

# Untersuchungen an einzelnen Pigmenten und Pigment-Protein-Komplexen

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

Vorgelegt von

**Carsten Tietz**

aus Mettmann

Hauptberichter:	Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter:	Prof. Dr. Michael Mehring
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Hans-Rainer Trebin
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Mai 2001

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart

2000



# Inhalt

Kapitel 1	Einleitung.....	7
Kapitel 2	Konfokale Mikroskopie.....	11
2.1	Grundlagen.....	11
2.2	Der experimentelle Aufbau für Untersuchungen bei Raumtemperatur.....	16
2.3	Der experimentelle Aufbau für Untersuchungen bei tiefen Temperaturen.....	19
2.4	Detektionseffizienz.....	21
Kapitel 3	Einzelne Farbstoffmoleküle auf Oberflächen.....	25
3.1	Einführung.....	25
3.2	Probenpräparation.....	26
3.3	Konfokale Mikroskopie einzelner Farbstoffmoleküle.....	28
3.3.1	Evidenz für die Detektion einzelner Moleküle.....	28
3.3.2	Dynamik der Fluoreszenz.....	30
3.4	Korrelationsspektroskopie einzelner Farbstoffmoleküle.....	32
3.4.1	Die Autokorrelationsfunktion.....	32
3.4.2	Ergebnisse.....	36
3.4.3	Diskussion der Zerfallszeiten.....	39
3.4.4	Abschätzung der Frequenzverschiebung.....	42
3.4.5	Mögliche physikalische Ursache der spektralen Sprünge.....	45
3.5	Fazit.....	48
Kapitel 4	Einzelne Antennenkomplexe von Purpurbakterien.....	51
4.1	Einführung.....	51
4.1.1	Struktur des LH2-Komplexes.....	54
4.1.2	Struktur des Kernkomplexes.....	56
4.2	Elektronische Struktur des B850-Aggregats.....	57
4.3	Definition der Kohärenzlänge.....	64
4.4	Probenpräparation.....	66
4.5	Mikroskopie an einzelnen LH2-Komplexen bei Raumtemperatur.....	68

4.5.1	Nachweis einzelner Moleküle .....	68
4.5.2	Orientierung der LH2-Komplexe auf dem Substrat .....	69
4.5.3	Intensitätsverhalten einzelner LH2-Komplexe .....	71
4.5.4	Polarisationsverhalten einzelner LH2-Komplexe .....	72
4.6	Einzelne LH2-Komplexe bei Temperaturen unterhalb 200 K.....	76
4.6.1	Abhängigkeit der Emission von der Polarisation des Anregungslichts.....	79
4.7	Diskussion der linearen Polarisation bei $T < 250$ K.....	80
4.7.1	Einführung einer diagonalen Unordnung, die deutlich größer ist als die Wechselwirkung zwischen benachbarten BChl-Molekülen.....	81
4.7.2	Einführung einer elliptischer Verzerrung des gesamten Aggregats. ....	83
4.7.3	Einführung einer quadratischen Deformation des Aggregates.....	86
4.7.4	Zusammenfassende Bemerkungen .....	86
4.8	Diskussion des Polarisationsverhalten bei Raumtemperatur.....	87
4.9	Fluoreszenz-Emissionsspektren einzelner LH2-Komplexe.....	89
4.10	Berechnung der Emissionsspektren.....	92
4.11	Fazit .....	96
Kapitel 5	Einzelne Antennenkomplexe von höheren Pflanzen .....	99
5.1	Einführung .....	99
5.2	Struktur des LHC-II-Komplexes .....	102
5.3	Probenpräparation.....	104
5.4	Polarisationsmessungen.....	105
5.4.1	Experimentelle Realisation.....	105
5.4.2	Trimere bei tiefen Temperaturen.....	107
5.4.3	Monomere.....	109
5.4.4	Trimere bei Raumtemperatur.....	113
5.4.5	Phasensprünge der Polarisation von Monomeren .....	115
5.4.6	Kritische Schlussbemerkungen zu den Polarisationsmessungen.....	119
5.5	Emissionsspektren einzelner LHC-II.....	121
5.6	Anregungsspektren von LHC-II Trimeren .....	126
5.6.1	Realisierung .....	126
5.6.2	Anregungsspektren mit geringer Auflösung.....	127

5.6.3	Anregungsspektren mit hoher Auflösung .....	129
5.7	Proteindynamik in LCH-II.....	132
5.7.1	Energielandschaft von Proteinen .....	132
5.7.2	Spektrale Diffusion bei tiefen Temperaturen .....	134
5.8	Fazit .....	138
Kapitel 6	Zusammenfassung .....	141



# Kapitel 1

## Einleitung

In den letzten 20 Jahren wurden eine Vielzahl höchst erfolgreicher Untersuchungsmethoden entwickelt, die es gestatten, die Materie auf einer atomaren bzw. molekularen Ebene zu untersuchen und zu manipulieren. Hatte Erwin Schrödinger 1952 noch geschrieben, es würde niemals Experimente an einzelnen Elektronen, Atomen oder Molekülen geben [1], so wurden wenige Dekaden später mit der Ionenfalle [2] und dem Rastertunnelmikroskop (STM) [3] die Geräte entwickelt, die als erstes Beobachtungen und Manipulationen auf atomarer Ebene ermöglichten.

Die optische Detektion einzelner Moleküle (*single molecule detection*, SMD) gelang erstmals Ende der achtziger Jahre unabhängig voneinander in den Gruppen von Moerner [4] mittels modulierter Absorption und Orrit [5] mittels Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie jeweils am System Pentazen in p-Terphenyl (also im Festkörper) bei tiefen Temperaturen, sowie in der Gruppe von Keller [6], in der einzelne Fluorophore in einem Flüssigkeitsstrom nachgewiesen werden konnten. Im Folgenden wurden bei tiefen Temperaturen Quanteneigenschaften an einzelnen Molekülen demonstriert, die in Ensemblemessungen ausgemittelt würden, wie z.B. Photonbunching [7], Photonantibunching [8;9] oder die direkte Sichtbarmachung von Zwei-Niveau-Systemen [10;11]. Drei Jahre später gelang wiederum unabhängig voneinander in den Gruppen von Moerner und Orrit erstmalig die Detektion eines einzelnen Spins mittels ODMR

(optisch detektierte magnetische Resonanz) [12;13]. Viele der Resultate der Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen sind in Ref. [14] zusammengefasst.

Ein wesentlicher Schritt zur Erweiterung der Systeme, die der Detektion auf Einzelmolekülniveau zugänglich gemacht wurden, war die Demonstration von Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Moleküle bei Raumtemperatur, und zwar zuerst 1993 mittels Nahfeldmikroskopie [15-18] (*near-field scanning optical microscopy*, NSOM) und später 1996 mittels konfokaler Mikroskopie [19]. Mit der Entwicklung immer empfindlicherer und rauschärmerer CCD-Kameras wurde es auch möglich nicht-scannende Weitfeld-Mikroskopieverfahren zur SMD einzusetzen [20]. Insbesondere mittels Anregung durch interne Totalreflexion (*total internal reflection*, TIR) lässt sich das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessern [21].

Mit diesen Techniken demonstrierte die Gruppe von Yanagida 1995 die erste biologische SMD, und zwar den Umsatz einzelner ATP-Moleküle durch ein einzelnes Myosinmolekül [21]. Es folgten im zunehmenden Maße Untersuchungen an einzelnen Biomolekülen, was sich deutlich in der Anzahl der SMD-Publikationen der letzten drei Jahre niederschlägt (siehe Abbildung 1.1). Einige der ersten Arbeiten untersuchten einzelne Motorproteine, wie das Gleiten von Actin-Filamenten über Meromyosin [22] oder die Bewegung einzelner Kinesin-Moleküle entlang eines Mikrotubulus [23] sowie die Beobachtung einzelner Lipide in einer künstlichen Phospholipidmembran [24].

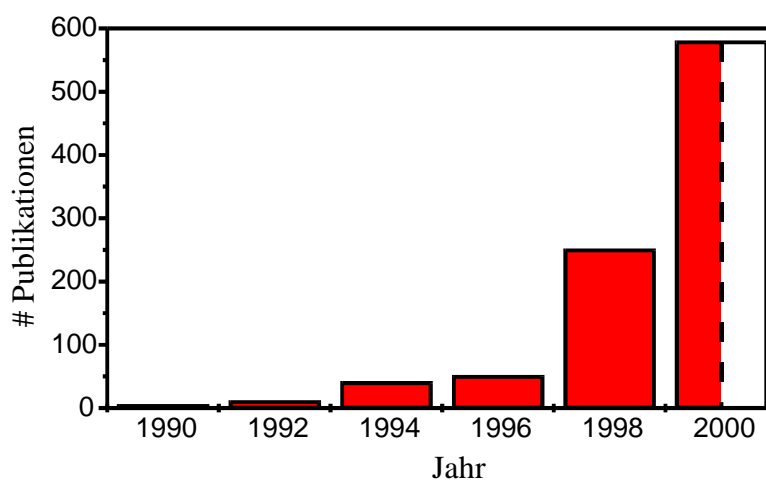


Abbildung 1.1 Anzahl der Publikationen zum Thema „einzelne Moleküle“ der letzten zehn Jahre.



Aus der Fülle an optischen SMD-Experimenten an Biomolekülen, die bis zum heutigen Tage folgten, sollen nur einige Beispiele herausgegriffen werden. Das wohl aufsehenerregendste Experiment gelang der Gruppe von Kinosita: Das Drehen des molekularen Motors  $F_1$ -ATPase in  $120^\circ$  Schritten konnte direkt in Videorate sichtbar gemacht werden [25-27]. Des Weiteren wurde ein einzelnes RNA-Polymerase-Molekül, das sich während der Transkription an einen DNA-Strang entlangbewegt, beobachtet [28], Memory-Effekte beim Umsatz einzelner Enzyme (Cholesterol-Oxidase) wurden beobachtet [29], die Konformationsdynamik einzelner Enzyme (Staphylococcal-Nuklease) [30] oder Konformationsänderungen einzelner RNA-Moleküle (*three-helix junction RNA*) mittels FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) [31].

Neben der Fülle von Arbeiten an biologischen Systemen wird die SMD auch weiterhin neuen nicht-biologischen Systemen zugänglich gemacht, wie einzelnen Quantenpunkten [32], einzelnen Farbzentren [33] oder auch Quantenoptik an einzelnen Molekülen [34;35].

Zusätzlich zu diesen optischen Arbeiten an einzelnen Molekülen nimmt auch die Anzahl an Arbeiten, die sich mit Kraftmessungen mittels Kraftmikroskop (AFM) und optischen Pinzetten (*optical tweezers*) beschäftigen, drastisch zu. So wurden mit diversen Methoden die elastischen Eigenschaften von einzelnen DNA- und RNA-Molekülen untersucht [36;37], es wurden die Kräfte gemessen, die Transkriptionsproteine [38] oder Muskelproteine [39;40] ausüben oder die Stärke kovalenter Bindungen bestimmt [41].

In dieser Arbeit werden in erster Linie Antennenkomplexe untersucht. Generell bilden Pigment-Protein-Komplexe eine wichtige Untergruppe der Proteine. Für die Spektroskopie sind sie besonders interessant, da die Pigmente schon in ihnen enthalten sind und somit ihre Eigenschaften nicht durch Fluoreszenzlabel gestört werden können. Die ersten Untersuchungen an Antennenkomplexen wurden an LH2-Komplexen von Purpurbakterien bei Raumtemperatur durchgeführt [42]. Untersuchungen bei tiefen Temperaturen folgten kurze Zeit später [43-45]. Außerdem gibt es erste Arbeiten zu Antennenkomplexen von Pflanzen (LHC-II) [46] und dem Photosystem I von Cyanobakterien [47]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen ist der Informationsgewinn bei tiefen Temperaturen aufgrund der hohen spektralen Auflösung im Falle von Pigment-Protein-Komplexen sehr groß, so dass es sinnvoll ist, diese über einen weiten Temperaturbereich zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich nach einer kurzen Einführung in die konfokale Mikroskopie (Kapitel 2) in drei Teile: In Kapitel 3 werden einzelne Farbstoffmoleküle auf Oberflächen mittels Korrelationsspektroskopie untersucht. Kapitel 4 behandelt den Antennenkomplex LH2 des Purpurbakteriums *Rhodospseudomonas acidophila* und Kapitel 5 behandelt den wichtigsten Antennenkomplex höherer Pflanzen (LHC-II).

## **Kapitel 2**

# **Konfokale Mikroskopie**

In diesem Kapitel wird kurz auf die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie eingegangen und dessen Vorteile für die Detektion einzelner Moleküle beschrieben. Danach werden die im Rahmen dieser Arbeit gebauten konfokalen Mikroskope für Messungen bei Raumtemperatur und bei tiefen Temperaturen beschrieben. Diese sind so konstruiert, dass eine möglichst hohe Detektionseffizienz erreicht wird, was in der Einzelmolekülspektroskopie absoluten Vorrang hat gegenüber Kriterien, die bei kommerziellen Mikroskopen von Wichtigkeit sind.

### **2.1 Grundlagen**

Konfokale Mikroskope werden benutzt um klare Tiefenschnitte von dreidimensionalen Proben zu erlangen, ohne die Proben zu zerstören, wie es durch die Präparationstechnik der konventionellen Mikroskopie üblich ist. Das heißt, dass Streulicht von außerhalb der Fokalebene liegenden Gebieten möglichst vollständig unterdrückt werden muss. Dies wird dadurch erreicht, dass eine punktförmige Lichtquelle auf die Probe abgebildet wird, also nur ein Raum-

volumen von der Größe des Fokus beleuchtet wird (Anregungsvolumen). Das gleiche Volumen (Detektionsvolumen) wird dann auf eine Lochblende vor dem Detektor abgebildet. Diese Überlagerung von Anregungs- und Detektionsfokus gibt der konfokalen Mikroskopie ihren Namen. Mit der Lochblende wird nur ein Bildpunkt für den Detektor selektiert. Alle axial verschobenen Objektpunkte werden in der Ebene der Lochblende als unscharfe Fläche abgebildet, wobei das Verhältnis dieser Fläche zur Fläche der Lochblende die Unterdrückung des Objektpunktes bestimmt. Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Strahlengang eines konfokalen Mikroskops. Die gestrichelte Linie entspricht dem Strahlengang eines Objektpunktes, der außerhalb der Brennebene liegt. Man erkennt leicht, dass die Unterdrückung dieses Objektpunktes zweifach ist: Erstens wird er nur schwach angeregt, da er außerhalb des Anregungsfokus liegt und zweitens wird er in der Ebene der Lochblende unscharf abgebildet, so dass nur wenig Licht auf den Detektor gelangen kann [48].

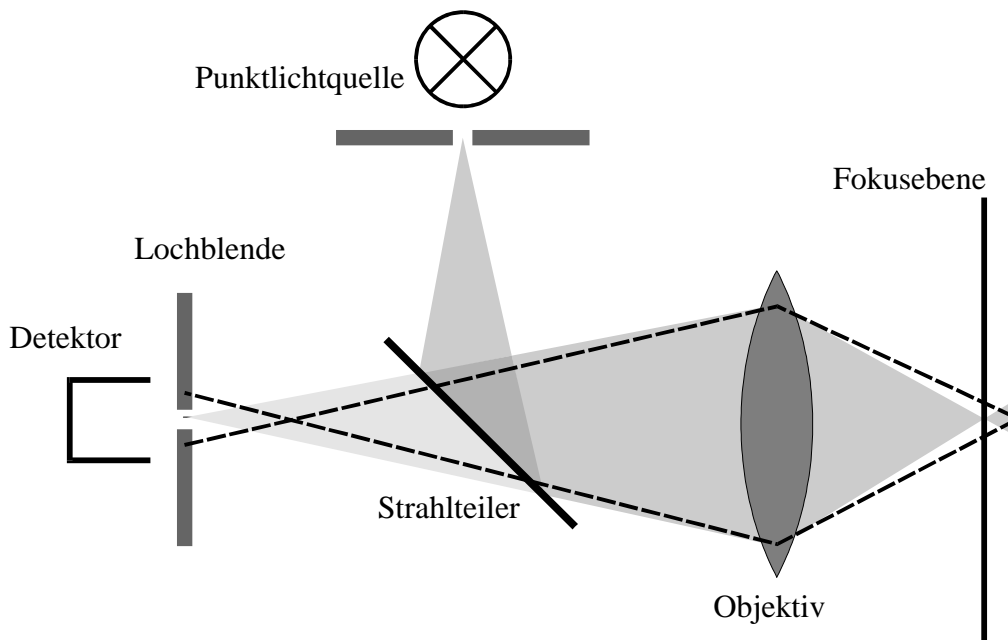


Abbildung 2.1 Strahlengang in einem konfokalen Mikroskop. Streulicht von einem Objektpunkt außerhalb der Fokusebene (gestrichelte Linie) wird zweifach unterdrückt: Erstens wird dieser Punkt nur schwach beleuchtet, da er nicht im Fokus liegt, und zweitens wird der Hauptteil dieses Lichts von der Lochblende vor dem Detektor ausgeblendet.

Um mit einem konfokalen Mikroskop ein Bild zu erlangen, ist es notwendig, die Probe rasterförmig abzufahren und das Bild aus einzelnen Punkten zusammzusetzen. Dabei ist es im einfachsten Fall möglich, die Probe durch den feststehenden Fokus zu scannen oder das Scannen durch Verkippen des Anregungsstrahls zu erreichen (*beam scanning*).

Es ist nicht notwendig, dass Detektion und Anregung vom gleichen Objektiv übernommen werden wie in Abbildung 2.1 dargestellt, sondern es kann auch mit zwei Objektiven in Transmission gearbeitet werden. Häufigste Anwendung der konfokalen Mikroskopie ist aber die Fluoreszenzmikroskopie mit einem Objektiv für beide Lichtwege. Da die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten konfokalen Mikroskope ebenfalls nur mit einem Objektiv arbeiten, wird im weiteren nur dieser Typ behandelt.

Allgemein manifestiert sich die Begrenzung der Auflösungsfähigkeit einer Abbildung im Auftreten von Beugungsringen, das heißt ein Lichtpunkt wird nicht mehr als Punkt sondern als kleine Scheibe mit konzentrischen Beugungsringen abgebildet. Diese Abbildungsfunktion wird *point spread function* (PSF) genannt. Ausgedehnte Objekte werden als Faltung der PSF mit der Objektfläche abgebildet. Die Lochblende des konfokalen Mikroskops ist nun so auf das verwendete Objektiv abgestimmt, dass nur die nullte Ordnung der PSF passieren kann. Eine weitere Verkleinerung der Lochblende ist nicht sinnvoll, da nur der Lichtdurchsatz verringert, nicht aber die Auflösung gesteigert würde. Sowohl die PSF des Anregungszeitweiges als auch des Detektionszeitweiges allein gesehen entsprechen der PSF eines konventionellen Mikroskops. Damit erhält das konfokale Mikroskop eine effektive PSF, die dem Quadrat der PSF eines konventionellen Mikroskops entspricht. Das zentrale Maximum der PSF wird durch das Quadrieren steiler und höher, während die Intensität der Beugungsringe nach außen hin schnell abnimmt. Abbildung 2.2 zeigt die PSF von konventionellem (A) und konfokalem (B) Mikroskop. Da nur verdeutlicht werden soll, wie in der konfokalen Mikroskopie das Hauptmaximum im Gegensatz zu den Nebenmaxima betont wird, wurde hier als PSF die Airy-Scheibe verwendet, also

$$p(\rho) = 2J_1^2(\rho) / \rho^2,$$

wobei  $J_1$  die sphärische Besselfunktion erster Ordnung ist und

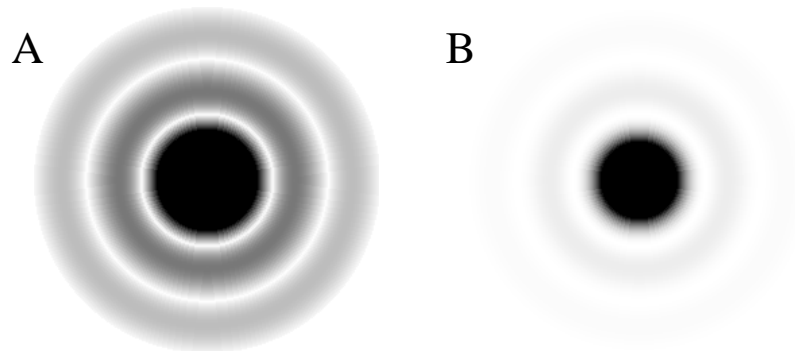


Abbildung 2.2 (A) Point spread function eines konventionellen Mikroskops. (B) Die PSF des konfokalen Mikroskops stellt das Quadrat der PSF des konventionellen Mikroskops dar.

$$\rho = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{r}{v} N.A.$$

Hier ist  $v$  die Vergrößerung der verwendeten Linse,  $r$  der Abstand zur optischen Achse und  $N.A.$  die numerische Apertur. Die Airy-Scheibe ist jedoch nur eine Näherung für paraxiale Strahlen, also für Objektive mit hoher  $N.A.$  nicht besonders gut. Die korrekte PSF für hohe  $N.A.$  ist mathematisch recht aufwendig und kann in Ref. [48] nachgelesen werden.

Eine Eigenschaft des konfokalen Mikroskops ist ein leicht verbessertes Auflösungsvermögen. Nach dem Sparrow-Kriterium werden zwei Punkte als aufgelöst betrachtet, wenn ihre gemeinsame Intensitätsfunktion entlang ihrer Verbindungslinie ein Minimum besitzt. Damit wird der minimal auflösbare Abstand zweier Punkte bei einem konventionellem Mikroskop:

$$\Delta x = 0.47 \frac{\lambda}{N.A.}. \quad (1)$$

Für ein konfokales Mikroskop ergibt sich eine leichte Erhöhung der Auflösung:

$$\Delta x = 0.32 \frac{\lambda}{N.A.}. \quad (2)$$

Viel bedeutsamer als die geringe Erhöhung der lateralen Auflösung ist die deutliche Steigerung der axialen Auflösung des konfokalen Mikroskops [49]:

$$\Delta z = \frac{\lambda n}{4N.A.}. \quad (3)$$

Dies bedeutet in der Praxis eine ungefähr doppelt so große axiale wie laterale Auflösung.

Für die Untersuchung einzelner Moleküle ergeben sich aus der konfokalen Mikroskopie wesentliche Vorteile:

- Bei Verwendung stark verdünnter Proben, bei denen der Abstand zwischen verschiedenen Molekülen größer ist als die laterale Auflösung, lässt sich der Fokus so platzieren, dass sich nur ein Molekül im Anregungsfokus befindet. Man erhält also nur die Fluoreszenz eines einzigen Moleküls, die dann leicht weiter untersucht werden kann.
- Alle anderen Moleküle werden während dieser Zeit nicht bestrahlt, können also auch nicht gebleicht oder verändert werden.
- Das Anregungsvolumen ist sehr gering, so dass mögliche Fluoreszenz des Untergrunds verkleinert wird.
- Aufgrund der guten axialen Auflösung, kann auch im Innern ausgedehnter Proben gearbeitet werden. (Zum Beispiel können so einzelne NV-Zentren in Diamant untersucht werden [33;50].)
- Die Einfachheit eines konfokalen Mikroskops erlaubt es, den verwendeten Aufbau speziell auf das zu untersuchende System abzustimmen.

## 2.2 Der experimentelle Aufbau für Untersuchungen bei Raumtemperatur

Das Verhalten einzelner Moleküle bei Raumtemperatur wird in der Regel durch rasches Photobleichen bestimmt. Es ist deshalb essentiell, den größtmöglichen Teil der Fluoreszenz zu detektieren, bevor das untersuchte Molekül irreversibel photobleicht. Da ein Molekül in der Regel in den vollen Raumwinkel emittiert, muss also ein möglichst großer Teil des vollen Raumwinkels erfasst werden. Dies bedeutet, dass Objektive mit möglichst hoher Numerischer Apertur verwendet werden. Das optische Limit liegt bei Öffnungswinkeln um  $\alpha \approx 70^\circ$ , was für Luftobjektive eine *N.A.* von 0.95 und für Immersionsölobjektive eine *N.A.* von 1.4 bedeutet. Obwohl der erfasste Raumwinkel für Luft- bzw. Ölobjektive gleich ist, ist es von Vorteil mit Ölobjektiven zu arbeiten, da ein strahlender Dipol bevorzugt in das Medium mit höherem Brechungsindex emittiert. So strahlt ein Dipol auf einem Luft-Glas-Interface ca. 70% der Intensität in das Glas ab [51].

Das Raumtemperaturmikroskop (siehe Abbildung 2.3) wurde so konstruiert, dass die Probe durch den feststehenden Fokus gefahren wird (*sample scanner*).

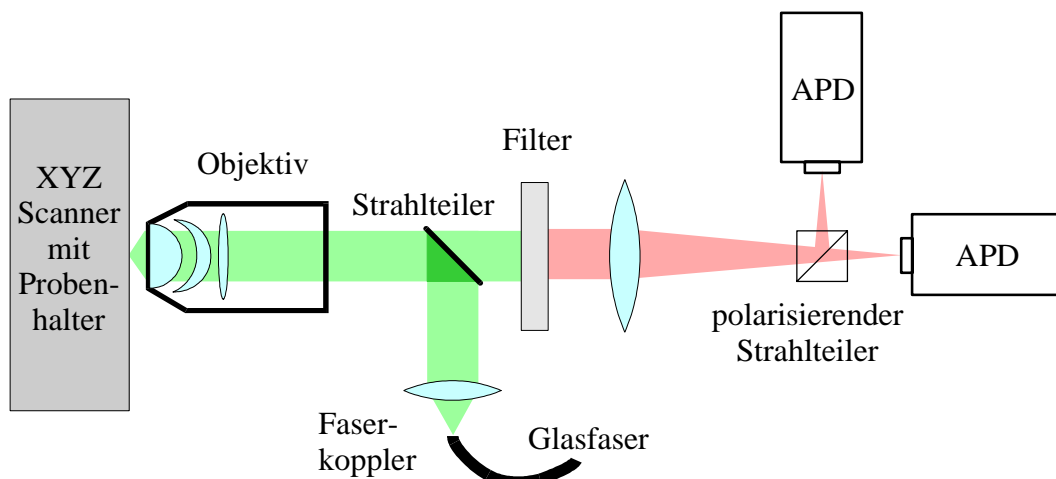


Abbildung 2.3 Der optische Aufbau des konfokalen Mikroskops für Messungen bei Raumtemperatur.



Dies hat den Vorteil, dass neben dem Objektiv und dem Strahlteiler nur eine zusätzliche Linse zur Abbildung auf die Lochblende benötigt wird, und je weniger optische Elemente der Aufbau enthält, desto weniger Verluste ergeben sich. Außerdem ist solch ein Aufbau sehr leicht zu justieren und kann sehr schnell auf das zu untersuchende System angepasst werden. Der Scanner wurde im Verlauf der Arbeit zweimal ersetzt: Zuerst wurde eine Piezoröhre verwendet, die in zwei Richtungen so verkippbar war, dass sich ein Scanbereich von  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  ergab. Diese wurde ausgetauscht gegen einen kommerziellen Dreiaachsen-Scanner (Tritor, Piezo Systeme Jena) mit  $100 \mu\text{m}$  Scanbereich pro Achse. Die bei Piezokristallen auftretende Hysterese kann nur zu einem bestimmten Grad berechnet werden, so dass es bei häufigem Anfahren von verschiedenen Punkten innerhalb des Scanbereichs zu immer größer werdenden Fehlern kommt, was eine manuelle Nachregelung erforderlich macht, die im Falle schnell photobleichender organischer Moleküle wertvolle Beobachtungszeit kostet. Aus diesem Grund wurde ein *closed-loop* Scanner (P-517.3, Physik Instrumente) angeschafft, der bei einem Scanbereich von  $100 \mu\text{m}$  für die x- und y-Richtung sowie von  $10 \mu\text{m}$  für die z-Richtung aufweist, bei einer Positioniergenauigkeit von  $5 \text{ nm}$ . Abgesehen von seinem hohen Preis ist dies der Scanner der Wahl für unsere Anwendung.

Es wurden je nach Anwendung folgende Objektive verwendet: Zeiss  $100 \times / 0.85 \text{ N.A.}$  Luftobjektiv und Zeiss  $100 \times / 1.3 \text{ N.A.}$  Öbobjektiv, beide auf unendlich korrigiert. Als Strahlteiler dienten eine Glasplatte der Dicke  $1 \text{ cm}$  oder eine Keilplatte, so dass nur der Reflex der Vorderseite ins Objektiv gelangt. Da nur sehr geringe Anregungsleistungen verwendet werden (typischer Wert  $\approx 10 \mu\text{W}$ ) kann man es sich leisten, ca.  $90\%$  des Anregungslichtes zu verlieren. Dafür gelangen  $90\%$  der aufgesammelten Fluoreszenz auf den Filter. Dieser dient dazu Fluoreszenz und Anregungslicht zu trennen. Hierzu wurden meistens holographische Notchfilter (Kaiser Optical Systems) verwendet, teilweise in Kombination mit Farbglasfiltern (Schott).

Die Fluoreszenzdetektion erfolgt mit Avalanche Photodioden (APD, SPCM-AQ 200, EG&G). Diese peltiergekühlten und aktiv gequenchten APDs zeichnen sich durch eine hohe Detektionsrate (bis  $70\%$  im roten Spektralbereich) und eine geringe Dunkelzählrate ( $< 30 \text{ cps}$ ) aus, wobei sie im Vergleich zu Photomultipliern verhältnismäßig robust sind. Die APDs sind direkt mit einem Diskriminator versehen, der pro detektiertem Photon einen TTL-Puls liefert,

der sehr einfach weiterverarbeitet werden kann. Die Detektorfläche der APD hat je nach Modell einen Durchmesser von 100 – 200  $\mu\text{m}$  und dient direkt als konfokale Lochblende.

Das Anregungslicht wird mittels einer Glasfaser zum Aufbau geführt. Das hat den Vorteil, dass das Mikroskop von den Anregungslasern vollständig entkoppelt ist. Im Unterschied zu Abbildung 2.1 wurde hier ein telezentrischer Aufbau gewählt, da so keine Abberationen durch die Filter oder andere zusätzliche optische Elemente verursacht werden und der Aufbau generell flexibler ist.

Als Anregungslichtquellen dienen verschiedene Linien eines  $\text{Kr}^+$ -Lasers (Innova 70, Coherent),  $\text{Ar}^+$ -Lasers (Innova 300, Coherent) und HeNe-Lasers. Außerdem steht der spektrale Bereich eines Farbstofflasers (Coherent CR-699) mit DCM 110 bzw. Pyriden 2 als Farbstoff zur Verfügung. Mit diesem sehr schmalbandigen ( $\Delta\nu \approx 1 \text{ MHz}$ ) Lasersystem wurden die Anregungsspektren an einzelnen LHC-II gemessen (siehe Kapitel 5).

Da der Durchmesser der Lochblende durch den Detektor vorgegeben ist, muss die Brennweite der Linse, die auf die APD abbildet, korrekt angepasst werden. Nach Gleichung (2) berechnet sich der Durchmesser des Hauptmaximums der Airy-Funktion für z.B.  $\lambda = 800 \text{ nm}$  und  $N.A. = 0.85$  zu  $2 \times \Delta x = 0.89 \mu\text{m}$ . Die Vergrößerung des optischen Systems lässt sich nun durch das Verhältnis der Brennweiten von Objektiv  $f_{obj} = 3.1 \text{ mm}$  und Linse abschätzen:

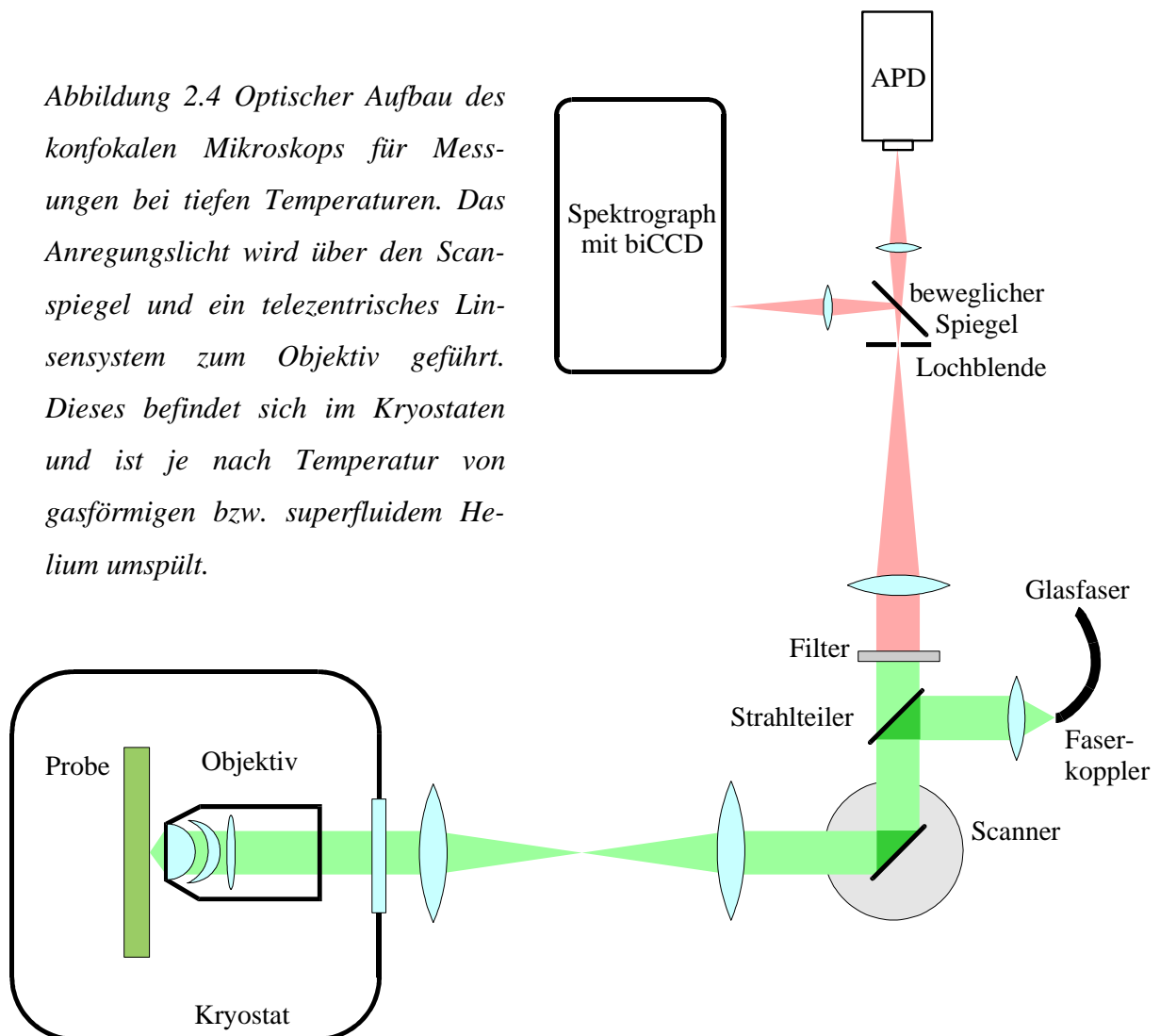
$$d_{pinhole} = \frac{f_{lens}}{f_{obj}} 2\Delta x$$

Für  $d_{pinhole} = 100 \mu\text{m}$  ergibt sich eine Brennweite von  $f_{lens} = 350 \text{ mm}$ . Die Erfahrung hat gezeigt, dass diese Abschätzung eine um den Faktor 2 – 3 zu große Brennweite liefert, was wohl an der einfachen Formel aus der Strahlenoptik zur Berechnung der Vergrößerung liegt.

## 2.3 Der experimentelle Aufbau für Untersuchungen bei tiefen Temperaturen

Der erste Tieftemperaturaufbau wurde identisch zum Raumtemperaturaufbau konzipiert, mit dem Unterschied, dass sowohl Scanner als auch Objektiv in einen Kryostaten eingebaut wurden. Der Kryostat (INPRO, Polen) ist ein kombinierter Bad-Fluss-Kryostat, mit dem im gesamten Temperaturbereich von 1.5K bis 300K gearbeitet werden kann.

Abbildung 2.4 Optischer Aufbau des konfokalen Mikroskops für Messungen bei tiefen Temperaturen. Das Anregungslicht wird über den Scan-spiegel und ein telezentrisches Linsensystem zum Objektiv geführt. Dieses befindet sich im Kryostaten und ist je nach Temperatur von gasförmigen bzw. superfluidem Helium umspült.



Als Objektiv diente ein  $63\times/N.A. 0.85$  Objektiv (Melles Griot) ohne gekittete Gruppen und Linsen, die bei tiefen Temperaturen zur Zerstörung der Optik führen würden. Als Konsequenz sind die optischen Eigenschaften dieses Objektivs deutlich schlechter als die der verwendeten Objektive bei Raumtemperatur. Als Scanner diente ein Rahmen [52;53], der aus vier Piezo-Bimorphs aufgebaut war und bei Raumtemperatur einen Scanbereich von ca.  $150\ \mu\text{m}$  besaß [54].

Der entscheidende Nachteil dieses Scanners ist die Reduktion des Scanbereichs bei tiefen Temperaturen. Abhängig vom mehr oder weniger spannungsfreien Einbau des Rahmens in die Halterung, reduziert sich der Scanbereich bei Heliumtemperatur auf  $4 - 10\ \mu\text{m}$ . Aus diesem Grund wurde der Tieftemperaturaufbau zu einem *beam scanner* umgebaut, der in Abbildung 2.4 dargestellt ist. In diesem Aufbau wird der Laserstrahl mittels eines Scanspiegels und eines telezentrischen Linsensystems (beide Linsen  $f_{tele} = 250\ \text{mm}$ ) so geführt, dass die Hauptebene des Objektivs exakt an der selben Stelle getroffen wird, allerdings unter verschiedenen Winkeln. In Abhängigkeit dieser Verkippung des Anregungsstrahls wandert der Fokus über die Probe, so dass diese abgerastert werden kann. Um dies zu erreichen befindet sich der Scanspiegel im Brennpunkt der ersten Linse, die beiden Linsen befinden sich im Abstand  $2\times f_{tele}$  und die Hauptebene des Objektivs im Brennpunkt der zweiten Linse. Da beide Linsen die gleiche Brennweite haben, wird keine Vergrößerung des Strahldurchmessers erreicht. Der Scanner besteht aus einem Spiegel, der mittels eines Galvoscaners in einer Richtung drehbar ist. Der Galvoscanner ist wiederum so auf einem Drehtisch montiert, dass sich der Spiegel über der Drehachse befindet. Auf diese Weise wird die zweite Scanrichtung erzielt. Trotz der Verwendung nur eines Scanspiegels<sup>1</sup> sind die Abbildungsfehler verhältnismäßig groß, so dass nur ein Scanbereich von  $200\times 200\ \mu\text{m}^2$  nutzbar ist. Der Grund hierfür ist hauptsächlich in der schlechten optischen Qualität des Objektivs und der zweiten Linse des telezentrischen Linsensystems (Scanlinse) zu suchen. Das Objektiv ist z.B. kein Achromat und auch nicht auf unendlich korrigiert (sondern auf  $16\ \text{cm}$ ), obwohl es in einem parallelen Strahlengang verwendet wird. Insbesondere bei Messungen in flüssigem Helium ist das Objektiv schlecht korrigiert, da der Brechungsindex von Helium deutlich größer ist als der von Luft, auf den das

---

<sup>1</sup> Kommerzielle Mikroskope verwenden in der Regel zwei Scanspiegel, erzielen aber trotzdem einen deutlich größeren Scanbereich als das hier beschriebene Mikroskop.

Objektiv abgestimmt ist. Die Scanlinse ist ein einfacher Achromat, der nicht auf Bildfeldwölbung korrigiert ist. Hier könnte eine spezielle Scanlinse (phi-theta-Linse) die Abbildungsqualität steigern. Trotz dieser optischen Fehler wird der genannte Scanbereich scharf abgebildet. Allerdings wird die Numerische Apertur von 0.85 in flüssigem Helium nicht erreicht.

Der Strahlengang der Detektionsseite ist im Wesentlichen identisch mit dem des Raumtemperaturaufbaus. Zusätzlich kann hier ein Spektrometer bestehend aus Gitterspektrograph (Acton, SP-275) und stickstoffgekühlter CCD-Kamera (Spec-10:100B, Princeton Instruments) benutzt werden. Dazu wird das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende fokussiert und der weiterlaufende Strahl wahlweise auf die APD oder auf den Eintrittsspalt des Spektrographen. Um den Spektrographen korrekt anzupassen, muss hierzu eine extrem kurzbrennweitige Linse benutzt werden, so dass das Gitter (300, 1200 und 1800 Striche/Zoll) gut ausgeleuchtet wird. Der CCD-Chip wird von der Rückseite beleuchtet (*back illuminated CCD*) und erzielt bei Kühlung mit flüssigem Stickstoff eine vernachlässigbar kleine Dunkelzählrate ( $< 1$  counts/h/Pixel). Das Ausleserauschen beträgt  $< 5$  counts bei einer Ausleserate von 100 kHz. Der Chip ist mit einer Auflösung von  $100 \times 1340$  Pixeln für die Spektroskopie optimiert. Die Detektionseffizienz beträgt bei 550 nm mehr als 90% und fällt im langwelligen Spektralbereich deutlich ab (70% bei 800 nm, 35% bei 900 nm).

## 2.4 Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz der Aufbauten hängt im Wesentlichen von der Numerischen Apertur des Objektivs ab. Sowohl eine Numerische Apertur von 0.85 bei Luftobjektiven als auch eine Numerische Apertur von 1.3 bei Öbobjektiven entspricht einem Öffnungswinkel von ca.  $60^\circ$ . Auf den vollen Raumwinkel bezogen heißt dies, dass im Falle von isotroper Strahlung nur 25% des emittierten Lichts eingesammelt werden. Ein emittierender Dipol (also auch ein einzelnes Molekül) hat jedoch eine anisotrope Abstrahlcharakteristik. Der Bruchteil der eingesammelten Photonen ist also stark von der Orientierung der Moleküle abhängig. Außerdem nimmt die Umgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Abstrahlcharakteristik eines Dipols. Befindet sich der Dipol auf einem dielektrischen Interface wie z.B. Quarz, so wird der wesentlich größere Teil der abgestrahlten Leistung in das höherbrechende Medium emittiert,

im Falle von Quarz ca. 70% [51]. Ein ganz wesentlicher Aspekt einer möglichst hohen Detektionseffizienz ist also schon die Probenpräparation. Da die zu untersuchenden Systeme in der Regel auf Deckgläsern (BK7 oder Quarz) immobilisiert werden (direkt oder in einem dünnen Film), ist es besser durch das Substrat hindurch zu detektieren. Insbesondere bei Raumtemperatur kann so mittels eines Öobjektivs die Detektionseffizienz maximiert werden. Trotzdem wurden sämtliche Messungen mit dem Tieftemperaturaufbau nicht durch das Substrat aufgenommen. Das Objektiv von Melles Griot ist nicht deckglaskorrigiert, so dass die Abbildungsqualität durch das Substrat extrem schlecht wird.

Des Weiteren ist für eine optimale Detektionseffizienz eine maximale Transmission durch sämtliche optische Elemente im Detektionsstrahlengang notwendig, sowie eine möglichst hohe Effizienz der verwendeten Detektoren. Folgende Verluste müssen somit einkalkuliert werden:

- Die Transmission der Zeiss-Objektive beträgt 80%, die des Melles-Griot-Objektivs 70%.
- Die Notchfilter haben eine Transmission von 80%.
- Jede unbeschichtete Glasoberfläche bis ca. 50° Neigung reflektiert 4% des Lichtes. Beschichtete Glasoberflächen reflektieren 1% – 2%. Unbeschichtete Glasoberflächen sind die drei Kryostatenfenster, das Schutzglas vor der APD und die Vorderseite des Strahlteilers. Sämtliche Linsen und der polarisierende Strahlteilerwürfel sind beschichtet.
- Die Lochblende (bzw. die Detektorfläche der APD) schneidet die nullte Ordnung aus dem Beugungsmuster, was 80% der Gesamtintensität entspricht.
- Die Quantenausbeute der APD liegt im gelben bis roten Spektralbereich bei 70%, im Spektralbereich 800 – 900 nm je nach APD im Bereich 10% – 20%.

Damit ergibt sich für den Raumtemperaturaufbau im besten Falle:

$$\begin{aligned}\alpha_{\text{Mikroskop}} &= t_{\text{Objektiv}} \cdot t_{\text{Notch}} \cdot t_{\text{Strahlteiler}} \cdot t_{\text{Linse}} \cdot t_{\text{Fenster(APD)}} \cdot \alpha_{\text{APD}} \\ &= 0.80 \cdot 0.80 \cdot 0.95 \cdot 0.98 \cdot 0.92 \cdot 0.70 \\ &= 0.38\end{aligned}$$

Nimmt man für den Anteil der mit dem Objektiv eingesammelten Photonen den Wert für isotrope Strahlung von 25% so erhält man eine Detektionseffizienz von  $\alpha_{\text{det}} = 9.5\%$ .

Im Falle des Tieftemperaturaufbaus kommen die Kryostatenfenster ( $t_{\text{Fenster}} = 0.78$ ) zwei Linsen ( $t_{\text{Linsen}} = 0.96$ ) und das schlechtere Objektiv hinzu, so dass sich eine Detektionseffizienz von  $\alpha_{\text{det}} = 4.4\%$  ergibt. Berücksichtigt man noch die anisotrope Dipolstrahlung, so erhöht sich der  $\alpha_{\text{det}}$ -Wert für den Raumtemperaturaufbau während sich der Wert für den Tieftemperaturaufbau verringert.





## Kapitel 3

# Einzelne Farbstoffmoleküle auf Oberflächen

### 3.1 Einführung

Ein wesentlicher Fortschritt innerhalb der Einzelmolekülspektroskopie war die Entwicklung von Detektionstechniken für einzelne Moleküle bei Raumtemperatur, die die Untersuchung einer Vielzahl neuer Systeme ermöglichte. Erst mit Raumtemperaturmessungen wurde es interessant zu biologischen Systemen überzugehen, die heutzutage im überwiegenden Maße im Mittelpunkt der Untersuchungen an einzelnen Molekülen stehen.<sup>2</sup>

Um einzelne Moleküle bei Raumtemperatur optisch detektieren zu können, ist es notwendig die zu untersuchende Probe so stark zu verdünnen, dass sich im Anregungs- bzw. Detektionsvolumen (je nachdem welches kleiner ist) nur ein Fluoreszenzmolekül befindet. Da sich neben diesem ausgewählten Molekül ebenfalls noch eine um einige Größenordnungen höhere Zahl an Matrixmolekülen, d.h. Molekülen, in die das zu untersuchende Molekül eingebettet ist, im Anregungsvolumen befinden, sind zwei Dinge notwendig: Erstens muss das Anre-

---

<sup>2</sup> Pigment-Protein-Komplexe, wie sie in den nächsten Kapiteln untersucht werden, bilden hier eine wichtige Ausnahme.

gungsvolumen so klein wie möglich gehalten werden und zweitens müssen Matrixmoleküle verwendet werden, deren Fluoreszenz um Größenordnungen kleiner ist als die des zu untersuchenden Moleküls. Extrem kleine Anregungsvolumina bieten optische Nahfeldmikroskope (*near-field scanning optical microscopy, NSOM*), so dass diesem Mikroskoptyp eine Zeit lang das Hauptinteresse galt, und Betzig und Chichester [16] waren 1993 die ersten, die einzelne Moleküle bei Raumtemperatur mittels eines NSOMs nachwiesen. Es zeigte sich jedoch, dass auch mittels Weitfeldmikroskopie, insbesondere mittels konfokaler Mikroskopie [19], die Detektion einzelner Moleküle möglich ist. Da diese Methoden vom apparativen Aufwand deutlich einfacher sind, wurde in der folgenden Zeit der Großteil der Untersuchungen im Fernfeld durchgeführt.

Die aktuelle Forschung betrifft häufig Biomoleküle, an die Farbstoffmoleküle angehängt (*Label*) werden [30;55;56]. Es ist also wichtig zu erkennen, welche beobachteten Eigenschaften dem Biomolekül und welche dem Label zuzuschreiben sind. Dazu muss das Verhalten einzelner Farbstoffe zuerst ausführlich untersucht werden.

## 3.2 Probenpräparation

Die Experimente wurden an einzelnen Sulforhodamin 101 (SR101), Oxazin 1 (OX1) und Rhodamin 6G (R6G) Molekülen durchgeführt, die auf einer Glasoberfläche immobilisiert wurden. Mittels einer Verdünnungsreihe von den in Methanol gelösten Farbstoffmolekülen wurde ermittelt, dass eine Ausgangslösung der Konzentration im Bereich von  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  mol/l ausreichend verdünnte Proben liefert. Diese Ausgangslösung wird auf ein sorgfältig gereinigtes Deckglas aufgeschleudert (*Spin-coating*). Die so auf der Oberfläche immobilisierten Moleküle werden unmittelbar danach mit einem ca. 100 nm dicken Polymerfilm (Polyvinylbutyral, PVB) bedeckt, der ebenfalls mittels Spin-coating einer einprozentigen Lösung von PVB in Chloroform aufgetragen wird. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung der Probe. Die Konzentration der Moleküle ist so gering, dass der Abstand zwischen zwei Molekülen deutlich größer ist, als die laterale Ausdehnung des Fokus ( $< 1\mu\text{m}$ ). Die PVB-Schicht dient in erster Linie als Schutz vor Sauerstoff, der die organischen Moleküle durch Photooxidation zerstören kann. Vergleiche von Proben mit und ohne Polymerschicht zeigen, dass die Be-

obachtungszeit bis zum endgültigen Photobleichen des Moleküls um eine Größenordnung erhöht wird. Die Strukturformeln von R6G, SR101 und OX1 sind in Abbildung 3.1 (rechts) dargestellt.

Alle Untersuchungen an einzelnen Farbstoffmolekülen wurden mit dem Raumtemperatur-Aufbau mit Piezoröhre Scanner bzw. Tritor (siehe Abschnitt 2.2) durchgeführt. Zur Anregung wurde im Falle von R6G und SR101 die 514.5 nm Linie des Ar<sup>+</sup>-Lasers verwendet, im Falle von OX1 die 632.8 nm Linie eines HeNe-Lasers. Zur Messung der Korrelationsfunktion wurde ein Hardwarekorrelator (ALV 5000) verwendet, der die Korrelationsfunktion im Zeitbereich  $\tau = 200 \text{ ns} - 10 \text{ s}$  ohne Zeitverzögerung aufzeichnet.

