke besitzt, besetzt. Andererseits ist aber bekannt, daß der LH1-Komplex bei tiefen Temperaturen fluoresziert. Das bedeutet, es liegen Störungen vor, die dazu führen, daß der Zustand $|k=0\rangle$ Oszillatorenstärke erhält.

Optische Spektroskopie in Verbindung mit der hohen Photostabilität bei tiefen Temperaturen erlaubt Einblicke in die energetische Struktur des Spektrums des LH1-Komplexes. Fluoreszenzspektren geben dabei Auskunft über die energetische Lage des tiefsten Zustandes, und aus polarisationsabhängigen Anregungsspektren lassen sich mit Hilfe des Exzitonen-Modells Aussagen über die Größe und Art eventueller Störung treffen.

Alle Messungen in diesem Kapitel wurden bei $T=1,8\text{ K}$ durchgeführt. Die Anregung der Lichtsammelkomplexe erfolgte für die Fluoreszenzspektren in der Q_y -Bande bei Wellenlängen um 865 nm bzw. für die Anregungsspektren in dem Wellenlängenbereich, der diese Bande umfaßt ($840\text{--}900\text{ nm}$).

Abbildung 5.1 zeigt eine konfokale Aufnahme einer LH1-Einzelmolekülprobe, wie sie vor Beginn jeder Messung gemacht wurde. Die Farbcodierung der Intensität ist als Balken neben dem eigentlichen Bild dargestellt, sie verläuft von blau (geringe Intensität) nach gelb (maximale Intensität). Jeder Spot in dem Bild markiert den Ort eines LH1-Komplexes auf der Probe. Für die eigentliche Messung wurde mit dem Scanner der Laserfokus auf einen Spot justiert und anschließend die Aufnahme

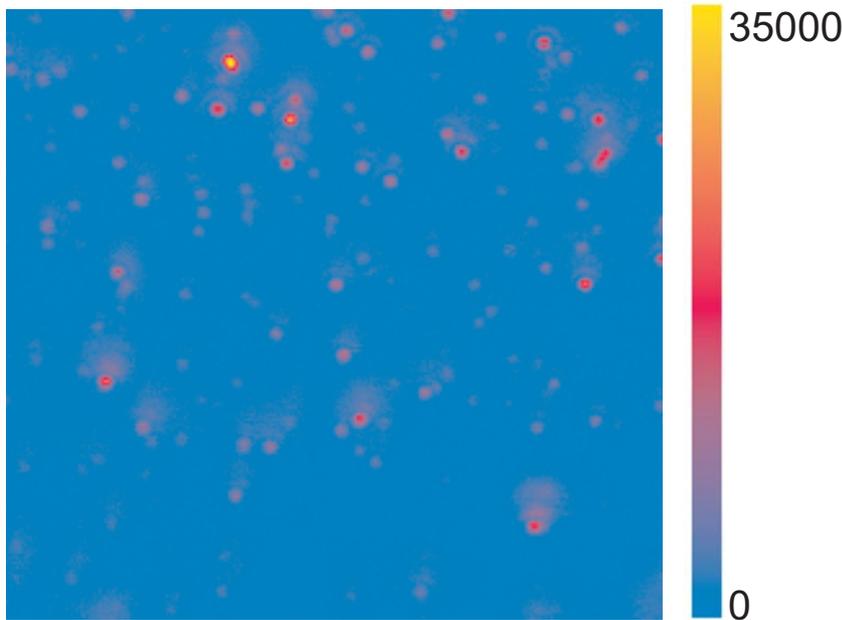


Abbildung 5.1: Konfokale Aufnahme einzelner rekonstituierter LH1-Komplexe bei $T=1,8\text{ K}$. (Aufnahmebereich $50 \times 50 \mu\text{m}^2$). Die Intensität ist farbcodiert (Balken rechts) und geht von blau (geringe Intensität) nach gelb (hohe Intensität).

des Spektrums gestartet.

Es ließ sich beobachten, daß das zeitliche Verhalten der Fluoreszenzintensität einzelner LH1- und RC-LH1-Komplexe bei $T=1,8\text{ K}$, abhängig von der Umgebung, Membran oder Detergens, große Unterschiede aufwies. Während beinahe alle untersuchten in die Lipiddoppelschicht rekonstituierten Komplexe konstante Fluoreszenzintensitäten besaßen, zeigte die Mehrzahl der Detergens-solubilisierten Komplexe Sprünge in der Fluoreszenzintensität. In Abb. 5.2 sind Traces von zwei Detergens-solubilisierten RC-LH1-Komplexen dargestellt. Es ließen sich Komplexe beobachten, bei denen die Fluoreszenz zwischen mehreren verschiedenen Werten springt (Abb. 5.2 (A)) oder ein „Blinken“ (Abb. 5.2 (B) und 5.7 (B)) (*random telegraph signal*) zeigt. Einige Komplexe zeigten auch lang anhaltende Dunkelzustände bis zu einigen Minuten, bei denen die Fluoreszenzintensität bis beinahe auf das Untergrundniveau abfiel (Abb. 5.2 (A) ab 100 s). Dieses Verhalten konnte auch bei den geringen Anregungsenergien, wie sie für die Anregungsspektren verwendet wurden, beobachtet werden und erschwerte somit die Aufnahme von Anregungs- sowie Fluoreszenzspektren Detergens-solubilisierter Komplexe.

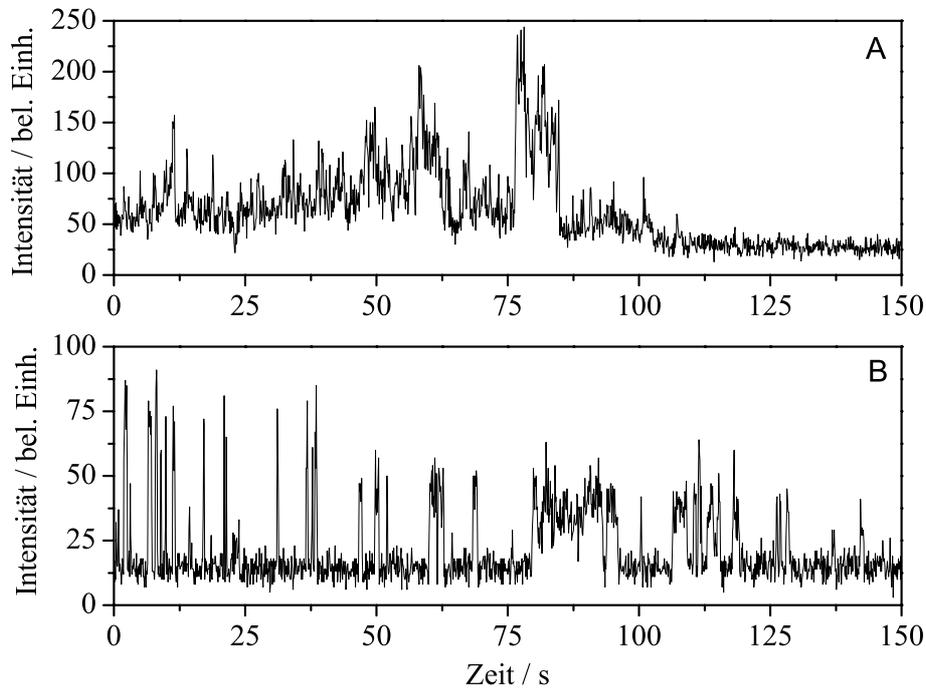


Abbildung 5.2: Fluoreszenztraces einzelner Detergens-solubilisierter RC-LH1-Komplexe (A, B) bei $T=1,8\text{ K}$ mit einer Zeitaufösung von 100 ms. Anregungswellenlänge 870 nm.

5.1 Fluoreszenzspektren einzelner Komplexe

5.1.1 LH1-Komplex

Abbildung 5.3 zeigt typische Fluoreszenzspektren Detergens-solubilisierter und rekonstituierter LH1-Komplexe, die bei einer Anregungswellenlänge von 865 nm aufgenommen wurden. Zur Unterdrückung des Anregungslaserlichtes in den Spektren wurde ein Notch-Filter (Kaiser Optical Systems) mit einer zentralen Wellenlänge von 865 nm und einer Breite von etwa 30 nm benutzt.

Die Spektren (A) und (B) zeigen mehr oder weniger stark ausgeprägt eine scharfe Linie, an die sich im roten eine breite Emissionsbande anschließt. Bei der scharfen Linie handelt es sich um eine Null-Phononen-Linie (*Zero-Phonon-Line*, ZPL). Diese ist der reine elektronische Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ aus dem tiefsten Zustand von S_1 in den Grundzustand. Die sich an die Null-Phononen-Linie anschließende breite Bande, die sog. Phononenseitenbande, ist ein elektronischer Übergang aus dem gleichen Niveau, bei dem zusätzlich noch Phononen, d. h. kollektive Schwingungen der umgebenden Proteinmatrix, angeregt werden. Das Auftreten von mehreren Linien in den Spek-

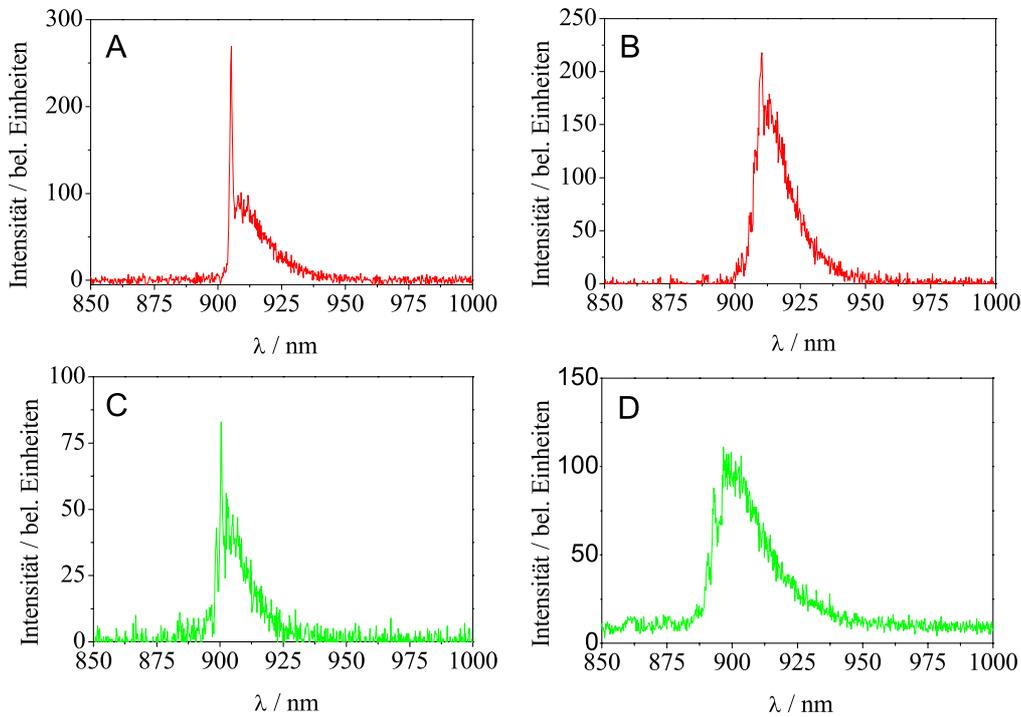


Abbildung 5.3: Fluoreszenzspektren von einzelnen rekonstituierten (A,B) und Detergenssolubilisierten (C,D) LH1-Komplexen bei $T=1,8\text{ K}$. Die Anregung erfolgte bei 865 nm .

tren (C) und (D) bzw. das „Ausschmieren“ der blauen Kanten der Spektren (B) und (D) läßt sich auf die in Kap.4.3 besprochene spektrale Diffusion zurückführen.

Um den Einfluß der spektralen Diffusion auf die Spektren zu veranschaulichen, wurde von einem einzelnen rekonstituierten LH1-Komplex eine Serie von 500 Emissionsspektren mit einer Mittelungszeit von 3 s aufgenommen. Abbildung 5.4 zeigt diese 500 zu einem Bild zusammengesetzten Spektren, wobei jede Bildzeile einem Spektrum entspricht. Die Intensität der Spektren ist ähnlich wie in Abb. 5.1 farbcodiert. Bei ungefähr 900 nm ist die Null-Phononen-Linie als heller Punkt in den Spektren sichtbar, an den sich die Phononenseitenbande, die als breite helle Struktur neben der Null-Phononen-Linie zu erkennen ist, anschließt. Man sieht, daß die Position der Null-Phononen-Linie nicht konstant ist, es existieren vielmehr mehrere spektrale Positionen um 900 nm , bei der die Linie auftreten kann.

Die Fluoreszenzintensität bei diesem Komplex ist nicht konstant. Es existieren Bereiche in Abb. 5.4, in denen die Fluoreszenz deutlich zunimmt, aber auch fast ganz verschwindet, wie z.B. bei $t \simeq 300\text{ s}$ bzw. bei $t \simeq 800\text{ s}$.

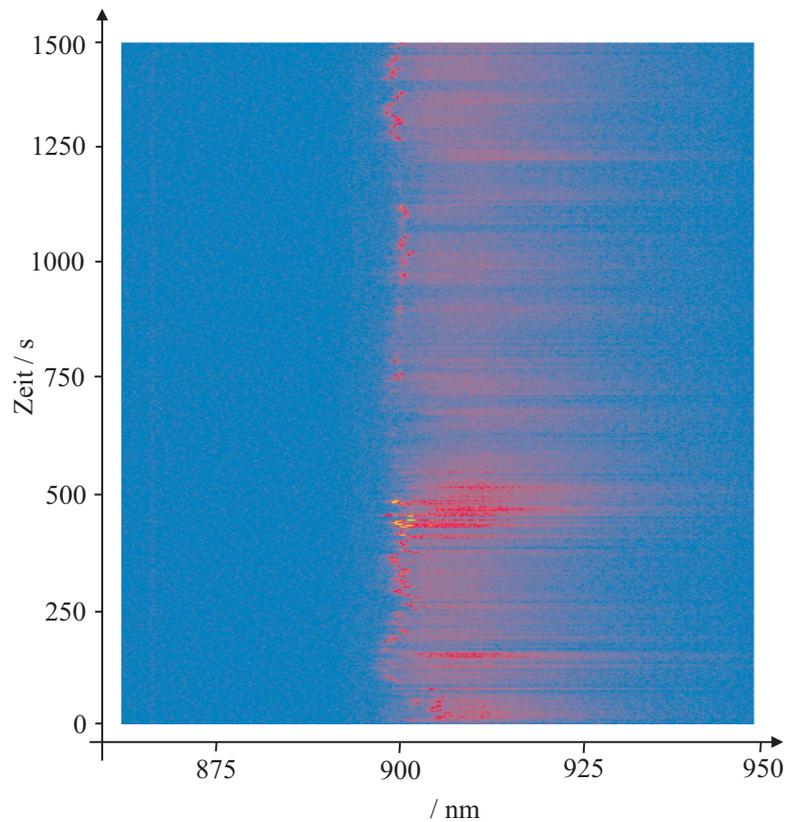


Abbildung 5.4: Serie von 250 in direkter Folge aufgenommener Emissionsspektren (Mittelungszeit 2 s) eines einzelnen rekonstituierten LH1-Komplexes bei $T=1,8$ K. Die Anregung erfolgte bei 865 nm mit einer Leistung von $\simeq 1$ mW. Die Intensität ist farbcodiert und geht von blau (geringe Intensität) nach gelb (hohe Intensität).

Die Verteilungen der spektralen Positionen der Null-Phononen-Linien, soweit diese aufgelöst werden konnten, bzw. der blauen Kanten der Spektren sind in Abb. 5.5 dargestellt. Die Breiten der Verteilungen liegen bei $105 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ für die rekonstituierten und bei $100 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ für die Detergens-solubilisierten Komplexe. Diese Breiten entsprechen in etwa den aus Lochbrenn-Experimenten gewonnenen Breiten von $150 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ für die Verteilung der Null-Phononen-Löcher des LH1-Komplexes von *Rb. sphaeroides* [Wu98].

Man erkennt, daß die Maxima der beiden Verteilungen um 5 nm gegeneinander verschoben sind. Hier machen sich die verschiedenen Umgebungen der Komplexe, Detergens und Lipiddoppelschicht, bemerkbar. Denn obwohl die Pigmente alle die gleiche Proteinumgebung besitzen, erfahren sie durch das die Komplexe umgebende Medium noch zusätzlich eine Wechselwirkung, die zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums führt. Solche durch die Umgebung verursachten Verschiebungen in Emission

oder Absorption werden als *solvent-shift* bezeichnet.

Die spektralen Positionen beider Maxima bei 900 nm für die rekonstituierten und bei 905 nm für die Detergens-solubilisierten Komplexe entsprechen Energien von 11110 cm^{-1} bzw. 11050 cm^{-1} . Diese liegen deutlich unter der berechneten Energie von 11285 cm^{-1} für den Zustand $|k=0\rangle$ ohne Störung (Kap. 4 Tab. 4.1). Ähnlich große Verschiebungen zwischen Absorption und Emission sind für den LH1- sowie den strukturell ähnlichen LH2 -Komplex aus Ensemble-Messungen bekannt [vD88].

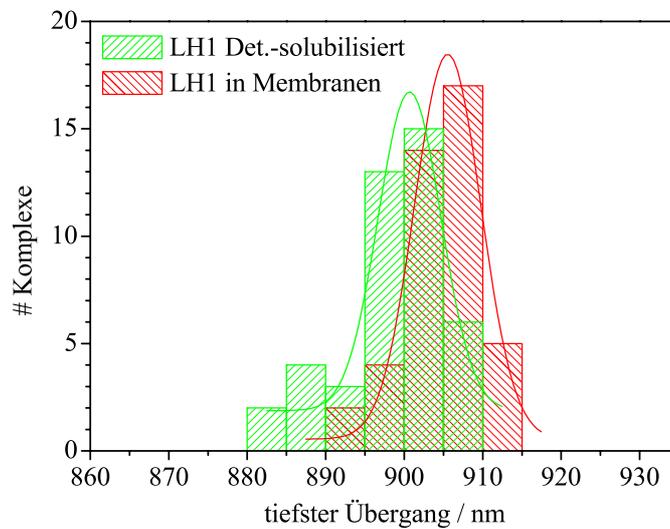


Abbildung 5.5: Spektrale Verteilung der Null-Phononen-Linien bzw. der blauen Kanten der Spektren für einzelne LH1-Komplex in den verschiedenen Umgebungen. Die Breiten der Verteilungen liegen bei $105 \pm 10\text{ cm}^{-1}$ (rekonstituierte Komplexe) und bei $100 \pm 10\text{ cm}^{-1}$ (Detergens-solubilisierter Komplexe).

Diese Absenkung der Energie läßt aufgrund ihrer Größe sich nicht allein mit dem Vorhandensein einer diagonalen Unordnung oder elliptischen Deformation begründen. Um diese Absenkung nur mit einer diagonalen Unordnung zu simulieren, sind Unordnungen von mehr als 500 cm^{-1} notwendig. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den in der Literatur angegebenen Werten von $200 - 250\text{ cm}^{-1}$ [Mon97]. Bei einer gegebenen Unordnung von 200 cm^{-1} müßte man, um die Rotverschiebung zu erhalten, eine konstante elliptische Verzerrung aller Komplexe von $\varepsilon \geq 0,5$ annehmen. Dies würde zu einer Aufspaltung der $|k=\pm 1\rangle$ Absorptionsbänder $\geq 250\text{ cm}^{-1}$ führen, die aber nicht beobachtet wurde (s. Kap. 5.2).

Eine Erklärung für die beobachtete Rotverschiebung bietet das in Kap. 4.2.2 vorgestellte Polaron-Modell von Polivka *et al.* [Pol00], das eine Absenkung der Energie des

emittierenden Zustandes gegenüber dem untersten exzitonischen Zustand und die Lokalisation der Anregung auf ein BChla-Molekül oder wenige Moleküle beschreibt. Wie bereits erwähnt ist eine starke Kopplung der Pigmente an die Proteinmatrix, d.h. eine starke Elektron-Phonon-Kopplung, eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Modells. Ein Maß für die Stärke der Kopplung ist der Debye-Waller-Faktor α , dieser ist für tiefe Temperaturen ($T \simeq 0$ K) definiert als [Goo00]

$$\alpha = e^{-S} . \quad (5.1)$$

Die Größe S ist der i. allg. temperaturabhängige Huang-Rhys-Faktor. Stark gekoppelte Systeme besitzen Huang-Rhys-Faktoren von $S > 1$, bei Werten von $S < 1$ spricht man von schwach gekoppelten Systemen. Aus den gemessenen Spektren läßt sich der Debye-Waller-Faktor aus dem Verhältnis der Intensitäten der Null-Phononen-Linie und der Gesamtintensität des Emissionsprofils ermitteln. Es gilt

$$\alpha = \frac{\int I_{\text{ZPL}} d\omega}{\int (I_{\text{ZPL}} + I_{\text{PSB}}) d\omega} , \quad (5.2)$$

wobei I_{ZPL} und I_{PSB} die spektralen Intensitäten der Null-Phononen-Linie und der Phononenseitenbande darstellen.

Die Debye-Waller-Faktoren wurden für sieben rekonstituierte LH1-Komplexe, deren Spektren eine klare Null-Phononen-Linie zeigten, berechnet und sind zusammen mit den daraus gewonnenen Werten für S in Tab. 5.1 aufgelistet. Die Null-Phononen-Linie wurde dabei mit einem Lorentz-Profil angepasst. Abbildung 5.6 zeigt ein Emissionsspektrum eines Komplexes, aufgetragen auf einer Energieskala, mit angepaßter Null-Phononen-Linie.