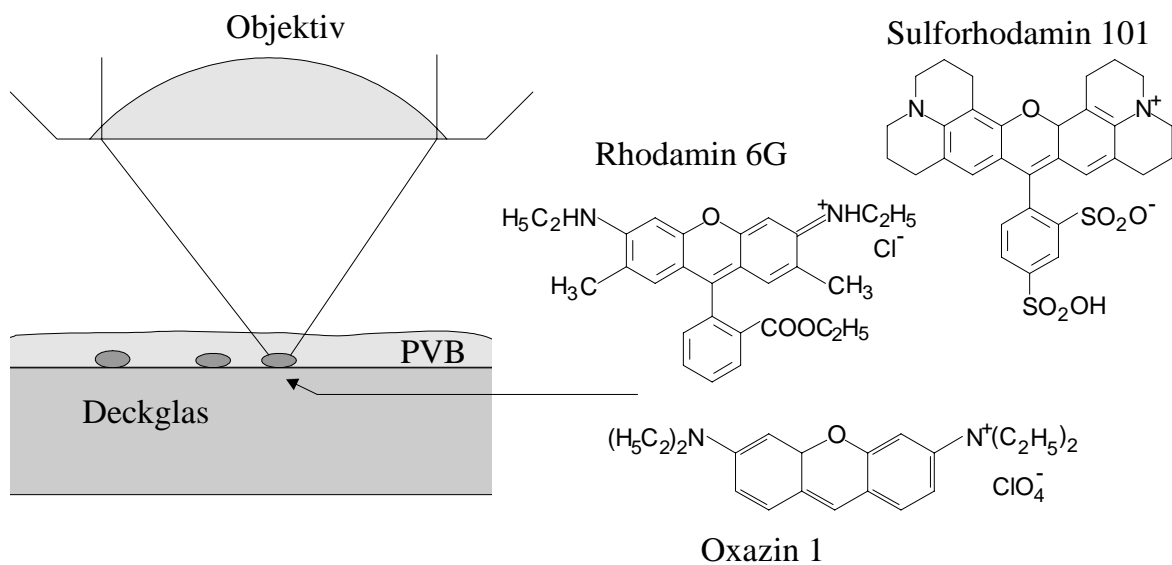


Abbildung 3.1 Die Farbstoffe R6G, SR101 und OX1 (rechts) werden durch Spin-coating auf ein Deckglas aufgebracht und mit einem Polymerfilm (PVB) bedeckt. Die Konzentration der Moleküle ist dabei so gering gewählt, dass sich im Durchschnitt nur ein Molekül im Fokus des Mikroskops befindet.

### 3.3 Konfokale Mikroskopie einzelner Farbstoffmoleküle

#### 3.3.1 Evidenz für die Detektion einzelner Moleküle

Abbildung 3.2 zeigt eine typische Aufnahme einzelner SR101-Moleküle mit dem konfokalen Mikroskop. Hierbei wurde zur Anregung die 514.5 nm Linie eines  $\text{Ar}^+$ -Lasers verwendet, bei einer Leistung von  $P_L = 1.5 \mu\text{W}$  vor dem Objektiv (Zeiss,  $100\times/1.3$ ). Eine Leistung von  $1 \mu\text{W}$  entspricht einer Anregungsintensität von  $1 \text{ kW}/\text{cm}^2$ . Das Bild wurde von links oben nach rechts unten abgerastert bei einer Mittelungszeit von  $\Delta t = 5 \text{ ms}$  pro Bildpunkt. Die Fluoreszenzintensität wird über einen Farbcode (rechter Rand der Aufnahme) wiedergegeben und ist in Photonen-pro-Sekunde (*counts per second, cps*) angegeben. Die nahezu optimale Justage spiegelt sich in einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis von 7:1 und einer Auflösung nahe am theoretischen Limit wider. Die hier erreichte laterale Auflösung beträgt  $\Delta x = 230 \text{ nm}$  (siehe Linescan in Abbildung 3.2 rechts) gegenüber  $\Delta x = 200 \text{ nm}$  nach Formel (2) (Abschnitt 2.1). Bei dem erhöhten Untergrund im linken Teil des Bildes handelt es sich um Streulicht, das nicht vollständig herausgefiltert wurde.

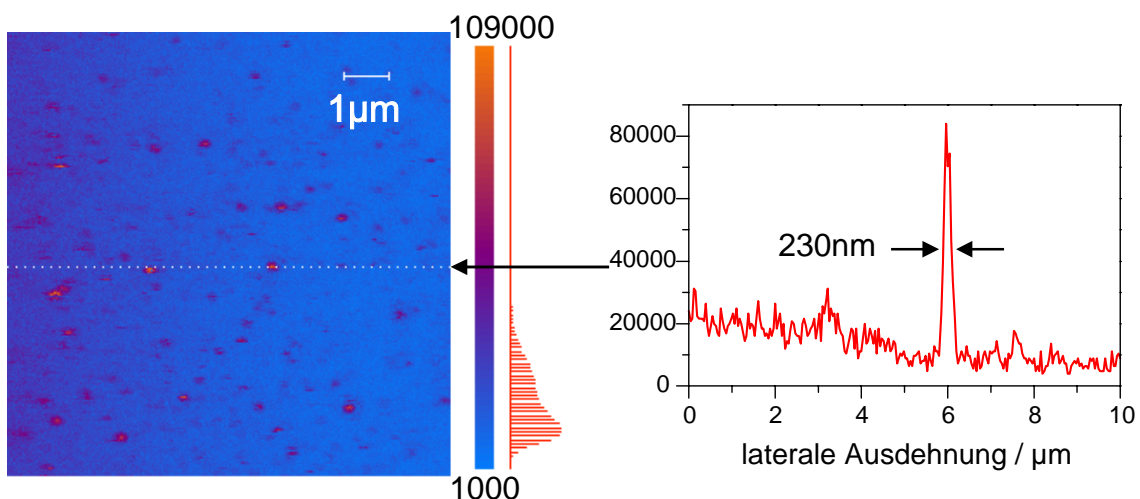


Abbildung 3.2 Konfokales Fluoreszenzbild einzelner SR101-Moleküle auf einer Glasoberfläche. Der Scanbereich beträgt  $10\times 10 \mu\text{m}^2$  und die Mittelungszeit  $\Delta t = 5 \text{ ms}$ . Der Graph rechts entspricht einem Schnitt durch das Bild auf Höhe der gepunkteten Linie. Die Auflösung von 230 nm ist nahe am theoretischen Auflösungsvermögen.

Für die Aufnahme hier wurde als Scanner eine Piezoröhre verwendet, so dass die Reflexion des Anregungslichtes sich mit der Scanposition ändert.

Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei den Intensitätsspotspots in der Aufnahme tatsächlich um einzelne Moleküle handelt. Alternativ könnte es sich auch um Molekülcluster handeln. Folgende Gründe sprechen dafür, dass einzelne Moleküle beobachtet wurden:

- Die Proben entstehen, indem man Lösungen mit Farbstoffmolekülen sukzessive verdünnt. Hat man einen Verdünnungsgrad erreicht, der die Beobachtung einzelner Spots erlaubt, so führt weiteres Verdünnen der Lösung zu Verminderung der Anzahl an Spots. Die Anzahl der Spots skaliert also mit der Konzentration in der Lösung.
- Die gemessenen Signale entsprechen den für die Detektion einzelner Chromophore gemachten Abschätzungen. Aus wenigen Molekülen bestehende Aggregate sollten eine höhere Signalstärke liefern. Bei größeren Aggregaten könnte die Fluoreszenz wirkungsvoll gequenchet werden, so dass die Signalstärke mit der eines einzelnen Chromophors vergleichbar wäre. Hiergegen spricht jedoch der nächste Punkt.
- Das dynamische Verhalten der Fluoreszenzintensität zeigt abrupte Änderungen. Misst man die Fluoreszenz eines Moleküls als Funktion der Zeit, so erhält man Zeittraces, die scharfe Quantensprünge zeigen. Insbesondere das endgültige Photobleichen geschieht in den meisten Fällen indem die Intensität in einem Schritt auf Untergrundniveau springt (siehe zum Beispiel Abbildung 3.4A und B). Daraus lässt sich klar schließen, dass hier einzelne Quantensysteme beobachtet werden, also entweder stark gekoppelte Aggregate oder einzelne Moleküle.

Aus diesen drei Punkten folgt, dass es sich bei den beobachteten Spots mit großer Wahrscheinlichkeit um einzelne Moleküle handelt. Dafür spricht auch, dass in der Literatur über Aggregation von SR101- bzw. OX1-Molekülen nichts berichtet wird.

### 3.3.2 Dynamik der Fluoreszenz

Abbildung 3.3 zeigt einige ausgewählte Beispiele konfokaler Fluoreszenzbilder einzelner SR101-Moleküle. Nur einige wenige Moleküle bleiben während des gesamten Scanvorgangs photostabil wie z.B. Molekül A. Die Fluoreszenz der meisten Chromophore zeigt reversible Sprünge in der Intensität bevor sie irreversibel photobleichen (Moleküle C) oder bleiben photostabil bevor sie irreversibel bleichen (Molekül B). Ebenfalls wurden Moleküle gefunden, deren Fluoreszenzintensität vom Untergrundniveau auf einen für ein einzelnes Molekül typischen Wert springt (Molekül D). Solche Moleküle zeigen nach der Rückkehr der Fluoreszenz das gleiche Verhalten wie die anderen Moleküle: Stabile Fluoreszenz, Intensitätssprünge und irreversibles Photobleichen.

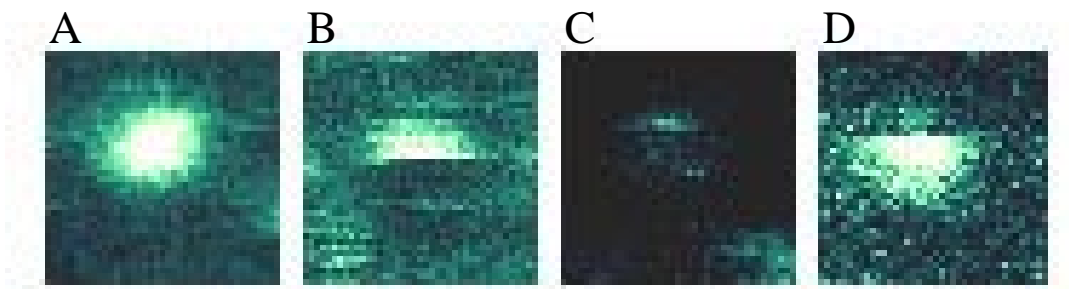


Abbildung 3.3 Konfokale Fluoreszenzbilder von vier unterschiedlichen einzelnen SR101-Molekülen. Der Scanbereich beträgt  $1.2 \times 1.2 \mu\text{m}^2$ , die Mittelungszeit  $\Delta t = 5 \text{ ms}$  und die Anregungsleistung  $P_L = 1 \mu\text{W}$ .

Um diese Fluktuationen der Fluoreszenz genauer zu untersuchen, wurde der Laserfokus auf ein einzelnes Molekül gefahren und dessen Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Abbildung 3.4 zeigt solche Zeittraces von drei einzelnen OX1-Molekülen. Einen typischen zeitlichen Verlauf zeigt Molekül A: Die Fluoreszenzintensität bleibt (bei einer Anregungsleistung von  $P_L = 1.7 \mu\text{W}$ ) über einen Zeitraum von 0 s – 25 s konstant, um dann irreversibel in einem Schritt auf Untergrundniveau zu springen. Einige Moleküle zeigen nach langer Dunkelphase eine Rückkehr der Fluoreszenz (Molekül A bei Zeitindex 62 s).

Deutlich weniger Moleküle zeigen ein mehrstufiges Bleichverhalten (Molekül B). In der Regel zeigen diese Moleküle eine Fluoreszenzintensität, die in den Bereichen zwischen den Sprüngen deutliche Schwankungen zeigt.

Das Intensitätsverhalten von Molekül C ist für ein OX1-Molekül sehr ungewöhnlich. Die Intensität springt permanent zwischen zwei Werten. SR101-Moleküle hingegen zeigen dieses Verhalten viel häufiger. Diese Intensitätssprünge finden nicht unkorreliert statt und manifestieren sich in der Korrelationsfunktion (siehe nächster Abschnitt).

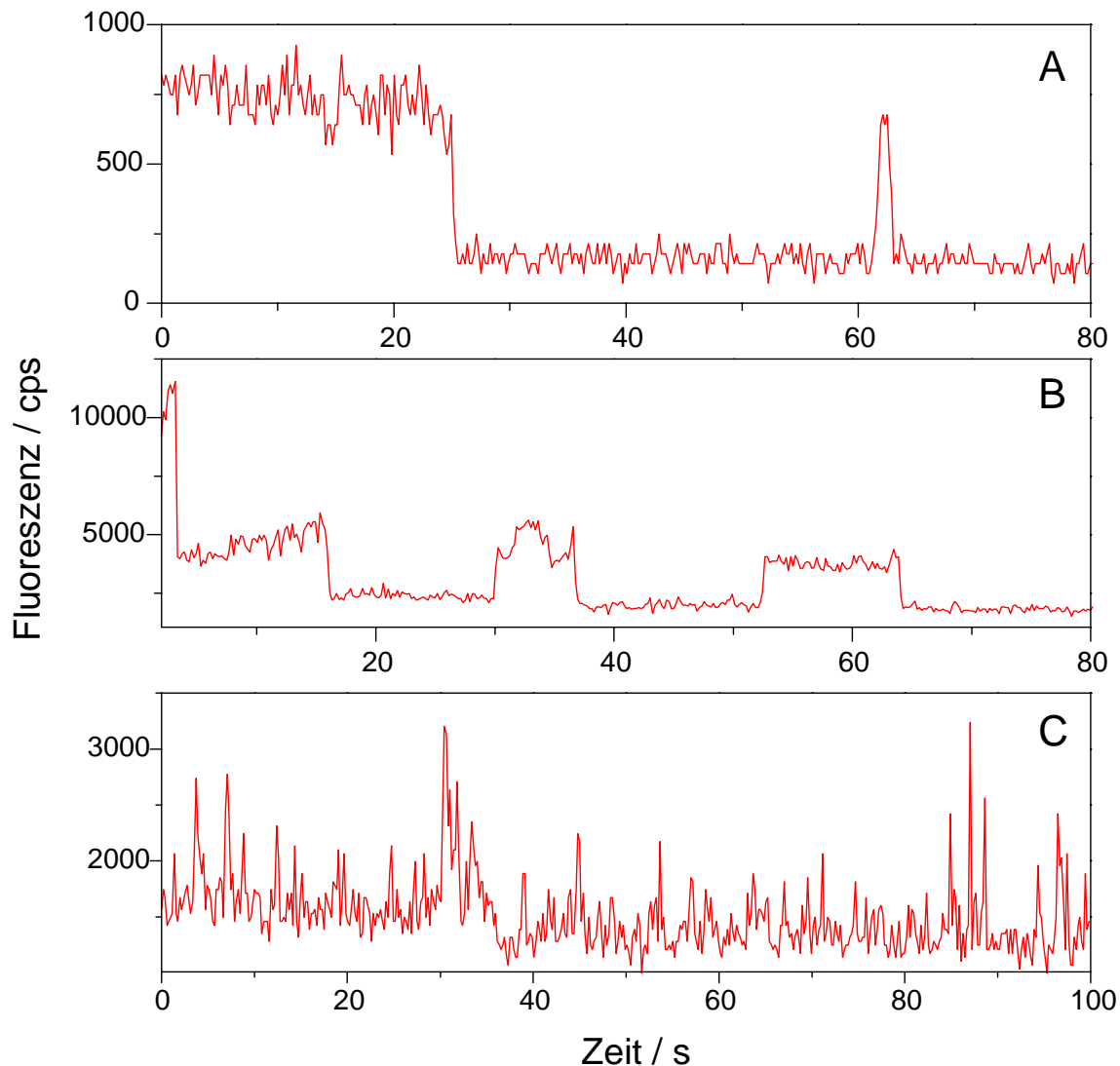


Abbildung 3.4 Zeittraces einzelner OX1-Moleküle. Die Anregungsleistung betrug  $P_L = 1.7 \mu\text{W}$  (A) bzw.  $P_L = 17 \mu\text{W}$  (B/C) bei einer Anregungswellenlänge von 632 nm.

## 3.4 Korrelationspektroskopie einzelner Farbstoffmoleküle

### 3.4.1 Die Autokorrelationsfunktion

Zum Verständnis der Dynamik der Fluoreszenz und damit der Korrelationsfunktion eines einzelnen Farbstoffmoleküls ist es von Vorteil, sich zunächst mit dem Energieniveauschema eines solchen Moleküls vertraut zu machen. Abbildung 3.5 zeigt ein Jablonski-Diagramm eines typischen Farbstoffs. Da im Folgenden immobilisierte Moleküle betrachtet werden, wurden lediglich die elektronischen Niveaus sowie deren vibronischen Niveaus eingezeichnet und auf ein Einzeichnen der Rotationsniveaus verzichtet. Aus dem Grundzustand ( $^1S_0$ ) erfolgt die optische Anregung in ein vibronisches Niveau des ersten (eventuell auch höheren) angeregten Singulettzustands ( $^1S_1$ ), von dem aus das Molekül auf einer Picosekunden-Zeitskala strahlungslos in den rein elektronischen Zustand relaxiert (*internal conversion*, IC). Ein strahlender Übergang innerhalb einer Mannigfaltigkeit wird als Fluoreszenz bezeichnet. Bei Farbstoffen ist die Quantenausbeute  $\Phi_f > 0.90$ , d.h. die Wahrscheinlichkeit pro Anregungszyklus ein Fluoreszenzphoton zu erlangen sehr hoch. Alternativen zur Fluoreszenz sind strahlungslose Relaxationsprozesse und ein *Intersystem-crossing* (ISC) Prozess in die Triplettmannigfaltigkeit. Für letzteren besteht quantenmechanisch nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, da das zugehörige Matrixelement von der Spin-Bahn-Kopplung bestimmt wird, die in der Regel sehr gering ist.<sup>3</sup> Aus den gleichen Gründen ist der strahlende Prozess zwischen den verschiedenen Mannigfaltigkeiten, die Phosphoreszenz, unwahrscheinlich und damit sehr langsam (Mikrosekunden bis einige hundert Millisekunden).

---

<sup>3</sup>Die in der Natur eine so wesentliche Rolle spielenden Chlorophyll-Moleküle bilden hier eine Ausnahme.



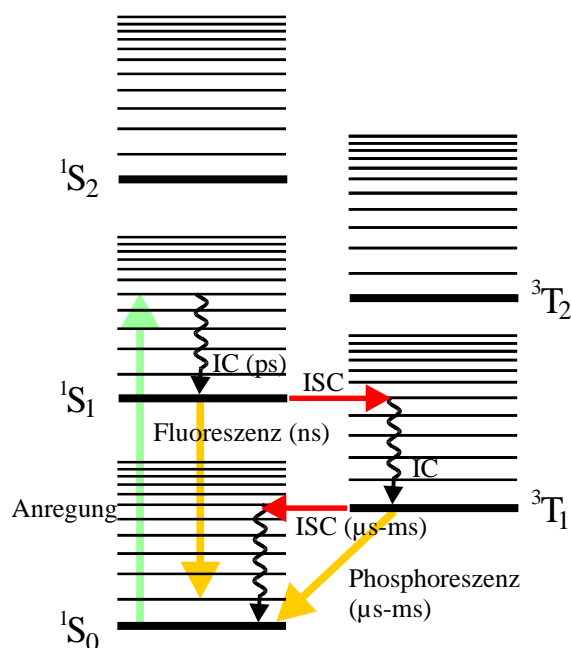


Abbildung 3.5 Jablonski-Diagramm eines typischen Farbstoffmoleküls. Eingezeichnet sind die elektronischen Niveaus (fett) der Singulett- ( $^1S_x$ ) und Triplettmannigfaltigkeit ( $^3T_x$ ) sowie deren vibronische Niveaus. Anregung und Emission werden durch grüne und gelbe Pfeile, Intersystem-crossing (ISC) durch rote Pfeile und nichtstrahlende Relaxationsprozesse durch geschwungene Pfeile dargestellt.

Da die Relaxationsprozesse um Größenordnungen schneller ablaufen als alle anderen Prozesse (Picosekunden in Vergleich zu Nanosekunden und Mikrosekunden), kann das Energieniveaudiagramm vereinfacht als Dreinevensystem betrachtet werden, das aus  $^1S_0$ -Grundzustand  $|1\rangle$ , ersten angeregten  $^1S_1$ -Singulettzustand  $|2\rangle$  und ersten angeregten  $^3T_1$ -Tripletzustand  $|3\rangle$  besteht. Um ein einzelnes Molekül beobachten zu können, ist neben der Quantenausbeute  $\Phi_f$  insbesondere die ISC-Rate  $k_{ISC}$  entscheidend. Befindet sich das Molekül im Tripletzustand, so wird für die Dauer der Triplettlebenszeit ( $\tau_{ph} = 1 \mu\text{s} - 10 \text{ms}$ ) kein Photon emittiert. Die Photonen werden also nicht kontinuierlich emittiert, sondern in Bündeln (*bunches*), was diesem Effekt den Namen *Photonbunching* gibt (siehe Abbildung 3.6).

Während für hohe Anregungsleistungen der Mittelwert der Dunkelzeiten  $\tau_d = \langle \tau'_d \rangle$  charakteristisch für die Phosphoreszenzlebensdauer  $\tau_{ph}$  ist, wird die Anzahl an Photonen pro Bündel und damit  $\tau_h = \langle \tau'_{hd} \rangle$  durch  $k_{ISC}$  bestimmt. Wird also die ISC-Rate zu hoch, so enthält ein Bündel so wenig Photonen, dass das Signal des einzelnen Moleküls im Untergrund verschwindet.

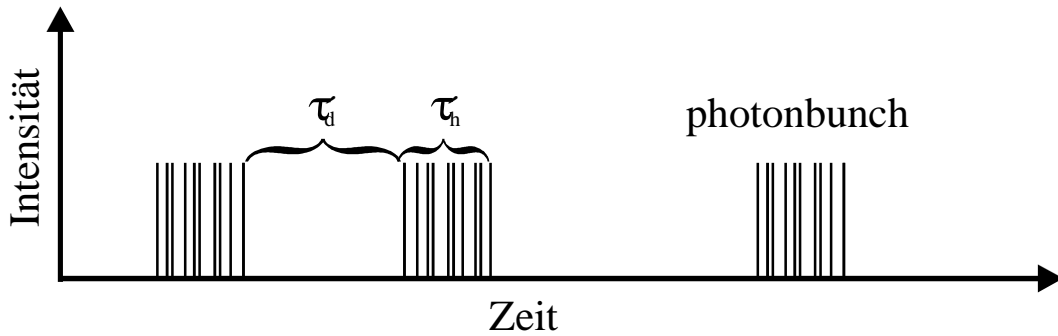


Abbildung 3.6 Die Fluoreszenzemission eines Dreiniveausystems zeigt eine Verteilung von Hell- und Dunkelphasen. Die Photonen werden in Bündeln (bunches) emittiert.

Das Photonbunching macht sich auch in der Korrelationsfunktion bemerkbar. Diese ist definiert als:

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (4)$$

wobei die eckigen Klammern eine Mittelung über die Zeit bedeuten. Sie entspricht der bedingten Wahrscheinlichkeit, zum Zeitpunkt  $t+\tau$  ein Photon zu detektieren, wenn zum Zeitpunkt  $t$  bereits ein Photon detektiert wurde. Die Untersuchung der Emissionsdynamik mittels der Autokorrelationsfunktion ist nur mit einzelnen Molekülen möglich, da der Anteil korrelierter Photonenpaare antiproportional zur Anzahl der Emitter ist. In einem Ensemble würden sich die Korrelationen der einzelnen Moleküle vollständig herausmitteln.

Der Verlauf der Korrelationsfunktion für Zeiten  $\tau > 10^{-7}$  s wird bei Abwesenheit möglicher Korrelationen, die durch die Umgebung des Moleküls bedingt sind, durch das Photonbunching bestimmt, und zwar durch ein exponentielles Abklingen der Form [7]

$$g^2(\tau) = 1 + Ce^{-\lambda\tau}, \quad (5)$$

wobei  $C$  der Kontrast der Korrelationsfunktion und  $\lambda$  eine charakteristische Rate sind, die folgendermaßen von  $\tau_h$  und  $\tau_d$  abhängen:

$$C = \frac{\tau_d}{\tau_h} \quad \text{und} \quad \lambda = \frac{1}{\tau_d} + \frac{1}{\tau_h}. \quad (6)$$

Diese Gleichungen lassen sich leicht umformen, so dass die physikalisch relevanten Raten des Dreiniveausystems von  $|2\rangle$  nach  $|3\rangle$   $k_{23}$  (ISC-Rate) und von  $|3\rangle$  nach  $|1\rangle$   $k_{31}$  ( $= 1/\tau_{ph}$ ) benutzt werden:

$$C(I) = \frac{I/I_s}{1 + 2 \times \frac{k_{31}}{k_{23}} I/I_s} \quad \text{und} \quad \lambda(I) = k_{31} + k_{31}C(I), \quad (7)$$

wobei  $I_s$  die Sättigungsintensität ist[57].

Für die Grenzfälle sehr starker bzw. sehr geringer Anregungsintensität vereinfacht sich Gleichung (7) zu

$$C = 0 \quad \text{und} \quad \lambda = k_{31} \quad (I \rightarrow 0) \quad (8)$$

in Falle geringer Intensität und

$$C = \frac{k_{23}}{2k_{31}} \quad \text{und} \quad \lambda = k_{31} + \frac{k_{23}}{2} \quad (I \rightarrow \infty) \quad (9)$$

im Falle sättigender Anregungsintensität.

Für sehr kurze Zeiten erwartet man Antikorrelationen, da ein Molekül, welches ein Photon emittiert hat, eine gewisse Zeit benötigt, um wieder angeregt zu werden und ein weiteres Photon zu emittieren. Dieses Verhalten nennt man *Antibunching* [8;9]. Es findet auf einer ns-Zeitskala (Lebenszeit) statt. An diesen Zeitbereich können sich *Rabi-Oszillationen* anschlie-

ßen, die aufgrund des kohärent rotierenden Pseudobesetzungsvektors entstehen [58]. Diese Kohärenz wird durch Dephasierungsprozesse in der Regel sehr schnell zerstört.

Neben diesen dem Molekül inhärenten Eigenschaften, die sich in der Korrelationsfunktion widerspiegeln, gibt es weitere Korrelationen, die aufgrund der Wechselwirkung des Moleküls mit seiner Umgebung entstehen können, wie zum Beispiel Rotationsdiffusion bzw. Rotations-sprünge, laterale Diffusion oder auch spektrale Diffusion.

Der Kontrast  $C$  wird durch unkorreliertes Untergrundlicht wie Streulicht oder Fluoreszenz der Matrix verringert. Die gemessene Intensität besteht also aus Signal  $s(t)$  und Untergrund  $b$ :  $I(t) = s(t) + b$ . Setzt man dies in Gleichung (4) ein, so lässt sich ein Korrekturterm berechnen [54], um aus dem gemessenen Wert  $C_{exp}$  den theoretisch zu erwartenden Kontrast  $C_{th}$  zu bestimmen:

$$C_{th} = \left( \frac{s+b}{s} \right)^2 \times C_{exp}. \quad (10)$$

Die Zeitkonstante  $\lambda$  bleibt durch den Untergrund unbeeinflusst  $\lambda_{th} = \lambda_{exp}$ .

### 3.4.2 Ergebnisse

Ungefähr 20% der untersuchten SR101-Moleküle zeigen reproduzierbare Photonenkorrelationen in  $g^2(\tau)$ . Abbildung 3.7 zeigt die Autokorrelationsfunktion von vier unterschiedlichen einzelnen SR101-Molekülen. Man erkennt deutliche Unterschiede sowohl im Kontrast von  $C = 0.2$  (Molekül A) bis zu extrem geringen Kontrast von  $C \approx 0.01$  (Molekül D), als auch in der Zerfallszeit und in der Art des Zerfalls. Sowohl näherungsweise monoexponentieller (Molekül A) als auch näherungsweise biexponentieller Zerfall treten auf. Nicht alle Moleküle, die Intensitätssprünge aufweisen, zeigen auch eine definierte Korrelationszeit in  $g^2(\tau)$ . Insbesondere für langsame Fluktuationen ist die Statistik oft zu schwach, um eine verlässliche Korrelationszeit zu liefern.

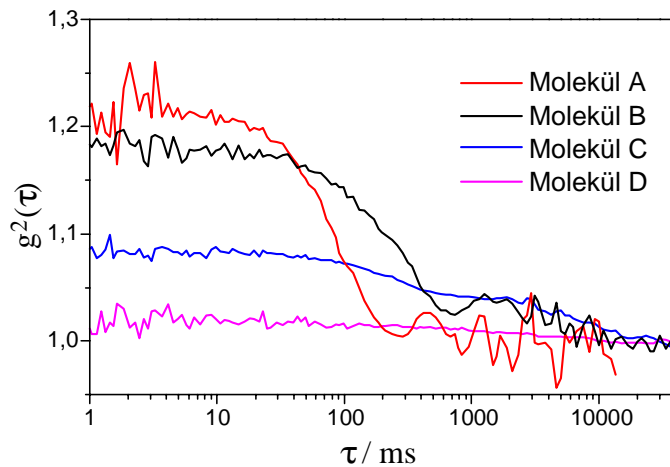


Abbildung 3.7 Autokorrelationsfunktionen der Fluoreszenzintensität von vier verschiedenen einzelnen SR101-Molekülen.

Untersuchungen an einzelnen R6G-Molekülen zeigen ein Verhalten, das mit dem Verhalten der SR101-Molekülen vergleichbar ist. Im Gegensatz dazu zeigen OX1-Moleküle, deren Proben exakt nach dem gleichen Verfahren hergestellt wurden wie die SR101- und R6G-Proben, kaum Korrelationen. In der Tat wurde nur ein Molekül mit einer ausgeprägten Korrelation gefunden (Zeittrace dieses Moleküls siehe Abbildung 3.4C) und einige Moleküle mit sehr schwachen Korrelationen, was zu einer Gesamtausbeute deutlich unter 1% führt.

Abbildung 3.8 (links) zeigt zwei Korrelationsfunktionen (Kreise) zusammen mit einem monoexponentiellen (Molekül A) bzw. biexponentiellen (Molekül C) Fit der Korrelationsfunktion (durchgezogene Linie). Abbildung 3.8 (rechts) zeigt die zu den Korrelationsfunktionen gehörigen Zeittraces. Die meisten Zerfälle der SR101- und R6G-Moleküle sind nicht-exponentiell (siehe Molekül A). Typischerweise ist der Zerfall für kleine Zeiten zu langsam um exponentiell zu sein, während er für große Zeiten schneller ist. Für die folgende Diskussion wird deshalb die Zerfallszeit definiert als Zeit, in der  $g^2(\tau) - 1$  vom Startwert  $C$  auf den Wert  $C/e$  abfällt.

Die Autokorrelationsfunktionen zeigen sowohl für kleine als auch für große Zeiten  $\tau$  starke Fluktuationen. Im Falle kleiner  $\tau$  liegt dies einfach an der schlechten Photonstatistik. Die Abweichungen vom Wert 1 für große  $\tau$  hängt mit den sehr intensiven Peaks in den Zeittraces zusammen (siehe Abbildung 3.8). Treten diese nicht auf, so ist die Autokorrelationsfunktion für große Zeiten glatt.

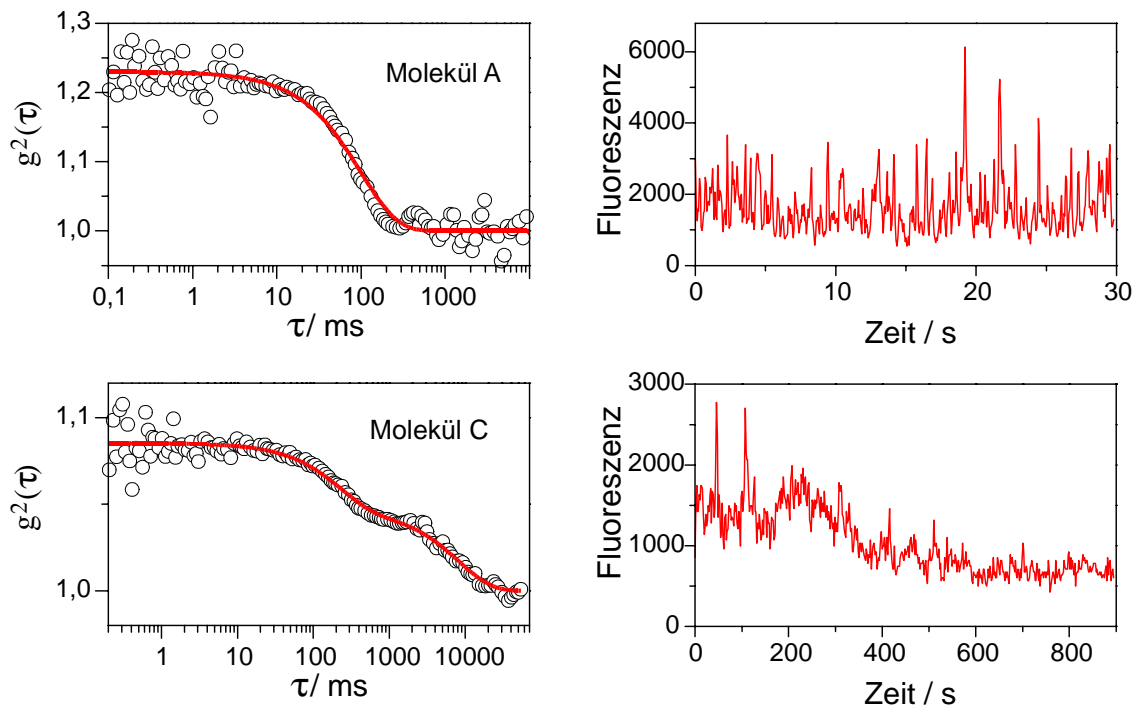


Abbildung 3.8 (Linke Seite) Korrelationsfunktion (Kreise) und monoexponentieller (Molekül A) bzw. biexponentieller (Molekül C) Fit (durchgezogene Linie). Die rechte Seite zeigt die zugehörigen Zeittraces.

Abbildung 3.9A zeigt ein Histogramm der Korrelationszeiten von 41 SR101-Molekülen. Innerhalb der Grenzen der Statistik zeigt sich eine bimodale Verteilung der Korrelationszeiten mit typischen Zeitkonstanten um 100 ms und 60000 ms. Einige der untersuchten Moleküle zeigen beide Typen der Korrelationszeit (siehe Molekül C in Abbildung 3.8), während in anderen Fällen entweder die eine oder andere Korrelationszeit vorzufinden ist. In einigen Fällen war es möglich, die Korrelationszeit als Funktion der Leistung des Anregungslasers zu bestimmen [59].

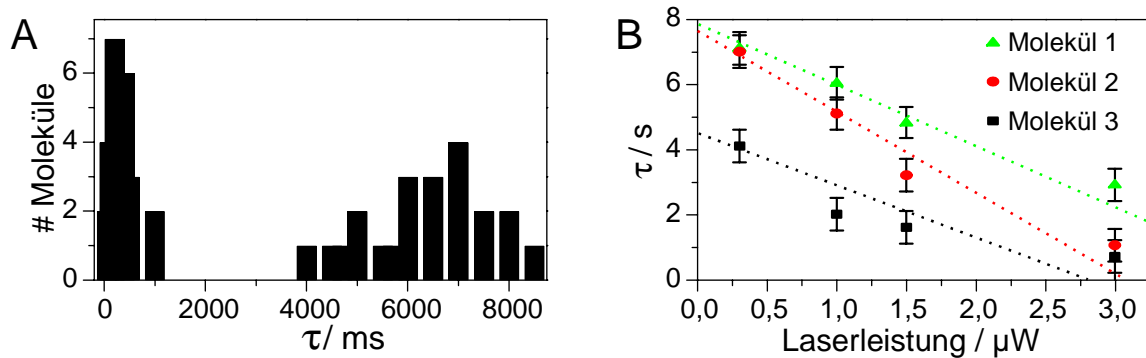


Abbildung 3.9 (A) Histogramm der Korrelationszeiten von 41 SR101-Molekülen. Als Korrelationszeit wurde der  $1/e$ -Wert der Amplitude des am besten passenden exponentiellen Zerfalls gewählt. (B) Abhängigkeit der langen Korrelationszeiten von der Anregungsleistung für drei verschiedene Moleküle.

Abbildung 3.9B zeigt den funktionalen Zusammenhang für drei verschiedene Moleküle. Es zeigte sich, dass die langen Korrelationszeiten eine lineare Abhängigkeit von der Anregungsleistung zeigen, während die kurzen Korrelationszeiten um 100 ms unabhängig von der Anregungsleistung sind.

### 3.4.3 Diskussion der Zerfallszeiten

Zur Erklärung der beobachteten Korrelationen in  $g^2(\tau)$  kommen mehrere mögliche Mechanismen in Frage. Eine offensichtliche Möglichkeit ist der in Abschnitt 3.4.1 ausführlich behandelte ISC-Prozess in einen metastabilen Tripletzustand, der das *Photonbunching* und damit eine starke Korrelation in  $g^2(\tau)$  bewirkt. Mit typischen Werten aus der Literatur für die Raten  $k_{31}$  und  $k_{32}$  für R6G in einem Polymer [8;60] oder auf einer silanisierten Oberfläche [61] erhält man nach Gleichung (9)  $C = 1.2$  und  $\tau = 0.1$  ms. Da die Korrelationszeiten wie sie hier beobachtet wurden mindestens vier Größenordnungen größer als dieser Wert sind, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die hier gemessenen Korrelationen dem ISC zuzuschreiben sind. Es muss also nach einer alternativen Erklärung gesucht werden.

Verschiedene Experimente wurden durchgeführt, die sich mit der Beobachtung von Intensitätssprüngen in der Emission einzelner Farbstoffmoleküle auf Oberflächen und in dünnen

Polymerfilmen beschäftigen. Bopp et al. [62] beobachteten eine laterale Diffusion einzelner R6G Moleküle in einem Polymer mit einer Diffusionskonstante von  $D = 2.6 \times 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Die mittlere quadratische Verschiebung  $\rho(t)$  für 2D-Diffusion ist definiert als

$$\rho(t) = 4Dt. \quad (11)$$

Geht man davon aus, dass R6G- und SR101-Moleküle ein ähnliches Diffusionsverhalten zeigen, so berechnet sich nach (11) eine Diffusionsstrecke von  $\rho(t) \approx 6 \text{ nm}^2$ , wenn man die durchschnittliche Beobachtungszeit bis zum irreversiblen Bleichen von 40 s zugrunde legt. Da die räumliche Auflösung des Mikroskops ungefähr 250 nm beträgt, bewirkt eine solch kleine laterale Verschiebung keine beobachtbare Änderung der Fluoreszenzintensität. Somit kommt auch die laterale Diffusion zur Erklärung der Korrelationen nicht in Frage.

Ein weiterer denkbarer Prozess zur Erklärung der Intensitätsfluktuationen ist die Reorientierung der Moleküle auf der Oberfläche. Aus Ensemblemessungen ist bekannt, dass Rhodamin-Moleküle plan auf der Glasoberfläche orientiert sind und ihre Übergangsdipolmomente in der Molekülebene liegen [63]. Bei Verwendung von linear polarisiertem Anregungslicht, wie es hier benutzt wurde, würden Rotationsdiffusion und Rotationssprünge zu einer Änderung im Absorptionsquerschnitt des Moleküls führen und so zu einer Änderung in der Fluoreszenzintensität führen. Xi und Dunn [18] zeigten jedoch anhand Polarisationsuntersuchungen, dass einzelne SR101-Moleküle auf Glas keine Reorientierungen ausführen. Die hier verwendete zusätzliche PVB-Schutzschicht sollte eine Reorientierung der Moleküle weiter einschränken, so dass für eins der hier verwendeten Systeme Rotationssprünge als Ursache der Fluktuationen ausgeschlossen werden kann.

Andererseits gibt es auch Untersuchungen, die Rotationssprünge und Rotationsdiffusion einzelner Moleküle zeigen. Ha et al. [64] untersuchten Tetramethylrhodamin-Moleküle, die über eine Kohlenwasserstoffkette an ein DNA-Fragment gebunden waren, welches fest auf einer silanisierten Oberfläche immobilisiert war. Es wurden neben spektralen Sprüngen auch Rotationssprünge und freie Rotation beobachtet, wobei letzteres bedeutet, dass das Molekül sich von der Oberfläche löst und frei an der Kohlenwasserstoffkette hängt. Dieses Verhalten wurde allerdings nur an 2% der untersuchten Moleküle beobachtet. Beachtet man ferner, dass in



dieser Arbeit die Moleküle mit einer Polymerschicht bedeckt sind, so ist es höchst unwahrscheinlich, dass die Intensitätsfluktuationen von Reorientierungen der Moleküle auf der Oberfläche ausgehen.

In einer weiteren Arbeit von Lu und Xi [65] wird eine teilweise photochemisch getriebene spektrale Diffusion als mögliche Ursache für Intensitätsfluktuationen genannt. SR101-Moleküle immobilisiert auf einer Quarzglasoberfläche und bedeckt mit einer Polymerschicht (Polymethylmethacrylat, PMMA) zeigen in Emission spektrale Diffusion der Größenordnung von 10 nm. Die charakteristischen Zeitkonstanten für diese spektrale Diffusion der Fluoreszenzemission betragen 500 ms und 45 s. Diese Werte liegen nahe an den in dieser Arbeit gemessenen Werten von 100 ms und 6 s (siehe Abbildung 3.9A), insbesondere wenn man berücksichtigt, dass die längeren Korrelationszeiten von der Anregungsleistung abhängen. Da hier die totale Fluoreszenz der einzelnen Moleküle gemessen wird, könnte eine spektrale Diffusion das Herausspringen der Absorptionslinie des Moleküls aus der Resonanz mit dem Anregungslaser bewirken. Eine geringere Absorption führt zu einer Verminderung der Fluoreszenzemission. Springt das Molekül zwischen mehreren spektralen Positionen, so erhielte man Intensitätsverläufe, vergleichbar mit den gemessenen, die zu den Korrelationen führen. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen dieser Arbeit und Ref. [65] ist die Abhängigkeit der gemessenen Zeiten von der Anregungsleistung. In beiden Fällen ist die kurze Zeit unabhängig von der Anregungsleistung, während die längere Korrelationszeit mit zunehmender Anregungsleistung abnimmt (Abbildung 3.9B).

Die Analyse der Korrelationszeiten erlaubt es, Eigenschaften der Energiehyperfläche des Grundzustandes in der Polymerumgebung abzuleiten. Der Unterschied von zwei Größenordnungen der Fluktuationsraten  $k_1 = 1/\langle\tau_{kurz}\rangle$  und  $k_2 = 1/\langle\tau_{lang}\rangle$  weist auf zwei verschieden hoch ausgeprägte Barrieren innerhalb der Hyperenergiefläche hin.

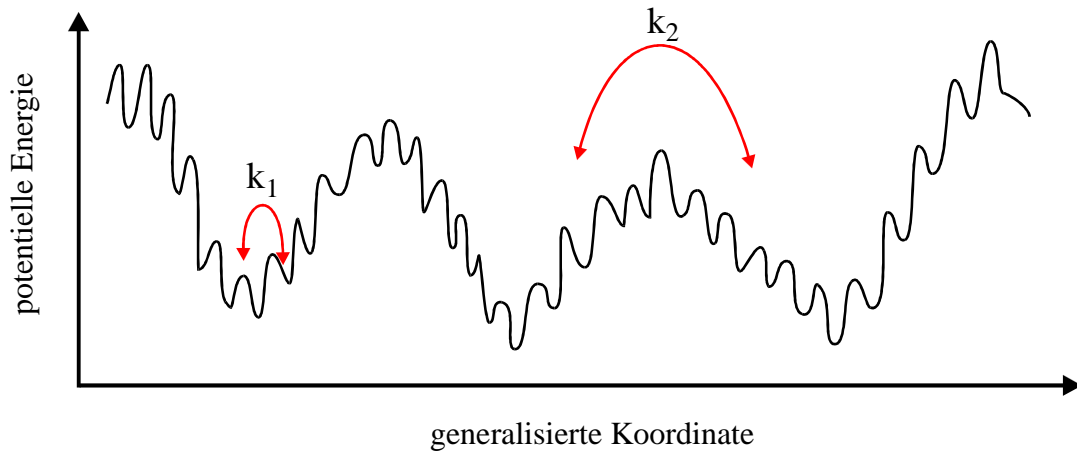


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung der potentiellen Energielandschaft. Die durch geringe Energiebarrieren getrennten Minima können durch thermische Aktivierung gewechselt werden (Rate  $k_1$ ), während die Überwindung der hohen Barrieren (Rate  $k_2$ ) hauptsächlich photoinduziert ist (nach Ref. [65]).

Wie in Abbildung 3.10 schematisch anhand eines eindimensionalen Schnitts durch die Hyperenergiefläche gezeigt wird, können die geringen Energiebarrieren leicht durch thermische Fluktuationen überwunden werden, was zu einer vergleichsweise großen Rate  $k_1$  führt. Die hohen Energiebarrieren hingegen können nur durch Photoanregung überwunden werden, was zu einer geringeren Rate  $k_2$  führt, die von der Anregungsleistung abhängig ist. Ob ein Teil der Rate  $k_2$  durch langsame thermische Aktivierung erfolgt, ist mit Korrelationsspektroskopie allein nicht feststellbar.

#### 3.4.4 Abschätzung der Frequenzverschiebung

In diesem Abschnitt soll die Größe der Frequenzverschiebung abgeschätzt werden. Die meisten Korrelationsfunktionen zeigen mono- bzw. biexponentielle Zerfälle. Daraus folgt, dass während der Dauer der Messung nur einige wenige Absorptionsfrequenzen zur Korrelationsfunktion beitragen [66]. In diesem Falle ist es nun möglich, die Frequenzverschiebung  $\Delta\nu_s$  mittels des Kontrastes  $C$  der Korrelationsfunktion  $g^2(\tau)$  abzuschätzen. Nimmt man an, dass die Absorption zwischen zwei Frequenzen  $\nu_1$  und  $\nu_2$  hin und her springt, ergibt sich folgende Korrelationsfunktion [10]:

$$g^2(\tau) = 1 + C \exp[-(k_1 + k_2)\tau], \quad (12)$$

wobei  $C$  definiert ist als

$$C = \frac{k_1 k_2 (I_1 - I_2)^2}{(k_1 I_1 + k_2 I_2)^2}. \quad (13)$$

In diesen Gleichungen ist  $k_1$  die Rate um von der spektralen Position  $\nu_1$  nach  $\nu_2$  zu gelangen und dementsprechend  $k_2$  die Rate von  $\nu_2$  nach  $\nu_1$ , während  $I_1$  und  $I_2$  die Intensitäten an diesen spektralen Positionen darstellen.

Werden die Korrelationsfunktionen auf den Untergrund korrigiert [7], erhält man im Falle von monoexponentiellen Zerfällen von  $g^2(\tau)$  für den Kontrast Werte im Bereich von  $C = 0.02$  bis  $0.3$ . Anhand der gemessenen Traces wählt man diejenigen Moleküle aus, deren Verweildauer in den zu  $I_{1/2}$  gehörigen Zuständen vergleichbar ist. Dies bedeutet, dass diese beiden Zustände im thermischen Gleichgewicht sind und damit die Raten  $k_{1/2}$  ungefähr die gleiche Größe besitzen. In Gleichung (13) kann man die Raten somit vernachlässigen, braucht also zur Bestimmung von  $C$  lediglich die Intensitäten  $I_{1/2}$  bestimmen.

Die Absorption eines einzelnen Moleküls lässt sich durch eine Lorentzlinie der Linienbreite  $\Delta\nu_{hom}$  (FWHM) abschätzen:

$$I_{1/2}(\nu) = \frac{I_0}{2\pi} \frac{\Delta\nu_{hom}}{(\nu - \nu_{1/2})^2 + (\Delta\nu_{hom}/2)^2}, \quad (14)$$

wobei  $\nu_{1/2}$  das Maximum und  $I_0$  die integrierte Intensität der Lorentzlinie darstellt. Setzt man Gleichung (14) in (13) ein, so ist  $C$  nur noch von der Anregungsfrequenz  $\nu_L$  abhängig.

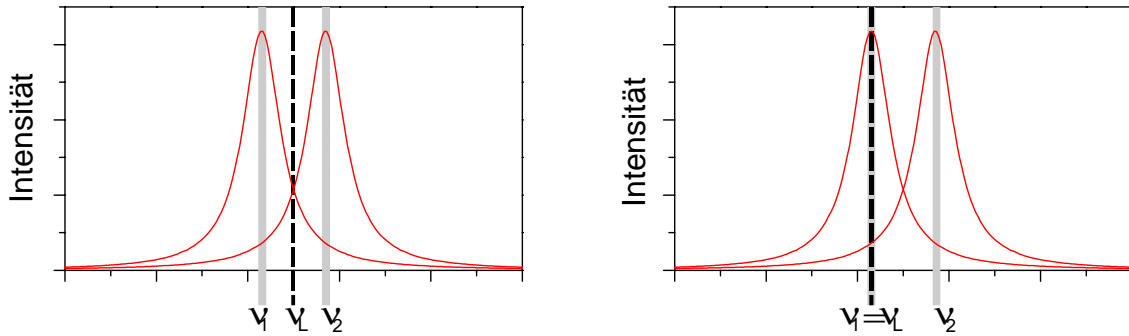


Abbildung 3.11 Der Kontrast der Korrelationsfunktion ist nicht allein von der spektralen Verschiebung  $\Delta\nu_s = \nu_2 - \nu_1$ , sondern auch von der Anregungsfrequenz  $\nu_L$  abhängig. Liegt  $\nu_L$  zwischen  $\nu_1$  und  $\nu_2$  so ist  $C = 0$ , während  $C$  für  $\nu_{1/2} = \nu_L$  maximal wird (siehe Text).

Abbildung 3.11 zeigt die beiden Grenzfälle  $\nu_L = \frac{\nu_2 - \nu_1}{2}$  und  $\nu_L = \nu_1$  (bzw. gleichermaßen  $\nu_L = \nu_2$ ). Im ersten Fall folgt  $I_1 = I_2$  und somit aus Gleichung (13)  $C = 0$ , während sich für den zweiten Fall ein maximaler Kontrast ergibt. Damit erhält man nach kurzer Umformung:

$$\Delta\nu_s = \Delta\nu_{hom} \sqrt{\frac{1+\sqrt{C}}{1-\sqrt{C}}} - 1, \quad (15)$$

wobei  $\Delta\nu_s = \nu_2 - \nu_1$  die Verschiebung der Absorptionsfrequenz ist. Gleichung (15) gilt exakt nur für  $\nu_{1/2} = \nu_L$  und ist somit eine untere Grenze für  $\Delta\nu_s$ .

Für die gemessenen Korrelationsfunktionen mit den höchsten Werten für den Kontrast sollte Gleichung (15) einen recht genauen Wert liefern. Der höchste Kontrast ist  $C = 0.3$  und damit  $\Delta\nu_s = 1.6 \cdot \Delta\nu_{hom}$ . Da für einzelne R6G- und SR101-Moleküle keine Absorptionsspektren vorliegen, aus denen die homogenen Linienbreiten bestimmt werden können, wird hier für  $\Delta\nu_{hom}$  die Linienbreite des Fluoreszenzspektrums [65] einzelner SR101-Moleküle verwendet. Dies führt zu einer Verschiebung der Absorptionswellenlänge im Bereich von 6 – 30 nm. Für den kleinsten gemessenen Wert von  $C = 0.02$  ergibt sich eine Verschiebung im Bereich 2.5 – 12

nm, wobei man jedoch berücksichtigen muss, dass die Anregungsfrequenz ungünstig liegen kann und die Verschiebung größer ist.

Aus diesem einfachen Modell lassen sich somit die Wellenlängensprünge einzelner R6G- und SR101-Moleküle auf den Bereich 3 – 30 nm abschätzen.

### 3.4.5 Mögliche physikalische Ursache der spektralen Sprünge

In diesem Abschnitt sollen mögliche physikalische Ursachen diskutiert werden, die für die spektralen Sprünge verantwortlich sind. Spektrale Diffusion bei tiefen Temperaturen ( $T < 5$  K) kann durch das in der Vergangenheit häufig erfolgreich angewendete Modell ungekoppelter Zwei-Niveausystemen (TLS, *two level system*) erklärt werden. Dieses Modell wurde für glasartige Systeme bei tiefen Temperaturen zuerst von Phillips [67] und Anderson et al. [68] unabhängig voneinander vorgeschlagen und konnte durch Einzelmolekülspektroskopie erstmals direkt nachgewiesen werden [10]. Im TLS-Modell wird die Matrix als System unspezifischer TLS's beschrieben, die an den optischen Übergang eines Gastmoleküls ankopeln. Das TLS wird hierbei als asymmetrisches Doppelminimumpotenzial eines effektiven Teilchens beschrieben, das zwischen den lokalisierten Eigenzuständen der beiden Minima hin und her tunneln kann. Die Resonanzfrequenz eines an ein TLS gekoppeltes Gastmolekül hängt vom Zustand des TLS ab, so dass der Tunnelprozess des TLS direkt als spektraler Sprung des Gastmoleküls beobachtbar ist [69].

Kristalline Systeme sind sehr dicht gepackt, so dass nur in unmittelbarer Umgebung von Fehlstellen Raum für mögliche molekulare Bewegung vorhanden ist. Ein eindrucksvolles Beispiel für ein TLS in einem Kristall existiert im *para*-Terphenyl (pTP)-Kristall. In der Tieftemperaturphase sind die pTP-Moleküle nicht planar angeordnet, sondern so, dass der mittlere Phenylring der Moleküle entlang der Kristallachsen ( $a, b$ ) alternierend aus der Molekülebene herausgedreht ist, wodurch eine antiferroelastische Ordnung entsteht [70]. Dementsprechend besitzt das Potenzial der Torsionsdrehung um die Längsachse des Moleküls ein asymmetrisches Doppelminimumpotenzial. In der Nähe von Störstellen, zum Beispiel von Gastmolekülen, lässt die verringerte Packungsdichte des pTP-Kristalls ein Tunneln zwischen den Minima des TLS zu, was in Anregungsspektren von Terrylen [71;72] bzw. Pentacen [73] in pTP direkt

beobachtbar ist. Insbesondere Terrylen zeigt beim Umklappen des mittleren Rings eines benachbarten pTP-Moleküls einen spektralen Sprung von  $28 \text{ cm}^{-1}$ . Dieser Übergang des TLS ist photoinduziert und sehr stabil, so dass zwischen den beiden Zuständen optisch hin und her geschaltet werden kann [72]. Anregungsspektren von Pentazen in pTP zeigen ein komplizierteres spektrales Verhalten [73], was durch die Ankopplung mehrere TLS's erklärt wird, die sich aus den benachbarten Phenylringen innerhalb einer Domänenwand ergeben [74-76].

Aufgrund der geringen Ordnung in glasartigen Systemen, wie zum Beispiel auch in Polymeren, ist hier mehr Raum für molekulare Bewegung gegeben. In diesen existieren eine Vielzahl TLS's, deren physikalischen Eigenschaften wie Tunnelaufspaltung oder Tunnelmatrixelement aufgrund der unterschiedlichsten molekularen Bewegungen stark variieren. Es zeigte sich, dass die dynamischen Eigenschaften verschiedener TLS's einen großen Zeitbereich von Mikrosekunden bis zu Stunden umfassen und dass auch die Anzahl an TLS's, die an ein Gastmolekül koppeln, stark variiert, und zwar von keinem über einige wenige bis hin zu nicht mehr messbar vielen [69]. Um welche molekularen Bewegungen es sich im Einzelnen handelt, ist in der Regel nicht bekannt. Ganz im Gegenteil ist das Modell gerade so erfolgreich, weil die vielfältigen und komplizierten molekularen Bewegungen auf einfach zu handhabende TLS's abstrahiert wurden.

Begibt man sich zu höheren Temperaturen, so nimmt die Konzentration hin und her springender TLS's eines glasartigen Systems immer mehr zu, so dass das für tiefe Temperaturen entwickelte Modell seine Gültigkeit verliert. Stattdessen setzen hierarchische Wechselwirkungen ein, die letztendlich zum Glasübergang führen [77].

Die hierarchische Struktur der Energielandschaft bezüglich einer generalisierten Koordinate führt zu teilweise extrem großen spektralen Sprüngen einzelner Moleküle bei Raumtemperatur. So wurden zum Beispiel im System SR101 in PMMA spektrale Sprünge bis zu 12 nm beobachtet [65], im System Rhodamin 630 in PVB sogar bis zu 40 nm [44;78]. Diese Werte sind vergleichbar mit den im vorhergehenden Abschnitt abgeschätzten Werten. Eine mögliche Erklärung für derart große spektrale Sprünge sind sterische Wechselwirkungen zwischen größeren Gruppen des Moleküls, die Deformationen der molekularen Geometrie bewirken können. Hierbei ist die Torsion um eine Einzelbindung die mit Abstand wichtigste strukturelle Änderung, da hierfür im Vergleich zum Dehnen einer Bindung verhältnismäßig wenig Energie benötigt wird [79].

In Molekülen mit einem ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystem werden sterische Spannungen oft durch die Rotation von Seitengruppen ausgeglichen. Da Einfachbindungen im Grundzustand oft einen geringen, im angeregten Zustand jedoch einen hohen  $\pi$ -Charakter haben, ist die Rotation im angeregten Zustand meist energetisch ungünstig, so dass sterische Hinderung in der Regel zu einer hypsochromischen Verschiebung führt (siehe Abbildung 3.12) [80].

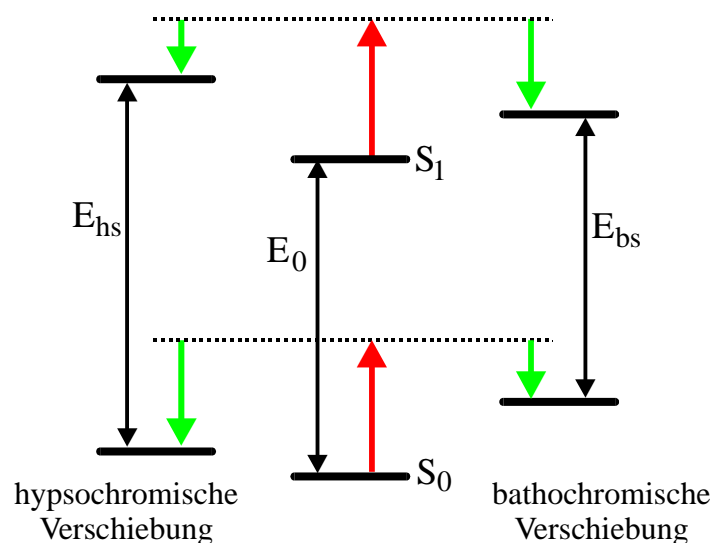


Abbildung 3.12 Durch sterische Hinderung verursachte hypsochromische und bathochromische Verschiebung. Die roten Pfeile kennzeichnen die sterische Spannung während die grünen Pfeile dessen Verminderung aufgrund molekularer Deformation darstellt (nach Ref. [80]).

Das in die Polystyrenmatrix eingebettete Chromophor 9-amino-N-(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarbosimid (API) zeigt spektrale Verschiebungen über 100 nm, die aufgrund sterischer Hinderung der Aminogruppe verursacht werden, wie Vergleichsmessungen an einem API-Derivat, dessen Aminogruppe chemisch fixiert wurde, gezeigt werden konnte [81].

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind wie das API-Molekül planare Chromophore mit ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystem, die eine Vielzahl chemischer Gruppen, die über Einzelbindungen an das Farbstoffmolekül gebunden sind, besitzen. Es ist also wahrscheinlich, dass sterische Hinderung auch in unseren Experimenten eine wesentliche Rolle im Zusammenhang mit der spektralen Diffusion spielt. Passend hierzu zeigen OX1-Moleküle, die deutlich kleiner sind als die beiden Rhodamine und lediglich über zwei einfachgebundene chemi-

sche Seitengruppen verfügen, deutlich weniger häufig Korrelationen, also auch deutlich weniger spektrale Diffusion. Hier ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine der Seitengruppen in der Polymermatrix abwechselnd gehemmt und ungehemmt vorliegt, kleiner als bei R6G- und SR101-Molekülen.

Für die Polymermatrix bedeutet dies, dass deren elastische Eigenschaften so beschaffen sein müssen, dass die Rotation der Seitengruppen um wenige Grad zeitweilig erlaubt und zeitweilig gehemmt wird. Beachtet man, dass der Glasübergang in PVB bei  $T_C = 70\text{ °C}$  liegt und dass aufgrund des Stokesshifts der Moleküle verhältnismäßig viel Energie in der unmittelbaren Umgebung der Farbstoffe in Wärme umgewandelt wird, so ist eine lokale Temperaturerhöhung nahe an  $T_C$  nicht abwegig. In diesem Bereich sollte die Flexibilität des Polymers deutlich zunehmen, so dass unterschiedliche Kopplungsmechanismen an die Gastmoleküle auftreten werden, insbesondere auch Änderungen der sterischen Hinderung.

### 3.5 Fazit

In diesem Kapitel konnten einzelne Farbstoffmoleküle in einer Polymermatrix mittels konfokaler Mikroskopie bei Raumtemperatur nachgewiesen werden. R6G-, SR101 und OX1-Moleküle zeigen ein ausgeprägtes dynamisches Verhalten. Sprunghafter Wechsel zwischen maximaler Fluoreszenzintensität und Untergrundniveau (*random telegraph signal*), Rückkehr der maximalen Intensität nach langen Dunkelphasen und schneller Wechsel zwischen verschiedenen Intensitätsniveaus sind die wesentlichen Beispiele.

Im Falle von SR101- und R6G-Molekülen zeigen sich häufig Fluoreszenz-Korrelationen, während diese bei OX1-Molekülen nur in sehr wenigen Fällen auftreten. Als Mechanismus, der für die Korrelationen in der Fluoreszenzintensität verantwortlich ist, wird eine sprunghafte Änderung der Absorptionsfrequenz der einzelnen Moleküle vorgeschlagen. Die Größe dieser Sprünge lässt sich aus dem Kontrast  $C$  der Korrelationsfunktion abschätzen und liegt im Größenbereich von 3–30 nm. Der größte Teil der OX1-Moleküle, aber auch viele SR101- und R6G-Moleküle, zeigen innerhalb der Messgenauigkeit keine Korrelationen. Beachtet man, dass das Signal-Rausch-Verhältnis eine Genauigkeit in der Bestimmung von  $C$  in der Größenordnung  $C = 0.01$  zulässt, so ergeben sich für diese Moleküle nach Gleichung (15) Fre-



quenzänderungen von  $\Delta\nu_s = 0.5 \times \Delta\nu_{hom}$ . Offensichtlich zeigen fast alle OX1-Moleküle nur deutlich kleinere Frequenzsprünge. Dies erklärt auch, warum nur ca. 20% der SR101-Moleküle Korrelationen zeigen, obwohl Farbstoffmoleküle in nahezu jedem Fall spektrale Sprünge im Emissionsspektrum zeigen [65]. Hier zeigt sich eine Beschränkung der Anwendbarkeit der Korrelationsspektroskopie auf einzelne Farbstoffmoleküle bei Raumtemperatur. Ein Steigern des Signal-Rausch-Verhältnisses wäre notwendig, um auch kleinere spektrale Sprünge mit dieser Messmethode zu detektieren.

Die Korrelationszeiten zeigen eine bimodale Verteilung. Dies deutet auf eine hierarchische Struktur der potentiellen Energielandschaft hin, die die unmittelbare Umgebung der Moleküle bestimmt. Diese wird durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlich hohen Barrieren bestimmt.

Als mögliche physikalische Ursache für die spektralen Sprünge wurden Änderungen der sterischen Hemmung vorgeschlagen. Die hypsochromische Verschiebung ändert sich je nachdem, wie stark die sterischen Spannungen durch molekulare Deformationen abgebaut werden können. Bei diesen Deformationen handelt es sich wahrscheinlich um Rotationen einzelner chemischer Gruppen, die durch Einzelbindungen mit dem Farbstoffmolekül verbunden sind.



## Kapitel 4

# Einzelne Antennenkomplexe von Purpurbakterien

### 4.1 Einführung

Antennenkomplexe von Purpurbakterien sind seit langem Objekt intensiver Studien. Die erfolgreiche Aufklärung der Kristallstruktur der peripheren Antennenkomplexe der Spezies *Rhodospseudomonas (Rps.) Acidophila* [82] und *Rhodospirillum Molischianum* [83] bewirkte einen weiteren Schub sowohl experimenteller als auch theoretischer Arbeiten an diesen Antennen. Allein auf dem Gebiet der optischen Spektroskopie existiert eine Fülle von Untersuchungen, insbesondere auf dem Gebiet der zeitaufgelösten Spektroskopie im Femtosekunden-Bereich [84-86], aber auch des spektralen Lochbrennens [87;88] und seit jüngster Zeit der Einzelmolekülspektroskopie [42;44;45;62;89]. Aus der Summe der Untersuchungen ergibt sich ein recht klares Bild der Energietransferprozesse innerhalb der Komplexe.

Generell erfüllen Antennenkomplexe zwei Funktionen: 1. Sie ernten (absorbieren) einfallendes Licht, woher auch der englische Name *light harvesting (LH) complex* stammt. 2. Sie transportieren die Anregungsenergie über Zwischenschritte zum Reaktionszentrum (RC), an dem die Ladungstrennung als erster Schritt der eigentlichen Photosynthese stattfindet. In Pur-

purbakterien erfüllen zwei (in manchen Spezies auch drei) verschiedene Antennenkomplexe diese Aufgabe: Zum einen der LH1-Komplex, der auch als Kern-Komplex bezeichnet wird, da er ringförmig das Reaktionszentrum umschließt und zusammen mit diesem den Kern der Photosynthetischen Einheit (*photosynthetic unit*, PSU) bildet. Zum anderen existiert der periphere LH2-Komplex, der ebenfalls eine ringförmige Struktur aufweist und um den Kern-Komplex angeordnet ist. LH1-, LH2-Komplexe und das RC bilden die wesentlichen Bestandteile der PSU. Eine stark vereinfachte Darstellung der PSU zeigt Abbildung 4.1.

Während es pro RC einen LH1-Komplex gibt, ist die Anzahl der LH2-Komplexe pro RC von den Wachstumsbedingungen der Zellen abhängig. So erhält man 8–10 LH2-Komplexe pro RC, wenn die Zellen bei schwacher Beleuchtung wachsen, während bei starker Beleuchtung das Verhältnis deutlich höher ausfällt [90]. Eine Hauptaufgabe des LH2-Komplexes ist es also, die absorbierende Fläche der Zellmembran zu vergrößern.

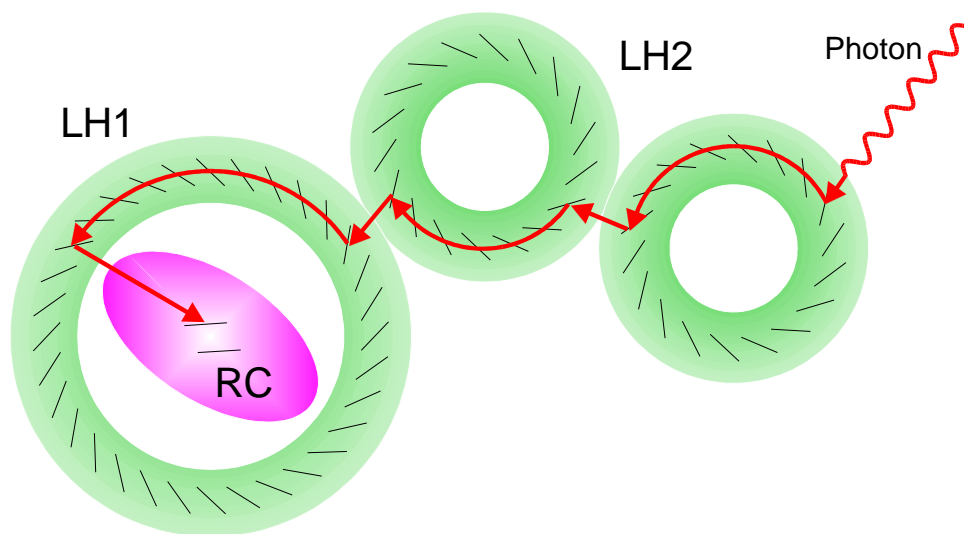


Abbildung 4.1 Stark vereinfachte Darstellung der bakteriellen Photosyntheseeinheit in Blickrichtung auf die Membran. Die wesentlichen Bestandteile der PSU sind die Antennenkomplexe (LH1/2) und das Reaktionszentrum (RC). Die Pfeile geben den Energietransfer zum RC an (nach Ref. [91]).

Bakterielle Antennen verschiedener Spezies sind alle nach einem allgemeinen modularen Prinzip aufgebaut. Die Pigmente Bakteriochlorophyll *a* (BChl) und Karotinoide (Car) sind nicht-kovalent an zwei Typen von Apoproteinen gebunden, die sehr hydrophob sind und ein vergleichsweise geringes Molekulargewicht haben. Diese  $\alpha$ - und  $\beta$ -Apoproteine kommen im Verhältnis 1:1 vor und bilden membranspannende  $\alpha$ -Helices. Für unterschiedliche Spezies existieren leicht unterschiedliche Polypeptidsequenzen.

Der Komplex im Ganzen besteht aus einem Oligomer aus  $\alpha\beta$ -Paaren, das den Pigmenten als Gerüst dient und deren spektroskopische Eigenschaften aufgrund der jeweiligen Proteinumgebung mitbestimmt. So liegt die sehr intensive niedrigste Absorptionsbande  $Q_y$  des BChl *a*-Moleküls je nach Proteinumgebung zwischen 790 nm und 1020 nm [92]. Die BChl *a*-Pigmente sind die wichtigsten Absorber der LH-Komplexe, da im natürlichen Lebensraum der Purpurbakterien (auf dem Grund von Seen) ausschließlich NIR-Licht zur Photosynthese zur Verfügung steht. Neben einer Erweiterung der Absorption auf den spektralen Bereich zwischen 400 nm und 600 nm dienen die Car-Moleküle als Schutzmechanismus gegen das Photobleichen der BChl-Moleküle. Der Triplettzustand der BChl-Moleküle liegt höher als der niedrigste Singulettzustand des Sauerstoffmoleküls, so dass durch einen Austauschprozess ein Energietransfer zum Sauerstoffmolekül stattfinden kann. Der entstehende Singulett-Sauerstoff ist extrem toxisch und kann ein BChl-Molekül (und damit den gesamten Komplex) durch Oxidation zerstören. Die extrem hohe *Intersystem-crossing* (ISC) Rate von BChl  $\tau_{ISC} \approx (10^8 - 10^9) s^{-1}$  [93] verstärkt zusätzlich die Gefahr der Photooxidation. Es ist also notwendig den Triplettzustand der BChl-Moleküle effektiv zu quenchen, was durch die Car-Moleküle geleistet wird. Deren Triplettzustand liegt nun energetisch niedriger als der Singulettzustand des Sauerstoffmoleküls, so dass ein Energietransfer nicht stattfinden kann.

Um den Prozess des Energietransfers zum RC effektiv zu gestalten ist es notwendig, dass sämtliche Energietransferprozesse beginnend vom LH-Komplex, welcher das Photon absorbiert, über diverse andere LH-Komplexe bis zum RC deutlich schneller ablaufen als Konkurrenzprozesse wie Fluoreszenz oder ISC der am Energietransfer beteiligten BChl-Moleküle. Bei Purpurbakterien liegen die Energietransferzeiten innerhalb der PSU um 3 ps für den Transfer zwischen verschiedenen LH2-Komplexen, 3 – 4 ps zwischen LH2 und LH1 und der langsamste Prozess ist mit 30 – 40 ps der Energietransfer vom LH1-Komplex zum RC [90]. Sämtliche Prozesse sind damit um mindestens zwei Größenordnungen schneller als die

schnellsten Konkurrenzprozesse Fluoreszenz  $\tau_{fl} \sim 1$  ns und ISC  $\tau_{fl} \sim 1-10$  ns. Somit läuft der Energietransferprozess in der photosynthetischen Membran mit 99-prozentiger Effizienz ab, d.h. nur ein absorbiertes Photon von 100 führt nicht zur Ladungstrennung am RC.

#### 4.1.1 Struktur des LH2-Komplexes

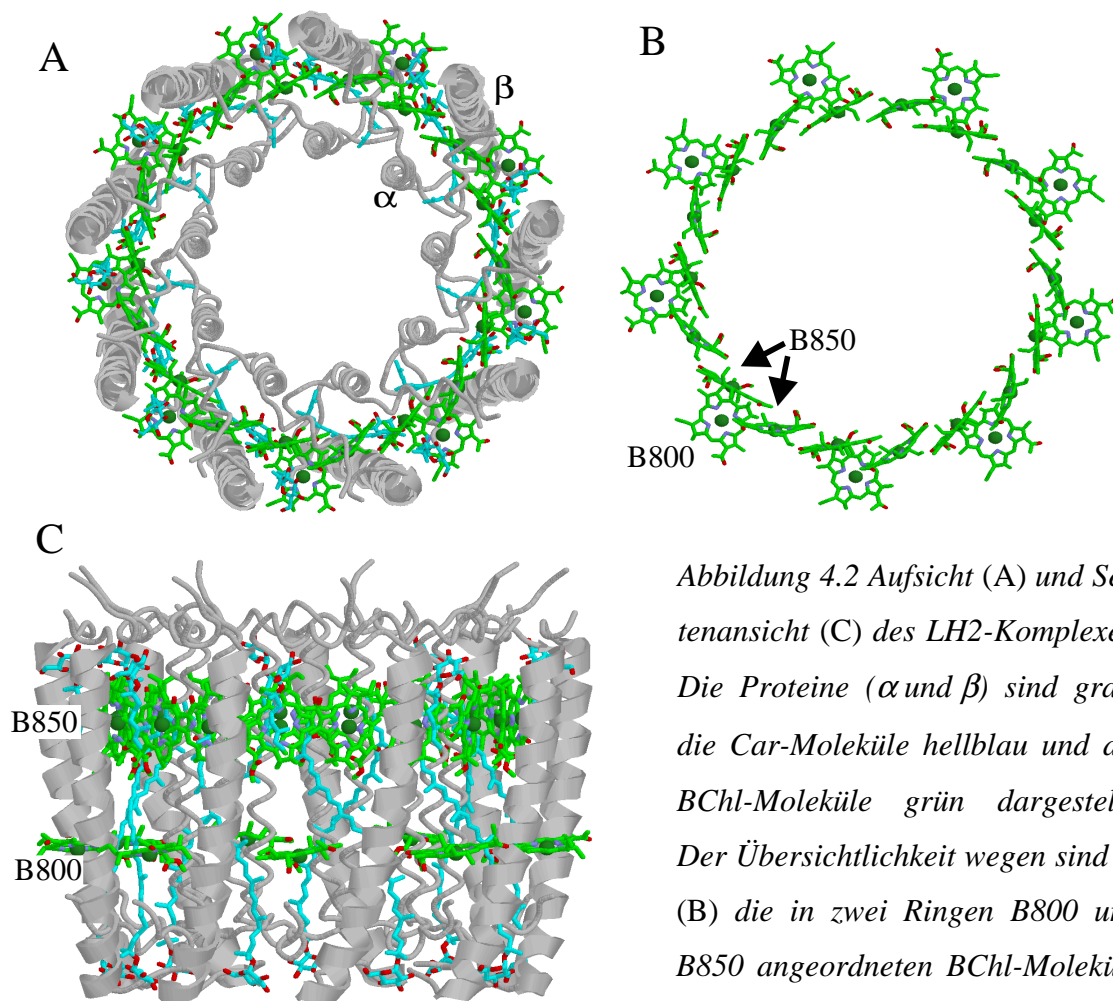
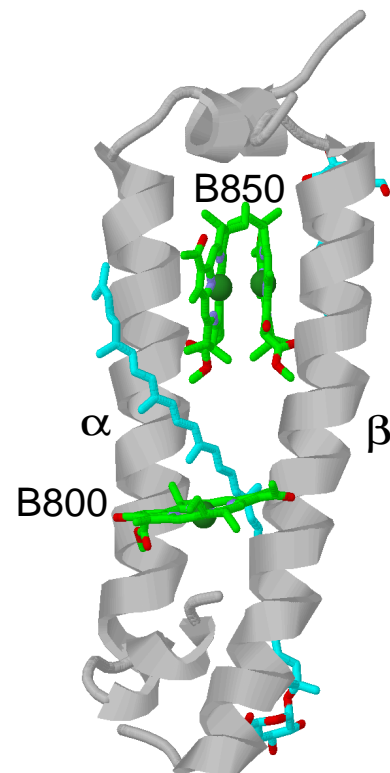


Abbildung 4.2 Aufsicht (A) und Seitenansicht (C) des LH2-Komplexes. Die Proteine ( $\alpha$  und  $\beta$ ) sind grau, die Car-Moleküle hellblau und die BChl-Moleküle grün dargestellt. Der Übersichtlichkeit wegen sind in (B) die in zwei Ringen B800 und B850 angeordneten BChl-Moleküle noch einmal separat dargestellt.

Der LH2-Komplex von *Rps. Acidophila* stellt ein ringförmiges Nonamer dar, besitzt also  $C_9$ -Symmetrie (siehe Abbildung 4.2). Die gesamte Struktur ähnelt einem prall gefüllten Reifen, dessen Innenseite aus einem Ring von neun  $\alpha$ -Apoproteinen gebildet wird, der einen Durch-

messer von 18 Å hat, und dessen Außenseite von neun  $\beta$ -Apoproteinen gebildet wird, so dass das Gesamtaggregate einen Durchmesser von 34 Å besitzt. Der transmembrane Teil beider Proteine ist zu  $\alpha$ -Helices gefaltet, wobei die  $\alpha$ -Apoproteine nahezu senkrecht zur Membran stehen, während die  $\beta$ -Apoproteine in Bezug zur Membran leicht gekippt liegen. Sämtliche Pigmente sind zwischen den beiden Ringen aus Proteinen angeordnet. Die BChl-Moleküle bilden zwei Ringe in zwei unterschiedlichen Ebenen: Der äußere Ring, näher zum Cytoplasma liegend, besteht aus neun Molekülen, die relativ weit von einander getrennt liegen (Mg–Mg-Abstand 21 Å) [82]. Dieser Ring wird B800 genannt, da die niedrigste Absorptionsbande ( $Q_y$ ) der in diesem Ring enthaltenen BChl-Moleküle um 800 nm liegt. Aufgrund des relativ großen Abstandes zueinander ist die Wechselwirkung zwischen den BChl-Molekülen verhältnismäßig gering, so dass es wahrscheinlich ist, dass die Anregungsenergie auf einem Molekül lokalisiert ist.

*Abbildung 4.3 Die monomerische Untereinheit des LH2 Nonamers besteht aus zwei Proteinen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) zwei Car-Molekülen (hellblau) und drei BChl-Molekülen, von denen das zum B800-Ring gehörige mit der Molekülebene parallel zur Membranebene ausgerichtet ist, während das zum B850-Ring gehörige Dimer senkrecht dazu steht. Der extrem geringe Abstand zwischen den Molekülen innerhalb des Dimers (8.7 Å) führt zu einer starken Wechselwirkung der Moleküle im B850-Ring.*



Der zweite Ring, näher zum Periplasma gelegen, besteht aus 18 BChl-Molekülen und wird aufgrund der Absorption um 850 nm als B850 bezeichnet. Die Moleküle liegen als Dimere mit antiparallel ausgerichteten Übergangsdipolmomenten vor. Der Abstand innerhalb des Dimers beträgt 8.7 Å (Mg–Mg), der zwischen Molekülen unterschiedlicher Dimere 9.7 Å [82]. Aufgrund des geringen Abstandes der Moleküle des B850-Rings, existiert eine starke Wechselwirkung zwischen ihnen, so dass wahrschein-

lich exzitonische Zustände gebildet werden. Hierfür spricht auch die starke Rotverschiebung. Dieser Sachverhalt wird ausführlich in Abschnitt 4.2 beschrieben. Des Weiteren existieren pro monomerischer Untereinheit zwei Car-Moleküle. Neben den schon beschriebenen Funktionen wird vermutet, dass das langkettige Car-Molekül, das innerhalb der monomerischen Untereinheit das B800 BChl-Molekül mit den beiden B850 BChl-Molekülen verbindet (siehe Abbildung 4.3), am Subpikosekunden-Energietransfer vom B800- zum B850-Ring beteiligt ist [94], da dieser Energietransfer für einen reinen Förster-Prozess zu schnell abläuft, wenn der relativ große Abstand von 18 Å (Mg–Mg) zwischen B800 und B850 BChl-Molekülen berücksichtigt wird.

#### 4.1.2 Struktur des Kernkomplexes

Obwohl für den LH1-Komplex bis heute keine hochauflösenden Strukturdaten vorliegen, ist bekannt, dass der LH1-Komplex ebenfalls eine ringförmige Struktur besitzt und das Reaktionszentrum von diesem Ring eingeschlossen wird. Es wird angenommen, dass LH1 aus  $\alpha\beta$ -Heterodimeren analog zum LH2-Komplex aufgebaut ist, allerdings nur zwei BChl-Moleküle pro Untereinheit besitzt, die in einem Ring analog zum B850-Ring in LH2 angeordnet sind, der um 875 nm absorbiert und als B875 bezeichnet wird. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen an LH1 in Membranen [95;96] und 2D-Kristallen rekonstituierter LH1-Komplexe [97;98] wird die Zahl der Untereinheiten auf 12 bis 16 abgeschätzt. Da die BChl-Moleküle der Ringe B850 und B875 innerhalb der Zellmembran auf gleicher Höhe liegen, was einen minimalen Abstand von 24 Å erlaubt, und die Übergangsdipolmomente der BChl-Moleküle unterschiedlicher Ringe näherungsweise parallel liegen, ist ein schneller Energietransfer von 3.3 ps zwischen LH2 und LH1 möglich [90]. Nach einer schnellen Delokalisation über den B875-Ring (Femtosekunden-Zeitskala), ist der letzte Schritt, an dem Antennenkomplexe beteiligt sind, der Energietransfer zum RC, mit 30 – 40 ps der langsamste [90].



## 4.2 Elektronische Struktur des B850-Aggregats

Da im Folgenden ausschließlich die Fluoreszenzeigenschaften einzelner LH2-Komplexe untersucht werden, ist es notwendig, sich ein genaues Bild der elektronischen Struktur des ersten angeregten Zustandes des B850-Aggregats zu machen. Ausgehend von 18 ungekoppelten BChl a-Molekülen wird dazu ein effektiver Hamiltonoperator gebildet, der die Kopplung zwischen den BChl-Molekülen berücksichtigt. Diagonalisierung dieses effektiven Hamiltonoperators führt dann zu den neuen Energieeigenwerten und Zuständen des Aggregats und damit auch zu den Übergangsdipolmomenten der neuen Zustände, die die optischen Eigenschaften bestimmen.

Man betrachte den B850-Ring zunächst ohne Kopplung zwischen den einzelnen BChl-Molekülen.  $|BChl_n\rangle$  und  $|BChl_n^*\rangle$  ( $n = 1 \dots 18$ ) bezeichnen Grund- und ersten angeregten Zustand der einzelnen BChl-Moleküle. Im folgenden wird angenommen, dass nur mäßige Anregungsintensität Verwendung findet und sich somit nur ein Molekül auf einmal in angeregtem Zustand befindet. Die Zustände für den gesamten ungekoppelten Ring lauten dann

$$|n\rangle = |BChl_1\rangle \dots |BChl_n^*\rangle \dots |BChl_{18}\rangle. \quad (16)$$

Diese Zustände besitzen sämtlich die Energie  $E_0 = 11430 \text{ cm}^{-1}$ , was dem  $Q_y$ -Zustand eines BChl-Moleküls in der Proteinumgebung des LH2-Komplexes entspricht. Dieser Wert ist nur indirekt zugänglich, da das Aggregat natürlich nur mit sämtlichen Wechselwirkungen gemessen werden kann, bzw. bei Berechnungen der Brechungsindex eingeht, der aber nur sehr ungenau bestimmt werden kann. Der obige Wert für  $E_0$  wurde mittels Emissionsspektren einzelner LH2-Komplexe bestimmt (siehe Abschnitt 4.9).

Führen wir nun eine Kopplung zwischen den BChl-Molekülen ein. Die einfachste Näherung für die Verteilung der Übergangsladung ist der Punkt-Dipol. Für Chlorophyll-Moleküle hat diese Verteilung allgemein die gleiche räumliche Ausdehnung wie der Macrocycle. Für kleinere bzw. vergleichbare Mg–Mg-Abstände sollte die Punkt-Dipol-Näherung versagen. In der

Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass selbst für deutlich kleinere Abstände als die Ausdehnung des Macrocyclus die Punkt-Dipol-Näherung noch gute Ergebnisse liefert [99]. Für die Kopplungsenergien der nächsten Nachbarn werden wir Literaturwerte verwenden, die mittels der *transition density cubes* Methode bestimmt wurden [100]. Wie aus den Strukturdaten bekannt ist, liegen die Moleküle im Ring als Dimere vor. Die Kopplung zweier Moleküle innerhalb eines Dimers sei  $U_{\alpha\beta}$ , während die Kopplung zwischen benachbarten Molekülen unterschiedlicher Dimere  $U_{\alpha\beta-\alpha\beta}$  sei. Aus Ref. [100] folgt  $U_{\alpha\beta} = 284 \text{ cm}^{-1}$  und  $U_{\alpha\beta-\alpha\beta} = 367 \text{ cm}^{-1}$ . Diese Werte sind nicht unumstritten in der Literatur. In der Tat wurden Werte für die intradimere Wechselwirkung  $U_{\alpha\beta}$  im Bereich  $125 - 800 \text{ cm}^{-1}$  angegeben [44;101-104]. Der Abstand zwischen allen anderen Molekülen ist groß genug um die Punkt-Dipol-Näherung zu rechtfertigen:

$$W_{ij} = C \left( \frac{\vec{d}_i \cdot \vec{d}_j}{r_{ij}^3} - \frac{3(\vec{r}_{ij} \cdot \vec{d}_i)(\vec{r}_{ij} \cdot \vec{d}_j)}{r_{ij}^5} \right) \quad (17)$$

Hierbei sind  $\vec{d}_i$  Einheitsvektoren in Richtung der Übergangsdipolmomente des  $i$ -ten BChl-Moleküls und  $\vec{r}_{ij}$  ist der Verbindungsvektor zwischen den Zentren der Moleküle  $i$  und  $j$ . Die Konstante  $C$  wird so bestimmt, dass  $W_{1,3}$  der von Krueger et al. [100] bestimmten Wechselwirkung für übernächste Nachbarn von  $W = -48 \text{ cm}^{-1}$  entspricht. Mit diesen Werten ergibt sich der folgende effektive Hamiltonoperator:

$$H = \begin{pmatrix} E_0 & U_{\alpha\beta} & W_{1,3} & W_{1,4} & \cdots & U_{\alpha\beta-\alpha\beta} \\ U_{\alpha\beta} & E_0 & U_{\alpha\beta-\alpha\beta} & W_{2,4} & & W_{2,18} \\ W_{1,3} & U_{\alpha\beta-\alpha\beta} & E_0 & U_{\alpha\beta} & & W_{3,18} \\ W_{1,4} & W_{2,4} & U_{\alpha\beta} & E_0 & & W_{4,18} \\ \vdots & & & & \ddots & \vdots \\ U_{\alpha\beta-\alpha\beta} & W_{2,18} & W_{3,18} & W_{4,18} & \cdots & E_0 \end{pmatrix} \quad (18)$$

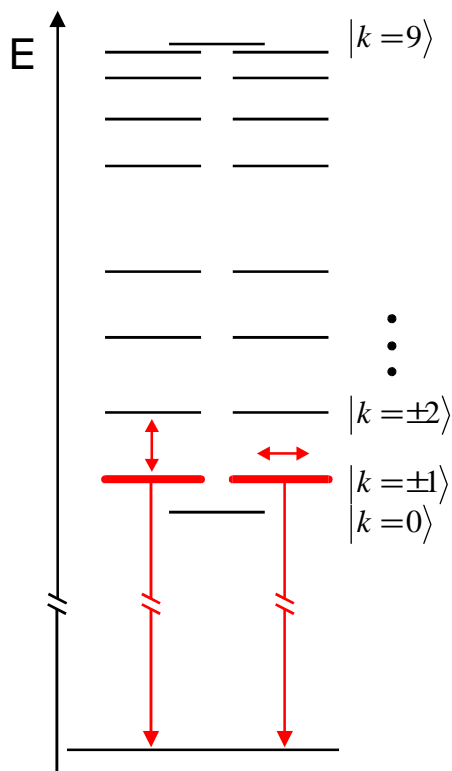


Abbildung 4.4 Energieniveauschema des ersten angeregten Zustands des ungestörten B850-Rings. Aufgrund der ringförmigen Symmetrie besitzen nur die Zustände  $k = \pm 1$  Oszillatorstärke, wobei die Übergangsdipolmomente orthogonal sind. Aufgrund der Dimerisierung der BChl-Moleküle innerhalb des Rings, ergeben sich zwei Energiebänder. Die genauen Kopplungsstärken, die zur Berechnung verwendet wurden, sind im Text angegeben.

Diagonalisieren der Matrix führt zu den neuen Energie-Eigenwerten und den exzitonischen Zuständen:

$$|k\rangle = \sum_{n=1}^{18} a_{nk} |n\rangle \quad \text{mit } k = 0, \pm 1, \dots, \pm 8, 9. \quad (19)$$

Die neuen Zustände sind über den Ring delokalisiert, weshalb man von exzitonischen Zuständen spricht. Abbildung 4.4 zeigt das Energieniveaudiagramm der neuen Zustände.

Aufgrund der Anordnung der BChl-Moleküle als Dimere ergeben sich zwei bandähnliche Strukturen. Außer dem niedrigsten ( $k = 0$ ) und dem höchsten ( $k = 9$ ) Zustand sind alle Zustände zweifach entartet, was für ringförmige Aggregate typisch ist. Im Speziellen hat der LH2-Komplex von *Rps. Acidophilae*  $C_9$ -Symmetrie. Die Zustände  $k = 0$  und  $k = 9$  gehören zur irreduziblen Darstellung A, während die Zustände  $k = \pm 1 \dots \pm 4$  zur Darstellung  $E_n$  und die Zustände  $k = \pm 5 \dots \pm 8$  zur Darstellung  $E_{9-n}$  gehören. Die Zustände der Symmetrie A

(Punktgruppe  $C_9$ ) haben ein Dipolmoment senkrecht zur Symmetrieebene. Da jedoch die Dipolmomente der einzelnen BChl-Moleküle nur sehr wenig aus der Ringebene gekippt sind, ist aus Symmetriegründen klar, dass die Zustände  $k = 0$  und  $k = 9$  nahezu keine Oszillatorstärke haben. Da in den folgenden Experimenten die Aggregate mit der Ringebene parallel zum Substrat immobilisiert sind (siehe Abschnitt 4.5.2), ist ein solches Dipolmoment senkrecht zur Ringebene nicht zu beobachten. Außerdem werden wir sehen, dass dieses intrinsische Dipolmoment von Komplexen perfekter Symmetrie vernachlässigbar klein ist im Vergleich zum Dipolmoment, das der Zustand  $k = 0$  aufgrund von energetischer Unordnung erlangt.

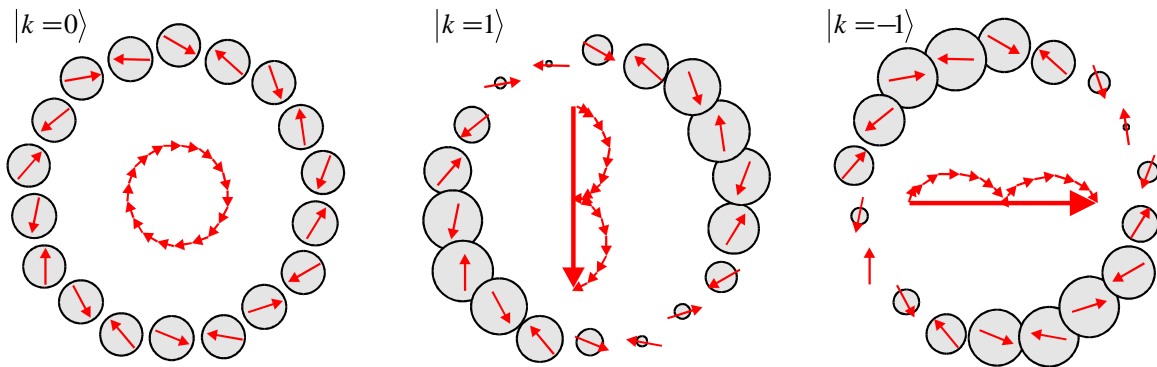


Abbildung 4.5 Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit (graue Scheiben) des Exzitons innerhalb der Zustände  $k = 0, \pm 1$ . Die Pfeile verdeutlichen, wie sich nach Gleichung (20) das Dipolmoment der exzitonenischen Zustände aus den Dipolmomenten der BChl-Moleküle zusammensetzt.

Die Koeffizienten  $a_{nk}$  geben die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsamplitude (AWA) des  $k$ -ten Exzitons auf dem  $i$ -ten BChl-Molekül an. Für die energetisch niedrigsten Zustände ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Exzitons in Abbildung 4.5 angegeben. Die äußeren Pfeile stellen die Dipolmomente der ungekoppelten BChl-Moleküle dar, während die Kreise proportional zur Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Exzitons sind, wenn sich das Molekül in dem jeweiligen Zustand befindet. Die AWA der neun unteren Zustände haben alternierende Vorzeichen, sind also antisymmetrische exzitonenische Zustände, während die neun höherliegenden Zustände symmetrische Zustände darstellen. Aus den AWA lassen sich direkt die Dipolmomente bzw. Oszillatorstärken der Exzitonenzustände berechnen:

$$\vec{d}_k = \sum_{n=1}^{18} a_{nk} \vec{d}_{BChl,n} \quad (20)$$

Hierbei sind  $\vec{d}_k$  die Dipolmomente der Exzitonenzustände und  $\vec{d}_{BChl,n}$  die Dipolmomente der ungekoppelten BChl-Moleküle. Für die drei niedrigsten Zustände sind diese Summen in Abbildung 4.5 dargestellt. Fast die gesamte Oszillatorstärke verteilt sich auf die Zustände  $k = \pm 1$ . Die Zustände  $k = \pm 8$  erhalten eine geringe Oszillatorstärke, die übrigen Zustände tragen näherungsweise keine Oszillatorstärke. Eigenenergien und Oszillatorstärke sämtlicher Zustände sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Die Dipolmomente der Zustände  $k = \pm 1$  liegen senkrecht zueinander (siehe Abbildung 4.5), d.h. die Emission senkrecht zur Ringebene ist unpolarisiert.

Zustand:	ungestörte Symmetrie		diagonale Unordnung	
	relative <sup>a</sup> Oszillatorstärke:	Energie [cm <sup>-1</sup> ]:	relative <sup>a</sup> Oszillatorstärke:	Energie [cm <sup>-1</sup> ]:
0	0.000	11396.5	1.365	11385.4
±1	8.987	11488.6	7.506 7.702	11468.8 11529.0
±2	0.000	11674.8	1.040 0.069	11687.5 11705.3
±3	0.000	11886.0	0.043 0.029	11867.8 11944.6
±4	0.000	12073.6	0.059 0.059	12065.6 12126.9
±5	0.000	12368.4	0.008 0.017	12328.1 12433.4
±6	0.000	12501.8	0.013 0.004	12498.0 12548.9
±7	0.000	12615.5	0.000 0.040	12596.5 12695.5
±8	0.013	12687.0	0.015 0.007	12727.8 12749.3
9	0.000	12711.3	0.024	12804.0
Σ	18.000		18.000	

<sup>a</sup> in Einheiten des ungekoppelten BChl-Moleküls.

*Tabelle 4-1 Zusammenfassung der Energien und Oszillatorstärken des ersten angeregten Zustands des B850-Rings in Falle ungestörter Symmetrie (linke Seite) und beispielhaft für einen Ring mit diagonalen Unordnung von  $w = 200 \text{ cm}^{-1}$  (rechte Seite).*

Die bis jetzt beschriebenen Eigenschaften gelten nur für den Fall eines perfekt symmetrischen Aggregats. Jede Art von Unordnung innerhalb des Rings führt zur Aufhebung der Entartung, Änderung der Oszillatorstärken (insbesondere der unterste Zustand  $k = 0$  bekommt Oszillatorstärke) und damit auch zu Änderungen der Polarisation des emittierten Lichts.

Es sei schon einmal an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass Fluoreszenzmikroskopie an einzelnen LH2-Komplexen eine extrem sensitive Methode darstellt, um statische und dynamische Unordnung des B850-Aggregats zu messen.

Aus spektroskopischen Untersuchungen an LH2-Ensembles ist bekannt, dass Unordnung innerhalb des B850-Rings vorkommen muss. Dies wird insbesondere aus Fluoreszenzmessungen bei tiefen Temperaturen deutlich. Bei Heliumtemperatur (4.2 K) ist nur der energetisch tiefste Zustand ( $k = 0$ ) besetzt, der im Fall perfekter Symmetrie aber keine Oszillatorstärke besitzt. Da bei tiefen Temperaturen trotzdem Fluoreszenz beobachtet wird, muss der Zustand  $k = 0$  Oszillatorstärke besitzen, d.h. es muss eine Störung der Symmetrie vorliegen. Zur Erklärung wurde meistens statische, energetische Unordnung angenommen, sei es diagonale Unordnung (meist eine Gaußverteilung der Energieeigenwerte der ungekoppelten BChl-Moleküle) oder nicht-diagonale Unordnung (also eine Verteilung der Kopplungsstärke). Dies soll hier kurz anhand einer diagonalen Unordnung von  $\omega = 200 \text{ cm}^{-1}$  demonstriert werden. Da die Unordnung deutlich kleiner als die Kopplung benachbarter Moleküle ist, sollte das Exziton immer noch über den Ring delokalisiert sein. (Bei einer deutlich größeren energetischen Unordnung als die Kopplung würde man hingegen erwarten, dass das Exziton auf einem Molekül lokalisiert wäre.) Das Energieniveaudiagramm ist in Abbildung 4.6 wiedergegeben.

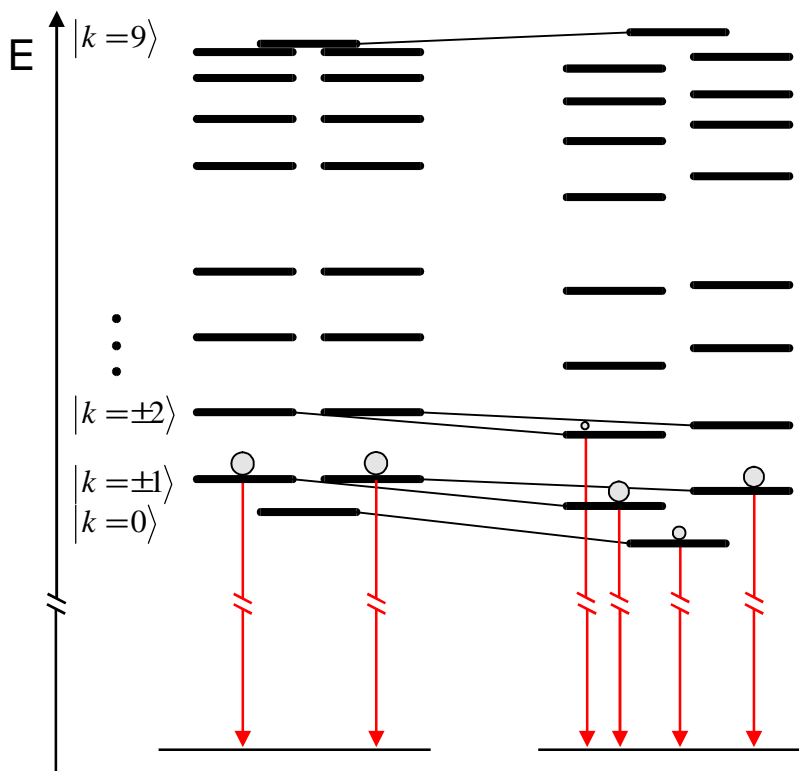


Abbildung 4.6 Änderung der elektronischen Eigenschaften des B850-Rings bei Einführung einer diagonalen Unordnung der Breite  $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ . Die Entartung wird aufgehoben und die vier niedrigsten Energieniveaus bekommen Oszillatorstärke (proportional zur Fläche der grauen Scheiben).

Die Energieniveaus werden durch Einführung der energetischen Unordnung leicht verschoben. Insbesondere die niedrigsten Zustände werden leicht abgesenkt und sämtliche Entartungen werden aufgehoben. Wesentlicher ist jedoch, dass durch die diagonale Unordnung auch andere Zustände als  $k = \pm 1$  Oszillatorstärke bekommen. Insbesondere die Zustände  $k = 0$  und  $k = 2$  besitzen nun eine Oszillatorstärke größer als Null (in Einheiten des isolierten BChl-Moleküls), was in Abbildung 4.6 durch die grauen Scheiben verdeutlicht wird, deren Fläche proportional zur Oszillatorstärke eingezeichnet ist. Oszillatorstärke und Lage der Energieniveaus eines gestörten Rings ( $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ ) sind in Tabelle 4-1 (rechte Seite) zusammengefasst. Ein derart gestörter Komplex fluoresziert auch bei tiefen Temperaturen, wenn nur der energetisch niedrigste Zustand thermisch besetzt ist. Hierbei ist die Emission linear polarisiert, da sie nur aus einem Zustand stammt. Dagegen ändert sich bei höheren Temperaturen der Polarisationsgrad verglichen zum ungestörten Komplex nur gering. Bei Raumtemperatur

ergibt sich ein Polarisationsgrad von  $p = 0.11$  und bei  $T = 200$  K erhält man  $p = 0.14$ . Diese Werte sind für das spezielle Beispiel aus Abbildung 4.6 berechnet, können aber für geringe diagonale Unordnung, das heißt  $w$ -Werte die nicht deutlich größer sind als die Kopplung benachbarter BChl-Moleküle, als typisch angesehen werden.