Aus den Anpassungen ergaben sich für die Null-Phononen-Linien Linienbreiten von ungefähr 20 cm^{-1} . Aufgrund spektraler Diffusion erscheinen daher die Linien ungefähr fünfmal breiter als die minimal auflösbare Linienbreite des Spektrographen. (Die sich aus der Fluoreszenzlebensdauer ergebende Breite beträgt $\sim 0,03 \text{ cm}^{-1}$ und ist somit nicht auflösbar.) Da aber nur die Flächen unter den Linienprofilen, d.h. die Anzahl der detektierten Photonen für die Berechnung verwendet werden, hat die spektrale Diffusion keinen Einfluß auf das Ergebnis. Aus Tab. 5.1 läßt sich erkennen, daß die Werte für α und S für die verschiedenen Komplexe keine großen Unterschiede aufweisen und die Kopplung an die Proteinmatrix bei einem mittleren Huang-Rhys-Faktor von $\bar{S} = 1,2 \pm 0,2$ eher als moderat zu betrachten ist.

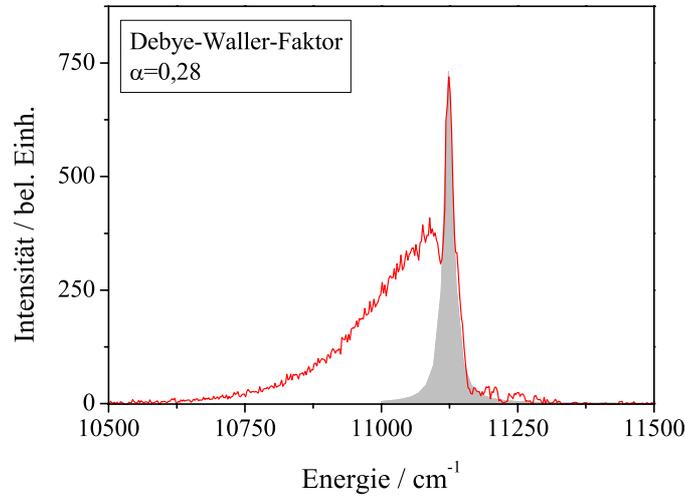


Abbildung 5.6: Emissionsspektrum eines rekonstituierten LH1-Komplexes bei $T=1,8\text{ K}$. Der Debye-Waller-Faktor α ergibt sich aus der Division der Fläche der Null-Phononen-Linie (grau) durch die Fläche des Gesamtprofils.

Komplex Nr.	Debye-Waller-Faktor α	Huang-Rhys-Faktor S
1	$0,28 \pm 0,05$	$1,27 \pm 0,03$
2	0,32	1,14
3	0,24	1,43
4	0,40	0,92
5	0,36	1,02
6	0,27	1,31
7	0,28	1,27
	$\bar{\alpha} = 0,31 \pm 0,05$	$\bar{S} = 1,2 \pm 0,2$

Tabelle 5.1: Debye-Waller-Faktoren und die daraus berechneten Huang-Rhys-Faktoren von sieben LH1-Komplexen bei $T=1,8\text{ K}$. Die mit den Mittelwerten angegebenen Fehler sind die Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes.

Der hier berechnete Wert \bar{S} ist allerdings deutlich größer als die in der Literatur angegebenen Huang-Rhys-Faktoren für bakterielle Lichtsammelkomplexe. So wurden aus Anpassungen von theoretischen Spektren an Fluoreszenzspektren des B820-Komplexes ein Huang-Rhys-Faktor von $S \simeq 0,5$ ermittelt [Pul95], und aus Lochbrenn-Experimenten ergaben sich Werte von $S \simeq 0,3$ für den LH1- und LH2-Komplex von *Rb. sphaeroides* bzw. *Rps. acidophila* [Sma95] [Red92]. Polivka *et al.*

weisen aber darauf hin, daß Polaronzustände nicht absorbieren [Pol00], so daß die aus Absorptionsexperimenten gewonnenen Werte für S nicht mit den tatsächlichen Huang–Rhys–Faktoren der Polaronzustände übereinstimmen.

Die Polarisation der Fluoreszenz wurde ebenfalls untersucht. Dies wurde technisch realisiert, indem ein Glan–Thompson–Polarisator in einer motorisierten drehbaren Halterung (OWIS GmbH) in den Nachweisstrahlengang eingebaut wurde und mit einer festen Umdrehungsgeschwindigkeit (zwischen 0,5 und 2 Umdreh./s) während der Messung rotierte. Der so aufgenommene zeitliche Verlauf der Fluoreszenz zeigt dann, wenn die Polarisation des emittierten Lichtes eine Vorzugsrichtung besitzt, eine \cos^2 -förmige Modulation. In Abb. 5.7 ist solch ein gemessener Verlauf von 2 Komplexen gezeigt. Der Polarisationsgrad p des Lichts läßt sich definieren als

$$p = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max}}, \quad (5.3)$$

wobei I_{\max} und I_{\min} die maximale bzw. minimale Intensität der Modulation nach dem Subtrahieren des Untergrundes darstellen. Ein Polarisationsgrad von $p = 1$ bedeutet somit, daß das Licht vollständig linear polarisiert ist, $p = 0$ bedeutet, daß das Licht zirkular bzw. unpolarisiert ist. Die Auswertung der Traces wurde mit einem selbst entwickelten Computerprogramm durchgeführt [Tie01].

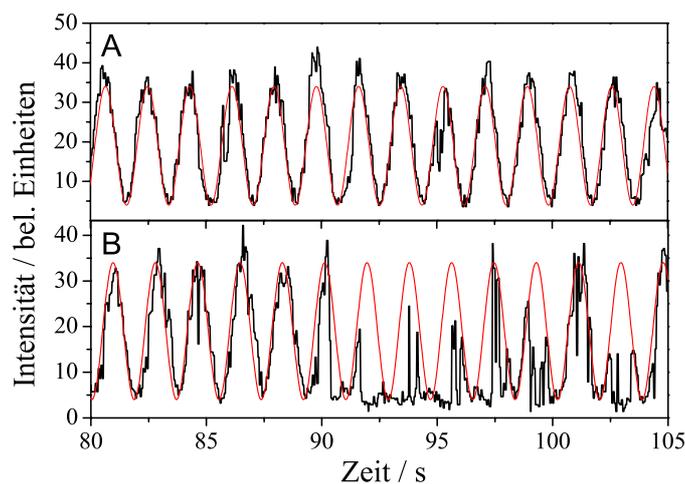


Abbildung 5.7: Fluoreszenztraces (schwarz) einzelner LH1-Komplexe gemessen mit rotierendem Polarisator vor dem Photodetektor. Ein rekonstituierter Komplex (A) mit konstanter Fluoreszenz und ein Detergens-solubilisierter Komplex (B) mit Intensitätssprüngen (blinking). Die rote Kurve ist eine Anpassung mit einer Funktion $\sim \cos^2$. Die zeitliche Auflösung beider Traces beträgt 20 ms.

Die Ergebnisse dieser Messungen für den LH1-Komplex in den verschiedenen Umgebungen sind in Abb. 5.8 dargestellt. Die Fluoreszenz der meisten Komplexe zeigt einen sehr hohen Polarisationsgrad von $p \geq 0,8$ und ist somit als linear polarisiert zu betrachten. Allerdings ließen sich bei beiden Präparationsmethoden auch Komplexe finden, deren Fluoreszenz einen deutlich geringeren Polarisationsgrad aufwies.

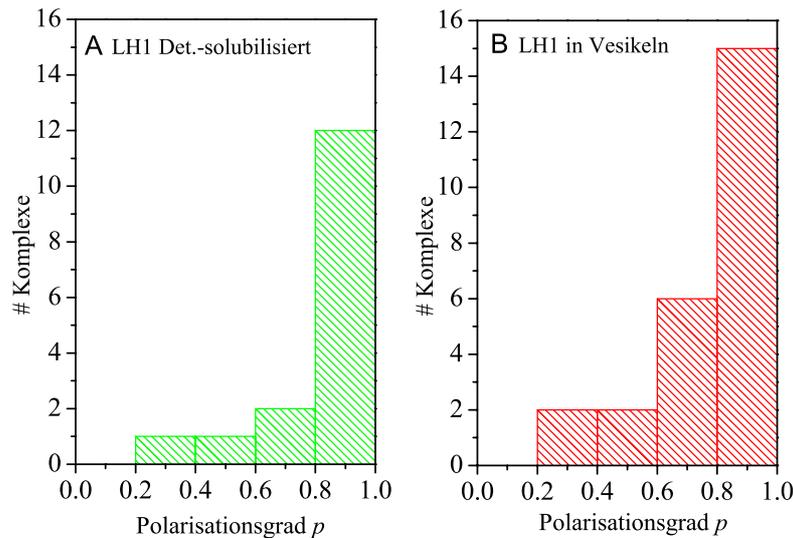


Abbildung 5.8: Verteilung der gemessenen Polarisierung bei $T=1,8\text{K}$ für (A) Detergenssolubilierte und (B) in Membranen rekonstituierte LH1-Komplexe.

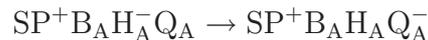
Daß beide Verteilungen ein Maximum bei einem Polarisationsgrad von $p \geq 0,8$ besitzen, zeigt, daß der Vektor des Dipolübergangs bei den meisten Komplexen annähernd konstant in seiner Lage bleibt. Wie schon in Kap. 4.2.1 dargestellt, ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Exzitons aufgrund diagonaler Unordnung und einer möglicherweise elliptischen Verzerrung schon unmittelbar nach der Absorption nicht gleichmäßig über den Ring verteilt. Eine bevorzugte Aufenthaltswahrscheinlichkeit könnte die Ursache dafür sein, daß die Lokalisation des Exzitons immer auf einer bestimmten Gruppe von Pigmenten stattfindet. Der Übergangsdipol bliebe dann bei jedem Emissionsakt annähernd gleich und die Fluoreszenz wäre linear polarisiert. Eine Lokalisation an mehreren Orten auf dem Ring wäre dann die Ursache für die Messungen, die einen geringeren Polarisationsgrad ergaben. Eine Lokalisation an beliebigen Orten ist jedoch ausgeschlossen, da dies zu einem Polarisationsgrad von Null führen würde.

Eine andere denkbare Erklärung für das Auftreten deutlich geringerer Polarisations-

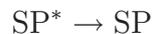
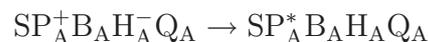
grade als eins wäre das Vorhandensein von LH1–Aggregaten auf den Proben. Aufgrund des bei den Präparationen verwendeten sehr großen Lipid/Protein-Verhältnisses (für die Vesikel) bzw. des hohen Detergensanteils erscheint dies doch eher unwahrscheinlich.

5.1.2 RC–LH1–Komplex

Durch die schonende Isolation der Lichtsammelkomplexe aus den photosynthetischen Membranen und die Probenpräparation bleibt die Funktionalität des Reaktionszentrums unverändert. Das bedeutet, das *special pair* ist weiterhin in der Lage, Photonen bzw. Energie aus dem LH1–Komplex zu absorbieren und damit die Ladungstrennung zu initiieren. Im weiteren soll nun kurz erläutert werden, warum das Reaktionszentrum trotz erhaltener Funktionalität nicht fluoreszieren kann. Nach der Absorption eines Photons oder Exzitons geht das Reaktionszentrum in den Zustand $SP^+_A B_A H_A Q_A Q_B^-$ über, in dem das Quinon Q_B reduziert und das *special pair* (SP) oxidiert vorliegen (s. Kap. 3.3). Der Schritt



während der Ladungstrennung ist jedoch irreversibel [Ber00], so daß der Rücktransfer des Elektrons nicht möglich ist. Aufgrund des Fehlens eines Reduktionsmittels und der tiefen Temperatur kann das ionisierte *special pair* SP^+ auch kein Elektron mehr aufnehmen und ist somit inaktiv. Wegen des inaktiven *special pairs* sowie der Unmöglichkeit des Rücktransfers des Elektrons vom reduzierten Quinon können die beiden strahlenden Prozesse



der Ladungsrekombination bzw. Relaxation nicht stattfinden [Ber00]. Das Reaktionszentrum kann bei dieser Art der Probenpräparation somit nicht fluoreszieren. Auch eine direkte Anregung des ionisierten *special pairs* ist aufgrund der zu erwartenden Rotverschiebung der Absorption ausgeschlossen. So verschiebt sich z. B. bei dem pflanzlichen Photosystem I (PSI) die Absorption des neutralen *special pairs* (P700) nach der Ionisation um ca. 140 nm in den roten Spektralbereich (P860⁺). Abbildung 5.9 zeigt Fluoreszenzspektren von rekonstituierten und Detergens-solubilisierten RC-LH1–Komplexen. Die Komplexe wurden mit einer Wellenlänge von

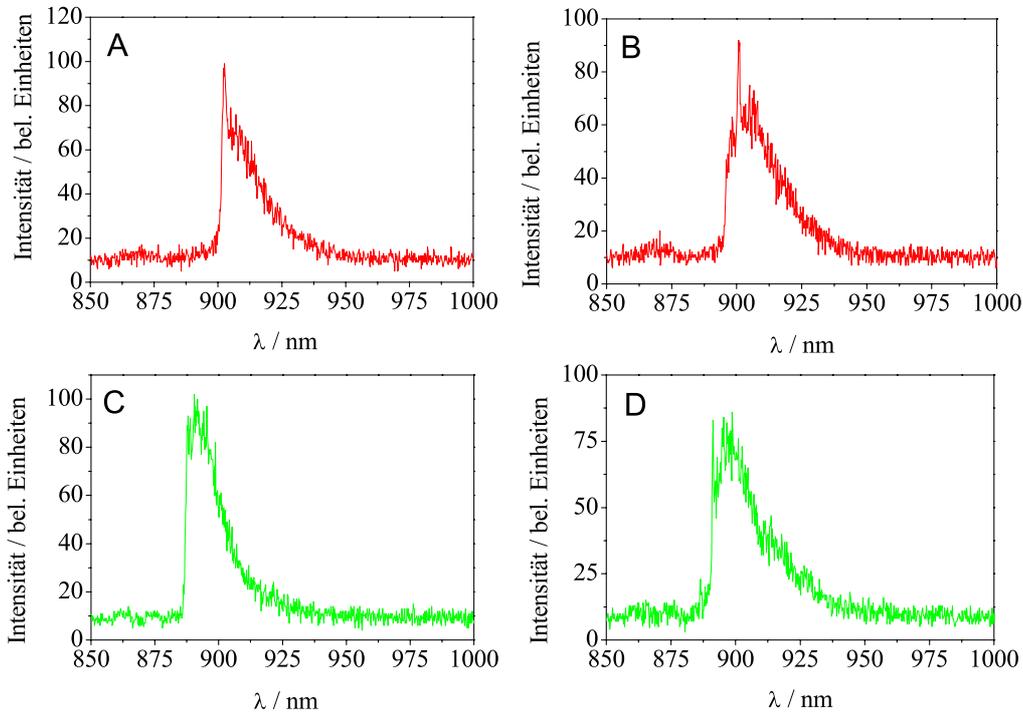


Abbildung 5.9: Fluoreszenzspektren von einzelnen rekonstituierten (A,B) und Detergens-solubilierten (C,D) RC-LH1-Komplexen bei $T=1,8$ K. Die Anregung erfolgte bei 865 nm

865 nm angeregt. Die Spektren der Kernkomplexe gleichen in ihrer Struktur den in Kap. 5.1.1 gemessenen Spektren des LH1-Komplexes. Auch hier war es möglich, Komplexe zu finden, die scharfe Null-Phononen-Linien, wie in Abb. 5.9 (A) und (B) zu sehen, bzw. eine steile Kante (Abb. 5.9 (C)) am blauen Ende ihrer Spektren aufwiesen. Es zeigte sich, daß bei vergleichbaren Meßbedingungen deutlich weniger Detergens-solubilierte Komplexe eine Null-Phononen-Linie bzw. eine steile Kante zeigten als die rekonstituierten Komplexe.

Die Verteilung der spektralen Positionen der Null-Phononen-Linien bzw. der blauen Kanten sind für den rekonstituierten Komplex in Abb. 5.10 gezeigt. Aufgrund der geringen Anzahl von Null-Phononen-Linien bzw. steilen Kanten in den Spektren ist die Verteilung für die Detergens-solubilierten Komplexe nicht aussagekräftig und wurde daher weggelassen. Die spektrale Position des Maximums bei 900 nm und die Breite der Verteilung mit $86 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ sind vergleichbar mit den für den LH1-Komplex bestimmten Werten.

Ebenfalls wurden der Debye-Waller-Faktor bzw. Huang-Rhys-Faktor für fünf Komplexe bestimmt, die eine deutliche Null-Phononen-Linie zeigten (s. Tab. 5.2). Die

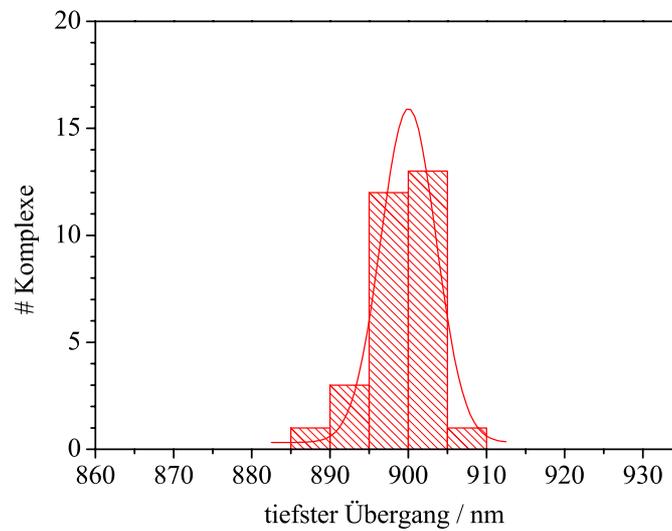


Abbildung 5.10: Spektrale Verteilung der Null-Phononen-Linien bzw. der blauen Kanten der Spektren für einzelne rekonstituierte RC-LH1-Komplexe. Die Verteilung besitzt eine Breite von $86 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$.

Huang-Rhys-Faktoren der einzelnen Komplexe sind wiederum als moderat anzusehen, ihr Mittelwert liegt mit $\bar{S} = 1,6 \pm 0,3$ jedoch um 25% über dem Wert für die LH1-Komplexe.

Komplex Nr.	Debye-Waller-Faktor α	Huang-Rhys-Faktor S
1	$0,20 \pm 0,05$	$1,60 \pm 0,05$
2	0,32	1,14
3	0,21	1,57
4	0,18	1,71
5	0,15	1,89
6	0,15	1,89
	$\bar{\alpha} = 0,20 \pm 0,06$	$\bar{S} = 1,6 \pm 0,3$

Tabelle 5.2: Debye-Waller-Faktoren und die daraus berechneten Huang-Rhys-Faktoren von sechs RC-LH1-Komplexen bei $T=1,8\text{K}$. Die mit den Mittelwerten angegebenen Fehler sind die Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes.

Ob es sich bei dieser stärkeren Kopplung der Chlorophylle an die Proteinmatrix um eine generelle Eigenschaft des Kernkomplexes handelt, läßt sich aufgrund der schlechten Statistik nicht eindeutig feststellen.

5.1.3 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden LH1- und RC-LH1-Komplexe mittels Emissionsspektroskopie untersucht. Viele Komplexe zeigten ein strukturiertes Spektrum, bestehend aus einer Null-Phononen-Linie mit angeschlossenen Phononenseitenband. Aus dem Histogramm der Positionen der Null-Phononen-Linien bzw. blauen Kanten ergab sich eine Rotverschiebung des tiefsten Zustandes. Diese Verschiebung läßt sich mit dem Exziton-Modell allein nicht erklären. Als eine mögliche Ursache für die Absenkung der Energie wird die Ausbildung eines Polaron-Zustandes vorgeschlagen, der allerdings eine starke Kopplung der Chlorophyll-Moleküle an die Proteinmatrix voraussetzt. Das Auftreten von Null-Phononen-Linien läßt aber eher auf eine mäßige bis schwache Kopplung schließen. Für einige Komplexe, deren Spektren es zuließen, wurden deshalb die Huang-Rhys-Faktoren S berechnet. Für den LH1-Komplex und den RC-LH1-Komplex ergaben sich dabei Werte von $\bar{S} = 1,2 \pm 0,2$ bzw. $\bar{S} = 1,6 \pm 0,3$.

5.2 Fluoreszenz-Anregungsspektren einzelner Komplexe

Der Einfluß der diagonalen Unordnung sowie einer Verzerrung des Ringes auf die spektrale Lage der Niveaus wurde bereits in Kap.4.1.1 theoretisch behandelt. Um die Lage der $|k = \pm 1\rangle$ und eventuell weiterer Zustände experimentell zu bestimmen, um Aussagen über die Störungen der LH1-Komplexe zu machen, wurden Anregungsspektren einzelner Lichtsammelkomplexe aufgenommen. Dabei wurde der Anregungslaser (lineare Polarisierung) schrittweise zwischen 830 und 905 nm durchgestimmt und die Fluoreszenz ab ca. 906 nm bei jedem Schritt aufgezeichnet. Zur Unterdrückung des Anregungslasers wurde ein Langpassfilter (905 AELP, Omega) mit einer Kante bei 905 nm vor dem Detektor plaziert. Die Mittelungszeit pro Schritt lag je nach Fluoreszenzrate des zu untersuchenden Komplexes zwischen 50 und 200 ms. Zusätzlich wurde das Polarisationsverhalten der Absorptionsbanden untersucht, indem von jedem Komplex eine Serie von sechs Spektren gemacht wurde, die sich um jeweils 30° in der Polarisationsrichtung des Anregungslasers unterschieden. Nach jeder Serie wurde ein Spektrum des Untergrundes an einem Punkt in der direkten Umgebung des gleichen Moleküls aufgenommen. Der Untergrund wurde anschließend von dem Molekülspektrum abgezogen. Für die Aufnahme der Spektren wurden die Lichtsammelkomplexe mit einer Leistung, je nach Helligkeit des Moleküls,

zwischen 50 und 250 nW angeregt.

Zeigte sich eine Polarisationsabhängigkeit der Lage der Spektren, so wurden die gemessenen Banden auf einer Energieskala mit einem Lorentz-Profil angepasst und aus der Lage der Maxima der energetische Abstand ermittelt. Der geschätzte Fehler bei der Bestimmung der Maxima liegt bei $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$.