Auch die Werte für die diagonale Unordnung innerhalb des B850-Rings werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Werte von  $125 \text{ cm}^{-1}$  bis  $700 \text{ cm}^{-1}$  werden von unterschiedlichen Gruppen angegeben [44;101;104]. Unmittelbar mit dieser großen Unsicherheit der diagonalen Unordnung geht auch eine Unsicherheit der Kohärenzlänge des Exzitons über dem B850 Ring einher. Diese wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

### 4.3 Definition der Kohärenzlänge

Obwohl seit vielen Jahren sehr intensiv an bakteriellen Antennenkomplexen geforscht wird, wird die Frage, über wie viele monomerische Untereinheiten das Exziton über den B850-Ring delokalisiert ist, bis heute kontrovers diskutiert. Meistens werden die Ergebnisse aus Messungen zusammen mit an diese Messungen angepassten Modellrechnungen erzielt, z.B. aus Messungen der Superradianz bei Raumtemperatur  $N_{coh} = 3-4$  [103], aus der Anisotropie der transienten Absorption  $N_{coh} = 4 \pm 2$  [105] oder an Hand von Anregungsspektroskopie an einzelnen Komplexen bei  $T = 1.2$  K eine Delokalisation über nahezu den gesamten Ring [44].

Hierbei ist zunächst zu klären, was man überhaupt unter den Begriffen „Kohärenzlänge“ bzw. „Lokalisationsgrad“ versteht. Berechnet man die elektronische Zustandsdichte für ein ringförmiges Aggregat im ersten angeregten Zustand, so ist klar, dass auf jedem Molekül des Aggregats eine endliche Elektronendichte besteht. Man muss also eine Methode finden, ab welcher Zustandsdichte ein Molekül als nicht-besetzt gilt. In der Literatur werden Lokalisationsgrad und Kohärenzlänge oft wie folgt definiert:



$$L(E) = \frac{1}{N_{coh}(E)} = \frac{\left\langle \sum_k \delta(E - E_k) \left( \sum_n a_{nk}^4 \right) \right\rangle}{\left\langle \sum_k \delta(E - E_k) \right\rangle} \quad (21)$$

Dabei stellt  $a_{nk}$  die  $n$ -te Komponente des  $k$ -ten Eigenvektors der Exzitonenzustände dar, das heißt  $|a_{nk}|^2$  ist die Zustandsdichte für den Exzitonenzustand  $k$  an BChl-Molekül  $n$ .  $E_k$  sind die Eigenenergien der Exzitonenzustände,  $\delta$  ist die Diracfunktion (wird teilweise auch aufgeweicht dargestellt) und die spitzen Klammern bedeuten eine Ensemblemittelung.

Für einen einzelnen Komplex vereinfacht sich diese Formel zu:

$$L(E_k) = \frac{1}{N_{coh}(E_k)} = \sum_n a_{nk}^4. \quad (22)$$

Ein offensichtlicher Nachteil dieser Definition ist die Energieabhängigkeit der Kohärenzlänge. Auch kann  $N_{coh}(E)$  keine Auskunft darüber geben, ob es sich im betrachteten System um Anderson-Lokalisation handelt. [106;107]

Um die Energieabhängigkeit von  $N_{coh}$  zu umgehen, berechnen wir zunächst die absolute Aufenthaltswahrscheinlichkeit  $P_n(T)$  für das Elektron an einem speziellen BChl-Molekül des B850-Rings. Dazu müssen die Amplituden  $a_{nk}$  mit den Besetzungswahrscheinlichkeiten der jeweiligen Exzitonenzustände gewichtet werden, wobei eine Boltzmannverteilung angenommen wird.

$$P_n(T) = \frac{1}{Z} \sum_k |a_{nk}|^2 \exp\left(-\frac{E_k - E_0}{k_B T}\right) \quad (23)$$

Hierbei normiert  $Z$  die Wahrscheinlichkeit, das Elektron irgendwo zu finden, auf eins. Hiermit lässt sich nun eine Kohärenzlänge nicht nur separat für jeden einzelnen Exzitonenzustand sondern für das gesamte B850 Aggregat definieren:

$$N_{tot}(T) = \sum_n P_n(T)^2. \quad (24)$$

Diese Definition weicht von der in der Literatur angegebenen effektiven Kohärenzlänge  $N_{eff}$ , bei der über die mit Boltzmannfaktoren gewichteten Kohärenzlängen der einzelnen Zustände gemittelt wird, ab [102;108]. Im Falle eines perfekt symmetrischen Komplexes erhält man unabhängig von der Temperatur  $N_{tot} = 18$ , was sinnvoll erscheint, da das Exziton an jedem BChl-Molekül die gleiche Aufenthaltswahrscheinlichkeit besitzt. Für  $N_{eff}$  erhält man jedoch in Abhängigkeit von der Temperatur Werte zwischen 12 und 18.

Die Kohärenzlänge ist nun entscheidend von Abweichungen der Symmetrie des B850-Rings abhängig. In Abschnitt 4.7 wird gezeigt, wie energetische Unordnung der Site-Energien der BChl-Moleküle sowie elliptische Deformation des gesamten Aggregates die Kohärenzlänge herabsetzen. Eine weitere wesentliche Störung der Symmetrie bewirken Phononen und haben damit Einfluss auf die Kohärenzlänge. Mittels Modellrechnungen an LH1-Komplexen, die 16 Dimere enthalten, zeigte Leegwater, dass die Lokalisation des Exzitons bei Raumtemperatur hauptsächlich auf Phononen zurückgeführt werden kann [109]. Die Kohärenzlänge reduzierte sich von  $N_{coh} = 9.7$  (BChl-Moleküle) bei Abwesenheit auf  $N_{coh} = 4.1$  bei Anwesenheit von Phononen. In Abschnitt 4.8 wird hierauf noch einmal kurz eingegangen.

## 4.4 Probenpräparation

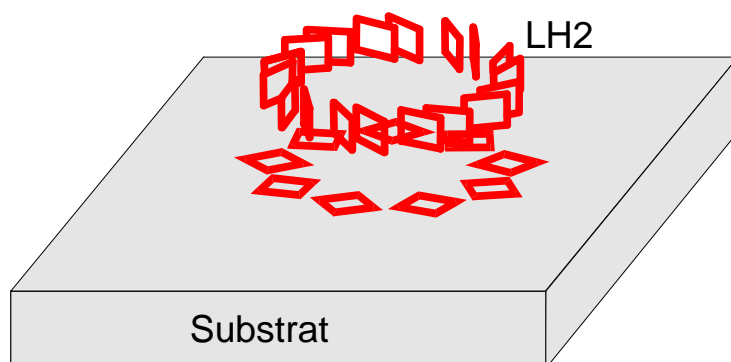
Isolierte LH2-Komplexe in Lösung wurden von R. Cogdell zu Verfügung gestellt. Der Prozess des Zellwachstums von *Rps. Acidophila*, sowie die anschließende Isolierung und Reinigung der Komplexe aus den Zellen ist ausführlich in Ref. [110] beschrieben. Die Komplexe sind in Puffer (20mM Tris, pH=8.0) gelöst, welcher 0.05% Detergenz (LDAO) enthält. Diese Ausgangslösung wird bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Als Substrate wurden Glimmer und mit Octadecyltrichlorosilan (OTS) silanisierendes Glas verwendet, wobei der Glimmer unmittelbar vor der Probenpräparation gespalten wurde, bzw. das

Glas silanisiert wurde, um eine möglichst saubere Oberfläche zu erhalten. Im Falle von Glimmer wurde die Ausgangslösung um einen Faktor  $10^6$ , im Falle von silanisiertem Glas um einen Faktor  $10^3$  mit reinem Puffer (inklusive Detergenz) verdünnt. Sowohl Glimmer als auch mit OTS silanisiertes Glas sind hydrophob, allerdings ist Glimmer zusätzlich leicht negativ geladen, was die Ursache für die effektivere Immobilisierung der LH2-Komplexe auf Glimmer sein könnte, wie sie in den Experimenten gefunden wurde.

Zur Immobilisierung der Komplexe wurde das jeweilige Substrat für 10 min mit einem Tropfen ( $20 \mu\text{l}$ ) der verdünnten Lösung bedeckt und anschließend dreimal mit reinem Puffer gespült. Der verbleibende Pufferfilm ist ausreichend, um bei Raumtemperatur mehrere Stunden (Glimmer), bzw. ca. eine Stunde (silanisierendes Glas) zu experimentieren, bevor die Komplexe denaturieren und keine Fluoreszenz mehr beobachtbar ist. Friert man die Probe samt Pufferfilm ein ( $T < 250 \text{ K}$ ), so findet keine Denaturierung statt. Tatsächlich wurde an einer Probe mehr als einen Monat lang gemessen, ohne dass eine Änderung im Fluoreszenzverhalten beobachtet wurde.

Der Vorteil dieser Probenpräparationstechnik gegenüber einer Immobilisierung der Komplexe innerhalb einer Matrix – zum Beispiel einem Gel oder einem Polymer – ist die Kenntnis der Orientierung der Komplexe zum Substrat. Es zeigt sich (siehe Abschnitt 4.5.2 oder Ref. [42]), dass die LH2-Komplexe aufrecht auf der Oberfläche, also mit der Symmetrieachse senkrecht zur Oberfläche des Substrats, immobilisieren (siehe Abbildung 4.7).



*Abbildung 4.7 LH2-Komplexe sind auf hydrophoben Substraten wie Glimmer oder silanisiertem Glas aufrecht orientiert, also mit der Symmetrieachse senkrecht zur Oberfläche.*

## 4.5 Mikroskopie an einzelnen LH2-Komplexen bei Raumtemperatur

### 4.5.1 Nachweis einzelner Moleküle

Nachfolgende Messungen wurden mit dem Raumtemperatur-Setup gemacht, wie es in Abschnitt 2.2 beschrieben wurde. Als Anregungslichtquelle diente die 799.3 nm-Linie des Kryptonlasers, d.h. es wurden die BChl-Moleküle im B800-Ring angeregt. Zur Trennung von Fluoreszenz und Streulicht diente ein 800nm-Notchfilter in Kombination mit einem 850nm-Kantenfilter. Abbildung 4.8A zeigt eine konfokale Abbildung einer LH2-Probe, die auf Einzelmolekülniveau verdünnt wurde.

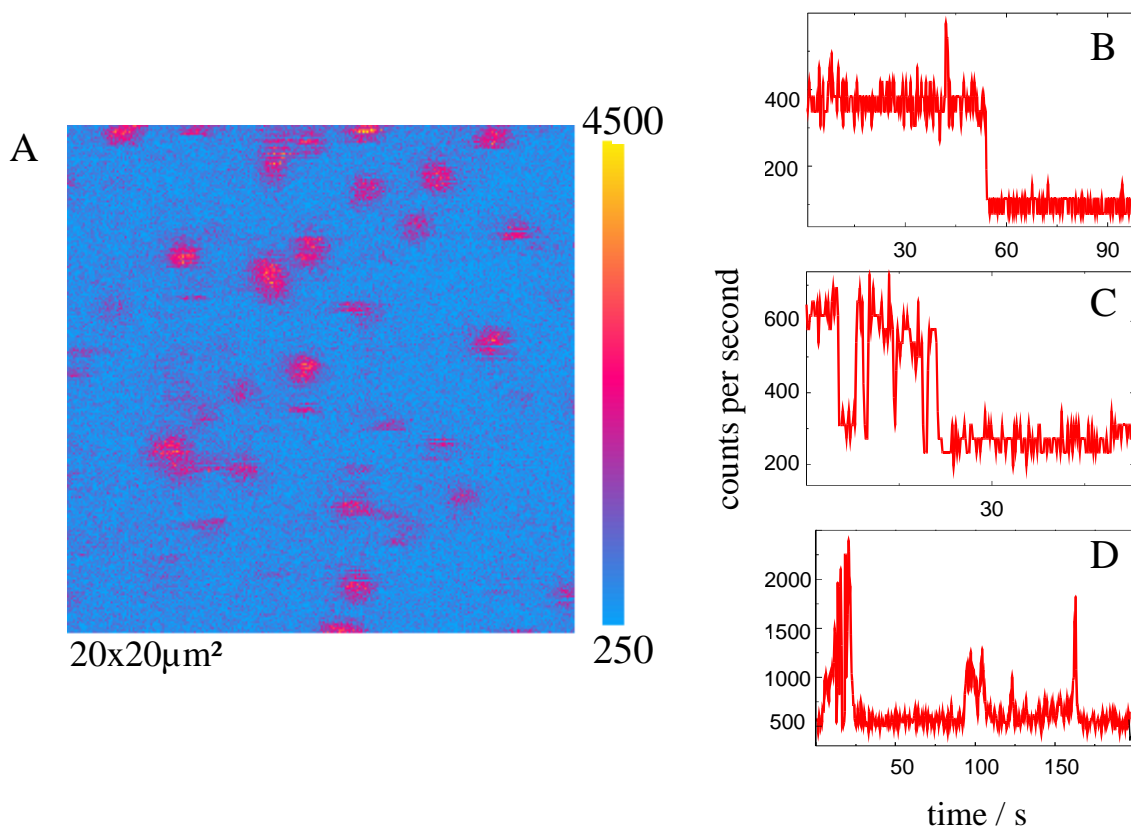


Abbildung 4.8 Konfokale Abbildung (A) und Traces (B-C) einzelner LH2-Komplexe bei Raumtemperatur. Die Traces wurden bei Anregungsenergien von  $P_L = 1.0 \mu\text{W}$  (B),  $P_L = 2.1 \mu\text{W}$  (C) und  $P_L = 10 \mu\text{W}$  (D) aufgenommen.

Scanrichtung ist von links oben zeilenweise nach rechts unten, wobei die Mittelungszeit pro Pixel  $\Delta t = 2$  ms entspricht. Die Intensität wird durch einen Farbcode angegeben und läuft von blau (entspricht minimaler Zählrate) nach gelb (entspricht maximaler Zählrate). Jeder Intensitätsspot der Abbildung stellt einen einzelnen LH2-Komplex dar. Die Evidenz, dass es sich wirklich um einzelne Komplexe handelt, ist prinzipiell die Gleiche, wie bei einzelnen Farbstoffmolekülen (siehe auch Abschnitt 3.3.1):

- Die Anzahl der Intensitätsspots skaliert mit der LH2-Konzentration der Lösung, aus der die Probe hergestellt wurde.
- Nimmt man Traces von einzelnen Spots auf, indem man den Fokus des Mikroskops auf einen Spot positioniert und die Intensität als Funktion der Zeit misst, so zeigen viele der Traces (siehe Abbildung 4.8C) ein digitales Blinken der Intensität (*random telegraph signal*), wobei die Intensität während des Dunkelzustandes auf Untergrundniveau sinkt, die Fluoreszenz also komplett gequencht wird. Dies ist typisch für einzelne Quantensysteme.
- Alle Spots zeigen ein endgültiges Photobleichen in einem Schritt. (Abbildung 4.8B-C)

#### 4.5.2 Orientierung der LH2-Komplexe auf dem Substrat

Für die folgenden Polarisationsstudien ist es wichtig, die Orientierung des Komplexes auf dem Substrat zu kennen. Man betrachte zunächst einen zylinderförmigen Komplex, der aufrecht auf der Oberfläche des Substrates steht, also mit der Symmetrieachse parallel zur Flächennormalen. Aufgrund der ringförmigen Anordnung der Übergangsdipolmomente der BChl-Moleküle im B800-Ring ist die Absorption unabhängig von der Polarisation des Anregungslichtes, wenn dessen Ausbreitungsrichtung senkrecht zur Ringebene steht. Letztere Bedingung ist trotz Verwendung eines Hochaperturobjektivs voll erfüllt [111]. Die Fluoreszenzintensität ist also unabhängig von der Polarisationsrichtung des Anregungslichtes.

Für den Fall, dass die Aggregate auf der Oberfläche liegen, also mit Symmetrieachse senkrecht zur Flächennormalen, addieren sich die Übergangsdipolmomente des B800-Rings zu einem nahezu linearen Gesamtübergangsdipolmoment. In diesem Fall sollte man eine  $\cos^2$ -

Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals erwarten, analog zum Verhalten einzelner Farbstoffmoleküle, die auf Oberflächen immobilisiert sind.

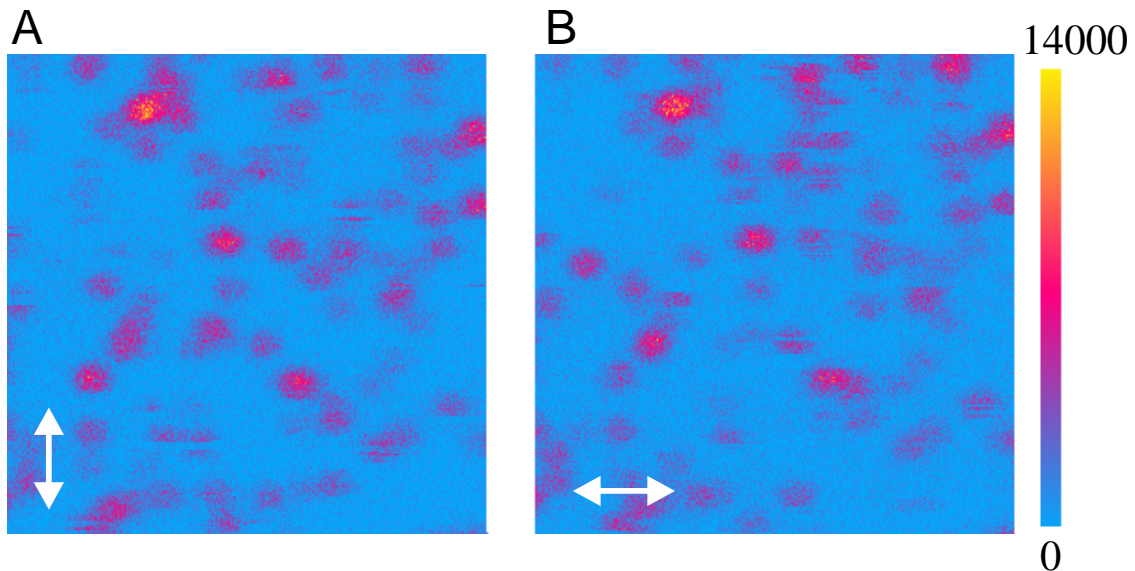


Abbildung 4.9 Zweifache konfokale Abbildung des gleichen Ausschnitts der Probe, wobei zwischen Abbildung (A) und (B) die Polarisationsrichtung des Anregungslichtes um  $90^\circ$  gedreht wurde. Die gleiche Intensitätsverteilung beider Abbildungen zeigt, dass die Komplexe aufrecht auf der Substratoberfläche stehen.

Abbildung 4.9 zeigt zwei Abbildungen des selben Ausschnitts einer LH2-Probe, die mit linear polarisiertem Anregungslicht aufgenommen wurden, wobei zwischen Abbildung 4.9A und B die Polarisation des Anregungslichtes um  $90^\circ$  gedreht wurde. Abgesehen von einzelnen Komplexen, die während des Scanvorgangs irreversibel photobleichten, haben sämtliche LH2-Komplexe die gleiche Fluoreszenzintensität. Dieses Verhalten wurde bei sämtlichen untersuchten Proben beobachtet. Aus diesem Verhalten folgt, dass die Komplexe aufrecht auf der Oberfläche immobilisiert sind, also Ringebene und Oberfläche koplanar sind. Die Ursache für dieses Verhalten liegt daran, dass sowohl Glimmeroberfläche, als auch die Antennenkomplexe Ladungsträger an ihren Oberflächen haben [42]. Die Seite des Komplexes, an der sich die C-Termini der Proteine befinden ist aufgrund der Lysin-Seitengruppen positiv geladen, während die gegenüberliegende Seite (N-Termini) aufgrund der Glutamat-Seitengruppen negativ geladen ist [82]. Da die Glimmeroberfläche leicht negativ geladen ist, richtet sich der Kom-

plex mit der Seite der C-Termini zur Glimmeroberfläche hin aus, also mit dem B850-Ring näher zur Oberfläche. Interessanterweise erhält man ebenfalls diese Ausrichtung der Komplexe, wenn sie in einer Polymermatrix (PVA) immobilisiert werden, die auf ein Substrat aufgeschleudert (*Spin-coating*) wird [44].

### 4.5.3 Intensitätsverhalten einzelner LH2-Komplexe

Aus Abbildung 4.8 wird deutlich, dass die meisten LH2-Komplexe während des Scanvorgangs nicht photostabil bleiben, sondern Fluktuationen der Fluoreszenzintensität zeigen oder irreversibel photobleichen. Dies wird besonders deutlich, wenn die Intensität eines einzelnen Komplexes als Funktion der Zeit aufgenommen wird. Neben Komplexen, die eine konstante Intensität zeigen, bevor sie irreversibel photobleichen (Abbildung 4.8A), zeigt die Mehrheit der Komplexe (> 60%) Sprünge in einen Dunkelzustand (B). Die Verweilzeit in diesem Dunkelzustand variiert von 5 ms (kürzeste Integrationszeit während eines Scans) bis zu Minuten (längste Dunkelzeit, die in einem Trace (C) gefunden wurde). Keiner der untersuchten Komplexe zeigte eine reproduzierbare Intensitätskorrelation  $g^2(\tau)$  nach Gleichung (4). Der Dunkelzustand wurde von Bopp et al. [42] ausführlich untersucht und mittels eines Fallenzustands erklärt, der durch Photobleichen von Teilen des Komplexes entsteht. Als mögliche Ursachen für diese Fälle werden Ladungsträgererzeugung, Elektronentransfer zu einem Akzeptor, Oxidation von Aminosäureresten oder thermische Zerstörung der Car-Moleküle angegeben [42].

Verglichen mit künstlichen Pigmenten, zum Beispiel den in Kapitel 3 behandelten Farbstoffmolekülen, ist die Photostabilität (die Zeitdauer bis zum endgültigen Bleichen) eines LH2-Komplexes im Durchschnitt fast eine Größenordnung geringer. Trotzdem ist die Stabilität völlig ausreichend, da in der Natur ein LH-Komplex nur verhältnismäßig selten angeregt wird ( $\approx 1$  Hz verglichen mit  $\approx 10^4$  Hz in den Experimenten). Aufgrund der anaeroben Bedingungen in der Zellmembran von Purpurbakterien kann man annehmen, dass der Komplex in seiner natürlichen Umgebung photostabiler ist, als die hier verwendeten isolierten Komplexe. Trotzdem würde schon im Falle gleicher Photostabilität der Komplex in der Natur aufgrund der geringen Anregungsrate einige Monate funktionstüchtig bleiben.

#### 4.5.4 Polarisationsverhalten einzelner LH2-Komplexe

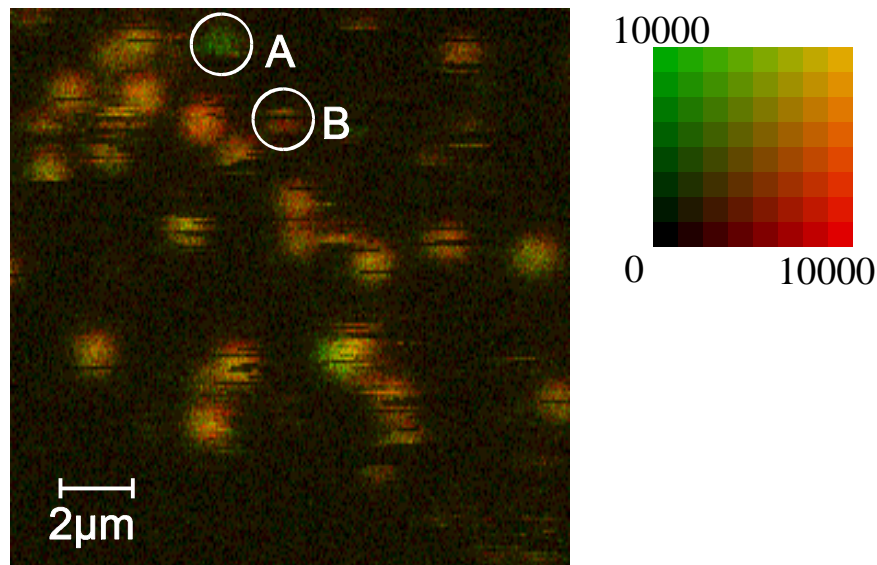
Hier soll in erster Linie auf die Polarisations-eigenschaften der Komplexe eingegangen werden. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben wurde, sollte im Falle eines ungestörten Aggregates, d.h. bei perfekter  $C_9$ -Symmetrie, das emittierte Licht in Richtung parallel zur Symmetrieachse unpolarisiert sein. Da die Komplexe auf dem Substrat aufrecht immobilisiert wurden, sollte also auch unpolarisiertes Licht gemessen werden. Diese Eigenschaft ändert sich jedoch, falls eine Störung der Symmetrie vorhanden ist, insbesondere wenn auch andere Zustände zusätzlich zu den Zuständen  $k = \pm 1$  Oszillatorstärke bekommen.

Eine Störung kann aber auch die Polarisation der Fluoreszenz des Komplexes ändern. Wenn zum Beispiel das Exziton auf einer kleinen Untergruppe von BChl-Molekülen des B850-Rings lokalisiert wird, würde dadurch elliptisch polarisiertes Licht<sup>4</sup> emittiert werden. Im Bild des Energieniveaudiagramms hieße dies, dass die Zustände  $k = \pm 1$  so weit aufspalten, dass selbst bei Raumtemperatur der höher liegende Zustand deutlich schwächer besetzt ist als der energetisch niedrigere oder dass eine deutliche Verschiebung der Oszillatorstärke zu anderen Zuständen als  $k = \pm 1$  – insbesondere zum Zustand  $k = 0$  hin – stattfindet. Solch ein Verhalten lässt sich mit dem in Abschnitt 2.2 beschriebenen Zwei-Detektoren-Aufbau, bei dem zwei orthogonale Polarisationsrichtungen gleichzeitig gemessen werden, direkt beobachten.

---

<sup>4</sup> Der Begriff „elliptisch polarisiert“ wird hier verwendet, wenn der Polarisationsgrad deutlich von  $p=0$  abweicht, unabhängig von der Kohärenz der Wellenfunktionen im angeregten Zustand.





*Abbildung 4.10 Konfokale Abbildung einzelner LH2-Komplexe. Zwei senkrecht zueinander stehende Polarisationsrichtungen wurden gleichzeitig detektiert und im Farbcode rot bzw. grün dargestellt. Unpolarisiertes Licht erscheint gelb.*

Abbildung 4.10 zeigt ein typisches Mikroskopbild der Fluoreszenz einzelner auf silanisiertem Glas immobilisierter LH2-Komplexe, das mit dem Zwei-Detektoren-Aufbau aufgenommen wurde. In diesem Bild wurde folgende Farbcodierung benutzt: Die Fluoreszenzintensität des einen Detektors wird rot, die des anderen grün dargestellt. Messen beide Detektoren die gleich Intensität, wird zur Darstellung gelb benutzt, nebst sämtlichen Zwischentönen für unterschiedliche Intensitäten. Die Integrationszeit pro Pixel betrug 6 ms, wobei eine Anregungsleistung von  $4.5 \mu\text{W}$  verwendet wurde. Wie oben erwähnt, sollten die Komplexe im Falle ungestörter Symmetrie unpolarisiertes Licht emittieren, also in Abbildung 4.10 in gelb dargestellt werden. In der Tat wird der überwiegende Teil der Komplexe so dargestellt, allerdings verhältnismäßig ungleichmäßig, so dass sie farblich gesprenkelt erscheinen. Einige Komplexe werden in rot bzw. grün dargestellt, d.h. ihre Fluoreszenz ist elliptisch (bzw. linear) polarisiert. In Abbildung 4.10 sind zwei Beispiele mit A bzw. B markiert. Solche Aggregate sind permanent gestört, wobei auf die Art der Störung erst später, und zwar im Zusammenhang mit Messungen bei tieferen Temperaturen, eingegangen wird. Ungefähr 10% der untersuchten Komplexe zeigten eine solche permanente Störung. Zusätzlich ist die Fluoreszenzintensität

solcher Komplexe geringer verglichen mit Aggregaten, die unpolarisiertes Licht emittieren, und die Wahrscheinlichkeit eines irreversiblen Photobleichens ist deutlich höher. Abbildung 4.11B zeigt ein weiteres Beispiel in vergrößerter Darstellung.

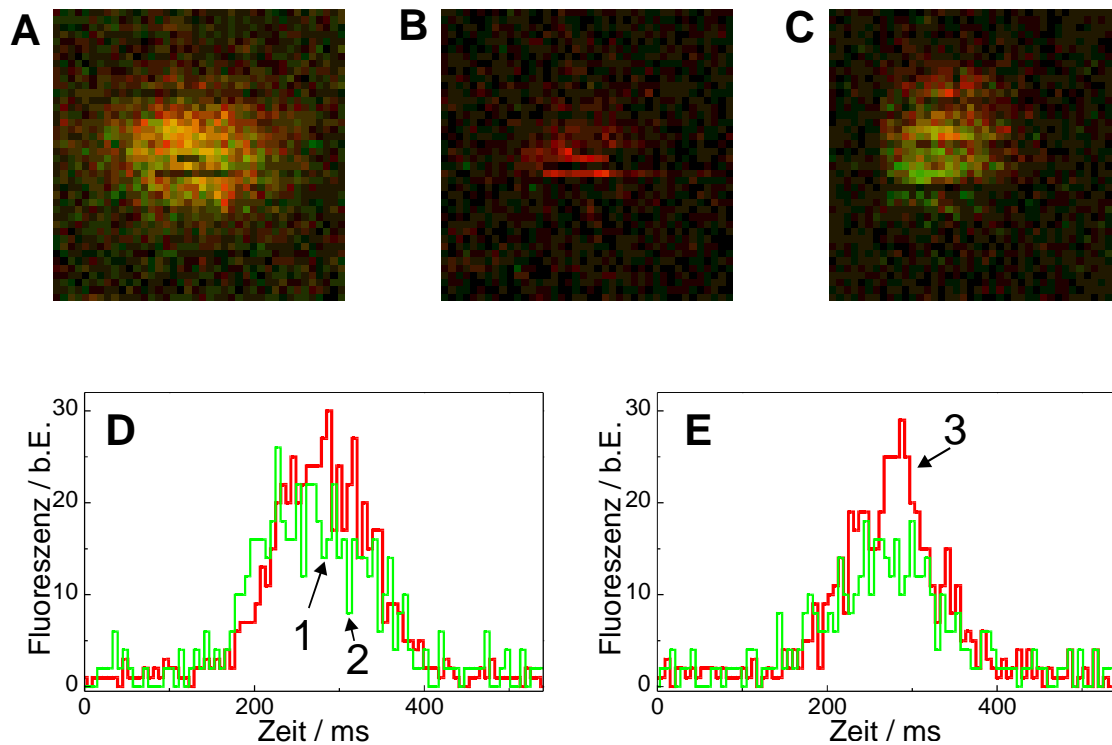


Abbildung 4.11 Konfokale Abbildungen einzelner LH2-Komplexe. (A) Typisches Polarisationsverhalten, d.h. im Mittel unpolarisierte Fluoreszenz. (B,C) Selteneres Verhalten: (B) permanent linear polarisiert und (C) Änderung der Polarisationsrichtung während des Scans. (D,E) Linescans, die auf einer 10 ms Zeitskala Sprünge der Polarisierung zeigen (Pfeile).

Aus Abbildung 4.10 geht klar hervor, dass die meisten Komplexe in der Darstellung aus roten und grünen Pixeln bestehen. Dieses Verhalten wird teilweise bedingt durch die sehr geringen Fluoreszenzintensitäten einzelner LH2-Komplexe und die daraus folgende schlechte Photonstatistik. Eine genaue Analyse der Linescans einzelner Komplexe offenbart jedoch Änderungen der Polarisation (teilweise kombiniert mit Intensitätsänderungen), die deutlich außerhalb des Photonrauschens liegen. Beispiele hierfür zeigt Abbildung 4.11: Ein Molekül (D) zeigt ein antikorreliertes Verhalten. Für die Dauer von 12 ms steigt die Intensität des roten

Kanals an, während die Intensität des grünen Kanals gleichzeitig abnimmt (siehe Pfeile in D). Ein anderes Molekül (E) zeigt einen relativ starken Anstieg des roten Kanals, aber keinen bzw. nur einen sehr schwachen Abfall der Fluoreszenz im grünen Kanal.

Es stellt sich nun die Frage, wie die zeitlichen Abweichungen der Polarisation von unpolarisierter Emission zu werten sind. Aufgrund der Art der Messung mit zwei Detektoren kann der Polarisationsgrad  $p$  nicht exakt bestimmt werden, sondern nur nach unten abgeschätzt werden:

$$p \geq \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max}} \quad (25)$$

wobei  $I_{\max}$  den Kanal mit größerer und  $I_{\min}$  den Kanal mit geringerer Intensität darstellt. Für die in Abbildung 4.11D und E mit Pfeilen markierten Ereignisse ergibt sich so ein Polarisationsgrad von  $p_1 \geq 0.5$ ,  $p_2 \geq 0.6$  und  $p_3 \geq 0.7$ . Ob man in diesen Fällen von einer Lokalisation des Exzitons sprechen kann, hängt von der Definition der Begriffe (De-)Lokalisation ab. Strenggenommen bedeutet Lokalisation, dass die Wellenfunktion des Exzitons nahezu auf einem BChl-Molekül konzentriert ist. Bei einer Verteilung der Wellenfunktion über zwei Moleküle spräche man dann von einer Delokalisation über zwei Moleküle. Im Falle einer Lokalisation auf einem Molekül würde man lineare polarisierte Emission erwarten, was aber in keinem Fall beobachtet wurde. Die Wellenfunktion ist also über eine Teilgruppe der BChl-Moleküle delokalisiert. Trotzdem wird dieser Vorgang im Weiteren der Einfachheit wegen als Lokalisation auf einer Teilgruppe von BChl-Molekülen des Rings bezeichnet und die Dauer dieser Lokalisation als Lokalisationszeit  $\tau$  bezeichnet. Ungefähr 70% aller Komplexe zeigen  $\tau$ -Werte, die größer sind als die Integrationszeit (typischer Weise 4–15 ms). Die meisten Komplexe erfahren also Störungen, die zu einer Lokalisation führen. Bei ca. 50% der Komplexe wurden relativ kurze  $\tau$ -Werte im Bereich 10–50 ms gefunden, also während einiger aufeinanderfolgender Pixel während des Scanvorgangs. Mit ca. 15% deutlich weniger Komplexe zeigen  $\tau$ -Werte größer 100 ms, also für die Dauer von mindestens einer Zeile während des Scanvorgangs und 10% der Komplexe zeigen, wie schon erwähnt, während des gesamten Scanvorgangs elliptisch polarisierte Emission. Im Durchschnitt zeigt jeder LH2-Komplex drei Ereignisse mit  $\tau > 10$  ms während des Scanvorgangs. Die markierten Beispiele in Abbildung

4.11D entsprechen  $\tau = 18 \text{ ms}$  (Pfeil 1) bzw.  $\tau = 12 \text{ ms}$  (Pfeil 2). Hier ist es nun interessant, die Anzahl der Photozyklen, die während der Zeit  $\tau$  durchlaufen werden, abzuschätzen. Für die kürzeste verwendete Integrationszeit von  $4 \text{ ms}$  ergeben sich in Abhängigkeit der Anregungsleistung ( $P_L = 1 - 6 \mu\text{W}$ ) ca.  $7000 - 40000$  ( $\pm 20\%$ ) Anregungszyklen pro Pixel. Für das Beispiel in Abbildung 4.11E mit  $\tau = 40 \text{ ms}$  folgt, dass ca.  $200000$  mal eine Anregung erfolgte und ein Exziton gebildet wurde. Innerhalb des Bereichs der verwendeten Anregungsleistung wurde weder für die Häufigkeit einer Lokalisation noch für die Verteilung von  $\tau$  eine Abhängigkeit von der Anregungsleistung gefunden.

Es gilt nun eine Möglichkeit zu finden, von dem Polarisationsgrad auf die Verteilung der Wellenfunktion zu schließen und damit auf ein Maß für die Lokalisationslänge. Dazu werden in Abschnitt 4.7 Monte-Carlo-Rechnungen durchgeführt, in denen verschiedene Störungen eingeführt werden. Durch Variation der Störungsstärke und Vergleich mit den experimentellen Daten, lassen sich dann Art der Störung und Stärke der Störung abschätzen. Zuvor müssen noch mehr Daten gewonnen werden, die in die Rechnungen eingehen können, weshalb im nächsten Abschnitt die Fluoreszenz der Komplexe als Funktion der Temperatur bestimmt wird.

## 4.6 Einzelne LH2-Komplexe bei Temperaturen unterhalb 200 K

Wie im vorangehenden Abschnitt gesehen, wird die Untersuchung einzelner Antennenkomplexe bei Raumtemperatur durch ein sehr rasches Photobleichen erschwert. Obwohl die BChl-Moleküle der Antenne durch Car-Moleküle geschützt werden, ist die Photostabilität einzelner LH2-Komplexe geringer als bei üblichen Farbstoffmolekülen, wie sie in Farbstofflasern Verwendung finden [16].

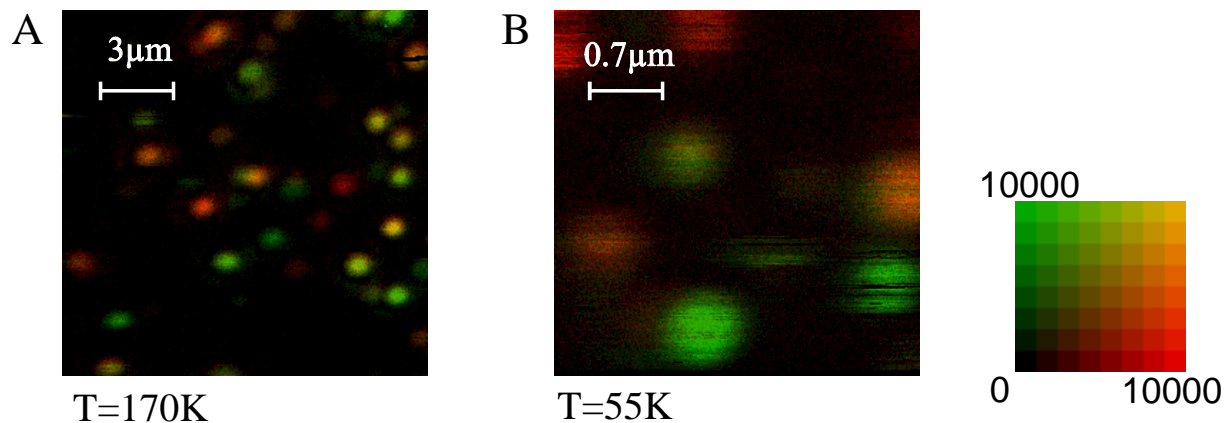


Abbildung 4.12 Konfokale Abbildungen einzelner LH2-Komplexe bei  $T = 170$  K (A) und  $T = 55$  K (B). Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe aufgrund des nicht temperaturstabilen Scanners.

Um die Photostabilität als Funktion der Temperatur zu bestimmen, wurde eine Serie von Mikroskopbildern aufgenommen. In Abbildung 4.12 sind stellvertretend zwei Bilder dieser Serie dargestellt, und zwar bei  $T = 170$  K und bei  $T = 55$  K. Der Anstieg der Photostabilität im Vergleich zu Raumtemperatur-Messungen wird sofort offensichtlich. Die Photostabilität wächst bei Temperaturen unterhalb von 200 K um mehr als zwei Größenordnungen an. Erniedrigt man die Temperatur weiter, so ist keine weitere Erhöhung der Stabilität festzustellen. Ebenfalls stellt sich keine deutliche Reduktion der Quanteneffizienz ein (was im Falle eines perfekt symmetrischen Rings zu erwarten wäre.) Interessanterweise ergibt sich bei Temperaturen unterhalb 70 K eine starke Zunahme von Fluktuationen der Fluoreszenzintensität, die aber nicht die absolute Photostabilität beeinflussen. Während bei Raumtemperatur die meisten Komplexe im zeitlichen Mittel unpolarisiertes Licht emittieren, hat die Fluoreszenzemission bei Temperaturen unterhalb 200 K einen sehr hohen Polarisationsgrad.

Zusammen mit der Erhöhung der Photostabilität, wird auch die Zeitskala der Intensitätssprünge gedehnt (Sekunden, verglichen mit Millisekunden bei Raumtemperatur). Die meisten Intensitätssprünge betreffen beide Polarisationsrichtungen gleichzeitig. Dies kann man deutlich in Abbildung 4.13 sehen. Hier ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen, wobei die Farben rot und grün wieder den Intensitäten der beiden Detektoren entsprechen. Der Intensitätssprung um 670 s in Abbildung 4.13A ist ein typisches Beispiel. Seltener sind Intensi-

tätssprünge, die nur einen Polarisationskanal betreffen, wie in (A) um 100 s zu sehen. Hier wird gleichzeitig die Gesamtintensität um 15% erhöht und der Polarisationsgrad von  $p > 0.9$  auf  $p > 0.7$  verringert.

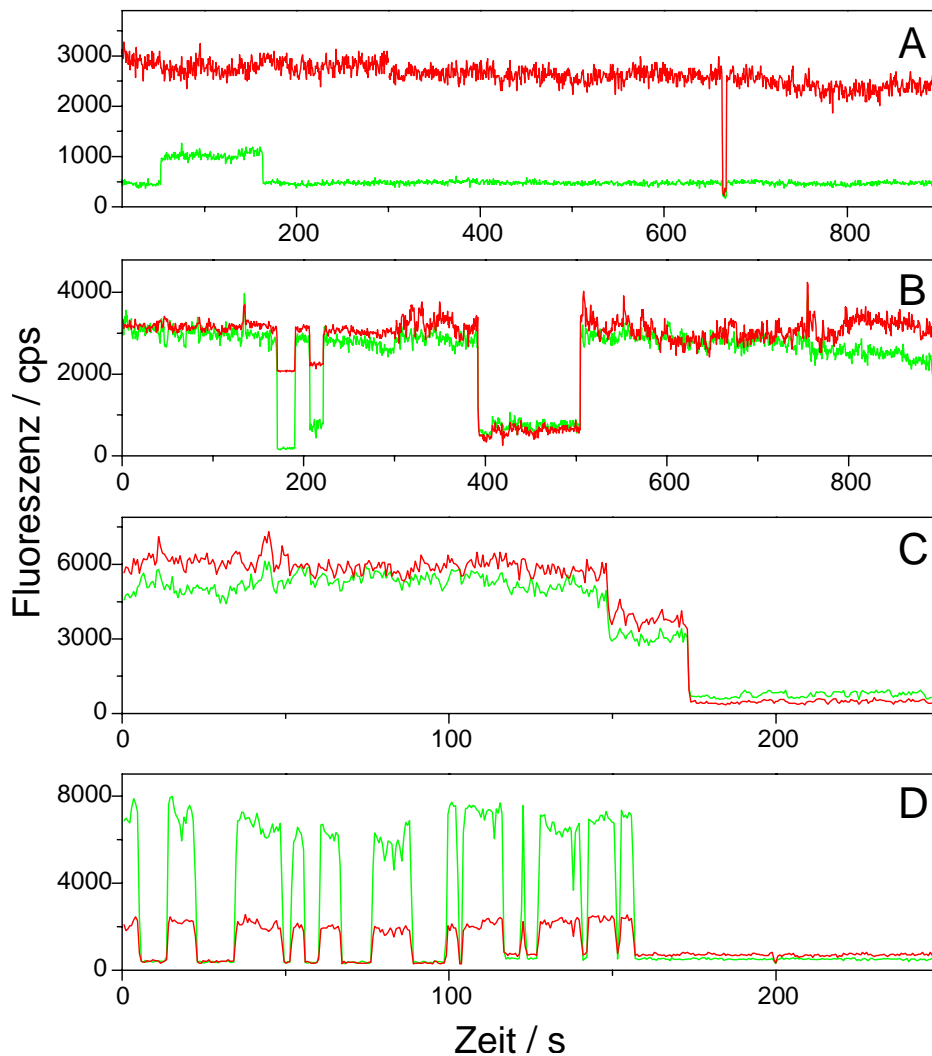


Abbildung 4.13 Zeittraces von einzelnen LH2-Komplexen bei  $T = 200$  K.

Sehr ähnlich verhält sich Komplex (B). Neben zwei Ereignissen um 200 s, bei denen sich sowohl der Polarisationsgrad als auch die Intensität ändern, gibt es ein Ereignis bei 400 s, wo sich der Komplex für knapp zwei Minuten in einem Dunkelzustand befindet. Den Komplexen (A) und (B) ist ferner gemein, dass sie selbst nach 15 Minuten noch nicht permanent gebleicht sind. Während die meisten Komplexe in einem Schritt photobleichen, zeigen einige Komple-

xe ein mehrstufiges Bleichverhalten (C). Vereinzelt findet man Komplexe, die sehr starke Intensitätssprünge zeigen, wie in (D) zu sehen. Die Fluoreszenz des Komplexes wird in den ersten 120 s im Dunkelzustand komplett gequenchet. Danach liegt im Dunkelzustand eine Intensität vor, die zwar sehr gering ist, aber deutlich oberhalb des Untergrundes liegt. Interessanterweise bleibt diese Restintensität bestehen, nachdem der Komplex bei 155 s irreversibel bleicht.

#### 4.6.1 Abhängigkeit der Emission von der Polarisation des Anregungslichts

Zur weiteren Untersuchung des Polarisationsverhaltens der Fluoreszenz einzelner Aggregate wurde die Emission in Abhängigkeit der Polarisationsrichtung des Anregungslichts untersucht. Dazu wurden in Abbildung 4.14 zwei Mikroskopbilder einzelner Komplexe aufgenommen, wobei linear polarisiertes Anregungslicht verwendet wurde, dessen Polarisationsrichtung zwischen den Aufnahmen um  $90^\circ$  gedreht wurde. Hierdurch werden im B800-Ring unterschiedliche BChl-Moleküle angeregt. Es ist nicht eindeutig geklärt, wie schnell der Energietransfer zwischen BChl-Molekülen des B800-Rings abläuft. Wahrscheinlich handelt es sich um einen inkohärenten Försterprozess (*hopping*) [94]. Für diesen werden unterschiedliche Zeiten vorgeschlagen von 400 fs bis 1.6 ps [86;101;112]. Die Transferzeiten für B800 – B850 Energietransfer beträgt 800 fs bei Raumtemperatur und 1.2 ps bei  $T = 77$  K [113]. Man kann also davon ausgehen, dass für die Anregungsenergie auf dem B800-Ring nicht genügend Zeit bleibt, um ein mögliches energetisches Minimum auf dem B800-Ring zu erreichen. Es werden also mit großer Wahrscheinlichkeit unterschiedliche Pfade für den Energietransfer von B800 nach B850 benutzt, wenn mit unterschiedlich polarisiertem Licht innerhalb des B800-Rings angeregt wird.

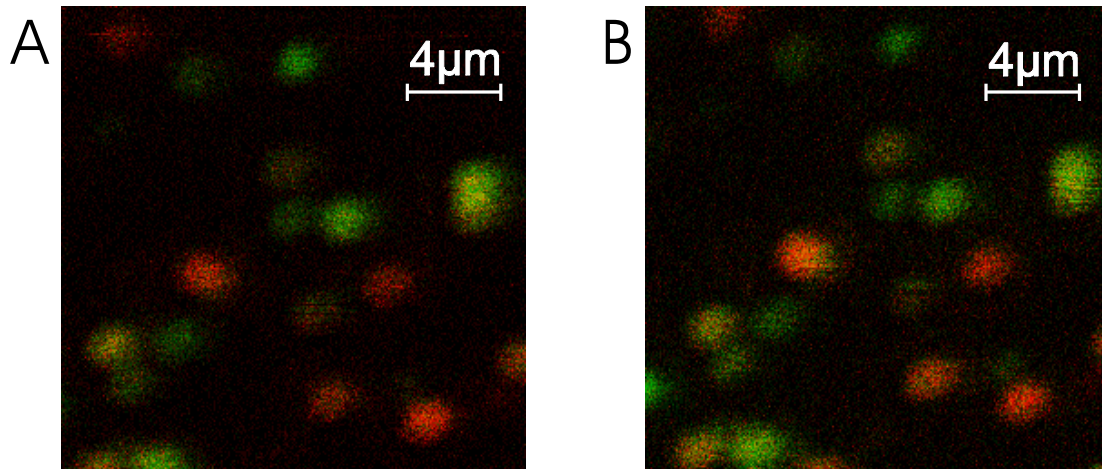


Abbildung 4.14 Konfokale Bilder einzelner LH2-Komplexe bei verschiedener Polarisation des Anregungslichtes. In Bild (B) wurde die Polarisation des Anregungslasers um  $90^\circ$  gedreht im Vergleich zu (A). Die Bilder wurden bei 50 K aufgenommen.

Nun wäre es denkbar, dass die Energielandschaft des B850 Rings derart gestört ist, dass sich mehrere lokale Minima bilden, die bei tiefen Temperaturen (hier  $T = 50$  K) energetisch getrennt sind. Durch die unterschiedlichen Pfade innerhalb des Energietransfers können nun unterschiedliche Minima besetzt werden, was eine Änderung der Polarisation der Emission zur Folge hätte. Wie Abbildung 4.14 zeigt, ist dies nicht der Fall. Die Emission sämtlicher Komplexe ist unabhängig von der Polarisation des Anregungslichts.

## 4.7 Diskussion der linearen Polarisation bei $T < 250$ K

Um die nahezu lineare Polarisation der LH2-Komplexe zu erklären, ist es notwendig eine Störung des ringförmigen Aggregats einzuführen. Um linear polarisierte Emission zu erhalten, müssen die Zustände  $k = \pm 1$  deutlich stärker aufspalten als  $\Delta E = k_B T$ , so dass der höherliegende Zustand im thermischen Gleichgewicht nicht nennenswert besetzt ist. Im Folgenden werden verschiedenartige Störungen eingeführt und überprüft, ob obige Forderung erfüllt wird.



#### 4.7.1 Einführung einer diagonalen Unordnung, die deutlich größer ist als die Wechselwirkung zwischen benachbarten BChl-Molekülen.

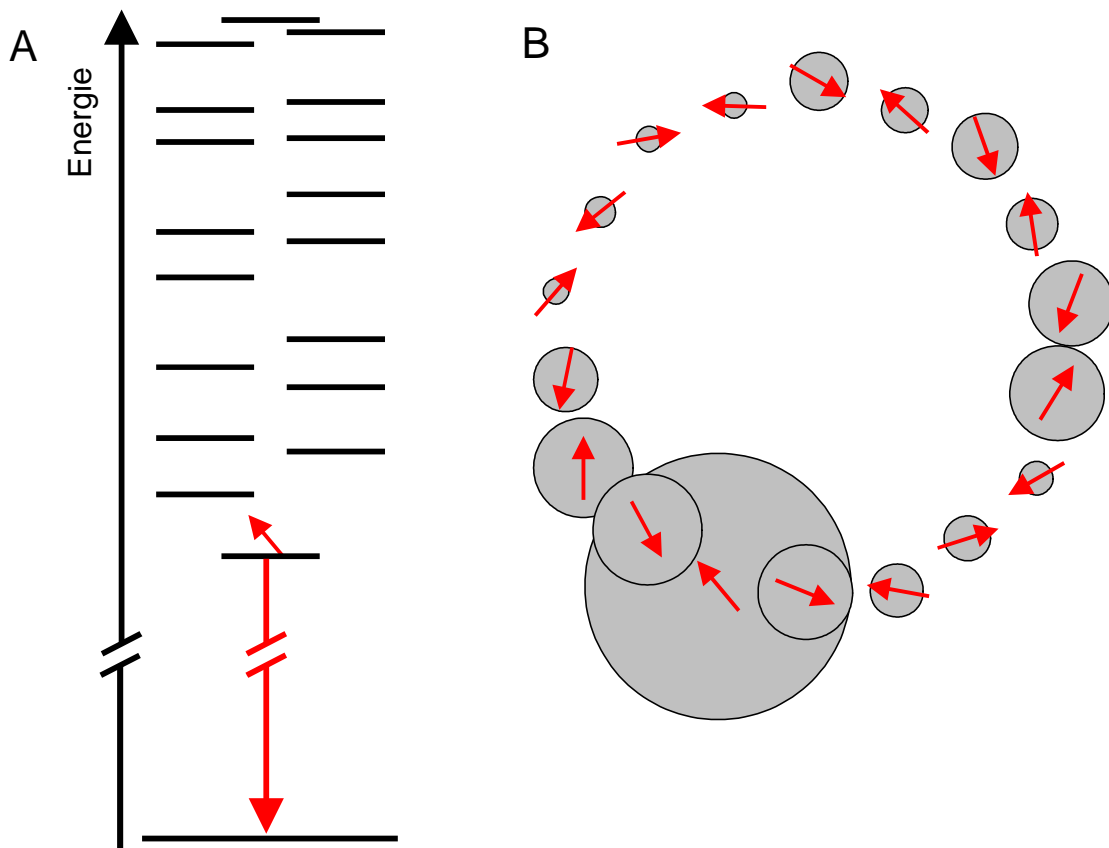


Abbildung 4.15 (A) Energieniveauschema des B850-Rings bei Einführung von diagonalen Unordnung  $w = 1000 \text{ cm}^{-1}$ . (B) Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons auf dem gestörten Ring bei  $T = 200 \text{ K}$ . Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit ist proportional zur Fläche der grauen Scheiben.

Abbildung 4.15A zeigt beispielhaft das Energieniveauschema, das man nach Einführung einer starken diagonalen Unordnung von  $w = 1000 \text{ cm}^{-1}$  erhält. Hierbei bedeutet ‚stark‘, dass die Gaussverteilung der Site-Energien der BChl-Moleküle eine größere Breite besitzt als die Wechselwirkungsenergien benachbarter Moleküle. Diese energetische Unordnung bewirkt, dass sämtliche entarteten Energieniveaus aufspalten und die gesamte bandartige Struktur energetisch gedehnt wird.

Die Berechnung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons auf dem B850-Ring (Abbildung 4.15B) zeigt, dass das Exziton aufgrund der Unordnung nicht länger delokalisiert ist, sondern hauptsächlich auf einem BChl-Molekül lokalisiert ist. Die Berechnung der Kohärenzlänge nach Gleichung (24) ergibt für das obige Beispiel  $N_{tot} = 3.7$  bei  $T = 200$  K und  $N_{tot} = 1.4$  bei  $T = 5$  K. Der niedrigste Zustand ist also fast vollständig auf einem BChl-Molekül lokalisiert. Bei höheren Temperaturen sind die energetisch nächst höherliegenden Zustände teilweise besetzt, so dass sich neben dem größeren Wert für  $N_{tot}$  auch ein Polarisationsgrad von  $p = 0.8$  ergibt, also kein vollständig linear polarisiertes Licht, wie bei tiefen Temperaturen.

Wie in Abschnitt 4.2 erwähnt, liegt die Wechselwirkung zwischen benachbarten Molekülen im Bereich von  $300 \text{ cm}^{-1}$ . Die Breite der Verteilung der Eigenwerte ist in der Literatur allerdings umstritten. Messungen der Temperaturabhängigkeit der strahlenden Rate des B850 Aggregats konnten am besten durch eine Unordnung simuliert werden, die 2 – 3 mal größer sein muss als die Wechselwirkung benachbarter BChl-Moleküle [103]. Damit ergibt sich nun eine Gaußverteilung der Breite  $\sigma \approx 600 \text{ cm}^{-1}$ , wie sie auch in Ref. [104] verwendet wird.

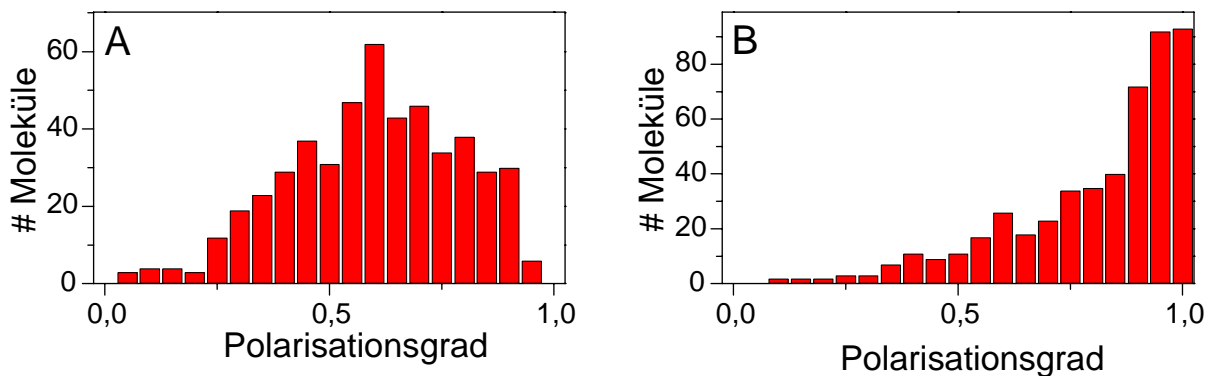


Abbildung 4.16 Monte-Carlo-Simulation des Polarisationsgrades der Fluoreszenz einzelner LH2-Komplexe bei Einführung einer diagonalen Unordnung von  $w = 600 \text{ cm}^{-1}$  (A) und  $w = 1200 \text{ cm}^{-1}$  (B).

Abbildung 4.16A zeigt ein Histogramm des Polarisationsgrades, das aus einer Monte-Carlo-Rechnung an 500 Molekülen stammt, wobei diagonale Unordnung von  $w = 600 \text{ cm}^{-1}$  einge-

führt und eine Temperatur von  $T = 200$  K angenommen wurde. Nur ein kleiner Prozentsatz von ca. 10% der Moleküle hat hier einen Polarisationsgrad  $p > 0.85$ . Dies steht im klaren Gegensatz zu den Messungen, wo bei der Mehrzahl der Moleküle eine solch hoher Polarisationsgrad festgestellt wurde. Erst bei deutlich höherer diagonaler Unordnung erhält man einen Anteil an Molekülen mit  $p > 0.85$ , wie er mit der Messung übereinstimmen würde. Abbildung 4.16B zeigt eine Verteilung, bei der eine Gaußverteilung der Breite  $w = 1200$   $\text{cm}^{-1}$  zu Grunde liegt. Eine solch hohe Inhomogenität der Energieeigenwerte der BChl-Moleküle wird in der Literatur jedoch nirgends beschrieben.

#### 4.7.2 Einführung einer elliptischen Verzerrung des gesamten Aggregats.

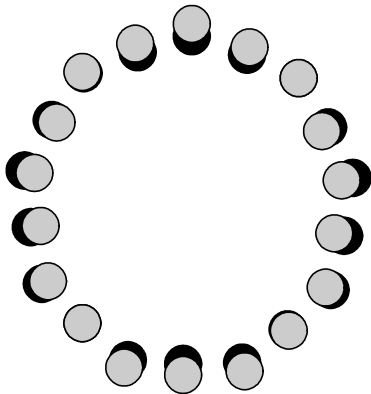
Eine andere Möglichkeit zur Erklärung des hohen Polarisationsgrads ist die Einführung einer Störung, die in erster Linie die Zustände  $k = \pm 1$  aufspaltet, alle anderen Zustände aber nur wenig beeinflusst. Die Zustände  $k = \pm 1$  haben die Symmetrie  $E_2$ , d.h. es muss eine Störung eingeführt werden, die diese Symmetrie bricht. Diese korrelierte Unordnung kann prinzipiell sowohl die Verteilung der Energien der BChl-Moleküle betreffen (diagonale Elemente des effektiven Hamiltonoperators) oder die Wechselwirkung zwischen den Molekülen (nicht-diagonale Elemente). Da eine strukturelle Verzerrung des Aggregats die Abstände zwischen den BChl-Molekülen verändert, werden die Wechselwirkungen der Moleküle stark beeinflusst (Dipol-Dipol-Wechselwirkung  $\propto 1/r^3$ ). Die Änderung der Site-Energien aufgrund der geänderten Proteinumgebung sind hingegen schwer abzuschätzen. Die diagonale Unordnung von mindestens  $125$   $\text{cm}^{-1}$  [44] zeigt, dass geringe Änderungen der Proteinumgebung verhältnismäßig großen Einfluss auf die energetische Lage der BChl-Moleküle haben.

Im Folgenden wird eine Verzerrung des Rings vom  $E_2$ -Typ eingeführt, und zwar in Form einer elliptischen Deformation des Aggregats. Hierbei wird nur die durch die strukturelle Änderung eingeführte, nicht-diagonale korrelierte Unordnung berücksichtigt und die mögliche diagonale korrelierte Unordnung vernachlässigt.

Ausgehend von den Strukturdaten deformiert man die Koordinaten zu einer Ellipse vorgegebener Exzentrizität  $\epsilon$ . Diese ist folgendermaßen definiert:

$$\varepsilon = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a} \quad (26)$$

wobei  $a$  und  $b$  ( $a > b$ ) die Halbachsen der Ellipse darstellen.



*Abbildung 4.17 Elliptische Deformation des LH2-Komplexes. Die schwarzen Scheiben repräsentieren die Positionen der BChl-Moleküle des ungestörten Komplexes, die grauen Scheiben die des elliptisch verformten Komplexes, wobei eine Exzentrizität von  $\varepsilon = 0.5$  benutzt wurde.*

Abbildung 4.17 zeigt die Positionen der Mg-Atome der BChl-Moleküle des ungestörten B850-Rings (schwarze Scheiben) und eines mit  $\varepsilon = 0.5$  elliptisch deformierten Rings (graue Scheiben).

Auch im Falle einer das gesamte Aggregat betreffenden Deformation, muss zusätzlich eine diagonale Unordnung angenommen werden, da ansonsten zwar die Energieniveaus verschoben werden, aber die Oszillatorstärke sich nur gering ändern würde. Die Verteilung des Polarisationsgrades der Komplexe ist allerdings nicht kritisch abhängig von diesem Wert. Es zeigte sich, dass mit Werten für die diagonale Unordnung zwischen  $200 \text{ cm}^{-1}$  und  $400 \text{ cm}^{-1}$  die gemessene Verteilung gleichermaßen gut angepasst werden kann. In der folgenden Simulation betrug die Breite der Gaußverteilung  $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ .

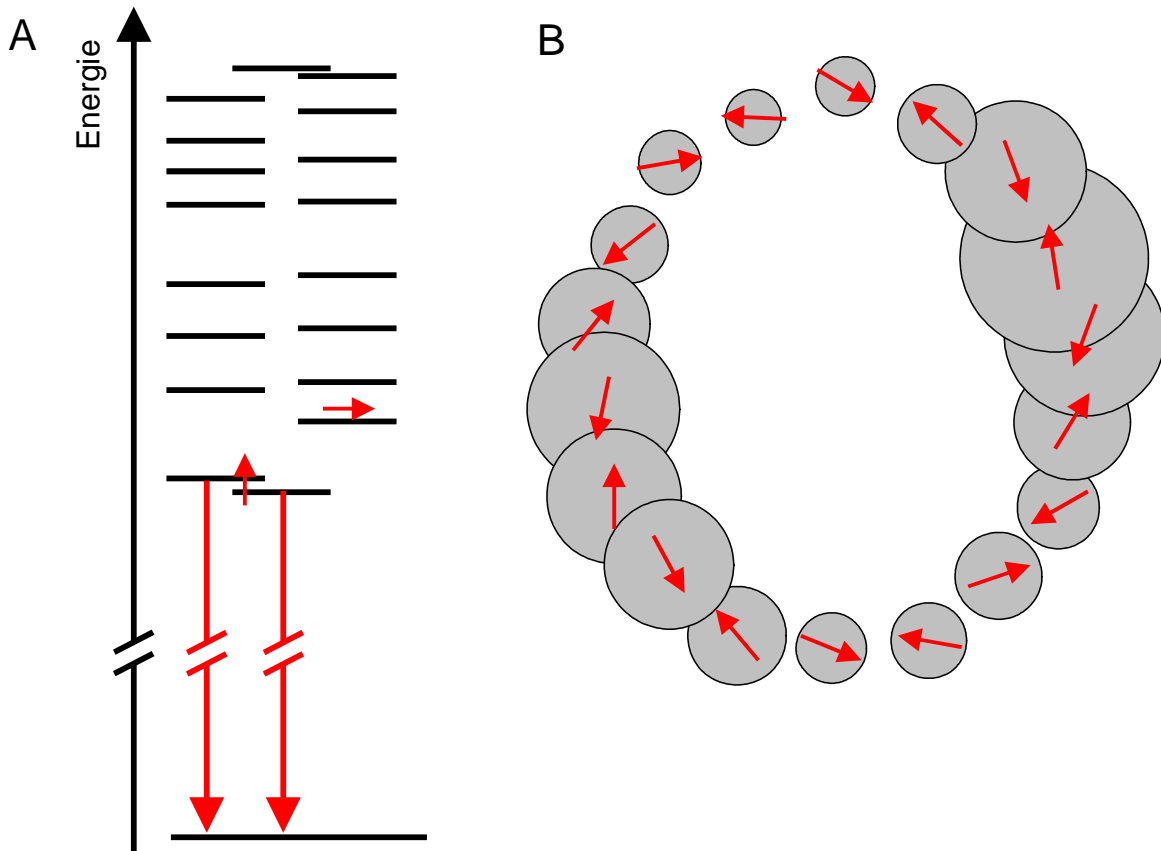


Abbildung 4.18 (A) Energieniveauschema des B850-Rings bei Einführung einer elliptischen Deformation des gesamten Rings der Exzentrizität  $\varepsilon = 0.5$  und einer diagonalen Unordnung von  $w = 200 \text{ cm}^{-1}$ . (B) Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons auf dem gestörten Ring bei  $T = 200 \text{ K}$ . Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit ist proportional zur Fläche der grauen Scheiben.

Die Einführung einer elliptischen Deformation bewirkt eine starke Aufspaltung der Niveaus  $k = \pm 1$ , während alle anderen entarteten Niveaus deutlich schwächer aufspalten (siehe Abbildung 4.18A). Eine Verlagerung der Oszillatorstärke findet insbesondere von Zustand  $k = -1$  zu Zustand  $k = 0$  hin statt. Das bedeutet, dass die Übergangsdipolmomente der beiden niedrigsten Zustände nahezu parallel ausgerichtet sind, während der Dipol des nächst höheren Zustands ( $k = 1$ ) senkrecht dazu liegt. Da die Fluoreszenz bei  $T = 200 \text{ K}$  hauptsächlich aus den beiden niedrigsten Zuständen emittiert, liegt ein hoher Polarisationsgrad von  $p = 0.79$  vor. Aus der Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons bei

$T = 200$  K (Abbildung 4.18B) wird ersichtlich, dass das Exziton nahezu über den gesamten Ring delokalisiert ist. Die Kohärenzlänge beträgt  $N_{tot} = 12.7$  und auch bei Heliumtemperatur ist das Exziton nicht vollständig lokalisiert sondern über  $N_{tot} = 5.2$  Einheiten delokalisiert.

### 4.7.3 Einführung einer quadratischen Deformation des Aggregates.

Arbeiten am LH1 Komplex des Bakteriums *Rhodospirillum rubrum* führten zu der Vermutung, dass der im Vergleich zum LH2-Komplex deutlich größere Antennenkomplex ( $N = 32$ ) quadratisch deformiert ist [114]. Aus diesem Grund wurde auch für den LH2-Komplex eine solche Deformation simuliert. Man erhält eine starke Aufspaltung der Zustände  $k = \pm 3$  und  $k = \pm 7$ , während die anderen entarteten Zustände, insbesondere aber die Zustände  $k = \pm 1$  kaum aufspalten. Die Emission eines derart gestörten Aggregats ist unpolarisiert, da die Oszillatorstärken der Zustände nur gering verändert werden. Mit einer quadratischen Deformation des Rings lässt sich der hohe Polarisationsgrad der Messungen also nicht erklären.

### 4.7.4 Zusammenfassende Bemerkungen

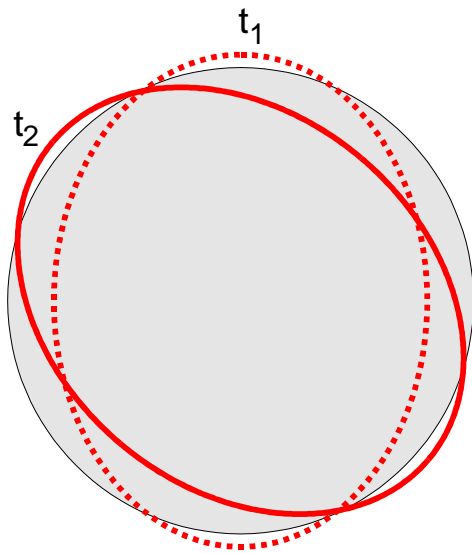
Von den hier vorgestellten Modellen zur Erklärung der elliptischen Polarisation, ist die elliptische Deformation am schlüssigsten. Gegen die starke diagonale Unordnung spricht in erster Linie, dass in der Literatur Werte für die diagonale Unordnung  $w > 1000 \text{ cm}^{-1}$  zur Erklärung gemessener spektroskopischer Daten nicht herangezogen werden mussten. Andererseits streuen die Werte für  $w$  in der Literatur so stark, dass man vermuten kann, dass die energetische Unordnung sehr stark von der Probenpräparation abhängt. Da diese hier deutlich abweicht von sämtlichen Präparationsmethoden der Ensemblespektroskopie, könnte dies der Grund für die ungewöhnlich hohe Unordnung sein.

Für die elliptische Deformation sprechen die Ergebnisse von van Oijen et al. [44]. Die Anregungsspektren einzelner LH2-Komplexe bei  $T = 1.2$  K werden mit elliptischer Deformation und geringer diagonaler Unordnung erklärt. Die dabei verwendeten Werte ( $\epsilon = 0.52$  und  $w = 125 \text{ cm}^{-1}$ ) sind den sich hier ergebenden Werten sehr nahe.

Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass in dieser Arbeit nicht berücksichtigte physikalische Sachverhalte eine wesentliche Rolle für das Polarisationsverhalten der Komplexe spielen. Polívka et al. [104] schlugen zur Deutung von zeitaufgelösten Messungen die Bildung eines Polarons auf dem B850-Ring vor. Eine sehr einfache Modellierung des Polarons (Absenkung einer Site-Energie und starke Verringerung der Kopplung zu den anderen Sites) führt ebenfalls zu elliptisch polarisierter Emission.

## 4.8 Diskussion des Polarisationsverhaltens bei Raumtemperatur

An dieser Stelle soll noch einmal abschließend auf die Messergebnisse bei Raumtemperatur eingegangen werden. Ein Großteil der Komplexe zeigt auf einer Zeitskala von einigen 10 ns Fluoreszenzemission mit hohem Polarisationsgrad ( $p = 0.3-0.5$ ). Wie ist dieses Verhalten im Lichte der Ergebnisse bei niedrigeren Temperaturen ( $T < 250$  K) zu beurteilen? Bei tieferen Temperaturen wurde als Erklärung des hohen Polarisationsgrads eine elliptische Deformation des gesamten Aggregats bevorzugt. Für die Ereignisse bei Raumtemperatur hieße dies, dass diese Deformation zeitlich nicht stabil ist, sondern sich vielmehr über den ringförmigen Komplex bewegt, und zwar in der Regel deutlich schneller als die üblich verwendete Mittelungszeit von  $\Delta t = 5$  ns pro Pixel, so dass die gemittelte Emission unpolarisiert erscheint. Abbildung 4.19 zeigt diesen Sachverhalt schematisch und – was die Exzentrizität angeht – stark übertrieben. Nur in sehr seltenen Fällen bleibt die Deformation für längere Zeiten ( $\sim 10$  ns) ortsfest, so dass elliptisch polarisiertes Licht beobachtet wird. Das Festhalten der Deformation würde dann höchstwahrscheinlich durch Phononen der Proteinumgebung bewirkt. Ein Absenken der Temperatur führt dann zum „Einfrieren“ der Deformation und so zu einer permanent elliptischen Emission.



*Abbildung 4.19 Schematische und stark übertriebene Darstellung der elliptischen Deformation bei Raumtemperatur. Während der Komplex als Ganzes auf dem Substrat immobilisiert ist, bewegt sich die Deformation über den Ring, in der Regel schneller als die Mittelungszeit von ca. 5 ms.*

Andererseits könnte der Ring bei Raumtemperatur auch nicht-deformiert sein und die beobachteten, hohen Polarisationsgrade auf der 10 ms-Zeitskala werden von Phononen verursacht, die bewirken, dass das Exziton auf einer relativ kleinen Untergruppe von BChl-Molekülen lokalisiert wird. Dies hieße, dass für  $\sim 10$  ms die Störung durch Phononen so groß ist, dass sich die Wellenfunktion des angeregten Zustands verhält, wie in Abschnitt 4.7.1 gezeigt wurde.

Bopp et al. [115] untersuchten die Fluoreszenzemission einzelner LH2-Komplexe in Abhängigkeit der Polarisationsrichtung des Anregungslichtes, die schnell zwischen zwei orthogonalen Richtungen hin und her geschaltet wurde. Die Ergebnisse werden mittels einer elliptischen Deformation erklärt, die nicht ortsfest ist sondern sich sprunghaft ändert. Dies ist vergleichbar mit der ersten, oben gegebenen Erklärung. Verglichen mit den Zeiten in dieser Arbeit sind die Zeitskalen in Ref. [115] teilweise deutlich länger, was aber an den nicht ganz vergleichbaren Messmethoden liegen kann.



## 4.9 Fluoreszenz-Emissionsspektren einzelner LH2-Komplexe

Da Unordnung wie gesehen eine entscheidende Rolle innerhalb der Photophysik des B850-Rings spielt, ist es von Interesse, ein quantitatives Maß der Übergangsenergien zwischen Grund- und angeregtem Zustand für verschiedene, individuelle Komplexe zu erlangen. Bei Temperaturen unterhalb von 200 K emittieren einzelne Komplexe vor ihrem irreversiblen Photobleichen hinreichend viele Photonen um Emissionsspektren mit hohem Signal-Untergrund-Verhältnis aufzunehmen.

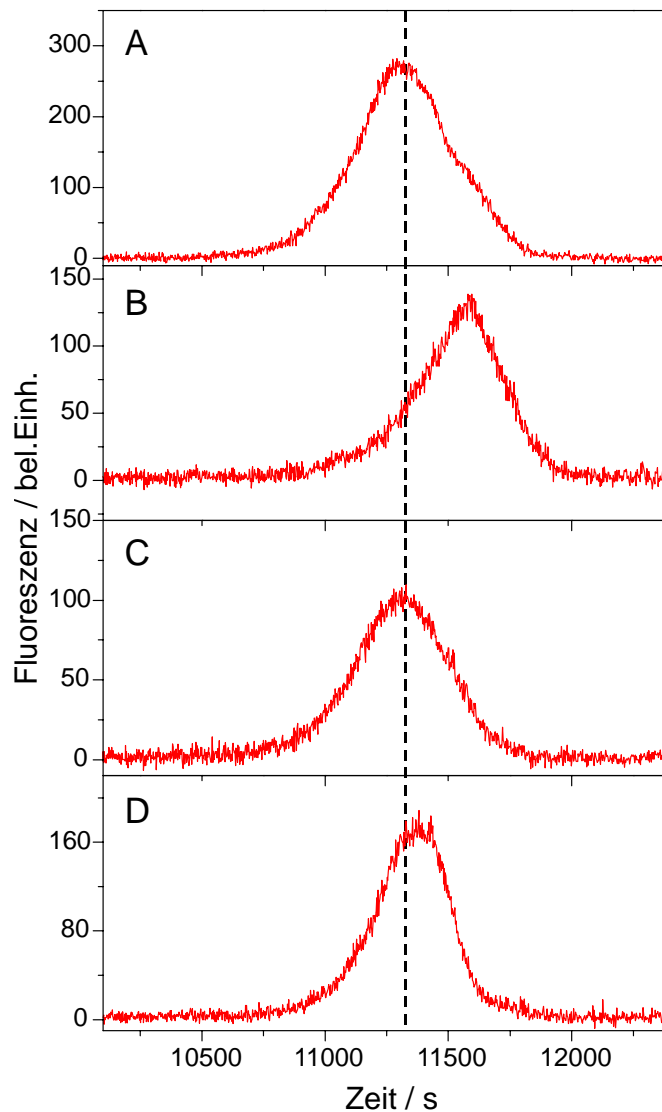


Abbildung 4.20 Fluoreszenzemissionsspektren verschiedener einzelner LH2-Komplexe.

Die Spektren wurden bei  $T = 200$  K aufgenommen bei einer Mittelungszeit von 180 s.

Typische Beispiele für Spektren, die bei  $T = 200$  K aufgenommen wurden, zeigt Abbildung 4.20. Die meisten Komplexe zeigen asymmetrische Spektren, deren spektraler Schwerpunkt im Mittel um  $11400 \text{ cm}^{-1}$  liegt, was nahe an dem Wert liegt, der für Ensemble-Messungen bei tiefen Temperaturen gefunden wurde [116]. Auffällig ist die relativ große Streuung des spektralen Schwerpunkts um den Mittelwert von  $11400 \text{ cm}^{-1}$ . Die Standardabweichung beträgt ca.  $250 \text{ cm}^{-1}$ . Eine solche Verteilung der spektralen Verteilung ist mit Hilfe von diagonaler Unordnung nicht zu erklären und deutet auf Unterschiede zwischen verschiedenen Komplexen hin, die die gesamte Struktur des Rings betreffen.

Wie erwartet nimmt die Breite der Emissionsspektren bei tieferen Temperaturen ab. Die schmalsten Linien, die bisher gefunden wurden, haben eine Breite um  $120 \text{ cm}^{-1}$ , wie in Abbildung 4.21A dargestellt. Andere Komplexe zeigen breitere, asymmetrische Linien (Abbildung 4.21B) der Fluoreszenzemission ohne aufgelöste Struktur. Die spektrale Position des Maximums der Spektren liegt bei  $T = 9.5$  K bei  $11340 \text{ cm}^{-1}$ .

Diese Resultate für Emissionsspektren bei tiefen Temperaturen sind durchaus unerwartet. Sowohl die Abwesenheit von schmalen Linien als auch die Blauverschiebung der Spektren ist nicht leicht zu erklären. Da bei tiefen Temperaturen nur noch der tiefste Zustand besetzt ist, wäre eine leichte Rotverschiebung zu erwarten. Eine mögliche Erklärung der Blauverschiebung ist eine Änderung der Umgebung der LH2-Komplexe. Durch das Abkühlen der Probe von  $200$  K auf  $10$  K ist es durchaus möglich, dass durch Änderungen des Pufferfilms, in dem sich die Komplexe befinden, eine Änderung der spektralen Eigenschaften der Komplexe induziert wird. Eine mögliche Erklärung für die Breite der Linien ist spektrale Diffusion: Während der Mittelungszeit von  $\Delta t = 300$  s diffundiert die in Wirklichkeit schmale Linie aufgrund von Proteindynamik, so dass das gemittelte Spektrum sehr breit erscheint. Typische Zeitkonstanten für die spektrale Diffusion müssten dann sehr schnell sein, da auch mit den kürzest möglichen Mittelungszeiten keine schmalere Spektren gefunden wurden. Aus zeitaufgelösten Lochbrennexperimenten [117;118] ist bekannt, dass in Pigment-Protein-Komplexen zwei Prozesse zur Linienverbreiterung beitragen: Schnelle lokale Fluktuationen, die eine reine Dephasierung bewirken, und langsame Fluktuationen aufgrund von Konformationsänderungen, die durch eine „cut-off“-Zeit  $\tau_{min}$  geprägt sind, unterhalb derer keine spektrale Diffusion mehr auftritt. Sowohl für das Reaktionszentrum als auch die Kernantenne von Photosystem II wurde  $\tau_{min}$  zu ca.  $1$  s bestimmt [117]. Aufgrund der hier verwendeten langen Mittelungszeiten

ist also nicht zu entscheiden, ob das Spektrum aufgrund von spektraler Diffusion verbreitert ist. (Siehe hierzu auch die aufgelöste spektrale Diffusion an Antennenkomplexen höherer Pflanzen in Abschnitt 5.7.2.)

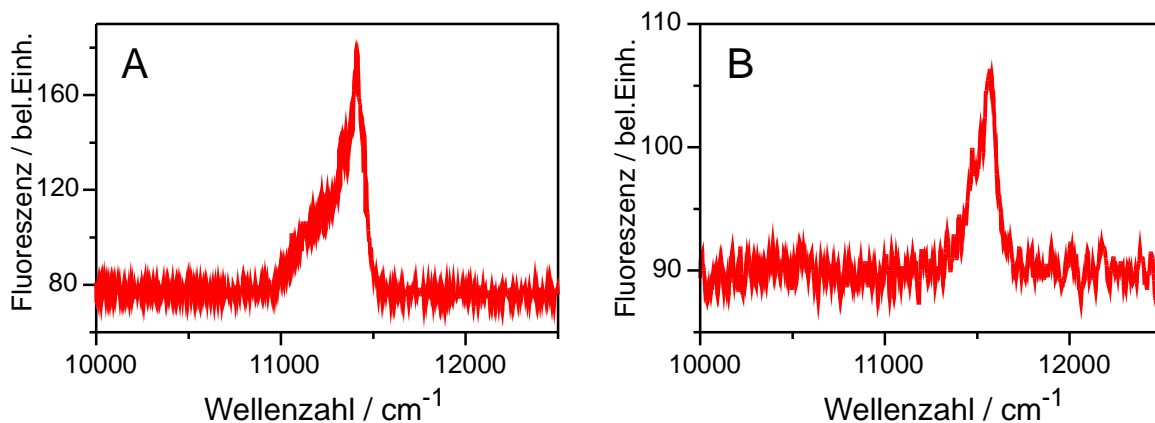


Abbildung 4.21 Fluoreszenzemissionsspektren von zwei verschiedenen LH2-Komplexen bei tiefen Temperaturen. Das Spektrum A bei  $T = 19 \text{ K}$  mit einer Mittelungszeit von 60 s aufgenommen, Spektrum B bei  $T = 9.5 \text{ K}$  in 300 s.

Intra- und Intermolekularer Anteil am Fluoreszenzspektrum wurden sowohl an Antennenkomplexen als auch an isolierten BChl-Molekülen untersucht. Aus spektralem Lochbrennen und hochaufgelösten Fluoreszenzspektren an Antennenkomplexen höherer Pflanzen (LHC-II) ist bekannt, dass die Elektron-Phonon-Kopplung in Pigment-Protein-Komplexen nur schwach ist. Trotzdem wurden für LHC-II Komplexe in *line-narrowing* Experimenten unterhalb  $T < 40 \text{ K}$  vibronische Nullphononenlinien gefunden. Im Falle der Spektren an einzelnen LH2-Komplexen wurde kein klarer Hinweis auf solche vibronischen Nullphononenlinien gefunden. Die Schwingungsmoden der BChl-Moleküle des B850-Rings wurden von Sturgis und Robert [119] mittels resonanter Ramanspektroskopie untersucht. Es zeigt sich, dass es nur eine geringe Dispersion der Frequenzen der Schwingungsmoden der BChl-Moleküle innerhalb des B850-Rings gibt. Es ist also wahrscheinlich, dass die in den Emissionsspektren gefundene Verteilung der Linienform und -position verschiedener, individueller Komplexe nicht durch Unterschiede der Schwingungsmoden verursacht werden. Vielmehr ist zu vermuten, dass Unterschiede der elektronischen Struktur des Aggregats für diese Unterschiede verantwortlich

sind. Im nächsten Abschnitt sollen deshalb die gemessenen Spektren mit berechneten Spektren verglichen werden, wie sie sich aus dem in Abschnitt 4.7 berechneten Energieniveauschema ergeben.

## 4.10 Berechnung der Emissionsspektren

Zur Berechnung der Fluoreszenzspektren wurde wie in Abschnitt 4.2 besprochen die elektronische Struktur des B850-Rings mittels eines effektiven Hamiltonoperators berechnet, wobei verschiedene Arten von Unordnung in den Hamiltonoperator eingefügt wurden. Man erhält die energetische Lage der einzelnen Zustände und nach Gleichung (20) deren neue Übergangsdipolmomente und damit die Oszillatorstärke der neuen Zustände. Es wurde angenommen, dass sich das System im thermischen Gleichgewicht befindet, so dass für die Besetzung der Zustände eine Boltzmannverteilung angenommen werden kann. Mit dieser Methode lassen sich sogenannte Strich-Spektren (*stick spectra*) berechnen:

$$I_{stick}(\omega) = \sum_k \delta(\omega - \omega_k) \frac{1}{Z} |\bar{\mu}_k|^2 \exp\left(\frac{E_k - E_0}{k_B T}\right) \quad (27)$$

wobei  $I_{stick}$  die Fluoreszenzintensität ist,  $\delta$  die Dirac-Funktion und  $Z$  die Wahrscheinlichkeit, das Elektron irgendwo zu finden, auf eins normiert. Um zu einem etwas realistischer wirkenden Spektrum zu kommen, wird das Strich-Spektrum mit einer Lorentzfunktion gefaltet:

$$I(\omega) = g(\omega) \otimes I_{stick}(\omega) \quad (28)$$

wobei  $g(\omega)$  die Lorentzfunktion ist

$$g(\omega) = \frac{2}{\pi} \frac{\gamma_{hom}}{4\omega^2 + \gamma_{hom}^2} \quad (29)$$

und  $\gamma_{hom}$  die homogene Linienbreite. Abbildung 4.22 zeigt beispielhaft den Zusammenhang zwischen Energieniveauschema und Fluoreszenzspektrum eines elliptisch deformierten Komplexes bei 200 K.

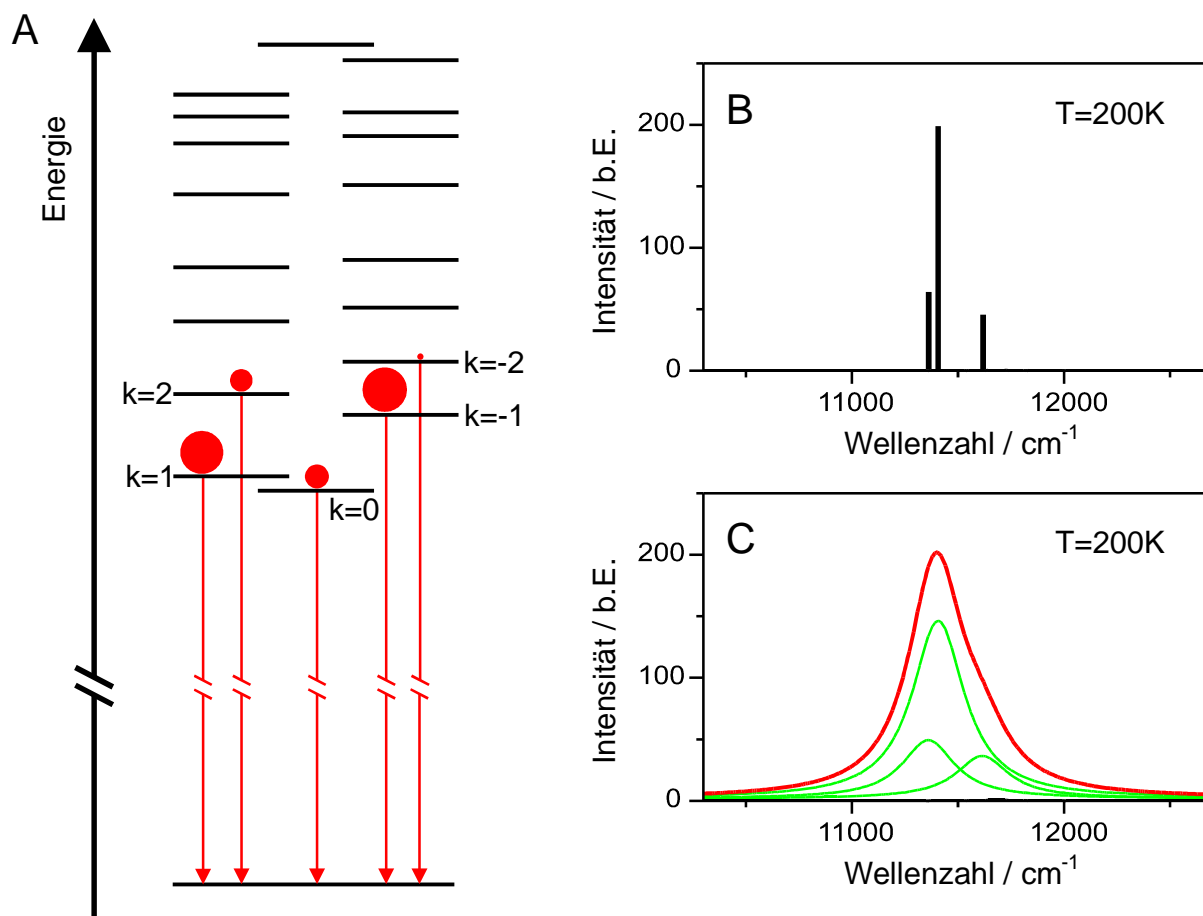


Abbildung 4.22 (A) Energieniveauschema des B850-Rings. Es wurde eine diagonale Unordnung von  $w = 400 \text{ cm}^{-1}$  und eine elliptische Deformation von  $\epsilon = 0.5$  verwendet. Die Flächen der Scheiben sind proportional zur Oszillatorstärke. Strich-Spektren (B), die sich aus diesem Energieschema bei  $T = 200 \text{ K}$  ergeben. Das vollständige Spektrum (C) ergibt sich durch eine Faltung des Strich-Spektrums mit Lorentzlinien, die an das Experiment angepasste Linienbreiten besitzen.

Das Energieniveauschema (Abbildung 4.22A) wurde für einen elliptisch deformierten Komplex ( $\varepsilon = 0.5$ ) mit einer diagonalen Unordnung von  $w = 400 \text{ cm}^{-1}$  berechnet. Die für elliptische Deformation typische Aufspaltung der Niveaus  $k = \pm 1$  ist deutlich zu erkennen. Die Übergangsdipolmomente dieser Zustände bleiben auch weiterhin näherungsweise orthogonal. Zusätzlich zu diesen Zuständen haben hier auch die Zustände  $k = 0$  und  $k = 2$  eine Oszillatorstärke größer als eins, wobei der Übergangsdipol von  $k = 0$  parallel zu  $k = 1$ , der von  $k = 2$  parallel zu  $k = -1$  orientiert ist. Dies ist ebenfalls typisch für elliptisch deformierte Komplexe. Die Oszillatorstärke der Zustände ist proportional zu den Flächen der Scheiben in Abbildung 4.22A. Berücksichtigt man nun die temperaturabhängige Besetzungsdichte, so lassen sich Strich-Spektren berechnen wie in (B) gezeigt. Der Balken gibt die spektrale Position der emittierenden Zustände an, seine Höhe die Fluoreszenzintensität. Bei  $T = 200 \text{ K}$  ist die Besetzung des Zustands  $k = 2$  schon so gering, dass dieser Zustand trotz relativ großer Oszillatorstärke kaum emittiert. Faltung dieses Strich-Spektrums mit einer Lorentzfunktion, deren Linienbreite an das Experiment angepasst wurde, ergibt dann das komplette Spektrum (Abbildung 4.22C).

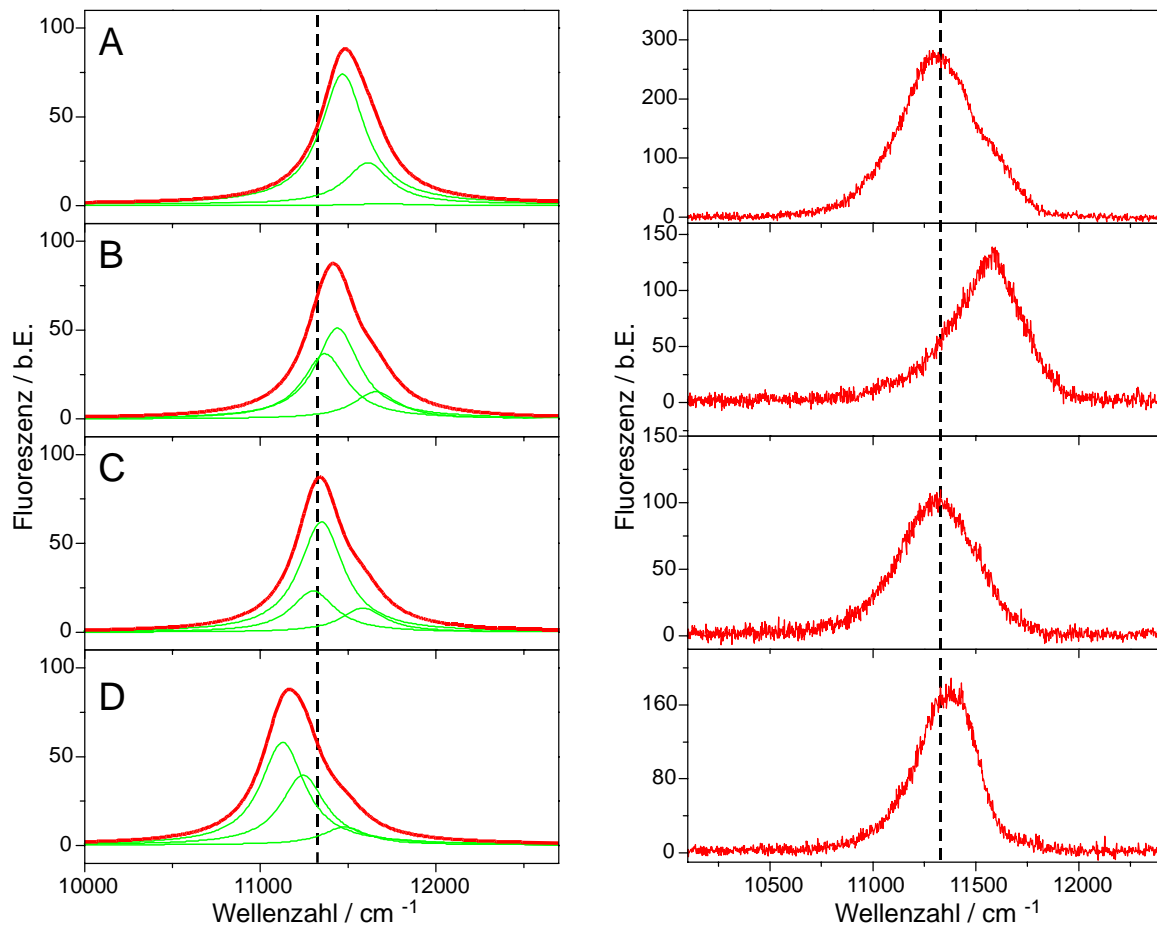


Abbildung 4.23 Vergleich von berechneten (A–D) und gemessenen (E–H) Spektren einzelner LH2-Komplexe bei  $T = 200$  K.

Abbildung 4.23 (A–D) zeigt vier typische Spektren, die auf diese Weise berechnet wurden, und zwar bei  $T = 200$  K einer diagonalen Unordnung von  $w = 400$   $\text{cm}^{-1}$  und einer Exzentrizität von  $\varepsilon = 0.5$ . Zum direkten Vergleich sind noch einmal die gemessenen Spektren (E–H) aus Abbildung 4.20 gegenübergestellt. Die Form der Spektren hängt in erster Linie von der Oszillatorstärke der drei energetisch niedrigsten Zustände ab und weniger von der absoluten Lage der Energieniveaus. Die Maxima der Spektren hingegen hängen sowohl von Oszillatorstärke der Zustände, aber auch der absoluten Lage des  $k = 0$  Niveaus ab. So haben die Spektren (A) und (D) beide einen  $k = 0$  Zustand mit relativ hoher Oszillatorstärke, ihre Maxima liegen aber um ungefähr  $330$   $\text{cm}^{-1}$  verschoben.

Die gemessenen Spektren zeigen eine Verteilung der Maxima um den Mittelwert mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{obs} = 120 \text{ cm}^{-1}$ . Berechnet man diese Standardabweichung der Verteilung für die simulierten Spektren so ergibt sich für die drei unterschiedlichen Fälle:

- $w = 200 \text{ cm}^{-1}$  und  $\varepsilon = 0.5 \rightarrow \sigma_{sim} = 40 \text{ cm}^{-1}$ .
- $w = 400 \text{ cm}^{-1}$  und  $\varepsilon = 0.5 \rightarrow \sigma_{sim} = 90 \text{ cm}^{-1}$ .
- $w = 1200 \text{ cm}^{-1}$  und  $\varepsilon = 0 \rightarrow \sigma_{sim} = 270 \text{ cm}^{-1}$ .

Um den gemessenen Wert  $\sigma_{obs}$  genau zu erreichen, wären Werte von  $w = 500 \text{ cm}^{-1}$  und  $\varepsilon = 0.5$ , bzw.  $w = 650 \text{ cm}^{-1}$  und  $\varepsilon = 0$  notwendig. Die Verteilung der Maxima der Spektren hängt also in erster Linie von der diagonalen Unordnung und nur zweitrangig von der Exzentrizität ab. Von obigen drei Fällen, die konsistent mit der Verteilung des Polarisationsgrads der Komplexe sind, passt der zweite Fall ( $w = 400 \text{ cm}^{-1}$  und  $\varepsilon = 0.5$ ) am besten zur Verteilung der Maxima der Spektren, während die große diagonale Unordnung ohne elliptische Verzerrung sowie die sehr kleine diagonale Unordnung mit elliptischer Verzerrung sehr weit vom gemessenen Wert  $\sigma_{obs} = 120 \text{ cm}^{-1}$  abweichen.

## 4.11 Fazit

In diesem Kapitel wurden einzelne LH2-Komplexe von Purpurbakterien mittels Polarisations- und Emissionsspektroskopie untersucht. Es wurden zwei Modelle aufgestellt, die zur Erklärung der Messergebnisse herangezogen wurden:

1. Im B850-Ring herrscht eine große Variation der Site-Energien von  $w = 1200 \text{ cm}^{-1}$  vor, so dass das Exziton auf dem Ring lokalisiert. Dieses Modell erklärt den gemessenen Polarisationsgrad der Fluoreszenz, sagt aber eine größere Variation der Maxima der Fluoreszenzspektren voraus, als tatsächlich gefunden wurde. Der Wert für die hier gefundene diagonale



Unordnung ist zudem deutlich größer, als die üblicherweise in der Literatur verwendeten Werte<sup>5</sup>, die von  $200\text{ cm}^{-1}$  [101] bis zu  $700\text{ cm}^{-1}$  [104] reichen.

2. Die Variation der Site-Energien innerhalb des B850-Rings ist mit  $w = 400\text{ cm}^{-1}$  nur mäßig stark und zusätzlich ist das gesamte Aggregat elliptisch deformiert (Exzentrizität  $\varepsilon = 0.5$ ). Dieses Modell erklärt ebenfalls den hohen Polarisationsgrad, liegt aber, was die Verteilung der Maxima der Fluoreszenzspektren angeht, deutlich näher beim gemessenen Wert, als das erste Modell. Auch der Wert für die diagonale Unordnung ist vergleichbar mit verschiedenen Ensemble-Messungen (z.B.  $450\text{ cm}^{-1}$  [102]).

Aus obigen Aussagen ergibt sich ein Gesamtbild, das für das zweite Modell spricht. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse anderer Arbeiten an einzelnen LH2-Komplexen. Sowohl bei tiefen Temperaturen [44] als auch bei Raumtemperatur [115] wird eine elliptische Deformation des gesamten Rings festgestellt, wobei im ersten Fall eine Exzentrizität von  $\varepsilon = 0.52$  bestimmt wird, die der hier gemessenen Exzentrizität fast genau entspricht.

Hier soll noch kurz auf zwei neuere Arbeiten eingegangen werden, die sich mit der Delokalisierung des Exzitons als Funktion der Zeit [120], bzw. mit der Bildung eines Polarons in LH2 bei tiefen Temperaturen beschäftigen [104].

Erstere kommt zum Ergebnis, dass das Exziton unmittelbar nach der Anregung über den ganzen Ring delokalisiert ist und dann auf einer kleinen Untergruppe von BChl-Molekülen lokalisiert wird (*self-trapping*), d.h. die Absorption geschieht in den gesamten Ring, die Emission nur von wenigen BChl-Molekülen. Dazu passend wird in der zweiten Arbeit die Bildung eines Polarons (ein elektronischer Zustand begleitet von einer dauerhaften Gitterdeformation) postuliert. Dieses Polaron ist dann auf einem einzigen BChl-Molekül lokalisiert. Das in Ref. [104] verwendete Modell ist extrem einfach: Die Site-Energie eines BChl-Moleküls wird stark abgesenkt und die Wechselwirkung zu den Nachbarmolekülen verringert, was zu einem Polarisationsgrad von  $p \approx 1$  führt. Auch die nach dieser Methode berechneten Spektren stimmen mit den hier gemessenen Spektren in Linienform und Verteilung der Maxima nicht überein. Passt man das einfache Polaronmodell an die Messwerte dieser Arbeit an, so muss die Abschirmung des Polarons um mindestens einen Faktor zwei gegenüber den Werten aus Ref.

---

<sup>5</sup> Der Wert  $125\text{ cm}^{-1}$  aus Ref. [44] wurde nach genaueren Analysen auf  $250\text{ cm}^{-1}$  korrigiert [152].

[104] zurückgenommen werden. Generell ist „Polaron“ ein sehr abstrakter Begriff, der keine genauen Angaben über die Art der Gitterdeformation, bzw. hier der Ringdeformation macht, so dass die hier benutzte elliptische Verzerrung vielleicht gar nicht weit entfernt ist von der Verzerrung die in Ref. [104] als Polaron beschrieben wird. Um dies zu klären muss einerseits das Polaronmodell deutlich verbessert werden und zum anderen eine genauere Bestimmung des Polarisationsgrads einzelner LH2-Komplexe als Funktion der Temperatur bestimmt werden.