Für die Aufnahme von polarisationsabhängigen Anregungsspektren ist die Kenntnis der Orientierung der Ringebeine zum Anregungslicht von Bedeutung. Da nur die Projektion der Dipolmomente auf das Substrat beobachtbar ist, führt jede Verkipfung der Ringebeine zu einem Verlust der Orthogonalität der Zustände $|k = \pm 1\rangle$. Weiterhin verkleinert sich auch der Betrag der Dipolmomente, was sich in einer Verringerung der Fluoreszenz des jeweiligen Zustandes bemerkbar machen sollte.

Die Immobilisierung der Detergens-solubilisierten LH1-Komplexe auf Glimmer bietet den Vorteil, daß die Orientierung des Komplexes auf dem Substrat bekannt ist. Messungen an auf Glimmer immobilisierten LH2-Komplexen von Bopp *et al.* [Bop97] ergaben, daß alle Komplexe liegend, d.h. mit der Ringebeine parallel zur Oberfläche, auf dem Substrat immobilisieren. Das gleiche Verhalten wird auch für den LH1-Komplex erwartet.

5.2.1 LH1-Komplex

Abbildung 5.11 zeigt typische Anregungsspektren rekonstituierter (A), (B) und Detergens-solubilisierter LH1-Komplexe (C), (D). Die roten und blauen Spektren wurden bei zueinander orthogonaler Polarisation des Anregungslasers aufgenommen. Alle Komplexe zeigten Absorptionsbänder mit einer Breite von $250 - 300 \text{ cm}^{-1}$, entsprechend einer Dephasierungszeit von einigen 10 fs.

Eine Vielzahl der Spektren der rekonstituierten Komplexe enthielten nur eine in ihrer Position von der Polarisation des Anregungslasers annähernd unabhängige Bande im Anregungsspektrum (Abb.5.13 (C)). Die Maxima der gemessenen Banden lagen zwischen 870 und 890 nm. Weitere Banden ließen sich in diesen Spektren nicht feststellen. Das Auftreten nur einer polarisationsunabhängigen Absorptionsbande in den Spektren bedeutet, daß die $|k = \pm 1\rangle$ Zustände der gemessenen Komplexe ihre energetische Entartung beibehalten. Es muß somit eine Störung der Komplexe vorliegen, die (i) eine Umverteilung der Oszillatorenstärke auf den $|k = 0\rangle$ Zustand bewirkt, aber (ii) die Entartung der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ nahezu unbeeinflusst läßt. Solche Spektren lassen sich mit einer moderaten diagonalen Unordnung von 150 cm^{-1} simulieren. Es ergaben sich hierbei energetische Aufspaltungen der Zustände $|k = \pm 1\rangle$

von $24 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$. Die Einführung einer elliptischen Verzerrung, d.h. strukturellen Unordnung erscheint überflüssig bei der Erklärung der gemessenen Aufspaltungen.

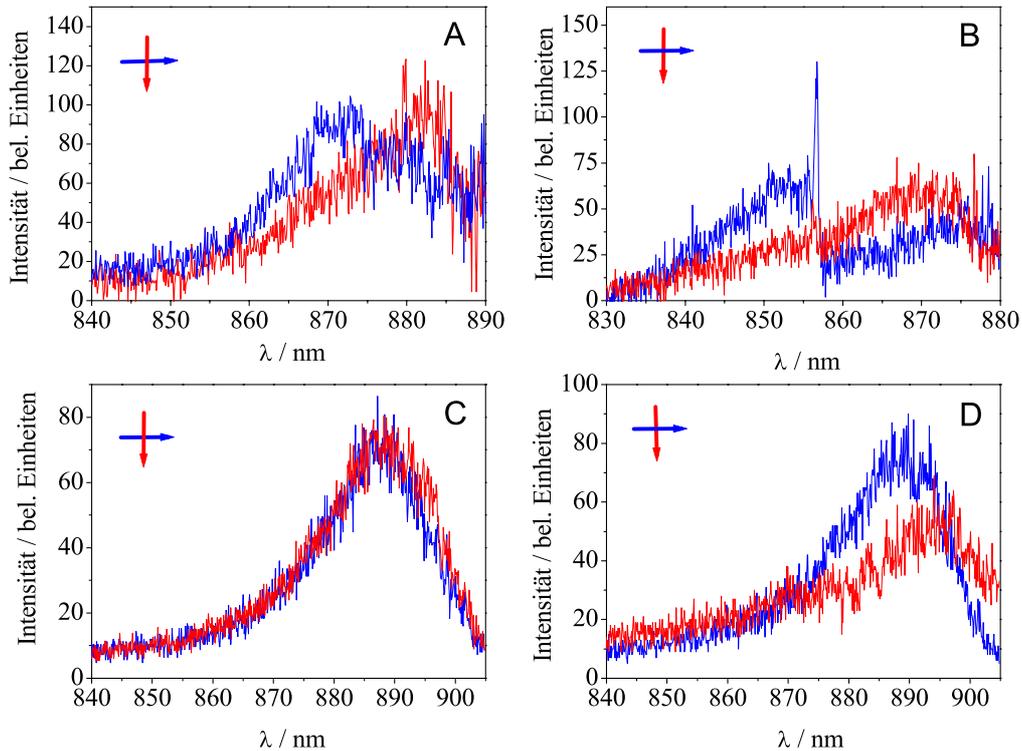


Abbildung 5.11: Anregungsspektren einzelner LH1-Komplexe (A, B) Detergens-solubilisiert und (C, D) in Membranen. Die roten und blauen Spektren wurden bei orthogonaler Polarisation des Anregungslasers aufgenommen.

Ungefähr 30% der untersuchten Komplexe zeigten allerdings in den Spektren eine größere Aufspaltung der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände, die nur durch die Einführung einer deutlich größeren diagonalen Unordnung als 150 cm^{-1} oder zusätzlichen Störung, wie z.B. der elliptischen Deformation (siehe Kap.4.1.2), erklärt werden kann. Das Histogramm der gemessenen Aufspaltungen ist in Abb. 5.13 gezeigt.

In drei Spektren des rekonstituierten LH1-Komplexes ließen sich zusätzlich die Absorption des Zustandes $|k = 0\rangle$ als scharfe Linien auf der roten Flanke der Banden beobachten (s. Abb.5.12). Daß diese Linie nicht in jedem Spektrum sichtbar ist, ist eine Folge der starken spektralen Diffusion des Zustandes $|k = 0\rangle$, wie sie auch schon für den LH2-Komplex beobachtet wurde [Ket01].

Die spektralen Parameter für den Zustand $|k = 0\rangle$ sind für jeden der drei Komplexe in

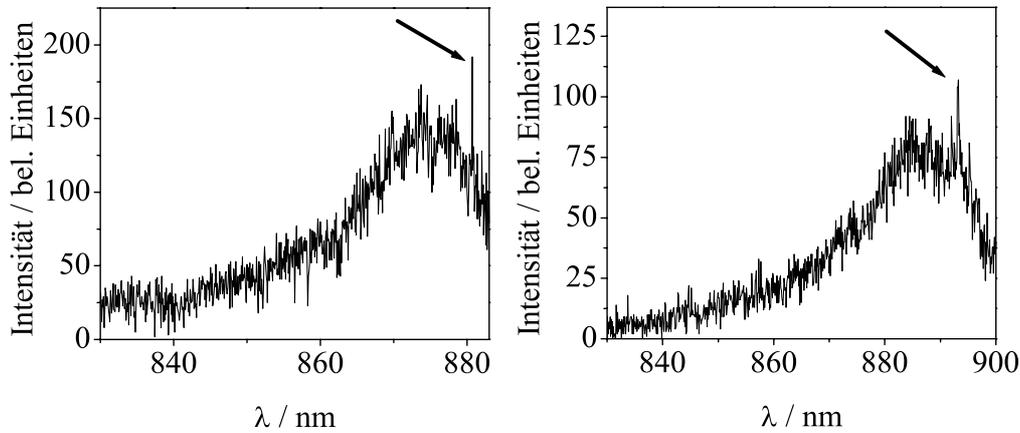


Abbildung 5.12: Anregungsspektren zweier rekonstituierter LH1-Komplexe. Die Absorption des Zustandes $|k=0\rangle$ ist als scharfe Linie (Pfeil) auf den Flanken der Spektren zu beobachten.

Tab. 5.3 aufgelistet. Alle drei Spektren zeigten eine Aufspaltung der Absorption der Zustände $|k=\pm 1\rangle$, die in Tab. 5.3 als $\Delta E_{\pm 1}$ bezeichnet wird. Der Wert ΔE_{01} ist deshalb der Abstand der $|k=0\rangle$ Absorption vom Mittelwert der spektralen Positionen der Maxima der Zustände $|k=\pm 1\rangle$. Unter Berücksichtigung der spektralen Diffusion liegt der Mittelwert $\overline{\Delta E_{01}} = 74 \pm 27 \text{ cm}^{-1}$ im Bereich des berechneten Wertes von $\geq 76 \text{ cm}^{-1}$ (Kap. 4.1.1, Abb. 4.6). Die Beobachtbarkeit und die spektrale Lage dieser Linie sind eine Bestätigung für die Anwendbarkeit des in Kap.4 vorgestellten Exzitonen-Modells auf den LH1-Komplex.

Komplex Nr.	spektrale Position (nm)	$\Delta E_{\pm 1}$ (cm^{-1})	ΔE_{01} (cm^{-1})
1	893,2	83 ± 10	46 ± 10
2	994	20	64
3	892,5	30	111
$\overline{\Delta E_{01}} = 74 \pm 27$			

Tabelle 5.3: Linienposition des tiefsten Zustandes $|k=0\rangle$ und sein Abstand ΔE_{01} vom Absorptionsmaximum der Zustände $|k=\pm 1\rangle$ für drei LH1-Komplexe sowie die Aufspaltung $\Delta E_{\pm 1}$ der Zustände $|k=\pm 1\rangle$. Als Fehler des Mittelwertes ist die Standardabweichung angegeben.

Die Mehrzahl der untersuchten Detergens-solubilisierten Komplexe zeigten zwei spektral verschobene, zueinander orthogonale Absorptionsbanden (Abb. 5.11 (A)) zwischen 840 und 890 nm. Es ließen sich Aufspaltungen der Banden bis zu 300 cm^{-1} mes-

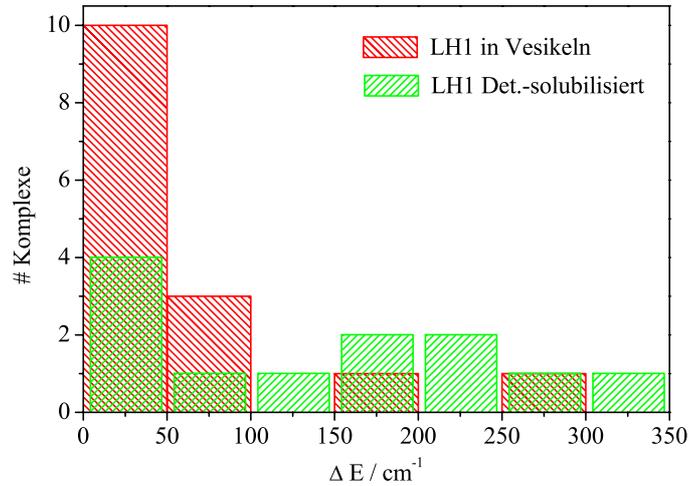


Abbildung 5.13: Histogramm der Aufspaltung ΔE des $|k = \pm 1\rangle$ Zustandes für rekonstituierte und Detergens-solubilisierte LH1-Komplexe.

sen. Weitere Absorptionsbanden wurden in dem Bereich zwischen 830 und 905 nm auch hier nicht beobachtet. Die Verteilung der Aufspaltungen ist in Abb. 5.13 wiedergegeben. Einige wenige Absorptionsspektren zeigten neben einer großen Aufspaltung auch noch eine vergleichsweise scharfe Linie am Rande einer der beiden Banden (Abb. 5.11(B)). Die Linienbreite beträgt $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$, entsprechend einer Lebensdauer von $\simeq 1 \text{ ps}$. Diese langen Lebensdauern und die großen Aufspaltungen sprechen für eine starke Störung des Ringes, die eine teilweise Entkopplung der Pigmente zur Folge hat. Dennoch wird aufgrund der Orthogonalität und der spektralen Lage der Banden davon ausgegangen, daß es sich um die beiden Zustände $|k = \pm 1\rangle$ handelt.

Es soll nun versucht werden, über die Art der Störung, die diese Aufspaltung zur Folge hat, eine Aussage zu treffen. Aus den Anregungsspektren geht hervor, daß die Störung folgende Eigenschaften aufweisen sollte: (i) Umverteilung der Oszillatorenstärke in den Zustand $|k = 0\rangle$, (ii) Aufspaltung der Zustände $|k = \pm 1\rangle$, (iii) die Oszillatorenstärke der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ sollte annähernd gleich bleiben und (iv) alle höherliegenden Zustände erhalten keine merkliche Oszillatorenstärke.

Bis zu einer gewissen Größe besitzt die diagonale Unordnung diese Eigenschaften. Aber um diese großen Aufspaltungen nur mit dem Vorhandensein einer diagonalen Unordnung zu erklären, wäre eine Unordnung von mehr als 1000 cm^{-1} nötig. Diagonale Unordnungen dieser Größe führen allerdings auch dazu, daß Zustände, die höher liegen als $|k = \pm 1\rangle$, deutlich an Oszillatorenstärke gewinnen. Da aber keine

weiteren Banden beobachtet wurden, ist eine diagonale Unordnung dieser Größe auszuschließen.

Ebenfalls wurde versucht, diese Aufspaltungen mit Komplexen zu simulieren, denen BChla-Moleküle fehlen, deren Proteingerüst aber ansonsten unverändert blieb. Das Entfernen von zwei benachbarten Pigmenten führte zu einer zu geringen Aufspaltung der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände, als daß damit die beobachteten Aufspaltungen erklärt werden könnten. Eine Änderung der Kopplungsstärken zwischen den Chlorophyllen führt zwar zu vergleichbaren Aufspaltungen, dieser Eingriff erscheint allerdings recht willkürlich und ist durch nichts gerechtfertigt.

Aufspaltungen dieser Größe lassen sich erklären, indem man neben einer vertretbaren Größe für die diagonale Unordnung zusätzlich eine elliptischen Deformation des Ringes zuläßt. Eine diagonale Unordnung von $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ und eine Exzentrizität von $\varepsilon = 0,4$ erzeugen z. B. eine Aufspaltung der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände von ungefähr 155 cm^{-1} (s. Abb. 4.10). Der Zustand $|k = 0\rangle$ erhält dabei Oszillatorenstärke, aber alle höherliegenden Zustände besitzen bei dieser Störung vergleichsweise geringe oder keine Oszillatorenstärke. Messungen von van Oijen *et al.* an Detergens-solubilisierten LH2-Komplexen von *Rps. acidophila* ergaben ebenfalls, daß die Entartung der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ aufgehoben war. Die Banden der beiden Zustände zeigten im Mittel eine Aufspaltung von 110 cm^{-1} . Diese Aufspaltung wurde dadurch erklärt, daß der eigentlich kreisförmige Komplex eine elliptische Deformation aufweist [van99].

Es läßt sich folgern, daß das Solubilisieren mit einem Detergens und die anschließende Immobilisation auf einer Glimmoberfläche einerseits Komplexe hinterläßt, die keine oder nur geringe elliptische Verzerrungen erlitten haben, andererseits aber auch für starke elliptische Verzerrungen der Komplexe verantwortlich ist. Verglichen mit der Präparation in Membranen, erhält man so nur eine äußerst inhomogene Verteilung der Aufspaltungen. Das bedeutet, daß die Membranumgebung wesentlich dazu beiträgt, daß der Lichtsammelkomplex geringere strukturelle Störungen erleidet und vorzugsweise in einer radialsymmetrischen Form vorliegt.

5.2.2 RC-LH1-Komplex

Für den Kernkomplex erwartet man, daß die Form des LH1-Ringes durch die Anwesenheit des Reaktionszentrums stabilisiert wird. Ob der LH1-Komplex dabei kreisförmig bleibt oder durch die Anwesenheit des Reaktionszentrums eine kon-

Die Anregungsspektren des Kernkomplexes wiesen unabhängig von der Umgebung des Komplexes ein einheitliches Verhalten auf. Ungefähr 70 % der gemessenen rekonstituierten und 90 % der Detergens-solubilisierten Komplexe zeigten nur eine, von der Polarisation des Anregungslasers unabhängige Bande im Absorptionsspektrum mit einem Maximum zwischen 880 und 890 nm. Typische Beispiele für diese Messungen sind in Abb. 5.14 dargestellt. Die Verteilung der gemessenen Aufspaltungen ist in Abb. 5.15 wiedergegeben und fällt natürlich dementsprechend schmal aus.

Das Vorhandensein nur einer Bande bedeutet wiederum, daß die Entartung der beiden Zustände $|k = \pm 1\rangle$ erhalten bleibt. Die Kernkomplexe müssen eine Störung aufweisen, die (i) eine Umverteilung der Oszillatorenstärke auf den $|k = 0\rangle$ Zustand bewirkt und (ii) die Entartung der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ unbeeinflusst läßt. Ähnlich wie bei den rekonstituierten LH1-Komplexen genügt hier die Einführung einer moderaten diagonalen Unordnung von $\leq 150 \text{ cm}^{-1}$, um die gemessenen Spektren zu simulieren. Eine zusätzliche elliptische Deformation für die Erklärung dieses Ergebnisses ist überflüssig.

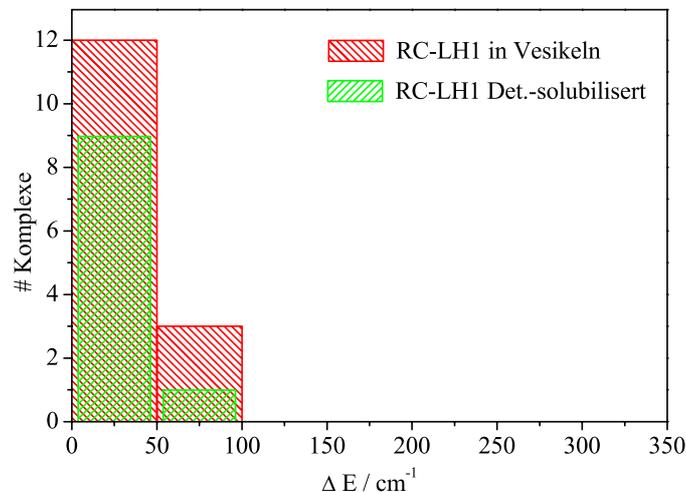


Abbildung 5.15: Histogramm der Aufspaltung ΔE der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände für rekonstituierte und Detergens-solubilierte RC-LH1-Komplexe

Die in Kap. 4.1.3 beschriebene quadratische Deformation der Komplexe zusammen mit einer diagonalen Unordnung würde zu ähnlichen Spektren führen, da eine quadratische Deformation die Entartung der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ nicht aufhebt. Eine Deformation dieser Art wird für die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe aus folgenden Gründen ausgeschlossen: (i) eine quadratische Deformation wurde bisher nur ein einziges Mal an einem carotinoidlosen Mutanten von *R. rubrum* nachgewie-

sen und (ii) neueste Strukturdaten des Kernkomplexes von *R. rubrum* S1 zeigen, wie schon erwähnt, daß der Komplex je nach Kristallisationsbedingungen eine radialsymmetrische oder elliptische Form annehmen kann [Jam02].

Die hier präsentierten Spektren des Kernkomplexes unterscheiden sich deutlich von den in der Arbeit von Ketelaars *et al.* [Ket02] gezeigten Ergebnissen. In dieser Arbeit wurde der RC–LH1–Komplex von *Rps. acidophila* untersucht, wobei die Detergensolubilisierten Komplexe in einer Polyvinyl–Alkohol–Matrix immobilisiert wurden. Die dort dargestellten Spektren zeigen in Bezug auf Form und Polarisationsverhalten, verglichen mit dieser Arbeit, ein sehr inhomogenes Erscheinungsbild. Die Autoren vermuten, daß dies eine Folge der Isolation und Aufreinigung der Komplexe sowie der Immobilisierung sein könnte.

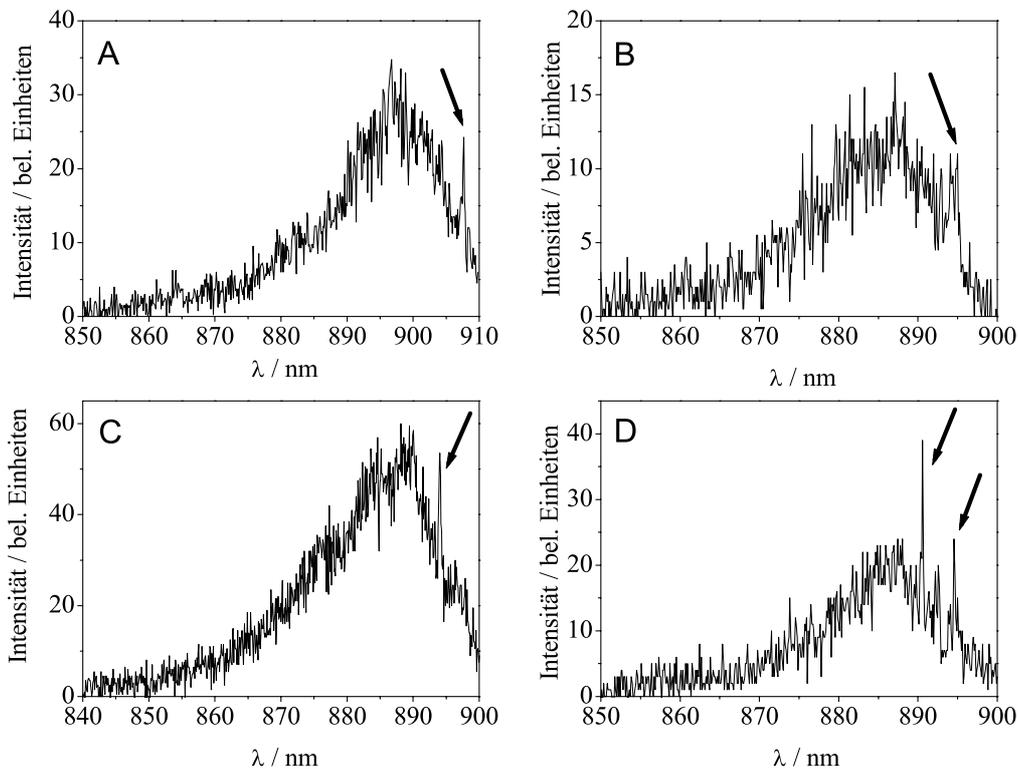


Abbildung 5.16: Anregungsspektren rekonstituierter RC-LH1-Komplexe (A-D) mit $|k=0\rangle$ Absorptionslinie (Pfeil) auf der Flanke. Aufgrund der spektralen Diffusion kann diese Linie sehr breit (B) oder auch zweimal während der Aufnahme (D) erscheinen.

In sieben Anregungsspektren des rekonstituierten RC-LH1-Komplexes ließen sich die Absorption des Zustandes $|k=0\rangle$ deutlich als scharfe Linien auf den roten Flanken beobachten. Abbildung 5.16 zeigt vier von diesen Spektren. Starke spektrale

Diffusion verhindert auch hier die Beobachtung dieser Linie in jedem Spektrum. Sie ist ebenfalls dafür verantwortlich, daß manche Linien sehr breit erscheinen (Abb.5.16 (B)) oder während der Aufnahme die spektrale Position wechseln, so daß mehr als eine Linie im Spektrum erscheint (Abb.5.16 (D)). Die spektralen Parameter Linienposition, $\Delta E_{\pm 1}$ und ΔE_{01} für den Zustand $|k=0\rangle$ sind für jeden der sieben Komplexe in Tab. 5.4 aufgelistet (Definition der Parameter: siehe Tab. 5.3). Bei Spektren, in denen mehr als eine Linie zu beobachten war, wurde der Mittelwert der Linienpositionen genommen. Der Mittelwert des Abstandes ΔE_{01} beträgt $\overline{\Delta E_{01}} = 84 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ und liegt damit ebenfalls im Bereich des berechneten Wertes von $\geq 76 \text{ cm}^{-1}$ (Kap. 4.1.1, Abb. 4.6). Die Linienbreiten der $|k=0\rangle$ Linien liegen im Bereich $\leq 1 \text{ cm}^{-1}$, was der ungefähren Linienbreite des Anregungslasers ($\simeq 1 \text{ cm}^{-1}$) entspricht bzw. auf ein Wegspringen der Linien während der Anregung hindeutet.

Komplex Nr.	spektrale Position (nm)	$\Delta E_{\pm 1}$ (cm^{-1})	ΔE_{01} (cm^{-1})
1	890	25 ± 10	27 ± 10
2	907,7	0	124
3	894	0	71
4	892,5	0	89
5	894,6	0	118
6	887,9	30	78
7	896,1	86	80
			$\overline{\Delta E_{01}} = 84 \pm 30$

Tabelle 5.4: Linienposition des tiefsten Zustandes $|k=0\rangle$ und sein Abstand ΔE_{01} vom Absorptionsmaximum der Zustände $|k=\pm 1\rangle$ für sieben RC-LH1-Komplexe sowie die Aufspaltung $\Delta E_{\pm 1}$ der Zustände $|k=\pm 1\rangle$. Als Fehler des Mittelwertes ist die Standardabweichung angegeben

Die Messungen zeigen, daß der LH1-Ring des Kernkomplexes von *R. rubrum* durch die Anwesenheit des Reaktionszentrums keine elliptische Deformation erfährt. Das Reaktionszentrum stabilisiert vielmehr die Form des LH1-Ringes, so daß dieser eine Radialsymmetrie aufweist. Die verschiedenen Umgebungen haben für den RC-LH1-Komplex keinen Einfluß mehr auf die Struktur des LH1-Ringes wie im Fall der einzelnen LH1-Komplexe. In seiner nativen Form ist der Kernkomplex *R. rubrum* den Ergebnissen zufolge kreisrund und das RC paßt, wie schon bei von Karrasch *et al.* [Kar95] vorhergesagt wurde, exakt in den LH1-Ring.

Ein deutlicher Hinweis für die Existenz der in Kap. 4.2.2 besprochenen Polaronenzustände wäre das Auftreten einer $|k=0\rangle$ Absorptionslinie und einer Null-Phononen-Linie im Emissionsspektrum desselben Komplexes, die in ihren spektralen Positionen deutlich voneinander getrennt sind. In den meisten Fällen, in denen ein Komplex eine deutliche Null-Phononen-Linie zeigte, war allerdings im Emissionsspektrum keine Null-Phononen-Linie erkennbar. Für zwei rekonstituierte RC-LH1-Komplexe gelang die gleichzeitige Aufnahme der beiden Linien, die gemessenen Spektren sind in Abb. 5.17 dargestellt.

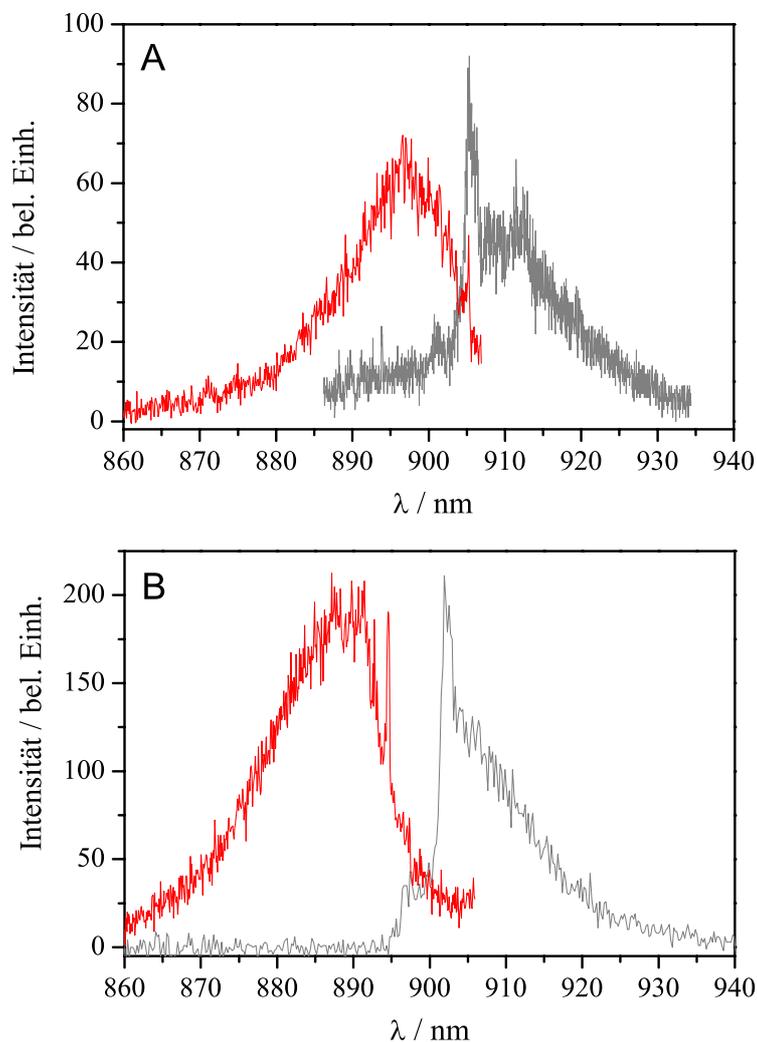


Abbildung 5.17: Anregungs- (rot) und Emissionsspektren (grau) von zwei einzelnen RC-LH1-Komplexen. (Erklärung: siehe Text)

In Spektrum (A) liegt die $|k=0\rangle$ Absorptionslinie innerhalb der durch spektrale Dif-

fusion stark verbreiterten Null-Phononen-Linie des Emissionsspektrums. Spektrum (B) hingegen zeigt eine deutliche Differenz von ungefähr 100 cm^{-1} in der spektralen Lage beider Linien. Eine klare Aussage über eine Energieabsenkung zwischen dem tiefsten Zustand in Absorption und dem emittierenden Zustand läßt sich somit nicht treffen.

5.2.3 Zusammenfassung

Mittels polarisationsabhängiger Anregungsspektroskopie wurde für den LH1-Komplex sowie den RC-LH1-Komplex die Lage der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, daß die in Membranen rekonstituierten LH1-Komplexe eine deutlich geringere Aufspaltung der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände aufwiesen als die Detergens-solubilisierten Komplexe. Die Aufspaltungen der rekonstituierten LH1-Komplexe ließ sich mit einer diagonalen Unordnung von 150 cm^{-1} erklären. Die doch eher inhomogene Verteilung der gemessenen Aufspaltungen der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ bei Detergens-solubilisierten LH1-Komplexen konnte nur durch das Vorhandensein einer strukturellen Störung wie der elliptischen Deformation des LH1-Ringes erklärt werden. Die Membranumgebung hilft anscheinend, die Struktur des LH1-Komplexes in einer radialsymmetrischen Form zu stabilisieren.

Für den RC-LH1-Komplex zeigen die Messungen, unabhängig von der Umgebung, nur sehr geringe bis gar keine Aufspaltungen der Zustände $|k = \pm 1\rangle$. Der Kernkomplex ist daher radialsymmetrisch.

In einigen Absorptionsspektren der Detergens-solubilisierten Komplexe konnte die Absorptionslinie des $|k = 0\rangle$ Zustandes beobachtet werden. Die Bestimmung ihrer spektralen Position in Bezug auf die Lage der Maxima der $|k = \pm 1\rangle$ Banden ergab einen Wert, der sich in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert des Exziton-Modells befindet.

Kapitel 6

Fluoreszenz- Korrelationspektroskopie (FCS)

6.1 Die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$

Die Untersuchung der Fluoreszenzdynamik eines Systems eröffnet die Möglichkeit, aus Schwankungen der Fluoreszenzintensität um ihren Mittelwert Informationen über die Prozesse zu erhalten, die für die Fluoreszenz bzw. deren Änderungen verantwortlich sind. Die Fluoreszenzdynamik lässt sich „messen“, indem man die normierte Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ der Fluoreszenz aufnimmt. Diese ist definiert als [Wid99]

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad (6.1)$$

wobei $I(t)$ und $\delta I(t)$ für die gesamte Intensität bzw. deren Fluktuation stehen. Die Werte im Zähler und im Nenner von Gl. (6.1) sind im zeitlichen Mittel zu betrachten, was durch die spitzen Klammern ausgedrückt wird. Es lassen sich im Prinzip die Dynamiken von Prozessen vom Subnanosekunden- bis hin in den Sekundenbereich untersuchen, solange diese Änderungen der Fluoreszenzintensität verursachen.

In der Einzelmolekülspektroskopie ist die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS) eine etablierte Methode, um z.B. photodynamische Eigenschaften von Proteinen [Wid99], Massen und Massenänderungen von Proteinen [Woh99] oder geringste Molekülkonzentrationen in Lösungen nachzuweisen [Rig93][Mes99][Mai97].

Experimentell wird die Autokorrelationsfunktion gemessen, indem man die Anzahl

der Photonenpaare $C(\tau)$, die in einem Abstand τ voneinander detektiert werden, aufzeichnet. Die Funktion $C(\tau)$ ist direkt proportional zur Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ und es gilt

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{C(\tau)}{C(\tau \rightarrow \infty)} . \quad (6.2)$$

Die Rate $C(\tau)$, die auch als Koinzidenzrate bezeichnet wird, ist genauer gesagt das Produkt aus der Anzahl von Photonen, die innerhalb einer festgelegten Zeit nachgewiesen werden und der bedingten Wahrscheinlichkeit $p(t, t+\tau)$, ein weiteres Photon nach der Zeit τ zu detektieren. Vorausgesetzt, es wurde zum Zeitpunkt t ein Photon detektiert. Die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ kann somit als ein Maß für die Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, zwei Photonen mit dem zeitlichen Abstand zum Zeitpunkt τ zu messen. Aus Gl. (6.2) ist direkt ersichtlich, daß für $\tau \rightarrow \infty$ die Funktion den Wert Eins annimmt. Dies ist eine allgemeine Eigenschaft der Autokorrelationsfunktion, unabhängig von dem Effekt, der für die gemessenen Korrelationen verantwortlich ist.

Im den folgenden beiden Abschnitten wird kurz auf die speziellen Eigenschaften der Autokorrelationsfunktion bzw. ihren Verlauf für einzelne Quantensysteme, wie z.B. Moleküle oder Farbzentren, und Diffusionsprozesse eingegangen.

6.1.1 $g^{(2)}(\tau)$ für einzelne Quantensysteme

Als Beispiel für ein einzelnes Quantensystem wird zunächst ein einfaches, kontinuierlich angeregtes 2-Niveau-System betrachtet (s. Abb. 6.1 (A)). Der Nachweis eines emittierten Photons mit einem Photodetektor projiziert das System aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurück. Die Wahrscheinlichkeit $p(t, t+0)$, ein weiteres Photon zeitgleich zu detektieren, ist somit Null, da das System erst wieder nach erneuter Anregung ein Photon emittieren kann. Das bedeutet, daß die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ für $\tau = 0$ auf den Wert Null abfällt. Dieser Abfall der Funktion für sehr kurze Zeiten wird als *Antibunching* bezeichnet. *Antibunching* ist ein charakteristisches Merkmal eines einzelnen Quantensystems und wird deshalb in einigen Experimenten als Nachweis dafür benutzt, daß es sich bei dem untersuchten System um ein einzelnes Molekül oder Quantensystem handelt [Bev][Mic00][Kur00].

Betrachten wir nun ein 3-Niveau-System, wie in Abb. 6.1 (B) gezeigt, mit einem metastabilen Zwischenzustand. Die Besetzung des metastabilen Zustandes führt da-

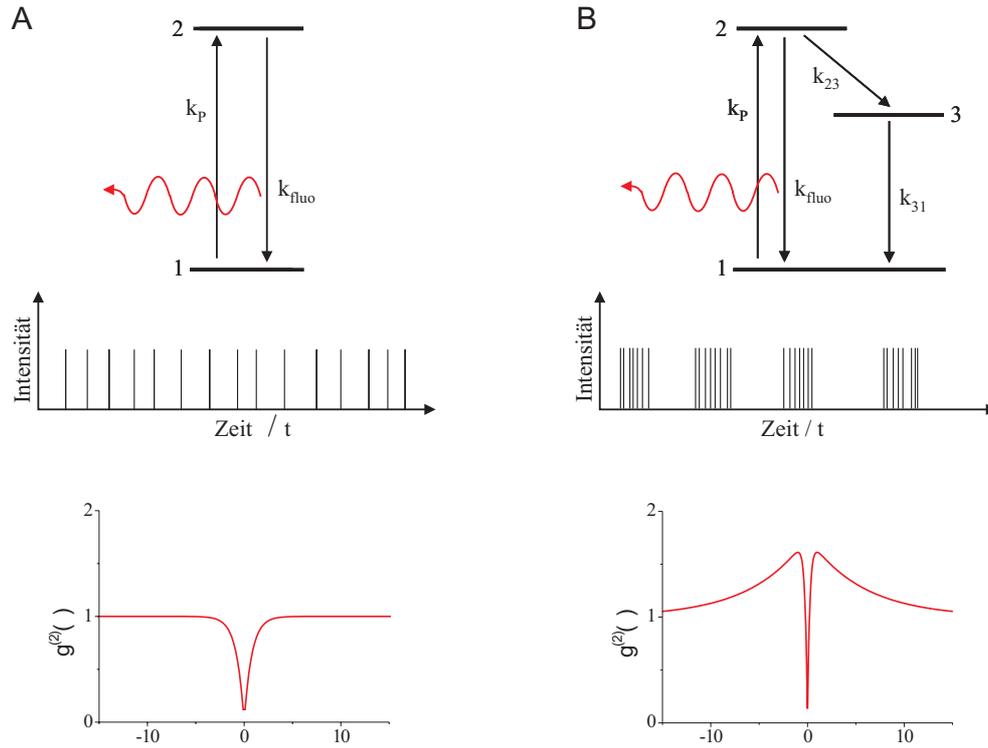


Abbildung 6.1: Niveauschemata eines 2-Niveau-Systems (A) und eines 3-Niveau-Systems mit metastabilem Zwischenzustand 3, die zeitliche Verteilung der Fluoreszenzphotonen sowie die Autokorrelationsfunktion des Systems (unter dem jeweiligen Schema). Die Anregung erfolgt kontinuierlich mit der Rate k_p . Der fluoreszierende Übergang $2 \rightarrow 1$ ist durch die rote Wellenlinie markiert. Während die Fluoreszenz des 2-Niveau-Systems aus einem kontinuierlichen Photonstrom besteht, treten die Photonen der Fluoreszenz des 3-Niveau-Systems in Bündeln auf.

zu, daß die Photonen nicht mehr kontinuierlich, sondern in Bündeln (engl. *bunches*) emittiert werden. Der Abstand der Bündel entspricht dabei der Lebensdauer des metastabilen Zustandes. Das gebündelte Auftreten der Photonen führt zu einem weiteren Term in der Autokorrelationsfunktion der für ein Ansteigen von $g^{(2)}(\tau)$ auf Werte größer Eins verantwortlich ist. Dieses Ansteigen wird auch als *Bunching* bezeichnet. Der *Bunching*-Term zerfällt mit einer Rate, die mit der Besetzungs- und Zerfallsrate des metastabilen Zustandes verknüpft ist. Der theoretische Verlauf für die $g^{(2)}(\tau)$ eines 3-Niveau-Systems ist in Kap. 6.3 beschrieben (siehe auch Abb. 6.15).

Die im vorigen Abschnitt erwähnte bedingte Wahrscheinlichkeit $p(t, t + \tau)$ ist direkt proportional zur Bevölkerung n des emittierenden Zustandes zum Zeitpunkt

$t + \tau$, wenn sich das System zum Zeitpunkt t im Grundzustand befand. Die Autokorrelationsfunktion (6.2) läßt sich nun für den Fall kontinuierlicher Anregung schreiben als

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{n(\tau)}{n(\tau \rightarrow \infty)}, \quad (6.3)$$

wobei $n(\tau \rightarrow \infty)$ den Gleichgewichtswert der Besetzung des emittierenden Zustandes darstellt [Bas97]. Aus Messungen der Autokorrelationsfunktionen an einzelnen Quantensystemen können daher direkt Informationen über die Besetzungsdynamik bzw. über Besetzungs- und Entvölkerungsraten des betrachteten Systems gewonnen werden.

6.1.2 $g^{(2)}(\tau)$ für Diffusionsprozesse

Eine der häufigsten Anwendungen der FCS in der Einzelmolekülspektroskopie ist die Untersuchung von Diffusionsvorgängen. Dabei wird die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzfluktuationen gemessen, die von Molekülen in Lösung hervorgerufen werden, die durch den Laserfokus eines konfokalen Mikroskopes diffundieren (s. Abb. 6.2) und dort zur Fluoreszenz angeregt werden. Da die Anzahl der Moleküle im Fokalvolumen um ihren Gleichgewichtswert schwankt, enthält das fluktuierende Fluoreszenzsignal aus diesem Volumen Informationen über die Konzentration der fluoreszenten Moleküle, und die Zeitskala, auf der diese Fluktuationen ablaufen, hängt von der Diffusionszeit bzw. dem Diffusionskoeffizienten ab.

Durch diese Fluktuationen erhält die Autokorrelationsfunktion einen neuen Term, der Informationen über die Konzentration und den Diffusionskoeffizienten der untersuchten Spezies in der Lösung enthält. Für den Fall einer diffundierenden Spezies ist die durch die Diffusion hervorgerufene Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ gegeben durch [Ara76]

$$g_{3d}^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{r_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (6.4)$$

wobei vorausgesetzt wird, daß Nachweis- bzw. Anregungsvolumen ein dreidimensionales Gaußprofil besitzen. Für zweidimensionale Diffusionsprozesse, z.B. Diffusion in Flüssigkeitsfilmen oder Membranen, hat die Autokorrelationsfunktion die Form

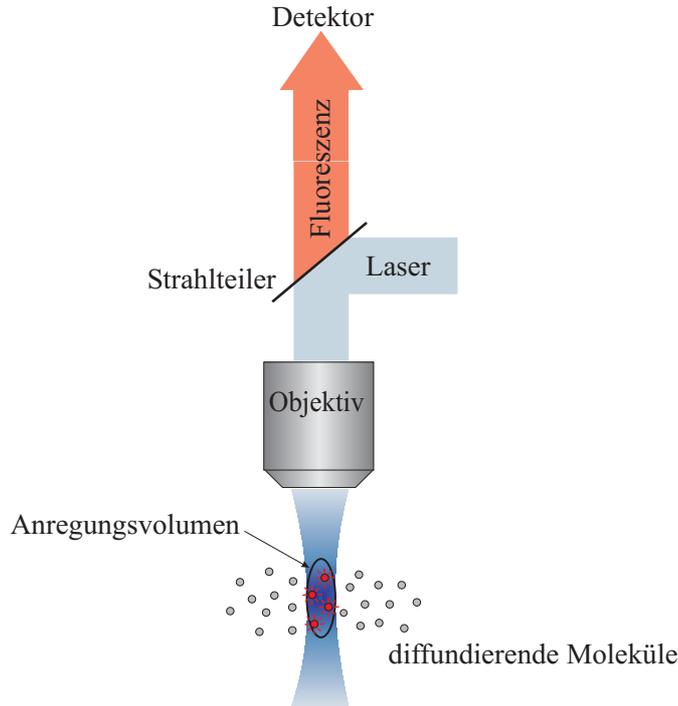


Abbildung 6.2: FCS für Diffusionsprozesse. Die Fluoreszenz der durch den Laserfokus diffundierenden und angeregten Moleküle (rot) wird durch das Objektiv eingesammelt (Anregungsvolumen=Nachweisvolumen) und mit einem Photodetektor aufgenommen.

$$g_{2d}^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{r_0^2} \right)^{-1}. \quad (6.5)$$

Die Korrelations- oder Diffusionszeit ist in beiden Fällen definiert als

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}, \quad (6.6)$$

D bezeichnet hierbei den Diffusionskoeffizienten und N die mittlere Anzahl fluoreszierender Moleküle im Nachweisvolumen. Die Größen r_0 und z_0 bezeichnen den radialen bzw. axialen Radius des Intensitätsprofils des Fokus, an dem die Intensität auf den $1/e^2$ -fachen Wert abgefallen ist. Die Korrelationszeit τ_D ist für die zweidimensionale Korrelationsfunktion die Zeit, in der die Funktion auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes abgefallen ist. Für den dreidimensionalen Fall liegt der Wert der Funktion bei τ_D wegen des Wurzelterms in Gl. (6.4) etwas unter seinem halben Wert. Der Wert von $(g^{(2)}(0) - 1)$ ist proportional zu N^{-1} und wird auch als Kontrast der Korrelationsfunktion bezeichnet. Durch Bestimmen des Kontrastes läßt

sich, bei bekanntem Fokalvolumen, die Konzentration der untersuchten Partikel in der Lösung bestimmen.