## Kapitel 5

# Einzelne Antennenkomplexe höherer Pflanzen

### 5.1 Einführung

In höheren Pflanzen und eukariontischen Algen befindet sich der Photosyntheseapparat innerhalb der Chloroplasten, die Bestandteil der Zellen sind. Chloroplasten besitzen zwei geschlossene Membranen, die das Innere der Chloroplasten (*Stroma*) vom Zellinneren (*Cytoplasma*) trennen. Innerhalb des Stroma existiert nun eine dritte Membranstruktur, die aus zusammenhängenden, kleinen Beuteln besteht, den Thylakoiden. In den meisten Pflanzen und Algen sind die Thylakoide in Stapeln (*Grana*) angeordnet, die durch eine Lamellenstruktur (*Stromal Lamella*) verbunden sind (siehe Abbildung 5.1). Es wird vermutet, dass die durch die Stromal Lamella verbundenen Grana eine einzige kompliziert gefaltete Membran bilden [121].

Die gesamte Photosyntheseinheit befindet sich in der Thylakoidmembran. Im Gegensatz zu photosynthetischen Bakterien besitzen Pflanzen zwei Photosysteme PS-I und PS-II, die von verschiedenen Antennenkomplexen (LHC-I und LHC-II) umgeben sind.

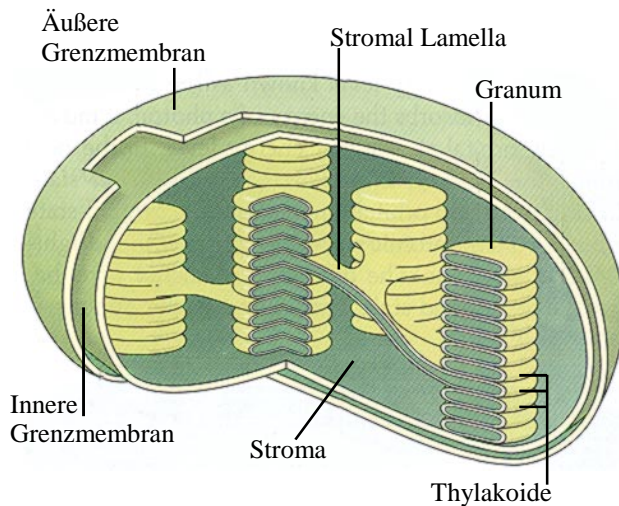


Abbildung 5.1 Membranen eines Chloroplasten. Sämtliche Pigment-Protein-Komplexe der Photosyntheseeinheit befinden sich in der Thylakoidmembran, die sich zu einer komplexen Form aus Stroma Lamella und Grana faltet [121].

Die beiden Photosysteme bilden ein funktionelles Tandem: Nach Anregung des Chlorophyll P680 in PS-II findet ein Ladungstransfer statt und das Elektron wird über eine ganze Kette von Elektronenüberträgern zum PS-I transferiert. Das verbleibende PS-II hat ein so hohes Oxidationspotenzial, dass Wasser gespalten werden kann. Das nach Anregung und Ladungstransfer erhaltene Elektron aus PS-I wird zur Reduktion von  $\text{NADP}^+$  benutzt. Der Pfad der Elektronen durch die Photosysteme, das sogenannte Z-Schema, ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Durch die Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu NADPH, sowie die Spaltung von Wasser an PS-II entsteht ein Protonengradient, der als Antrieb der ATPase dient. Eine zusammenfassende Darstellung der Funktionsweise des Photosyntheseapparats findet sich z.B. in Ref. [121] und [122].

Der PS-II Komplex besteht aus ungefähr 25 verschiedenen Proteinen [123]. Neben den beiden Proteinen des Reaktionszentrums, die das spezielle Chl *a* (P680) enthalten, existieren diverse geringere Antennenkomplexe (*minor light harvesting complexes*), die ein internes Antennensystem bilden (PS-II-Kernkomplex). Weiter außen liegen Chl *a/b* bindende Antennenkomplexe, wobei neben zwei LHC-II-Trimeren noch vier weitere Komplexe vorliegen, die ähnlich

aufgebaut sind, aber nur als Monomere vorkommen [123]. Die LHC-II befinden sich am äußersten Rand des PS-II Komplexes und sind sehr einfach von diesem zu trennen.

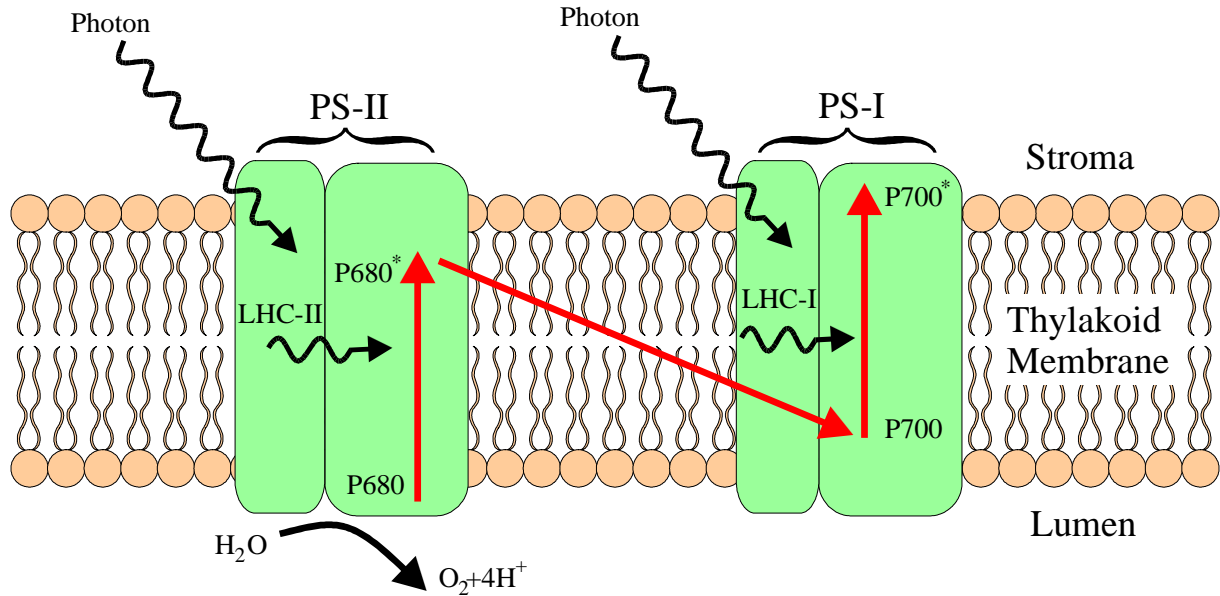
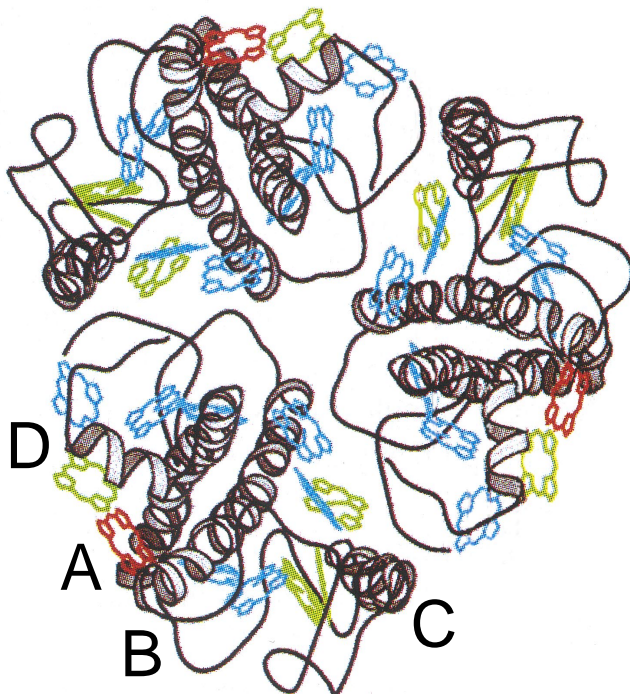


Abbildung 5.2 Organisation der Photosysteme in der photosynthetischen Membran. Die roten Pfeile stellen das Z-Schema des Elektronenflusses dar: Der erste Pfeil entspricht dem Elektronenfluss ausgehend von der Spaltung eines Wassermoleküls durch das Photosystem II, die Diagonale wird durch den Elektronenfluss über eine Serie von Elektronenüberträgern gebildet, die PS-II mit PS-I verbinden. Das Elektron gelangt durch PS-I über weitere Zwischenschritte zu  $\text{NADP}^+$ .

Der größte Teil der LHC-II ist jedoch nicht direkt mit dem PS-II verbunden, liegt aber in unmittelbarer räumlicher Nähe, so dass ein schneller Energietransfer möglich ist. Auch diese LHC-II-Komplexe liegen als Trimere vor, wobei teilweise Aggregate von sieben LHC-II-Trimern gebildet werden, die andere optische Eigenschaften haben als nicht-aggregierte Trimere [124].

## 5.2 Struktur des LHC-II-Komplexes

Die Struktur von LHC-II wurde von Kühlbrandt et al. [125] mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie an zweidimensionalen Kristallen von LHC-II Trimeren bestimmt, wobei eine Auflösung von 3.4 Å erreicht wurde. Damit konnte die Lage von 80% der Aminosäurereste, 12 Chl-Molekülen und zwei Car-Molekülen (Luteinen) bestimmt werden. Abbildung 5.3 zeigt die trimerische Struktur mit Blickrichtung auf die Membranoberfläche.



*Abbildung 5.3 LHC-II Trimer bei Blickrichtung auf die Membran (Lumen). Pro monomerische Untereinheit existieren eine Proteinkette die drei membranspannende  $\alpha$ -Helices enthält, fünf Chl b-Moleküle (grün) und sieben Chl a-Moleküle (blau) [ein Chl b ist blau gezeichnet, siehe Text]. Das niederenergetischste Chl a-Molekül ist rot dargestellt. Nicht eingezeichnet sind zwei Lutein-Moleküle [126].*

Pro monomerischer Untereinheit existiert ein Protein, das drei transmembrane  $\alpha$ -Helices (A–C) enthält, sowie eine kurze  $\alpha$ -Helix (D) parallel zur Membran. Die restlichen Aminosäuren liegen auf Höhe der Oberfläche der Membran. Die Luteine, die in Abbildung 5.3 nicht eingezeichnet sind, befinden sich im Zentrum des Komplexes zu jeder Seite der  $\alpha$ -Helices (A) und (B) und verlaufen wie diese von der inneren Membran (Lumen) zur äußeren (Stroma). Aufgrund ihrer zentralen Position sind die Luteine essentiell für den Komplex. So ist eine Rekonstitution von LHC-II ohne Lutein-Moleküle nicht möglich [127]. Generell besitzen Car-Moleküle in Antennenkomplexen die Aufgaben den spektralen Bereich der Absorption zu erweitern und die Chl-Moleküle vor Photooxidation zu schützen. Letzterer Punkt ist bei LHC-

II wichtiger, da die Absorption der Car- verglichen mit den Chl-Molekülen verhältnismäßig gering ist. Der Schutzmechanismus ist hier identisch zu dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Mechanismus der bakteriellen Antennen und ist um so wichtiger, als der LHC-II-Komplex in unmittelbarer Nähe zum wasserspaltenden Photosystem-II-Reaktionszentrum liegt.

Die Auflösung von 3.4 Å ist nicht ausreichend um zwischen Chl *a*- und Chl *b*-Molekülen unterscheiden zu können oder die Orientierung der Moleküle innerhalb ihrer Ebene zu bestimmen. Die Zuordnung der Chl-Moleküle erfolgte deshalb nur phänomenologisch [125]. Aufgrund des subpikosekunden Energietransfers von Chl *b* zu Chl *a* [128-130] ist ein Übergang in den Triplettzustand für Chl *b*-Moleküle viel unwahrscheinlicher als für Chl *a*-Moleküle. Deshalb wurden die fünf Moleküle, die nicht in *van der Waals*-Kontakt mit den Lutein-Molekülen stehen als Chl *b* gewählt. Um den Triplettzustand eines Chl-Moleküls zu quenchen ist ein Austauschprozess notwendig, d.h. die Orbitale der Zustände müssen überlappen. Aus diesem Grund wurden die sieben Chl Moleküle in *van der Waals*-Kontakt als Chl *a* gewählt. Diese Zuordnung ist in der Literatur nicht unumstritten. So wird der Austausch eines Chl *a*/Chl *b* Paars [131] bzw. zweier solcher Paare [130] diskutiert<sup>6</sup>. Aufgrund von LHC-II-Mutanten, denen jeweils ein Chl-Molekül entfernt wurde, konnte das Chl-Molekül ermittelt werden, das in erster Linie für die Emission verantwortlich ist [126]. Hierbei handelt es sich um das in Abbildung 5.3 rot eingezeichnete Molekül, das zuvor fälschlicherweise als Chl *b* zugeordnet wurde. Aus diesem Grund sind in Abbildung 5.3 acht Chl *a* (blau) und vier Chl *b* (grün) eingezeichnet.

Wie schon erwähnt liegen die LHC-II in der Membran als Trimere vor. Diese lassen sich durch den Einsatz geeigneter Detergenzien auch in sehr reiner Form isolieren, da der Zusammenhalt der monomeren Untereinheiten durch Lipide bewirkt wird, die schwerer zu lösen sind als die Membranlipide. Sehr reine Monomere lassen sich durch enzymatische Auflösung dieser Lipide erzielen (siehe nächster Abschnitt).

---

<sup>6</sup> Diese Änderungsvorschläge werden aufgrund von fs-Spektroskopie in Verbindung mit relativ aufwendigen Rechnungen getroffen. Die Ergebnisse sind umstritten, da aus den Strukturdaten mehr Informationen über die Lage der Übergangsdipole der Chl-Moleküle gezogen wurden als in Wirklichkeit vorhanden sind [153].

### 5.3 Probenpräparation

Trimerische LHC-II-Komplexe können mit Hilfe von Detergenzien aus der Thylakoidmembran herausgelöst werden. Die hier verwendeten Komplexe stammen von Blättern der Erbsenpflanze *Pisum sativum* L. und wurden nach der Methode von Krupa et al. [132] isoliert und in Pufferlösung (10mM Tricine, pH 7.8) bei  $T = 77$  K gelagert.

An der Bildung von Trimeren ist das Lipid Phosphatidylglycerol maßgeblich beteiligt, das von dem milden Detergenz (siehe unten), welches die Thylakoidmembran löst, nicht beeinflusst wird [133]. Um zu monomeren LHC-II zu gelangen, können diese Lipide mittels 0.1 Einheiten/ml Phospholipase A<sub>2</sub>, das aus Bienengift gewonnen wird (Sigma, #P-6534), gelöst werden. Bei Raumtemperatur werden die Trimere in Lösung für zwei Stunden der Phospholipase ausgesetzt. Zentrifugation über einen Saccharosegradienten (20 h, 40000 U/min) trennt die Monomere von verbleibenden Trimeren und leichteren Komponenten der Lösung, wie ausgelösten Pigmenten. Auch die Monomere werden in Pufferlösung bei  $T = 77$  K gelagert.

Zur Probenpräparation wird die Ausgangslösung mit Puffer verdünnt, der 1% Detergenz (n-octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, Sigma) enthält. Ein Tropfen (~100  $\mu$ l) dieser Lösung wird mit 1 ml einer einprozentigen PVA-Lösung vermischt. Durch sofortiges Aufschleudern (*Spin-coating*) auf ein sauberes Deckglas erhält man einen dünnen (< 1  $\mu$ m) PVA-Film, in dem die LHC-II-Komplexe räumlich so weit getrennt sind, dass sich jeweils nur ein Komplex im Fokus des Mikroskops befindet.

Trotz der Car-Moleküle innerhalb der Komplexe sind diese bei Raumtemperatur extrem empfindlich gegenüber Photooxidation. Es zeigte sich, dass in den meisten Fällen lediglich eine Beobachtungszeit von wenigen Sekunden zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurden die Proben für Messungen bei Raumtemperatur unter Inertgas hergestellt und mit Sauerstoff bindenden Substanzen versehen. Hierzu dient zum einen das Enzym Glukoseoxidase (Sigma) und das Substrat Glukose (Sigma). Zum anderen muss zusätzlich das Enzym Katalase (Sigma) zugegeben werden, um das bei der Oxidation von Glukose entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu entfernen. Diese Substanzen führen nur zu einer sehr geringen Zunahme des Fluoreszenzuntergrunds, bewirken aber eine Lebenszeitverlängerung um einen Faktor zehn.



## 5.4 Polarisationsmessungen

### 5.4.1 Experimentelle Realisation

Zur Bestimmung des Polarisationsgrades wurde wie folgt vorgegangen: Vor die Projektionslinse im Parallelstrahl wurde ein Polarisator (Glan-Thompson-Prisma) in eine motorisierte Halterung eingebaut, die mit einer festen Frequenz ( $\nu = 0.5 - 2$  Hz, je nach Intensität der Fluoreszenz) rotiert. Trägt man nun die Fluoreszenz als Funktion der Zeit auf, erhält man ein moduliertes Signal (siehe Abbildung 5.4A). Als Polarisationsgrad einer Einzelmolekülmessung definiert man:

$$p = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max}}, \quad (30)$$

wobei  $I_{\max}$  und  $I_{\min}$  die maximale und minimale Intensität der Modulation sind. Für einen einzelnen emittierenden Dipol erhält man als Signal  $I(t) = I_{\max} \cos^2 \omega t$  ( $\omega$  Kreisfrequenz des Polarisators), also  $I_{\min} = 0$  und somit einen Polarisationsgrad von  $p = 1$ . Für unpolarisiertes Licht erhält man keine Modulation, d.h.  $I_{\max} = I_{\min}$  und somit  $p = 0$ . Setzt sich die Fluoreszenz aus mehreren emittierenden Dipolen zusammen, was im Falle der LHC-II-Komplexe sehr wahrscheinlich ist, so hat das aufgenommene Signal die allgemeine Form:

$$I(t) = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) \cos^2 \omega t \quad (31)$$

Zwei Gründe erschweren nun eine Anpassung der gemessenen Funktion an Gleichung (31). Zum ersten das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis und zum anderen die Gleichlaufschwankungen des verwendeten Motors, der den Polarisator dreht. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung des Polarisationsgrads folgende Prozedur verwendet, die den zusätzlichen Vorzug hat, dass sie sich einfach automatisieren lässt: Von der gemessenen Funktion  $I(t)$  wird deren Mittelwert  $I_{\text{mean}}$  abgezogen und der Betrag gebildet. Das Maximum dieser neuen Funktion

stellt die halbe Modulationstiefe  $I_{mod}$  der Ausgangsfunktion dar. Hat  $I(t)$  die Form von Gleichung (31), so stehen Maximum und Mittelwert der Funktion  $|I(t) - I_{mean}|$  im Verhältnis  $\pi/2$ .

Damit ergibt sich für die Modulationstiefe:

$$\frac{I_{mod}}{2} = \frac{\pi}{2} \frac{\sum_n |I_n - I_{mean}|}{n_{end} - n_{begin}} \quad (32)$$

Hierbei ist  $I(t)$  in Kanäle ( $n$ ) digitalisiert und die Messung beginnt bei  $n_{begin}$  und endet bei  $n_{end}$ . Die Summe läuft über die gemessenen Kanäle. Mit Hilfe der Modulationstiefe berechnet sich der Polarisationsgrad zu

$$p = \frac{I_{mod}}{\frac{I_{mod}}{2} + I_{mean}} \quad (33)$$

Um eine möglichst gute Untergrundkorrektur zu erlangen, wurde der Untergrund in unmittelbarer Umgebung der Komplexe gemessen. Bei Raumtemperatur erhält man den Untergrund automatisch, nachdem der Komplex endgültig photobleicht, bei tiefen Temperaturen wird nach der eigentlichen Messung der Komplex lateral aus dem Fokus gefahren. Gleichungen (32) und (33) beziehen sich auf untergrundkorrigierte Traces.

### 5.4.2 Trimere bei tiefen Temperaturen

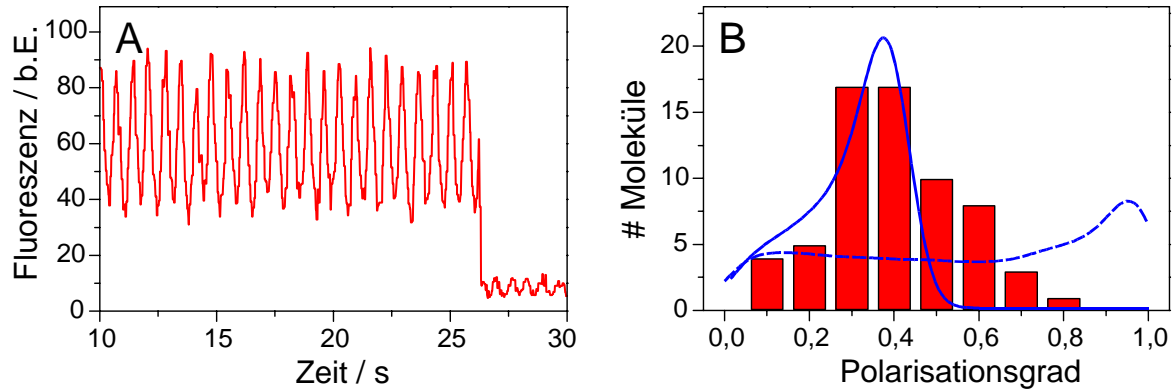


Abbildung 5.4 (A) Fluoreszenz eines einzelnen LHC-II Trimers als Funktion der Zeit bei  $T = 1.8\text{ K}$ , wobei ein rotierender Polarisator vor dem Detektor installiert wurde. (B) Verteilung des Polarisationsgrades von ca. 70 Trimeren bei  $T = 1.8\text{ K}$ . Die blauen Linien geben den Polarisationsgrad von Monte-Carlo-Simulationen an unter der Voraussetzung, dass die emittierenden Dipole um  $0^\circ$  (gestrichelt) bzw.  $43^\circ$  (durchgezogen) aus der Symmetrieebene herausgedreht sind (siehe Text).

Es gibt zwei Gründe mit den Polarisationsuntersuchungen bei tiefen Temperaturen zu beginnen: Erstens wird generell die Detektion einzelner Moleküle bei Raumtemperatur durch rasches Photobleichen und starke Intensitätsfluktuationen erschwert und zweitens gibt es bei Heliumtemperatur keine thermische Besetzung energetisch höherliegender Niveaus. Im LHC-II-Komplex liegen die niedrigsten Energieniveaus der monomerischen Untereinheit so dicht zusammen, dass sie bei Raumtemperatur teilweise besetzt wären, während bei Heliumtemperatur nur der niedrigste Zustand besetzt ist und damit die gesamte Emission aus diesem Zustand stammt. Eine Frage, die sich nun stellt ist, wie viele emittierende Zustände es pro Trimer gibt. Allgemein wird angenommen, dass die Kopplung zwischen den monomerischen Untereinheiten nur sehr gering ( $\sim 5\text{ cm}^{-1}$ ) ist [134]. Trotzdem ist nicht geklärt, ob es bei tiefen Temperaturen drei emittierende Zustände gibt, also quasi keine Kopplung zwischen den Monomeren und damit kein Energietransfer, oder ob es nur einen emittierenden Zustand gibt, also geringe Kopplung zwischen Monomeren, aber ausreichend um einen Energietransfer zu bewirken.

Abbildung 5.4A zeigt die mit einem Polarisator modulierte Fluoreszenz eines LHC-II Trimers bei  $T = 1.8\text{ K}$ . Aus der maximalen und minimalen Intensität der Modulation lässt sich der Polarisationsgrad nach der in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Methode zu  $p = 0.5$  bestimmen. Das Abbrechen des Signals bei  $t \approx 26\text{ s}$  ist kein Photobleichen. Vielmehr wurde der Komplex aus dem Fokus herausgefahren, um den Untergrund in unmittelbarer Nähe zum Komplex zu messen und so eine optimale Untergrundkorrektur vornehmen zu können. Der Polarisationsgrad wurde auf diese Weise für ca. 70 Trimere bestimmt und das Ergebnis in einem Histogramm (Abbildung 5.3B) zusammengefasst. Die meisten trimerischen LHC-II zeigen also einen Polarisationsgrad im Bereich  $p = 0.3 - 0.5$ . Hieraus folgt sofort, dass es sich nicht um einen emittierenden Zustand handeln kann, da ansonsten das häufigste Ereignis im Histogramm um  $p \approx 1$  auftreten müsste. Nach den oben gemachten Überlegungen sollten also drei emittierende Zustände pro Trimer (einer pro monomerischer Untereinheit) vorliegen.

Die auf den ersten Blick etwas überraschende Form der Verteilung mit einem Maximum um 0.4 lässt sich auf der Grundlage von drei Emittlern erklären: Wie in der Einführung erwähnt ist die Auflösung der Struktur nicht ausreichend, um die Orientierung der Dipole der Chl-Moleküle zu bestimmen [125]. Es wurden nun Monte-Carlo-Simulationen unter folgenden Voraussetzungen durchgeführt: Die Trimere sind isotrop in der PVA-Matrix verteilt; alle emittierenden Dipole sind um den gleichen Winkel  $\theta$  aus der Symmetrieebene (Membranebene) herausgedreht und emittieren gleich stark. Die Annahme, dass die Übergangsdipolmomente in der Symmetrieebene liegen, führt zu einer breiten Verteilung, die alle  $p$ -Werte zwischen 0 und 1 einschließt (Abbildung 5.4B, gestrichelte Linie) und keinerlei Ähnlichkeit mit der Verteilung der gemessenen Werte hat. Variiert man nun  $\theta$ , so lässt sich die Verteilung ermitteln, die der gemessenen am nächsten kommt. Ein ausgeprägtes Maximum um  $p = 0.4$  erhält man für Winkel von  $25^\circ$  und  $43^\circ$ . Die durchgezogene Linie in Abbildung 5.4B gibt die berechnete Verteilung für  $\theta = 43^\circ$  an, wobei die berechnete Funktion mit einer Gaußkurve gefaltet wurde, die die Breite der Messunsicherheit von  $\Delta s = 0.05$  besitzt. Die Simulation zeigt wie die Messung einen maximalen Peak um  $p = 0.4$ . Allerdings ergibt sich in der Simulation eine Flanke zu kleinen  $p$ -Werten hin, die für  $\theta = 25^\circ$  noch ausgeprägter ist als für  $\theta = 43^\circ$ , während große  $p$ -Werte überhaupt nicht auftreten. Hierfür lassen sich z.B. die folgenden zwei Erklärungen finden: 1. Es herrscht keine isotrope Verteilung der Trimere inner-

halb der PVA Matrix vor. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da durch den Präparationsprozess (*Spin-coating*) unter Umständen eine Vorzugsorientierung eingeführt wird, wie es beim LH2-Komplex von Purpurbakterien der Fall ist [44]. 2. Es findet eine ungewollte Selektion durch den Experimentator statt, was der Fall sein könnte, wenn die Fluoreszenzintensität der Komplexe stark von der Orientierung der Dipole abhängt.

### 5.4.3 Monomere

Die Emission monomerischer LHC-II-Komplexe bei tiefen Temperaturen stammt aus dem energetisch tiefstem Zustand. Dies führt zu einer vollständig linearen Polarisation der Fluoreszenz, wie man es aufgrund der Ergebnisse an trimerischen Komplexen auch erwarten konnte. Interessant ist nun das Verhalten bei höheren Temperaturen insbesondere bei Raumtemperatur. Genau wie die in Kapitel 4 untersuchten Antennenkomplexe von Purpurbakterien sind die Komplexe höherer Pflanzen bei Raumtemperatur extrem photostabil, d.h. sie photobleichen im Durchschnitt innerhalb weniger Sekunden. Dieses Verhalten wird in erster Linie durch Photooxidation verursacht, also durch den Luftsauerstoff. Verringert man den Sauerstoffgehalt der Probe durch Zugabe des Enzyms Glukoseoxidase und des Substrats Glukose (siehe Abschnitt 5.3), so erhöht sich die Lebensdauer der Komplexe (Monomere gleichermaßen wie Trimere) um einen Faktor zehn. Die Karotinoide bilden also für die hier verwendeten Bestrahlungsintensitäten nur eine begrenzte Schutzfunktion. Zum Vergleich (siehe auch Kapitel 3) ist die Lebensdauer vieler Farbstoffmoleküle wie sie für Farbstofflaser verwendet werden, deutlich größer als die der Antennenkomplexe.

Durch die Verwendung des Sauerstoff reduzierenden Enzyms ist es nun möglich, das Fluoreszenzverhalten einzelner Antennen auf Zeitskalen bis zu einigen Minuten zu beobachten. Abbildung 5.5A zeigt die modulierte Fluoreszenz eines einzelnen Monomers. Diese ist bis zum endgültigen Photobleichen bei  $t = 53\text{s}$  sehr stabil und zeigt kaum Schwankungen und keine Sprünge der Intensität. Das Bleichen in einem Schritt deutet darauf hin, dass zwischen den Chl-Molekülen eine nicht vernachlässigbare Kopplung besteht. So ist von Pigment-Protein-Komplexen mit stark gekoppelten Pigmenten wie LH2 von Purpurbakterien (siehe Kapitel 4) oder *B-Phycoerythrin* [135] bekannt, dass sie in einem Schritt photobleichen. Dies

wird mit der Ausbildung eines nicht-strahlenden Fallenzustandes erklärt, der als sehr effektive Energiesenke wirkt [135].

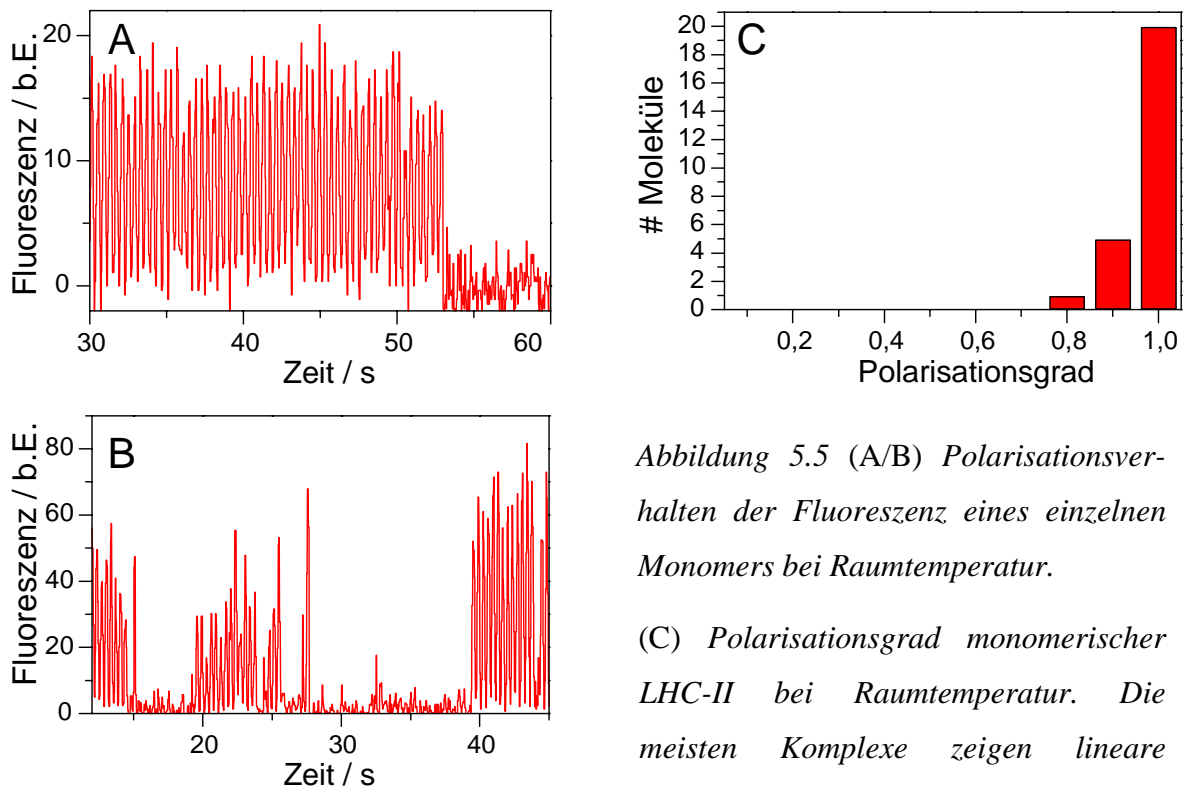


Abbildung 5.5 (A/B) Polarisationsverhalten der Fluoreszenz eines einzelnen Monomers bei Raumtemperatur.

(C) Polarisationsgrad monomerischer LHC-II bei Raumtemperatur. Die meisten Komplexe zeigen lineare Polarisation.

Obwohl ein recht hoher Prozentsatz (ca. 40%) der Monomere solch eine stabile Fluoreszenzintensität zeigen, findet man in der Mehrheit der Traces von Monomeren Intensitätssprünge. Abbildung 5.5B zeigt ein typisches Beispiel: Die meisten Sprünge zeigen ein Verringern der Intensität auf Untergrundniveau. (Bei den hier gezeigten Traces wurde der Untergrund bereits subtrahiert.) Ebenfalls gibt es Sprünge auf ein Zwischenniveau der Intensität. Der Polarisationsgrad ändert sich bei den meisten Intensitätssprüngen jedoch nicht. Bei einer kleinen Anzahl Monomere wurden Intensitätssprünge beobachtet, die mit einer gleichzeitigen Änderung der Phase der Polarisation einhergingen.

Beide Traces in Abbildung 5.5 zeigen einen hohen Polarisationsgrad nahe eins, also nahezu linear polarisierte Emission. Wie das Histogramm in Abbildung 5.5B zeigt, ist dies die Regel. Monomerische LHC-II zeigen bei Raumtemperatur linear polarisierte Emission. Dies ist sehr

überraschend, da bekannt ist, dass die energetisch niedrigsten Zustände innerhalb des Monomers sehr dicht zusammen liegen [129;131]. Bei Raumtemperatur liegen die fünf niedrigsten Zustände in Bereich  $\Delta E = k_B T / 2$ , sollten also Besetzungszahlen größer 0.6 besitzen und dementsprechend an der Emission beteiligt sein. Man würde somit eine unpolarisierte bzw. zumindest nicht linear polarisierte Emission erwarten.

Um die linear polarisierte Fluoreszenz zu verstehen, bieten sich mehrere Erklärungsansätze an:

1. Die Dipolmomente der fünf niederenergetischen Zustände sind parallel orientiert.
2. Durch starke Kopplung zwischen Chl *a*-Molekülen bilden sich exzitonische Zustände mit stark veränderten Oszillatorstärken, so dass ein Zustand den Großteil der Oszillatorstärke erhält.
3. Die Chl-Moleküle, die zu den niedrigsten Zuständen gehören, haben stark unterschiedliche photophysikalische Parameter, so dass es lediglich einen Zustand mit einer hohen Fluoreszenz-Quantenausbeute gibt.
4. Zwischen den niederenergetischen Zuständen existiert kein thermisches Gleichgewicht, möglicherweise aufgrund irreversiblen Energietransfers zum energetisch niedrigsten Chl *a*-Molekül.

Zu 1) Da die Auflösung der Struktur lediglich die Ebene der Chl-Moleküle, nicht aber die Orientierung der Übergangsdipolmomente aufklärt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die fünf niedrigsten Zustände parallele Dipolmomente besitzen. In Abschnitt 5.4.5 werden wir jedoch sehen, dass die Fluoreszenz der Monomere von verschiedenen Zuständen emittiert werden kann, die nicht parallel zueinander liegen.

Zu 2) Die Kopplungsstärke zwischen unterschiedlichen Chl *a* wird in der Literatur nicht einheitlich als schwach angenommen. Schubert et al. [136] erklären ihre NLPF-Spektren (*non-linear polarization spectroscopy in the frequency domain*) mittels exzitonischer (also starker) Kopplung zwischen 2 – 3 Chl *a*, was zu einer Verschiebung der Oszillatorstärke zu einem Zustand hin führt. Die Fluoreszenz dieses Zustands wäre dominant und – da es sich nur um einen Zustand handelt – linear polarisiert. Andererseits sollte man diese hohe Oszillatorstärke

auch im Absorptionsspektrum sehen, was aber nicht der Fall ist. Im Gegenteil ist die Absorption um 680 nm eher gering.

Zu 3) Die maximale Fluoreszenz eines Moleküls ist gegeben durch

$$I_{sat} = \frac{(k_{21} + k_{23})\Phi_F}{2 + k_{23}/k_{31}}. \quad (34)$$

Hierbei ist  $\Phi_F$  die Fluoreszenz-Quantenausbeute,  $k_{21}$  und  $k_{31}$  die inversen Lebenszeiten des ersten Singulettzustands bzw. Triplettzustands und  $k_{23}$  die ISC-Rate. Wie schon erwähnt (Abschnitt 4.1) ist die ISC-Rate bei Chl-Molekülen sehr hoch. Setzt man realistische Werte in Gleichung (34) ein, so ergibt sich eine maximale Fluoreszenz von  $I_{sat} = 500$  cps, die bei Berücksichtigung der Detektionseffizienz (siehe Kapitel 2) im Bereich der Dunkelzählrate des Detektors liegt. Wird nun der Triplettzustand eines Chl-Moleküls durch ein Car-Molekül effizient gequencht, so kann  $k_{31}$  um zwei Größenordnungen reduziert werden, wodurch  $I_{sat}$  um den gleichen Faktor ansteigt. Das Fluoreszenzsignal des Chl-Moleküls mit gequenchten Triplettzustand kann so deutlich größer werden als das der anderen Chl-Moleküle.

Zu 4) Folgt man der Nomenklatur von Kühlbrandt [125], so ist der Abstand benachbarter Chl *a*-Moleküle zu groß um einen Überlapp von Orbitalen zuzulassen, so dass zwischen Chl *a* nur Förster-Energietransfer (ET) stattfinden kann. Dessen Effizienz hängt im Wesentlichen vom spektralen Überlapp zwischen Donor und Akzeptor ab. Ist nun der spektrale Überlapp für Hin- und Rücktransport sehr unterschiedlich, so ergeben sich unterschiedliche ET-Raten. Ist die Rate des Hintransports deutlich größer, so wird die Fluoreszenz hauptsächlich aus dem röttesten Zustand emittieren. Selbst im Falle großer Linienbreiten und eines kleinen Stokes-Shifts, wie sie hier höchstwahrscheinlich vorliegen, ist es gut möglich, dass der spektrale Überlapp für Hin- und Rücktransport um einen Faktor zehn variiert, insbesondere wenn man Asymmetrien der Linienform berücksichtigt, die durch die vibronischen Banden der Chl-Moleküle verursacht werden.



#### 5.4.4 Trimere bei Raumtemperatur

Als letztes wird in diesem Abschnitt nun das Polarisationsverhalten von trimerischen LHC-II bei Raumtemperatur untersucht. Dazu wurde wieder die modulierte Fluoreszenz als Funktion der Zeit gemessen. Abbildung 5.6A zeigt einen solchen Trace, wobei bei  $t \cong 6$  s der Komplex in den Fokus gefahren wurde. Man erkennt deutlich, wie die Fluoreszenz schrittweise abnimmt, wobei sich bei jedem Intensitätssprung gleichzeitig der Polarisationsgrad ändert.

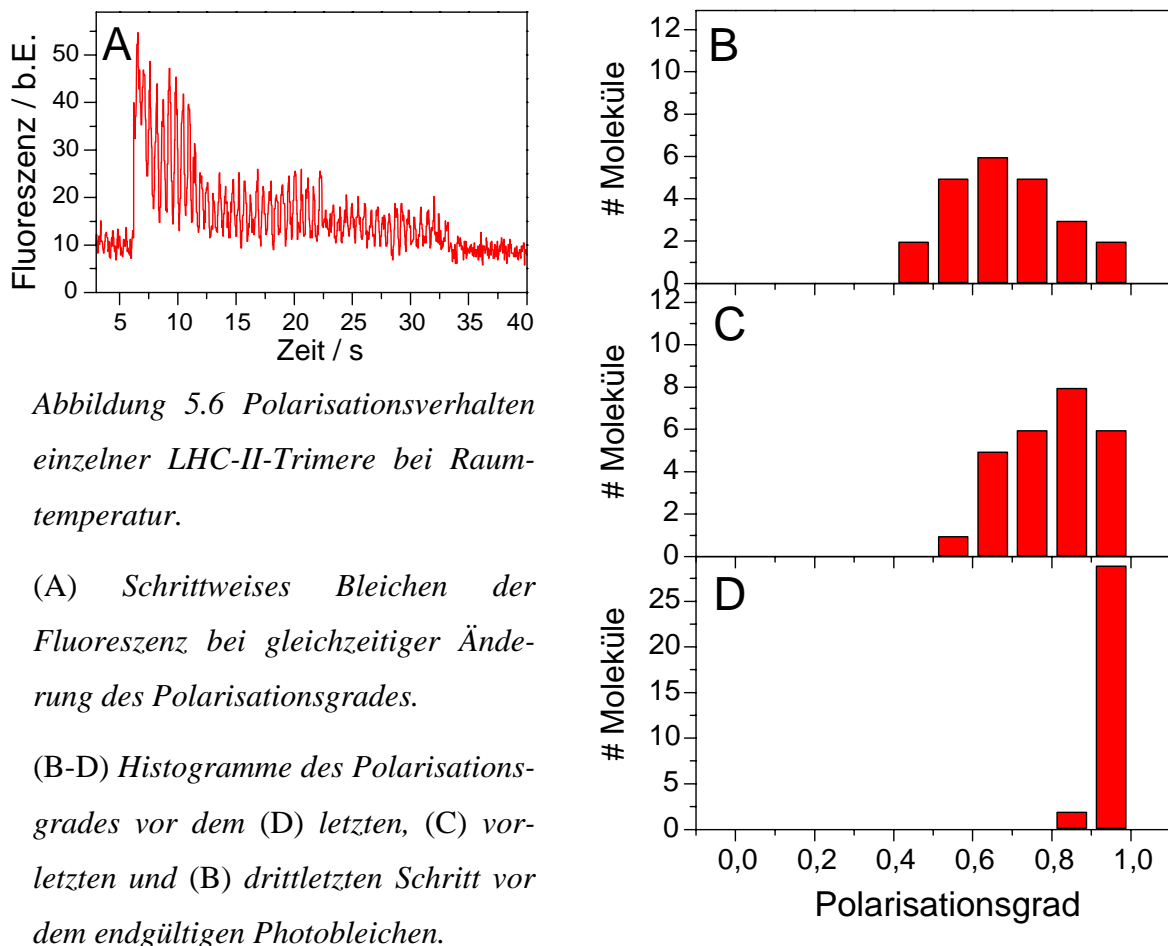


Abbildung 5.6 Polarisationsverhalten einzelner LHC-II-Trimere bei Raumtemperatur.

(A) Schrittweises Bleichen der Fluoreszenz bei gleichzeitiger Änderung des Polarisationsgrades.

(B-D) Histogramme des Polarisationsgrades vor dem (D) letzten, (C) vorletzten und (B) drittletzten Schritt vor dem endgültigen Photobleichen.

Das Beispiel suggeriert, dass der Komplex in drei Schritten bleicht (bei  $t = 8$  s,  $t = 12$  s und  $t = 32$  s), dass also die monomeren Untereinheiten unabhängig voneinander bleichen. Dies erklärt, warum mit jedem Sprung sowohl die Intensität abnimmt und gleichzeitig der Polarisationsgrad zunimmt. Allerdings zeigen nicht alle gemessenen Traces ein so deutliches

Verhalten wie das gezeigte Beispiel. Viele Komplexe zeigen Sprünge zwischen zwei Intensitätsniveaus vergleichbar zum Verhalten einzelner Monomere bei Raumtemperatur (Abbildung 5.5B) oder sie zeigen nur zwei deutlich erkennbare Sprünge. Einige wenige Komplexe zeigen auch mehr als drei Sprünge, wobei es sich hierbei um mehr als einen Komplex im Fokus handeln könnte oder es könnte sich um einen die Polarisation ändernden Sprung innerhalb einer monomerischen Untereinheit handeln, wie sie teilweise beobachtet wurden (siehe Abschnitt 5.4.3).

Um ein klareres Bild des Bleichvorgangs zu bekommen, wurden der Polarisationsgrad der einzelnen Bleichschritte in einem Histogramm eingetragen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Abbildung 5.6D zeigt die Verteilung des Polarisationsgrades vor dem endgültigen Photobleichen, Abbildung 5.6C den Polarisationsgrad vor dem vorletzten Schritt und Abbildung 5.6B vor dem drittletzten Schritt. Durch diese Methode können sämtliche Komplexe berücksichtigt werden, unabhängig von der Anzahl der Bleichschritte. Abbildung 5.6B zeigt eine Verteilung des Polarisationsgrad, die der Verteilung von Trimeren bei tiefen Temperaturen (Abbildung 5.4) ähnlich ist, allerdings ein zu höheren  $p$ -Werten verschobenes Maximum zeigt. Nach einem weiteren Bleichschritt erhält man einen höheren Polarisationsgrad und vor dem letzten Schritt zeigen die meisten Komplexe näherungsweise linear polarisierte Emission, was mit dem Verhalten einzelner Monomere vergleichbar ist (siehe Abbildung 5.5C).

Dieses schrittweise Bleichen ist verschieden vom Verhalten von z.B. *B-Phycoerythrin* [135]. In diesem Pigment-Protein-Komplex führt das Bleichen eines Chromophors zum Erlöschen der Fluoreszenz des gesamten Komplexes, was typisch ist für Komplexe, deren Pigmente stark gekoppelt sind. Im Gegensatz hierzu sind in LHC-II-Komplexen die emittierenden Zustände entweder nicht stark gekoppelt oder es wird durch das Photobleichen kein energetisch tiefliegender Fallenzustand erzeugt.

Es wird vermutet, dass in LHC-II-Trimeren die Kopplung zwischen monomerischen Untereinheiten mit einigen zehn Wellenzahlen relativ gering ist [134], zu gering um einen effektiven Energietransfer zwischen den Untereinheiten zu gewährleisten. Solch eine schwache Kopplung zwischen den Untereinheiten erklärt das beobachtete Bleichen in drei Schritten. Ein vergleichbares Verhalten wurde auch in Trimeren des Pigment-Proteins *Allophycocyanin* ge-

funden [137]. Die Histogramme bestätigen also die Vermutung, dass die monomerischen Untereinheiten unabhängig voneinander sind und eine nach der anderen bleichen.

Die Verschiebung des Maximums des Histogramms bei Raumtemperatur gegenüber den Messungen bei  $T = 1.8\text{ K}$  hat wahrscheinlich folgende Ursache: Da auch die Monomere vereinzelt Sprünge zeigen, bei denen sich der Polarisationsgrad ändert, kann man dieses Verhalten auch bei den monomerischen Untereinheiten des Trimers erwarten. Da die Bleichschritte immer vom letzten Schritt an rückwärts gezählt wurden, würden Sprünge innerhalb der Untereinheit das Histogramm verfälschen, und zwar genau in Richtung von zu hohen  $p$ -Werten.

#### 5.4.5 Phasensprünge der Polarisation von Monomeren

Bei einer nicht unerheblichen Anzahl ( $> 40\%$ ) von monomerischen LHC-II-Komplexen wurden Sprünge in der Phase der modulierten Fluoreszenz gefunden, wobei der Polarisationsgrad als auch die Gesamtintensität der Fluoreszenz unverändert blieben. Abbildung 5.7 zeigt ein Beispiel für solch einen Phasensprung: Zum Zeitpunkt  $t \approx 9.2\text{ s}$  ändert sich die Phase um  $72^\circ$  (bzw.  $180^\circ - 72^\circ$ ), bleibt für ca. drei Perioden konstant, um dann um den selben Winkel zurückzuspringen. Bei dem Intensitätseinbruch bei  $t = 12.3\text{ s}$  könnte es sich um einen weiteren Phasensprung handeln, der jedoch zu schnell zurückspringt, als dass ein Winkel bestimmt werden kann. Alternativ könnte es sich hierbei natürlich auch um einen sehr kurzen Sprung in einen Dunkelzustand handeln.

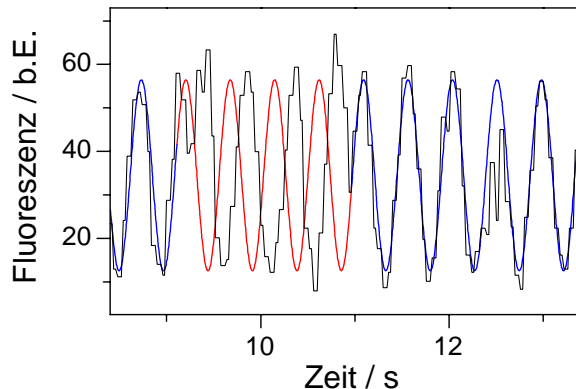


Abbildung 5.7 Modulierter Zeittrace (Ausschnitt) eines LHC-II-Monomers. Die farbige Kurve gibt die Phase des Polarisators an. Zu den Zeitpunkten  $t \approx 9.2 \text{ s}$  und  $t \approx 11 \text{ s}$  finden Phasensprünge um  $\varphi = \pm 72^\circ$  statt, so dass zwischen diesen Zeitpunkten eine Phasenverschiebung (rote Linie) vorliegt.

Eine andere Methode, solche Phasensprünge der Polarisation zu untersuchen, ist die Verwendung des Zweidetektoren-Aufbaus, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Hier werden zwei orthogonale Polarisationsrichtungen der Fluoreszenz mittels eines polarisierenden Strahlteilers und zwei APDs gleichzeitig gemessen. Abbildung 5.8 zeigt die Fluoreszenz als Funktion der Zeit anhand zweier Beispiele. Die beiden orthogonalen Polarisationsrichtungen sind in rot und grün dargestellt, ihre Summe in schwarz.

Betrachten wir zunächst die Gesamtfluoreszenz des oberen Graphen: Diese ist bis zum Zeitindex  $t = 21 \text{ s}$  konstant, fällt dann für die Dauer eines Kanals – also  $\Delta t < 20 \text{ ms}$  – fast bis auf Untergrundniveau ab, um dann bis zum endgültigen Photobleichen nahezu die gleiche Intensität wie zuvor zurückzuerlangen. Im Zeitintervall  $t = 21 - 39 \text{ s}$  zeigt ein Detektor (grün) Untergrundniveau, d.h. das emittierte Licht ist linear polarisiert. Im Zeitintervall  $t = 10 - 21 \text{ s}$  zeigen beide Detektoren die gleiche Intensität, d.h. die Orientierung des  $E$ -Vektor liegt  $45^\circ$  zwischen den beiden Polarisationsrichtungen des Strahlteilers.