Abbildung 6.3 zeigt den typischen Verlauf der Autokorrelationsfunktion (6.4). Die Funktion (6.5) für den zweidimensionalen Fall ist aufgrund des nur sehr schwach wirkenden Wurzelterms in Gl. (6.4) qualitativ gleich. In Abb. 6.3 wurde, wie vielfach üblich, $(g^{(2)}(\tau) - 1)$ gegen τ aufgetragen.

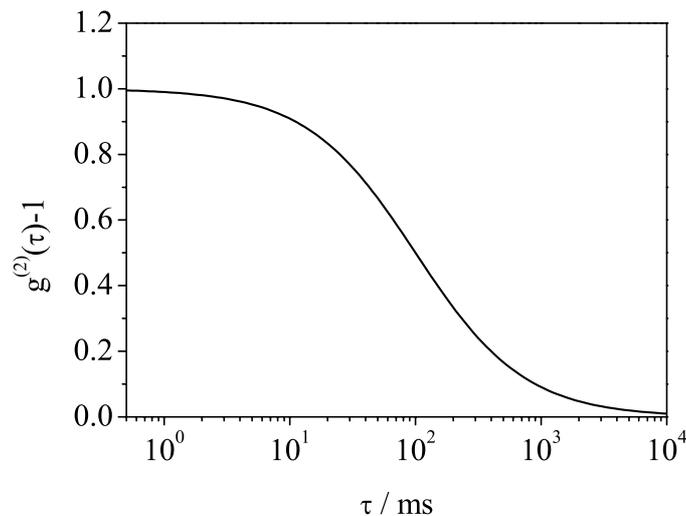


Abbildung 6.3: Simulation der Autokorrelationsfunktion 6.4 mit den Parametern $N = 1$ und $\tau_D = 5$ ms.

Es ist zu beachten, daß der Kontrast durch unkorreliertes Untergrundlicht (z.B. gestreutes Anregungslicht) verringert wird. Um diesen Effekt zu korrigieren, muß die gemessene Autokorrelationsfunktion mit dem Faktor $(\frac{s+b}{s})^2$ multipliziert werden. Der Wert s steht hierbei für die Intensität des Signals und b für die des Untergrundes. Die gesamte gemessene Intensität ist folglich $I = s + b$.

Sind auch die axialen und radialen Durchmesser des Laserfokus bekannt, läßt sich aus der Anpassung von Gl. (6.4) bzw. Gl. (6.5) an die gemessene Korrelationsfunktion die Diffusionskonstante bestimmen.

Neben der Diffusion gibt es natürlich noch weitere Prozesse, wie z.B. einen Übergang des Moleküls in einen metastabilen Zustand, die zu Fluktuationen der Fluoreszenz führen können. Laufen diese Prozesse auf einer ähnlichen Zeitskala wie die Diffusion ab, so müssen sie bei der Auswertung der Autokorrelationsfunktion berücksichtigt werden. Die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ besteht dann aus dem Produkt der einzelnen, die verschiedenen Prozesse beschreibenden Autokorrelationsfunktionen.

6.2 Fluoreszenzdynamik im μs -Bereich: Diffusion in der Membran

In diesem Abschnitt sollen die Diffusionskoeffizienten von Lipiden sowie des LH1-Komplexes in der DOPC-Membran bestimmt werden. Aufgrund der fehlenden Literaturwerte für Diffusionskoeffizienten von Proteinen der Größe des LH1-Komplexes soll zuerst anhand eines Diffusionsmodells eine Abschätzung des zu erwartenden Wertes gemacht werden.

6.2.1 Das Saffman-Delbrück-Modell

Das am häufigsten benutzte Modell zur Beschreibung von Diffusionsprozessen in Membranen ist das hydrodynamische Modell von Saffman und Delbrück [Saf75] [Saf76]. Bei diesem Modell wird die Membrandoppelschicht als 2-dimensionales, homogenes Kontinuum der Höhe h betrachtet, das sich in einer wässrigen Umgebung befindet. Die in der Membran diffundierenden Partikel werden als Zylinder mit dem Radius a angenommen, deren Höhe dem Membrandurchmesser entspricht (s. Abb. 6.4).

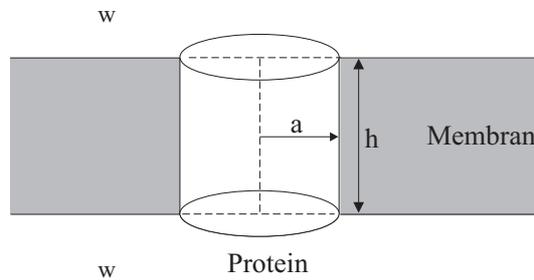


Abbildung 6.4: Saffman-Delbrück-Modell für die Diffusion in Membranen: Ein zylindrischer Körper der Höhe h und mit dem Radius a bewegt sich innerhalb einer Membran mit der Viskosität η . Die Membran ist eingebettet in eine wässrige Umgebung der Viskosität η_w .

Die aus diesem Modell gewonnene Gleichung für den lateralen Diffusionskoeffizienten D lautet

$$D = \frac{kT}{4\pi\eta h} \left[\ln \left(\frac{\eta h}{\eta_w a} \right) - \gamma \right], \quad (6.7)$$

wobei mit η und η_w die Viskosität der Membran bzw. die der wässrigen Umgebung bezeichnet wird ($\gamma = 0,5772$, Eulersche Konstante). Das Saffman-Delbrück-Modell

berücksichtigt als einziges Modell auch die auf das sich bewegende Teilchen wirkenden Kräfte, die durch die Reibung mit dem wässrigen Medium entstehen. Es wurde gezeigt, daß die Gl. (6.7) in dieser Form nur gilt, wenn für den dimensionslosen Parameter

$$\epsilon = \frac{2\eta_w a}{\eta h}$$

die Bedingung $\epsilon \leq 0,1$ erfüllt ist [Hug81] [Hug82]. Eine für alle ϵ gültige Beschreibung ist bei Hughes *et al.* [Hug81] nachzulesen.

Der Wert für η_w wird i. allg. als 0,01 P (1 P = 1 Poise = 0,1 Ns/m²) angenommen und entspricht der Viskosität von Wasser bei Raumtemperatur. Für die Viskosität η von Membranen, auch Mikroviskosität genannt, werden in der Literatur Werte von 1–10 P (flüssigkristalline Phase) angegeben [Che79]. Bei diesen Werten sollte allerdings beachtet werden, daß sie vielfach aus Messungen der Beweglichkeit kleiner, in der Membran gelöster Moleküle wie z.B. Lipide [Pet82] oder Plastocyanin [Fra84] hervorgingen. Bewegungen kleiner Moleküle in der Membran sind aber sehr empfindlich gegen die direkte Umgebung des Moleküls wie z.B. die Orientierung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide oder auch Schwankungen in der Lipidpackungsdichte der Membran (das sog. freie Volumen). Die aus diesen Messungen gewonnenen Viskositäten sind wohl eher als Werte der direkten Umgebung der Moleküle und nicht als Viskosität der gesamten Membran zu verstehen. Über die Frage, ob sich die so gemessenen Mikroviskositäten auch auf die Diffusion großer Membranproteine anwenden lassen, wird immer noch diskutiert. Eine endgültige Aussage über den erwarteten Wert für die Diffusionskonstante kann also nicht getroffen werden. Deshalb soll der erwartete Wert abgeschätzt werden: Der LH1-Komplex hat einen Radius a von 5,5 nm und eine Höhe h von 4,5 nm, zusammen mit $\eta_w = 0,01$ P ergibt sich aus Gl. (6.7) daraus ein Wert für die Diffusionskonstante von

$$D = 3,9 \times 10^{-8} - 3,9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s} , \quad (6.8)$$

wenn der logarithmische Term mit $\eta = 5$ P abgeschätzt wird und für die Membranviskosität Werte von 1–10 P angenommen werden. Die Bedingung $\epsilon \leq 0,1$ bleibt für diese Wahl der Parameter erfüllt.

Das Saffman–Delbrück–Modell ist, wie schon erwähnt, ein hydrodynamisches Modell. Die Anwendung der Hydrodynamik setzt allerdings implizit voraus, daß das diffundierende Teilchen deutlich größer ist als die Teilchen des ihn umgebenden

Mediums. Für ein System wie LH1 in DOPC ist das in guter Näherung erfüllt ($a_{\text{LH1}}/a_{\text{DOPC}} \simeq 16$ und $h_{\text{LH1}}/h_{\text{DOPC}} = 2$), das Saffman–Delbrück–Modell somit anwendbar. Manche Autoren benutzen das Modell allerdings auch, um Diffusionskoeffizienten von deutlich kleineren Membranproteinen, z.B. Bakteriorhodopsin oder sogar von Lipiden zu berechnen [Pet82] [Hug82]. Bei einer Wahl von $\eta = 1 \text{ P}$ und $\eta_w = 0,01 \text{ P}$ führt das auch zu einer erstaunlich guten Übereinstimmung mit experimentellen Daten. Messungen der Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten in [Vaz84] zeigen allerdings, daß das Saffman–Delbrück–Modell mit seiner linearen Abhängigkeit von der Temperatur den gemessenen Verlauf nicht wiedergibt. Um die Diffusionskoeffizienten von kleinen Membranproteinen und Lipiden theoretisch zu berechnen wird deshalb das *freie-Volumen*-Modell [Gal79] vorgeschlagen.

6.2.2 Diffusion des LH1-Komplexes

Die Diffusion der LH1-Komplexe in DOPC-Vesikeln wurde bei Raumtemperatur gemessen. Um das vorzeitige Photobleichen zu verhindern, wurden der Pufferlösung die Enzyme Glukoseoxidase und Katalase zugefügt (s. Kap. 2.3). Die Anregung der Komplexe erfolgte bei 865 nm mit einer Leistung von $\simeq 1 \mu\text{W}$. An die gemessenen Korrelationsfunktionen wurde die Funktion (6.5) für 2-dimensionale Diffusion angepasst.

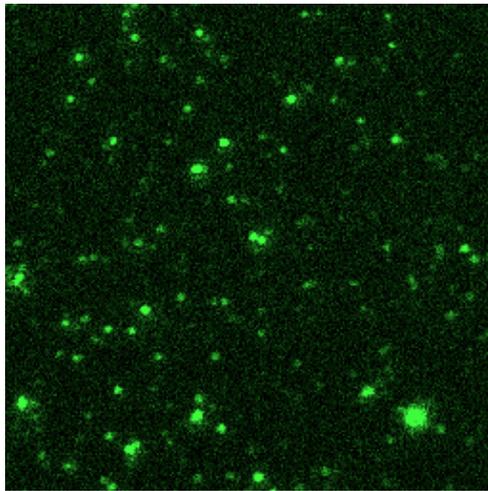


Abbildung 6.5: Konfokale Aufnahme in DOPC-Membranen rekonstituierter LH1-Komplexe (Aufnahmebereich $50 \times 50 \mu\text{m}^2$).

Anschließend wurden die Diffusionskonstanten aus den so gewonnenen Korrelationszeiten τ_D mit Gl. (6.5) berechnet. Die Radius r_0 des Laserfokus wurde vorher bestimmt zu $r_0 = 515 \pm 40$ nm. Abbildung 6.5 zeigt die konfokale Aufnahme einer für diese Messung verwendeten Probe. Für die Aufnahme der Autokorrelationsfunktionen wurden nur die Moleküle ausgewählt, die in den konfokalen Aufnahmen eher als diffuse Spots sichtbar waren. Der Grund dafür war die Annahme, daß es sich bei den Komplexen, die als helle Spots sichtbar waren, um ortsfeste, nicht diffundierende Komplexe handelt. Tatsächlich ließen sich an „hellen“ Komplexen auch keine Korrelationen messen.

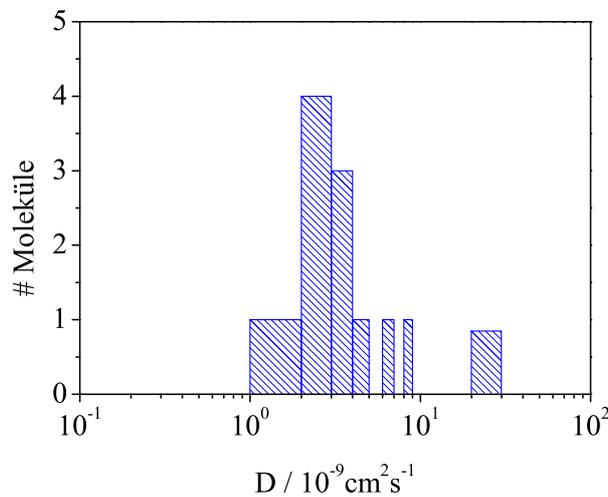


Abbildung 6.6: Verteilung der gemessenen Diffusionskoeffizienten für LH1 in DOPC-Membranen. Der Mittelwert liegt bei $\overline{D} = (5 \pm 4) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Bei 90 % von allen gemessenen LH1-Komplexen wurden aus der Anpassung Diffusionskonstanten im Bereich von $10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmt. Die Verteilung der Diffusionskonstanten ist in Abb. 6.6 gezeigt. Der Mittelwert der Verteilung liegt bei $\overline{D} = (5 \pm 4) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ und damit im unteren Bereich des in Gl. (6.8) für D abgeschätzten Wertes. Mit \overline{D} ergibt sich aus derselben Abschätzung eine Mikroviskosität von $\eta \approx 7 \text{ P}$.

Bei den Messungen wurde deutlich, daß bei ca. 90 % aller gemessenen Korrelationsfunktionen das dazugehörige Fluoreszenzsignal einen zeitlichen Verlauf zeigt, wie ihn Abb. 6.7 (B) darstellt. Die Fluoreszenzintensität wechselte dabei nicht, wie man es für Diffusion nur eines LH1-Komplexes im Vesikel erwarten würde, zwischen Untergrund- und eigentlichem Fluoreszenzsignal (s. Abb. 6.7 (A)), sondern zwischen mehreren Stufen, die deutlich über der Intensität des Untergrundes liegen.

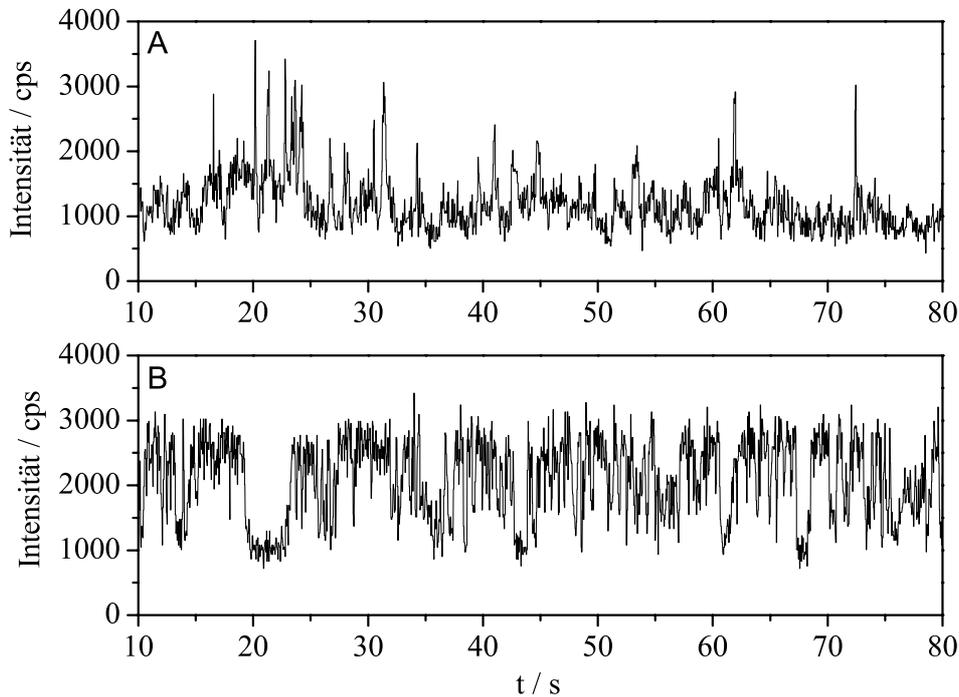


Abbildung 6.7: Gemessene Fluoreszenztraces für in Membranen rekonstituierte LH1-Komplexe. Bei ungefähr 10% aller gemessenen Vesikel zeigte sich ein für Diffusionsmessungen erwartetes Verhalten (A), während die restlichen 90% Intensitätsverläufe, wie in (B) dargestellt, aufwiesen (siehe Text). Der Untergrund liegt in (A) bei ~ 700 cps, in (B) bei ~ 500 cps.

Wegen der im Vergleich zu Abb. 6.7 (A) geringeren Fluktuationsraten zeigten die aus diesen Intensitätsverläufen gewonnenen Korrelationsfunktionen einen 2–4-mal kleineren Kontrast, und auch das Rauschen auf dem Signal war größer (s. Abb. 6.8). Bei einigen Komplexen waren die Fluktuationen der Fluoreszenz so schwach, daß sich keine aussagekräftigen Korrelationsfunktionen aufnehmen ließen.

Eine mögliche Erklärung dieses doch unerwarteten Verhaltens der Fluoreszenz bietet sich beim Blick auf die Größenverteilung der Vesikel in Abb. 2.12 an. Aufgrund des Fokaldurchmessers von ungefähr $1 \mu\text{m}$ gibt es nur sehr wenige Vesikel, die größer als der Fokaldurchmesser sind. Nur bei diesen wenigen wird man einen Fluoreszenztrace wie in Abb. 6.7 (A) messen können. In Vesikeln, die ungefähr den Durchmesser des Fokus besitzen, kann der LH1-Komplex den Fokus nie ganz verlassen. Er kann sich nur zwischen Bereichen verschiedener Anregungsintensitäten bewegen, was eine Änderung der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Die Diffusion der LH1-Komplexe in Vesikeln dieser Größe wäre dann für die Intensitätsverläufe ähnlich zu dem in Abb. 6.7 (B) verantwortlich. An Vesikel die kleiner sind als der Fokaldurchmesser, sind

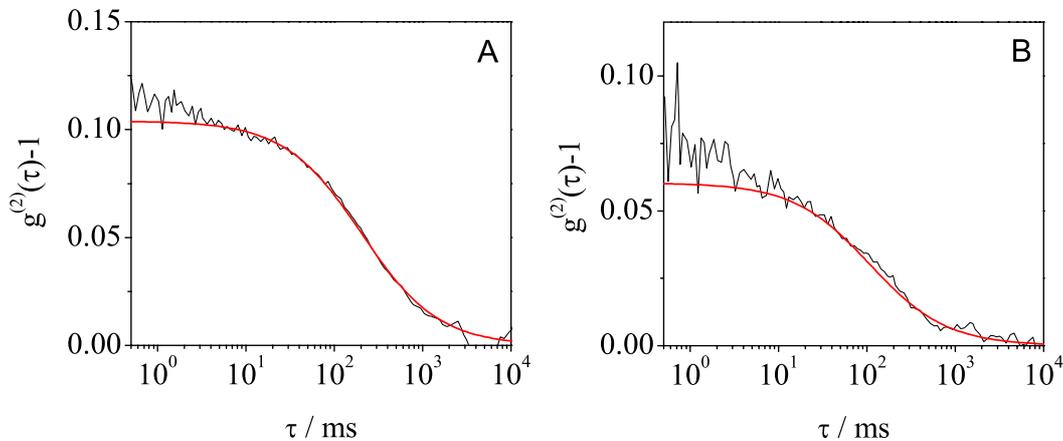


Abbildung 6.8: Gemessene Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen ($g^{(2)}(\tau) - 1$) (schwarz) diffundierender LH1-Komplexe in Vesikeln und die angepasste Funktion (6.5) (rot). (A) zeigt die Autokorrelationsfunktion des in Abb. 6.7 (A) gezeigten Intensitätsverlaufes und (B) die von Abb. 6.7 (B). Die Aufnahmezeiten für (A) und (B) betragen 216 s bzw. 71 s.

keine Messungen des Diffusionskoeffizienten möglich.

Eine weitere Ursache für die gemessenen Korrelationen könnten Übergänge in metastabile Zustände im LH1-Komplex darstellen. Der einzige in der Literatur bekannte langlebige Zustand des LH1-Komplexes ist der bereits in Kap. 3.1 erwähnte $^3\text{BChl}a^*$ -Triplettzustand. Dieser kommt mit seiner effektiven Lebensdauer von 12–25 ns (Energietransfer zum Carotinoid) allerdings für die gemessenen Korrelationszeiten nicht in Betracht. Ebenfalls gegen einen solchen Prozeß spricht der mit der Funktion (6.5) gut anpassbare Verlauf der Korrelationsfunktionen. Autokorrelationsfunktionen von Übergängen mit einer Rate k besitzen jedoch eine $e^{-t/k}$ -Abhängigkeit. Eine Funktion mit diesem Verlauf läßt sich aber nicht an die gemessenen Funktionen anpassen.

6.2.3 Diffusion der Lipide

Die Lipiddiffusion wurde bei Raumtemperatur an DOPC-Vesikeln gemessen, die rekonstituierte LH1-Komplexe sowie RhoB-PE als fluoreszente Markierung enthielten (s. Kap. 2.3). Die Anregung des Farbstoffes (RhoB) erfolgte bei 514 nm mit einer Leistung von ca. $1 \mu\text{W}$. An die gemessenen Korrelationsfunktionen wurde die Funktion (6.5) für 2-dimensionale Diffusion angepasst. Die Diffusionskonstanten wurden anschließend mit Gl. (6.5) aus den so gewonnenen Korrelationszeiten τ_D berech-

net. Der Radius r_0 des Laserfokus wurde vorher bestimmt zu $r_0 = 297 \pm 15$ nm. Abbildung 6.9 zeigt die konfokale Aufnahme einer für diese Messung verwendeten Probe.

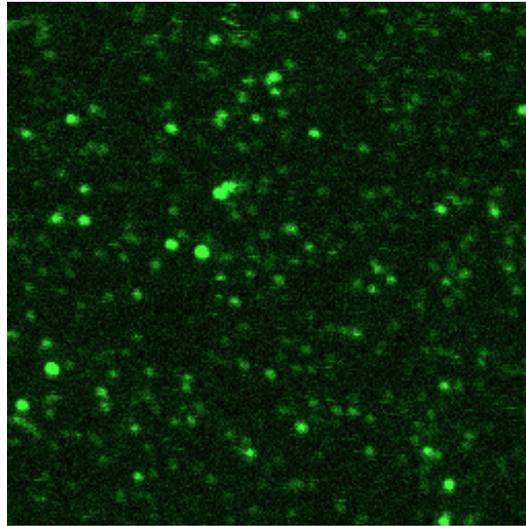


Abbildung 6.9: Konfokale Aufnahme von RhoB-PE markierten DOPC-Membranen (Aufnahmebereich $50 \times 50 \mu\text{m}^2$).

Für die Aufnahme der Autokorrelationsfunktionen wurden Vesikel verschiedener Größe und Helligkeit ausgewählt, alle Vesikel zeigten Fluoreszenztraces, wie in Abb. 6.10 dargestellt.

Bei ungefähr 70% der gemessenen Vesikel zeigten die markierten Lipide eine Diffusionskonstante von ungefähr $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, während die restlichen 30% Diffusionskonstanten im Bereich von $10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ aufwiesen. Stellvertretend für dieses Ergebnis sind in Abb. 6.11 zwei der gemessenen Korrelationsfunktionen dargestellt.

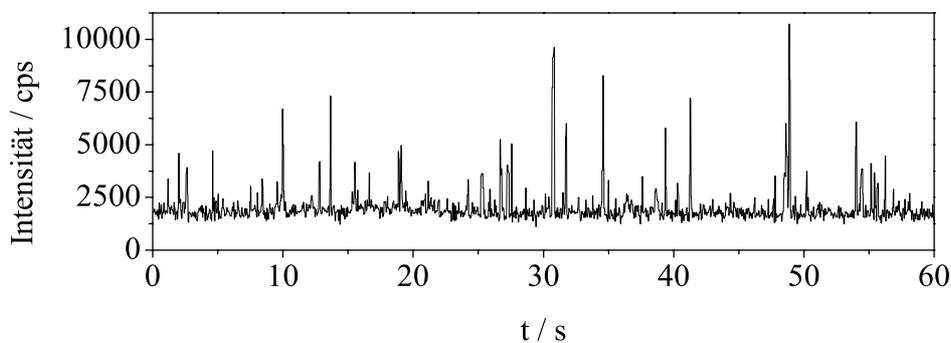


Abbildung 6.10: Typischer Fluoreszenztrace für RhoB-markierte Lipide in DOPC-Membran.

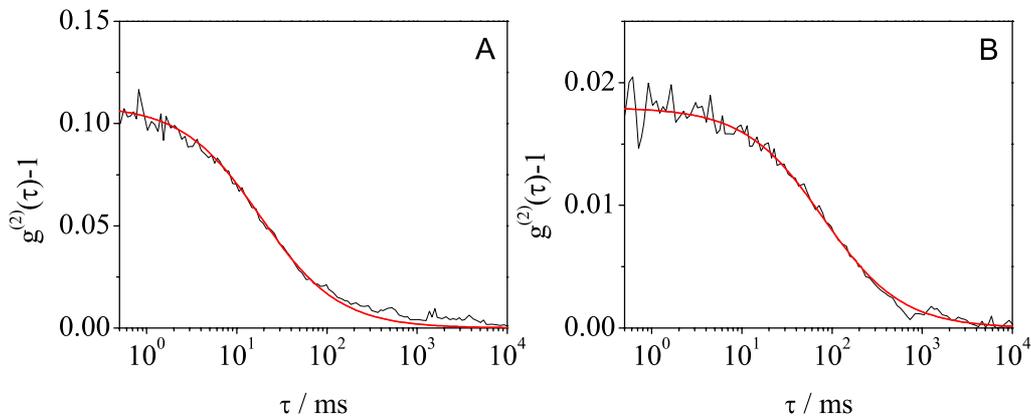


Abbildung 6.11: Gemessene Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktionen ($g^{(2)}(\tau) - 1$) (schwarz) von RhoB-PE in DOPC-Vesikeln und die angepasste Funktion (6.5) (rot). Die Diffusionskonstante für (A) liegt bei 20 ms, die für (B) bei 100 ms. Die Aufnahmezeit betrug bei (A) und (B) jeweils 4 min.

Aus anderen Einzelmolekülmessungen ist bekannt, daß die Diffusionskonstanten für ähnliche Lipide in Membranen bei $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ liegen [Sch96] [Ke01]. Auch Ensemble-Experimente wie FRAP-Messungen [Vaz84] und NMR-Messungen an Spin-markierten PC-Vesikeln [Dev72] ergaben ebenfalls Werte im Bereich von $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Daher werden die Diffusionskonstanten im Bereich $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ der Diffusion der Lipide zugeordnet.

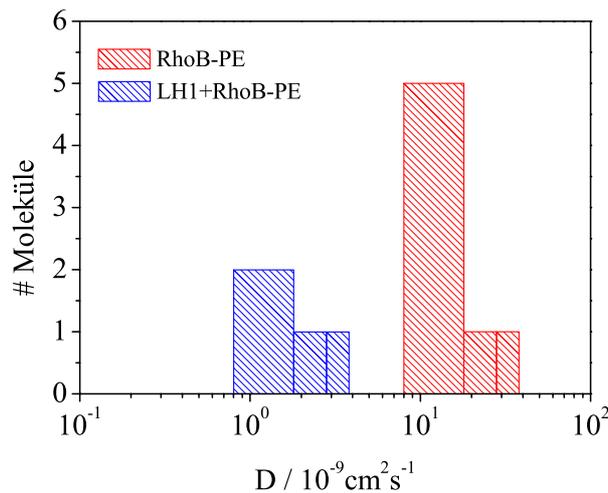


Abbildung 6.12: Verteilung der gemessenen Diffusionskoeffizienten für RhoB-PE-markierte DOPC-Membranen. Die Mittelwerte der Verteilungen liegen bei $\overline{D}_{\text{PE}} = (1,5 \pm 0,8) \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $\overline{D}_{\text{LH1-PE}} = (2,0 \pm 1) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Weiterhin ist bekannt, daß Membranproteine von Lipiden umgeben sind, die fest an sie gebunden sind [Jos73]. Die Bindung an das Protein kann dabei über elektrostatische Wechselwirkung mit der zwitterionischen Kopfgruppe des Lipids sowie über Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten des Lipids und dem Protein stattfinden [Roy99]. Es ist deshalb gerechtfertigt anzunehmen, daß die deutlich kleinere Diffusionskonstante, die Diffusion von Lipiden (RhoB-PE) umgebenen LH1-Komplexen beschreibt, da die Größe der gemessenen Diffusionskonstanten mit der des LH1-Komplexes ($\bar{D} = 4,9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, s. Kap. 6.2.2) vergleichbar ist.

Abbildung 6.12 zeigt nochmal die Verteilung der gemessenen Diffusionskonstanten und deren Zuordnung. Daraus ergibt sich für die Diffusionskonstanten ein Mittelwert von $\bar{D} = (1,5 \pm 0,8) \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ für RhoB-PE in DOPC und $\bar{D} = (2,0 \pm 1) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ für LH1+RhoB-PE in DOPC.

6.2.4 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden die Diffusion des LH1-Komplexes und des Lipids PE in DOPC-Membranen untersucht. Für den Diffusionskoeffizienten des LH1 ergab sich ein Wert von $\bar{D} = 4,9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, der damit am unteren Rand der anhand des Saffman-Delbrück-Modells gemachten Abschätzung lag. Bei diesen Messungen zeigte sich auch, daß die Größenverteilung der Vesikel die Messungen erschwerte, so daß eine andere Größenverteilung hin zu größeren Vesikeldurchmessern wünschenswert wäre.

Bei der Messung der Diffusionskoeffizienten für PE zeigte sich, daß neben den erwarteten Werten von $\bar{D} = 1,5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ sich auch Werte, die mit $\bar{D} = 1,8 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ um eine Größenordnung kleiner waren, messen ließen. Aufgrund der Ähnlichkeit dieses Wertes mit der Diffusionskonstanten des LH1-Komplexes und der Tatsache, daß Lipide an Proteine binden, wurden die Messwerte der Diffusion von Lipiden, die an den LH1-Komplex gebunden sind, zugeordnet.

6.3 Fluoreszenzdynamik im *ns*-Bereich: Übergangsraten

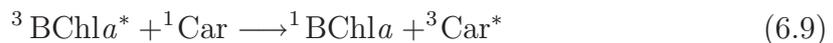
Werte für die Interkombinationsraten des BChla und die Raten des Energietransfers zwischen dem Triplettzustand des BChla und dem Carotinoid wurden bisher nur aus Messungen der transienten Absorption an bulk-Proben gewonnen. In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, daß es möglich ist, mit Fluoreszenzkorrelationsmessungen Aussagen über die Interkombinations- sowie die Energietransferraten einzelner LH1-Komplexe zu machen.

Die Messungen bei $T=1,8\text{ K}$ wurden an rekonstituierten LH1-Komplexen durchgeführt und die Messungen bei Raumtemperatur wurden in Lösung in einer Flüssigkeitszelle vorgenommen. Es wurden hierbei Detergens-solubilisierete LH1-Komplexe verwendet, die mit Pufferlösung auf Einzelmolekülniveau verdünnt wurden. In beiden Fällen wurde mit einer Wellenlänge von 865 nm angeregt.

Experimente bei $T=1,8\text{ K}$

In Abb. 6.13 sind alle die Fluoreszenzdynamik betreffenden Prozesse und deren Raten für den LH1-Komplex bei $T=2\text{ K}$ gezeigt. Im Experiment erfolgte die Anregung des Komplexes resonant (Pumprate k_p) in die $|k = \pm 1\rangle$ Zustände des unteren Exzitonbandes. Nach der Delokalisation der Energie (in Abb. 6.13 durch den grauen Balken dargestellt), die weniger als 100 fs dauert, relaxiert dieser strahlungslos mit einer Rate von $(\sim 170\text{ fs})^{-1}$ in den untersten exzitonischen Zustand $|k = 0\rangle$. Von dort kann der Komplex, nachdem sich die Anregung auf einige wenige BChla-Moleküle lokalisiert hat, mit einer Rate von $k_{\text{fluor}} \leq (1\text{ ns})^{-1}$ [Mon76] strahlend in den Grundzustand relaxieren.

Aufgrund der hohen Interkombinationsrate (*Intersystem Crossing*, ISC) für freies BChla von $k_{\text{ISC}} \simeq (2-5, 1\text{ ns})^{-1}$ [Lim98] kann der Zustand $|k = 0\rangle$ allerdings auch in den metastabilen BChla-Triplettzustand relaxieren (Lebensdauer $\sim 50\ \mu\text{s}$ [Mon76]). Im Gegensatz zu der Anregung in das Singulett-System ist die Energie jetzt auf einem BChla-Molekül lokalisiert. Durch den Energietransfer



wird das BChla-Molekül wieder in den Grundzustand zurückgeführt. Die Lebensdauer des dabei erzeugten Carotinoidtripletts beträgt $\sim 4\ \mu\text{s}$ [Mon76]. Für die Rate des

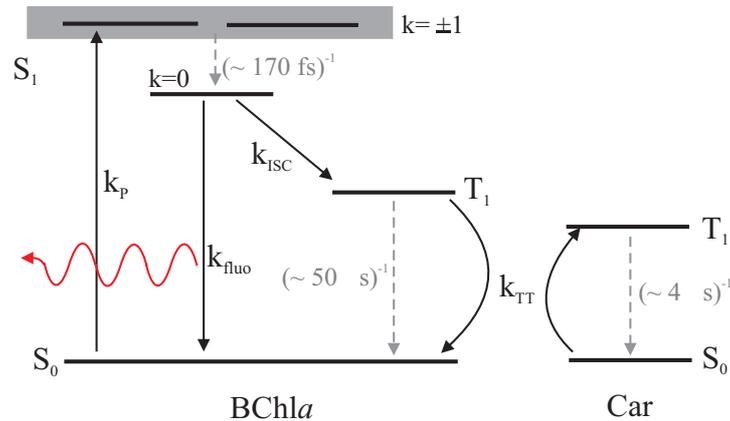


Abbildung 6.13: Energielaxation im LH1-Komplex und Energietransfer zwischen dem BChla-Ring (BChla) und dem Carotinoid (Car) bei $T=2\text{ K}$. Der fluoreszierende Übergang ist durch die rote Wellenlinie markiert. (Für die Erklärung der Raten k_i : siehe Text.)

Energietransfers k_{TT} werden in der Literatur Werte zwischen $(12\text{ ns})^{-1}$ und $(25\text{ ns})^{-1}$ [Lim98][Mon76] angegeben. Die besondere Schutzfunktion des Prozesses (6.9) wurde bereits in Kap. 3.1 erläutert.

Betrachtet man nun die Energietransferrate k_{TT} als effektive Relaxationsrate des BChla-Tripletts in den Grundzustand, so läßt sich die Besetzung $\rho_i(t)$ der Energieniveaus des BChla und damit die Fluoreszenzdynamik mit einem einfachen Raten-gleichungssystem beschreiben. Weiterhin wird aufgrund der schnellen strahlungslosen Relaxation der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ der Pumpprozess als direkte Besetzung des fluoreszierenden Zustandes $|k = 0\rangle$ betrachtet. Jetzt läßt sich die Besetzungsdynamik des BChla-Ringes mit einem 3-Niveausystem beschreiben. Das dazugehörige Energieniveauschema ist in Abb. 6.14 dargestellt.

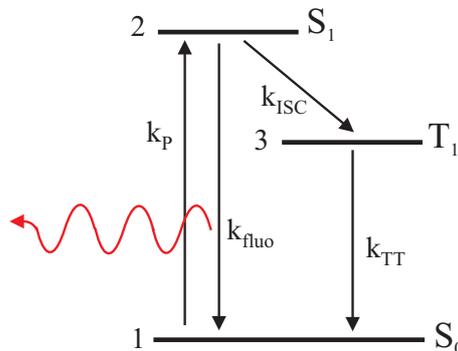


Abbildung 6.14: Vereinfachtes Niveauschema zur Berechnung der Fluoreszenzkorrelationsfunktion des LH1-Komplexes.

Das Ratengleichungssystem für dieses Schema lautet

$$\begin{aligned}
 \dot{n}_1 &= -k_P n_1 + k_{\text{fluo}} n_2 + k_{\text{TT}} n_3 \\
 \dot{n}_2 &= k_P n_1 - (k_{\text{fluo}} + k_{\text{ISC}}) n_2 \\
 \dot{n}_3 &= k_{\text{ISC}} n_2 - k_{\text{TT}} n_3
 \end{aligned} \tag{6.10}$$

mit der Randbedingung

$$n_1 + n_2 + n_3 = 1$$

Aus der Lösung für $n_2(t)$ ergibt sich nach Gl. (6.3) die Korrelationsfunktion für die Fluoreszenz. Nach Lösung des DGL-Systems (6.10) (siehe dazu: Anhang A) erhält man für die Korrelationsfunktion

$$g^{(2)}(\tau) = 1 - (K + 1)e^{k_1 \tau} + K e^{k_2 \tau} \tag{6.11}$$

mit den Raten

$$k_{1,2} = -\frac{1}{2}P \pm \sqrt{\frac{1}{4}P^2 - Q}$$

mit

$$\begin{aligned}
 P &= k_{\text{fluo}} + k_P + k_{\text{ISC}} + k_{\text{TT}} \\
 Q &= k_{\text{TT}}(k_{\text{fluo}} + k_P) + k_{\text{ISC}}(k_{\text{TT}} + k_P)
 \end{aligned}$$

und dem Koeffizienten

$$K = \frac{k_2 + k_{\text{TT}} - k_P \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{TT}}}}{k_1 - k_2}.$$

Das Sättigungsverhalten der Fluoreszenzintensität ergibt sich zu

$$I = n_2 k_{\text{fluo}} = \frac{k_P/k_P^*}{1 + k_P/k_P^*} I_\infty \tag{6.12}$$

mit dem Sättigungsparameter

$$k_P^* = \frac{k_{\text{fluor}} + k_{\text{ISC}}}{1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{TT}}}}$$

und der Sättigungsintensität

$$I_\infty = \frac{k_{\text{fluor}}}{1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{TT}}}}.$$

Eine Simulation der Autokorrelationsfunktion (6.11) ist in Abb. 6.15 dargestellt. Der Abfall der Kurve auf den Wert Null bei $\tau = 0$ ns, das *Antibunching*, ist zu erkennen sowie das *Bunching*. Die deutliche Sichtbarkeit des *Bunchings* ist die Folge der hohen Interkombinationsrate, deren Wert mit der Fluoreszenzrate vergleichbar ist. Der Triplettzustand des BChla mit seiner effektiven Lebensdauer wird dadurch effektiv bevölkert. Die Überlagerung der beiden Effekte, *Antibunching* und *Bunching*, führt zu diesem charakteristischen Verlauf der Korrelationsfunktion.

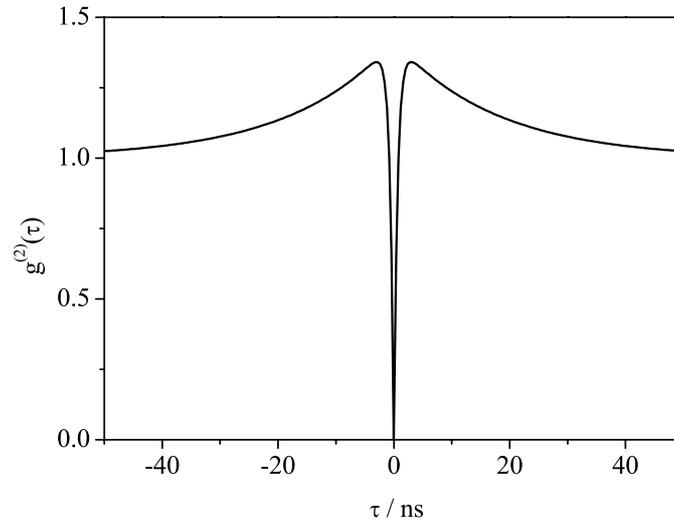


Abbildung 6.15: Simulation der Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ mit Gl. (6.11). Als Parameter wurden dabei gewählt: $k_P = (20 \text{ ns})^{-1}$, $k_{\text{fluor}} = (1 \text{ ns})^{-1}$, $k_{\text{ISC}} = (2 \text{ ns})^{-1}$ und $k_{\text{TT}} = (25 \text{ ns})^{-1}$.

Abbildung 6.16 zeigt die gemessene Koinzidenzrate $C(\tau)$ für einen rekonstituierten LH1-Komplex bei $T=1,8 \text{ K}$. Die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ folgt aus dieser durch Division der Koinzidenzrate durch ihren Wert für $|\tau| > 40 \text{ ns}$ [Yua02] [Mic00] und ist ebenfalls in Abb. 6.16 dargestellt (rechte Ordinate). Die Kanalbreite, d.h. der zeitliche Abstand benachbarter Meßpunkte, betrug bei dieser Aufnahme $0,079 \text{ ns}$

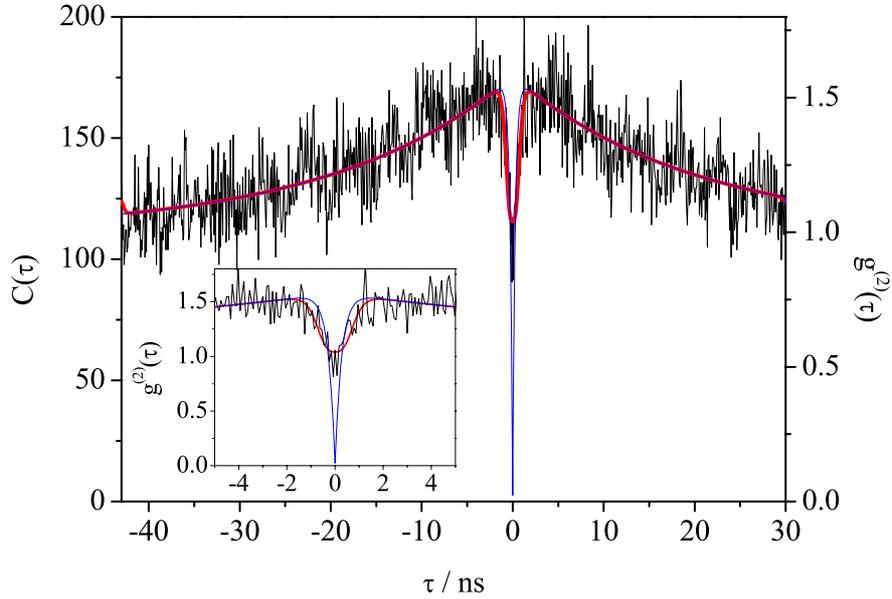


Abbildung 6.16: Koinzidenzrate $C(\tau)$ und Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ für einen LH1-Komplex bei $T=1,8\text{K}$. Gemessene Kurve (schwarz), mit Gl.(6.11) angepasste (blau) und mit der Antwortfunktion gefaltete Kurve (rot). Der Einschub zeigt den Verlauf der Autokorrelationsfunktion um den Zeitpunkt $\tau = 0$.

und die Meßdauer 27,6 min. Der Komplex wurde mit einer Leistung von $\simeq 500 \mu\text{W}$ angeregt. Die in Abb. 6.17 gezeigte Sättigungskurve zeigt, daß der Übergang bei diesen Leistungen gesättigt ist.