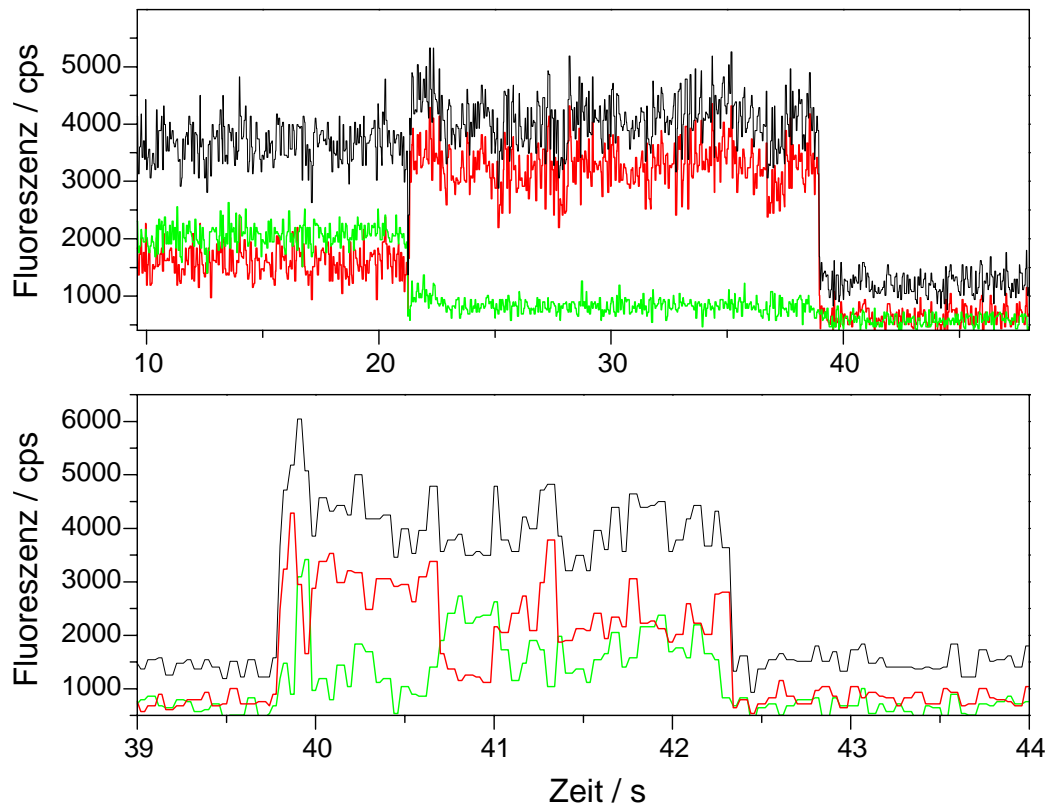


Abbildung 5.8 Zeitliches Verhalten der Fluoreszenz von LHC-II-Trimeren. Zwei orthogonale Polarisationsrichtungen wurden gleichzeitig detektiert (rot und grün). Die schwarze Kurve zeigt deren Summe.

Abbildung 5.8 (unten) zeigt ein Beispiel mit ähnlichem Verhalten. Wiederum ist die Gesamtintensität während der Beobachtungszeit (ca. 2.5 s) nahezu konstant. Der Komplex wurde bei Zeitindex  $t = 39.8$  s in den Fokus gefahren, es handelt sich also nicht um eine Rückkehr der Fluoreszenz aus einem Dunkelzustand. Die beiden orthogonalen Polarisationsrichtungen der Fluoreszenz zeigen ein absolut antikorreliertes Verhalten; steigt ein Kanal an, so fällt der andere ab und umgekehrt, wie man zu den Zeitpunkten  $t = 40$  s,  $40.8$  s und  $41.4$  s besonders gut sehen kann. Es soll noch erwähnt werden, dass es sich bei den letzten beiden Messungen um Trimere handelt, deren erste beiden monomerischen Untereinheiten zum Zeitpunkt der Messung schon gebleicht waren.

Die beobachteten Phasensprünge könnten durch eine Drehung des emittierenden Chl-Moleküls bzw. des gesamten Komplexes erklärt werden. Dies ist jedoch nicht möglich, da die

Proteinumgebung der Chl-Moleküle sehr dicht gepackt ist und Drehungen um große Winkel, wie z.B.  $72^\circ$  in Abbildung 5.7, extrem unwahrscheinlich sind. Auch eine Drehung des gesamten Komplexes in der PVA-Matrix kommt nicht in Frage, da bekannt ist, dass selbst wesentlich kleinere Teilchen, wie einzelne Farbstoffmoleküle, in Polymermatrizen nicht rotieren.

Als Erklärung bleibt somit noch, dass mehrere Chl *a*-Moleküle an der Emission beteiligt sind, und zwar in der Regel immer nur eins zur gleichen Zeit. Im Beispiel aus Abbildung 5.7 hieße dies, dass die Dipole näherungsweise in der Ebene liegen, da die Fluoreszenzintensität unverändert bleibt, aber um  $72^\circ$  zueinander gedreht orientiert sind. Das Beispiel aus Abbildung 5.8 (oben) entspricht einem Dipolpaar, das ebenfalls fast in der selben Ebene liegt, aber lediglich um  $42^\circ$  zueinander orientiert ist. Da die Intensität nach dem Phasensprung etwas höher ist als zuvor, ist der Dipol, der für die Emission bis zum Zeitindex 22 s verantwortlich ist, etwas weiter aus der Detektionsebene gedreht, als der Dipol des Moleküls, das nach dem Sprung emittiert. Das Beispiel aus Abbildung 5.8 (unten) zeigt, dass auch ein eher kontinuierlicher Verlauf zwischen zwei (oder mehr) Emittlern auftreten kann, bzw. dass die Sprünge zwischen mehreren Molekülen deutlich schneller sind als die verwendete Zeitauflösung von 20 ms.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die sich zur Erklärung obigen Verhaltens anbieten und die beide auf Konformationsänderungen der Proteinumgebung beruhen:

- 1) Änderung der photophysikalischen Eigenschaften der Chl *a*-Moleküle, so dass jeweils nur ein Zustand eine hohe Quantenausbeute besitzt, oder
- 2) Änderung der Proteinumgebung der Chl *a*-Moleküle, so dass verschiedene Moleküle den niederenergetischsten Zustand erlangen können.

Beide Punkte sind direkt mit den Punkten 3. und 4. aus Abschnitt 5.4.3 verknüpft, die zur Erklärung der linear polarisierten Emission von Monomeren herangezogen wurden.<sup>7</sup>

Zu 1) Eine Änderung der photophysikalischen Parameter der Chl *a*-Moleküle tritt ein, wenn sich die Abstände zwischen Lutein- und Chl-Molekülen ändert. Eine Konformationsänderung könnte bewirken, dass sich das Lutein-Molekül gleichzeitig von einem Chl-Molekül entfernt und sich einem anderen annähert, so dass der Überlapp der Wellenfunktionen zum ersten Mo-

---

<sup>7</sup> Hier wird auch sofort klar, dass die Dipole nicht alle parallel orientiert sind, so dass Punkt 1. aus Abschnitt 5.4.3 als Erklärung ausscheidet.

lekül unterbrochen wird, während er zum zweiten Molekül hergestellt wird. Es würde somit jeweils nur der Tripletzustand eines Chl-Moleküls effizient gequench, welches dann im Einzelmolekülexperiment beobachtbar wäre.

Zu 2) Chl-Moleküle reagieren, was ihre spektrale Lage angeht, sehr empfindlich auf ihre Proteinumgebung [92]. Eine Konformationsänderung kann also bewirken, dass die Proteinumgebung der Chl-Moleküle so geändert wird, dass entweder das niederenergetischste Chl-Molekül blauverschoben wird, bzw. ein zuvor nicht-emittierendes Chl-Molekül rotverschoben wird, und zwar so, dass nach der spektralen Verschiebung ein neues Molekül den elektronischen Übergang mit der niedrigsten Energie besitzt.

Solch ein Prozess könnte in der Evolution bevorzugt werden, da sich hier mehrere Chl-Moleküle als Speicher der Anregungsenergie abwechseln, bevor ein Energietransfer zum nächsten Antennenkomplex bzw. zum Reaktionszentrum durchgeführt wird. Dies könnte zu einer etwas längeren Gesamtlebensdauer des Komplexes führen und somit zu einem kleinen Vorteil in der Evolution.

#### 5.4.6 Kritische Schlussbemerkungen zu den Polarisationsmessungen

Das wohl erstaunlichste Ergebnis der Polarisationsstudien ist, dass monomerische LHC-II-Komplexe auch bei Raumtemperatur linear polarisierte Emission zeigen. Um sicher zu stellen, dass keine Verunreinigung der Probe vorlag, wurde gleichzeitig zu der bei Raumtemperatur untersuchten Probe eine zweite Probe hergestellt, deren Emissionsspektren bei tiefen Temperaturen untersucht wurden. Die spektrale Position der Emissionslinien und deren spektrale Diffusion (siehe nächster Abschnitt) zeigen sehr sicher, dass die Fluoreszenz von LHC-II-Komplexen stammt. Als mögliche Erklärung kommen die beiden oben genannten Punkte in Frage: Innerhalb des Chl *a*-Pools existiert ein stark irreversibler Energietransfer oder es existiert ein unterschiedlich starkes Quenchen der Tripletzustände der niederenergetischen Chl-Moleküle.

Es konnte klar gezeigt werden, dass im Falle der Trimere bei tiefen Temperaturen mehr als ein Zustand für die Emission verantwortlich ist. Dies zeigt sich sofort aus dem relativ hohen Polarisationsgrad der gemessenen Trimere. Ein Kritikpunkt ist die mögliche Bildung von Ag-

gregaten. In der Ausgangslösung ist die Detergenzkonzentration so gewählt, dass eine Aggregation ausgeschlossen werden kann [138]. Erst im letzten Verdünnungsschritt, wenn die Komplexe in PVA-Lösung gelöst werden, wird die kritische Detergenzkonzentration, bei der sich noch Mizellen bilden (*cmc, critical micelle concentration*), unterschritten. Es ist trotzdem höchst unwahrscheinlich, dass zu diesem Zeitpunkt noch Aggregation stattfindet: Zum einen ist die LHC-II-Konzentration extrem gering und zum anderen dauert die gesamte Prozedur der Verdünnung mit PVA-Lösung und anschließendem Spin-coating nur wenige Sekunden. Helle Spots in den konfokalen Abbildungen, die immer wieder auftraten, werden somit keinen Aggregaten zugeordnet, sondern Ansammlungen von einzelnen LHC-II-Komplexen, die an Unregelmäßigkeiten des Glassubstrates bevorzugt immobilisiert wurden. Ein Problem ergibt sich hierbei durch Ansammlungen von einigen wenigen Komplexen, die irrtümlich für einzelne Komplexe gehalten werden. Solche kleinen Ansammlungen hätten einen sehr hohen Polarisationsgrad und würden bei Raumtemperatur in mehr als drei Schritten bleichen. Da generell kaum Komplexe mit  $p \approx 0$  gemessen wurden und bei Raumtemperatur nur wenige Komplexe mehr als drei Bleichschritte zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass die Statistik wesentlich von solchen Ansammlungen weniger Komplexe beeinflusst wurde.

Für die Trimere ergibt sich ein recht klares Bild: Die monomerischen Untereinheiten sind untereinander nur sehr schwach gekoppelt, so dass die Einheiten unabhängig voneinander photobleichen. Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei tiefen Temperaturen erhält man so drei unabhängige Emitter pro Trimer.



## 5.5 Emissionsspektren einzelner LHC-II

Aufgrund der hohen spektralen Selektion und der hohen Photostabilität wurden Emissionsspektren von einzelnen LHC-II-Komplexen bei tiefen Temperaturen ( $T = 1.8\text{ K}$ ) aufgenommen. Es zeigte sich jedoch, dass die Fluoreszenzintensität bei tiefen Temperaturen deutlich geringer ist als bei Raumtemperatur und stark von der Probenpräparation abhängig ist. So zeigen native LHC-Trimere, die in der Gruppe von H. Lokstein (MBI Berlin) isoliert wurden, eine Fluoreszenzintensität bei tiefen Temperaturen, die mit der Intensität bei Raumtemperatur vergleichbar ist, während native Trimere, die nach einem anderen Protokoll isoliert wurden (Gruppe von W. Kühlbrandt, MPI Frankfurt), eine deutlich schwächere Fluoreszenzintensität bei tiefen Temperaturen als bei Raumtemperatur zeigen. Rekonstituierte Trimere der Gruppe von H. Paulsen (Universität Mainz), die bei Raumtemperatur die selbe Intensität zeigen wie native Trimere, zeigen bei tiefen Temperaturen keine messbare Fluoreszenzintensität. Ähnlich ist das Verhalten der Monomere: Native Monomere, die nach dem in Abschnitt 5.3 beschriebenen Verfahren isoliert wurden, zeigen bei tiefen Temperaturen eine deutlich schwächere Fluoreszenz als bei Raumtemperatur, die an der Detektionsschwelle liegt. Die Fluoreszenz von rekonstituierten Monomeren (W. Kühlbrandt, H. Paulsen) lag wiederum unter der Detektionsgrenze. Aus diesem Grund beschränken sich die Messungen bei tiefen Temperaturen in der Regel auf native Trimere, während von Monomeren bis jetzt lediglich einige Emissionsspektren vorliegen.

Die Auswertung der Emissionsspektren ist überraschend komplex. Dies wird in erster Linie durch das Auftreten von spektraler Diffusion bewirkt, d.h. das emittierte Licht ist spektral nicht konstant sondern springt (bzw. diffundiert) zwischen verschiedenen spektralen Positionen. Abbildung 5.9 zeigt diesen Sachverhalt anhand des zeitlichen Verhaltens der spektral aufgelösten Fluoreszenz eines einzelnen Trimers bei  $T = 1.8\text{ K}$ .

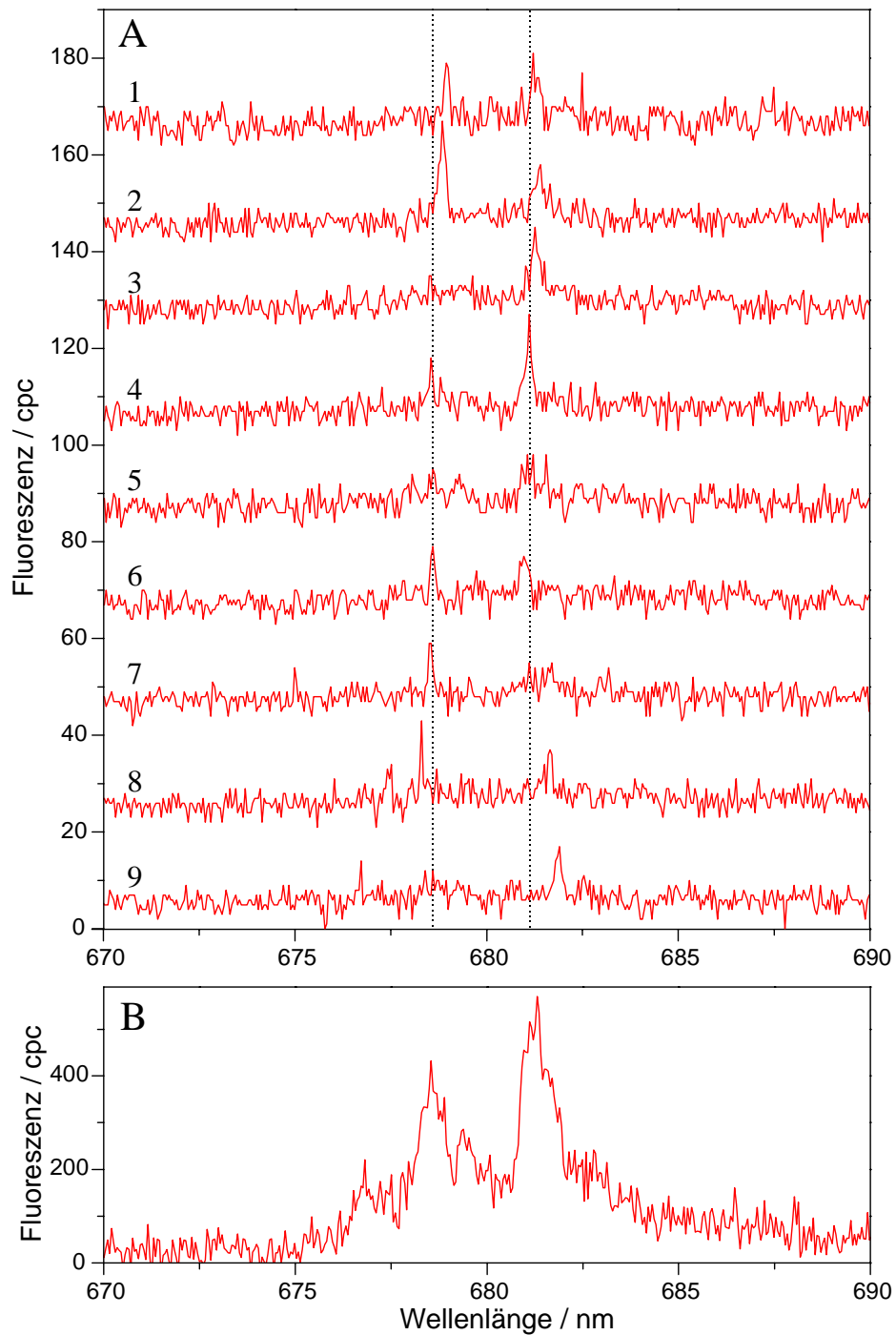


Abbildung 5.9 (A) Neun Fluoreszenzspektren eines einzelnen Trimers (Mittelungszeit  $\Delta t = 5$  s), die aus einer Serie von 100 Spektren stammen. (B) Summenspektrum aller 100 Spektren.

Die neun Spektren in Abbildung 5.9A wurden mit einer Mittelungszeit von  $\Delta t = 5$  s aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde in Photonen pro Kanal (*counts per channel, cpc*) angegeben, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit zwischen zwei Spektren ein Offset von 20 eingefügt wurde. Diese neun Spektren sind ein Ausschnitt aus einer Serie von 100 Spektren, deren Summe in Abbildung 5.9B dargestellt ist. Das Summenspektrum hat demnach eine Mittelungszeit von  $\Delta t = 500$  s. Man sieht an diesem Beispiel, dass sowohl die Mittelungszeit als auch der absolute Zeitpunkt der Messung entscheidend für das Aussehen des gemessenen Spektrums sind.

Man erkennt in den Spektren mit kurzer Mittelungszeit ein bis drei Linien, die an unterschiedlichen spektralen Positionen erscheinen, hauptsächlich in der Nähe von  $\lambda = 679$  nm und  $\lambda = 681$  nm, markiert durch die gestrichelten Linien. Die schmalsten Linien entsprechen mit  $\Delta\bar{\nu} \approx 3$  cm<sup>-1</sup> der Auflösung des Spektrographen.

Bevor in Abschnitt 5.7 näher auf die spektrale Diffusion eingegangen wird, vergleichen wir zunächst die Fluoreszenzspektren von Monomeren und Trimeren. Abbildung 5.10 zeigt ein Spektrum eines Trimers (oben) und eines Monomers (unten).

Die Mittelungszeit wurde mit  $\Delta t = 10$  s so gewählt, dass ein möglichst guter Kompromiss zwischen Signal-Rausch-Verhältnis auf der einen und möglichst wenig spektraler Diffusion auf der anderen Seite eingegangen wird. Beide Komplexe emittieren um 680 nm, was dem Maximum des Ensemblespektrums entspricht [133;139]. Diese deutet darauf hin, dass das zum emittierenden Zustand gehörende Chl-Molekül nicht im Grenzbereich zwischen monomeren Untereinheiten liegen kann, da man ansonsten aufgrund der unterschiedlichen Proteinumgebungen in Trimer und Monomer mit verschiedenen Wellenlängen der Emission rechnen müsste. Dies ist konsistent mit Ergebnissen von Rogl und Kühlbrandt [126], wonach das emittierende Molekül am Rand des Trimers positioniert ist (siehe Abbildung 5.3, rot gezeichnetes Molekül).

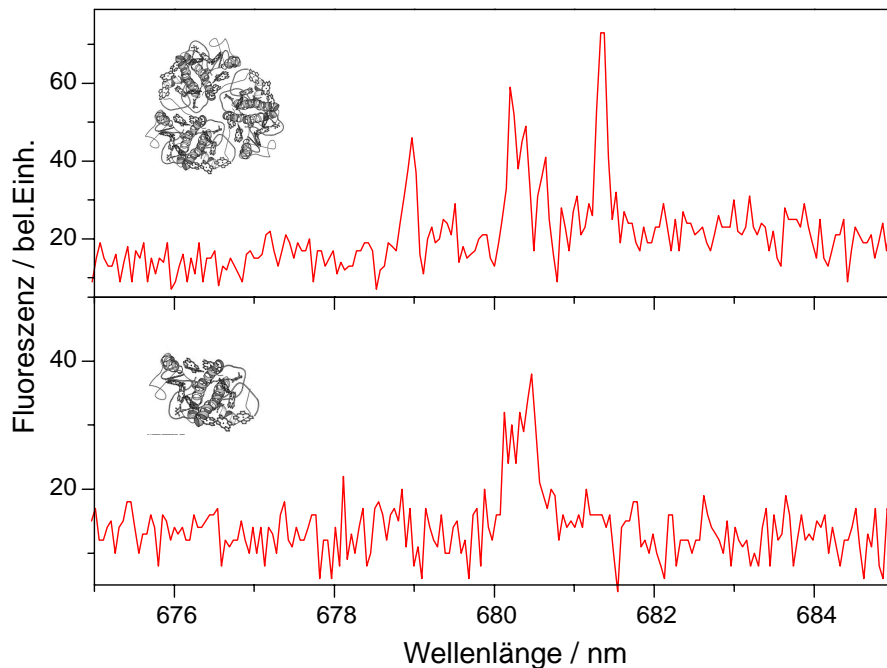


Abbildung 5.10 Fluoreszenzspektrum von einzelnen trimerischen (oben) und monomeren (unten) LHC-II-Komplexen. Spektren von Trimeren zeigen im Mittel mehr Linien als Spektren von Monomeren.

Das trimerische Spektrum zeigt drei Linien, das monomere eine Linie, wobei die Linien durch die spektrale Diffusion eine Feinstruktur besitzen. Man kann aber nicht direkt folgern, dass diese Linien den drei emittierenden Zuständen des Trimers bzw. dem einen emittierenden Zustand des Monomers entsprechen. Es ist für beide Fälle leicht, durch Verlängerung der Mittelungszeit Spektren zu erhalten, die deutlich mehr Linien zeigen, oder - im Falle der Trimeren - durch die Wahl einer sehr kurzen Mittelungszeit nur eine Linie zu erhalten. Das Erscheinen von mehr Linien als auch von weniger Linien als Zuständen ist leicht mit spektraler Diffusion erklärbar: Ein emittierender Zustand kann aufgrund von Änderungen der Proteinumgebung seine spektrale Position ändern, so dass im Spektrum zwei (oder mehr) Linien erscheinen, die zu einem Zustand gehören. Andererseits kann durch eine Vielzahl sehr kleiner Änderungen der Umgebung eine Linie derart verschmieren, dass sie insbesondere bei kurzen Mittelungszeiten im Rauschen untergeht.

Trotzdem ist ein klarer Trend aus den Spektren ablesbar. Spektren von Trimeren haben im Mittel mehr Linien als solche von Monomeren, wobei hier oft nur eine Linie beobachtet wurde. Aufgrund der höheren Anzahl an emittierenden Zuständen, zeigen Trimere offensichtlich

mehr Linien in Fluoreszenzspektren als Monomere. Eine eindeutige Zuordnung der Linien bzw. der Spektralen Positionen zu bestimmten Zuständen ist aufgrund der zu starken spektralen Diffusion nicht möglich.

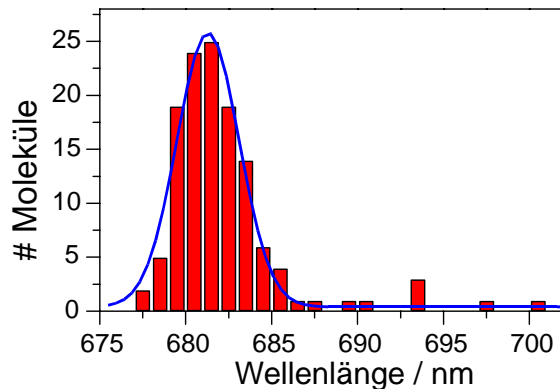


Abbildung 5.11 Verteilung der spektralen Position der Linien in Spektren einzelner LHC-II-Trimere. Die blaue Kurve zeigt eine an die Verteilung angepasste Gaußkurve. Im Vergleich zum Ensemble-Spektrum ist das Maximum der Verteilung um 2 nm ins Blaue verschoben.

Das Fluoreszenzspektrum von LHC-II-Ensembles bei 77 K zeigt ein Maximum bei 680 nm [133;139]. Im Gegensatz hierzu zeigen viele LHC-II-Komplexe Linien bei spektralen Positionen, die weiter im Roten liegen. Dies ist bemerkenswert, da das Fluoreszenzspektrum von LHC-II-Aggregaten ein Maximum bei 700 nm sowie eine Schulter um 682 nm zeigt [140]. Aus diesem Grund wurde ein Histogramm der spektralen Positionen der intensivsten Linien der einzelnen Komplexe erstellt. Dieses sollte dem Ensemble-Spektrum entsprechen. Abbildung 5.11 zeigt das Histogramm sowie eine daran angepasste Gaußkurve. Das Maximum der Verteilung liegt bei 682 nm, d.h. 2 nm weiter im Roten als im Ensemble-Spektrum. Diese spektrale Verschiebung kann auf unterschiedliche Matrizen zurückgeführt werden, die hier bzw. in Ref. [139] und [133] Verwendung fanden. Da sich die für die Fluoreszenz verantwortlichen Chl-Moleküle am Rand des Komplexes befinden, ist ein Einfluss der Matrix auf die spektrale Position nicht überraschend. Von dieser Verschiebung abgesehen zeigt das Histogramm eine große Ähnlichkeit mit dem Ensemble-Spektrum aus Ref. [133]: In beiden Fällen ist die blaue Flanke des Spektrums steiler als die rote, die sich im Ensemble-Spektrum bis hin zu Werten größer als 710 nm erstreckt, in Übereinstimmung mit dem Histogramm, das vereinzelt Werte bis ca. 700 nm enthält.

Ob es sich bei den sehr weit im Roten emittierenden Komplexen um Aggregate handelt oder um Komplexe, die aufgrund einer starken äußeren Störung soweit im Roten emittieren, ist sowohl im Ensemble-Spektrum als auch im Histogramm einzelner Komplexe unklar. Wichtig

ist, dass durch die Ähnlichkeit zwischen Ensemble-Spektrum und Histogramm gezeigt wurde, dass durch die hier verwendete Probenpräparationstechnik keine zusätzlichen spektralen Eigenheiten auftreten, die auf eine Veränderung der Probe – insbesondere Aggregation – schließen lassen.

## 5.6 Anregungsspektren von LHC-II Trimeren

### 5.6.1 Realisierung

Um ein Anregungsspektrum aufzunehmen wird allgemein der spektrale Bereich, in dem die zu untersuchende Probe absorbiert, mit einer durchstimmbaren Lichtquelle abgefahren und die gesamte Fluoreszenz als Funktion der Anregungswellenlänge gemessen. Als Lichtquellen werden aufgrund ihrer Schmalbandigkeit meist Laser benutzt, in unserem Fall ein Farbstoff-Ringlaser (Coherent 699-21), der mit dem Farbstoff Pyridin 2 betrieben wird und von einem  $\text{Ar}^+$ -Laser (Coherent Innova 300) mit einer Leistung von 10 W (Multiline) gepumpt wird. Dieser Farbstofflaser hat im Multimodebetrieb eine Auflösung von  $1.1 \text{ cm}^{-1}$ , kann aber durch den Einbau eines Dreiplattenfilters in die Cavity zum Singlmodelaser aufgerüstet werden, der mit einer Linienbreite von 1 MHz ( $\cong 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ ) extrem schmalbandig ist.

Der nutzbare Scanbereich im Falle der LHC-II-Komplexe wird durch den verwendeten Notch-Filter begrenzt. Eine Vergrößerung des Bereichs durch Glasfilter oder Bandpassfilter im Bereich der Fluoreszenz ist sehr problematisch, da das Signal-Rausch-Verhältnis schon am Limit der Detektierbarkeit liegt.

Aufgrund der geringen Elektron-Phonon-Kopplung innerhalb der LHC-II-Komplexe befindet sich der größte Teil der Fluoreszenzintensität (60 – 70%) in der Nullphononenlinie [141]. Da durch die Filter noch ein Teil der Fluoreszenz der Phononenseitenbande abgeschnitten wird, steht für ein Anregungsspektrum der energetisch tiefsten Zustände nur 10 – 20% der Gesamtfluoreszenz zur Verfügung. Trotzdem ist es möglich mit dieser geringen Restfluoreszenz Anregungsspektren von Trimeren aufzunehmen. Bei Monomeren, die wie oben erwähnt eine deutlich kleinere Fluoreszenzintensität aufweisen, ist dies bisher nicht gelungen.

### 5.6.2 Anregungsspektren mit geringer Auflösung

Abbildung 5.12A zeigt eine Serie von neun in direkter Folge aufgenommener Anregungsspektren bei  $T = 1.8\text{ K}$  und einer Anregungsintensität von  $P_L = 30\text{ nW}$ . Die Fluoreszenzintensität ist durch einen Farbcode wiedergegeben, wobei eine hellere Darstellung einer größeren Intensität entspricht. Im Scanbereich von  $678 - 685\text{ nm}$  sind zwei deutlich getrennte Linien zu erkennen. Die Linie um  $680.6\text{ nm}$  entspricht der Nullphononenlinie des emittierenden Zustands, den man in Emissionsspektren beobachtet (Abschnitt 5.5). Diese Linie, aber insbesondere die Linie(n) um  $679.1\text{ nm}$ , zeigen spektrale Diffusion, was aufgrund der Resultate aus Abschnitt 5.5 zu erwarten gewesen ist.

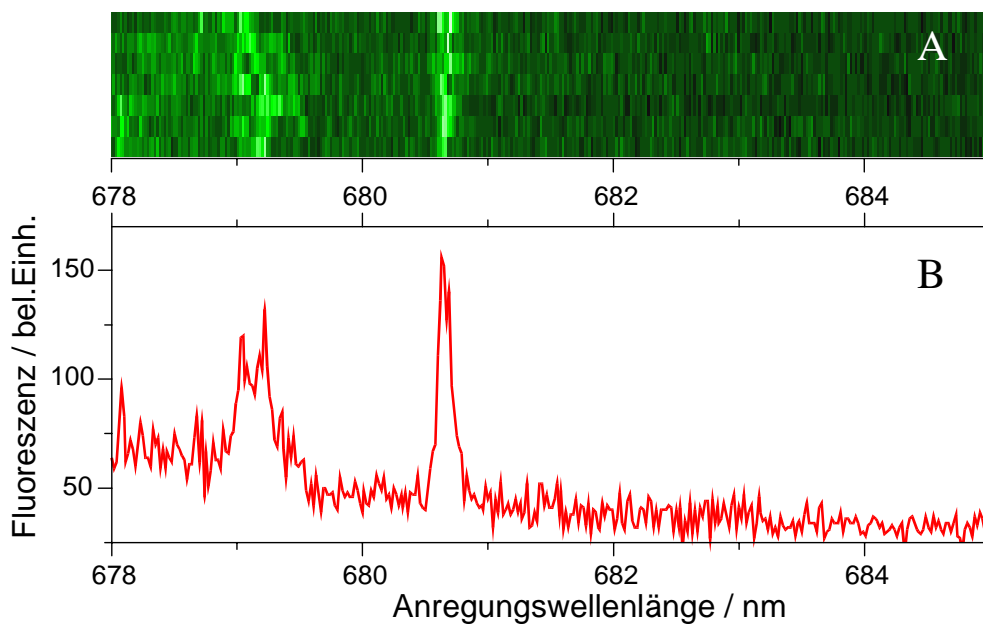


Abbildung 5.12 Anregungsspektrum eines einzelnen LHC-II-Trimers. (A) Sieben aufeinander folgende Spektren. Je heller die Farbe, desto höher die Intensität. Wie in den Emissionsspektren ist spektrale Diffusion zu erkennen. (B) Summespektrum der sieben Spektren.

Da als Anregungslichtquelle für diese Spektren der breitbandige Laser benutzt wurde ( $\bar{\nu} = 1.1 \text{ cm}^{-1}$ ), spiegelt die Linienbreite der Spektren lediglich die Laserlinie wieder. Insbesondere ist nicht zu entscheiden, ob es sich bei den Linien um 679.1 nm um Absorption von energetisch höherliegenden Zuständen handelt, die dann aufgrund von Energietransferprozessen verbreitert sind, oder um spektrale Diffusion der tiefsten, emittierenden Zustände. Im letzteren Falle wären sowohl verschiedene Zustände der monomerischen Untereinheiten denkbar, oder auch eine schnelle spektrale Diffusion eines Zustands zwischen mehreren spektralen Positionen, so dass im Spektrum mehrere Linien erscheinen, die aber nur zu einem Zustand gehören. Auffällig ist weiterhin der Anstieg der Intensität zwischen 679 nm und 678 nm. Hierbei könnte es sich um die Flanke eines höher liegenden Zustands handeln, der aufgrund von Energietransferprozessen verbreitert ist.

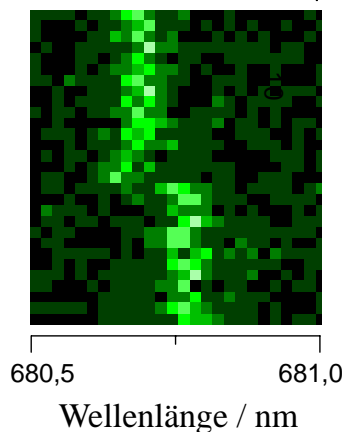


Abbildung 5.13 Anregungsspektren des tiefsten Zustands des LHC-II Trimers mit geringer Anregungsleistung  $P_L = 7 \text{ nW}$ . Während der 31 Scans findet nur ein spektraler Sprung statt.

Die Stärke der spektralen Diffusion variiert stark zwischen verschiedenen Komplexen und ist insbesondere von der Anregungsintensität abhängig. Abbildung 5.13 zeigt 31 Anregungsspektren des tiefsten Zustandes bei einer Anregungsleistung von  $P_L = 7 \text{ nW}$ . Bei dieser sehr geringen Leistung wurde nur ein spektraler Sprung beobachtet.



### 5.6.3 Anregungsspektren mit hoher Auflösung

Bei den bisherigen Messungen konnte die Linienbreite der Anregungsspektren um 680 nm nur so weit bestimmt werden, als dass sie schmäler sind als die Linienbreite des Lasers. Für exaktere Messungen ist ein extrem schmalbandiger Single-Mode-Laser notwendig, der mit einer Linienbreite von  $\nu = 1$  MHz deutlich schmäler ist als typische lebenszeitverbreiterte Absorptionslinien von Chromophoren.

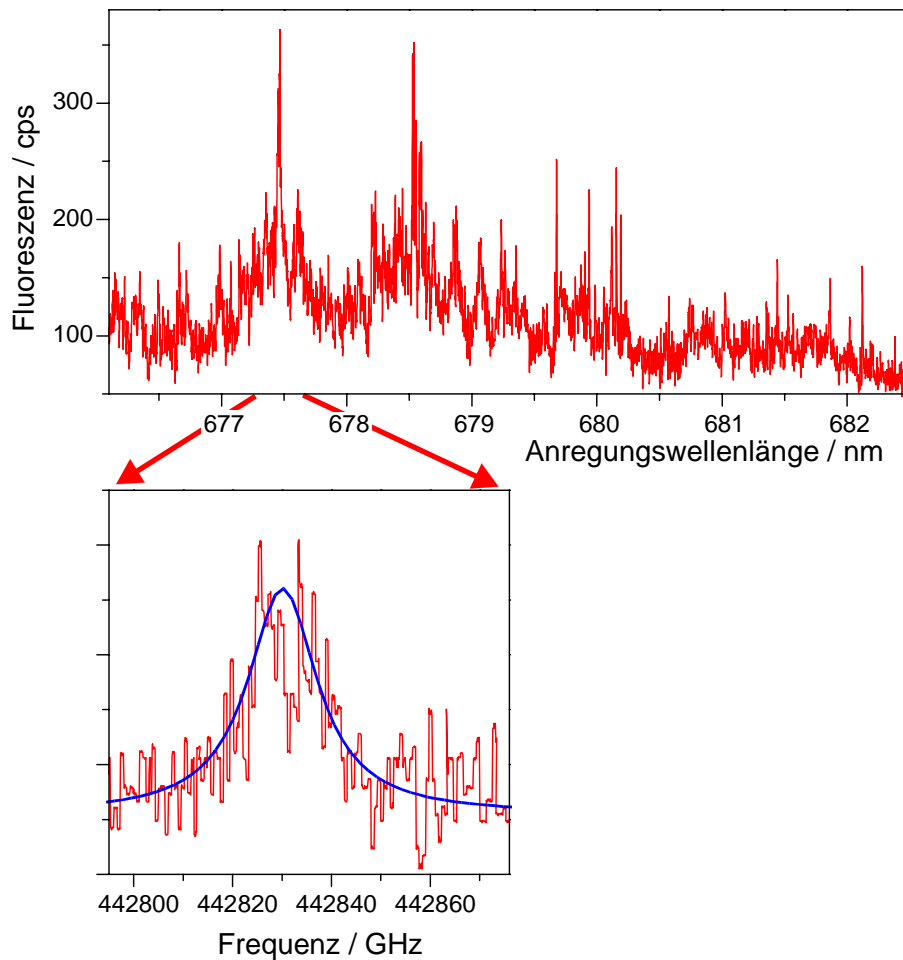


Abbildung 5.14 Anregungsspektrum eines einzelnen LHC-II-Trimers im Chl a-Bereich. Neben sehr schmalen Linien im Bereich 680 nm und 682 nm, die den emittierenden Zuständen zugeordnet werden, existieren bei 677.5 nm und 678.5 nm breite Linien ( $\Delta\bar{\nu} = 17 \text{ cm}^{-1}$ ), die höherliegenden Chl a-Molekülen zugeordnet sind und deren Linienbreite einem 10 ps Energietransfer entspricht.

Abbildung 5.14 zeigt ein Anregungsspektrum in spektralen Bereich 676 nm bis 682.5 nm, das mit einem schmalbandigen Laser bei  $T = 1.8$  K mit einer Anregungsleistung von  $P_L = 6$  nW aufgenommen wurde. Man erkennt zwei breitbandige Strukturen um 677.5 nm und 678.5 nm, sowie eine Vielzahl sehr schmaler Linien um 680 nm und um 682 nm. Das Spektrum ist sehr verrauscht, was wiederum durch spektrale Diffusion verursacht wird. Nimmt man an, dass die Linie um 677.5 nm durch spektrale Diffusion nur unwesentlich verbreitert ist, so ergibt sich durch einen Fit mit einer Lorentzfunktion (siehe Abbildung 5.14 unten) eine Linienbreite von  $\Delta\nu = 17$  GHz  $\cong 0.57$  cm<sup>-1</sup>. Aus

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi T_2} = \frac{1}{2\pi T_1} + \frac{1}{\pi T_2^*} \quad (35)$$

folgt eine Energietransferzeit von  $T_1 = 9.4$  ps, wenn andere Prozesse, die zur reinen Dephasierung ( $T_2^*$ ) beitragen, vernachlässigt werden. Diese Linie wird einem energetisch höher liegenden Zustand eines Chl *a*-Moleküls zugeordnet, das als Elektron-Donor fungiert und die Anregung zu Chl *a*-Molekülen mit tiefer liegenden Zuständen leitet

Aufgrund der Feinstruktur der Linien um 677.5 nm und 678.5 nm kann eine Verbreiterung dieser Linien durch spektrale Diffusion nicht ausgeschlossen werden. Obiger Wert für  $T_1$  ist also ein Grenzwert zu kurzen Zeiten hin, d.h.  $T_1$  könnte deutlich größer sein als 9.4 ps. Dies ist aber unwahrscheinlich, da zeitaufgelöste Messungen Chl *a*-Chl *a*-Energietransferzeiten im Bereich einiger Picosekunden sehen [128].

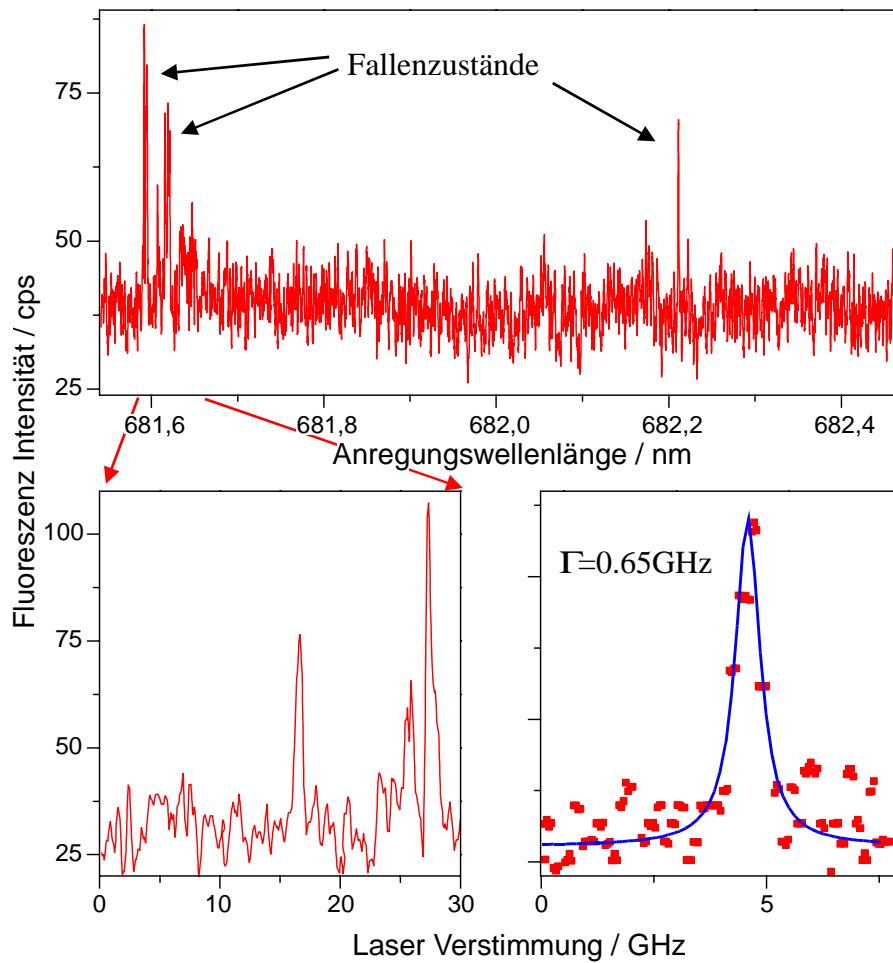


Abbildung 5.15 Die emittierenden Zustände sind über einen großen spektralen Bereich ausgebreitet. Die Vergrößerung (unten) zeigt eine Linienbreite von 0.65 GHz, was dem 17-fachen Wert der reinen Lebensdauer verbreiterung entspricht.

Die Zustände zwischen 680 nm und 682 nm sind in Abbildung 5.15 vergrößert dargestellt. Diese Linien entsprechen den emittierenden Zuständen und sind sehr schmalbandig. Wird eine solche Linie mit einer Lorentzlinie angepasst, so erhält man eine Linienbreite (FWHM) von  $\Gamma = 0.65 \text{ GHz}$ . Die Linienbreite wird von den Relaxationszeiten des Übergangs nach Gleichung (35) bestimmt. Bei einer Lebenszeit von  $T_1 = 4.3 \text{ ns}$  [142] ergibt sich ohne Dephasierungsprozesse eine Linienbreite von  $\Gamma = 0.037 \text{ GHz}$ . Die gemessene Linienbreite ist also um einen Faktor 17 breiter als die lebenszeitbegrenzte Linienbreite, was zu einer reinen

Dephasierungszeit von  $T_2^* = 0.52$  ns führt. Ursachen für die reinen Dephasierungsprozesse können zum Beispiel sehr schnelle, lokale Fluktuationen der Proteinumgebung sein. Solch ein Verhalten wurde mittels spektralem Lochbrennens am Reaktionszentrum des Photosystem-II beobachtet [117]. Andererseits ist es auch möglich, dass die Linienverbreiterung auf spektrale Diffusion, die auf einen extrem kleinen spektralen Bereich beschränkt ist, zurückzuführen ist. Auf einem energetisch größeren Maßstab spielt die spektrale Diffusion auf jeden Fall eine wesentliche Rolle. Scannt man den selben spektralen Bereich mehrmals hintereinander, so ist sowohl die Anzahl der Linien, als auch ihre jeweilige spektrale Position in jedem Spektrum verschieden. Auf die der spektralen Diffusion zu Grunde liegenden Proteindynamik soll im Folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

## 5.7 Proteindynamik in LCH-II

### 5.7.1 Energielandschaft von Proteinen

Proteine haben eine wohldefinierte tertiäre Struktur. Betrachtet man diese wie zum Beispiel in Abbildung 4.2 und Abbildung 5.3 in Falle von LH2 und LHC-II dargestellt, so ist das statische Bild eines Proteins, das durch die Abbildung suggeriert wird, sehr irreführend. Proteine sind dynamische Systeme, keine statischen [143].

In komplexen Systemen wie gefalteten Proteinen ist der Grundzustand hochgradig entartet und anstelle eines klar definierten Grundzustands spricht man bei Proteinen von einer „Energielandschaft“. Proteine können also eine große Anzahl isoenergetischer Konformationen (*conformational substates*, CS) annehmen. Die Bewegung eines Proteins kann nun beschrieben werden als Übergang zwischen verschiedenen CS [144;145].

Die Energielandschaft beschreibt die potentielle Energie  $E_c$  des Proteins als Funktion der Konformationskoordinaten und ist eine Hyperfläche im hochdimensionalen Raum der Koordinaten aller Atome des Proteins. Man nimmt an, dass die CS hierarchisch in Rängen (*tiers*) organisiert sind [144], wobei CS niedriger Ränge durch hohe Energiebarrieren getrennt sind, CS höherer Ränge durch geringere Energiebarrieren.

Abbildung 5.16 zeigt eindimensionale Schnitte durch die verschiedenen Ränge der Energielandschaft eines Proteins. Diese hierarchische Organisation unterscheidet Proteine von anderen komplexen Systemen wie zum Beispiel Gläsern, deren Energielandschaft aus einer zufälligen Verteilung von Energiebarrieren besteht.

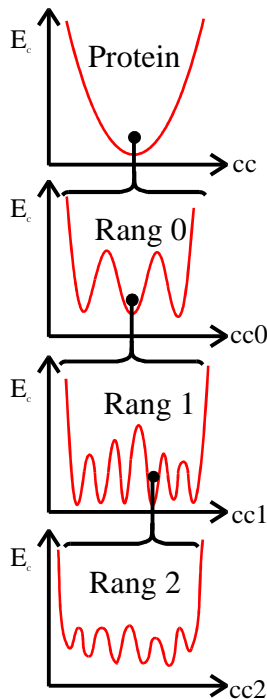


Abbildung 5.16 Energielandschaft der CS. Die potentielle Energie ist Minimal für das gefaltete Protein (oben). Dessen Grundzustand ist jedoch hochgradig entartet, wobei die nahezu isoenergetischen CS hierarchisch in Rängen angeordnet sind, wie Schnitte durch die Energiehyperfläche verdeutlichen (Rang 0 bis Rang 2).

[Abbildung nach Frauenfelder [144], beispielhaft für das Protein Myoglobin erstellt.]

Die optischen Übergänge von in Proteinen eingebetteten Chromophoren reagieren extrem sensitiv auf ihre jeweilige Umgebung. Ein Wechsel der CS des Proteins führt zu einer Änderung der Pigmentumgebung und damit zu einer Änderung des optischen Übergangs. Mit anderen Worten, die Proteindynamik bewirkt spektrale Diffusion. Bei tiefen Temperaturen bieten optisch hochauflösende Spektroskopiemethoden somit einen Zugang zur Untersuchung von Proteindynamik. Dies wurde insbesondere mit zeitaufgelöstem Lochbrennen [117;118;146] und mit Photonecho (*threepulse stimulated photon echo*, 3PSE) [147] durchgeführt.

Die durch die Proteindynamik bedingte spektrale Diffusion lässt sich mit spektralem Lochbrennen über einen Zeitbereich von  $10^{-5}$  –  $10^5$  s untersuchen. Es zeigte sich, dass nur langsame Fluktuationen in den Prozess der Konformationsrelaxation einbezogen sind [117]. Die Verteilung der beteiligten Frequenzen enthält eine obere Grenzfrequenz, die in der Nähe von einigen Hertz liegt. Für Beobachtungszeiten, die deutlich höheren Frequenzen als der Grenz-

frequenz entsprechen, wird das optische Verhalten der Chromophore durch schnelle, lokale Fluktuationen bestimmt, d.h. es liegt eine reine Dephasierung der optischen Übergänge vor, wie es von Gastmolekülen in kristallinen Systemen bekannt ist. Hieraus wird geschlossen, dass die direkte Umgebung der Pigmente starr ist und sich kristallähnlich verhält [117]. Der Grad der spektralen Diffusion ist abhängig von der Größe der Proteine. Je größer ein Protein, desto geringer ist die spektrale Diffusion, bzw. verschwindet für große Proteine vollständig [117].

Weiterhin wird vermutet, dass die Konformationsfluktuationen große Teile bzw. das gesamte Protein betreffen. Dies gilt für jeden Rang. Der Unterschied zwischen verschiedenen Rängen ist die Größe der Auslenkung der Atome des Proteins. Es ist also nicht der Fall, dass unterschiedliche Ränge unterschiedliche Bereiche des Proteins beschreiben [147].

### 5.7.2 Spektrale Diffusion bei tiefen Temperaturen

Die Einzelmolekülspektroskopie bietet eine Möglichkeit, Proteindynamik bei tiefen Temperaturen in Pigment-Protein-Komplexen direkt sichtbar zu machen, indem man die spektrale Diffusion der Spektren als Funktion der Zeit misst.

Um die spektrale Diffusion zu untersuchen, wurden Serien von Emissionsspektren aufgenommen, deren Mittelungszeit  $\Delta t$  so kurz wie möglich gewählt wurde, d.h. die Linien sollen noch deutlich über den Rauschpegel liegen. In Abhängigkeit der Anregungsleistung ( $P_L = 5 - 80 \mu\text{W}$ ) und der Helligkeit des individuellen Komplexes, liegen die Mittelungszeiten im Bereich von  $\Delta t = 2 - 5 \text{ s}$ .

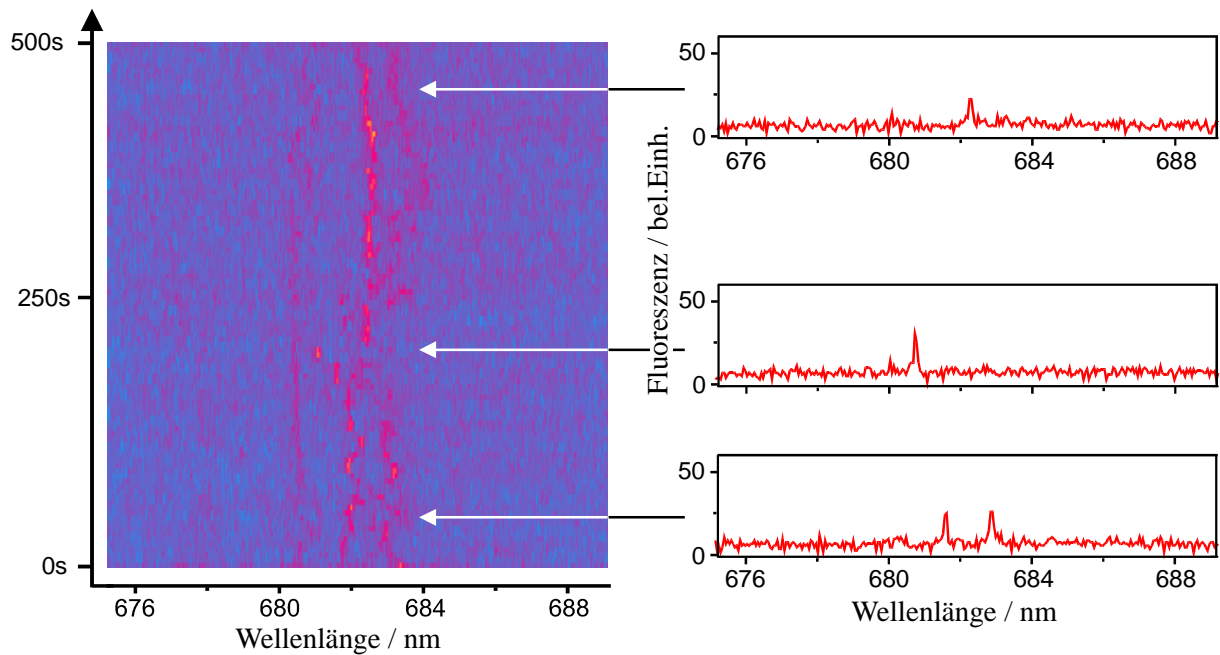


Abbildung 5.17 Serie von 100 Emissionsspektren, die in unmittelbarer Folge gemessen wurden und die zeitliche Entwicklung der spektralen Diffusion zeigen. Die Intensität wird mittels Farbcode von blau (geringe Intensität) über rot zu gelb (hohe Intensität) angegeben. Zur Verdeutlichung sind rechts drei Spektren konventionell dargestellt.

Abbildung 5.17 zeigt eine Serie von 100 Emissionsspektren, deren Mittelungszeit  $\Delta t = 5$  s beträgt bei einer Anregungsleistung von  $P_L = 6 \mu\text{W}$ . Jede Zeile entspricht einem Spektrum, dessen Intensität durch einen Farbcode wiedergegeben ist, bei dem die Intensität von blau über rot zu gelb zunimmt. Zur Veranschaulichung sind auf der rechten Seite der Abbildung drei Spektren konventionell dargestellt. Die Spektren zeigen in der Regel ein oder zwei Linien, in wenigen Fällen auch drei Linien. Diese Linien erscheinen hauptsächlich an zwei spektralen Positionen um 681 nm und 682 nm. Zusätzlich existiert eine sehr schwache Linie um 680 nm, die in den einzelnen Spektren kaum aufgelöst wird.

Schon an diesem Beispiel erkennt man typische, bei fast allen Komplexen auftretende Eigenschaften: Es existieren mehrere spektrale Positionen, an denen Linien auftreten können. Diese spektrale Positionen sind lediglich Mittelwerte für das Erscheinen der Linien im Spektrum.

Die Breite der Verteilung um diesen Mittelwert ist unterschiedlich für verschiedene Komplexe und beträgt zwischen  $10 \text{ cm}^{-1}$  und  $50 \text{ cm}^{-1}$ . Die Lage der spektralen Positionen variiert sehr stark zwischen unterschiedlichen Komplexen, die Proteinumgebung der emittierenden Pigmente ist also ebenfalls unterschiedlich. Dies ist der Grund für die starke inhomogene Verbreiterung des Fluoreszenzspektrums von Ensembles von  $175 \text{ cm}^{-1}$  [139]. Da pro Trimer drei emittierende Zustände existieren, erwartet man je nach Orientierung des Trimers in der PVA-Matrix und Proteinumgebung der jeweiligen Emitter ein bis drei spektrale Positionen in den Serien von Spektren. Wie Abbildung 5.18 zeigt, ist dies nicht der Fall. Es wurden Spektren mit bis zu acht spektralen Positionen gefunden. Hierfür gibt es zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

- Die spektralen Positionen existieren ebenfalls aufgrund der spektralen Diffusion und würden dann CS eines höheren Ranges zugeordnet. Jede spektrale Position entspräche dann dem Minimum der Energielandschaft eines bestimmten Ranges, während die Sprünge um die Mittenposition CS des nächst höheren Ranges widerspiegeln.
- Wie in Abschnitt 5.4.5 gezeigt wurde, emittieren innerhalb der Monomere bei Raumtemperatur verschiedene Chl *a*-Moleküle abwechselnd. Diese Moleküle haben verschiedene Proteinumgebungen und sollten somit unterschiedliche spektrale Positionen haben. Ist nun das Verhalten der Monomere bei tiefen Temperaturen identisch zum Verhalten bei Raumtemperatur, so wäre dies eine Erklärung für die teilweise vielen Linien. Leider zeigen die Monomere bei tiefen Temperaturen eine zu geringe Fluoreszenzintensität, um Phasensprünge in der Polarisierung zu messen.



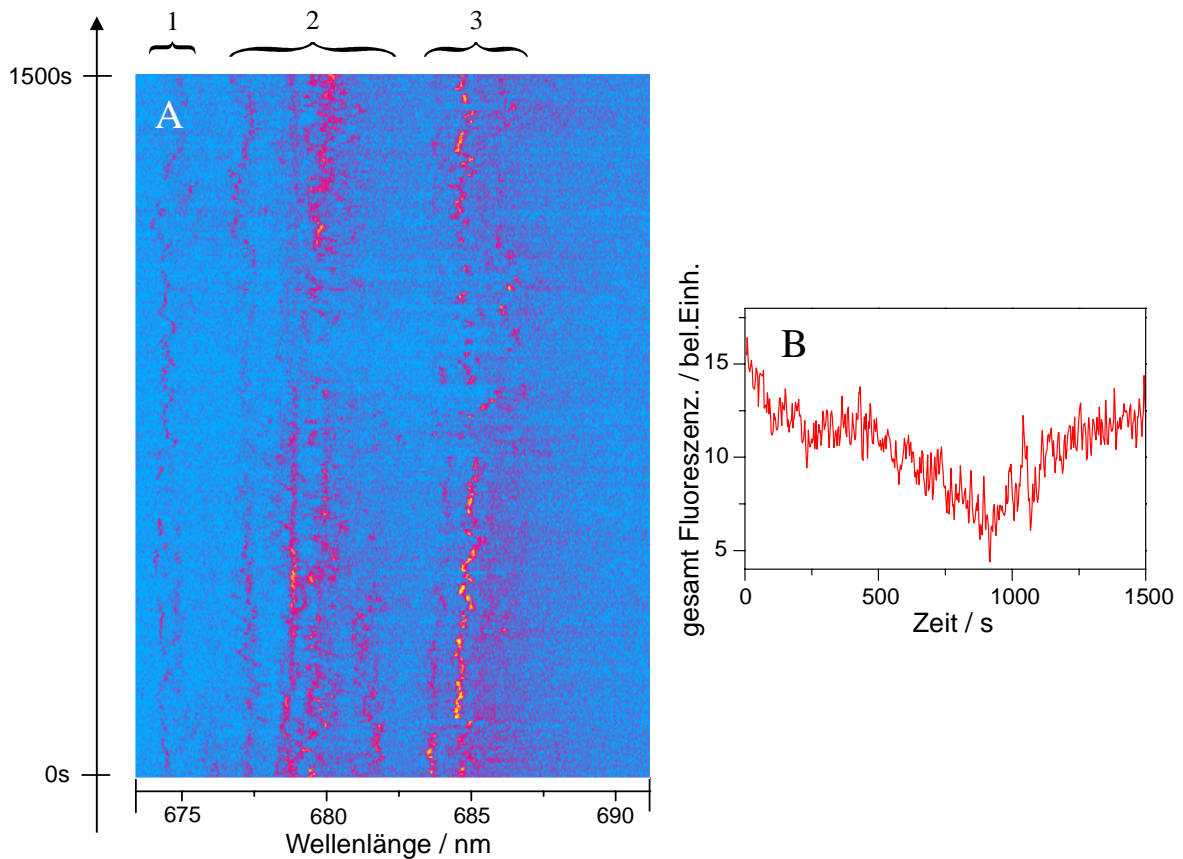


Abbildung 5.18 (A) Serie von 500 Emissionsspektren bei  $T = 1.8\text{ K}$ . Mittelungszeit war  $\Delta t = 3\text{ s}$  bei einer Anregungsleistung von  $P_L = 23\mu\text{W}$ . Es wurde der selbe Farbcode verwendet, wie in der vorherigen Abbildung. Das Verhalten der Intensitäten in den Bereichen 1 – 3 unterscheidet sich voneinander (siehe Text). (B) Zeitliches Verhalten der integrierten Fluoreszenz. Auffällig ist der reversible Einbruch der Intensität um 900 s.

Werden einzelne Komplexe über einen längeren Zeitraum intensiv angeregt, so nimmt die Fluoreszenzintensität in den meisten Fällen langsam ab. Dieser Vorgang ist nicht mit dem schrittweisen Bleichen der Fluoreszenz bei Raumtemperatur vergleichbar, sondern geschieht vielmehr kontinuierlich über einen längeren Zeitraum und ist teilweise reversibel. Abbildung 5.18A zeigt eine Serie von 500 Fluoreszenzspektren eines Trimers die mit einer Mittelungszeit von 3 s pro Spektrum hintereinander aufgenommen wurden. Die Gesamtintensität (also die über den dargestellten spektralen Bereich integrierte Fluoreszenz) ist in Abbildung 5.18B über einen Zeitraum von 25 Minuten dargestellt. Sie fällt bis zum Zeitpunkt  $t = 900\text{ s}$  langsam ab um sich dann wieder fast bis zum Ausgangswert zu erholen. Betrachtet man das zeitliche Verhalten der einzelnen Linien, so ergeben sich drei verschiedene Verhaltensweisen im Zeit-

bereich 750 – 1000 s, also dem Bereich schwächster Fluoreszenzintensität: im Bereich 1 um 675 nm bleibt die Intensität der Linien konstant. Im Bereich 2 nimmt die Intensität der Linien erst kontinuierlich ab und dann wieder zu, während im Bereich 3 die Intensität der Linien entweder unverändert ist oder vollständig verschwindet, so dass die Linien zu blinken scheinen. Würden sich alle Linien so verhalten wie die in Bereich 2, so käme eine Änderung des Absorptionsquerschnitts für die Anregungswellenlänge 647 nm als Erklärung für das Abnehmen der Fluoreszenz in Frage. Da aber die Linien im Bereich 1 unverändert bleiben, kann dies nicht der Fall sein. Eine andere mögliche Erklärung ist die Änderung der photophysikalischen Eigenschaften aufgrund von Konformationsänderungen des Proteins. Es ist bekannt, dass LHC-II-Komplexe bei Raumtemperatur eine Vielzahl von Schutzmechanismen besitzen, um eine Zerstörung durch übermäßige Lichteinstrahlung zu verhindern, die sich durch ein Quenchen der Fluoreszenz bemerkbar machen. In erster Linie werden die Umlagerung von relativ lose gebundenen Car-Molekülen (Xanthophyll-Zyklus) [148;149], Aggregation in der Membran oder Konformationsänderungen aufgrund der Protonierung verschiedener Aminosäuren bei Erhöhung des pH-Werts diskutiert [150;151]. Abbildung 5.18 zeigt, dass auch bei tiefen Temperaturen die Fluoreszenz von LHC-II-Trimeren gequencht werden kann. Es fragt sich, ob dieser Vorgang Bestandteil des Schutzmechanismus der LHC-II-Komplexe ist oder ob es sich um eine teilweise Zerstörung des Komplexes handelt, so dass der Energietransfer innerhalb des Komplexes nicht mehr einwandfrei funktioniert. Im ersten Fall könnten, durch Konformationsänderungen gesteuert, Kanäle für einen strahlungslosen Übergang in den Grundzustand geöffnet werden.

## 5.8 Fazit

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, Experimente an individuellen LHC-II-Komplexen durchzuführen. An Hand von Polarisationsmessungen konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei Raumtemperatur als auch bei tiefen Temperaturen drei emittierende Zustände pro Trimer gibt, einen pro monomerischer Untereinheit. Die Fluoreszenz von monomerischen LHC-II-Komplexen ist linear polarisiert, was entweder aufgrund stark unterschiedlicher photophysikalischer Parameter der Chl *a*-Moleküle oder aufgrund irreversiblen Energietransfers zwi-

schen den Chl *a*-Molekülen zu Stande kommt. Phasensprünge in der Polarisation deuten eher auf einen unterschiedlichen Energietransfer hin, so dass die Emission von verschiedenen Chl-Molekülen stammt, aber zu einem Zeitpunkt immer nur ein Chl-Molekül emittiert.

Trimerische LHC-II-Komplexe zeigen bei Raumtemperatur ein Bleichverhalten in drei Schritten, was auf eine nur schwache Kopplung zwischen den monomerischen Untereinheiten schließen lässt. Dies wird unterstützt durch die sehr schmalen Linien in Emissions- und Anregungsspektren bei tiefen Temperaturen.

Emissionsspektren von einzelnen Komplexen enthalten eine unterschiedlich große Anzahl an spektralen Positionen, an denen Emissionslinien erscheinen können, wobei Monomere oft mehr als eine spektrale Position und Trimere deutlich mehr als drei spektrale Positionen aufweisen. Im Durchschnitt zeigen Trimere mehr Linien als Monomere. Die Emissionsspektren zeigen eine ausgeprägte spektrale Diffusion, die auf zwei unterschiedlich großen energetischen Skalen abläuft: Zum einen gibt es energetisch kleinere Sprünge ( $\Delta E \sim 10 \text{ cm}^{-1}$ ) um die Mittelwerte der spektralen Positionen, an denen Linien erscheinen können, und zum anderen existieren energetisch größere Sprünge ( $\Delta E \sim 100 \text{ cm}^{-1}$ ) zwischen diesen spektralen Positionen. Die Ursache für die energetisch kleineren Sprünge ist Proteindynamik: Durch Konformationsänderungen ändert sich die Umgebung des emittierenden Chl-Moleküls, was eine leichte Verschiebung des optischen Übergangs nach sich zieht. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie ist es erstmals möglich, Konformationsänderungen direkt quantitativ sichtbar zu machen. Die energetisch größeren Sprünge können ihre Ursache entweder in Konformationsänderungen eines höheren Ranges der Energielandschaft des Proteins haben oder in Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften der emittierenden Chl-Moleküle analog zu den Beobachtungen bei Raumtemperatur.

Es wurde die Möglichkeit gezeigt, Anregungsspektren von Trimeren zu messen. Diese besitzen sowohl sehr schmalbandige Linien, die den emittierenden Zuständen zugeordnet werden, als auch breite Linien, die höherenergetischen Zuständen zugeordnet werden. Aus der Linienbreite lässt sich die Energietransferzeit zu den emittierenden Zuständen ( $\sim 10 \text{ ps}$ ) direkt ablesen. An dieser Stelle bietet sich ein Ausblick an: Anregungsspektroskopie eröffnet die Möglichkeit zur Bestimmung der Übergangsdipolmomente der Chl-Moleküle des Komplexes sowie eine Zuordnung dieser zu den Strukturdaten. Dies kann mit mutierten LHC-II-Komplexen, denen jeweils ein Chl-Molekül fehlt, realisiert werden, d.h. mit rekonstituierten

Komplexen [126]. Diese sind jedoch instabiler als native Komplexe und zeigen bei tiefen Temperaturen eine geringere Fluoreszenzintensität. Hier muss zuerst geklärt werden, ob es durch geänderte Präparations- und Lagerungstechniken möglich ist, ausreichend stark fluoreszierende LHC-II-Mutanten herzustellen. Das Fehlen der Information der Dipolorientierung der Chl-Moleküle innerhalb des Komplexes stellt ein zentrales Problem bei der Auswertung und Modellierung der meisten spektroskopischen Daten dar. Ihre Aufklärung würde einen großen Schritt im Verständnis des wichtigsten Antennenkomplexes höherer Pflanzen liefern.

## Kapitel 6

### Zusammenfassung

Die Einzelmoleküldetektion hat sich während der Dauer dieser Dissertation rapide weiterentwickelt. Allein in den Jahren 1999/2000 sind mehr Publikationen zum Thema „einzelne Moleküle“ erschienen, als in dem gesamten Zeitraum zuvor. Viele neue Messmethoden und Systeme wurden der Einzelmoleküldetektion zugänglich gemacht. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Systeme untersucht: Farbstoffmoleküle in Kapitel 3, Antennenkomplexe von Purpurbakterien (LH2) in Kapitel 4 und Antennenkomplexe höherer Pflanzen und Algen (LHC-II) in Kapitel 5. Da diese Teilberichte in sich geschlossen sind, wurde jeweils am Ende des Kapitels ein zusammenfassendes Fazit gezogen. Da darin sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit enthalten sind, werden sie hier noch einmal zusammengestellt.

Kapitel 3 beschreibt den Nachweis einzelner Farbstoffmoleküle in einer Polymermatrix mittels konfokaler Mikroskopie bei Raumtemperatur. R6G-, SR101 und OX1-Moleküle zeigen ein ausgeprägtes dynamisches Verhalten. Sprunghafter Wechsel zwischen maximaler Fluoreszenzintensität und Untergrundniveau (*random telegraph signal*), Rückkehr der maximalen Intensität nach langen Dunkelphasen und schneller Wechsel zwischen verschiedenen Intensitätsniveaus sind die wesentlichen Beispiele.

Im Falle von SR101- und R6G-Molekülen zeigen sich häufig Fluoreszenz-Korrelationen, während diese bei OX1-Molekülen nur in sehr wenigen Fällen auftreten. Als Mechanismus, der für die Korrelationen in der Fluoreszenzintensität verantwortlich ist, wird eine sprunghafte Änderung der Absorptionsfrequenz der einzelnen Moleküle vorgeschlagen. Die Größe dieser Sprünge lässt sich aus dem Kontrast  $C$  der Korrelationsfunktion abschätzen und liegt im Größenbereich von 3–30 nm. Der größte Teil der OX1-Moleküle, aber auch viele SR101- und R6G-Moleküle, zeigen innerhalb der Messgenauigkeit keine Korrelationen. Beachtet man, dass das Signal-Rausch-Verhältnis eine Genauigkeit in der Bestimmung von  $C$  in der Größenordnung  $C = 0.01$  zulässt, so ergeben sich für diese Moleküle nach Gleichung (15, Abschnitt 3.4.4) Frequenzänderungen von  $\Delta\nu_s = 0.5 \times \Delta\nu_{hom}$ . Offensichtlich zeigen fast alle OX1-Moleküle nur deutlich kleinere Frequenzsprünge. Dies erklärt auch, warum nur ca. 20% der SR101-Moleküle Korrelationen zeigen, obwohl Farbstoffmoleküle in nahezu jedem Fall spektrale Sprünge im Emissionsspektrum aufweisen [65]. Hier zeigt sich eine Beschränkung der Anwendbarkeit der Korrelationsspektroskopie auf einzelne Farbstoffmoleküle bei Raumtemperatur. Ein Steigern des Signal-Rausch-Verhältnisses wäre notwendig, um auch kleinere spektrale Sprünge mit dieser Messmethode zu detektieren.

Die Korrelationszeiten zeigen eine bimodale Verteilung. Dies deutet auf eine hierarchische Struktur der potentiellen Energielandschaft hin, die die unmittelbare Umgebung der Moleküle bestimmt. Diese wird durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlich hohen Barrieren bestimmt.

Als mögliche physikalische Ursache für die spektralen Sprünge wurden Änderungen der sterischen Hemmung vorgeschlagen. Die hypsochromische Verschiebung ändert sich je nachdem wie stark die sterischen Spannungen durch molekulare Deformationen abgebaut werden können. Bei diesen Deformationen handelt sich wahrscheinlich um Rotationen einzelner chemischer Gruppen, die durch Einzelbindungen mit dem Farbstoffmolekül verbunden sind.

In Kapitel 4 wurden einzelne LH2-Komplexe von Purpurbakterien mittels Polarisations- und Emissionsspektroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass die  $C_9$ -Symmetrie des ringförmigen Aggregats gestört ist, weshalb zwei Modelle aufgestellt und zur Erklärung der Messergebnisse herangezogen wurden:

1. Im B850-Ring herrscht eine große Variation der Site-Energien von  $w = 1200 \text{ cm}^{-1}$  vor, so dass das Exziton auf dem Ring lokalisiert. Dieses Modell erklärt den gemessenen Polarisationsgrad der Fluoreszenz, sagt aber eine größere Variation der Maxima der Fluoreszenzspektren voraus, als tatsächlich gefunden wurde. Der Wert für die hier gefundene diagonale Unordnung ist zudem deutlich größer, als die üblicherweise in der Literatur verwendeten Werte<sup>8</sup>, die von  $200 \text{ cm}^{-1}$  [101] bis zu  $700 \text{ cm}^{-1}$  [104] reichen.

2. Die Variation der Site-Energien innerhalb des B850-Rings ist mit  $w = 400 \text{ cm}^{-1}$  nur mäßig stark und zusätzlich ist das gesamte Aggregat elliptisch deformiert (Exzentrizität  $\epsilon = 0.5$ ). Dieses Modell erklärt ebenfalls den hohen Polarisationsgrad, liegt aber, was die Verteilung der Maxima der Fluoreszenzspektren angeht, deutlich näher beim gemessenen Wert, als das erste Modell. Auch der Wert für die diagonale Unordnung ist vergleichbar mit verschiedenen Ensemble-Messungen (z.B.  $450 \text{ cm}^{-1}$  [102]).

Aus obigen Aussagen ergibt sich ein Gesamtbild, das für das zweite Modell spricht. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse anderer Arbeiten an einzelnen LH2-Komplexen. Sowohl bei tiefen Temperaturen [44] als auch bei Raumtemperatur [115] wird eine elliptische Deformation des gesamten Rings festgestellt, wobei im ersten Fall eine Exzentrizität von  $\epsilon = 0.52$  bestimmt wird, die der hier gemessenen Exzentrizität fast genau entspricht.

Hier soll noch kurz auf zwei neuere Arbeiten eingegangen werden, die sich mit der Delokalisierung des Exzitons als Funktion der Zeit [120], bzw. mit der Bildung eines Polarons in LH2 bei tiefen Temperaturen beschäftigen [104].

Erstere kommt zum Ergebnis, dass das Exziton unmittelbar nach der Anregung über den ganzen Ring delokalisiert ist und dann auf einer kleinen Untergruppe von BChl-Molekülen lokalisiert wird (*self-trapping*), d.h. die Absorption geschieht in den gesamten Ring, die Emission nur von wenigen BChl-Molekülen. Dazu passend wird in der zweiten Arbeit die Bildung eines Polarons (ein elektronischer Zustand begleitet von einer dauerhaften Gitterdeformation) postuliert. Dieses Polaron ist dann auf einem einzigen BChl-Molekül lokalisiert. Das in Ref. [104] verwendete Modell ist extrem einfach: Die Site-Energie eines BChl-Moleküls wird stark abgesenkt und die Wechselwirkung zu den Nachbarmolekülen verringert, was zu einem Polarisationsgrad von  $p \approx 1$  führt. Auch die nach dieser Methode berechneten Spektren stim-

---

<sup>8</sup> Der Wert  $125 \text{ cm}^{-1}$  aus Ref. [44] wurde nach genaueren Analysen auf  $250 \text{ cm}^{-1}$  korrigiert [152].

men mit den hier gemessenen Spektren in Linienform und Verteilung der Maxima nicht überein. Passt man das einfache Polaronmodell an die Messwerte dieser Arbeit an, so muss die Abschirmung des Polarons um mindestens Faktor zwei gegenüber den Werten aus Ref. [104] zurückgenommen werden. Generell ist „Polaron“ ein sehr abstrakter Begriff, der keine genauen Angaben über die Art der Gitterdeformation, bzw. hier der Ringdeformation macht, so dass die hier benutzte elliptische Verzerrung vielleicht gar nicht weit entfernt ist von der Verzerrung die in Ref. [104] als Polaron beschrieben wird. Um dies zu klären muss einerseits das Polaronmodell deutlich verbessert werden und zum anderen eine genauere Bestimmung des Polarisationsgrads einzelner LH2-Komplexe als Funktion der Temperatur bestimmt werden.

Kapitel 5 behandelt Antennenkomplexe höherer Pflanzen (LHC-II). In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, Experimente an individuellen LHC-II-Komplexen durchzuführen. An Hand von Polarisationsmessungen konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Raumtemperatur als auch bei tiefen Temperaturen drei emittierende Zustände pro Trimer gibt, einen pro monomerischer Untereinheit. Die Fluoreszenz von monomeren LHC-II-Komplexen ist linear polarisiert, was entweder aufgrund stark unterschiedlicher photophysikalischer Parameter der Chl *a*-Moleküle oder aufgrund irreversiblen Energietransfers zwischen den Chl *a*-Molekülen zu Stande kommt. Phasensprünge in der Polarisation deuten eher auf einen unterschiedlichen Energietransfer hin, so dass die Emission von verschiedenen Chl-Molekülen stammt, aber zu einem Zeitpunkt immer nur ein Chl-Molekül emittiert.

Trimerische LHC-II-Komplexe zeigen bei Raumtemperatur ein Bleichverhalten in drei Schritten, was auf eine nur schwache Kopplung zwischen den monomeren Untereinheiten schließen lässt. Dies wird unterstützt durch die sehr schmalen Linien in Emissions- und Anregungsspektren bei tiefen Temperaturen.

Emissionsspektren von einzelnen Komplexen enthalten eine unterschiedlich große Anzahl an spektralen Positionen, an denen Emissionslinien erscheinen können, wobei Monomere oft mehr als eine spektrale Position und Trimere deutlich mehr als drei spektrale Positionen aufweisen. Im Durchschnitt zeigen Trimere mehr Linien als Monomere. Die Emissionsspektren zeigen eine ausgeprägte spektrale Diffusion, die auf zwei unterschiedlich großen energetischen Skalen abläuft: Zum einen gibt es energetisch kleinere Sprünge ( $\Delta E \sim 10 \text{ cm}^{-1}$ ) um die Mittelwerte der spektralen Positionen, an denen Linien erscheinen können, und zum anderen existieren energetisch größere Sprünge ( $\Delta E \sim 100 \text{ cm}^{-1}$ ) zwischen diesen spektralen Positio-



nen. Die Ursache für die energetisch kleineren Sprünge ist Proteindynamik: Durch Konformationsänderungen ändert sich die Umgebung des emittierenden Chl-Moleküls, was eine leichte Verschiebung des optischen Übergangs nach sich zieht. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie ist es erstmals möglich, Konformationsänderungen direkt quantitativ sichtbar zu machen. Die energetisch größeren Sprünge können ihre Ursache entweder in Konformationsänderungen eines höheren Ranges der Energielandschaft des Proteins haben oder in Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften der emittierenden Chl-Moleküle analog zu den Beobachtungen bei Raumtemperatur.

Es wurde die Möglichkeit gezeigt, Anregungsspektren von Trimeren zu messen. Diese besitzen sowohl sehr schmalbandige Linien, die den emittierenden Zuständen zugeordnet werden, als auch breite Linien, die höherenergetischen Zuständen zugeordnet werden. Aus der Linienbreite lässt sich die Energietransferzeit zu den emittierenden Zuständen ( $\sim 10$  ps) direkt ablesen.

Aktuell wird die Einzelmoleküldetektion auf andere Pigment-Protein-Komplexe erweitert, wie dem Photosystem I von Cyanobakterien [47]. An LH1 von Purpurbakterien sowie dem ehrgeizigen Ziel, ein einzelnes Photosystem in Funktion zu untersuchen, wird bereits gearbeitet. Eine Vielzahl weiterer Pigment-Protein-Komplexe bietet sich von den photophysikalischen Parametern für die Einzelmoleküldetektion an.

Vielversprechend ist auch der Ansatz, die Pigment-Protein-Komplexe nicht isoliert, sondern in ihrer natürlichen Umgebung – also in Membranen – zu untersuchen. So ließe sich klären, inwieweit der Prozess der Isolierung die optischen und strukturellen Eigenschaften der Komplexe ändert. Auch eine Kombination von optischer Mikroskopie und Kraftmikroskopie ist denkbar. Hier könnte man die Änderung der optischen Eigenschaften durch gezielte äußere Störungen der Proteine verfolgen.

Durch die großen Fortschritte der Biochemie in den letzten Jahren ist es möglich, gezielte Punktmutationen standardmäßig durchzuführen. Auch diesbezüglich bieten sich vielfältige zukünftige Untersuchungsmöglichkeiten an, wie das Anbringen von Farbstoff-Labeln oder Ankern an wohldefinierte Stellen der Proteinkette. Auch Mutationen, die zur Erhöhung bzw. Erniedrigung der Stabilität des Komplexes führen oder die Wechselwirkung zu anderen Proteinen hemmen bzw. verstärken, sind denkbar.

Diese kurze Zusammenstellung zeigt, dass auch in Zukunft Pigment-Protein-Komplexe ein interessantes Studienobjekt der Einzelmoleküldetektion bleiben werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] Schrödinger, E. *Br. J. Philos.* (1952) 233
- [2] Paul, W. *Nobel Lecture*, Stockholm, 1989
- [3] Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. *Phys. Rev. Lett.* **49** (1982) 57
- [4] Moerner, W. E.; Kador, L. *Phys. Rev. Lett.* **62** (1989) 2535
- [5] Orrit, M.; Bernard, J. *Phys. Rev. Lett.* **65** (1990) 2716
- [6] Shera, E. B.; Seitzinger, N. K.; Davis, L. M.; Keller, R. A.; Soper, S. A. *Chem. Phys. Lett.* **174** (1990) 553
- [7] Bernard, J.; Fleury, L.; Talon, H.; Orrit, M. *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 850
- [8] Ambrose, W. P.; Goodwin, P. M.; Enderlein, J.; Semin, D. J.; Martin, J. C.; Keller, R. A. *Chem. Phys. Lett.* **269** (1997) 365
- [9] Basché, Th.; Moerner, W. E.; Orrit, M.; Talon, H. *Phys. Rev. Lett.* **69** (1992) 1516
- [10] Zumbusch, A.; Fleury, L.; Brown, R.; Bernard, J.; Orrit, M. *Phys. Rev. Lett.* **70** (1993) 3584
- [11] Moerner, W. E.; Plakhotnik, T.; Irgartinger, Th.; Croci, M.; Palm, V.; Wild, U. P. *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 7382
- [12] Köhler, J.; Disselhorst, J. A. J. M.; Donckers, M. C. J. M.; Groenen, E. J. J.; Schmidt, J.; Moerner, W. E. *Nature* **363** (1993) 242
- [13] Wrachtrup, J.; von Borczyskowski, C.; Bernard, J.; Orrit, M.; Brown, R. *Nature* **363** (1993) 244
- [14] Basché, Th., Moerner, W. E., Orrit, M., and Wild, U. P. *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*, Verlag Chemie, Weinheim, 1997

- [15] Ambrose, W. P.; Goodwin, P. M.; Martin, J. C.; Keller, R. A. *Science* **265** (1994) 364
- [16] Betzig, E.; Chichester, R. J. *Science* **262** (1993) 1422
- [17] Trautman, J. K.; Macklin, J. J.; Brus, L. E.; Betzig, E. *Nature* **369** (1994) 40
- [18] Xie, X. S.; Dunn, R. C. *Science* **265** (1994) 361
- [19] Macklin, J. J.; Trautman, J. K.; Harris, T. D.; Brus, L. E. *Science* **272** (1996) 255
- [20] Schmidt, Th.; Schütz, G. J.; Baumgartner, W.; Gruber, H. J.; Schindler, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995)
- [21] Funatsu, T.; Harada, Y.; Tokunaga, M.; Saito, K.; Yanagida, T. *Nature* **374** (1995) 555
- [22] Sase, I.; Miyata, H.; Corrie, J. E. T.; Craik, J. S.; Kinosita, K. *Biophys. J.* **69** (1995) 323
- [23] Vale, R. D.; Funatsu, T.; Pierce, D. W.; Romberg, L.; Harada, Y.; Yanagida, T. *Nature* **380** (1996) 451
- [24] Schmidt, Th.; Schütz, G. J.; Baumgartner, W.; Gruber, H. J.; Schindler, H. *J. Chem. Phys.* (1995)
- [25] Kinosita, K.; Yasuda, R.; Noji, H.; Ishiwata, S.; Yoshida, M. *Cell* **93** (1998) 21
- [26] Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M.; Kinosita, K. *Nature* **386** (1997) 299
- [27] Yasuda, R.; Noji, H.; Kinosita, K.; Yoshida, M. *Cell* **93** (1998) 1117
- [28] Harada, Y.; Funatsu, T.; Murakami, K.; Nonoyama, Y.; Ishihama, A.; Yanagida, T. *Biophys. J.* **76** (1999) 709
- [29] Lu, H. P.; Xun, L.; Xie, X. S. *Science* **282** (1998) 1877

- [30] Ha, T.; Ting, A. Y.; Liang, J.; Caldwell, W. B.; Daniz, A. A.; Chemla, D. S.; Schultz, P. G.; Weiss, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 893
- [31] Ha, T.; Zhuang, X.; Kim, H. D.; Orr, J. R.; Williamson, J. R.; Chu, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 9077
- [32] Nirmal, M.; Dabbousi, B. O.; Bawendi, M. G.; Macklin, J. J.; Trautman, J. K.; Harris, T. D.; Brus, L. E. *Science* **383** (1996) 802
- [33] Gruber, A.; Dräbenstedt, A.; Tietz, C.; Fleury, L.; Wrachtrup, J.; von Borczyskowski, C. *Science* **276** (1997) 2012
- [34] Tamarat, Ph.; Lounis, B.; Bernard, J.; Orrit, M.; Kummer, S.; Kettner, R.; Mais, S.; Basché, Th. *Phys. Rev. Lett.* **75** (1995) 1514
- [35] Lounis, B.; Jelezko, F.; Orrit, M. *Phys. Rev. Lett.* **78** (1997) 3673
- [36] Smith, S. B.; Cui, Y.; Bustamante, C. *Science* **271** (1996) 795
- [37] Strick, T. R.; Allemand, J.-F.; Bensimon, D.; Bensimon, A.; Croquette, V. *Science* **271** (1996) 1835
- [38] Yin, H.; Wang, M. D.; Svoboda, K.; Landick, R.; Block, S. M.; Gelles, J. *Science* **270** (1995) 1653
- [39] Keller Mayer, M. S. Z.; Smith, S. B.; Granzier, H. L.; Bustamante, C. *Science* **276** (1997) 1112
- [40] Rief, M.; Gautel, M.; Oesterhelt, F.; Fernandez, J. M.; Gaub, H. E. *Science* **276** (1997) 1109
- [41] Grandbois, M.; Beyer, M.; Rief, M.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. E. *Science* **283** (1999) 1727
- [42] Bopp, M. A.; Jia, Y.; Li, L.; Cogdell, R.; Hochstrasser, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 10630

- [43] van Oijen, A. M.; Ketelaars, M.; Köhler, J.; Aartsma, T. J.; Schmidt, J. *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 9363
- [44] van Oijen, A. M.; Ketelaars, M.; Köhler, J.; Aartsma, T. J.; Schmidt, J. *Science* **285** (1999) 400
- [45] Tietz, C.; Chekhlov, O.; Dräbenstedt, A.; Schuster, J.; Wrachtrup, J. *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 6328
- [46] Tietz, C.; Gerken, U.; Jelezko, F.; Wrachtrup, J. *Single Mol.* **1** (2000) 67
- [47] Jelezko, F.; Tietz, C.; Gerken, U.; Wrachtrup, J.; Bittl, R. *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 8093
- [48] Webb, R. H. *Rep. Prog. Phys.* **59** (1996) 427
- [49] Pawley, J. B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York, 1989
- [50] Dräbenstedt, A.; Fleury, L.; Tietz, C.; Jelezko, F.; Kilin, S.; Nizovtzev, A.; Wrachtrup, J. *J. Phys. Rev. B* **60** (1999) 11503
- [51] Lukosz, W. *J. Opt. Soc. Am.* **69** (1979) 1495
- [52] Lányi, S.; Ozvold, M. *Ultramicroscopy* (1992) 1664
- [53] Desogus, S.; Lányi, S.; Nerino, R.; Picotto, G. P. *J. Vac. Sci. Technol. B* **12** (1994) 1665
- [54] Dräbenstedt, A. *Hochauflösende Spektroskopie und Mikroskopie einzelner Moleküle und Farbzentren bei tiefen Temperaturen* Dissertation, TU Chemnitz, 1999
- [55] Deniz, A. A.; Laurence, T. A.; Beligere, G. S.; Dahan, M.; Martin, A. B.; Chemla, D. S.; Dawson, P. E.; Schultz, P. G.; Weiss, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 5179
- [56] Weiss, S. *Science* **283** (1999) 1676

- [57] Boiron, A. M.; Lounis, B.; Orrit, M. *J. Chem. Phys.* **105** (1996) 3969
- [58] Kummer, S.; Mais, S.; Basché, Th. *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 17078
- [59] Tietz, C.; Daum, R.; Dräbenstedt, A.; Fleury, L.; Wrachtrup, J.; von Borczyskowski, C. *Chem. Phys. Lett.* **282** (1998) 164
- [60] Ambrose, W. P.; Goodwin, P. M.; Martin, J. C.; Keller, R. A. *Phys. Rev. Lett.* **72** (1994) 160
- [61] Ha, T.; Enderle, Th.; Chemla, D. S.; Selvin, P. R.; Weiss, S. *Chem. Phys. Lett.* **271** (1997) 1
- [62] Bopp, M. A.; Meixner, A. J.; Tarrach, G.; Zoschke-Gränacher, I.; Novotny, L. *Chem. Phys. Lett.* **263** (1996) 721
- [63] Lieberherr, M.; Fattinger, C.; Lukosz, W. *Surf. Sci.* **189** (1987) 954
- [64] Ha, T.; Enderle, Th.; Chemla, D. S.; Selvin, P. R.; Weiss, S. *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3979
- [65] Lu, H. P.; Xie, X. S. *Nature* **385** (1997) 143
- [66] Brooks Shera, E.; Seitzinger, N. K.; Davis, L. M.; Keller, R. A.; Soper, S. A. *Chem. Phys. Lett.* **174** (1990) 553
- [67] Phillips, W. A. *J. Low Temp. Phys.* **7** (1972) 351
- [68] Anderson, P. W.; Halperin, B. I.; Varma, C. M. *Philos. Mag.* **25** (1972) 1
- [69] Brown, R.; Orrit, M. in *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy* Basché, Th.; Moerner, W. E.; Orrit, M.; Wild, U. P. (Ed.), VCH, Weinheim, 1997 S.109-142
- [70] Baudour, J. L.; Delugeard, Y.; Cailleau, H. *Acta Cryst.* **B32** (1976) 150
- [71] Basché, Th.; Kummer, S.; Bräuchle, C. *Nature* **373** (1995) 132

- [72] Kulzer, F.; Kummer, S.; Matzke, R.; Bräuchle, C.; Basché, Th. *Nature* **387** (1997) 688
- [73] Ambrose, W. P.; Basché, Th.; Moerner, W. E. *J. Chem. Phys.* **95** (1991) 7150
- [74] Reilly, P. D.; Skinner, J. L. *J. Chem. Phys.* **102** (1995) 1540
- [75] Reilly, P. D.; Skinner, J. L. *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 965
- [76] Reilly, P. D.; Skinner, J. L. *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 959
- [77] Palmer, R. G.; Stein, D. L.; Abrahams, E.; Anderson, P. W. *Phys. Rev. Lett.* **53** (1984) 958
- [78] Meixner, A. J.; Weber, M. A. *J. Lumin.* **86** (2000) 181
- [79] Rademacher, P. *Strukturen organischer Moleküle*, VCH, Weinheim, 1987
- [80] Klessinger, M. and Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH, Weinheim, 1995
- [81] Stracke, F.; Blum, C.; Becker, S.; Müllen, K.; Meixner, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **325** (2000) 196
- [82] McDermott, G.; Prince, S. M.; Friend, R. H.; Hawthornthwaite-Lawless, A. M.; Papiz, A. M.; Cogdell, R. J.; Isaacs, N. W. *Nature* **374** (1995) 517
- [83] Koepke, J.; Hu, X.; Muenke, C.; Schulten, K.; Michel, H. *Structure* **4** (1996) 581
- [84] Kühn, O.; Sundström, V. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 3432
- [85] Ma, Y.-Z.; Cogdell, R. J.; Gillbro, T. *J. Phys. Chem.* **101** (1997) 1087
- [86] Monshouwer, R.; van Grondelle, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1275** (1996) 70
- [87] van den Laan, H.; Schmidt, Th.; Visscher, R. W.; Visscher, K. J.; van Grondelle, R.; Völker, S. *Chem. Phys. Lett.* **170** (1990) 231



- [88] Wu, H.-M.; Savikhin, S.; Reddy, N. R. S.; Jankowiak, R.; Cogdell, R. J.; Struve, W. S.; Small, G. J. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 12022
- [89] van Oijen, A. M.; Ketelaars, M.; Köhler, J.; Aartsma, T. J.; Schmidt, J. *Biophys. J.* **78** (2000) 1570
- [90] Papiz, M. Z.; Prince, S. M.; Hawthornthwaite-Lawless, A. M.; McDermott, G.; Freer, A. A.; Isaacs, N. W.; Cogdell, R. J. *Trends Plant Sci.* **1** (1996) 198
- [91] Hu, X.; Damjanovic, A.; Ritz, T.; Schulten, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 5935
- [92] Hawthornthwaite, A. M.; Cogdell, R. J. in *Chlorophylls* Scheer, H. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991 S.493-528
- [93] Kramer, H.; Mathis, P. *Biochim. Biophys. Acta* **593** (1980) 319
- [94] Pullerits, T.; Hess, S.; Herek, J. L.; Sundstöm, V. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 10560
- [95] Miller, K. R. *Nature* **300** (1982) 53
- [96] Stark, W.; Kühlbrandt, W.; Wildhaber, I.; Wehrli, E.; Mühlethaler, K. *EMBO J.* **3** (1984) 777
- [97] Karrasch, S.; Bullough, P. A.; Gosh, R. *EMBO J.* **14** (2000) 631
- [98] Walz, T.; Ghosh, R. *J. Mol. Biol.* **265** (1997) 107
- [99] Pearlstein, R. M. in *Chlorophylls* Scheer, H. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991 S.1047-1078
- [100] Krueger, B. P.; Scholes, G. D.; Fleming, G. R. *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 5378
- [101] Jimenez, R.; Dikshit, S. N.; Bradforth, S. E.; Fleming, G. R. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 6825

- [102] Novoderezhkin, V.; Monshouwer, R.; van Grondelle, R. *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 10540
- [103] Monshouwer, R.; Abrahamsson, M.; van Mourik, F.; van Grondelle, R. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 7241
- [104] Polívka, T.; Pullerits, T.; Herek, J. L.; Sundstöm, V. *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 1088
- [105] Pullerits, T.; Chachisvilis, M.; Sundström, V. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 10787
- [106] Fidler, H.; Knoester, J.; Wiersma, D. A. *J. Chem. Phys.* **95** (1991) 7880
- [107] Skinner, J. L. *J. Phys. Chem. B* **98** (1994) 2503
- [108] Meier, T.; Zhao, Y.; Chernyak, V.; Mukamel, S. *J. Chem. Phys.* **107** (1997) 3876
- [109] Leegwater, J. A. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 14403
- [110] Cogdell, R. J.; Hawthornthwaite, A. in *The Photosynthetic Reaction Center* Deisenhofer, J.; Norris, J. R. (Ed.), Academic Press, San Diego, 1993 S.23-42
- [111] Ha, T.; Laurence, T. A.; Chemla, D. S.; Weiss, S. *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 6839
- [112] Hess, S.; Feldchtein, F.; Babin, A.; Nurgaleev, I.; Pullerits, T.; Sergeev, A.; Sundström, V. *Chem. Phys. Lett.* **216** (1993) 247
- [113] Scholes, G. D.; Fleming, G. R. *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 1854
- [114] Stahlberg, H.; Dubochet, J.; Vogel, H.; Ghosh, R. *J. Mol. Biol.* **282** (1998) 819
- [115] Bopp, M. A.; Sytnik, A.; Howard, T. D.; Cogdell, R. J.; Hochstrasser, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 11271
- [116] Wu, H. M.; Reddy, N. R. S.; Small, G. J. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 651
- [117] den Hartog, F. T. H.; van Papendrecht, C.; Störkel, U.; Völker, S. *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 1375

- [118] Störkel, U.; Creemers, T. M. H.; den Hartog, F. T. H.; Völker, S. *J. Lumin.* **76&77** (1998) 327
- [119] Sturgis, J. N.; Robert, B. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 7227
- [120] Book, L. D.; Ostafin, A. E.; Ponomarenko, N.; Norris, J. R.; Scherer, N. F. *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 8295
- [121] Wolfe, S. L. *Molecular and cellular biology*, Wadsworth Publishing, Belmont, 1993
- [122] Voet, D. and Voet, J. G. *Biochemistry*, Wiley, New York, 1995
- [123] Barber, J.; Kühlbrandt, W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** (1999) 469
- [124] Dekker, J. P.; van Roon, H.; Boekem, E. J. *FEBS Lett.* **449** (1999) 211
- [125] Kühlbrandt, W.; Wang, D. N.; Fujiyoshi, Y. *Nature* **367** (1994) 614
- [126] Rogl, H.; Kühlbrandt, W. *Biochemistry* **38** (1999) 16214
- [127] Plumley, F. G.; Schmidt, G. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 146
- [128] Kleima, F. J.; Gradinaru, C. C.; Calkoen, F.; van Stokkum, I. H. M.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Biochemistry* **36** (1997) 15262
- [129] Conelly, J. P.; Müller, M. G.; Hucke, M.; Gatzen, G.; Mullineaux, C. W.; Ruban, A. V.; Horton, P.; Holzwarth, A. R. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 1902
- [130] Trinkunas, G.; Conelly, J. P.; Müller, M. G.; Valkunas, L.; Holzwarth, A. R. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 7313
- [131] Gradinaru, C. C.; Özdemir, S.; Gülen, D.; van Stokkum, I. H.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Biophys. J.* **75** (1998) 3064
- [132] Krupa, Z.; Huner, N. P. A.; Williams, J. P.; Maissan, E.; James, D. R. *Plant Physiol.* **84** (1987) 19

- [133] Nussberger, S.; Dekker, J. P.; Kühlbrandt, W.; van Bolhuis, B. M.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Biochemistry* **33** (1994) 14775
- [134] Pieper, J.; Rätsep, M.; Jankowiak, R.; Irrgang, K.-D.; Voigt, J.; Renger, G.; Small, G. *J. J. Phys. Chem. A* **103** (1999) 2412
- [135] Wu, M.; Goodwin, P. M.; Ambrose, W. P.; Keller, R. A. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 17406
- [136] Schubert, A.; Beenken, W.; Stiel, H.; Ehlert, J.; Leupold, D.; Lokstein, H. *Biophys. J.* submitted (2000)
- [137] Ying, L.; Xie, X. S. *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 10399
- [138] Barzda, V.; Peterman, E. J. G.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *Biochemistry* **37** (1998) 546
- [139] Hemelrijk, P. W.; Kwa, S. L. S.; van Grondelle, R.; Dekker, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1098** (1992) 159
- [140] Vasil'ev, S.; Irrgang, K.-D.; Schrötter, T.; Bergmann, A.; Eichler, H.-J.; Renger, G. *Biochemistry* **36** (1997) 7503
- [141] Peterman, E. J. G.; Pullerits, T.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 4448
- [142] Vasil'ev, S.; Schrötter, T.; Bergmann, A.; Irrgang, K.-D.; Eichler, H.-J.; Renger, G. *Photosynthetica* **33** (1997) 553
- [143] Linderstrøm-Lang, K. U.; Schellman, J. A. *Enzyme* **1** (1959) 443
- [144] Frauenfelder, H.; Sligar, S. G.; Wolynes, P. G. *Science* **254** (1991) 1598
- [145] Frauenfelder, H.; Wolynes, P. G. *Phys. Today* **47** (1994) 58
- [146] Gafert, J.; Pschierer, H.; Friedrich, J. *Phys. Rev. Lett.* **74** (1995) 3704

- [147] Leeson, D. T.; Wiersma, D. A. *Phys. Rev. Lett.* **74** (1995) 2138
- [148] Ruban, A. V.; Horton, P. *Plant Physiol.* **119** (1999) 531
- [149] Havaux, M.; Niyogi, K. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 8762
- [150] Ruban, A. V.; Pesaresi, P.; Wacker, U.; Irrgang, K.-D.; Bassi, R.; Horton, P. *Biochemistry* **37** (1998) 11586
- [151] Walters, R. G.; Ruban, A. V.; Horton, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 14204
- [152] Ketelaars, M., persönliche Mitteilung
- [153] Rogl, H., persönliche Mitteilung



## Danksagung

Diese Arbeit wurde nahezu vollständig am Lehrstuhl für Optische Spektroskopie und Molekülphysik an der Technischen Universität Chemnitz angefertigt. Herrn Prof. Christian von Borczyskowski danke ich für die freundliche Aufnahme an seinen Lehrstuhl.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jörg Wrachtrup, der sämtliche Teile dieser Arbeit aufmerksam betreute und dessen Idee es war, einzelne Antennenkomplexe zu untersuchen.

Herrn Prof. Michael Mehring (Uni-Stuttgart) danke ich für die spontane Bereitschaft, den Mitbericht zu übernehmen.

Während der gesamten Arbeit habe ich immer wieder sehr eng mit verschiedenen Kollegen zusammengearbeitet: Zusammen mit Dr. Rainer Daum untersuchte ich die einzelnen Farbstoffmoleküle, mit Dr. Oleg Chekhlov die LH2 sowie mit Dr. Fedor Jelezko und Uwe Gerken die LHC-II.

Auch den anderen Kollegen der Einzelmolekülgruppe Dr. Alexander Dräbenstedt, Dr. Ludovic Fleury, Jörg Schuster und Achim Gruber möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Axel Schubert (HU-Berlin) schlug erstmals vor, einzelne LHC-II zu untersuchen. Er und Hans Rogl (MPI Frankfurt) zeichnen verantwortlich für die Probenpräparation und halfen in vielen Diskussionen bei der Interpretation der Ergebnisse.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Jost von Schütz (Uni-Stuttgart), namentlich Dr. Markus Braun, Dr. Jens Blömker und Oliver Wendland, danke ich für die herzliche Aufnahme in Stuttgart und für die vielen kleinen Hilfen, die man beim Zusammenschreiben einer solchen Arbeit so braucht.

Allen Kolleginnen und Kollegen in Chemnitz und Stuttgart danke ich für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.