Man erkennt in Abb. 6.16 den Abfall der Messkurve um den Zeitpunkt $\tau = 0 \text{ ns}$ (*Antibunching*) sowie den Anstieg der Kurve für Zeiten $\tau \geq 1 \text{ ns}$ (*Bunching*) auf Werte größer als Eins. Aufgrund der Fluoreszenzlebensdauer von $(k_{\text{fluo}})^{-1} \leq 1 \text{ ns}$ und des zeitlich begrenzten Auflösungsvermögens des 2-Detektoraufbaus (siehe Kap. 2.2.3) ist ein Abfallen auf den Wert Null bei $\tau = 0 \text{ ns}$ nicht möglich. Die Anpassung der Gl. (6.11) an die gemessene Autokorrelationsfunktion ist in Abb. 6.16 als blaue Kurve dargestellt. Um das begrenzte zeitliche Auflösungsvermögen des Meßaufbaus zu berücksichtigen, wurde die angepasste Funktion mit der in Kap. 2.2.3, Abb. 2.7 gezeigten Antwortfunktion gefaltet. Das Ergebnis der Faltung ist als rote Kurve in Abb. 6.16 gezeigt. Für die Raten ergaben sich dabei die Werte $k_{\text{fluo}} = (0,33 \pm 0,03 \text{ ns})^{-1}$, $k_{\text{TT}} = (31 \pm 1 \text{ ns})^{-1}$ und $k_{\text{P}} = (7,7 \pm 0,6 \text{ ns})^{-1}$. Die Interkombinationsrate wurde mit $k_{\text{ISC}} = (2 \text{ ns})^{-1}$ [Lim98] fest gewählt. Die angepassten Raten k_{fluo} und k_{TT} sind vergleichbar mit den aus Ensemble-Messungen erhaltenen Daten (s. Abb. 6.13). Es ist zu erkennen, daß die gefaltete Funktion den Verlauf der Meßkurve gut

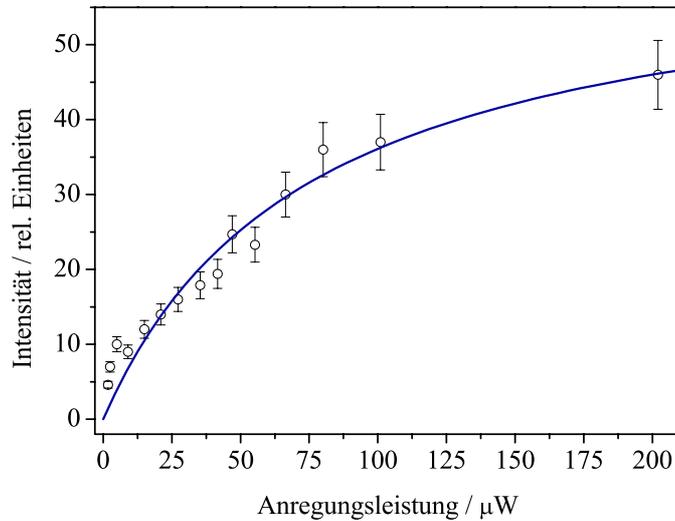


Abbildung 6.17: Sättigungsverhalten der Fluoreszenzintensität eines einzelnen rekonstituierten LH1-Komplexes bei $T=1,8\text{ K}$. Die Meßwerte sind vorher auf den Untergrund korrigiert worden. Die Sättigungskurve (blau) wurde mit Gl. (6.12) und den aus der Anpassung der Autokorrelationsfunktion erhaltenen Parametern angepaßt.

wiedergibt und um $\tau=0\text{ ns}$ sogar von ihr geschnitten wird.

Experimente bei Raumtemperatur

Abbildung 6.18 zeigt die Energielaxationsprozesse des LH1-Komplexes bei Raumtemperatur. Aufgrund des energetischen Abstandes von ungefähr 70 cm^{-1} zwischen den Zuständen $|k=0\rangle$ und $|k=\pm 1\rangle$ verteilt sich bei Raumtemperatur die Besetzung auf die untersten drei Zustände. Die Verteilung der Besetzung ist in Abb. 6.18 durch den grauen Kasten symbolisiert. Gemäß der Boltzmann-Verteilung sind die entarteten Zustände $|k=\pm 1\rangle$ bei $T=300\text{ K}$ 1,4-fach stärker besetzt als der tiefste Zustand. Bei Raumtemperatur fluoreszieren also die untersten drei Zustände.

Die Besetzungsdynamik der Zustände des LH1-Komplexes läßt sich wieder durch das Ratengleichungssystem (6.10) beschreiben, allerdings ist die Fluoreszenzrate k_{fluo} diesmal die gemeinsame Rate der drei fluoreszierenden Zustände $|k=\pm 1\rangle$ und $|k=0\rangle$.

Die Messungen wurden, wie bereits erwähnt, an Detergens-solubilierten LH1-Komplexen in einer Flüssigkeitszelle durchgeführt. Um sicherzustellen, daß sich im Mittel ein LH1-Komplex im Fokus befindet, wurde zu Beginn die Konzentration mit der in Kap. 6.1 vorgestellten Methode bestimmt (siehe auch Abb. 6.19 (B)). Die Anregung erfolgte bei 865 nm mit einer Leistung von ungefähr $18\text{ }\mu\text{W}$. Die Kanalbrei-

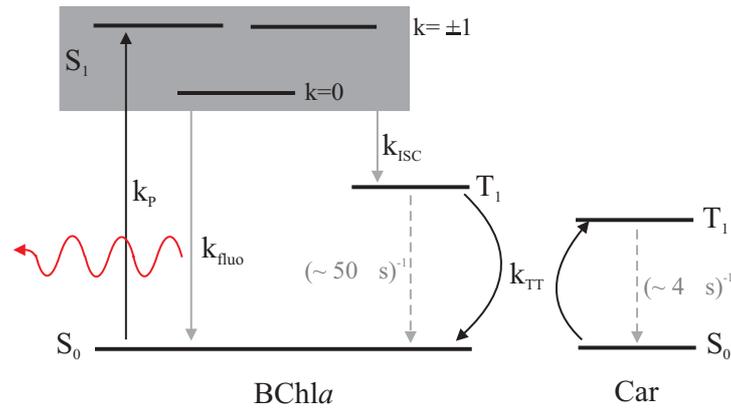


Abbildung 6.18: Energierelaxation im LH1-Komplex und Energietransfer zwischen dem BChla-Ring (BChla) und dem Carotinoid (Car) bei $T=300 \text{ K}$. Der fluoreszierende Übergang ist durch die rote Wellenlinie markiert. (Für die Erklärung der Raten k_i : siehe Text.)

te betrug $0,105 \text{ ns}$ und die Dauer der Messung 113 min . Abbildung 6.19 (A) zeigt die gemessene Koinzidenzrate $C(\tau)$ bzw. Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ (rechte Ordinate). Diese ergab sich durch Division der Koinzidenzrate durch ihren Wert für $|\tau| \geq 45 \text{ ns}$. Die blaue Kurve ist die Anpassung von Gl. (6.11) an die Meßdaten; um die Zeitaufösung zu berücksichtigen, wurde diese mit der Antwortfunktion (siehe Kap. 2.2.3) gefaltet (rote Kurve). Die Anpassung ergab für die Raten die Werte $k_{TT} = (25 \pm 1 \text{ ns})^{-1}$ und $k_p = (10,2 \pm 0,8 \text{ ns})^{-1}$. Die Interkombinationsrate wurde mit $k_{ISC} = (2 \text{ ns})^{-1}$ [Lim98] fest gewählt ebenso wie die Fluoreszenzrate $k_{fluo} = (0,68 \text{ ns})^{-1}$ (Literaturwert aus Raumtemperaturexperiment [Mon97]). Die angepaßte Funktion ist als blaue Kurve in Abb. 6.19 (A) dargestellt. Die Energietransferrate k_{TT} liegt im Bereich der Literaturwerte, die Raten zwischen $(12 \text{ ns})^{-1}$ und $(25 \text{ ns})^{-1}$ [Lim98][Mon76] angeben.

Der Einschub in Abb. 6.19 (A) zeigt, daß um den Zeitpunkt $\tau = 0$ die Meßdaten wegen des starken Rauschens oberhalb der für ein Molekül simulierten Autokorrelationskurve (rote Kurve) liegen. Eine Aussage, wieviele Moleküle sich im Fokus befanden, läßt sich aus dieser Messung daher nicht machen. Der korrigierte Kontrast der Autokorrelationsfunktion in Abb. 6.19 (B) für $\tau \rightarrow 0$ zeigt jedoch klar, daß sich im Mittel weniger als ein LH1-Komplex im Fokalvolumen befand. Die Ergebnisse zeigen, daß sich das Emissionsverhalten des Multichromophorsystem LH1 durch ein einfaches 3-Niveau-System beschreiben läßt. Die aus den Anpassungen gewonnenen Raten für den Energietransfer zwischen den Triplett-Zuständen des BChla und des Carotinoids sind mit den aus Ensemblemessungen erhaltenen Werten vergleichbar.

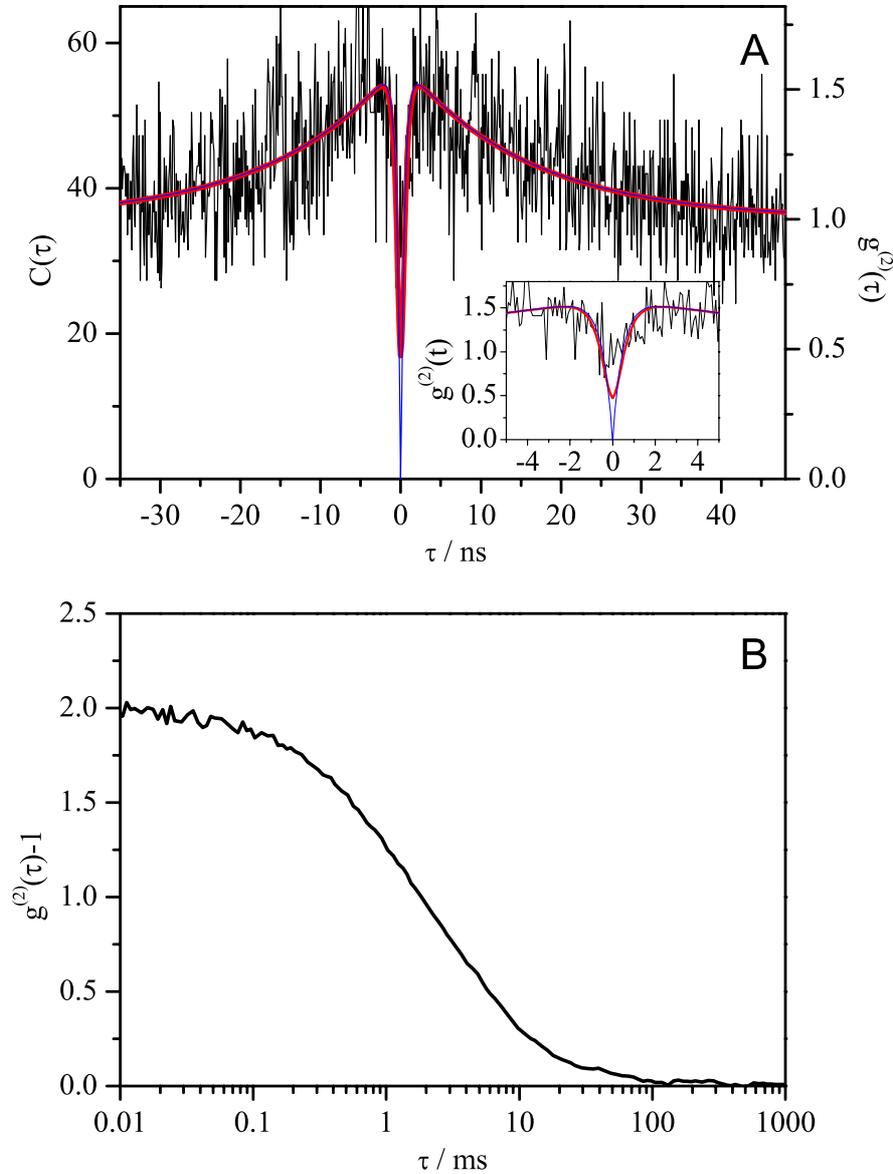
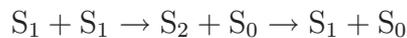


Abbildung 6.19: Gemessene Koinzidenzraten und Autokorrelationsfunktionen von Detergenssolubilisierten LH1-Komplexen in Lösung bei Raumtemperatur in verschiedenen Zeitbereichen. (A) Koinzidenzraten $C(\tau)$ und Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ in ns-Bereich. Gemessene Kurve (schwarz), mit Gl.(6.11) angepaßte (blau) und mit der Antwortfunktion gefaltete Kurve (rot). Der Einschub zeigt den Verlauf der Autokorrelationsfunktion um den Zeitpunkt $\tau = 0$. (B) Autokorrelationsfunktion bzw Kontrast $(g^{(2)}(\tau) - 1)$ im μ s- bis ms-Bereich zur Bestimmung der Konzentration der LH1-Komplexe in der Lösung. Es ist zu erkennen, daß sich im Mittel weniger als ein Komplex im Fokalvolumen befand.

Der Nachweis des *Antibunching* in beiden Experimenten belegt, daß die Fluoreszenz des Komplexes nur von einem einzigen Emitter, nämlich dem auf einige wenige Pigmente lokalisierten Exziton (s. Kap. 4.2.1) stammt.

Der Prozeß der Lokalisation der Anregung läuft auf einer Zeitskala von $\simeq 1$ ps ab und ist damit deutlich vor dem strahlenden Zerfall des Exzitons beendet. Die Lokalisation des Exzitons auf einem kleinen Bereich des LH1-Ringes ($\simeq 6$ BChla Moleküle) eröffnet nun die Möglichkeit, daß sich der Komplex bei entsprechend hohen Anregungsleistungen ein weiteres Mal anregen läßt und sich damit ein zweites Exziton ausbildet. Aufgrund der Beweglichkeit der Exzitonen können diese miteinander kollidieren. Bei einer Kollision kommt es dann zu folgendem Annihilationsprozeß



wobei der Übergang $S_2 \rightarrow S_1$ strahlungslos ist. Dieser Singulett–Singulett–Annihilationsprozeß wurde bereits an künstlichen Multichromophorsystemem [Tin02] [De 01] sowie an Lichtsammelkomplexen [Wes98] [Gul96] [Bra95] nachgewiesen. Die Zeitkonstanten des Annihilationsprozesses bei diesen Systemen liegen im ps-Bereich, so wird für den LH1-Komplex eine Zeit von < 20 ps angegeben [Wes98]. Exziton–Annihilation ist damit deutlich schneller als der strahlende Zerfall und praktisch vollständig abgeschlossen, bevor ein Photon emittiert wird. Voraussetzung für eine effektive Annihilalion ist neben der Kürze des eigentlichen Annihilationsprozesses auch eine entsprechend hohe Kollisionsrate der Exzitonen. Die in Kap. 4.2.1 erwähnte hopping time τ_{hop} für den LH1-Komplex im Bereich von ≤ 1 ps erscheint ausreichend, daß zwei Exzitonen innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer kollidieren. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ist es wegen der hohen Anregungsleistung wahrscheinlich, daß sich mehrere Exzitonen auf dem LH1-Ring anregen lassen. Die Beobachtbarkeit des *Antibunchings* läßt sich daher mit Annihilationsprozessen erklären. Daß die bei Raumtemperatur gemessene Autokorrelationsfunktion in Abb. 6.19 bei $\tau=0$ nicht auf den theoretischen Wert abfällt kann daher als Folge der schlechten Statistik und nicht etwa als Folge mehrerer relaxierender Exzitonen angesehen werden.

6.3.1 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden Messungen der Fluoreszenz–Autokorrelationsfunktion im ns-Bereich an einzelnen LH1-Komplexen bei $T=1,8$ K und bei Raumtemperatur präsentiert. Dabei wurde zum ersten Mal der Quanteneffekt des *Antibunching*

an einem Pigment-Protein-Komplex gemessen. Die Messungen ließen sich mit der theoretischen Autokorrelationsfunktion eines einfachen 3-Niveausystems anpassen, wobei die Energietransferrate zwischen dem Triplettzustand des LH1 und des Carotinoïds als effektive Relaxationsrate des Übergangs in den Grundzustand angenommen wurde. Bei den Anpassungen mußte wegen der kurzen Fluoreszenzlebensdauer des LH1 das Auflösungsvermögen des Meßaufbaus berücksichtigt werden. Die aus den Anpassungen gewonnenen Raten für diesen Energietransfer liegen im Bereich von 20–30 ns und stimmen mit den aus Ensemblemessungen erhaltenen Werte überein.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lichtsammelkomplexe LH1 und RC-LH1 des Purpurbakteriums *R. rubrum* untersucht. Die Messungen wurden an Detergenssolubilisierten sowie an in DOPC-Membranen rekonstituierten Komplexen durchgeführt. Dabei handelte es sich um die ersten Einzelmolekülmessungen an Lichtsammelkomplexen in Membranen überhaupt. Es wurden Emissionsspektren und polarisationsabhängige Anregungsspektren einzelner Komplexe bei $T=1,8$ K aufgenommen und mit Hilfe des Exziton-Modells analysiert. Weiterhin wurde das zeitliche Verhalten der Fluoreszenz bei $T=1,8$ K und bei Raumtemperatur mit FCS untersucht. Ebenfalls mit FCS wurde die Diffusion von Lipiden und des LH1-Komplexes in Membranen untersucht.

Es werden noch einmal kurz die Ergebnisse der einzelnen Messungen vorgestellt.

- Die in Kap. 5 durchgeführten Messungen der Emissions- und Anregungsspektren ergaben folgende Ergebnisse:
 - Die Emissionsspektren einzelner LH1- und RC-LH1-Komplexe zeigten vielfach eine deutlich ausgeprägte Null-Phononen-Linie des Übergangs $S_1 \rightarrow S_0$ mit sich anschließender Phononen-Seitenbande.
 - Die spektrale Position der Spektren wies auf eine deutliche Rotverschiebung zwischen dem emittierenden tiefsten Zustand und der Position des mit dem Exziton-Modell berechneten $|k = 0\rangle$ Zustandes hin. Zur Erklärung dieses Umstandes wurde das Polaron-Modell vorgeschlagen, das eine Absenkung der Energie des tiefsten Zustandes durch die Bildung eines polaronischen Zustandes auf dem LH1-Ring voraussagt.

- Die Verteilungen der spektralen Positionen der Null-Phononen-Linien bzw. blauen Kanten der Spektren zeigten einen sog. *solvent-shift* für rekonstituierte bzw. Detergens-solubilisierete LH1-Komplexe.
 - Polarisationsabhängige Anregungsspektren einzelner LH1-Komplexe zeigten, daß die Aufspaltung der $|k = \pm 1\rangle$ Zustände für rekonstituierte Komplexe geringer ist als für Detergens-solubilisierete. Simulationen der Spektren ergaben, daß die Einführung einer diagonale Unordnung von 150 cm^{-1} ausreicht, um die Ergebnisse für die rekonstituierten Komplexe zu erklären. Es wurde daraus geschlossen, daß die Membranjunggebung den LH1-Komplex in einer radialsymmetrischen Form stabilisiert.
 - Messungen polarisationsabhängiger Anregungsspektren einzelner RC-LH1-Komplexe ergaben, daß die Größe der Aufspaltung der Zustände $|k = \pm 1\rangle$ unabhängig von der Umgebung ist. Es reichte hier ebenfalls eine diagonale Unordnung von 150 cm^{-1} aus, um die Spektren zu simulieren. Die Anwesenheit des Reaktionszentrums stabilisiert den LH1-Ring in radialsymmetrischer Form.
 - Auf einigen Anregungsspektren des LH1- und des RC-LH1-Komplexes war die Absorption des $|k = 0\rangle$ Zustandes als schmale Linie sichtbar. Ihre spektrale Lage konnte durch das Exziton-Modell mit guter Genauigkeit vorhergesagt werden.
- Die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie in Kap. 6 ergab folgende Ergebnisse:
 - Die Messung des Diffusionskoeffizienten für die Diffusion einzelner LH1-Komplexe in einer DOPC-Membran ergab einen Wert von $\overline{D} = 4,9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$.
 - Die Messungen des Diffusionskoeffizienten für die Diffusion farbstoffmarkierter Lipide (PE) in einer DOPC-Membran ergaben zwei Verteilungen von Diffusionskoeffizienten mit Mittelwerten von $\overline{D} = 1,5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $\overline{D} = 1,8 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$. Der größere Diffusionskoeffizient beschreibt die Lipiddiffusion, während der kleinere Koeffizient der Diffusion den an Lichtsammelkomplexen gebundenen Lipiden zugeordnet wurde.
 - Durch Messungen der Autokorrelationsfunktion im ns-Bereich wurde der Quanteneffekt des Antibunching an LH1 bei $T=1,8 \text{ K}$ und bei Raumtemperatur demonstriert. Die Korrelationsfunktion ließ sich durch ein einfa-

ches 3-Niveau-System simulieren. Die aus den Simulationen gewonnenen Übergangsraten zeigten eine gute Übereinstimmung mit Raten, die aus zeitaufgelösten Ensemble-Messungen gewonnen wurden.

Das Ziel weiterer Arbeiten mit in Membranen rekonstituierten LH1-Komplexen müßte sein, die Präparationsmethode der Vesikel so zu verändern, daß diese einen Durchmesser deutlich größer als der Laserfokus erreichen. Erst dadurch wäre eine genaue Messung der Diffusionskonstanten des LH1-Komplexes möglich. Aufgrund seiner Form und Größe ist der Komplex hervorragend geeignet, um mit dem gemessenen Wert der Diffusionskonstanten, die Membranviskosität mit Hilfe des Saffman-Delbrück-Modells zu bestimmen.

Weiterhin sollte an einzelnen LH1-Komplexen gezielt versucht werden, die $|k=0\rangle$ Absorptionslinie und die Null-Phononen-Linie in Emission zu messen. Aus der Lage der beiden Linien bzw. aus deren energetischen Abstand ließen sich dann Aussagen über die Rotverschiebung der Emission und die Gültigkeit des Polaron-Modells machen.

Anhang A

Autokorrelationsfunktion eines 3-Niveau-Systems

Im folgenden Abschnitt wird die vollständige Herleitung der in Kap. 6.3 benutzten Funktion zur Anpassung der Autokorrelationsmessungen wiedergegeben. Abbildung A.1 zeigt nochmal das dort verwendete 3-Niveau-Modell.

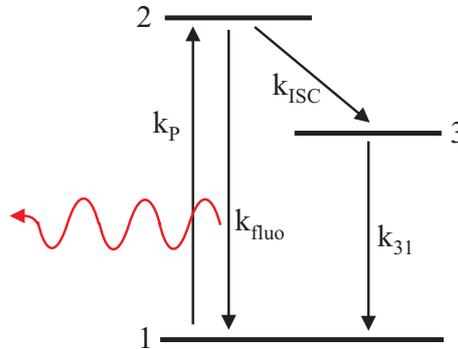


Abbildung A.1: 3-Niveau-System für die Fluoreszenz eines LH1-Komplexes.

Dieses 3-Niveau-Modell wird beschrieben durch das DGL-System

$$\begin{aligned}\dot{n}_1 &= -k_p n_1 + k_{\text{fluo}} n_2 + k_{31} n_3 \\ \dot{n}_2 &= k_p n_1 - (k_{\text{fluo}} + k_{\text{ISC}}) n_2 \\ \dot{n}_3 &= k_{\text{ISC}} n_2 - k_{31} n_3\end{aligned}\tag{A.1}$$

wobei die n_i für die Besetzung der jeweiligen Zustände stehen. Die Funktion $n_2(t)$

ist gesucht, denn mit ihr wird die Korrelationsfunktion

$$g^{(2)}(t) = \frac{n_2(t)}{n_2(t \rightarrow \infty)} \quad (\text{A.2})$$

des emittierten Lichts bestimmt.

Die Anfangsbedingungen für das betrachtete System lauten

$$n_1(0) = 1 \quad n_2(0) = n_3(0) = 0 \quad (\text{A.3})$$

und zusätzlich gilt als Randbedingung

$$n_1 + n_2 + n_3 = 1 \quad \Rightarrow \quad \dot{n}_1 + \dot{n}_2 + \dot{n}_3 = 0, \quad (\text{A.4})$$

da die Gesamtbesetzung zu jedem Zeitpunkt erhalten bleiben muß. Das DGL-System (A.1) ist somit überbestimmt.

Durch Anwendung der Randbedingung (A.4) läßt sich die Gleichung für \dot{n}_3 in (A.1) eliminieren, und das DGL-System reduziert sich zu

$$\begin{aligned} \dot{n}_1 &= -(k_P + k_{31})n_1 + (k_{\text{flu0}} - k_{31})n_2 + k_{31} \\ \dot{n}_2 &= k_P n_1 - (k_{\text{flu0}} + k_{\text{ISC}})n_2. \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

Das inhomogene DGL-System (A.5) läßt sich mit einer Laplace-Transformation

$$f^*(s) = \mathcal{L}\{f(t)\} \equiv \int_0^\infty e^{-st} f(t) dt$$

in zwei algebraische Gleichungen umformen. Man erhält somit

$$\begin{aligned} s n_1^* - 1 &= -(k_P + k_{31})n_1^* + (k_{\text{flu0}} - k_{31})n_2^* - \frac{k_{31}}{s} \\ s n_2^* &= k_P n_1^* - (k_{\text{flu0}} + k_{\text{ISC}})n_2^* \end{aligned} \quad (\text{A.6})$$

bzw.

$$\begin{aligned}
(s + k_P + k_{31})n_1^* + (k_{\text{fluo}} - k_{31})n_2^* &= 1 + \frac{k_{31}}{s} \\
k_P n_1^* - (s + k_{\text{fluo}} + k_{\text{ISC}})n_2^* &= 0.
\end{aligned} \tag{A.7}$$

Dabei wurde von dem Differentiationsatz der Laplace-Transformation

$$\mathcal{L}\{f^{(m)}(t)\} = s^m f^*(s) - s^{m-1}f(0) - \dots - s f^{(m-2)}(0) - f^{(m-1)}(0)$$

und der Transformation

$$\mathcal{L}\{c\} = \frac{c}{s} \quad \text{für } c = \text{const.}$$

Gebrauch gemacht. Aus den beiden Gleichungen (A.7) ergibt sich für n_2^*

$$\begin{aligned}
n_2^*(s) &= \frac{k_P}{s} \frac{s + k_{31}}{s^2 + s(k_{\text{fluo}} + k_P + k_{\text{ISC}} + k_{31}) + (k_{\text{fluo}} + k_P)k_{31} + (k_{31} + k_P)k_{\text{ISC}}} \\
&= \frac{k_P}{s} \frac{s + k_{31}}{s^2 + Ps + Q} \\
&= \frac{k_P}{s} \frac{s + k_{31}}{(s - s_1)(s - s_2)}
\end{aligned} \tag{A.8}$$

mit den Größen

$$s_{1,2} = -\frac{1}{2}P \pm \sqrt{\frac{1}{4}P^2 - Q}$$

und

$$\begin{aligned}
s_1 + s_2 &= P = k_{\text{fluo}} + k_P + k_{\text{ISC}} + k_{31} \\
s_1 s_2 &= Q = k_{31}(k_{\text{fluo}} + k_P) + k_{\text{ISC}}(k_{31} + k_P).
\end{aligned}$$

Für die Rücktransformation wird mit dem Ausdruck (A.8) eine Partialbruchzerlegung durchgeführt:

$$n_2^*(s) = \frac{k_P(s + k_{31})}{s(s - s_1)(s - s_2)}$$

$$\begin{aligned}
n_2^*(s) &= \frac{A(s-s_1)(s-s_2) + Bs^2 + Cs}{s(s-s_1)(s-s_2)} \\
&= \frac{A}{s} + \frac{Bs+C}{(s-s_1)(s-s_2)}
\end{aligned}$$

mit den Koeffizienten

$$A = \frac{k_P k_{31}}{s_1 s_2} \quad B = -A \quad C = k_P \left(1 + \frac{s_1 + s_2}{s_1 s_2} \right).$$

Der Ausdruck für $n_2^*(s)$ besitzt jetzt eine Form, deren Rücktransformation in den geläufigen mathematischen Tabellenwerken, wie z.B dem *Taschenbuch der Mathematik* von Bronstein und Semendjajew [Bro87], nachzuschlagen ist. Die gesuchte Funktion n_2 lautet nun

$$n_2(t) = A + \frac{Bs_1 + C}{s_1 - s_2} e^{s_1 t} - \frac{Bs_2 + C}{s_2 - s_1} e^{s_2 t}. \quad (\text{A.9})$$

Aus Gl.(A.9) ist außerdem direkt ersichtlich, daß $n_2(t \rightarrow \infty) = A$ gilt. Für die Korrelationsfunktion (A.2) des emittierten Lichtes folgt somit

$$g^{(2)}(t) = 1 - \frac{s_1 + k_{31} - k_P \frac{k_{1SC}}{k_{31}}}{s_1 - s_2} e^{s_1 t} + \frac{s_2 + k_{31} - k_P \frac{k_{1SC}}{k_{31}}}{s_1 - s_2} e^{s_2 t}.$$

Diesen Ausdruck kann man nun weiter umformen zu

$$g^{(2)}(t) = 1 - (K + 1)e^{s_1 t} + Ke^{s_2 t}. \quad (\text{A.10})$$

mit dem Koeffizienten

$$K = \frac{s_2 + k_{31} - k_P \frac{k_{1SC}}{k_{31}}}{s_1 - s_2}.$$

Veröffentlichungsliste

- U. Gerken, D. Lupo, C. Tietz, J. Wrachtrup und R. Ghosh zur Veröffentlichung akzeptiert. *Biochemistry* (2003)
- U. Gerken, F. Jelezko, B. Götze, M. Branschädel, C. Tietz, R. Ghosh und J. Wrachtrup *J. Phys. Chem. B*, 107 (1), 338–343 (2003)
- U. Gerken, H. Wolf–Klein, Chr. Huschenbett, B. Götze, S. Schuler, F. Jelezko, C. Tietz, J. Wrachtrup und H. Paulsen *Single Mol.*, 3 (4), 19–25 (2002)
- C. Tietz, F. Jelezko, U. Gerken, S. Schuler, A. Schubert, H. Rogl und J. Wrachtrup *Biophys. J.*, 81, 556–562, (2001)
- F. Jelezko, C. Tietz, U. Gerken, J. Wrachtrup und R. Bittl *J. Phys. Chem.*, 104 (34), 8093–8096 (2000)
- C. Tietz, U. Gerken, F. Jelezko und J. Wrachtrup *Single Mol.*, 1 (1), 67–72 (2000)

Literaturverzeichnis

- [All87] Allen, J. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84, 6162–6166 (1987).
- [Ame97] Amelickx, S. et al., Herausgeber. *Handbook of Microscopy, Methods I*. VCH Weinheim (1997).
- [Ans85] Ansari, A. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82, 5000 (1985).
- [Ara76] Aragón, S.R. und Pecora, R. *J. Chem. Phys.*, 64, 1791–1803 (1976).
- [Aut02] Authenrieth, F. et al. (2002). Zur Veröffentlichung eingereicht.
- [Bas92] Basché, Th. et al. *Phys. Rev. Letters*, 69, 1516–1519 (1992).
- [Bas97] Basché, Th. et al., Herausgeber. *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. VCH Weinheim (1997).
- [Ber93] Bernard, J. et al. *J. Phys. Chem.*, 98, 850 (1993).
- [Ber00] Bernhardt, K. und Trissl, H.-W. *Biochim. Biophys. Acta*, 1457, 1–17 (2000).
- [Bev] Beveratos, A. et al. *EPJD*. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- [Boo00] Book, L.D. et al. *J. Phys. Chem. B*, 104, 8295–8307 (2000).
- [Bop97] Bopp, M.A. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 10630–10635 (1997).
- [Bra95] Bradforth, S.E. et al. *J. Phys. Chem.*, 91, 16179–16191 (1995).
- [Bra01] Branschädel, M. *Characterization of a carotenoid mutant LH1 complex of Rhodospirillum rubrum*. Studienarbeit, Institut für Biologie, Universität Stuttgart (2001).
- [Bro87] Bronstein, I.N. und Semendjajew, K.A. *Taschenbuch der Mathematik*. B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig (1987).

- [Che79] Cherry, R. *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 289–327 (1979).
- [De 01] De Belder, G. et al. *ChemPhysChem*, 1, 1439–1435 (2001).
- [Dei85] Deisenhofer, J. et al. *Science*, 318, 618–624 (1985).
- [Dev72] Devaux, P. und McConnell, H.M. *J. Am. Chem. Soc.*, 13, 1022 (1972).
- [dH99] den Hartog, F.T.H. et al. *J. Phys. Chem. B*, 103, 1375–1380 (1999).
- [Erm94] Ermler, U. et al. *Structure*, 2, 925–936 (1994).
- [Fid91] Fidler, H. et al. *J. Phys. Chem.*, 95, 7880–7890 (1991).
- [Fra84] Fragata, M. et al. *Biochemistry*, 23, 4044–4051 (1984).
- [Fra91] Frauenfelder, H. et al. *Science*, 254, 1598 (1991).
- [Fra99] Frauenfelder, H. et al., Herausgeber. *Simplicity and Complexity in Proteins and Nucleic Acids*. Dahlem University Press, New-York, erste Auflage (1999).
- [Gal79] Galla, H.J. et al. *J. Membr. Biol.*, 48, 215–236 (1979).
- [Ger03a] Gerken, U. et al. *J. Phys. Chem. B*, 107 (1), 338–343 (2003).
- [Ger03b] Gerken, U. et al. zur Veröffentlichung akzeptiert (2003).
- [Gho88] Ghosh, R. et al. *Biochemistry*, 27, 1004–1014 (1988).
- [Gho93] Ghosh, R. et al. *J. Mol. Biol.*, 231, 501–504 (1993).
- [Gö01] Götze, B. *Mikroskopie und Spektroskopie an einzelnen Pigment-Protein-Komplexen in Vesikeln*. Diplomarbeit, 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart (2001).
- [Goe72] Goedheer, J.C. *Biochim. Biophys. Acta*, 275, 169–176 (1972).
- [Goo00] Gooijer, C. et al., Herausgeber. *Shpo'lskii Spectroscopy ond other Site-Selection Methods*. John Wiley & Sons, New York (2000).
- [Gul96] Gulbinas, V. et al. *J. Phys. Chem.*, 100, 17950–17955 (1996).
- [Hel00] Hell, S.W. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 97 (15), 8206–8210 (2000).

- [Hu97] Hu, X. et al. *J. Phys. Chem. B*, 101, 3854–3871 (1997).
- [Hu02] Hu, X. et al. (2002). Zur Veröffentlichung eingereicht.
- [Hug81] Hughes, B. D. et al. *J. Fluid Mech.*, 110, 349–372 (1981).
- [Hug82] Hughes, B. D. et al. *Biophys. J.*, 37, 673–676 (1982).
- [Hum96] Humphrey, W. et al. *J. Molecular Graphics*, 14 (1996).
- [Jam02] Jamieson, S.J. et al. *EMBO J.*, 21 (15), 3927–3925 (2002).
- [Jos73] Jost, P.C. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 480 (1973).
- [Jos82] Jost, P.C. und Hayes, O., Herausgeber. *Lipid-Protein Interactions*. John Wiley & Sons, New-York (1982).
- [Jun99] Jungas, C. et al. *EMBO J.*, 18, 534–543 (1999).
- [Kar95] Karrasch, S. et al. *EMBO J.*, 14 (4), 631–638 (1995).
- [Ke01] Ke, P. Ch. und Naumann, Ch. *Langmuir*, 17, 3727–3733 (2001).
- [Ket01] Ketelaars, M. et al. *Biophys. J.*, 80, 1591–1603 (2001).
- [Ket02] Ketelaars, M. et al. *Biophys. J.*, 83, 1701–1715 (2002).
- [Kö93] Köhler, J. et al. *Nature*, 263, 242 (1993).
- [Kö00] Köhler, J. *Phys. Bl.*, 56 (1), 47–50 (2000).
- [Koe96] Koepke, J. et al. *Structure*, 4, 581–597 (1996).
- [Kom98] Komori, M. et al. *Biochemistry*, 37 (25), 8987–8994 (1998).
- [Kra84] Kramer, H.J.M. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 765, 156–165 (1984).
- [Kur00] Kurtsiefer, Ch. et al. *Phys. Rev. Letters*, 58 (2), 290–293 (2000).
- [Lee96] Leegwater, J.A. *J. Phys. Chem.*, 100, 14403–14409 (1996).
- [Leu96] Leupold, D. et al. *Phys. Rev. Letters*, 77, 4675–4678 (1996).
- [Lim98] Limantara, L. et al. *Biochemistry*, 37, 17469–17486 (1998).
- [Mai97] Maiti, S. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 11753–11757 (1997).

- [Mat01] Matsushita, M. et al. *Biophys. J.*, 80, 1604–1614 (2001).
- [MB85] Michel-Beyerle, M. E., Herausgeber. *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria*. Springer, Berlin (1985).
- [McC73] McClain, W.M. *Applied Optics*, 12, 153 (1973).
- [McD95] McDermott, G. et al. *Nature*, 374, 517–521 (1995).
- [Mes99] Meseth, U. et al. *Biophys. J.*, 76, 1619–1631 (1999).
- [Mic00] Michler, P. et al. *Nature*, 406, 968–970 (31 August 2000).
- [Moe89] Moerner, W.E. und Kador, L. *Phys. Rev. Letters*, 62, 2535 (1989).
- [Mon76] Monger, T.G. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 449, 136 (1976).
- [Mon97] Monshouwer, R. et al. *J. Phys. Chem. B*, 101, 7241–7248 (1997).
- [Noj97] Noji, H. et al. *Nature*, 386, 299 (1997).
- [Nov94] Novoderezhkin, V.I. und Razjivin, A.P. *Photosynth. Res.*, 42, 9–15 (1994).
- [Orr90] Orrit, M. und Bernard, J. *Phys. Rev. Letters*, 65, 2716–2719 (1990).
- [Pap96] Papiz, M.Z. et al. *Trends Plant Sci.*, 1, 198–206 (1996).
- [Par84] Parente et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 812, 493–502 (1984).
- [Paw91] Pawley, J.B., Herausgeber. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum, New-York, zweite Auflage (1991).
- [Pet82] Peters, P.G. und Cherry, R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79, 4317–4321 (1982).
- [Pol00] Polivka, T. et al. *J. Phys. Chem. B*, 104, 1088–1096 (2000).
- [Pul95] Pullerits, T. et al. *Chem. Phys.*, 194, 395–407 (1995).
- [Pul96a] Pullerits, T. und Sundström, V. *Acc. Chem. Res.*, 29, 381–389 (1996).
- [Pul96b] Pullerits, T. et al. *J. Phys. Chem.*, 100, 10787 (1996).
- [Red92] Reddy, N.R.S. et al. *J. Phys. Chem.*, 96, 6458–6464 (1992).

- [Rig93] Rigler, R. et al. *Eur. Biophys. J.*, 22, 169–175 (1993).
- [Roy99] Royer, C.A., Herausgeber. *Proteins*. Biophysics Textbooks online. Biophysical Society, <http://www.biophysics.org/btol/Scarлата.html> (1999).
- [Saf75] Saffman, P G. und Delbrück, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 27 (8), 3111–3115 (1975).
- [Saf76] Saffman, P. *J. of Fluid Mech.*, 73 (4), 593–602 (1976).
- [Sch91] Scheer, H., Herausgeber. *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, Florida (1991).
- [Sch96] Schmidt, Th. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 2926–2929 (1996).
- [Sch03] Scheuring, S. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 18, 1690–1693 (2003).
- [Sei01] Seisenberger, G. et al. *Science*, 294, 1929–1932 (30. November 2001).
- [She90] Shera, E.B. et al. *Chem. Phys. Lett.*, 174, 553 (1990).
- [Sic00] Sick, B. et al. *Phys. Rev. Letters*, 85, 4482–4485 (2000).
- [Sma95] Small, G.J. *Chem. Phys.*, 197, 239–257 (1995).
- [Sta98] Stahlberg, H. et al. *J. Mol. Biol.*, 282, 819–831 (1998).
- [Stö98] Störkel, U. et al. *J. Lumin.*, 76/77, 327–330 (1998).
- [Tam00] Tamarat, Ph. *J. Phys. Chem. A*, 104 (1), 1–16 (2000).
- [Tie99] Tietz, C. et al. *J. Phys. Chem. B*, 103, 6328–6333 (1999).
- [Tie01] Tietz, C. *Untersuchungen an einzelnen Pigmenten und Pigment-Proteinkomplexen*. Dissertation, Universität Stuttgart, 3 Physikalisches Institut (2001).
- [Tin02] Tinnefeld, Ph. et al. *JACS*, 124, 14310–14311 (2002).
- [Tre00] Tretiak, S. et al. *J. Phys. Chem. B*, 104, 9540–9553 (2000).
- [van99] van Oijen, A.M. et al. *Science*, 285, 400–402 (September 1999).
- [Vaz84] Vaz, W.C.L. et al. *Biochemistry*, 24, 781–786 (1984).

- [vD88] van Dorssen, R.J. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 932, 179–188 (1988).
- [vG01] van Grondelle, R. und Novoderezhkin, V. *Biochemistry*, 40 (50), 15057–15068 (2001).
- [Vis96] Vissers, H. et al. *J. Phys. Chem.*, 100, 18859–18867 (1996).
- [Wal97] Waltz, Th. und Ghosh, R. *J. Mol. Biol.*, 256, 107–111 (1997).
- [Web97] Webb, R.H. *Rep. Prog. Phys.*, 59, 427–471 (1997).
- [Wes98] Westerhuis, W.H.J. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366, 317–329 (1998).
- [Wid99] Widengren, J. et al. *Chem. Phys.*, 250, 171–186 (1999).
- [Woh99] Wohland, T. et al. *Biochemistry*, 38, 8671–8681 (1999).
- [Woo94] Woodbury, N. et al. *Biochemistry*, 33, 1801–8112 (1994).
- [Wra93] Wrachtrup, J. et al. *Nature*, 263, 244 (1993).
- [Wu98] Wu, H.-M. et al. *J. Phys. Chem. B*, 102, 4023–4034 (1998).
- [Yua02] Yuan, Z. et al. *Science*, 295, 102–105 (4. Januar 2002).

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Jörg Wrachtrup bedanken, der es mit ermöglichte, am 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart zu promovieren, sowie bei Carsten Tietz und Fedor Jelezko, die mir bei der Einarbeitung in das Gebiet der Einzelmolekülspektroskopie behilflich waren und mir jederzeit mit wissenschaftlichem Rat und experimentellem Geschick zur Seite standen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Robin Ghosh aus der Abteilung Bioenergetik des Biologischen Instituts und seinen Mitarbeitern Domenico Lupo und Marcus Branschädel, die durch die Präparation der Lichtsammelkomplexe und wissenschaftliche Diskussionen einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Britta Götze, Sebastian Schuler und Andreas Volkmer für manche Hilfe bei den Messungen und der Probenpräparation, Andrew Aird für die VMD-Bilder in dieser Arbeit, Achim Gruber für die graphische Darstellung der Abbildungsfunktionen und bei Aleksander Nizovtsev für die Hilfe bei der Berechnung der Autokorrelationsfunktion.

Bei allen anderen Mitgliedern des Instituts und insbesondere bei Markus Braun, Oliver Wendland und Jens Blömker bedanke ich mich für die gute Aufnahme am Institut und das nette Arbeitsklima. Ein Dankeschön auch an die Mitarbeiter der mechanischen Werkstatt, Helium-Werkstatt und der E-Werkstatt des Physikalischen Instituts.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium finanziert haben und mir in allen Lebenslagen stets beistanden.